



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 باجي مختار - عنابة -

UNIVERSITÉ BADJI MOKHTAR-ANNABA

FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

Thèse En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Végétale

Intitulé :

Phytoépuration des eaux contaminées par le Nickel et le Cadmium : étude comportementale des plantes néoformées de *Phragmites australis* dans un système de lagunage expérimental.

Présenté par : Mr. BOUCHAMA Khaled

Directeur de thèse : Pr. ROUABHI Rachid Université de Tébessa

Co-Directeur de thèse : Pr. DJEBAR Med-Réda Centre de Recherche en Environnement, Annaba

Membres du Jury :

Pr. KADRI Skander	Président	Université Badji-Mokhtar, Annaba.
Pr. KHALDI Fadila	Examinatrice	Université Mohamed-Chérif Messaadia Souk Ahras
Dr. ALAYAT Amel	Examinatrice	Université Chadli Bendjedid El Tarf.
Dr. BENOSMANE Sana	Examinatrice	Université 8 Mai 1945, Guelma.

Année universitaire : 2024/2025

Remerciements

Au terme de ce travail de recherche, je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de cette thèse.

*Mes premiers remerciements vont à mon directeur de thèse, **Pr. ROUABHAI Rachid**, Professeur à l'Université de Tébessa pour sa confiance, ses précieux conseils et son soutien indéfectible tout au long de ce parcours.*

*Ma plus profonde reconnaissance s'adresse au **Pr. DJEBAR Mohammed Réda**, Professeur à l'Université Badji-Mokhtar Annaba et directeur adjoint au Centre de Recherche en Environnement d'Annaba. Je lui exprime une reconnaissance particulière pour la pertinence de ses recommandations.*

Je remercie également les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer ce travail. Leur expertise et leurs remarques constructives contribueront, sans nul doute, à enrichir ma réflexion.

*J'adresse mes sincères remerciements au **Pr. KADRI Skander**, Professeur à l'Université Badji-Mokhtar d'Annaba, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.*

*Je souhaite exprimer ma sincère reconnaissance au **Dr. ALAYAT Amel**, maître de conférences à l'Université d'EL Tarf, pour l'attention portée à l'analyse de mon travail. Je lui suis profondément reconnaissant pour son engagement dans l'évaluation de ma thèse.*

*Je voudrais également exprimer ma gratitude au **Dr. ISSAAD Ghozlène**, maître de conférences à l'Université Badji-Mokhtar d'Annaba, pour avoir eu l'amabilité de faire partie de mon jury.*

*Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au **Dr. BENOSMANE Sana** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Son expertise et ses précieux conseils contribueront grandement à l'enrichissement de mon travail.*

*Je souhaite exprimer ma sincère gratitude au **Pr. Margherita Ferrante** et au **Pr. Giuseppe Cirelli**, tous deux professeurs à l'Université de Catane, ainsi qu'au **Pr. Lucia Guilhermino**, professeur à l'Université de Porto, pour leur accueil chaleureux dans leurs laboratoires respectifs durant plusieurs années, ce qui m'a permis de mener à bien des éléments clés de ce travail de recherche.*

Résumé

Dans le contexte actuel, l'emploi de macrophytes au sein des systèmes de lagunage pour la phytoépuration représente une approche écologiquement responsable, performante et économiquement avantageuse dans l'élimination des éléments traces métalliques (ETMs). Néanmoins, l'optimisation de ces systèmes requiert une sélection rigoureuse des espèces végétales les plus appropriées aux paramètres environnementaux particuliers des marais filtrants.

Dans cette optique, la présente étude vise à examiner les réponses adaptatives de la macrophyte émergente *Phragmites australis* dans des eaux contaminées par différentes doses simples et combinées de cadmium (Cd) et/ou de nickel (Ni) au sein d'un système de lagunage expérimental. Une analyse comportementale des plantes a été réalisée, prenant en compte plusieurs aspects, comme la germination des graines, la croissance précoce des jeunes pousses, évaluée à l'aide de six indices, la multiplication végétative et l'accumulation du Cd et du Ni dans les différents organes. Des paramètres métaboliques, incluant des marqueurs enzymatiques (CAT, GPOx et GST) associés au stress, ont également été examinés. Une évaluation des perturbations physiologiques, histologiques et anatomiques a été effectuée en utilisant la coloration au Phloroglucinol (méthode de Wiesner) ainsi que des observations au microscope électronique à balayage (MEB).

Les résultats mettent en évidence une série d'adaptations à plusieurs niveaux ; physiologique, biochimique et anatomique. Il en ressort que toutes les doses testées ont eu un impact négatif sur le taux et la vitesse de germination, ainsi que sur la croissance précoce des pousses. À l'exception des faibles doses de Ni, qui ont produit un effet légèrement positif, étant donné que le Ni est bénéfique à faibles doses. Les jeunes pousses issues des graines ont montré une capacité à moduler leur système antioxydant pour neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées suite à l'accumulation de Cd et de Ni. Les plantules issues des rhizomes ont démontré également une remarquable capacité d'adaptation face aux fortes doses testées. Cette plasticité s'est manifestée par des ajustements au niveau de leur teneur en chlorophylle, en protéines et en lipides, ainsi que par une modulation de leur système antioxydant enzymatique.

Sur le plan anatomique, des modifications structurelles des tissus ont été observées, plus marquées sous l'exposition au Cd qu'au Ni. Notamment, un épaississement du rhizoderme accompagné d'une lignification au sein des tissus foliaires et caulinaires a été noté.

L'efficacité de la phytoépuration a été confirmée également dans notre marais filtrant, avec des taux d'abattement significatifs allant de 22 % à 63 % selon la dose et l'ETM appliqué.

Mots clés : Marais filtrant, Phytoépuration, *Phragmites australis*, Cadmium, Antioxydant.

Abstract

Given the current situation, using macrophytes within constructed wetland systems for Phyto-purification offers an environmentally sustainable, high-performance, and economically viable solution for the elimination of trace metal elements (ETMs). However, optimizing these systems requires rigorous selection of plant species most suitable for the specific environmental parameters of constructed wetlands.

In this perspective, the present study aims to examine the adaptive responses of the emergent macrophyte *Phragmites australis* in waters contaminated with various single and combined doses of cadmium (Cd) and/or nickel (Ni) within an experimental constructed wetland. A behavioral analysis of the plants was conducted, taking into account several aspects, such as seed germination, early growth of seedlings (evaluated using six indices), vegetative multiplication, and the accumulation of Cd and Ni in the different organs. Metabolic parameters, including enzymatic stress markers (CAT, GPOx, and GST), were also examined. An assessment of physiological, histological, and anatomical disturbances was performed using Phloroglucinol staining (Wiesner method) and scanning electron microscope (SEM) observations.

The results highlight a series of adaptations at multiple levels: physiological, biochemical, and anatomical. It was found that all tested doses had a negative impact on germination rate and speed, as well as on early seedling growth, with the exception of low Ni doses, which produced a slightly positive effect, given that Ni is beneficial at low doses. Seedlings from seeds demonstrated the ability to modulate their antioxidant system to neutralize reactive oxygen species (ROS) generated following the accumulation of Cd and Ni. Seedlings from rhizomes also demonstrated a remarkable capacity for adaptation to high tested doses. This plasticity was manifested through adjustments in their chlorophyll, protein, and lipid content, as well as modulation of their enzymatic antioxidant system.

Anatomically, structural modifications of tissues were observed, more pronounced under Cd exposure than Ni. Notably, a thickening of the rhizodermis accompanied by lignification within leaf and stem tissues was noted. The efficiency of phytoremediation was also confirmed in our constructed wetland, with significant removal rates ranging from 22% to 63%, depending on the dose and ETM applied.

Keywords: Constructed Wetland, Phyto-purification, *Phragmites australis*, Cadmium, Antioxidant.

ملخص

في الوقت الراهن، يُمتل استخدام النباتات المائية في أنظمة الأراضي الرطبة الاصطناعية نهجًا فعالًا بيئيًا، وذا جدوى اقتصادية، وكفؤًا من حيث الأداء لمعالجة المياه وإزالة العناصر المعدنية الثقيلة النزرية. غير أن تعزيز كفاءة هذه الأنظمة يتطلب اختيارًا دقيقًا ومدروسًا للأنواع النباتية الأكثر ملاءمةً وتكيفًا مع الظروف البيئية الخاصة بالمستنقعات المرشحة أو الأراضي الرطبة المنشأة.

في هذا السياق، تهدف الدراسة الحالية إلى تقييم الاستجابات والخصائص التأقلمية للنبات المائي *Phragmites australis* ضمن نظام بحيرة اصطناعية تجريبية ملوثة بتركيزات مختلفة، مفردة ومركبة، من الكاديوم (Cd) و/أو النيكل (Ni). تم إجراء تحليل شامل لسلوك النبات، شمل مراحل إنبات البذور، والنمو المبكر للشتلات (باستخدام ستة مؤشرات)، التكاثر الخضري، وتراكم المعادن الثقيلة في الأعضاء المختلفة. كما تم تقييم المؤشرات الأيضية، بما في ذلك علامات الإجهاد الإنزيمي: (CAT و GPOx و GST). وقد شمل التقييم أيضًا دراسة للاضطرابات الفسيولوجية والتشريحية والنسجية باستخدام صبغة الفلوروغلوسينول (طريقة Wiesner)، بالإضافة إلى دراسة نسيجية باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح (MEB).

أظهرت النتائج أن *Phragmites australis* تتمتع بقدرة عالية على التكيف على مستويات متعددة، تشمل الجوانب الفسيولوجية، والكيميائية الحيوية، والتشريحية. وأوضحت النتائج أن جميع الجرعات المختبرة أثرت سلبيًا على معدلات وسرعة الإنبات، وكذلك على نمو الشتلات، باستثناء الجرعات المنخفضة من النيكل، التي أبدت تأثيرًا إيجابيًا طفيفًا، نظرًا لكون النيكل عنصرًا نزرًا قد يكون نافعًا للنباتات عند تركيزات منخفضة. كما أبانت النتائج أن الشتلات الناتجة من البذور قادرة على تعديل نظامها المضاد للأكسدة للتخلص من أنواع الأكسجين التفاعلية الناتجة عن تراكم الكاديوم والنيكل في أعضاء النبات. كما أظهرت نتائج التجربة على الشتلات الناتجة من الجذامير قدرة ملحوظة على التكيف والتأقلم مع الجرعات العالية المختبرة. تجلت هذه المرونة من خلال تعديلات في محتوى الكلوروفيل، البروتينات، والدهون، فضلاً عن تعديل نظامها الإنزيمي المضاد للأكسدة.

أما من الناحية التشريحية والنسجية، فقد تم رصد تغيرات بنوية واضحة، كانت أكثر وضوحًا تحت تأثير الكاديوم مقارنةً بالنيكل، حيث لوحظ بشكل خاص تسمك في البشرة الخارجية للجذور، يرافقه تخشب ملحوظ في أنسجة الأوراق والسيقان. وفيما يتعلق بفعالية البحيرة الاصطناعية التجريبية، فقد أظهرت الدراسة كفاءة عالية في المعالجة النباتية، تمثلت في معدلات تصفية كبيرة تراوحت بين 22% و 63%، اعتمادًا على نوع العنصر المعدني وتركيزه.

الكلمات المفتاحية: الأراضي الرطبة المنشأة، المعالجة النباتية، *Phragmites australis*، الكاديوم، مضادات الأكسدة.

Table des matières

Remerciements.....	i
Dédicaces.....	ii
Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
ملخص	v
Table des matières.....	vi
Liste des figures	xii
Liste des tableaux	xv
Liste des symboles.....	xvii
Introduction.....	1

Partie 1 :Synthèse bibliographique

Chapitre I : Phytoépuration et lagunage	6
1 Les ressources en eau non conventionnelles	6
1.1 Dessalement de l'eau de mer et saumâtre	6
1.2 Traitement des eaux usées	8
1.2.1 Station d'épuration des eaux usées	8
1.2.2 Le lagunage.....	10
2 Les macrophytes émergents utilisée dans un system de lagunage	12
3 Phytoépuration par lagunage à macrophytes.....	15
4 Types de marais filtrants	16
4.1 Marais filtrant à écoulement surfacique.....	16
4.2 Marais filtrant à écoulement subsurfacique	17
4.2.1 Marais filtrant à écoulement subsurfacique horizontal.....	18
4.2.2 Marais filtrant à écoulement subsurfacique vertical.....	18
4.3 Marais filtrant flottant.....	20
4.4 Système de marais filtrant hybrides	20
5 Traitements des eaux contaminées par les métaux lourds.....	21

6	Normes et valeurs limites des ETMs dans les effluents.....	23
	Chapitre II : Etude écotoxicologiques	24
1	Généralité	24
2	Phytodisponibilité et spéciation d'éléments traces métalliques	24
2.1	Phytodisponibilité et spéciation du cadmium	25
2.2	Phytodisponibilité et spéciation du nickel	27
3	Phytotoxicité d'éléments traces métalliques	28
3.1	Phytotoxicité du cadmium	30
3.2	Phytotoxicité du nickel	31
4	Mécanismes de tolérance et de détoxification.....	33
4.1	L'évitement.....	34
4.2	La Tolérance	34

Partie 2 : Expérimentations et discussions des résultats

	Chapitre I : Phytotoxicité de Cd et/ou Ni sur la germination	36
1	Matériel et méthodes	36
1.1	Test de germination.....	36
1.2	Test de phytotoxicité.....	37
1.3	Indices de germination	38
1.4	Dosage des enzymes du système antioxydant	39
1.4.1	Dosage de l'activité GUAÏCOL-PEROXYDASE (GPOx).....	40
1.4.2	Dosage de l'activité CATALASE (CAT)	40
1.4.3	Dosage de l'activité GLUTATHION-S-TRANSFÉRISE (GST).....	41
2	Analyse statistique.....	41
3	Résultats	42
3.1	Pourcentage final de germination	42
3.2	Indices de germination	44
3.2.1	Temps moyen de germination (MGT).....	44
3.2.2	Temps de 50% de germination (T50%).....	44
3.2.3	Indice de germination (IG)	45

3.2.4	Indice de longueur de la radicule et de la racine (RLI)	47
3.2.4.1	Indice de longueur de la racine (RLI) sous les doses de Cd.....	47
3.2.4.2	Indice de longueur de la racine (RLI) sous les doses de Ni	47
3.2.4.3	Indice de longueur de la racine (RLI) sous les doses mixtes	48
3.2.5	Indice de longueur des pousses (PLI).....	52
3.2.5.1	Indice de croissance en longueur des pousses (PLI) sous les doses de Cd	52
3.2.5.2	Indice de croissance en longueur des pousses (PLI) sous les doses de Ni.....	52
3.2.5.3	Indice de croissance en longueur des pousses (PLI) sous les doses mixtes	53
3.3	Enzymes du système antioxydant	55
3.3.1	Activité enzymatique du système antioxydant sous Cd	55
3.3.2	Activité enzymatique du système antioxydant sous Ni	58
3.3.3	Activité enzymatique du système antioxydant sous les doses mixtes	61
4	Discussion	64
4.1	Indices de germination	64
4.2	Indice de longueur de la radicule et de la racine (RLI).....	68
4.3	Indice de longueur des pousses (PLI)	71
4.4	Enzymes du système antioxydant	75
5	Conclusion.....	83
Chapitre II : Phytoépuration des eaux contaminées par le Cadmium et/ou le Nickel		87
1	Matériel et méthodes	87
1.1	Matériel végétal	87
1.2	Dispositif expérimental et conditions de culture	87
1.3	Taux de plantules néoformées dans le marais filtrant.....	91
1.4	Dosage du cadmium et du nickel	91
1.4.1	Dosage du Cd et du Ni à la sortie du marais filtrant.....	91
1.4.2	Dosage du Cd et du Ni dans les plantes.....	91
1.5	Spéciation chimique du Cd et du Ni dans le marais filtrant	92
2	Analyse statistique.....	92
3	Résultats	93
3.1	Taux total de plantules néoformées dans le marais filtrant.....	93

3.2	Taux de plantules néoformées sous le Cd dans les étages du marais filtrant	94
3.3	Taux de plantules néoformées sous le Ni dans les étages du marais filtrant	95
3.4	Taux de plantules néoformées sous les doses mixtes	96
3.5	Dosage du Cd et du Ni dans les eaux des étages du marais filtrant.....	97
3.5.1	Dosage du Cadmium	97
3.5.2	Dosage du Nickel.....	98
3.6	Spéciation chimique du Cd et du Ni dans le marais filtrant	100
3.6.1	Spéciation chimique des doses simples de Cd.....	100
3.6.2	Spéciation chimique des doses simples de Ni	101
3.6.3	Spéciation chimique des doses mixtes de Cd et de Ni	102
3.7	Accumulation de Cd et de Ni dans les plantules néoformées	105
3.7.1	Accumulation de Cd dans les plantules exposées à des doses individuelles.....	105
3.7.2	Accumulation de Ni dans les plantules exposées à des doses individuelles	107
3.7.3	Accumulation de Cd et de Ni dans la partie aérienne sous des doses mixtes.....	109
3.7.4	Accumulation de Cd et de Ni dans la partie souterraine sous des doses mixtes	110
4	Discussion	112
4.1	Taux de plantules néoformées dans le marais filtrant.....	112
4.2	Dosage du Cd et Ni dans les eaux du marais filtrant et les plantes néoformées.....	117
4.3	Dosage du Cd et Ni dans les plantes néoformées.	121
5	Conclusion	127
Chapitre III : Réponses métabolique, enzymatique.....		129
1	Matériel et méthodes	129
1.1	Dispositif expérimental.....	129
1.2	Conditions de culture	129
1.3	Dosage du Cadmium et du Nickel dans les plantes	130
1.4	Dosage de la chlorophylle total.....	132
1.5	Dosages des lipides totaux	132
1.6	Dosage des protéines.....	133
1.7	Dosage des enzymes du système antioxydant	133

2	Analyse statistique.....	133
3	Résultats	135
3.1	Accumulation du Cadmium et du Nickel dans les organes de <i>P. australis</i>	135
3.2	Teneur en chlorophylle totale	137
3.3	Teneur en protéines totales	138
3.4	Teneur en lipide	140
3.5	Activité des enzymes du système antioxydant.....	142
3.5.1	Activité enzymatique de la catalase (CAT).....	142
3.5.2	Activité enzymatique de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx)	144
3.5.3	Activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST).....	146
3.5.4	Rapport d'activité de feuille/racine sous l'effet du Cd.....	148
3.6	Corrélation entre les différentes réponses métaboliques et enzymatiques.....	150
3.6.1	Corrélation entre les différentes réponses des plantes témoins	150
3.6.2	Corrélation entre les différentes réponses des plantes exposées au Cd.....	151
3.6.3	Corrélation entre les différentes réponses des plantes exposées au Ni.....	156
3.6.4	Corrélation entre les réponses des plantes exposées aux doses mixtes	161
4	Discussion	164
4.1	Teneur en chlorophylle et réponse métabolique	164
4.2	Teneur en protéines.....	168
4.3	Teneur en lipides.....	172
4.4	Réponse des enzymes de system antioxydant.....	175
4.4.1	Activité enzymatique de la catalase (CAT).....	175
4.4.2	Activité enzymatique de la GPOx	178
4.4.3	Activité enzymatique de la glutathion-S-transférase GST	183
4.5	Corrélation entre les différentes réponses métaboliques et enzymatiques.....	188
5	Conclusion.....	196
Chapitre IV : Caractérisation histologique sous Cd et/ou Ni		202
1	Matériel et méthodes	202
1.1	Echantillonnage.....	202

1.2	Coupe histologique et coloration	202
1.3	Caractérisation ultrastructurale des tissus racinaires	202
2	Résultats et discussion.....	203
2.1	Effet de doses simples et combinée de Cd et de Ni sur l'histologie de la feuille.....	203
2.2	Effet de doses simples et combinée de Cd et de Ni sur l'histologie de la tige	213
2.3	Effet de doses simples et combinée de Cd et de Ni sur l'histologie de la racine	219
2.4	Effet de doses simples et combinée de Cd et de Ni sur l'ultrastructure de la racine.....	226
3	Conclusion.....	233
	Conclusion générale	236
	Références bibliographiques.....	236
	Annexes	

Liste des figures

N°	Titre	Page
1	Station d'épuration des eaux usées par lagunage aéré El Guerrara, Ghardaïa, Algérie	11
2	Représentation schématique des principaux cycles biologiques dans la lagune	12
3	Une colonie de <i>Phragmites australis</i>	14
4	Tige de <i>Phragmites australis</i>	14
5	Grains de <i>Phragmites australis</i>	14
6	Classification des macrophytes	16
7	Représentation schématique d'un marais filtrant à écoulement surfacique	17
8	Coupe transversale schématique d'un marais filtrant à écoulement subsurfacique horizontal	19
9	Coupe transversale schématique d'un marais filtrant à écoulement subsurfacique vertical	19
10	Représentation schématique d'un marais filtrant flottantes	20
11	Représentation schématique d'un système de marais filtrant hybrides	21
12	Voies d'absorption de l'eau et des ETMs par les racines	29
13	Effets phytotoxiques directs et indirects du cadmium et du nickel sur les plantes	30
14	Pourcentage final de germination des graines de <i>Phragmites australis</i> (GP%) après 20 jours d'exposition à différentes concentrations de Cd (a), Ni (b), et Cd + Ni (c)	43
15	Indices de longueur des racines (RLI) et des pousses (PLI) des graines germées à 10, 20 et 30 jours exposées à différentes doses de Cd.	49
16	Indices de longueur des racines (RLI) et des pousses (PLI) des graines germées à 10, 20 et 30 jours exposées à différentes doses de Ni.	50
17	Indices de longueur des racines (RLI) et des pousses (PLI) des graines germées à 10, 20 et 30 jours exposées à différentes doses mixtes : Cd + Ni.	51
18	Plantules de <i>Phragmites australis</i> sous les différentes doses de Cd et/ou Ni après 20 jours du test de phytotoxicité. A) sous les doses de Cd, B) sous les doses de Ni et C) sous les doses mixtes de Cd + Ni.	54
19	Système de lagunage à macrophytes avec marais filtrant à écoulement surfacique en trois étages.	90
20	Taux de néoformation de plantules de <i>P. australis</i> dans les trois étages du marais filtrant en fonction des différentes doses de Cd et/ou de Ni.	93
21	Taux de néoformation des plantules de <i>P. australis</i> selon l'étage du marais filtrant et les doses simples de Cd.	94
22	Taux de néoformation des plantules de <i>P. australis</i> selon l'étage du marais filtrant et les doses simples de Ni.	95
23	Taux de néoformation des plantules de <i>P. australis</i> selon l'étage du marais filtrant et les doses combinées de Cd + Ni.	96
24	Accumulation de Cd dans les parties aériennes des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses individuelles de Cd.	106
25	Accumulation de Cd dans les parties souterraines des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses individuelles de Cd.	106
26	Accumulation de Ni dans les parties aériennes des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses individuelles de Ni.	108
27	Accumulation de Ni dans les parties souterraines des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses individuelles de Ni.	108
28	Accumulation de Cd et de Ni dans les parties aériennes (a) et souterraines (b) des plantules âgées de semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses mixtes de Cd et Ni.	111
29	Dispositif expérimental installé pour l'évaluation des réponses métaboliques et enzymatiques chez des plantes de <i>Phragmites australis</i> âgées de 10 semaines, exposées à différentes doses simples et combinées de Cd et/ou de Ni.	131

30	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe contrôle.	150
31	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd _(10 ppb) .	153
32	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd _(30 ppb)	153
33	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd _(100 ppb)	154
34	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd _(100 ppm)	154
35	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd _(500 ppm) .	155
36	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd _(1000 ppm) .	155
37	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni _(30 ppb) .	158
38	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni _(60 ppb) .	158
39	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni _(120 ppb) .	159
42	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni _(100 ppm) .	159
41	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni _(500 ppm) .	160
42	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé à Ni _(1000 ppm) .	160
43	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé à Cd _(1000 ppm) + Ni _(120ppb) .	162
44	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé à Cd _(100 ppm) + Ni _(100 ppm)	163
45	Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes de <i>P. australis</i> exposée à Cd _(100 ppb) + Ni _(1000ppm) .	163
46	Section transversale de feuille de <i>Phragmites australis</i> du groupe témoin (x80).	207
47	Section transversale de feuille de <i>Phragmites australis</i> du groupe témoin colorée au phloroglucinol-HCl (x80)	207
48	Sections transversales de feuilles de <i>Phragmites australis</i> exposées aux faibles doses de Cd : (A) 10 ppb, (B) 30 ppb, (C) 100 ppb, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).	208
49	Sections transversales de feuilles de <i>Phragmites australis</i> exposées aux doses élevées de Cd : (A) 100 ppm, (B) 500 ppm, (C) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).	209
50	Sections transversales de feuilles de <i>Phragmites australis</i> exposées aux faibles doses de Ni : (A) 30 ppb, (B) 60 ppb, (C) 120 ppb, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).	210
51	Sections transversales de feuilles de <i>Phragmites australis</i> exposées aux doses élevées de Ni : (A) 100 ppm, (B) 500 ppm, (C) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).	211
52	Sections transversales de feuilles de <i>Phragmites australis</i> exposées à différentes doses mixtes de Cd et Ni : (A) Cd _(100 ppm) +Ni _(100 ppm) , (B) Cd _(100 ppb) +Ni _(1000 ppm) , (C) Cd _(1000 ppm) +Ni _(120 ppb) , colorées au phloroglucinol-HCl (x80).	212
53	Section transversale de tige de <i>Phragmites australis</i> du groupe témoin (x80).	215
54	Section transversale de tige de <i>Phragmites australis</i> du groupe témoin colorée au phloroglucinol-HCl (x80).	215

55	Sections transversales de tiges de <i>Phragmites australis</i> exposées à différentes doses de Ni : (A) 30 ppb, (B) 60 ppb, (C) 120 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).	216
56	Sections transversales de tiges de <i>Phragmites australis</i> exposées à différentes doses de Cd : (A) 10 ppb, (B) 30 ppb, (C) 100 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).	217
57	Sections transversales de tiges de <i>Phragmites australis</i> exposées à différentes doses mixtes de Cd et Ni : (A) Cd _(100 ppm) +Ni _(100 ppm) , (B) Cd _(100 ppb) +Ni _(1000 ppm) , (C) Cd _(1000 ppm) +Ni _(120 ppb) , colorées au phloroglucinol-HCl (x80).	218
58	Section transversale de racine de <i>Phragmites australis</i> du groupe témoin (x80)	222
59	Section transversale de racine de <i>Phragmites australis</i> du groupe témoin colorée au phloroglucinol-HCl (x80).	222
60	Sections transversales de tiges de <i>Phragmites australis</i> exposées à différentes doses de Cd : (A) 10 ppb, (B) 30 ppb, (C) 100 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80)	223
61	Sections transversales de racines de <i>Phragmites australis</i> exposées à différentes doses de Cd : (A) 10 ppb, (B) 30 ppb, (C) 100 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80)	224
62	Sections transversales de racines de <i>Phragmites australis</i> exposées à différentes doses mixtes de Cd et Ni : (A) Cd _(100 ppm) +Ni _(100 ppm) , (B) Cd _(100 ppb) +Ni _(1000 ppm) , (C) Cd _(1000 ppm) +Ni _(120 ppb) , colorées au phloroglucinol-HCl (x80).	225
63	Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des coupes transversales d'une racine témoin. (A) et (B) vue d'ensemble de la racine. (C) poils absorbants. (D) Détail de l'aérenchyme.	229
64	Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des coupes transversales des racines de <i>P. australis</i> exposées à différentes doses de Cd : (A) 10 ppb, (B) 30 ppb, (C) 100 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm.	230
65	Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des coupes transversales des racines de <i>P. australis</i> exposées à différentes doses de Ni : (A) 30 ppb, (B) 60 ppb, (C) 120 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm	231
66	Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des coupes transversales des racines de <i>P. australis</i> exposées à différentes doses mixtes de Cd et Ni : (A) Cd _(100 ppm) + Ni _(100 ppm) , (B) Cd _(100 ppb) +Ni _(1000 ppm) , (C) Cd _(1000 ppm) +Ni _(120 ppb) .	232

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
1	Efficacité des techniques de traitement des eaux usées contaminées par les ETMs	22
2	Valeurs limites des ETM en mg/l dans les effluents rejetés et traités destinés à l'irrigation, selon la réglementation algérienne et les normes de l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA), de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).	23
3	Pourcentage final de germination (GP%), Temps moyen de germination (MGT), Temps jusqu'à 50% de germination (T50%), Germination indice (IG) de graines de <i>P. australis</i> à différentes doses de Cd, mesurées au 20ème jour.	46
4	Pourcentage final de germination (GP%), Temps moyen de germination (MGT), Temps jusqu'à 50% de germination (T50%), Germination indice (IG) de graines de <i>P. australis</i> à différentes doses de Ni, mesurées au 20ème jour.	46
5	Pourcentage final de germination (GP%), Temps moyen de germination (MGT), Temps jusqu'à 50% de germination (T50%), Germination indice (IG) de graines de <i>P. australis</i> à différentes doses mixtes de Cd+Ni, mesurées au 20ème jour.	46
6	Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des semis de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Cd après 30 jours de germination.	57
7	Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des semis de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Cd après 30 jours de germination.	57
8	Activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des semis de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Cd après 30 jours de germination.	57
9	Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des semis de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Ni après 30 jours de germination.	60
10	Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des semis de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Ni après 30 jours de germination.	60
11	Activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des semis de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Ni après 30 jours de germination.	60
12	Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des semis de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses mixtes de Cd +Ni après 30 jours de germination.	63
13	Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des semis de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses mixtes de Cd +Ni après 30 jours de germination.	63
14	Activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des semis de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses mixtes de Cd +Ni après 30 jours de germination.	63
15	Moyennes périodiques des températures enregistrées au cours de l'expérimentation	89
16	Quantités de Cd mesurées et éliminées à la sortie des étages du marais filtrant selon les différentes doses de Cd testées.	98
17	Quantités de Cd mesurées et éliminées à la sortie des étages du marais filtrant selon les différentes doses mixtes testées.	98
18	Quantités de Ni mesurées et éliminées à la sortie des étages du marais filtrant selon les différentes doses de Ni testées.	99
19	Quantités de Ni mesurées et éliminées à la sortie des étages du marais filtrant selon les différentes doses mixtes testées.	99
20	Spéciation chimique de CdCl ₂ dans les eaux du marais filtrant.	100
21	Spéciation chimique de NiCl ₂ dans les eaux du marais filtrant.	101
22	Spéciation chimique de CdCl ₂ et NiCl ₂ dans les eaux du marais filtrant sous la dose combinée Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb).	102
23	Spéciation chimique de CdCl ₂ et NiCl ₂ dans les eaux du marais filtrant sous la dose combinée Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm).	103

24	Spéciation chimique de CdCl ₂ et NiCl ₂ dans les eaux du marais filtrant sous la dose combinée Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm).	104
25	Accumulation de Cd dans les différents organes de <i>P. australis</i> en fonction des doses de Cd appliquées.	135
26	Accumulation de Ni dans les différents organes de <i>P. australis</i> en fonction des doses de Ni appliquées	136
27	Accumulation de Cd dans les différents organes de <i>P. australis</i> en fonction des doses mixtes de Cd +Ni appliquées.	136
28	Accumulation de Ni dans les différents organes de <i>P. australis</i> en fonction des doses mixtes de Cd +Ni appliquées.	136
29	La teneur en chlorophylle totale dans les feuilles des plantes de <i>P. australis</i> exposées à des doses simples et combinées de Cd et/ou Ni.	137
30	La teneur en protéines dans les organes de <i>P. australis</i> sous des doses simples de Cd.	139
31	La teneur en protéines dans les organes de <i>P. australis</i> sous des doses simples de Ni.	139
32	La teneur en protéines dans les organes de <i>P. australis</i> sous des doses combinées de Cd et de Ni.	139
33	La teneur en lipides dans les organes de <i>P. australis</i> sous des doses simples de Cd.	141
34	La teneur en lipides dans les organes de <i>P. australis</i> sous des doses simples de Ni.	141
35	La teneur en lipides dans les organes de <i>P. australis</i> sous des doses combinées de Cd et de Ni.	141
36	Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des plantes de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Cd.	143
37	Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des plantes de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Ni.	143
38	Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des plantes de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Cd+Ni.	143
39	Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des plantes de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Cd.	145
40	Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des plantes de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Ni.	145
41	Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des plantes de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Cd+Ni.	145
42	Activité la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des plantes de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Cd.	147
43	Activité la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des plantes de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Ni.	147
44	Activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des plantes de <i>P. australis</i> exposés à différentes doses de Cd+Ni.	147

Liste des symboles

ANOVA	Analyse de Variances
APX	Ascorbate Peroxydase
As	Arsenic
ASC	Ascorbate ou Acide Ascorbique
BBC	Bleu Brillant de Coumassie
BSA	Sérum Albumine Bovine
CAT	Catalase
Cd	Cadmium
CdCl ₂	Dichlorure de cadmium
CdCO ₃	Carbonate de cadmium
CdSO ₄	Sulfate de cadmium
CDNB	1-Chloro 2, 4 Dinitrobenzène
Chl	Chlorophylle
Chl a	Chlorophylle a
Chl b	Chlorophylle b
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
ETM	Eléments Traces Métalliques
ERO	Espèces Réactives de l'oxygène
Fe	Fer
GPOX	Gaïacol peroxydase
GR	Glutathion réductase
GSH	Glutathion réduit
GST	Glutathion-S- transférase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée)
Hg	Mercur
MDA	Malon-dialdéhyde
MF	Matière fraîche
Mg ⁺²	Magnésium
Mn	Manganèse
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucléotide réduite
Ni	Nickel
NiCl ₂	Dichlorure de nickel
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
OH	Le radical hydroxyle
Pb	Plomb
POX	Les peroxydases
PPM	Partie par million
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
Se	Sélénium
-SH	Groupe thiol (ou sulfhydryle)
SOD	Superoxyde dismutase
Zn	Zinc

Introduction

L'augmentation constante des niveaux de pollution dans les différents compartiments environnementaux est concomitante avec l'essor soutenu des secteurs des transports aériens, routiers et ferroviaires, les multiples activités industrielles, agricoles et minières, ainsi que les rejets d'eaux usées domestiques et industrielles souvent insuffisamment ou non traitées provenant des nombreuses agglomérations urbaines, contribuent de manière substantielle à cette pollution croissante des milieux naturels (Jost-Tse, 2018). Au sein de la panoplie des composés polluants générés par le secteur industriel, les métaux lourds ou éléments traces métalliques (ETM) tels que le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le chrome (Cr), le nickel (Ni) et le plomb (Pb) constituent un sujet de préoccupation environnementale majeur. De par leur caractère non biodégradable, ces éléments présentent une écotoxicité prononcée à l'égard des écosystèmes et des milieux naturels récepteurs (Adriano, 2001).

Dans les écosystèmes aquatiques naturels, les concentrations en ETM sont typiquement faibles, se situant généralement dans les gammes de l'ordre du nanogramme ou du microgramme par litre. Cependant, ces dernières années, la présence des ETMs à des teneurs supérieures aux charges naturellement rencontrées est devenue une problématique environnementale de plus en plus préoccupante (Calamari et Naeve, 1994). Une part importante de ces ETM rejetés dans l'environnement s'accumule dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques marins et d'eaux douces/continentales, à savoir les sédiments des fonds de cours d'eau, canaux, lacs, retenues et réservoirs, ainsi que les sédiments des zones estuariennes et des fonds marins. Les impacts environnementaux, sanitaires et sociétaux induits par cette contamination sont multiples et d'ordres divers (Abrahams, 2002; Adriano, 2001; Barka, 2012). L'introduction de ces ETMs dans les écosystèmes aquatiques peut résulter de rejets directs dans les masses d'eau marines et continentales, mais également de voies d'entrées indirectes telles que les lixiviats et ruissellements à partir de décharges solides et liquides, le lessivage et le ruissellement des sols agricoles, ainsi que les retombées atmosphériques issues de sources aériennes (Calamari et Naeve, 1994; Lévêque, 1996).

La pollution par les ETMs pose donc des risques avérés pour la santé humaine, avec des effets néfastes clairement établis sur les systèmes nerveux, rénal et pulmonaire, ainsi que sur les tissus osseux. Les conséquences environnementales sont également considérables. Des concentrations élevées en ETMs entraînent une diminution de la biodiversité, de la densité et de l'activité des communautés végétales et animales, ainsi qu'une dégradation de la fertilité des sols (Grison *et al.*, 2015). La compréhension scientifique des modalités, mécanismes et impacts de la pollution de la biosphère, non seulement sur les organismes vivants individuels mais aussi

sur le fonctionnement intégré des systèmes écologiques, représente un prérequis indispensable pour assurer la préservation de la qualité et de la pérennité des habitats terrestres et aquatiques (Ramade, 2007). Il est donc impératif à l'heure actuelle non seulement d'approfondir les connaissances sur les effets de ces polluants sur les organismes vivants, mais également de développer et mettre en œuvre des solutions durables visant à limiter les risques qui leur sont associés (Remon, 2006).

Les végétaux supérieurs, ainsi que les organismes associés à leurs systèmes racinaires (bactéries, champignons) constituant la rhizosphère, présentent des capacités très diversifiées et des potentialités considérables en termes d'accumulation, de tolérance et, dans certains cas, de métabolisation d'un large éventail de molécules polluantes (Vavasseur *et al.*, 2009). Ces dernières années, un intérêt considérable a été porté sur les capacités de certaines plantes à tolérer voire accumuler des ETMs. Cette propriété remarquable a permis l'émergence de nouvelles voies de recherche dédiées au traitement des sols et des eaux contaminés, dont l'objectif final est la mise en œuvre de techniques de phytoremédiation et de phytoépuration (Raskin *et al.*, 1994; Salt *et al.*, 1995). L'étude des plantes résistantes, de par leurs capacités de détoxification, d'immobilisation ou d'absorption des ETMs, pourrait donc constituer un outil prometteur. D'une part, elle permettrait d'évaluer les risques de transfert potentiel de ces contaminants métalliques au sein des écosystèmes. D'autre part, elle ouvrirait des perspectives intéressantes pour le développement de techniques de réhabilitation des milieux pollués exploitant ces propriétés végétales (Martin *et al.*, 1996).

Depuis des années, un intérêt considérable a été porté aux techniques de phytoépuration et à l'utilisation de macrophytes pour la dépollution des eaux contaminées par les ETMs (Meagher, 2000). Aujourd'hui, la phytoépuration utilisant des macrophytes aquatiques s'est imposée comme une méthode écologique, efficace et rentable pour éliminer les ETMs et autres polluants des eaux (Ali *et al.*, 2020; Anand *et al.*, 2019). Plusieurs macrophytes ont démontré une grande capacité à accumuler et éliminer des contaminants comme le zinc (Zn), l'arsenic (As), le cuivre (Cu), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le mercure (Hg) (Saha *et al.*, 2022). Les macrophytes sont devenus des outils très efficaces pour la phytoépuration grâce à leurs nombreuses propriétés génétiques, biochimiques et physiologiques. Ces caractéristiques leur confèrent une remarquable tolérance vis-à-vis de la présence des ETMs (Meagher, 2000). En raison de leurs propriétés de traitement, les macrophytes sont utilisés dans des systèmes d'épuration qui imitent les fonctions écologiques des marais naturels. Ce système est appelé le "lagunage à macrophytes", il peut également être désigné par d'autres termes équivalents comme "filtres plantés à macrophytes",

"lits de macrophytes", "zones humides artificielles", "marais filtrants", "marais construits" ou encore "constructed Wetland" en anglais (Stefanakis, 2016; Stefanakis *et al.*, 2014).

Un marais filtrant est composé d'un ou plusieurs bassins, qui peuvent contenir ou non un substrat poreux. Ce substrat peut être du gravier, du sable ou d'autres matériaux granulaires comme de la zéolithe ou de la pouzzolane. Ces bassins accueillent différents types de macrophytes : émergents (hélrophytes), submergés et/ou flottants (hydrophytes). Le marais filtrant est également doté d'un système d'alimentation en eaux usées et d'un système d'évacuation de l'eau une fois traitée (Bruch *et al.*, 2011; Selvaraj et Velvizhi, 2021). L'efficacité de l'épuration des eaux contaminées par un marais filtrant dépend de plusieurs facteurs clés : la conception et le type du marais filtrant, les conditions environnementales du système (climat, température, hydrologie, etc.), la composition de l'eau contaminée notamment la nature et la concentration des ETMs, la spéciation et la phytodisponibilité des ETM, ainsi que la capacité d'adaptation et de tolérance des macrophytes utilisés dans le traitement. Pour assurer une phytoépuration réussie dans les systèmes de marais filtrants, la sélection d'espèces végétales adaptées aux conditions locales est cruciale (Guittonny-Philippe *et al.*, 2014). Le choix des macrophytes à implanter est un élément essentiel pour garantir l'efficacité du traitement. Chaque espèce possède des capacités spécifiques à tolérer et accumuler certains types de polluants, ce qui influence directement la performance du système de phytoépuration (Guittonny-Philippe *et al.*, 2015; Kochi *et al.*, 2020).

Dans les systèmes de lagunage ou de marais filtrants, il est essentiel de sélectionner les espèces végétales les plus adaptées aux conditions environnementales imposées, ce qui nécessite une connaissance approfondie des mécanismes que les plantes utilisent dans le processus de dépollution des ETMs. Il est également crucial de comprendre les mécanismes que les plantes mettent en œuvre pour neutraliser les ETMs et atténuer leurs effets nocifs au niveau cellulaire. En outre, il convient de prendre en compte les paramètres qui influencent la performance des plantes, tels que les propriétés physico-chimiques des eaux contaminées et les conditions climatiques.

Dans ce contexte, la présente étude a pour objectif d'évaluer la capacité phytoépuration de la macrophyte émergente *Phragmites australis* dans des eaux contaminées par différentes doses simples et combinées de cadmium (Cd) et/ou de nickel (Ni) au sein d'un système de lagunage expérimental. Une analyse comportementale des plantes a été réalisée, prenant en compte plusieurs aspects, tels que la germination des graines, le débourrement des nœuds, et la formation de nouvelles plantules. Des paramètres métaboliques, incluant des marqueurs enzymatiques liés au stress, ont été examinés. Une évaluation approfondie des perturbations

physiologiques et histologiques a également été effectuée afin de déterminer les mécanismes d'adaptation et les réponses de *Phragmites australis* face à l'augmentation des concentrations en Cd et/ou Ni.

Le manuscrit est organisé en deux parties principales, traitant successivement les points suivants :

❖ **Partie 1 : Synthèse bibliographique**

- **Chapitre I :** Ce premier chapitre vise à faire une synthèse des connaissances existantes sur les ressources en eau non conventionnelles, en mettant l'accent sur l'utilisation du lagunage à macrophytes et des marais filtrants dans le traitement des eaux usées.
- **Chapitre II :** Ce chapitre examine en profondeur les aspects écotoxicologiques associés à l'utilisation des macrophytes dans les systèmes de phytoépuration. Il s'intéresse à la phytodisponibilité, à la spéciation et à la phytotoxicité du Cd et du Ni, ainsi qu'aux mécanismes de tolérance et de détoxification adoptés par les plantes.

❖ **Partie 2 : Expérimentations et discussions des résultats**

- **Chapitre I :** Dans ce chapitre, nous analysons les effets du Cd et/ou Ni sur la germination des grains de *P. australis*, la croissance précoce des plantules, et la réponse enzymatique antioxydante. Cela permet d'évaluer le potentiel de cette espèce à se propager et à se régénérer par reproduction sexuée dans les marais filtrants.
- **Chapitre II :** Ce deuxième chapitre se concentre sur le comportement et la capacité de *P. australis* à se régénérer de manière végétative dans un système expérimental de lagunage à macrophytes ; en analysant les effets du Cd et/ou du Ni sur le débourrement des nœuds des rhizomes et la néoformation de jeunes plants, ainsi que la capacité du système épuratoire.
- **Chapitre III :** Ce chapitre se concentre sur les réponses métaboliques et enzymatiques de *P. australis* exposé au Cd et/ou au Ni. Nous mettons en lumière les résultats obtenus, notamment l'accumulation de Cd et de Ni dans les organes de *P. australis*, ainsi que les teneurs en chlorophylle, en protéines et en lipides. L'activité enzymatique est également détaillée, avec un accent particulier sur les variations observées entre les trois organes.
- **Chapitre IV :** Dans ce chapitre, nous avons réalisé des coupes histologiques pour analyser les modifications structurelles et ultrastructurales potentielles dans les organes de *P. australis* (feuille, tige et racine) sous l'influence de diverses doses de Cd et/ou de Ni. En identifiant les altérations spécifiques au sein des tissus, nous pourrions examiner

les mécanismes de défense déployés par *P. australis* face aux différentes doses, qu'elles soient appliquées individuellement ou en combinaison.

- Enfin, une conclusion qui résumera les points clés de l'étude et proposera des pistes de recherche futures.

Chapitre I : Phytoépuration et lagunage

1 Les ressources en eau non conventionnelles

Au cours de la dernière décennie le risque de pénurie d'eau est devenu une préoccupation mondiale majeure. La croissance démographique, associée à la pollution et à des dispositifs de gouvernance inadéquats ont contribué à l'épuisement des ressources en eau, et la situation pourrait se détériorer davantage si aucune mesure n'est prise dans les années à venir (Bouchama, 2022). Il est bien reconnu que la répartition de l'eau dans la planète est extrêmement inégale. De toute l'eau qui existe sur notre planète 97,2% est constituée d'eau salée inutilisable pour l'homme ; sur les 2.8 % restants, 2,1 % sont sous forme de glace et calottes glaciaires; 0,6 % sous forme souterraine; 0,1 % est dans l'atmosphère et seulement moins de 0,1 % est disponible dans les rivières, lacs et marécages (Baechler, 2012). Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), les prélèvements annuels d'eau conventionnelle (eau des nappes souterraines, eau superficielle, barrage, lac...etc.) à l'échelle mondiale est estimé à environ 4250 km³, l'agriculture est le secteur le plus consommateur d'eau, représentant 71,7 % de la consommation mondiale totale (FAO, 2021). Avec l'augmentation de la population et un développement économique excessif, le déséquilibre entre l'offre et la demande en eau s'est élargi et est devenu l'un des principaux obstacles au développement durable (Karimidastenaie *et al.*, 2022; J. Li *et al.*, 2022).

Face aux défis du dérèglement climatique, de la pollution et de l'insuffisance des ressources conventionnelles, le recours aux eaux non-conventionnelles peuvent constituer une ressource alternative pour satisfaire les demandes croissantes en eau (Souak, 2008). L'exploitation des eaux issues du traitement des eaux usées et du dessalement des eaux de mer ou saumâtre peut réduire les pressions exercées sur les ressources en eau conventionnelles et contribuer aussi à la lutte contre la détérioration de la qualité de l'eau (Al-Haddad *et al.*, 2015).

1.1 Dessalement de l'eau de mer et saumâtre

Face à l'augmentation de la demande en eau et à la diminution de l'approvisionnement en eau douce, trouver des sources d'eau alternatives est devenu plus qu'une nécessité. Au cours des dernières années, le dessalement de l'eau est en train de devenir une solution clé pour répondre aux besoins croissants en eau, en particulier dans les pays en situation de stress hydrique (Darre et Toor, 2018). L'ancienne idée de dessaler de l'eau est née du besoin en eau potable. Cependant, c'est seulement récemment que cette technologie a atteint un stade industriel (Salomon, 2012). L'eau dessalée est produite soit à partir d'eau saumâtre, dont la teneur en sel est inférieure à

10 g/l, ou de l'eau de mer qui a généralement une salinité comprise entre 30 à 44 g/l (Debele Negewo et Ward, 2019). Globalement les méthodes de dessalement des eaux sont classées en deux catégories :

-Les procédés thermiques qui font intervenir un changement de phase, cette catégorie comprenant les diverses méthodes de distillation (évaporation) et de séparation par le froid (congélation) (Desjardins, 1997). En général, les procédés thermiques sont des méthodes efficaces, ils ne nécessitent pas d'additifs chimiques et de maintenance majeure mais ils nécessitent des coûts initiaux élevés et une consommation d'énergie importante (Debele Negewo et Ward, 2019).

- Les procédés membranaires, cette catégorie comprenant : L'osmose inverse (ou reverse osmosis : RO), la nanofiltration (NF) et l'électrodialyse (ED). RO et NF utilisent une membrane semi-perméable pour éliminer les ions, par l'application d'une pression hydraulique pour forcer l'eau à circuler à travers la membrane. Cependant le procédé de l'électrodialyse applique un champ électrique pour la séparation du sel (Beltrán et Koo-Oshima, 2006; Debele Negewo et Ward, 2019). À l'échelle mondiale, on compte environ 16 000 usines de dessalement, qui produisent autour de 100 millions m³/jour. Le coût de cette technique a toujours été le principal obstacle limitant son application, on estime que les grandes usines de dessalement peuvent produire de l'eau à un coût compris entre 0,5 et 2 USD/m³ (FAO, 2020). Malgré que le dessalement par les procédés thermiques et membranaires ont devenus beaucoup plus efficaces et rentables en raison d'une baisse des coûts et de l'énergie consommée, l'installation d'usines de dessalement nécessite toujours des investissements conséquents (Debele Negewo et Ward, 2019). Outre les coûts énergétiques et de maintenance, la gestion et l'élimination de la saumure (principal déchet) est une autre préoccupation commune pour tous les usines de dessalement (Xu *et al.*, 2013). Le traitement de la saumure peut être effectué soit par une deuxième phase de dessalement ou par l'élimination en la rejetant dans les eaux de surface, si la saumure répond aux normes réglementaires. Selon Omerspahic *et al.* (2022), la méthode la plus courante pour se débarrasser de la saumure est de la rejeter directement dans la mer ou l'océan à l'aide d'une conduite. Cette pratique entraîne une pollution marine considérable qui affecte gravement les écosystèmes marins. La salinité élevée de la saumure peut entraîner des perturbations graves dans les écosystèmes marins, en particulier pour les organismes benthiques, ce qui peut à son tour entraîner une réduction du nombre de bactéries benthiques, de phytoplancton, d'invertébrés et de communautés de poissons (Frank *et al.*, 2017). Les eaux de la saumure peuvent aussi contenir des métaux lourds tels que le cuivre (Cu), le fer (Fe),

le nickel (Ni), le chrome (Cr) et le molybdène (Mo). Il est donc important de surveiller la qualité de l'eau autour des usines de dessalement (Alshahri, 2017).

1.2 Traitement des eaux usées

Le traitement des eaux usées est le processus d'amélioration de la qualité des effluents liquides qui peuvent être réutilisés ou rejetés dans le milieu naturel avec un minimum de risques sanitaires et d'impact sur l'environnement (Nizamuddin *et al.*, 2019). Le traitement des eaux usées est le moyen par lequel l'eau qui a été utilisée et/ou contaminée par l'homme ou la nature est restaurée à une qualité souhaitable. Le traitement peut être chimique, biologique ou physique ou en une combinaison de ces méthodes. Les eaux usées peuvent être traitées à n'importe quel niveau de qualité souhaité, que ce soit pour le rejeter dans le milieu naturel, l'alimentation en eau potable ou l'irrigation (Englande *et al.*, 2015). L'eau usée traitée est généralement réutilisée à des fins non potables, telles que l'agriculture, la recharge des aquifères, l'irrigation urbaine d'espaces verts, la lutte contre les incendies et les activités de construction. Elle peut également être utilisée pour le refroidissement dans les centrales thermiques (Angelakis et Snyder, 2015; Yang *et al.*, 2017).

L'utilisation d'eau recyclée pour l'alimentation en eau potable est moins commun, mais certains pays comme Singapour, l'Australie, et les États-Unis d'Amérique boivent déjà de l'eau recyclée, ce qui montre que les eaux usées épurées peuvent être sûres si elles sont purifiées avec des procédés appropriés (Ananda, 2019; Barbier, 2009; Guo *et al.*, 2014; Lee et Tan, 2016). Le choix du procédé de traitement des eaux usées est influencé par plusieurs paramètres, tels que la nature des eaux usées, l'objectif de leur réutilisation, les moyens financiers et techniques disponibles et les normes ou les standards de qualités requises (Cunha *et al.*, 2021; Kesari *et al.*, 2021).

1.2.1 Station d'épuration des eaux usées

Une station d'épuration ou de traitement des eaux usées est une installation dans laquelle une combinaison de divers processus sont utilisées pour épurer les eaux usées (domestiques, agricoles ou industrielles) avant de les rejeter dans le milieu naturel ou de les réutiliser (Hreiz *et al.*, 2015). Des processus mécaniques, physiques, chimiques et biologiques sont utilisés pour enlever les solides, les matières en suspensions (MES), la matière organique, et éventuellement des nutriments (Anjum *et al.*, 2016; Sharma et Bhatti, 2022).

Plusieurs étapes sont impliquées dans le processus d'épuration des eaux usées :

- **Les prétraitements (mécanique)** : qui comprends le dégrillage, dessablage, déshuilage-dégraissage.
- **Traitement primaire (physico-chimique)** : qui comprends la décantation, la coagulation, et la floculation. Pour séparer les matières en suspension et les colloïdes dans l'eau, on utilise un procédé de séparation solide/liquide basé sur la gravité. Cela implique l'ajout d'un agent de coagulation tel que le sulfate d'aluminium $Al_2(SO_4)_3$ ou le chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) pour agglomérer les particules, suivi de l'ajout d'un agent de floculation comme le sulfate ferrique $Fe_2(SO_4)_3$ pour former de plus gros agrégats (flocs) qui peuvent être séparés plus facilement de l'eau par décantation (Teh *et al.*, 2016).
- **Traitement secondaire (biologique)** : implique l'utilisation de micro-organismes, principalement des bactéries aérobies (bactéries nitrifiantes, dénitrifiantes) et anaérobies (bactéries hydrolytiques, acétogènes et méthanogènes), pour éliminer la matière organique colloïdale et/ou soluble restante après le traitement primaire (Liu *et al.*, 2019). L'utilisation peu fréquente de traitements anaérobies dans le traitement des eaux usées s'explique principalement par la sensibilité des processus de traitements, qui requièrent des conditions de fonctionnement très précises (pH, température, oxygène dissous, et la concentration de nutriments) ainsi que par leur lenteur due aux vitesses métaboliques plus faibles des micro-organismes impliqués (Cremiato *et al.*, 2018). Le procédé de traitement aérobie qui est le plus répandu, consiste à injecter de l'air dans des bassins d'aération pour favoriser la croissance des micro-organismes. Ce procédé regroupe plusieurs méthodes telles que le traitement par boues activées, les lits bactériens, les disques biologiques, la biofiltration (à l'aide d'un support granulaire pour les bactéries), le lagunage aéré et le lagunage naturel (Choubert *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2022).
- **Traitement Tertiaire (complémentaires)** : Le traitement tertiaire de l'eau est la dernière étape du processus d'épuration des eaux usées, comprennent la filtration sur charbon actif, la désinfection par rayonnement ultraviolet, l'électrodialyse, l'osmose inverse, la filtration membranaire, l'ozonation et la chloration (Pérez *et al.*, 2011). Ces méthodes éliminent les contaminants restants tels que les nutriments (azote, phosphore), les produits pharmaceutiques, les métaux lourds, les virus, les bactéries et les parasites. L'élimination de ces substances nocives rend l'eau traitée sûre pour être réutilisée, recyclée ou rejetée dans l'environnement (Hejna *et al.*, 2022). Le traitement tertiaire peut être nécessaire dans certaines situations, comme lorsque les eaux usées sont rejetées dans des milieux récepteurs sensibles, tels que des lacs ou des rivières, ou lorsqu'elles sont utilisées pour l'irrigation ou la recharge des nappes phréatiques (Zhang, 2020).

1.2.2 Le lagunage

Le lagunage ou marais artificiel est un procédé de traitement biologique extensive des eaux usées par voie naturelle, qui utilise des bassins peu profonds (une succession de 3 à 5 bassins), appelés "lagunes". Les lagunes sont des masses d'eau ou des bassins ressemblant à des étangs conçus à l'air libre pour recevoir, retenir et traiter les eaux usées pendant une période de temps prédéterminée (Steinmann *et al.*, 2003). Le lagunage est considéré comme une méthode de traitement des eaux usées à part entière, mais utilisée aussi comme traitement primaire, secondaire ou comme traitement complémentaire pour les filières à boues activées (Aleya *et al.*, 2007; Boutin *et al.*, 2018). Le lagunage est couramment utilisé pour traiter de nombreux types d'eaux usées, telles que les eaux usées domestiques, les eaux de ruissellement urbaines et agricoles, les effluents industriels et miniers. Le procédé de traitement peut combiner l'action de microorganismes, d'algues et de plantes aquatiques (Niaounakis et Halvadakis, 2006). Les lagunes sont classées en fonction de :

-Leur régime : aérobie, anaérobie ou aéro-anaérobie

-Leur place dans la filière d'épuration: primaires (recevant des eaux brutes), secondaires (recevant des eaux pré-décantées) et de maturation destinées à réduire les pathogènes (Edeline, 1993).

- Leur type de végétation : Lagunes à microphytes ou macrophytes ou mixte

Il est possible de combiner ou d'utiliser individuellement les différents types de lagunes après un prétraitement (Shammas *et al.*, 2009).

-Lagune anaérobie: Ce type de lagunes sont assez profonds (supérieure à 2,5 m), utilise des bactéries anaérobies pour dégrader les matières organiques et l'abattement de la charge polluante carbonée (Gabert *et al.*, 2010).

-Lagune facultative : Sont des bassins peu profonds (profondeur comprise entre 1,2 à 2,4 m) qui permettent la dégradation des matières organiques par des bactéries aérobies dans les zones proches de la surface où les algues produisent de l'oxygène, et par des bactéries anaérobies dans les zones plus profondes où l'oxygène est épuisé. C'est le siège de l'abattement de l'azote et du phosphore (Edeline, 1993; Gabert *et al.*, 2010)

-Lagune aérobie ou de maturation : Leur profondeur est le plus souvent assez faible et inférieure à 1,5 m. Ces lagunes sont caractérisées par une forte activité biologique d'algues et de bactéries aérobies. L'aération des lagunes est naturelle par le brassage du vent à la surface de l'eau. Puisque les lagunes aérobies favorisent le développement des microalgues, elles

peuvent être considérées comme appartenant aux lagunes à microphytes. Employées pour l'abattement des pathogènes et les germes, utilisées souvent comme une étape de traitement primaire ou secondaire (Edeline, 1993; Gabert *et al.*, 2010).

-Lagune à microphyte : Les lagunes à microphytes ont une profondeur d'environ 1 mètre, on y trouve des bactéries et des algues microscopiques (telles que les Cyanobactéries, les Chlorophycées, les Euglénophycées et les Diatomées). Le processus de dépollution est similaire à celui des lagunes aérobies, cependant, les lagunes à microphytes nécessitent généralement un temps de rétention plus long. Ce type de lagune est plus adapté pour des eaux chargées en éléments pathogènes (Racault *et al.*, 1997). La minéralisation de la matière organique solubilisée en suspension est assurée par les bactéries, qui la décomposent en eau, gaz carbonique, nitrates et phosphates. Ces composés sont ensuite utilisés par les algues, qui produisent de l'oxygène via la photosynthèse, fournissant ainsi un environnement oxygéné pour la prolifération des bactéries (Amin *et al.*, 2013).

-Lagune aérée ou à haut rendement : Leur profondeur est plus faible que celui des lagunes anaérobies, facultatives et aérobies (profondeur de 0,3 à 0,6 m). Contrairement au lagunage aérobie, le lagunage aéré utilise des systèmes mécaniques pour fournir de l'oxygène aux bactéries pour accélérer le processus de traitement. Un aérateur artificiel et un brassage sont utilisés pour faciliter le transfert de l'oxygène dans l'eau. En fonction de leur niveau d'oxygénation et de brassage les lagunes aérées peuvent en outre être classées comme lagunes aérobies ou aéro-anaérobies (Edeline, 1993; Gabert *et al.*, 2010; Shammas *et al.*, 2009).



Fig. 01 : Station d'épuration des eaux usées par lagunage aéré El Guerrara, Ghardaïa, Algérie (Amenhyd, 2012).

-Lagune à macrophyte : Le lagunage à macrophytes peut être également appelé filtres plantés à macrophytes, lits de macrophytes, zones humides artificielles, marais filtrants, marais construits ou encore en anglais « *constructed wetlands* ». Le lagunage à macrophytes utilise des bassins plantés par des macrophytes qui peuvent être émergents, submergés ou flottants pour phytoépurer les eaux polluées (Stefanakis *et al.*, 2014). La profondeur des lagunes varie généralement entre 0,5 et 3 mètres. Le choix de la profondeur est influencé par de nombreux facteurs tels que la taille de la lagune, le type et la densité des macrophytes, la qualité de l'eau et les conditions environnementales (Piepho, 2017). Le lagunage à macrophytes peut être utilisé pour un traitement primaire, secondaire ou tertiaire des eaux usées (urbaines, domestiques, pluviales, agricoles ou industrielles) (Gabert *et al.*, 2010).

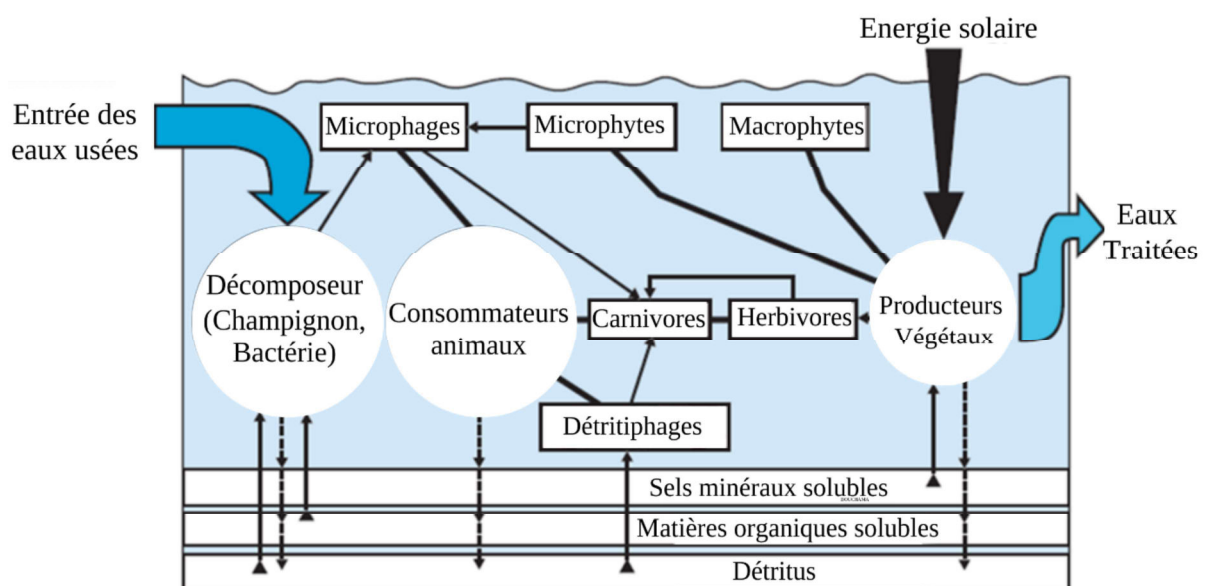


Fig. 02 : Représentation schématique des principaux cycles biologiques dans la lagune, d'après Cemagref in Maton and Le comte (1996).

2 Les macrophytes émergents utilisée dans un system de lagunage

Depuis quelques années un grand intérêt a été porté à la phytoépuration et aux techniques utilisant des macrophytes émergents pour dépolluer les eaux contaminées par les ETMs. Les macrophytes émergents ou les hélrophytes sont des outils efficaces pour la phytoépuration en raison de leurs nombreuses propriétés génétiques, biochimiques et physiologiques qui leur permettent de tolérer la présence de métaux lourds (Meagher, 2000). Avec une efficacité variable, plusieurs macrophytes émergents, tels que *Cyperus riparia* (Ladislas *et al.*, 2013), *Phragmites australis* (Chandra et Yadav, 2011), *Myriophyllum spicatum* (Wang *et al.*, 1996) *Limnocharis flava* et *Typha latifolia* (Anning *et al.*, 2013) ont été utilisés dans des systèmes de lagunage pour l'épuration des eaux contaminées par des ETMs, tels que le Plomb (Pb),

le Mercure (Hg), le Cadmium (Cd), le Nickel (Ni), le Cuivre (Cu) et le Chrome (Cr). L'efficacité de phytoépuration de ces espèces dépend de plusieurs facteurs, tels que le type et la concentration des ETMs, la durée d'exposition, les paramètres physico-chimiques de l'eau polluée, ainsi que le type du marais filtrant utilisé (Olguín et Sánchez-Galván, 2011).

Le roseau commun ou *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud (Fig. 03), est la plante émergente la plus utilisée dans les systèmes de lagunage à macrophyte. Selon Wang *et al.* (2022), les espèces du genre *Phragmites sp* représentent 15,5 % du total des plantes utilisées dans les marais filtrants au cours des deux dernières décennies. Plusieurs caractéristiques rendent *P. australis* préférable à d'autres macrophytes émergents pour une utilisation dans un marais filtrant (Vymazal, 2013; Vymazal et Březinová, 2016). Le roseau commun possède une capacité de croissance vigoureuse et rapide, ainsi qu'un large intervalle de tolérance aux conditions environnementales et climatiques, la salinité, le pH et la température et les ETMs (Bouchama *et al.*, 2016; Chandra et Yadav, 2011; Vymazal, 2013). Avec ces propriétés physiologiques et morphologiques, il est également capable de s'acclimater à différents types de substrat et de conditions hydrologiques (Wang *et al.*, 2022). *P. australis* est une graminée pérenne qui forme des colonies denses de plus de 300 tiges/m² (Fig. 03) (Mal et Narine, 2004). Les tiges sont non ligneuses, mesurant de 1 à 6 mètres de long et de 0,4 à 1 cm de diamètre (Fig. 04). Elles sont produites au printemps et meurent à la fin de l'automne. La plante possède des rhizomes souterrains ou subaquatique et d'autres aériens appelés stolons, qui se trouvent soit sur le sol, soit à la surface de l'eau (Gaussen *et al.*, 1982; Mal et Narine, 2004). L'inflorescence de *P. australis* est violacée-argentée, mesurant de 10 à 30 cm produit énormément de graines monocotylédones (Fig. 05). Elle est hermaphrodite, anémogame et anémochore. Les graines sont brunes-marron, minces et délicates, mesurant environ 2,5 cm de long (avec les glumes). Elles sont très légères, pesant seulement 0,1 mg, et disposent de peu de réserves nutritives (Brisson, 2014; Raynal-Roques, 1994). Sous de bonnes conditions, la floraison se produit généralement au cours de la première ou de la deuxième année, entre août et septembre (Maheu-Giroux et de Blois, 2007).

Le roseau commun se propage latéralement par multiplication végétative grâce aux stolons et aux rhizomes. Cependant, sa propagation vers de nouvelles zones se fait principalement par le biais des graines (Albert *et al.*, 2015). Le roseau commun peut pousser dans différents types de sols ou substrats inondés, tant qu'ils ne sont pas trop acides (pH entre 6,5 et 7,2) ou trop ombragés, car cette espèce est héliophile. La croissance est optimale dans les substrats riches en nutriments et constamment inondés par 0,5 -1,5 m, composés d'alluvions argileuses ou sablo-argileuses légèrement acides à basiques (Mens, 1986; Rameau *et al.*, 1993).

Selon la classification proposée par Quézel *et al.* (1962)

Règne : végétale

Embranchement : Spermaphytes.

Sous / emb : Angiospermes.

Classe : Monocotylédones.

Ordre : Graminales.

Famille : Graminées.

Genre : Phragmites.

Espèce : *Phragmites australis*.



Fig. 03 : Une colonie de *Phragmites australis* (photos personnel).



Fig. 04 : Tige de *P. australis* (Marnotte et Carrara, 2006).



Fig. 05 : Grains de *P. australis* (Université Ohio, 2009).

3 Phytoépuration par lagunage à macrophytes

Le lagunage à macrophytes ou les marais filtrants sont des systèmes artificiels qui imitent les fonctions écologiques des marais naturels. Un marais filtrant est constitué d'un ou plusieurs bassins, avec ou sans substrat (milieu poreux : gravier, sable ou d'autres matériaux granulaires comme le zéolithe, pouzzolane etc.), avec des macrophytes émergents (hélrophytes), submergés et/ou flottants (hydrophytes) (Fig. 06), un système d'apport d'eaux usées et un système d'évacuation de l'eau traitée (Bruch *et al.*, 2011; Selvaraj et Velvizhi, 2021).

Les marais filtrants offre la possibilité d'éliminer divers types de polluants comme les hydrocarbures, les métaux lourds, les résidus pharmaceutiques et les microorganismes pathogènes (Das et Goel, 2019). Plusieurs processus peuvent contribuer à l'élimination des polluants, notamment la filtration physique de l'eau usées, le traitement biologique par les plantes et les biofilms microbiens, ainsi que les changements chimiques dus à l'état de réduction-oxydation (Faulwetter *et al.*, 2009). Le système racinaire des macrophytes joue un rôle crucial dans le fonctionnement des marais filtrants, car il favorise la croissance de microorganismes et contribue à l'oxygénation du milieu. Ces plantes aquatiques ont la capacité de séquestrer les ETMs et de favoriser la dégradation biologique des polluants d'origine organique par le biais de plusieurs processus comme la phytoextraction (phytoaccumulation), la rhizostabilisation, la rhizofiltration et la rhizodégradation (Dhir, 2013).

L'utilisation de plusieurs espèces végétales dans un système de lagunage à macrophytes peut améliorer l'efficacité de l'élimination des métaux lourds. Une approche basée sur la communauté végétale offre la possibilité d'améliorer l'élimination de plusieurs types de contaminants (Türker *et al.*, 2016). L'utilisation de communautés végétales peut être plus efficace que les monocultures, car elle offre une diversité plus importante de plantes ayant des propriétés différentes. Cependant, il est primordial de comprendre les interactions interspécifiques dans un système de lagunage à macrophytes (Engelhardt et Ritchie, 2001). L'effet de la compétition entre les espèces dans un système de lagunage peut avoir un impact sur la composition de la communauté végétale et donc sur la capacité d'épuration des eaux polluées (Du *et al.*, 2017).

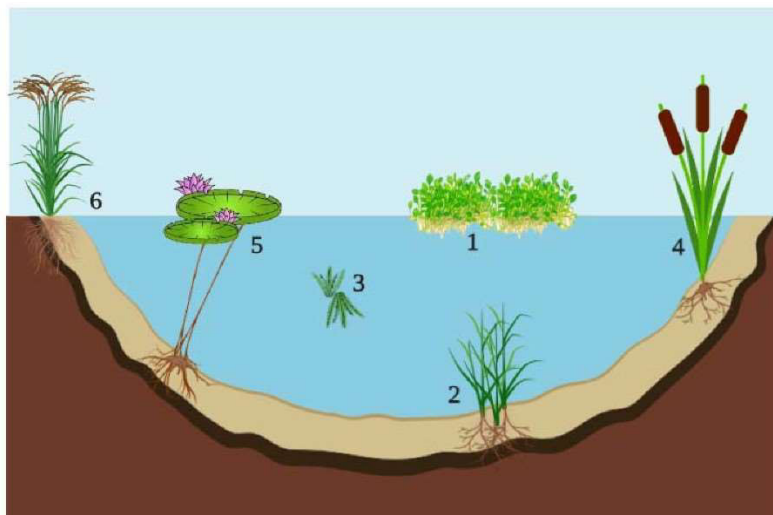


Fig. 06 : Classification des macrophytes. (1) *Flottant libre*, (2) *Enraciné submergé*, (3) *Immergé libre*, (4) *Émergent*, (5) *Submergé avec des feuilles flottantes*, (6) *Amphiphytes* (Kochi et al., 2020).

4 Types de marais filtrants

Les marais filtrants sont composés d'un ou de plusieurs bassins disposés en série. Il existe différents types de marais filtrants selon le mode d'écoulement de l'eau, la végétation et le substrat utilisé. Les systèmes de lagunage à macrophytes sont classés en trois types principaux :

- Marais filtrant à écoulement surfacique (MFES) (Fig. 07);
- Marais filtrant à écoulement subsurfacique (MFESS) : à écoulement horizontal (Fig. 08) ou vertical (Fig. 09) ;
- Marais filtrant flottant (MFF) (Fig. 10);
- Système de marais filtrant hybrides (SMFH) (Fig. 11).

4.1 Marais filtrant à écoulement surfacique

Dans les marais filtrants à écoulement de surface (MFES), aussi appelée écoulements à surface libre (*Free Water Surface constructed Wetland : FWS Cw*), l'eau usée circule en surface à travers la végétation au-dessus ou au niveau du substrat, la surface de l'eau est généralement exposée à l'air libre, la couche proche de la surface est aérobie tandis que les eaux plus profondes et le substrat sont généralement anaérobies (Gikas et al., 2021). Dans ce type de lagunage, les bassins sont peu profonds, qui peut varier entre 15 et 45 cm. Le flux des eaux à traiter suit une direction horizontale, allant de l'entrée vers la sortie du bassin. Le design du

marais filtrant à écoulement surfacique doit inclure une faible pente pour assurer que l'eau s'écoule par gravitation lentement et uniformément (USDA, 2009).

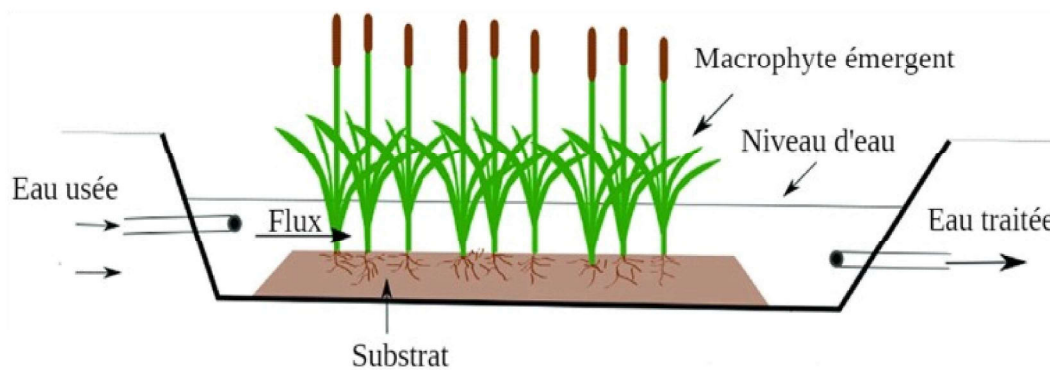


Fig. 07 : Représentation schématique d'un marais filtrant à écoulement surfacique (Gagnon, 2012).

Les marais filtrants à écoulement surfacique ressemblent beaucoup aux marais naturels et peuvent fournir un habitat pour la faune. Leurs coûts d'investissement et d'exploitation sont faibles, et leur construction, exploitation et entretien sont simples. Le principal inconvénient est qu'ils nécessitent généralement une plus grande surface de terrain que les autres systèmes, ainsi que le risque de la prolifération des moustiques quand le temps de rétention des eaux usées est long (Davis, 1995).

4.2 Marais filtrant à écoulement subsurfacique

Les marais filtrant à écoulement subsurfacique ou sous-surfacique (MFESS) (*Subsurface Flow Wetland SSF Cw*), sont conçus pour que le niveau d'eau reste en dessous du substrat sans contact avec l'air (Stefanakis *et al.*, 2014). Les macrophytes sont plantés à la surface du marais et l'eau usée s'écoule sous la surface à travers le substrat et les racines, ce qui évite les problèmes d'odeurs et de moustiques (Fletcher *et al.*, 2020). Dans ce type de lagunage, les bassins sont peu profonds, la pente est comprise entre 1 et 3%. Le substrat ou le milieu poreux offrent une plus grande surface de contact avec les eaux usées à traiter que dans les marais MFES, ce qui peut donc nécessiter moins de surface de terrain (USEPA, 2000). L'inconvénient des marais MFESS est qu'ils sont plus coûteux à construire, et que les coûts d'entretien sont généralement plus élevés. Un certain nombre de marais MFESS ont rencontré des problèmes de colmatage et d'écoulement de surface non intentionnel (Davis, 1995).

Il existe deux types principaux de marais filtrants à écoulement subsurfacique : les marais à écoulement horizontal ou à écoulement vertical. Les deux types possèdent des similitudes dans

leur conception et leur dimensionnement, mais le sens de l'écoulement au sein du milieu poreux (vertical ou horizontal) influence de façon très importante le renouvellement en oxygène dans le substrat qui affecte donc l'élimination des différents polluants qui influencent plus ou moins la performance de traitement de ces systèmes (Li *et al.*, 2014).

4.2.1 Marais filtrant à écoulement subsurface horizontal

Dans les marais à écoulement subsurface horizontal, le milieu poreux et les racines des plantes filtrent les eaux usées qui s'écoulent horizontalement sous la surface (Fig. 08) (Davis, 1995). Ce type de marais est alimenté de façon continue d'eau usée, le milieu poreux est en permanence saturé et par conséquent ils présentent une faible concentration en oxygène dissous. L'alimentation du système se fait latéralement via un filtre à gravier (gabion) (Boutin *et al.*, 2007). Les marais MFESS horizontal se trouvent généralement dans des conditions anaérobies (anoxie), ce qui est propice à la réduction des métaux, la dénitrification et à l'élimination de l'excès d'azote (USEPA, 2000). L'aération résulte uniquement des apports provenant des racines des plantes et de la diffusion gazeuse dans la partie non saturée superficielle

4.2.2 Marais filtrant à écoulement subsurface vertical

Dans les marais à écoulement subsurface vertical, le milieu poreux et les racines des macrophytes filtrent les eaux usées qui percolent verticalement (Fig. 09) (Fletcher *et al.*, 2020). Les eaux usées sont distribuées en surface par aspersion, avant de s'infiltrer dans le milieu poreux jusqu'au système de drainage situé au fond du marais. Ces marais sont souvent insaturés en eau usée et avec une bonne concentration en oxygène dissous, car ils reçoivent de l'eau usée par intermittence (Boutin *et al.*, 2007; Davis, 1995). Les conditions aérobies favorisent la dégradation de la matière organique et la nitrification (Boutin *et al.*, 2007). Les marais MFESS vertical peuvent recevoir des eaux usées brutes directement dans la première couche du milieu poreux, qui est principalement constituée de graviers fins. C'est pourquoi ils servent souvent d'étape initiale dans un système de marais filtrants hybrides (USEPA, 2000).

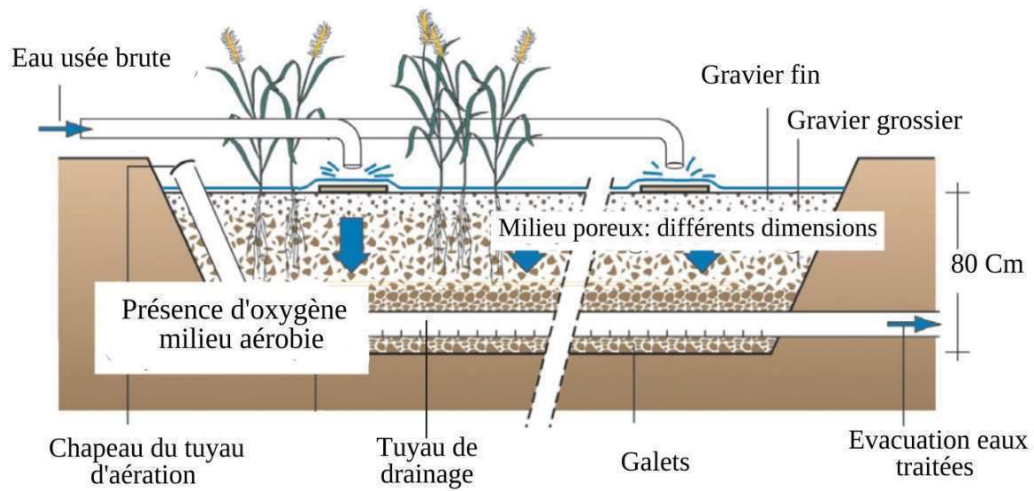


Fig. 08 : Coupe transversale schématique d'un marais filtrant à écoulement subsurface horizontal (Iwema *et al.*, 2005).

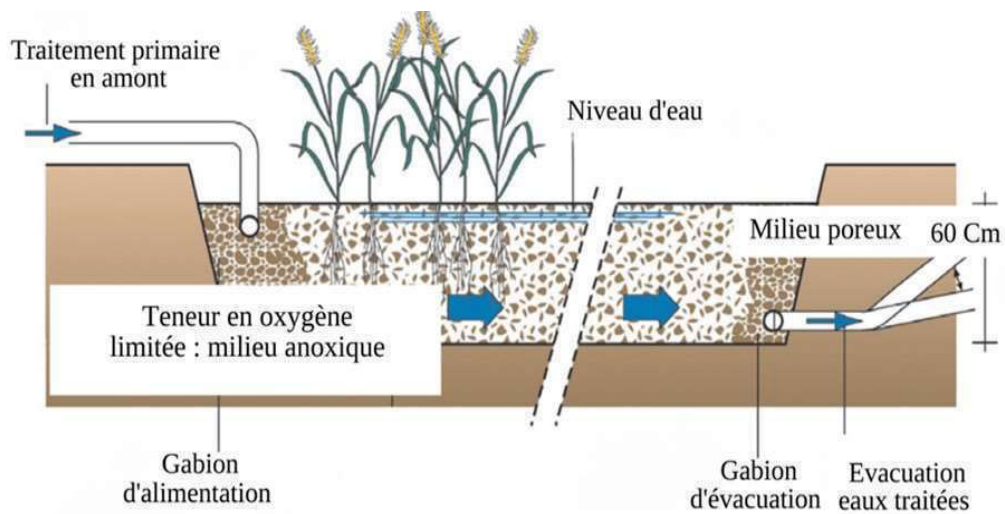


Fig. 09 : Coupe transversale schématique d'un marais filtrant à écoulement subsurface vertical (Iwema *et al.*, 2005).

4.3 Marais filtrant flottant

Le marais filtrant flottant, également appelés systèmes de lagunage flottant (*Floating treatment constructed wetlands*), est l'une des nouvelles solutions d'ingénierie écologique qui a été développée (Stefanakis *et al.*, 2014). Le principe de ce système est que les macrophytes émergentes sont plantées dans un marais rempli d'eau usée sur un support flottant, permettant aux racines submergées d'épurer l'eau par rhizofiltration, phytoextraction, et/ou phytodégradation (Fletcher *et al.*, 2020; Kiiskila *et al.*, 2017). Un filet ou une mousse sont généralement utilisés pour soutenir le milieu de croissance dans lequel les macrophytes sont cultivés, les plantes développent ensuite un système racinaire profond dans la colonne d'eau sous-jacente (Yueya *et al.*, 2017). Les MFF s'appliquent principalement aux contaminants solubles dans l'eau, bien que les polluants liés aux sédiments puissent être filtrés aussi par les racines des macrophytes (Tanner et Headley, 2011). Les MFF ont été utilisés principalement pour leur capacité à éliminer les nutriments des eaux usées, mais l'évaluation de l'élimination des métaux lourds par ce système a montré des résultats encourageants (Kiiskila *et al.*, 2017). Parmi les avantages de l'utilisation des MFF, il y a la facilité avec laquelle la biomasse de macrophytes peut être récoltée à partir du support flottant, ce qui facilite ainsi la récupération des polluants bioaccumulés par les macrophytes (Fletcher *et al.*, 2020).

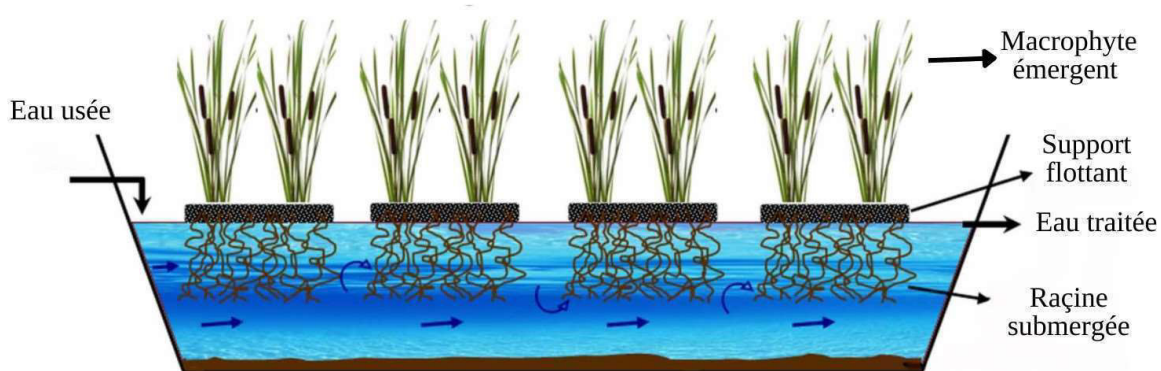


Fig. 10 : Représentation schématique d'un marais filtrant flottantes (Stefanakis, 2016).

4.4 Système de marais filtrant hybrides

Les marais filtrants hybrides ont été introduits pour la première fois par Seidel en Allemagne dès les années 1960. Le processus est connu sous le nom de système SEIDEL ou de système de KREFELD. La conception consistait en deux étages de plusieurs marais (MFESS) à percolation verticale parallèle, suivis de 2 ou 3 marais (MFESS) à écoulement horizontal en série. Outre les systèmes (MFESS) vertical-horizontal ou horizontal-vertical en séries ou en

parallèle, d'autres combinaisons de divers marais filtrants ont été utilisées dans les débuts des années 2000, y compris les marais filtrants à écoulement surfacique (MFES) (Vymazal, 2013). Le recours au système de marais filtrants hybrides a été une nécessité pour améliorer les performances d'épuration en capitalisant sur les avantages de différents types de marais. Cette combinaison offrant ainsi une solution plus efficace pour le traitement de différents types de polluants présents dans les eaux usées (Parde *et al.*, 2021).

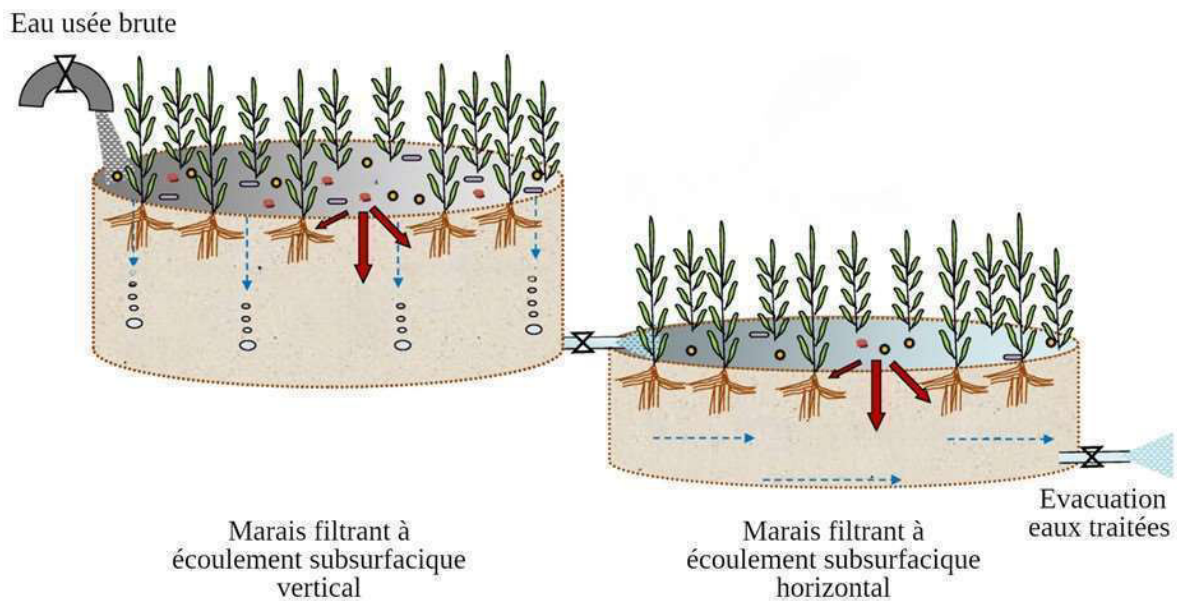


Fig. 11 : Représentation schématique d'un système de marais filtrant hybrides (Ilyas et van Hullebusch, 2020).

5 Traitements des eaux contaminées par les métaux lourds

Au cours de la dernière décennie, une forte augmentation de la pollution par les éléments traces métalliques (ETMs) a été constatée. Plusieurs facteurs ont contribué à cette situation, notamment l'utilisation croissante de produits phytosanitaires contenant des ETMs, l'exploitation minière, les pratiques inadéquates d'élimination des déchets, ainsi que l'utilisation d'eaux usées municipales et industrielles non ou mal traitées pour l'irrigation (Liu *et al.*, 2013). Les métaux lourds ou les éléments traces métalliques (ETM) sont un groupe d'éléments métalliques naturels qui se caractérisent par leur masse volumique élevée, supérieure à 5 g/cm^3 (Adriano, 2001). Ces éléments, étant par nature bioaccumulable et non biodégradables, ont une forte toxicité environnementale entraînant des dégâts écologiques importants. Ils peuvent également être impliqués dans de nombreuses pathologies chez l'homme, tels que des atteintes du système nerveux central, des effets sur le système sanguin, le foie et les reins. Ils présentent également des risques cancérigènes et peuvent provoquer des

malformations embryonnaires (Abrahams, 2002; Adriano, 2001).

Les ETMs font partie des toxiques les plus étudiés dans les écosystèmes aquatiques, principalement car ils sont non biodégradables et qu'ils ont une affinité particulière avec les substances organiques et minérales présentes dans les eaux et les sols, ce qui favorise leur persistance dans l'environnement (Mitra *et al.*, 2022). Ils peuvent ainsi s'accumuler dans les sédiments et les organismes vivants, ce qui peut provoquer une contamination à long terme des chaînes alimentaires aquatiques et terrestres (Ali *et al.*, 2019). La décontamination des eaux usées polluées par les ETMs est un défi environnemental majeur. Les techniques utilisées pour y faire face dépendent de nombreux facteurs tels que le type et la concentration des ETMs dans les eaux usées, ainsi que les moyens financiers et techniques disponibles. Parmi ces techniques, on peut citer la précipitation chimique, l'adsorption (par le charbon actif, les résines échangeuses d'ions et les argiles modifiées), la filtration membranaire, l'électrodialyse ou l'électrocoagulation et la phytoremédiation (Mitra *et al.*, 2022; Razzak *et al.*, 2022). Il est important de reconnaître que dans de nombreux pays, la mise en place d'un traitement tertiaire pour décontaminer les eaux usées polluées par les ETMs peut être un défi en raison de contraintes financières et techniques. En effet, les coûts associés à certaines méthodes peuvent être prohibitifs, ce qui rend leur adoption difficile, voire impossible.

Tab. 01 : Efficacité des techniques de traitement des eaux usées contaminées par les ETMs ("Water treatment handbook"1991)

Technique	Mercure	Plomb	Cuivre	Zinc	Nickel	Chrome	Cadmium	Cobalt
Préchloration	Améliore l'élimination de tous les métaux lourds							
Coagulation	+	+++	+++	++	++	-		-
Filtres à sable	+++	+++	+++	+++		-	+++	-
Échangeurs d'ions	++	++	++	++		+++	+++	++
Charbon actif	+++	++	++	++	++	++	++	++

- : Pas d'effet / + : Peu d'effet / ++ : Suffisant pour répondre aux normes en vigueur / +++ : Excellent.

6 Normes et valeurs limites des ETMs dans les effluents

Les normes pour les valeurs limites des ETMs dans les effluents rejetés ou les effluents traités destinés à l'irrigation, varient d'un pays à l'autre et peuvent dépendre des lois et des réglementations locales. Cependant, en général, les limites de rejet de métaux lourds dans les eaux usées traitées sont fixées par les autorités locales de régulation environnementale. Les valeurs limites de rejets d'effluents contenant des métaux lourds sont des normes qui réglementent la quantité et la concentration de ces substances polluantes dans les eaux usées. Ces normes varient selon les pays et les secteurs d'activité.

Tab. 02 : Valeurs limites des ETM en mg/l dans les effluents rejetés et traités destinés à l'irrigation, selon la réglementation algérienne et les normes de l'Agence de protection de l'environnement des États-Unis (EPA), de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et de l'Organisation mondiale de la santé (OMS).

L'élément trace métallique (ETM)	Densité à 25 C (g/cm ³)	Valeurs limites des ETM dans les effluents (mg/l) (*Selon la catégorie d'installation) (JORA, 2006)	Concentration maximale admissible dans les effluents traités destinés à l'irrigation (mg/l) (JORA, 2012)	Concentration maximale admissible dans les effluents traités destinés à l'irrigation (mg/l) (USEPA, 2012; WHO, 2006; Pescod, 1992)
		Réglementation algérienne		Norme EPA, FAO et OMS
Cadmium (Cd)	8.65	* 0.07- 0.2	0.05	0.01
Cuivre (Cu)	8.96	* 0.1 - 0.5 - 1.5	5	0.2
Mercuré (Hg)	13.53	0.01	0.01	-
Plomb (Pb)	11.34	* 0.5 - 0.7	10	EPA (5), FAO (5)
Chrome (Cr)	7.19	* 0.05 - 0.1 - 0,5 -1.5	1	0.1
Etain (Sn)	7.31	2	-	-
Manganèse (Mn)	7.47	1	10	0.2
Fer (Fe)	7.87	3	-	5
Nickel (Ni)	8.91	*0.1 - 0.5 - 0.7	2	0.2
Zinc (Zn)	7.14	*2 - 3	10	2
Cobalt (Co)	8.90	0.1	5	0.05
Arsenic (As)	5.73	-	2	0.1
Vanadium (V)	6.10	-	1	0.1
Molybdène (Mo)	10.28	-	0.05	0.01

Chapitre II : Etude écotoxicologiques

1 Généralité

Les polluants inorganiques, qu'ils proviennent de sources naturelles ou anthropiques, sont très répandus dans l'environnement. Ils comprennent principalement les ETMs, les ions/nutriments et les radionucléides (Dhir, 2013). Les ETM peuvent être présents dans tous les compartiments des écosystèmes : la lithosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère, les sédiments et dans le biote où ils s'accumulent (Sabria, 2012). Les ETM sont des éléments minéraux présents à faible concentration dans la croûte terrestre et dans les sols. D'un point de vue purement physique, les ETMs sont un groupe d'éléments métalliques naturels caractérisés par leur masse volumique élevée, supérieure à 5 g/cm^3 (Adriano, 2001).

En fonction de leurs effets ou rôles physiologiques chez les végétaux, on distingue deux types de métaux : les métaux essentiels (oligoéléments) et les métaux toxiques. Les éléments essentiels sont les macroéléments (Ca, Mg, K, P, N, S) et les microéléments (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn), aussi le metalloïde (Mo) et le bore (B) qui sont essentiels à la croissance des plantes à faibles concentrations (Mitra, 2017; Prasad, 2001). D'autres éléments ont été révélés comme bénéfiques à faibles concentrations pour la nutrition des végétaux mais non essentiels tels que : le chrome (Cr), le gallium (Ga), le nickel (Ni), le strontium (Sr), l'étain (Sn), le titane (Ti), le vanadium (V) et le silicium (Si : metalloïde) (Michalak *et al.*, 2018). Cependant, les éléments non essentiels et toxiques à de très faibles concentrations sont : l'arsenic (As), le cadmium (Cd), le mercure (Hg) et le plomb (Pb). Ces métaux ont été largement étudiés en raison de leurs effets toxiques sur les plantes, les animaux et les microorganismes (Stevenson 1999, Adriano 2001). Globalement, au-delà d'un certain seuil, tous les éléments, qu'ils soient essentiels ou non, peuvent avoir des effets toxiques et écotoxicologiques (Mitra, 2017; Sabria, 2012).

2 Phytodisponibilité et spéciation d'éléments traces métalliques

L'efficacité de l'épuration des eaux contaminées par un marais filtrant dépend de plusieurs facteurs : La conception et le type du marais filtrant, les plantes et le substrat utilisées, les conditions environnementales, la composition de l'eau contaminée, la spéciation et la phytodisponibilité des d'éléments traces métalliques pour les plantes. Il est largement reconnu que le risque de toxicité des éléments traces métalliques ne provient pas des concentrations totales dans le milieu contaminé, mais plutôt de la fraction biodisponible (Sigg et Behra, 2005). La biodisponibilité et la phytodisponibilité sont des termes utilisés pour décrire le degré auquel les contaminants sont disponibles pour être absorbés ou assimilés par

les organismes vivants qui y sont exposés (Chang *et al.*, 2014).

Selon Caussy *et al.* (2003), la phytodisponibilité reflète la capacité des ETMs à être absorbés par les végétaux, atteindre les tissus cibles et exercer des effets toxicologiques. La régulation de l'absorption des ETMs dans les marais filtrants dépend fortement de leur biodisponibilité (Kamnev et van der Lelie, 2000). La phytodisponibilité des ETMs est un processus complexe qui implique plusieurs facteurs interconnectés, tels que les conditions physico-chimiques et biologiques du marais filtrant, la spéciation (forme chimique des ETMs), et l'espèce végétale utilisée (Guittonny-Philippe *et al.*, 2014; Meers *et al.*, 2007; Peijnenburg et Jager, 2003).

2.1 Phytodisponibilité et spéciation du cadmium

Le cadmium (Cd) est un élément rare dans la croûte terrestre. En moyenne, on trouve entre 0,1 et 0,4 mg de Cd par kg de sol sec (Bourrelier *et al.*, 1998; Das *et al.*, 1997). Cependant, cette quantité peut varier en fonction de l'origine des sols. Les sols formés à partir de sables quartzueux contiennent moins de 0,05 mg.kg⁻¹ de Ms, tandis que ceux formés à partir de sédiments calcaires peuvent en contenir davantage, entre 0,5 et 1 mg.kg⁻¹ de MS (Das *et al.*, 1997; Perrono, 1999). Les éruptions volcaniques, les retombées atmosphériques et l'altération des matériaux de la croûte terrestre sont les principales sources naturelles de pollution par le Cd (Bourrelier *et al.*, 1998). Les apports anthropiques de Cd proviennent, notamment, de l'industrie métallurgique et minière (minerais du zinc et du phosphate), de l'élimination de déchets industriels, l'utilisation de boues provenant de stations d'épuration, ainsi que l'utilisation excessive d'engrais phosphatés, de pesticides et d'insecticides (Rao et Kashifuddin, 2016). Les niveaux de concentrations de cadmium dans les sols peuvent dépasser 150 mg.kg⁻¹ de MS, comme dans certains sols pollués par l'épandage de boues contaminées (Jackson et Alloway, 2017).

Dans les écosystèmes aquatiques, les concentrations de Cd peuvent varier considérablement. Elles dépendent du bruit de fond géochimique et des activités anthropiques. Dans les eaux naturelles les concentrations sont autour de 0,05-1 µg /l (Martin-Garin *et al.*, 2004). Les concentrations élevées dans les écosystèmes aquatiques sont souvent liées à la pollution par les effluents industriels (Cd=1000 mg/l), ou par les eaux usées municipales non traitées (généralement inférieure à 10 µg/l). Les concentrations totales de Cd dans l'eau ne reflètent pas nécessairement sa phytodisponibilité, car la spéciation chimique et la forme adsorbée ou libre affectent aussi sa phytodisponibilité. Les plantes dans les marais filtrant ne peuvent absorber que les formes libres de Cd, qui sont généralement plus phytodisponible que

les formes adsorbées sur les particules en suspension dans l'eau (Duplay *et al.*, 2014).

La spéciation définit les états de valence et/ou les états de complexation des ETMs. L'état de valence fait référence au nombre d'électrons qu'un atome peut perdre ou gagner lors de la formation de liaisons chimiques avec d'autres atomes. L'état de complexation se réfère à la manière dont un ion métallique est lié à un ou plusieurs molécules ou ions (ligand) pour former une espèce chimique complexe (Wang *et al.*, 2023). Ces deux concepts sont les aspects clés de la spéciation chimique des ETMs et par conséquent leur phytodisponibilité. Le Cd peut exister sous différentes formes chimiques en fonction des conditions de pH. Il est principalement présent sous forme d'ion libre Cd^{2+} ou sous forme de complexes inorganiques (avec les argiles, les carbonates, sulfates et hydroxydes) ou organiques (avec les acides humiques, l'humine ou les acides fulviques) (Hizal et Apak, 2006). Dans l'eau et la solution du sol, il a été estimé qu'entre 55 et 99 % du Cd existe sous forme ionique libre Cd^{2+} (Kabata-Pendias et Sadurski, 2004). À pH inférieur à 6,5, le Cd est principalement présent sous forme de Cd^{2+} , CdSO_4 , CdCl^+ , ou CdCl_2 , il s'associe avec l'ion chlorure (Cl^-) ce qui accroît sa mobilité et phytodisponibilité. Alors que dans les solutions alcalines, les espèces moins biodisponibles CdHCO_3^+ , CdCO_3 , CdSO_4 ou $\text{Cd}(\text{OH})_2$ prédominent (Sauvé *et al.*, 2000). En solution aqueuse, Cd^{2+} est la forme la plus soluble et la plus stable dans la gamme de pH= 1 à 8. Cependant, au-delà d'un pH de 8, il peut commencer à précipiter sous forme de $\text{Cd}(\text{OH})_2$ (hydroxyde de cadmium) et/ou CdCO_3 (carbonates de cadmium), qui sont moins soluble que Cd^{2+} (Flores *et al.*, 2006). Selon Martin-Garin *et al.* (2004), la concentration de sel dans l'eau peut aussi affecter la phytodisponibilité du Cd. L'augmentation de la salinité de l'eau (Na^+ et Cl^- ...) peut favoriser la désorption et la libération du cadmium fixé sur les particules en suspension, ce qui peut conduire à l'apparition de Cd^{2+} et/ou CdCl_2 . La salinité des eaux affecte négativement la force d'attraction entre le cadmium et les particules adsorbantes, en perturbant la disponibilité des sites d'adsorption et les interactions électrostatiques (Zheng *et al.*, 2021).

La phytodisponibilité et l'efficacité de l'absorption des ETMs par les plantes et les macrophytes utilisées dans les marais filtrants dépendent également de la présence et de la concentration d'autres ETMs, tels que Pb, Cu, Zn, As et Cr (Wu *et al.*, 2018). Par exemple, il existe un antagonisme entre le Cd et le Zn dans le processus d'absorption (Green *et al.*, 2017), et une corrélation significativement positive entre l'absorption de Pb et de Cd car le processus d'absorption de ces deux ETMs est synergique (Song *et al.*, 2014). En général, la phytodisponibilité du Cd dans un marais filtrant à macrophytes est régulée par un certain nombre de réactions impliquant la précipitation/dissolution, l'adsorption/désorption sur les particules en suspension et le substrat, ainsi que la formation de complexes Cd-ligand (Bolan

et al., 2013; Loganathan *et al.*, 2012). Le cadmium présente des caractéristiques hydrochimiques particulières, contrairement aux autres ETMs, il demeure en solution à un pH proche de la neutralité et a tendance à former des complexes dissous stables avec des ligands inorganiques et organiques, ce qui inhibe la précipitation (Kubier *et al.*, 2019).

2.2 Phytodisponibilité et spéciation du nickel

Le nickel (Ni) est le 6-ème élément le plus abondant sur terre (Rausch *et al.*, 2005), et le 22 -ème élément le plus abondant de la croûte terrestre (Bilal Hussain *et al.*, 2013). Le Ni est présent naturellement dans les sols, les eaux et l'atmosphère, émis par les éruptions volcaniques, l'érosion éolienne des sols et l'altération des matériaux de la croûte terrestre (CEP, 1994). Environ 10% du nickel présent dans la croûte terrestre est incorporée dans le minerai fondu de fer-nickel (Ahmad et Ashraf, 2011). On trouve le Ni dans divers minéraux ou roches contenant du fer et du magnésium, tels que les pyroxènes et l'olivine. Il est également associé au soufre dans la millérite (NiS) ou à l'arsenic dans la niccolite (NiAs) trouvée dans le minerai rouge de nickel. Il peut également être combiné avec le fer sous forme de pentlandite (Ni,Fe)₉S₈ et de l'antimoine sous forme de breithauptite (NiSb) (CEP, 1994). Selon les estimations sa concentration moyenne dans la croûte terrestre étant d'environ 75-80 µg/g ou un Clarke de 75 à 80 g/t (Rausch *et al.*, 2005). En général, la concentration naturelle moyenne du Ni dans le sol et les eaux de surface est de 100 mg/kg et 0,005 mg/L, respectivement (McGrath, 1995). Mais la teneur dans l'environnement peut varier de 3 à 1000 ppm en fonction de l'origine des sols et de la proximité des écosystèmes aquatiques à certaines formations géologiques (Iyaka, 2011). Les apports anthropiques de Ni dans l'environnement proviennent de l'exploitation minière, des dépôts atmosphériques dus aux combustions des hydrocarbures et du charbon, de l'incinération des déchets, de l'industrie métallurgique et de la galvanoplastie, de l'utilisation des eaux usées en agriculture, de l'épandage des boues d'épuration et des engrais phosphatés (qui contiennent environ 30 ppm de nickel) (CEP, 1994; Lhuillier, 1994; Poonkothai et Vijayavathi, 2012).

Le nickel dans l'eau se trouve généralement sous forme de sels solubles tels que le chlorure (NiCl₂), le nitrate Ni(NO₃)₂, le sulfate (NiSO₄), ainsi que dans une moindre mesure sous forme de carbonates (NiCO₃) et d'hydroxyde Ni(OH)₂ (Masse et Houde, 2018). Le NiCl₂ et le NiSO₄ sont très solubles dans l'eau, avec une solubilité d'environ 2400 à 2500 g.L⁻¹. En revanche, les composés moins solubles sont le Ni(NO₃)₂, le NiO et le Ni(OH)₂, qui ont des solubilités respectives de 45 - 1,1 - 0,13 g.L⁻¹. La solubilité aqueuse la plus faible est celle du carbonate de nickel (NiCO₃), qui ne se dissout qu'à hauteur de 0,09 g.L⁻¹ (Begum *et al.*, 2022).

La majeure partie du nickel rejeté dans le système aquatique existe sous forme de sels solubles associés à des matières particulaires, des solides en suspension ou en combinaison avec des matières organiques (Mukherjee, 1998). Dans l'eau les sels de nickel peuvent se dissocier en ions de nickel (Ni^{2+}) et en anions tels que Cl^- , SO_4^{2-} et NO_3^- . La forme ionique Ni^{2+} est la forme la plus stable et la plus prédominante du Ni dans l'eau. Dans l'eau la spéciation du Ni dépend de plusieurs facteurs, comme le pH, la température et la présence d'autres ions (Lhuillier, 1994). À un pH= 5-9, le Ni tend à se présenter sous forme ionique soluble libre Ni^{2+} . Cependant, à pH plus basique, le Ni se lie avec OH^- pour former des précipités $\text{Ni}(\text{OH})_2$ ou des complexes solubles en se liant avec des ligands organiques (Acides humiques, fulviques ou l'humine...) ou des éléments inorganiques (les carbonates, sulfates...) (Begum *et al.*, 2022; Doig et Liber, 2007).

La phytodisponibilité du Ni dans les milieux aquatiques ou les marais filtrants est déterminée par sa répartition entre les phases solides particulières et les phases solubles (Guilpain *et al.*, 2018). Cette répartition est influencée par des phénomènes physico-chimiques comme l'adsorption, la précipitation et la complexation, qui dépendent eux-mêmes de facteurs tels que le potentiel redox, le pH, la force ionique de l'eau, la concentration de nickel et des ligands, ainsi que de la présence de surfaces solides pour l'adsorption, notamment les oxydes de fer et de manganèse hydratés (Begum *et al.*, 2022). Globalement, les facteurs qui favorisent la solubilisation du nickel sont susceptibles de favoriser sa phytodisponibilité. Une diminution du pH et de la concentration en fer et en manganèse dans les eaux usées peut entraîner une augmentation de la concentration de la forme ionique libre Ni^{2+} par rapport aux formes complexées et par conséquent sa phytodisponibilité (Barbafieri, 2000; Lhuillier, 1994). Dans un milieu réducteur, la solubilisation et la phytodisponibilité du nickel peuvent être favorisées par la réduction et la solubilisation des oxydes de fer et de manganèse, ce qui a pour effet de libérer le nickel. En outre, un tel milieu peut favoriser la formation d'acides organiques solubles de faible poids moléculaire, qui se lie avec le Ni formant des complexes ligand-Ni relativement facilement absorbables par les racines des plantes (Lhuillier, 1994).

3 Phytotoxicité d'éléments traces métalliques

D'un point de vue physiologique, la phytotoxicité des ETMs est étroitement liée à l'ensemble des mécanismes qui régulent leur homéostasie, tels que l'absorption, le transport, la chélation et la séquestration. Ces mécanismes jouent un rôle crucial dans la régulation des niveaux d'ETMs à l'intérieur des cellules végétales (Clemens *et al.*, 2002). En fonction de l'espèce et de l'élément trace métallique en question, l'absorption peut avoir lieu soit dans

la région apicale de la racine, soit sur toute la surface racinaire. Une partie des éléments qui atteignent la racine est adsorbée sur les parois de l'épiderme et ne pénètre pas directement dans les cellules (Chaignon, 2001). Elle est adsorbée par les charges négatives présentes à la surface de l'acide polygalacturonique des pectines (Briat et Lebrun, 1999). L'absorption des ETMs par les plantes se fait principalement par diffusion passive simple, suivant le gradient de concentration, via la voie apoplastique (à travers l'espace intercellulaire du cortex racinaire et de l'endoderme). Mais au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary (hydrophobe), située dans l'endoderme, le transport peut devenir actif en empruntant la voie symplastique (Fig. 12) (Briat et Lebrun, 1999; Chaignon, 2001).

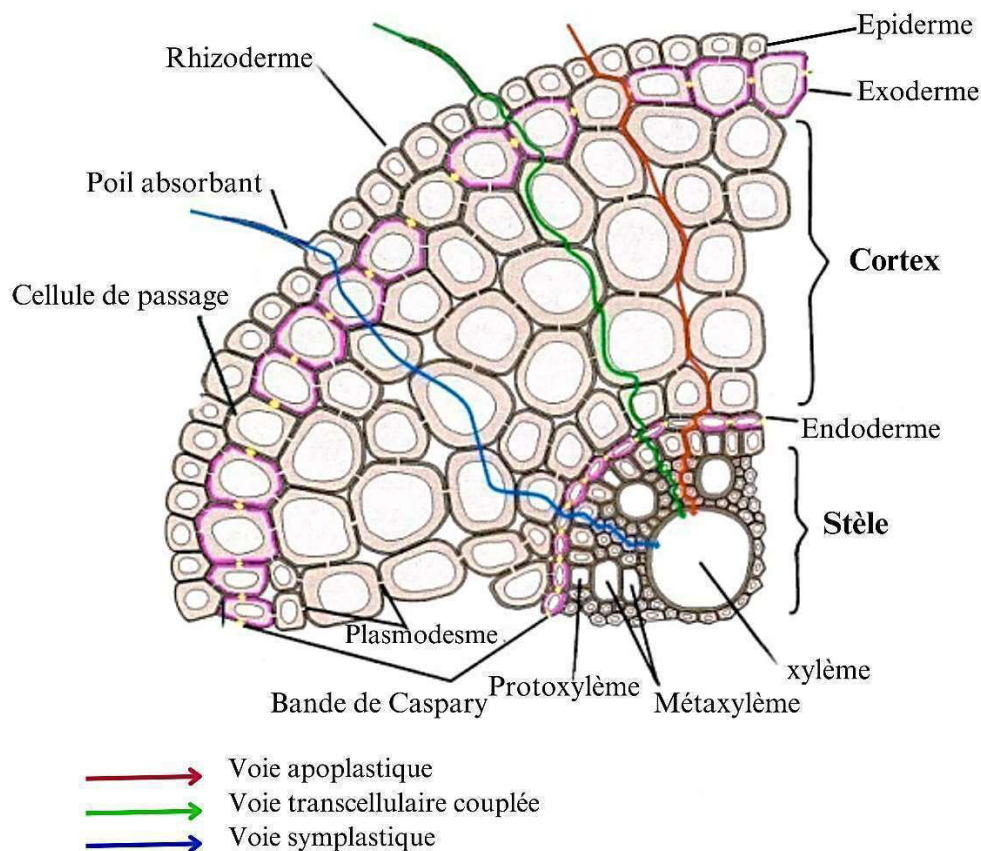


Fig. 12 : Voies d'absorption de l'eau et des ETMs par les racines (Kim *et al.*, 2018) (modifiée par Bouchama, K).

La présence des cadres de Caspary dans l'endoderme obstrue la voie apoplastique et rend la voie symplastique obligatoire. Une partie d'ETMs qui se trouvent dans la voie apoplastique peut rejoindre la voie symplastique puis le xylème à travers les plasmodesmes qui traversent les parois cellulaires et relient les cytoplasmes des cellules adjacentes (Remon, 2006).

Les ETMs, dont le cadmium et le nickel, peuvent avoir des effets phytotoxiques sur les plantes, à la fois de manière directe et indirecte (Fig. 13) (Raza *et al.*, 2022). La phytotoxicité des ETMs peut entraîner de graves dommages et dysfonctionnements, notamment une

croissance réduite ou inhibée, une faible biomasse et une production réduite, un retard et une inhibition de la germination, la chlorose, une perturbation de l'absorption des nutriments et de l'eau, la dénaturation des enzymes et des protéines essentielles (Haider *et al.*, 2021). Indirectement, ils accélèrent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), l'activation des enzymes du system antioxydant, la peroxydation des lipides, l'altération de l'ADN et de l'ARN et finalement l'apoptose cellulaire et la mort de la plante (Hassan *et al.*, 2019; Raza *et al.*, 2022).

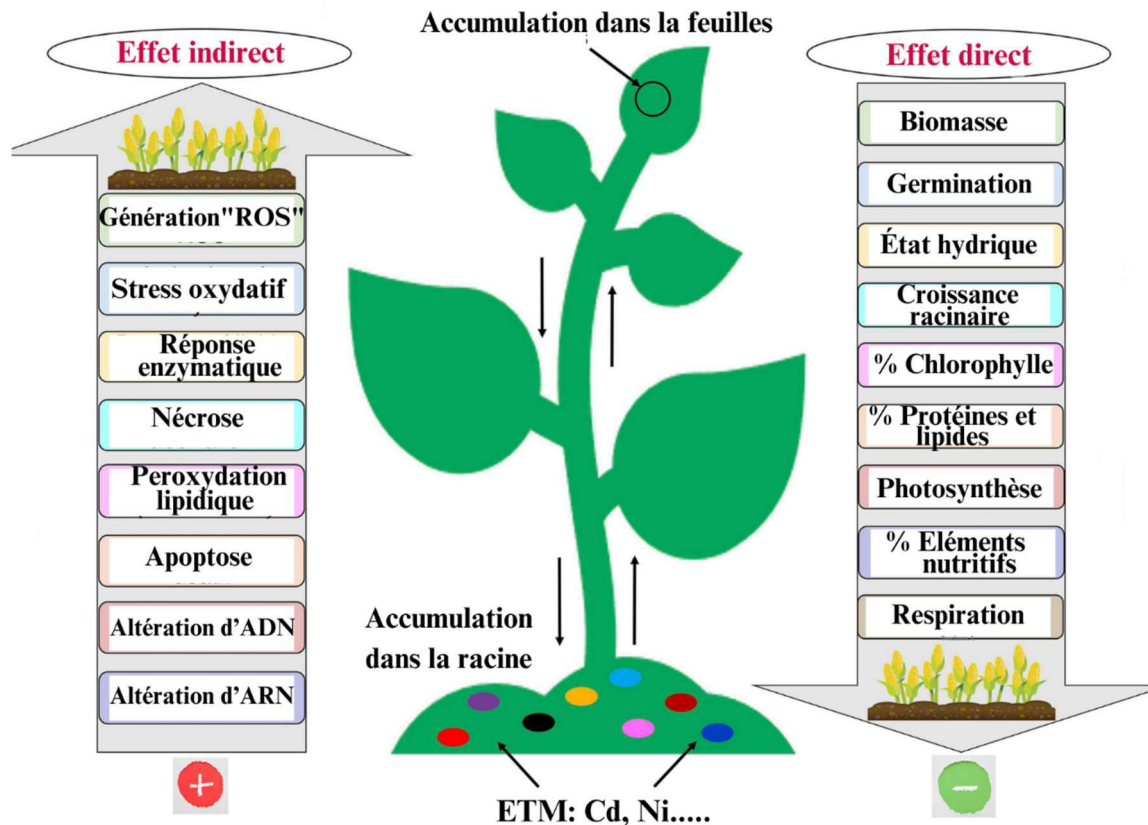


Fig. 13: Effets phytotoxiques directs et indirects du cadmium et du nickel sur les plantes (Raza *et al.*, 2022) (modifiée par Bouchama, K).

3.1 Phytotoxicité du cadmium

Le Cd est un élément trace métallique qui soulève de sérieuses préoccupations sur le plan environnemental et sanitaire. Il est l'un des éléments les plus mobiles dans l'environnement. Même s'il n'a pas de fonction biologique connue dans la plupart des organismes vivants, il est absorbé et accumulé dans leurs tissus (Adriano, 2001). Sauf chez la diatomée marine *Thalassiosira weissflogii*, chez laquelle il agit comme cofacteur de l'anhydrase carbonique, une enzyme permettant de convertir l'ion bicarbonate (HCO_3^-) en CO_2 (utiliser HCO_3^- comme source de carbone) (Lane *et al.*, 2005). Les plantes sont considérées comme la principale voie d'entrée du Cd dans la chaîne trophique. Il est absorbé par les racines via les voies apoplasmique

et symplasmique, en utilisant les mêmes transporteurs membranaires des nutriments essentiels comme le Zn ou le Ca^{2+} . Une fois absorbé, il est transporté vers la partie aérienne de la plante via le xylème, et vers les autres parties de la plante via le phloème (Dong *et al.*, 2019; Huybrechts *et al.*, 2019). En empruntant les canaux membranaires des nutriments essentiels, le Cd induit une déficience nutritionnelle chez les plantes, ce qui affecte leur développement. Il est capable d'interférer avec l'absorption de plusieurs nutriments comme le calcium, le fer, le zinc, le magnésium et le phosphore (Das *et al.*, 1997). Ainsi que l'absorption et la translocation des nitrates vers les parties aériennes (Tang *et al.*, 2018).

Les symptômes de toxicité du cadmium se manifestent généralement par une réduction globale de la croissance, une chlorose, une nécrose des tissus des organes, un flétrissement généralisé, une coloration rouge-orange des feuilles et une nécrose le long des veines principales des feuilles (Adriano, 2001). Le Cd est reconnu pour son effet inhibiteur sur la photosynthèse, Il réduit la transcription de gènes essentiels à ce processus (Qian *et al.*, 2010). Il inhibe également l'activité des enzymes clés de la photosynthèse, telles que la Rubisco et la phosphoénolpyruvate carboxylase (Bashir *et al.*, 2013). Le Cd induit la peroxydation des lipides (Iannone *et al.*, 2010), perturbe la fonction des protéines en remplaçant les ions essentiels dans leurs sites actifs en raison de sa forte similitude chimique avec d'autres cations divalents (Huybrechts *et al.*, 2019), modifie la transpiration des feuilles en affectant la densité et la conductance stomatique (Hatamian *et al.*, 2020), diminue l'efficacité du système de défense antioxydant contre les ERO (Gill et Tuteja, 2010). Le Cd peut endommager le matériel génétique des plantes de différentes manières. Il provoque des cassures dans le double brin de l'ADN, entraîne une oxydation indirecte de l'ADN par la génération de ERO (Haider *et al.*, 2021). Le radical hydroxyle ($\text{HO}\bullet$), qui est hautement électrophile, oxyde préférentiellement la position 5 de la cytosine et de la thymine, et peut également attaquer l'atome d'hydrogène du groupe méthyle de la thymine (Nzengue *et al.*, 2011). Un autre symptôme de toxicité du Cd est la perturbation de la mitose (Jin *et al.*, 2003). Le Cd peut également interférer avec le métabolisme de l'ARN, déclencher l'apoptose et la mort cellulaire (*Programmed cell death*) (Quadros *et al.*, 2022).

3.2 Phytotoxicité du nickel

Le nickel a longtemps été considéré comme un élément non essentiel et potentiellement toxique pour les plantes. Cependant, au cours des années 1970, des recherches ont mis en lumière l'importance de cet élément pour la nutrition des végétaux (Michalak *et al.*, 2018). Le Ni s'est révélé bénéfique à faibles concentrations pour les plantes. Il est considéré comme

un nutriment important à la croissance et au développement normaux des plantes, et essentiel à l'activation de plusieurs enzymes telles que l'uréase et la glyoxalase (Shahzad *et al.*, 2018). Le Ni joue un rôle important dans un large éventail de processus physiologiques, notamment la germination des graines, la croissance végétative, la reproduction, la photosynthèse ainsi que dans le métabolisme de l'azote (Bai *et al.*, 2013). Le caractère essentiel du nickel en tant que micronutriment dans les plantes a été établi car il fait partie du site actif de l'enzyme uréase, qui hydrolyse l'urée dans les tissus (Chen *et al.*, 2009). Deux formes d'uréase sont présentes dans les plantes : l'une très active qui se trouve dans les graines et l'autre moins active dans les autres tissus de la plante. Bien qu'elle soit moins active, cette dernière joue un rôle important dans le recyclage de l'azote dans les plantes (Polacco *et al.*, 2013). À certains seuils potentiellement toxiques, l'urée est métabolisée en ammoniac par l'action de l'uréase. L'azote de l'ammoniac peut alors être réutilisé dans d'autres voies métaboliques, comme la synthèse d'acides aminés, de polyamines et d'autres composés azotés (Gerendas et Sattelmacher, 1999). En l'absence de nickel, l'urée peut s'accumuler dans les tissus à des niveaux toxiques, ce qui peut causer des lésions nécrotiques dans les feuilles et par conséquent affecter la photosynthèse (S. Li *et al.*, 2022). Le nickel joue un rôle important dans l'activation du système glyoxalase, un système enzymatique responsable de la dégradation du méthylglyoxal (pyruvaldéhyde et 2-oxopropanal), un puissant composé cytotoxique produit naturellement par le métabolisme cellulaire lors de la glycolyse, la peroxydation des lipides et dans des conditions de stress (Ghosh *et al.*, 2016; Sankaranarayanan *et al.*, 2017). La glyoxalase détoxifie le méthylglyoxal en le transformant en D-lactate non toxique, en utilisant le glutathion réduit (GSH) comme cofacteur (Kaur *et al.*, 2014).

Le nickel est considéré comme un micronutriment essentiel pour la plupart des plantes, car il est présent naturellement dans les tissus végétaux à des concentrations allant de 0,05 à 10 ppm de matière sèche, selon les plantes cultivées (Adriano, 2001; Hassan *et al.*, 2019; Nieminen *et al.*, 2007). Plusieurs études ont montré que le nickel est toxique pour de nombreuses plantes, mais à des concentrations différentes. Les concentrations seuils pour la toxicité létale du Ni sont généralement signalées comme étant inférieures à 100 ppm (Adriano, 2001). Cependant, des concentrations élevées de Ni ont été trouvées dans des espèces dites hyperaccumulatrices : 600 ppm dans *Acer spp.* (Nieminen, 2004), 1900 ppm dans *Linaria vulgaris* (Brooks, 1994), et 17000 ppm dans *Bornmuellera tymphaea* (Hipfinger *et al.*, 2022).

Lorsque les concentrations dépassent le seuil de tolérance d'une espèce donnée, le Ni peut altérer de nombreux processus physiologiques et biochimiques. Il peut inhiber la germination et la croissance des racines, réduire l'absorption d'eau et de nutriments, et diminuer le taux de

photosynthèse (Mustafa *et al.*, 2023).

Dans les feuilles, la toxicité du Ni peut également altérer les pigments photosynthétiques, entraînant ainsi une nécrose et une chlorose des feuilles. Le stress induit par le Ni peut réduire la stabilité de la membrane cellulaire, entraîner la perte d'osmolytes et une diminution de la pression de turgescence, causant ainsi la fermeture des stomates (Adriano, 2001; Gerendas et Sattelmacher, 1999; Hassan *et al.*, 2019). Le Ni peut également perturber l'équilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et le système de défense antioxydant, entraînant une accumulation de ERO et induisant un stress oxydatif. La production de ERO peut altérer la synthèse des protéines et des lipides, affecter les activités enzymatiques, provoquer la peroxydation des lipides, l'oxydation de l'ADN et perturber la division cellulaire (Bai *et al.*, 2013; Shahzad *et al.*, 2018).

4 Mécanismes de tolérance et de détoxification

Les plantes, en tant qu'organismes sessiles, n'ont aucun moyen d'échapper au stress métallique et aux conditions environnementales défavorables. La façon dont les plantes réagissent au stress métallique est complexe. Elle résulte de la combinaison de divers mécanismes à différents niveaux d'organisation. La capacité des plantes à s'adapter repose sur l'activation de réactions moléculaires en chaîne qui commence par la perception et se termine par une réponse au stress (Melanie *et al.*, 2013). La cascade de signalisation débute par la perception du stimulus au niveau de la membrane cellulaire, puis elle entraîne la production de molécules messagères secondaires et de facteurs de transcription. Ces derniers régulent l'expression des gènes impliqués dans la réaction au stress, ce qui engendre des modifications morphologiques, biochimiques et physiologiques (Calatayud *et al.*, 2013; Raza *et al.*, 2022).

Pour faire face au stress métallique, les plantes ont développé de multiples mécanismes adaptatifs (Qadir *et al.*, 2014). Les plantes résistantes ont la capacité de survivre et de se reproduire en présence de concentrations élevées d'ETMs dans leur environnement. Ces mécanismes de résistance et d'adaptation peuvent être réalisés selon les deux stratégies : l'évitement et/ou la tolérance (Jutsz et Gnida, 2015). Les plantes évitantes sont capables de se protéger en empêchant les ions métalliques de pénétrer dans leur cytoplasme cellulaire, tandis que les plantes tolérantes sont capables de détoxifier les ions métalliques qui ont traversé la membrane plasmique ou les membranes internes des organites (Millaleo *et al.*, 2010).

4.1 L'évitement

Les plantes mettent en œuvre des stratégies d'évitement afin de limiter l'absorption des ETMs par le système racinaire, ainsi que de restreindre leur entrée et leur mouvement au sein des cellules. Cela est réalisé grâce à :

- **La synthèse de callose** : la première réaction de défense en cas de présence d'ETMs est une synthèse de callose (β -1,3-glucane). Ce polysaccharide est déposé à l'extérieur de la membrane cellulaire, réduisant ainsi la diffusion des ions métalliques dans la cellule (Miransari, 2011).

- **la production d'acides organiques** : L'évitement se fait également par la production d'acides organiques (e.g. le citrate, le malate, l'oxalate) et d'exsudats racinaires pour la chélation, la séquestration et la complexation des ETMs (Song *et al.*, 2017). Dans un environnement pollué par les ETMs, les racines des plantes sécrètent un certain nombre de substances qui peuvent se lier aux ions métalliques et limiter leur assimilation, telles que les acides organiques et les substances présentes dans la matrice extracellulaire des racines (e.g. les glucides simples, les phénols, les acides aminés et les gels de polysaccharides) (Jutsz et Gnida, 2015).

- **Adsorption sur les parois** : Les ETMs peuvent s'adsorber sur les parois cellulaires des racines par des liaisons ioniques, covalentes, hydrogène ou des interactions électrostatiques. Les sites de fixation sur les parois cellulaires incluent les groupements carboxyle, hydroxyle, phénoliques et les groupements sulfhydryle. Le Cd par exemple peut se lier aux groupes hydroxyles des hémicelluloses par des liaisons covalentes (Deshwal *et al.*, 2023; Miransari, 2011).

4.2 La Tolérance

En l'absence de stratégies d'évitement, certaines plantes peuvent pousser et survivre dans des environnements contaminés par des niveaux toxiques d'ETMs, qui sont par ailleurs mortels ou préjudiciables à la croissance et à la survie d'autres espèces (Maestri et Marmiroli, 2012). Les stratégies de tolérance font référence aux réponses des plantes face à la phytotoxicité des ETMs une fois qu'ils ont pénétré dans les cellules. Le mécanisme de tolérance inclut la séquestration et la chélation en les liant à des peptides et des protéines (Viehweger, 2014). Les ligands organiques intracellulaires (ou chélateurs) assurent la complexation, le transport, l'accumulation et la séquestration du complexe ETMs-ligands dans les vacuoles. Chez les végétaux, les principaux groupes de ligands intracellulaires sont :

- **Les métallothionéines** : Sont des protéines de faible poids moléculaire riches en cystéines, présentes de manière universelle chez les espèces résistantes ou sensibles. Elles sont davantage impliquées dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire des ETMs que dans des réponses spécifiques à un ETM donné (Schat *et al.*, 2002).
- **Les phytochélatines** : Représentent un autre groupe de chélateurs intracellulaires, spécifiques au règne végétal, de nature peptidique, avec une structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly/}$ $n=2$ à 11, Leur poids moléculaire est inférieur à celui des métallothionéines et ils sont synthétisés en réponse à la présence d'ETMs (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001; Remon, 2006).
- **Les acides aminés libres** : Lors d'un stress métallique, certains acides aminés libres tels que la proline et l'histidine peuvent s'accumuler et jouer un rôle dans la chélation de différents ETMs, tels que le Ni (Bert, 2000). La cystéine et la méthionine sont des acides aminés contenant du soufre qui possèdent des groupes sulfhydriles ou thiol (-SH) capables de former des liaisons avec le Cd et le Pb (Remon, 2006).
- **Les acides organiques** : En présence d'ETMs une augmentation de la biosynthèse des acides organiques, comme les acides fumarique, malique, oxalique (acides dicarboxyliques) et l'acide citrique (acide tricarboxylique) a été observée chez les végétaux. Ces acides organiques sont clairement impliqués dans les processus de chélation, complexation et la séquestration des ETMs dans les vacuoles (Ma *et al.*, 1997).
- **le système antioxydant** : Le maintien des capacités antioxydantes, qu'elles soient enzymatiques ou non enzymatiques, est également crucial pour éliminer les niveaux toxiques d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO, sont des radicaux contenant de l'oxygène, extrêmement nocifs pour les cellules végétales, générés en excès sous l'effet du stress oxydatif, tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) (Das et Roychoudhury, 2014; Hasanuzzaman *et al.*, 2020). Les principales enzymes impliquées dans l'élimination et la détoxification des ERO comprennent la gâïacol peroxydase (GPOx), la catalase (CAT), le glutathion (GSH), la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX) et la monodéhydro-ascorbate réductase (MDHAR). En ce qui concerne les antioxydants non enzymatiques, ils incluent la proline, l'acide ascorbique, les caroténoïdes, les flavonoïdes et les polyphénols (Bacha *et al.*, 2017; Ederli *et al.*, 2004).

Partie 2 : Expérimentations et discussions des résultats

Chapitre I : Phytotoxicité de Cd et/ou Ni sur la germination

L'étude des effets du Cd et/ou Ni sur la germination, la croissance précoce des plantules, et la réponse enzymatique antioxydante constitue un outil intéressant, non seulement elle permet d'estimer la tolérance des semis au stress oxydatif induit par le Cd et/ou le Ni, mais elle évalue également le potentiel de cette espèce à se propager et à se régénérer par reproduction sexuée dans les marais filtrants ou les habitats contaminés par Ni et Cd.

Les enzymes de système antioxydantes constituent la première ligne de défense contre le stress oxydatif induit par les ETMs. Leur activité reflète directement la capacité de la plante à se défendre contre les espèces réactives de l'oxygène générées. Les changements dans l'activité des enzymes du système antioxydant sont une réponse précoce et sensible au stress métallique, ce qui en fait de bons biomarqueurs pour détecter les effets des ETM.

Dans ce contexte, les principaux objectifs de ce chapitre sont : 1) évaluer l'effet inhibiteur du Cd et/ou du Ni sur les caractéristiques de la germination des graines de *P. australis* en utilisant six (06) indices de germination : Pourcentage final de germination (GP%) ; Temps moyen de germination (MGT) ; Temps de 50% de germination (T50%) ; Indice de germination (IG) ; Indice de longueur de la radicule et de la racine (RLI) ; Indice de la longueur des pousses (semis) (PLI). 2) Discuter la réponse différentielle des enzymes : la Glutathion peroxydase (GPOx), la catalase (CAT), et le glutathion S-transférases (GST), impliquées dans la détoxification cellulaire dans les trois organes des plantules de *P. australis* (feuille, tige et racine). L'évaluation des effets phytotoxiques du Cd et/ou du Ni sur les caractéristiques de la germination et la réponse des enzymes du système antioxydant ont été réalisées au laboratoire G.F. Ingrassia de l'Université de Catane, Italie.

1 Matériel et méthodes

1.1 Test de germination

Le test de germination a été réalisé selon la méthode standard de l'agence américaine de la protection de l'environnement (USEPA) (EPA, 1996) et le protocole de test de germination et de croissance des plantules de l'organisation de coopération et de développement économiques (OECD, 2003). Les graines de *P. australis* ont été obtenues à partir de roseaux âgés de deux ans, cultivés à l'extérieur dans un système hydroponique, en utilisant une dilution au 1/4 de NPK (20-20-20) comme source de nutriments. Le système hydroponique a été installé dans la wilaya de Tébessa, au nord-est de l'Algérie. Les roseaux de deux ans ont été cultivés à

partir de rhizomes obtenus d'une population naturelle croissant dans le barrage de Babar ($35^{\circ}10'31.1''$ N et $7^{\circ}01'15.4''$ E), wilaya de Khenchela, au nord-est de l'Algérie. Aucune pollution par les ETMs ou polluants organiques n'a été signalée dans les eaux du barrage. Nous avons collecté les graines à partir de la partie médiane de l'inflorescence en utilisant un tamis pour obtenir des graines homogènes en termes de poids et de taille (poids des graines : $16,77 \pm 0,11$ mg/100 graines, $n = 21$). Après la collecte, toutes les graines ont été conservées à l'obscurité à 4°C jusqu'au début du processus de germination.

1.2 Test de phytotoxicité

La viabilité des graines a d'abord été vérifiée en les suspendant dans de l'eau déionisée, et celles qui se sont déposées au fond avec des téguments sains ont été sélectionnés. Les graines choisies ont ensuite été trempées dans une solution à 6% d'hypochlorite de sodium (NaClO) pendant 5 minutes et rincées à l'eau déionisée pendant 10 minutes.

Afin de minimiser la contamination par des champignons et des bactéries, les boîtes de germination (14 cm de diamètre) ont été autoclavées pendant 15 minutes à 121°C avant de débiter le test. L'expérience a été réalisée avec 16 groupes :

- Un groupe témoin non traité : Eau distillée plus solution nutritive de Hoagland.
- Six groupes traités avec des doses croissantes de Cd : 10, 30 et 100 ppb ; 100, 500 et 1000 ppm.
- Six groupes traités avec des doses croissantes de Ni : 30, 60 et 120 ppb ; 100, 500 et 1000 ppm.
- Trois groupes traités avec des doses mixtes de Cd + Ni :
Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) ; Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) ; Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm).

Les doses de Cd et de Ni utilisées dans notre expérimentation ont été analysées immédiatement après leur préparation par un spectrophotomètre de masse à plasma à couplage inductif NexION® 300D (ICP-MS : Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA). Les trois doses élevées (100, 500 et 1000 ppm) ont été choisies pour évaluer la capacité des graines et des semis à tolérer des niveaux élevés de Cd et de Ni. Les trois faibles doses de Cd et de Ni ont été utilisées pour évaluer le niveau de sensibilité de la germination des grains. Concernant les doses mixtes, l'objectif de leur utilisation est de tester les effets de synergie ou d'antagonisme entre le Cd et le Ni. L'expérience a été menée en utilisant un total de 4800 graines, réparties en 3 répétitions indépendantes, 1600 graines par répétition et 100 graines par traitement. Cent (100) grains ont été déposées dans chaque boîte de germination tapissée de papier de germination (Sartorius Stedim Biotech™). Les graines ont ensuite été traitées avec 15 ml d'une solution contenant l'une

des doses de Cd et/ou Ni, ainsi que 1/4 de solution nutritive de Hoagland (Basal Salt Mixture : Sigma-Aldrich, Cat. no : H2395) : $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ (115.03 mg l^{-1}), H_3BO_3 (2.86 mg l^{-1}), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (656.4 mg l^{-1}), CuSO_4 (0.08 mg l^{-1}), $\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$ (5.32 mg l^{-1}), MgSO_4 (240.7 mg l^{-1}), MnCl_2 (1.81 mg l^{-1}), MoO_3 (0.016 mg l^{-1}), KNO_3 (606.6 mg l^{-1}), ZnSO_4 (0.22 mg l^{-1}). Pour prévenir le dessèchement, 2 à 3 ml d'eau ont été ajoutés tous les 3 jours.

Les boîtes de germination ont ensuite été placées dans une serre avec des températures de $23 \pm 3^\circ\text{C}$ le jour et de $11 \pm 4^\circ\text{C}$ la nuit, ainsi qu'une intensité lumineuse ≥ 5400 lux et une photopériode de 12 heures. L'alternance des températures et de la photopériode était similaire à celles des conditions réelles au printemps dans le nord-est de l'Algérie, offrant ainsi des conditions propices à la germination de *P. australis* (Alfadul et Al-Fredan, 2013; Gorai *et al.*, 2006).

1.3 Indices de germination

Au cours des 20 jours de l'expérience, un comptage des graines germées a été effectué quotidiennement avec un intervalle de 24 heures. Une graine était considérée comme germée lorsque la radicule qui perçait la cuticule mesurait environ 1 mm de longueur (Gorai *et al.*, 2006). Si aucune radicule n'avait émergé, la graine était considérée comme germée lorsque 2 mm de coléoptile avaient émergé (Guterres *et al.*, 2019). Le processus de germination a été considéré comme achevé lorsque aucune nouvelle germination n'a été observée pendant cinq (05) jours consécutifs. Six (06) indices de germination ont été déterminés : Pourcentage final de germination (GP%) ; Temps moyen de germination (MGT) ; Temps de 50% de germination (T50%) ; Indice de germination (IG) ; Indice de longueur de la radicule et de la racine (RLI) ; Indice de longueur des pousses (PLI).

- **Pourcentage final de germination** : $GP\% = \frac{Ng}{Nt} \times 100$

Ng : Nombre des grains germés et Nt nombre total des grains.

- **Temps moyen de germination (MGT)** : $MGT = \frac{\sum(t \times n)}{\sum n}$ (day)

où : t = le temps en jours entre le jour (0) et la fin du test de germination, et n est le nombre de graines germées au jour t (Ellis, 1981).

- **Temps de 50% de germination (T50%)** : $T50\% = t_i - \frac{(n/2 - n_i) \times (t_j - t_i)}{(n_j - n_i)}$ (day)

Le temps jusqu'à 50 % de germination est le temps nécessaire pour atteindre 50 % de germination finale, calculé selon la formule de Farooq *et al.* (2005).

Où : n est le nombre final de graines germées, n_i et n_j sont le nombre total de graines germées par comptages adjacents aux temps t_i et t_j , où : $n_i < \frac{(n+1)}{2} < n_j$.

- **Indice de germination (IG) :** L'indice de germination est le taux de germination exprimé en termes de nombre total de graines qui germent dans un intervalle de temps. L'indice a été calculé comme décrit par l'Association des Analystes Officiels des Semences (AOSA, 1983).

$$GI = \frac{\text{Nombre de grains germés}}{\text{premier jour de décompte}} + \dots + \frac{\text{Nombre de grains germés}}{\text{Dernier jour de décompte}} (\text{Grain} \cdot \text{jour}^{-1})$$

- Indices de croissance en longueur des semis (pousses, plantules)

Les indices de longueur des racines (RLI) et des pousses (PLI) ont été mesurés à des intervalles de 10 jours (à 10, 20 et 30 jours) pour 15 plantules choisies au hasard pour chaque traitement et à chaque période ($n = 15$). Les trois périodes de mesure ont été sélectionnées afin d'évaluer l'effet du Cd et Ni sur les pousses ou les plantules à différents stades de croissance. Les plantules ont été numérisées et scannées à l'aide d'un scanner Epson Perfection V700, puis mesurées à l'aide du logiciel d'image Mesurim Pro version 3.4 (Madre, Académie d'Amiens, France). La longueur des racines a été mesurée depuis la jonction racine-pousse jusqu'à l'extrémité de la racine.

$$RLI (\%) = \frac{\text{Longueur de la racine la plus longue sous Cd et/ou du Ni}}{\text{Longueur de la racine la plus longue groupe témoin}} \times 100$$

La longueur des pousses a été mesurée depuis la jonction racine-pousse jusqu'à l'extrémité de la pousse.

$$SLI (\%) = \frac{\text{Longueur de la pousse la plus longue sous Cd et/ou du Ni}}{\text{Longueur de la pousse la plus longue groupe témoin}} \times 100$$

1.4 Dosage des enzymes du système antioxydant

L'activité de la gaïacol peroxydase (EC 1.1.1.7 ; GPOx), l'activité de la catalase (CAT) (EC 1.11.1.6 ; CAT) et l'activité glutathion-S-transférase (GST) (EC 2.5.1.18 ; GSTs) ont été mesurées dans les feuilles, les tiges et les racines des pousses de *P. australis* (âgée de 30 jours) exposées à différentes doses de Cd et/ou Ni. 0,5 g de chaque échantillon a été prélevé et conservé à -80 °C (dans de l'azote liquide) jusqu'au début de l'analyse.

La détermination quantitative des activités enzymatiques de la CAT, de la GPOX et de la GST a été effectuée par spectrophotométrie, en appliquant l'équation établie par Servais (2004).

$$Act = \frac{\Delta A. Vt}{\varepsilon. \Delta t. L. Ve. p}$$

Act = Activité enzymatique ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protéine)

ΔA = Variation de l'absorbance par minute

Vt = Volume total du mélange réactionnel (ml)

ε = Coefficient d'extinction molaire ($\mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

Δt = Intervalle de temps entre deux mesures (min)

L = Longueur de la cuve (cm)

Ve = Volume de l'extrait enzymatique introduit dans le mélange réactionnel (ml)

P = Quantité de protéines totales présentes dans l'extrait enzymatique (mg)

1.4.1 Dosage de l'activité Gaiacol-Peroxydase (GPOx)

Les échantillons ont été homogénéisés (séparément) dans 5 ml de tampon phosphate (50 mM, pH 7,5). L'homogénat a ensuite été centrifugé à 12 000 g pendant 20 min à 4 °C, et le surnageant résultant a été utilisé pour mesurer l'activité de GPOx (Loggini *et al.*, 1999). Le test est basé sur l'utilisation du gaiacol (2-méthoxyphénol) comme donneur d'hydrogène. En présence de peroxyde d'hydrogène, il se forme le tétra gaiacol qui présente un maximum d'absorption à 470 nm. L'évolution cinétique de l'absorbance à 470 nm a été mesurée pendant 1 min (Lin et Kao, 1999). L'activité GPOx a été calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire du tétra gaiacol ($\varepsilon = 26,6 \mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et exprimée en μmol de gaiacol oxydé par minute et par mg de protéine à 25 °C. Pour un volume final de 3 ml, le mélange réactionnel contient 100 μl d'extrait enzymatique, 50 μl de H_2O_2 (à 0,3%), et 2850 μl de tampon gaiacol-phosphate (50 mM NaK, 8 mM de gaiacol, pH 7,2). La réaction est initiée par l'ajout de peroxyde d'hydrogène (Fielding et Hall, 1978).

1.4.2 Dosage de l'activité Catalase (CAT)

Les échantillons ont été homogénéisés (séparément) dans 5 ml de tampon phosphate (50 mM, pH 7,5). L'homogénat a ensuite été centrifugé à 12 000 g pendant 20 min à 4 °C, et le surnageant résultant a été utilisé pour mesurer l'activité de CAT. Le dosage spectrophotométrique de l'activité catalase (CAT) a été effectué suivant la méthode de Cakmak et Horst (1991). La diminution de l'absorbance a été enregistrée pendant trois minutes à une longueur d'onde de 240nm et un coefficient d'extinction molaire de $\varepsilon = 39400 \mu\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Le volume réactionnel total était de 3ml, contenant : 100 μl d'extrait enzymatique brut, 50 μl de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 0,3% et 2850 μl de tampon phosphate (50mM, pH 7,2).

L'étalonnage a été réalisé en l'absence d'extrait enzymatique. La réaction a été initiée par l'addition de peroxyde d'hydrogène. L'activité catalase est exprimée en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de protéines.

1.4.3 Dosage de l'activité glutathion-S-transférase (GST)

La quantification de l'activité de la glutathion S-transférase (GST) est déterminée en utilisant la méthode de Habig *et al.* (1974). Cette méthode repose sur la réaction de conjugaison entre la GST et un substrat, le CDNB (1-chloro 2,4 dinitrobenzène), en présence d'un cofacteur, le glutathion (GSH). Cette conjugaison engendre la formation d'une nouvelle molécule (1-S-Glutathionyl-2-4-dinitrobenzène) qui absorbe la lumière à 340 nm. La densité optique mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé, ce qui est intrinsèquement lié à l'intensité de l'activité GST (Habig *et al.*, 1974).

Les échantillons (0.5 g) sont homogénéisés dans 5 ml de tampon phosphate (0,1 M, pH 6). L'homogénat est centrifugé ensuite à 14000 tours/minute pendant 30 minutes et le surnageant récupéré sert de source d'enzymes. Le dosage consiste à faire réagir 200 μl du surnageant avec 1,2 ml du mélange CDNB (1 mM)/GSH (5 mM) [20,26 mg CDNB, 153,65 mg GSH, 1 ml éthanol, 100 ml tampon phosphate (0,1 M, pH 6)]. La lecture des absorbances est effectuée pendant une minute, toutes les 15 secondes, à 340 nm contre un blanc contenant 200 μl d'eau distillée remplaçant la quantité de surnageant.

2 Analyse statistique

Un dispositif en split-plot a été utilisé pour l'analyse des résultats. Les résultats des indices de germination (GP% ; MGT ; T50% ; IG ; RLI ; PLI) et de l'activité des enzymes du système antioxydant (CAT, GPOx, GST) ont été exprimés sous forme de moyenne de trois expériences indépendantes (\pm écart-type). À l'aide d'une analyse de variance à un facteur (ANOVA), avec $p \leq 0,05$, les résultats ont été testés afin de détecter les différences significatives entre les valeurs moyennes obtenues sous les différents traitements avec Cd et/ou Ni. Les données des indices de longueur des plantules RLI et PLI pour chaque période (10, 20 et 30 jours) ont été testées séparément pour détecter les différences significatives entre les groupes (y compris le groupe témoin : $n=15$). Le test de Tukey avec $p = 0,05$ a été utilisé pour la comparaison des moyennes des résultats significativement différents. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel IBM SPSS version 25 (SPSS Inc. 2011). Enfin, pour une meilleure visualisation des résultats, des histogrammes ont été réalisés avec les logiciels R.

3 Résultats

3.1 Pourcentage final de germination

Les variations du pourcentage final de germination (GP%) des graines de *P. australis* dans le groupe témoin et sous les différentes doses simples et combinées de Cd et/ou de Ni sont illustrées dans la Figure 14 (a ; b et c) et les tableaux (03 ; 04 et 05).

Globalement, les résultats montrent que les graines de *P. australis*, ont pu germer sous toutes les doses testées. Comparativement au groupe témoin, toutes les doses de Cd et/ou de Ni testées ont réduit le pourcentage final de germination, sauf sous Ni 30, 60 et 120 ppb où nous avons enregistré respectivement 96.33%, 96.67% et 96.00%, contre 95.33% dans le groupe témoin. L'analyse statistique a révélé des différences significatives entre les effets des doses de Cd ($F_{6,14} = 50.6$; $p = 0.000 < 0.05$); Ni ($F_{6,14} = 47.49$; $p = 0.000 < 0.05$); Cd + Ni ($F_{6,14} = 58.01$; $p = 0.000 < 0.05$). Cependant des variations non significatives entre les valeurs de GP% du groupe témoin et celles des autres groupes traités avec de faibles doses de Cd (10, 30 ppb) et de Ni (30, 60 et 120 ppb). Seule la dose de Cd (100 ppb) a entraîné une réduction significative du taux final de germination, avec un GP% de 76,67 %. En ce qui concerne les groupes traités avec des doses élevées de Cd (100, 500 et 1000 ppm), de Ni (100, 500 et 1000 ppm), ainsi qu'avec les trois doses mixtes, l'effet inhibiteur a été significatif sur le GP% de manière dose-dépendante. La figure 13, montre aussi que les premiers grains ont commencé à germer dans le groupe témoin après 5 jours tandis que dans les groupes traités par le Cd, les premiers grains ont commencé à germer après 6 jours dans les groupes traités avec 10, 30, 100 ppb et 100 ppm, et après 7 jours sous 500 et 1000 ppm. Les dernières graines ont germé le 12^{ème} jour dans le groupe témoin et sous les faibles doses de Cd (10, 30 et 100 ppb) et entre le 14^{ème} et le 17^{ème} jour sous les doses 100, 500 et 1000 ppm.

Sous les différentes doses de Ni, les faibles doses de 30, 60 et 120 ppb ne semblent pas avoir retardé la germination, et les premiers grains ont germé après 5 jours, comme chez le groupe témoin. En revanche, sous les doses élevées, le début de la germination a eu lieu après 7 jours sous 100 et 500 ppm, et après 8 jours sous 1000 ppm. Les derniers grains ont germé le 12^{ème} jour sous 30 et 60 ppb et le 14^{ème} jour sous 120 ppb. Dans les groupes traités par les doses 100 et 500 ppm, les dernières graines ont germé le 15^{ème} jour, mais sous 1000 ppm, c'était le 18^{ème} jour. En ce qui concerne l'effet des doses mixtes sur la germination, les premiers grains ont commencé à germer après 7 jours dans les groupes traités avec Cd(1000 ppm) + Ni(120 ppb) et Cd (100 ppm)+Ni (100 ppm), et le 8^{ème} jour sous Cd (100 ppb) +Ni (1000 ppm). Quant aux derniers grains, ils ont germé le 15^{ème}, le 18^{ème} et le 20^{ème} jour.

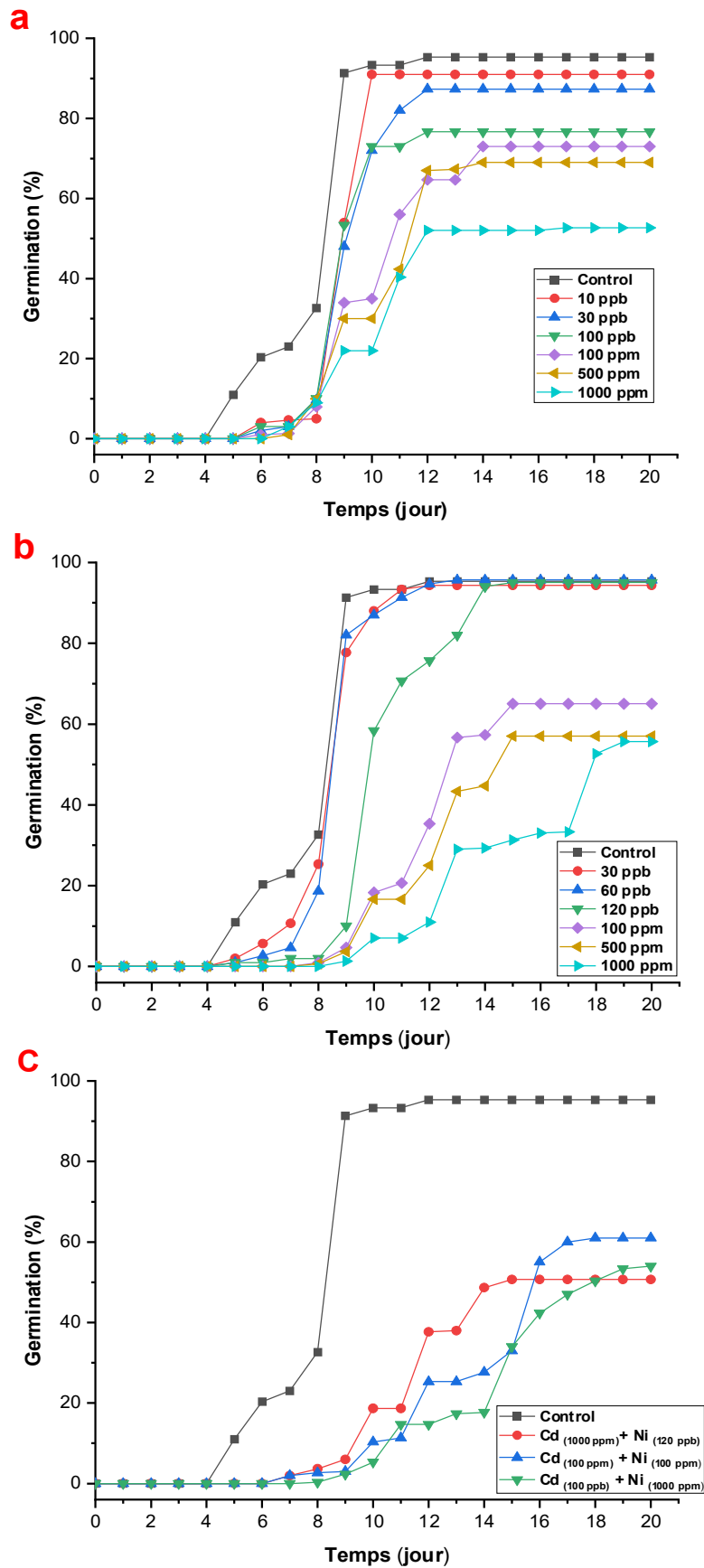


Fig. 14. Pourcentage final de germination des graines de *Phragmites australis* (GP%) après 20 jours d'exposition à différentes concentrations de Cd (a), Ni (b), et Cd + Ni (c) (*Moyenne de 3 expériences indépendantes ; n = 3*).

3.2 Indices de germination

3.2.1 Temps moyen de germination (MGT)

Les résultats de l'indice du temps moyen de germination (MGT) sont présentés dans les tableaux (03 ; 04 et 05). Les résultats indiquent que toutes les doses de Cd, de Ni et de Cd+Ni ont retardé la germination des graines de *P. australis*. Par rapport au groupe témoin, les différences étaient statistiquement significatives pour Cd ($F_{6,14} = 90,79$; $p = 0,000 < 0,05$) ; Ni ($F_{6,14} = 94,11$; $p = 0,000 < 0,05$) et Cd + Ni ($F_{6,14} = 89,57$; $p = 0,000 < 0,05$).

Sous les doses de Cd, le test post-hoc de Tukey a révélé trois ensembles ou groupes homogènes significativement différents : le groupe témoin, le deuxième (groupes traités avec 10, 30 et 100 ppb), et le troisième (groupes traités avec 100, 500 et 1000 ppm). Par rapport à ce qui était enregistré dans le groupe témoin (MGT = 8,13 jours), le temps de germination moyen le plus long a été enregistré dans les groupes de 100, 500 et 1000 ppm, avec 10,54, 10,40 et 10,20 jours, respectivement.

Sous l'exposition aux différentes doses de Ni, le test de Tukey a révélé que les valeurs du MGT pour les six doses testées, ainsi que pour le groupe témoin, étaient presque toutes statistiquement différentes. Le MGT le plus long a été enregistré dans le groupe de Ni (100 ppm), avec 13,75 jours, et le plus bas MGT = 8,78 jours a été enregistré dans le groupe traité par Ni (30 ppb).

Sous les doses mixtes, le test de Tukey a révélé trois ensembles ou groupes homogènes : le groupe témoin, le second : Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb), et le troisième [Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) et Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm)]. Le temps de germination moyen était plus long sous la dose mixte Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) que sous la dose individuelle Cd_(1000 ppm). Mais MGT semble être plus long sous la dose individuelle Ni_(1000 ppm) que sous la dose mixte Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm).

3.2.2 Temps de 50% de germination (T50%)

Le temps nécessaire pour atteindre 50% de la germination finale corrobore les résultats de l'indice MGT ; toutes les doses de Cd, Ni et Cd + Ni ont provoqué un retard dans la germination (Tab : 03 ; 04 et 05). Par rapport au groupe témoin, les différences étaient statistiquement significatives pour Cd ($F_{6,14} = 36,93$; $p = 0,000 < 0,05$), Ni ($F_{6,14} = 37,02$; $p = 0,000 < 0,05$) et Cd + Ni ($F_{6,14} = 39,47$; $p = 0,000 < 0,05$).

Les valeurs de l'indice T50% augmentent avec l'augmentation des doses. Cependant, les différences n'étaient pas significatives entre les valeurs du T50% du groupe témoin et ceux traités avec les doses faibles (Cd : 10, 30 et 100 ppb et Ni : 30, 60 et 120 ppb).

Contrairement aux groupes traités avec 100, 500 et 1000 ppm de Cd et Ni et aussi les doses mixtes, les différences étaient significatives. Par rapport au groupe témoin, les doses de Cd (1000 ppm) et Ni (1000 ppm) ont retardé le T50% de germination de plus de 2 et 4 jours, respectivement.

3.2.3 Indice de germination (IG)

L'indice de germination (IG) représente la corrélation entre le taux de germination quotidien et le taux de germination maximum. Dans la présente étude, les valeurs de l'IG dans tous les groupes traités étaient significativement inférieures à celles du groupe témoin (Tab : 03 ; 04 et 05).

L'indice IG a diminué progressivement avec l'augmentation des doses de Cd et Ni. Le groupe témoin avait la valeur la plus élevée, $IG = 12,24 \text{ grain.jour}^{-1}$, tandis que dans les groupes traités avec $Ni_{(1000 \text{ ppm})}$, $Cd_{(100 \text{ ppb})} + Ni_{(1000 \text{ ppm})}$ et $Cd_{(1000 \text{ ppm})} + Ni_{(120 \text{ ppb})}$ nous avons enregistré les valeurs les plus faibles ; $IG = 4,26, 4,61$ et $4,99 \text{ grain.jour}^{-1}$, respectivement.

L'ANOVA a révélé un effet négatif significatif des doses testées sur IG : Cd ($F_{6,14} = 147,32$; $p = 0,000 < 0,05$), Ni ($F_{6,14} = 156,34$; $p = 0,000 < 0,05$) et Cd + Ni ($F_{6,14} = 121,86$; $p = 0,000 < 0,05$). Le test de Tukey a montré que les valeurs de l'IG étaient significativement différentes entre la majorité des groupes traités. Comparativement aux autres indices, les valeurs de l'IG étaient même différentes entre les faibles doses testées de Cd et Ni (Tab : 03 ; 04 et 05).

Tab. 03 : Pourcentage final de germination (GP%), Temps moyen de germination (MGT), Temps jusqu'à 50% de germination (T50%), Germination indice (IG) de graines de *P. australis* à différentes doses de Cd, mesurées au 20ème jour. Les valeurs représentent les moyennes de 3 répétitions de 100 graines chacune ($n = 3$) ($\pm Sd$). Les valeurs les plus élevées sont indiquées par la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes dans une même colonne présentent des différences statistiquement significatives ($p \leq 0,05$, test de Tukey).

Traitement Cd	Indices de Germination			
	GP (%)	MGT (jour)	T 50% (jour)	IG (grain.jour ⁻¹)
Control	95.33 \pm 4.61 ^a	8.13 \pm 0.27 ^c	8.25 \pm 0.067 ^b	12.24 \pm 0.18 ^a
10 ppb	91.00 \pm 3.00 ^a	9.37 \pm 0.61 ^b	8.81 \pm 0.046 ^b	9.87 \pm 0.29 ^b
30 ppb	87.33 \pm 4.04 ^a	9.33 \pm 0.14 ^b	8.79 \pm 0.070 ^b	9.47 \pm 0.48 ^b
100 ppb	76.67 \pm 1.52 ^b	9.16 \pm 0.11 ^b	8.65 \pm 0.072 ^b	8.50 \pm 0.13 ^c
100 ppm	73.00 \pm 2.64 ^b	10.54 \pm 0.12 ^a	9.90 \pm 0.59 ^a	7.17 \pm 0.32 ^d
500 ppm	69.00 \pm 5.00 ^b	10.40 \pm 0.16 ^a	10.36 \pm 0.18 ^a	6.81 \pm 0.40 ^d
1000 ppm	52.67 \pm 3.05 ^c	10.20 \pm 0.15 ^a	10.25 \pm 0.12 ^a	5.31 \pm 0.36 ^e

Tab. 04 Pourcentage final de germination (GP%), Temps moyen de germination (MGT), Temps jusqu'à 50% de germination (T50%), Germination indice (IG) de graines de *P. australis* à différentes doses de Ni, mesurées au 20ème jour.

Traitement Ni	Indices de Germination			
	GP (%)	MGT (jour)	T 50% (jour)	IG (grain.jour ⁻¹)
Control	95.33 \pm 4.61 ^a	8.13 \pm 0.27 ^e	8.25 \pm 0.067 ^c	12.24 \pm 0.18 ^a
30 ppb	96.33 \pm 2.08 ^a	8.78 \pm 0.14 ^{de}	8.40 \pm 0.09 ^c	11.22 \pm 0.07 ^{ab}
60 ppb	96.67 \pm 1.53 ^a	9.00 \pm 0.07 ^d	8.45 \pm 0.05 ^c	10.91 \pm 0.24 ^{ab}
120 ppb	96.00 \pm 3.46 ^a	9.84 \pm 0.28 ^c	8.77 \pm 0.16 ^c	10.02 \pm 0.32 ^c
100 ppm	65.00 \pm 4.36 ^b	11.01 \pm 0.08 ^b	9.92 \pm 0.09 ^b	6.06 \pm 0.31 ^d
500 ppm	57.00 \pm 7.55 ^b	11.38 \pm 0.30 ^b	11.20 \pm 0.23 ^b	5.18 \pm 1.06 ^{de}
1000 ppm	55.67 \pm 7.64 ^b	13.75 \pm 0.38 ^a	12.39 \pm 0.97 ^a	4.26 \pm 0.48 ^e

Tab. 05 : Pourcentage final de germination (GP%), Temps moyen de germination (MGT), Temps jusqu'à 50% de germination (T50%), Germination indice (IG) de graines de *P. australis* à différentes doses mixtes de Cd+Ni, mesurées au 20ème jour.

Treatment Cd+Ni	Indices de Germination			
	GP (%)	MGT (jour)	T 50% (jour)	IG (grain.jour ⁻¹)
Control	95.33 \pm 4.61 ^a	8.13 \pm 0.27 ^c	8.25 \pm 0.067 ^d	12.24 \pm 0.18 ^a
Cd (1000ppm) + Ni (120ppm)	50.67 \pm 4.73 ^b	10.60 \pm 0.44 ^b	10.32 \pm 0.23 ^c	4.99 \pm 0.74 ^b
Cd (100ppm) + Ni (100ppm)	61.00 \pm 6.56 ^b	12.80 \pm 0.19 ^a	13.35 \pm 0.13 ^a	5.06 \pm 0.41 ^b
Cd (100ppb) + Ni (1000ppm)	54.00 \pm 6.00 ^b	12.42 \pm 0.58 ^a	12.59 \pm 0.23 ^b	4.61 \pm 0.27 ^b

3.2.4 Indice de longueur de la racine et de la racine (RLI)

L'indice de la longueur des racines et des racines (RLI) mesuré à 10, 20 et 30 jours sous des doses simples et combinées de Cd et/ou de Ni est illustré dans les figures 15, 16 et 17 (A, B, C). Les résultats sous les doses simples de Cd (Fig.15 : A, B et C) et de Ni (Fig.116 : A, B et C), ainsi que sous les doses mixtes Cd+Ni (Fig.17 : A, B et C) ont révélé un effet dose-dépendant sur la croissance en longueur des racines.

3.2.4.1 Indice de longueur de la racine (RLI) sous les doses de Cd

Sous les différentes doses de Cd et après 10 jours, l'inhibition de la croissance était évidente chez tous les semis ($F_{6,98} = 143,70$; $p = 0,000 < 0,05$). Par rapport au groupe témoin, toutes les graines traitées ont montré une réduction significative, sauf pour le groupe dans lequel les graines ont été traitées avec Cd_(10 ppb). Dans ce groupe, nous avons enregistré une très légère réduction de l'indice de longueur des racines RLI = 95,5% ($\pm 8,12$). Contrairement aux autres groupes, notamment ceux traités avec 100, 500 et 1000 ppm, où les valeurs de l'indice de longueur des racines étaient ≤ 51 %.

Concernant les valeurs de RLI après 20 jours ($F_{6,98} = 80,55$; $p = 0,000 < 0,05$ (Fig.15-B) et 30 jours ($F_{6,98} = 180,21$; $p = 0,000 < 0,05$) (Fig.15-C), les résultats étaient comparables à ceux trouvés après 10 jours. Cependant, sous les faibles doses de 10, 30 et 100 ppb, l'effet négatif de Cd était plus prononcé après 30 jours (RLI = 67,77 ; 58,92 et 53,50 ; respectivement) qu'après 10 et 20 jours de traitement. La réduction de la croissance en longueur des racines dans les groupes traités avec 100, 500 et 1000 ppm ne semble pas varier de manière significative entre les trois périodes (10, 20 et 30 jours). Contrairement à ce qui avait été observé après 10 jours d'expérimentation, nous avons constaté la présence de tissus nécrosés dans les racines des graines traitées avec 100, 500 et 1000 ppm de cadmium après 20 et 30 jours d'expérimentation.

3.2.4.2 Indice de longueur de la racine (RLI) sous les doses de Ni

Les résultats de l'effet des doses simples de Ni sur la croissance en longueur de la racine et de la racine sont illustrés dans la figure (Fig.16 : A, B et C). Les résultats après 10 jours ($F_{6,98} = 376,08$; $p = 0,000 < 0,05$) ont révélé un effet dose-dépendant sur la croissance des racines. L'inhibition de la croissance en longueur des racines a augmenté avec l'augmentation des doses. Le taux le plus élevé de croissance a été enregistré sous Ni_(30 ppb) avec RLI = 84,60% et le plus bas sous la dose Ni_(1000 ppm) avec RLI = 6,55%.

À ce stade de croissance racinaire (10 jours), la dose de Ni_(1000 ppm) semble affecter plus la croissance racinaire que le Cd_(1000 ppm). Après 20 jours ($F_{6,98} = 140,17$; $p = 0,000 < 0,05$),

la tendance d'inhibition était similaire à celle observée après 10 jours, sauf que Ni_(30 ppb) ne diminue pas significativement la croissance. Aussi, sous la dose de Ni_(1000 ppm) ne semble pas significativement différente de Ni_(500 ppm) et Ni_(100 ppm). Après 30 jours ($F_{6,98} = 314,03$; $p = 0,000 < 0,05$), la tendance est la même qu'après 10 et 20 jours. Comparativement aux résultats du groupe contrôle, toutes les doses ont diminué la croissance. Il n'y a pas de différence significative entre les résultats sous les faibles doses 30 ; 60 et 120 ppb où nous avons enregistré 69,42 ; 68,76 et 69,48%, respectivement. Pareil sous 100, 500 et 1000 ppm 41,63 ; 39,95 et 39,01%, respectivement.

3.2.4.3 Indice de longueur de la racine (RLI) sous les doses mixtes

Les résultats de l'effet des doses combinées sur la croissance en longueur de la racine et de la racine sont illustrés dans la figure (Fig.17 : A, B et C). Les résultats indiquent que dans les trois périodes, toutes les doses inhibent significativement la croissance racinaire. Après 10 jours ($F_{6,98} = 121,57$; $p = 0,000 < 0,05$), après 20 jours ($F_{6,98} = 49,94$; $p = 0,000 < 0,05$), et après 30 jours ($F_{6,98} = 306,70$; $p = 0,000 < 0,05$).

Le plus haut taux de croissance a été enregistré sous la dose mixte Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm), avec RLI= 63,64% - 70,46% et 51,50% après 10-20 et 30 jours. Le plus bas taux de croissance a été enregistré sous la dose mixte Ni_(1000 ppm) + Cd_(100 ppb) après 10 jours (RLI de 8,50%). Mais après 20 et 30 jours, la dose mixte Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) semble affecter davantage la croissance racinaire, où RLI était de 51,75% et 41,12%, respectivement.

Comparativement aux résultats enregistrés sous les doses simples, tous les doses mixtes ont montré un effet inhibiteur sur la croissance des racines inférieur à celui de leurs doses individuelles respectives. Dans les trois périodes (10, 20 et 30 jours), RLI sous Cd_(1000 ppm) était de 43,33% - 42,67% et 39,83%, respectivement ; inférieur à celui mesuré sous la dose mixte Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) où RLI = 46,88% - 51,75% et 41,12%. Sous la dose simple Ni_(1000 ppm), le RLI était de 6,55% - 41,47% et 39,01% ; mais sous la dose mixte Ni_(1000 ppm) + Cd_(100 ppb) le RLI était de 8,50% - 66,91% et 50,38%. Sous les doses simples de Cd_(100 ppm), le RLI était de 51,29% - 53,66% et 50,04% ; et sous Ni_(100 ppm), le RLI était de 48,83% - 41,63% et 39,01%. Cependant, sous la dose mixte Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm), le RLI était plus élevé : 63,64% - 70,46% et 51,50%.

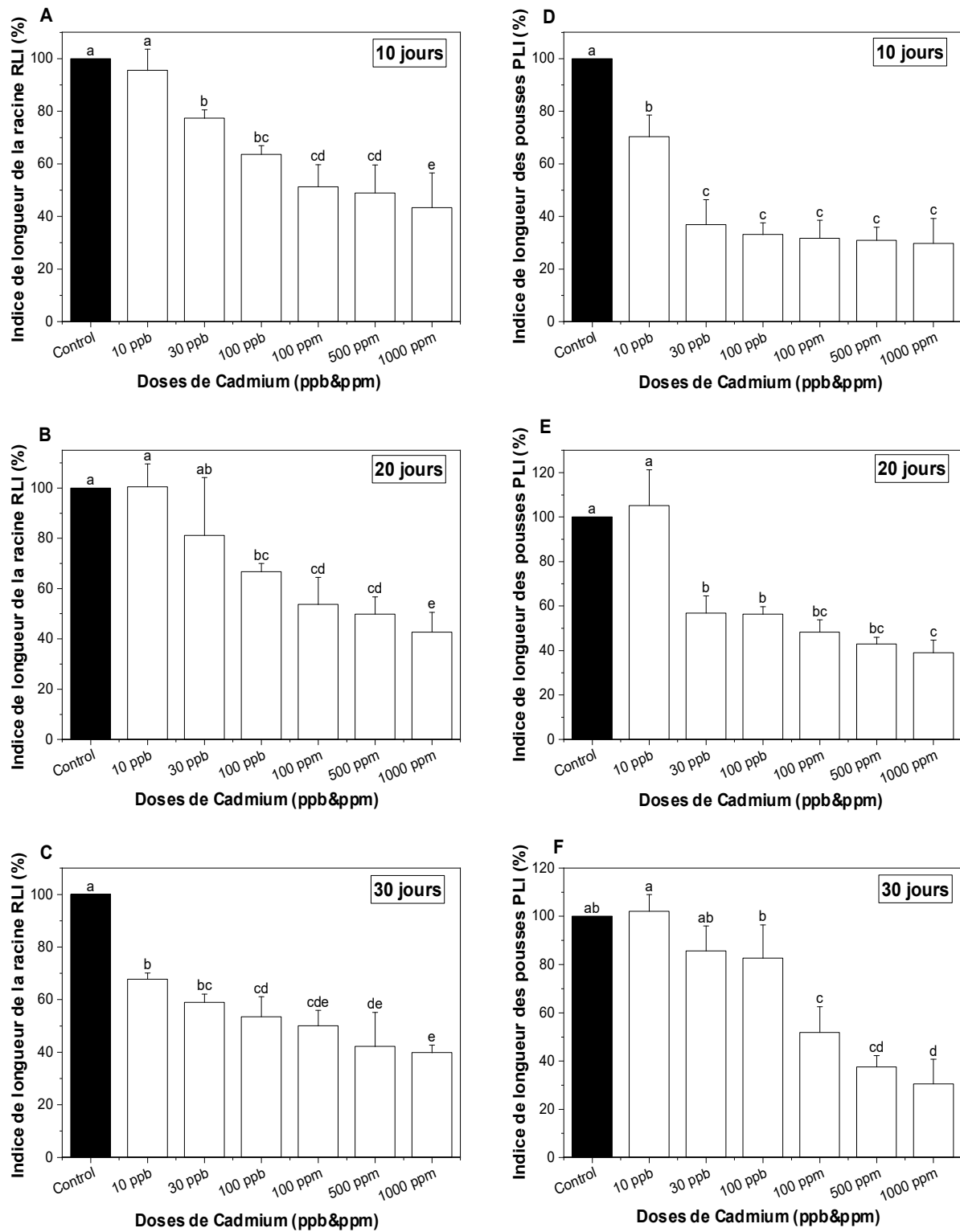


Fig. 15 : Indices de longueur des racines (RLI) et des pousses (PLI) des graines germées à 10, 20 et 30 jours exposées à différentes doses de Cd. Les valeurs représentent les moyennes ($n = 15$) (\pm Sd). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes présentent des différences statistiquement significatives ($p \leq 0,05$, test de Tukey).

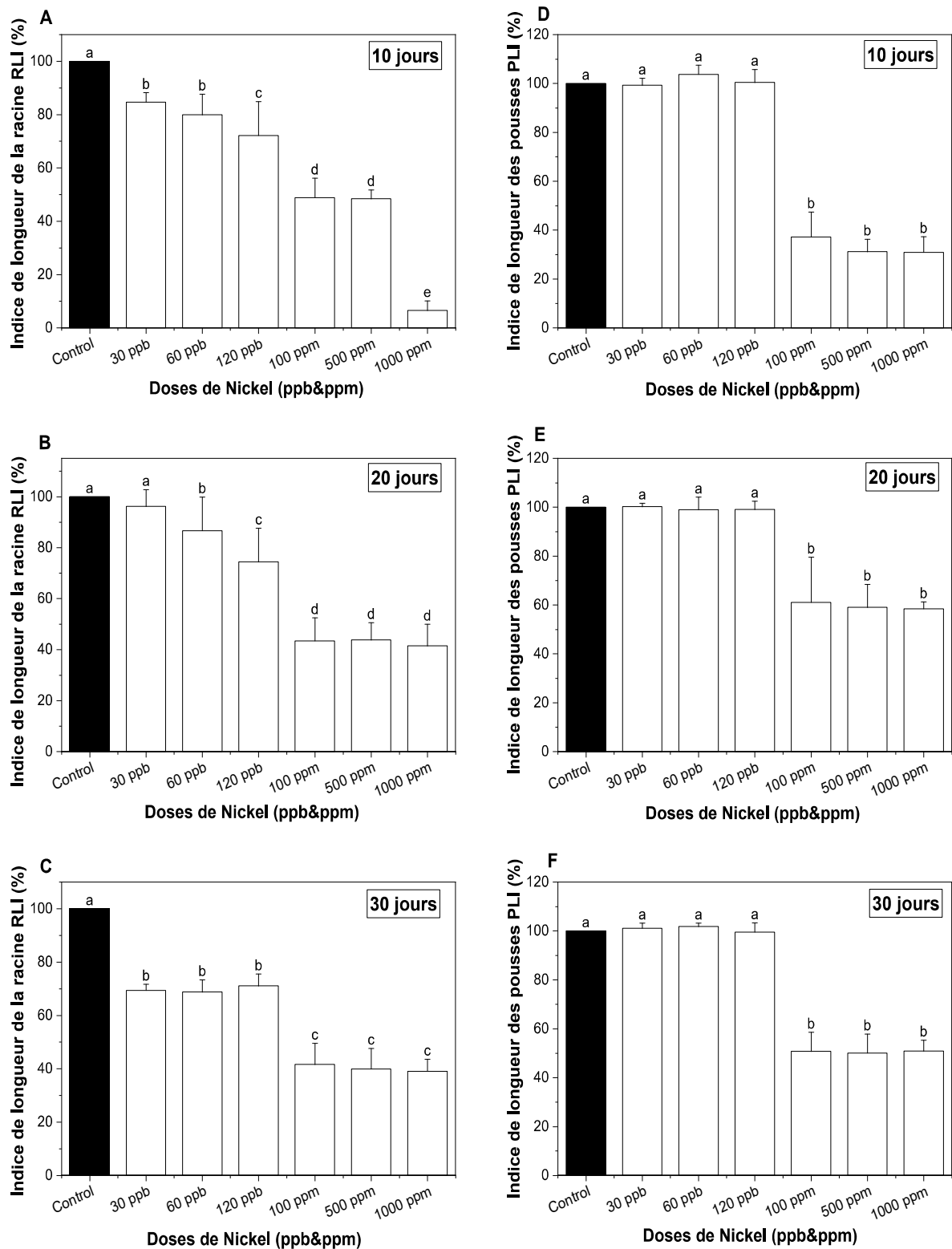


Fig. 16 : Indices de longueur des racines (RLI) et des pousses (PLI) des graines germées à 10, 20 et 30 jours exposées à différentes doses de Ni. Les valeurs représentent les moyennes ($n = 15$) ($\pm Sd$). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes présentent des différences statistiquement significatives ($p \leq 0,05$, test de Tukey).

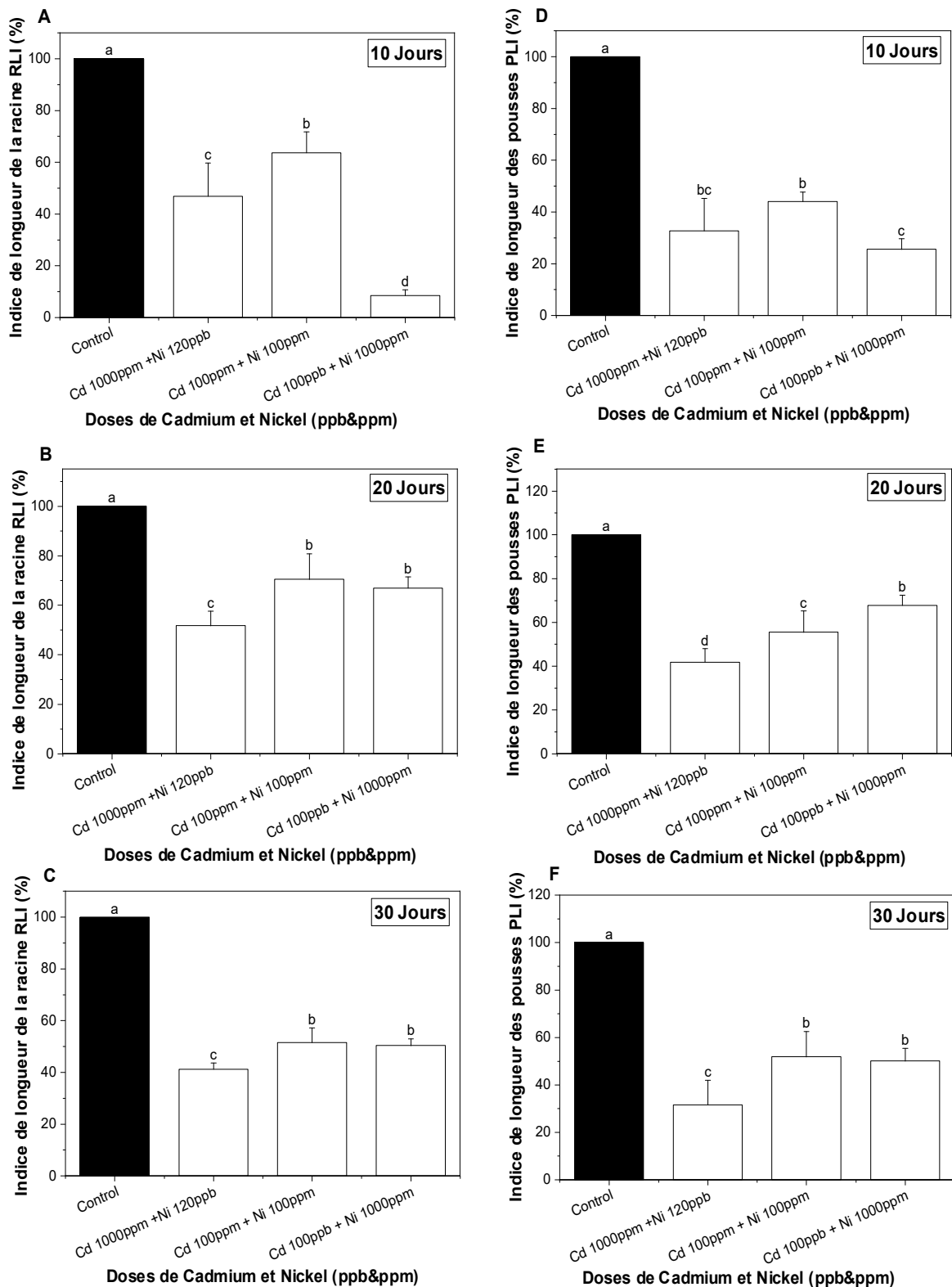


Fig. 17 : Indices de longueur des racines (RLI) et des pousses (PLI) des graines germées à 10, 20 et 30 jours exposées à différentes doses mixtes : Cd + Ni. Les valeurs représentent les moyennes ($n = 15$) ($\pm Sd$). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes présentent des différences statistiquement significatives ($p \leq 0,05$, test de Tukey).

3.2.5 Indice de longueur des pousses (PLI)

L'indice de croissance en longueur des pousses (semis) (PLI) mesuré à 10, 20 et 30 jours sous des doses simples et combinées de Cd et/ou de Ni est illustré dans les figures 14, 15 et 16 (D, E, F).

3.2.5.1 Indice de croissance en longueur des pousses (PLI) sous les doses de Cd

Les résultats de l'indice de longueur des pousses (PLI) des grains de *P. australis* germés sous les six doses simples de Cd sont présentés dans les Fig.14 (D, E, F).

Après 10 jours, les résultats obtenus ont montré un fort effet négatif du Cd sur la croissance en longueur des pousses ($F_{6,98} = 231,86$; $p = 0,000 < 0,05$). Par rapport au groupe témoin, une diminution significative de la valeur de PLI a été constatée dans tous les groupes traités, à l'exception de la dose de Cd ($_{10}$ ppb). L'effet inhibiteur n'a pas été statistiquement différent sous toutes les autres doses, où PLI varie entre 29,75 % et 36,92 %. Le PLI le plus élevé était de 70,30 % dans le groupe traité avec Cd($_{10}$ ppb), tandis que le taux de croissance le plus faible était PLI = 29,75 % enregistré dans le groupe traité avec 1000 ppm.

Comparativement au groupe témoin, les résultats après 20 jours ($F_{6,98} = 220,97$; $p = 0,000 < 0,05$) et 30 jours ($F_{6,98} = 181,92$; $p = 0,000 < 0,05$) de l'expérience ont montré que la tendance de l'inhibition était similaire. Les valeurs de l'indice PLI dans les groupes traités ont montré une diminution significative par rapport au groupe contrôle, à l'exception du groupe traité par 10 ppm, où une légère augmentation de l'indice a été enregistrée. Par rapport aux 10 et 20 premiers jours de l'expérience, l'effet d'inhibition du Cd sur la croissance des pousses semble moins important au 30-eme jour ; en particulier dans les groupes de graines traitées par 10, 30 et 100 ppb. Cela indique que la croissance en longueur des pousses était plus sensible au Cd dans les 10 premiers jours.

3.2.5.2 Indice de croissance en longueur des pousses (PLI) sous les doses de Ni

Les résultats de l'indice de longueur des pousses (PLI) des grains germés sous les six doses simples de Ni sont présentés dans la Fig.15 (D, E, F).

Dans les trois périodes, l'ANOVA a révélé un effet négatif significatif du facteur dose sur la croissance en longueur des semis : après 10 jours ($F_{6,98} = 826,39$; $p = 0,000 < 0,05$); après 20 jours ($F_{6,98} = 66,06$; $p = 0,000 < 0,05$) et également après 30 jours de l'expérience ($F_{6,14} = 541,22$; $p = 0,000 < 0,05$). Cependant, le test de Tukey a montré que les valeurs de PLI n'étaient pas significativement différentes entre les groupes traités par les faibles doses (30, 60 et 120 ppb), ni entre les groupes traités par les fortes doses (100, 500 et 1000 ppm). Sous les faibles doses,

PLI était entre 99,23% et 103,78% après 10 jours ; entre 98,98% et 100,27% après 20 jours ; et entre 99,53% et 101,78% après 30 jours. Sous les fortes doses (100, 500 et 1000 ppm), L'indice PLI a indiqué que le taux de croissance était meilleur à 20 jours avec PLI = 61,11% - 59,05% - 58,47%. Après 30 jours, PLI = 50,76% - 50,03% - 50,87%. Et à 10 jours, PLI était le plus bas avec 37,20% - 31,17% - 30,88%.

3.2.5.3 Indice de croissance en longueur des pousses (PLI) sous les doses mixtes

Les résultats de l'effet des doses combinées sur la croissance en longueur des semis sont illustrés dans la figure Fig.16 (D, E, F).

Les résultats indiquent que dans les trois périodes, toutes les doses combinées inhibent significativement la croissance en longueur des semis : après 10 jours ($F_{6,98} = 121,7$; $p = 0,000 < 0,05$), après 20 jours ($F_{6,98} = 79,77$; $p = 0,000 < 0,05$), et après 30 jours ($F_{6,98} = 68,08$; $p = 0,000 < 0,05$). Le plus haut taux de croissance dans les trois périodes a été enregistré sous la dose mixte $Cd_{(100 \text{ ppm})} + Ni_{(100 \text{ ppm})}$, avec PLI = 44,06% - 50,16% (après 10 et 30 jours). Cependant après 20 jours, le PLI le plus élevé a été enregistré dans le groupe traité avec $Cd_{(100 \text{ ppb})} + Ni_{(1000 \text{ ppm})}$ avec 67,70%.

Globalement, la tendance de l'inhibition était similaire à celle observée pour la croissance racinaire. La majorité des doses mixtes ont montré un effet inhibiteur moins prononcé sur la croissance en longueur des semis que celui mesuré sous les doses individuelles correspondantes. Les résultats montrent que dans les trois périodes de l'expérience (10, 20 et 30 jours), les doses mixtes de Cd + Ni ont entraîné une inhibition de la croissance des pousses moins importante comparée aux doses individuelles correspondantes. Après 10, 20 et 30 jours, les valeurs de PLI sous la dose simple de $Cd_{(1000 \text{ ppm})}$ était de 29,75% - 38,94% et 30,50%, alors qu'avec la dose mixte $Cd_{(1000 \text{ ppm})} + Ni_{(120 \text{ ppb})}$, le PLI était légèrement plus élevé: 32,11% - 41,75% et 31,55%.

Pareil sous la dose simple de $Ni_{(1000 \text{ ppm})}$, où le PLI était de 30,88% - 58,47% et 50,87%, tandis que la mixture $Ni_{(1000 \text{ ppm})} + Cd_{(100 \text{ ppb})}$ a conduit à un PLI de 25,54% - 67,70% et 50,03%. Une tendance similaire a été observée en présence de $Cd_{(100 \text{ ppm})}$ et/ou $Ni_{(100 \text{ ppm})}$.

Sous la dose simple de $Cd_{(100 \text{ ppm})}$, le PLI était de 31,67% - 48,22% et 51,81% ; et sous $Ni_{(100 \text{ ppm})}$, le PLI était de 37,20% - 61,11% et 50,76%. Cependant, la mixture $Cd_{(100 \text{ ppm})} + Ni_{(100 \text{ ppm})}$ a amélioré légèrement la croissance en longueur des semis (particulièrement après 10 et 30 jours) où le PLI était de : 44,06% - 55,51% et 51,56%.

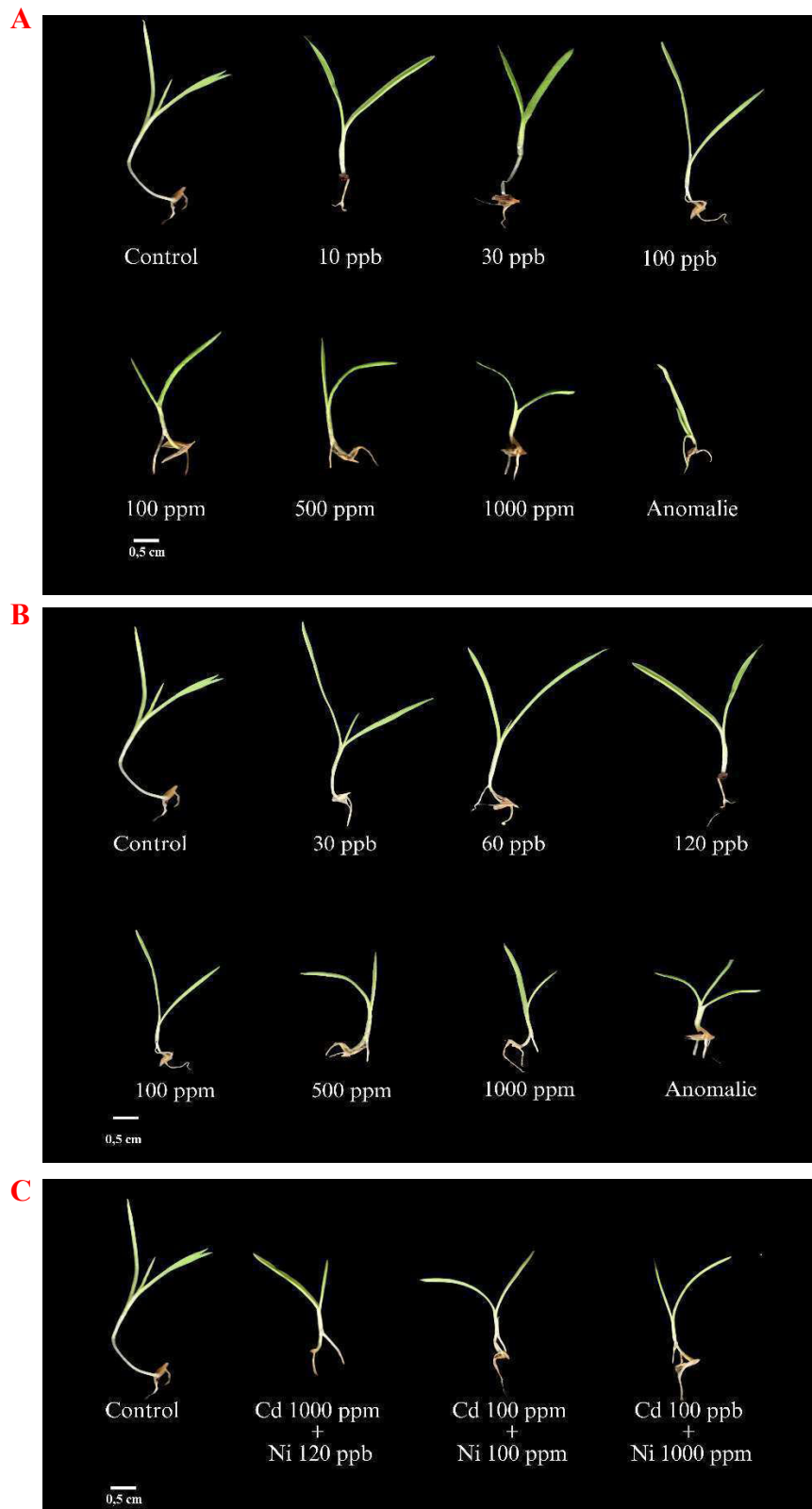


Fig. 18 : Plantules de *Phragmites australis* sous les différentes doses de Cd et/ou Ni après 20 jours du test de phytotoxicité. A) sous les doses de Cd, B) sous les doses de Ni et C) sous les doses mixtes de Cd + Ni.

3.3 Enzymes du système antioxydant

3.3.1 Activité enzymatique du système antioxydant sous Cd

Les tableaux 07 ; 08 et 09 présentent les variations de l'activité des enzymes : la Catalase (CAT), la Guaïcol-Peroxydase (GPOx), et la glutathion-S-transférase (GST) dans les différents organes des semis de *P. australis* exposés à diverses doses de Cd.

Sous les différentes doses de Cd et dans les trois organes (feuilles, tiges et racines), l'ANOVA a révélé un effet significatif du facteur dose sur l'activité de CAT : feuilles ($F_{6,56} = 352,71$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,56} = 5429,04$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{6,56} = 1032,87$; $p = 0,000 < 0,05$). Cependant, le test de Tukey a montré que les différences ne sont pas significatives entre les faibles doses et le témoin (tab). Sauf sous la dose de Cd_(100 ppb) dans les feuilles et les tiges où l'augmentation est statistiquement significative. Sous les hautes doses, l'activité du CAT est significativement stimulée et un effet dose-réponse positif sur l'activité a été observé dans tous les organes. L'activité maximale dans les feuilles a été enregistrée sous Cd_(500 ppm) et Cd_(1000 ppm) avec $CAT = 22,54$ et $22,61 \mu M \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivement. Dans les tiges, les activités maximales étaient de $CAT = 2,45$ et $22,61 \mu M \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ sous Cd_(1000 ppm). Dans les racines des plantules traitées avec Cd_(500 ppm) et Cd_(1000 ppm), les activités étaient de $CAT = 41,71$ et $42,95 \mu M \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivement.

Le rapport d'activité de la CAT entre la feuille et la racine était supérieur à 1 dans le groupe témoin et les groupes traités avec de faibles doses de Cd. Le rapport CAT feuille/racine le plus élevé a été enregistré sous 100 ppb de Cd, atteignant 2,66. Cependant, ce rapport était inférieur à 1 sous les fortes doses de Cd, variant entre 0,53 et 0,58.

Quant à l'activité de GPOx, l'ANOVA a révélé un effet significatif du facteur dose dans les trois organes (feuilles, tiges et racines) : feuilles ($F_{6,56} = 136,29$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,56} = 1870,20$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{6,56} = 7772,04$; $p = 0,000 < 0,05$).

Après 30 jours de germination, un effet dose-réponse positif du Cd sur l'activité GPOx a été observé dans les feuilles, les tiges et les racines (Tableau 2).

L'activité maximale a été enregistrée sous Cd_(500 ppm) et Cd_(1000 ppm) sauf dans les feuilles, où le pic d'induction a été enregistré sous 100 ppm ($GPOX = 37,80 \mu M \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$), puis l'activité a diminué de manière significative dans les groupes traités avec Cd_(500 ppm) et Cd_(1000 ppm) à $33,85$ et $29,03 \mu M \cdot \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$, respectivement.

Contrairement à ce qui a été observé sous les hautes doses Cd (100 ; 500 et 1 000 ppm), l'activité sous les faibles doses (en particulier à 10 et 30 ppb) n'était pas significativement différente de celle du groupe témoin. Dans les racines, il n'y avait aucune différence

statistiquement significative entre l'activité GPOx dans le groupe témoin et les groupes traités avec 10 ; 30 et 100 ppb.

Le rapport d'activité GPOx feuille/racine était supérieur à 1 dans le groupe témoin et les groupes traités avec de faibles doses de Cd. Cependant, le rapport était inférieur à < 1 sous les hautes doses. Cela démontre un doublement de l'activité GPOx dans les racines par rapport aux feuilles (Tab. 07).

Le tableau 08 illustre les variations de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les différents organes des semis de *P. australis* exposés à diverses doses de Cd. L'analyse de variance a un facteur a révélé un effet significatif du facteur dose dans les trois organes (feuilles, tiges et racines) : feuilles ($F_{6,56} = 8103,497$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,56} = 42,343$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{6,56} = 5831,158$; $p = 0,000 < 0,05$).

Globalement, dans tous les organes l'activité de la GST augmente avec l'augmentation des doses de Cd. Sous les faibles doses (10 ; 30 et 100 ppb) et comparativement au groupe témoin, l'augmentation était significative dans les feuilles dès 10 ppb. Dans les racines, l'augmentation est modérée et significative seulement sous Cd (100 ppb) ; par contre, dans les tiges, il n'y a pas de différence significative entre les résultats sous les faibles doses testées et le contrôle. Aux fortes doses (100 ; 500 et 1000 ppm), l'activité est maximale sous Cd (1000 ppm) dans tous les organes, sauf dans les racines où elle est maximale sous Cd (500 ppm) (GST = 1,75). L'activité de GST est globalement plus élevée dans les feuilles et les racines que dans les tiges. Le ratio feuilles/racines reste relativement stable, proche de 1, sauf pour le traitement à 10 ppb où il est significativement plus élevé GST feuille/racine = 1,33.

Tab. 06 : Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des semis de *P. australis* exposés à différentes doses de Cd après 30 jours de germination. *Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune avec trois répétitions (n = 9). Les valeurs les plus élevées sont indiquées par la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes dans une même colonne présentent des différences statistiquement significatives (p≤0,05, test de Tukey).*

Traitement	CAT activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	0,556± 0,034 ^c	0,318± 0,019 ^c	0,379± 0,057 ^c	1,49± 0,24 ^c
10 ppb	0,549± 0,044 ^c	0,297± 0,031 ^c	0,327± 0,014 ^c	1,69± 0,19 ^{bc}
30 ppb	0,629± 0,037 ^c	0,307± 0,016 ^c	0,346± 0,051 ^c	1,85± 0,25 ^b
100 ppb	0,934± 0,061 ^c	0,378± 0,022 ^d	0,353± 0,031 ^c	2,66± 0,34 ^a
100 ppm	11,72± 1,24 ^b	1,57± 0,04 ^c	20,50± 2,16 ^b	0,58± 0,07 ^d
500 ppm	22,54± 2,46 ^a	1,77± 0,06 ^b	41,71± 3,47 ^a	0,54± 0,04 ^d
1000 ppm	22,61± 3,44 ^a	2,45± 0,05 ^a	42,95± 2,74 ^a	0,53± 0,09 ^d

Tab. 07 : Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des semis de *P. australis* exposés à différentes doses de Cd après 30 jours de germination. *Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune avec trois répétitions (n = 9). Les valeurs les plus élevées sont indiquées par la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes dans une même colonne présentent des différences statistiquement significatives (p≤0,05, test de Tukey).*

Traitement	GPOX activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	5.15±0.54 ^e	1.26±0.09 ^e	2.19±0.17 ^c	2,35±0,04 ^b
10 ppb	4.74±0.69 ^e	1.79±0.13 ^{de}	2.55±0.34 ^c	1,86±0,20 ^b
30 ppb	5.68±0.33 ^e	1.87±0.07 ^{de}	2.76±0.26 ^c	2,06±0,26 ^b
100 ppb	11.87±1.19 ^d	3.11±0.23 ^d	2.91±0.45 ^c	4,07±0,99 ^a
100 ppm	37.80±3.62 ^a	22.90±1.29 ^c	62.43±2.89 ^b	0,61±0,05 ^c
500 ppm	33.85±3.22 ^b	25.91±1.63 ^b	68.88±0.55 ^a	0,49±0,04 ^c
1000 ppm	29.03±2.73 ^c	31.35±1.28 ^a	68.39±0,69 ^a	0,42±0,03 ^c

Tab. 08 : Activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des semis de *P. australis* exposés à différentes doses de Cd après 30 jours de germination. *Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune avec trois répétitions (n = 9). Les valeurs les plus élevées sont indiquées par la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes dans une même colonne présentent des différences statistiquement significatives (p≤0,05, test de Tukey).*

Traitement	GST activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	0,180± 0,021 ^f	0,089± 0,005 ^c	0,158± 0,013 ^e	1,14± 0,13 ^b
10 ppb	0,236± 0,027 ^e	0,085± 0,008 ^c	0,177± 0,014 ^e	1,33± 0,10 ^a
30 ppb	0,224± 0,025 ^e	0,093± 0,011 ^c	0,193± 0,020 ^e	1,16± 0,05 ^b
100 ppb	0,299± 0,016 ^d	0,086± 0,019 ^c	0,302± 0,032 ^d	0,99± 0,08 ^c
100 ppm	1,49± 0,013 ^c	1,14± 0,031 ^b	1,51± 0,025 ^c	0,98± 0,04 ^c
500 ppm	1,54± 0,028 ^b	1,15± 0,021 ^b	1,75± 0,019 ^a	0,88± 0,02 ^d
1000 ppm	1,76± 0,034 ^a	1,19± 0,016 ^a	1,60± 0,058 ^b	1,10± 0,10 ^a

* Afin de différencier des valeurs numériques très proches, celles-ci sont présentées avec trois chiffres après la virgule.

3.3.2 Activité enzymatique du système antioxydant sous Ni

Les tableaux 09 ; 10 et 11 présentent les variations de l'activité des enzymes : la Guaïcol-Peroxydase (GPOx), la Catalase (CAT) et la glutathion-S-transférase (GST) dans les différents organes des semis de *P. australis* exposés à diverses doses de Ni.

L'analyse de variance à un facteur a révélé un effet significatif du facteur dose sur l'activité de la Catalase (CAT) dans les trois organes (feuilles, tiges et racines) : feuilles ($F_{6,56} = 5429,66$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,56} = 187,54$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{6,56} = 1110,53$; $p = 0,000 < 0,05$).

Le test de comparaisons multiples de Tukey a révélé un effet non significatif des faibles doses sur l'activité de CAT dans les trois organes. Comparativement aux résultats dans le groupe témoin, les faibles doses inhibent l'activité du CAT dans les feuilles et la stimulent dans les tiges et les racines, contrairement à ce qui a été observé sous Cd.

En revanche, à partir de 100 ppm, il y a une très forte induction de l'activité CAT, augmentant de façon dose-dépendante. Le pic d'induction a été enregistré dans les organes des plantes qui ont poussé sous Ni_(1000 ppm).

Contrairement aux résultats sous Cd, le ratio CAT feuilles/racines sous les différentes doses de Ni reste stable autour de 1, où le ratio le plus élevé a été enregistré dans le groupe témoin CAT feuilles/racines = 1,14.

Les résultats de l'activité de la GPOx dans les différents organes des semis de *P. australis* exposés à diverses doses de Ni sont illustrés dans le tableau 10. L'ANOVA a révélé un effet significatif du facteur dose sur l'activité de la GPOx dans les trois organes (feuilles, tiges et racines) : feuilles ($F_{6,56} = 284,87$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,56} = 285,91$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{6,56} = 289,03$; $p = 0,000 < 0,05$).

Aux faibles doses de Ni (30 ;60 et 120 ppb), il n'y a pas de variation significative de l'activité GPO_x par rapport au contrôle, dans aucun des organes. À l'inverse de ce qui a été observé sous les faibles doses de Cd, particulièrement dans les feuilles et les tiges.

Sous les hautes doses et à partir de Ni_(100 ppm), on observe une augmentation dose-dépendante très significative de l'activité GPOx dans tous les organes. L'activité maximale a été enregistrée sous Cd_(1000 ppm) avec GPOx = 36,09 ; 17,24 et 42,15 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$, respectivement, dans les feuilles, tiges et racines. La même tendance sous les hautes doses de Cd, mais il semble que l'induction de GPOx était plus faible sous Ni que Cd.

Globalement, quelle que soit la dose de Ni, l'activité GPO_x est toujours plus élevée dans les racines comparativement aux parties aériennes (feuilles et tiges). Le ratio GPOx feuilles/racines diminue de façon marquée avec l'augmentation des doses de Ni, très similaire

à ce qui a été enregistré sous les doses de Cd.

Le tableau 11 illustre les variations de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les différents organes des semis de *P. australis* exposés à diverses doses de Ni. L'analyse de variance a révélé un effet significatif du facteur dose sur l'activité de la GST dans les feuilles, les tiges et les racines : feuilles ($F_{6,56} = 275,52$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,56} = 322,34$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{6,56} = 318,88$; $p = 0,000 < 0,05$).

Sous les faibles doses de Ni (30 ; 60 et 120 ppb) et comparativement au groupe témoin, il n'y a pas d'induction significative de l'activité GST. Contrairement à ce qui a été observé sous Cd, particulièrement dans les feuilles et les racines, où des doses inférieures de Cd (10 ; 30 et 100 ppb) ont significativement stimulé l'activité de GST.

Sous les hautes doses et à partir de 100 ppm, on observe une augmentation dose-dépendante de l'activité GST dans tous les organes. Cependant, l'induction maximale dans les feuilles et les tiges a été enregistrée sous $Ni_{(100 \text{ ppm})}$ et non sous $Ni_{(1000 \text{ ppm})}$ comme dans les racines, et sous les hautes doses de Cd.

Globalement, l'induction est maximale dans les racines, intermédiaire dans la tige et moindre dans les feuilles. Ceci est confirmé par la diminution marquée du ratio GST feuilles/racines avec l'augmentation des doses de Ni.

L'activité de GST dans les feuilles et les tiges sous Ni est plus ou moins similaire à celle sous Cd, mais les hautes doses de Cd semblent stimuler l'activité de GST deux fois plus que Ni dans les racines (Tableaux 08 et 11).

Tab. 09 : Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des semis de *P. australis* exposés à différentes doses de Ni après 30 jours de germination. *Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune avec trois répétitions (n = 9). Les valeurs les plus élevées sont indiquées par la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes dans une même colonne présentent des différences statistiquement significatives (p ≤ 0,05, test de Tukey).*

Traitement	CAT activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	0,556 ± 0,034 ^c	0,318 ± 0,019 ^c	0,379 ± 0,057 ^c	1,49 ± 0,24 ^c
30 ppb	0,528 ± 0,040 ^c	0,338 ± 0,028 ^c	0,591 ± 0,010 ^c	0,893 ± 0,08 ^c
60 ppb	0,551 ± 0,012 ^c	0,339 ± 0,023 ^c	0,553 ± 0,040 ^c	1,001 ± 0,08 ^c
120 ppb	0,531 ± 0,016 ^c	0,353 ± 0,038 ^c	0,543 ± 0,033 ^c	0,982 ± 0,07 ^c
100 ppm	64,84 ± 3,09 ^b	6,20 ± 1,19 ^b	60,41 ± 7,38 ^b	1,088 ± 0,14 ^b
500 ppm	117,20 ± 4,99 ^a	14,35 ± 1,49 ^a	128,37 ± 9,88 ^a	0,918 ± 0,08 ^a
1000 ppm	208,33 ± 6,45 ^a	16,56 ± 3,69 ^a	224,16 ± 16,75 ^a	0,933 ± 0,06 ^a

Tab. 10 : Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des semis de *P. australis* exposés à différentes doses de Ni après 30 jours de germination. *Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune avec trois répétitions (n = 9). Les valeurs les plus élevées sont indiquées par la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes dans une même colonne présentent des différences statistiquement significatives (p ≤ 0,05, test de Tukey).*

Traitement	GPOX activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	5,15 ± 0,54 ^d	1,26 ± 0,09 ^c	2,19 ± 0,17 ^c	2,35 ± 0,04 ^b
30 ppb	5,39 ± 0,58 ^d	1,68 ± 0,11 ^c	2,17 ± 0,09 ^c	1,86 ± 0,20 ^b
60 ppb	5,36 ± 0,40 ^d	1,79 ± 0,09 ^c	2,71 ± 0,16 ^c	2,08 ± 0,26 ^b
120 ppb	5,17 ± 0,31 ^d	1,75 ± 0,15 ^c	2,91 ± 0,45 ^c	4,20 ± 1,00 ^a
100 ppm	18,06 ± 1,34 ^c	8,34 ± 1,43 ^b	26,21 ± 4,17 ^b	0,62 ± 0,07 ^c
500 ppm	21,52 ± 3,59 ^b	15,92 ± 1,64 ^a	29,58 ± 2,73 ^b	0,49 ± 0,04 ^c
1000 ppm	36,09 ± 4,06 ^a	17,24 ± 2,51 ^a	42,15 ± 6,06 ^a	0,43 ± 0,03 ^c

Tab. 11 : Activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des semis de *P. australis* exposés à différentes doses de Ni après 30 jours de germination. *Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune avec trois répétitions (n = 9). Les valeurs les plus élevées sont indiquées par la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes dans une même colonne présentent des différences statistiquement significatives (p ≤ 0,05, test de Tukey).*

Traitement	GST activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	0,180 ± 0,021 ^c	0,089 ± 0,005 ^c	0,158 ± 0,013 ^c	1,14 ± 0,13 ^a
30 ppb	0,252 ± 0,030 ^c	0,089 ± 0,004 ^c	0,258 ± 0,026 ^c	0,98 ± 0,11 ^b
60 ppb	0,246 ± 0,008 ^c	0,087 ± 0,004 ^c	0,277 ± 0,017 ^c	0,88 ± 0,05 ^b
120 ppb	0,296 ± 0,027 ^c	0,091 ± 0,004 ^c	0,319 ± 0,028 ^c	0,93 ± 0,03 ^b
100 ppm	1,74 ± 0,15 ^a	1,59 ± 0,097 ^a	3,50 ± 0,30 ^b	0,49 ± 0,03 ^c
500 ppm	1,58 ± 0,29 ^{ab}	1,27 ± 0,28 ^b	3,59 ± 0,32 ^b	0,44 ± 0,09 ^c
1000 ppm	1,46 ± 0,08 ^b	1,25 ± 0,06 ^b	4,11 ± 0,70 ^a	0,43 ± 0,10 ^c

* Afin de différencier des valeurs numériques très proches, celles-ci sont présentées avec trois chiffres après la virgule.

3.3.3 Activité enzymatique du système antioxydant sous les doses mixtes

Les tableaux 12 ; 13 et 14 présentent les variations de l'activité des enzymes : la Catalase (CAT), la Guaïcol-Peroxydase (GPOx), et la glutathion-S-transférase (GST) dans les différents organes des semis de *P. australis* exposés à diverses doses mixte de Cd+ Ni.

Quelles que soient les doses mixtes utilisées, on observe une très forte induction de l'activité CAT par rapport au contrôle non traité et cela dans les trois organes ; feuilles ($F_{6,56} = 3795,78$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,56} = 785,80$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{6,56} = 2084,30$; $p = 0,000 < 0,05$).

Comparativement à la dose simple de Cd (1000 ppm), l'ajout de faible dose de Ni (120 ppb) stimule davantage l'activité de la CAT dans les trois organes, particulièrement dans les racines, où l'activité a augmenté de près de 19 % par rapport à la dose simple.

Pareil, sous Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm), une légère augmentation de l'activité a été observée dans les feuilles (+2 %), la tige (+4 %), et d'environ 4,5 % dans les racines par rapport à la dose simple Ni (1000 ppm).

Sous 100 ppm de Cd et de Ni, la dose simple de Ni (100 ppm) stimule davantage l'activité de la CAT que sous Cd (100 ppm) seul. La dose de Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) diminue légèrement l'activité par rapport à la dose simple de Ni (100 ppm), mais l'augmente de manière significative comparativement à Cd (100 ppm) seul. Le ratio CAT feuille/racine sous Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) et Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm) est similaire à celui observé sous les doses simples de Cd (1000 ppm) et Ni (1000 ppm), respectivement. Même constatation sous la dose mixte de Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) comparativement à la dose simple Ni (100 ppm). En revanche, le ratio est presque doublé par rapport à celui observé sous la dose Cd (100 ppm).

Concernant les résultats de l'activité de la GPOx, l'ANOVA a également révélé un effet significatif du facteur dose dans les feuilles ($F_{6,56} = 151,91$; $p = 0,000 < 0,05$), les tiges ($F_{6,56} = 318,19$; $p = 0,000 < 0,05$) et les racines ($F_{6,56} = 897,18$; $p = 0,000 < 0,05$).

Comparativement aux doses simples de Cd (1000 ppm) ou Ni (1000 ppm), l'activité de la GPOx sous les doses mixtes de Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) et Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm) est très similaire. Cependant, l'addition de Ni (120 ppb) à Cd (1000 ppm) provoque une légère diminution d'activité dans les feuilles et les tiges, et une faible augmentation dans les racines, comparativement au Cd (1000 ppm). Par contre, l'addition de Cd (100 ppb) à Ni (1000 ppm) entraîne une faible augmentation de l'activité dans les feuilles et les tiges, et une très légère diminution dans les racines, comparativement sous Ni (1000 ppm) seul.

Sous 100 ppm de Cd et de Ni, la dose simple de Ni (100 ppm) stimule moins l'activité de la GPOx que sous Cd (100 ppm). L'inverse de ce qui été observé pour l'activité de CAT, qui est plus stimulée par Ni (100 ppm) que par Cd (100 ppm).

La dose de Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) diminue légèrement l'activité de la GPOx par rapport à la dose simple de Cd (100 ppm), mais l'augmente de manière significative comparativement à Ni (100 ppm) seul. Le ratio GPOx feuille/racine sous Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) est similaire à celui observé sous les doses simples de Cd (1000 ppm). Pareil comparativement sous la dose mixte de Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) et les deux doses simples Cd (100 ppm) et Ni (100 ppm). En revanche, sous Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm) le ratio est plus que doublé par rapport à celui observé sous la dose simple de Ni (1000 ppm).

Le tableau 14 illustre les variations de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les différents organes des semis de *P. australis* exposés à différentes doses mixtes de Cd + Ni. L'analyse statistique a révélé un effet négatif significatif des doses testées sur l'activité de la GST dans tous les organes des plantules : feuilles ($F_{6,56} = 1011,77$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,56} = 256,62$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{6,56} = 3795,90$; $p = 0,000 < 0,05$).

Comparativement sous la dose simple de Cd (1000 ppm), l'ajout de la faible dose de Ni (120 ppb) à Cd (1000 ppm) diminue l'activité de la GST dans les trois organes : moins de (- 8 %) dans les feuilles, moins de (- 21 %) dans la tige et environ moins de (-11 %) dans les racines. A l'inverse l'addition de Cd (100 ppb) à Ni (1000 ppm), augmente l'activité de la GST dans les trois organes par rapport à Ni (1000 ppm) seule : plus de (+13 %) dans les feuilles, (+20 %) dans la tige, et (+ 6 %) dans les racines par rapport à la dose simple Ni (1000 ppm).

Concernant les résultats sous 100 ppm de Cd et de Ni, la dose simple de Ni (100 ppm) stimule davantage l'activité de la GST que sous Cd (100 ppm), particulièrement dans les racines. La dose mixte de Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) diminue l'activité dans les trois organes par rapport à la dose simple de Ni (100 ppm). Comparativement à la simple dose Cd (100 ppm), la dose mixte Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) diminue l'activité dans les feuilles, mais l'augmente d'environ 70% dans les racines.

Le ratio de l'activité GST feuille/racine sous Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) et Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm) est similaire à celui observé sous les doses simples de Cd (1000 ppm) et Ni (1000 ppm), respectivement. Cependant, sous la dose mixte de Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm), l'activité de la GST est environ deux fois plus faible que sous Cd (100 ppm), et reste proche de celle observée sous la dose simple de Ni (100 ppm) (Tab. 14).

Tab. 12 : Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des semis de *P. australis* exposés à différentes doses mixtes de Cd +Ni après 30 jours de germination. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune avec trois répétitions ($n = 9$). Les valeurs les plus élevées sont indiquées par la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes dans une même colonne présentent des différences statistiquement significatives ($p \leq 0,05$, test de Tukey).

Traitement Cd+Ni	GPOX activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Leaf	Stem	Root	Leaf/ Root %
Control	5.15±0.54 ^d	1.26±0.09 ^c	2.19±0.17 ^d	2,35±0,04 ^a
Cd _(1000ppm) +Ni _(120ppb)	28,91±3,52 ^c	29,56±2,85 ^a	70,53±2,69 ^a	0,41±0,05 ^d
Cd _(100 ppm) +Ni _(100ppm)	34,13± 4,39 ^b	20,20±1,98 ^b	52,19± 3,44 ^b	0,65±0,08 ^c
Cd _(100 ppb) +Ni _(1000 ppm)	39,09±4,65 ^a	19,96 ±1,96 ^b	39,89±3,80 ^c	0,98 ±0,10 ^b

Tab. 13 : Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des semis de *P. australis* exposés à différentes doses mixtes de Cd +Ni après 30 jours de germination. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune avec trois répétitions ($n = 9$). Les valeurs les plus élevées sont indiquées par la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes dans une même colonne présentent des différences statistiquement significatives ($p \leq 0,05$, test de Tukey).

Traitement Cd+Ni	CAT activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Leaf	Stem	Root	Leaf/ Root %
Control	0,556± 0,034 ^d	0,318± 0,019 ^d	0,379± 0,057 ^c	1,49± 0,24 ^a
Cd _(1000ppm) +Ni _(120ppb)	24,05±3,08 ^c	2,78± 0,142 ^c	50,94± 2,564 ^b	0,47 ± 0,045 ^c
Cd _(100 ppm) +Ni _(100ppm)	59,30± 4,21 ^b	5,63± 0,46 ^b	56,12± 2,46 ^b	1,06± 0,097 ^b
Cd _(100 ppb) +Ni _(1000 ppm)	212,69±7,67 ^a	17,28±1,53 ^a	233,99±12,96 ^a	0,91±0,035 ^b

Tab. 14 : Activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des semis de *P. australis* exposés à différentes doses mixtes de Cd +Ni après 30 jours de germination. Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes, chacune avec trois répétitions ($n = 9$). Les valeurs les plus élevées sont indiquées par la lettre (a). Les valeurs avec des lettres différentes dans une même colonne présentent des différences statistiquement significatives ($p \leq 0,05$, test de Tukey).

Traitement Cd+Ni	GST activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Leaf	Stem	Root	Leaf/ Root %
Control	0,180± 0,021 ^c	0,089± 0,005 ^d	0,158± 0,013 ^d	1,14± 0,13 ^a
Cd _(1000ppm) +Ni _(120ppb)	1,63± 0,11 ^a	0,97±0,02 ^c	1,45± 0,09 ^c	1,14±0,07 ^a
Cd _(100 ppm) +Ni _(100ppm)	1,26± 0,06 ^b	1,14± 0,03 ^b	2,57± 0,04 ^b	0,49± 0,02 ^b
Cd _(100 ppb) +Ni _(1000 ppm)	1,65±0,04 ^a	1,51±0,22 ^a	4,35±0,14 ^a	0,38±0,01 ^c

* Afin de différencier des valeurs numériques très proches, celles-ci sont présentées avec trois chiffres après la virgule.

4 Discussion

4.1 Indices de germination

Globalement, nos résultats montrent que les graines de *P. australis* ont pu germer sous toutes les doses testées. La tendance à la baisse des valeurs du pourcentage final de germination (GP%) et de l'indice de germination (IG) qui représente la corrélation entre le taux de germination quotidien et le taux de germination maximum était dose-dépendante.

Dans le groupe témoin les valeurs de GP% et GI se sont avérées maximum et ont diminué progressivement avec l'augmentation des doses de Cd et Ni. Sauf sous les faibles doses de Ni (30, 60 et 120 ppb) où une légère augmentation de GP% a été enregistrée. Les données concernant l'effet de Ni sur la germination des grains de *P. australis* sont rares dans la littérature scientifique. A notre connaissance, aucune étude dans la littérature n'a été menée sur l'effet isolé du Ni sur la germination des graines de *P. australis*. Mais des résultats similaires ont été observés chez d'autres espèces de la même famille que *P. australis* comme *Arundo donax*, où 10 ppm n'a aucun effet indésirable, tandis que 50 ppm diminue la germination significativement (Atma *et al.*, 2017).

Sous Cd, les observations de Peng *et al.* (2010) corroborent nos résultats. Ils ont enregistré une réduction du GP% des graines de *P. australis* et une diminution de la valeur de IG à mesure que la concentration de Cd²⁺ dans la solution augmentait. Des résultats similaires ont été observés lorsque les graines de *P. australis* ont été traitées avec 0,5 et 1 µg ml⁻¹ de CdSO₄ (Ye *et al.*, 1997).

Dans la présente étude, en testant des niveaux de Cd inférieurs à ceux examinés par Peng *et al.* (2010) et Ye *et al.* (1997), qui étaient respectivement de 500 ppb et 1 ppm de Cd, nous a montré que les graines étaient plus sensibles que ce qui avait été rapporté, et que 100 ppb de Cd inhibaient de manière significative la germination.

Concernant l'indice du temps moyen de germination (MGT) utilisé pour mesurer la durée et le taux de germination, où une valeur de MGT plus faible correspond à une germination plus rapide. Il a été constaté dans notre étude que toutes les doses de Cd ou de Ni avaient retardé la germination des graines. L'augmentation des doses de Cd ou Ni ont également augmenté le temps nécessaire pour atteindre 50% de germination (T50%), alors que le temps le plus court pour atteindre 50% de germination a été observé dans le groupe témoin. De manière semblable à nos résultats, des études antérieures ont démontré les effets négatifs du Cd et Ni sur la germination de plusieurs plantes des milieux humides et aquatiques, telles que *Spartina alterniflora* (Wang *et al.*, 2021), *Ipomoea aquatica* (Cao *et al.*, 2019) et *Suaeda salsa* (Liu *et*

al., 2012). Les résultats des quatre indices utilisés dans la présente étude montrent que le processus de germination des grains de *P. australis* est ETM et dose-dépendant. Les valeurs des indices sous les trois faibles doses testées (Cd : 10, 30 et 100 ppb et Ni : 30, 60 et 120 ppb) montrent que le Ni retarde et inhibe moins la germination que le Cd, malgré que les doses de Ni soient plus élevées que celles de Cd. Cependant, à fortes doses (Cd ou Ni : 100, 500 et 1000 ppm), on a constaté que le Ni inhibe et retarde davantage la germination des graines de *P. australis*. Cette sensibilité différentielle observée entre le Cd et le Ni peut s'expliquer par la différence entre la toxicité intrinsèque de chaque ETM et la relation dose-effet. Cela est également dû au fait que le Cd est un ETM toxique, tandis que le Ni, bien qu'il soit non essentiel pour certaines espèces, il est bénéfique pour la germination d'autres espèces végétales comme *P. australis* mais à de faibles concentrations, vu que nous avons observé une légère augmentation de GP% sous les faibles doses de Ni (30, 60 et 120 ppb).

Selon Ashraf *et al.* (2011), l'effet du Ni sur la germination des graines varie selon l'espèce végétale et la concentration. Plusieurs études ont constaté que des concentrations faibles de quelques ppb à 10 ppm de Ni favorisaient la germination, tandis que des niveaux plus élevés l'inhibaient (Ashraf *et al.*, 2011; Kumar et Verma, 2018; Yadav, 2019). Contrairement au Ni, le Cd est un élément non essentiel toxique même à de faibles concentrations. Il peut affecter et inhiber plusieurs processus physiologiques dont la germination. Dans la présente étude, l'inhibition et le retard de la germination par toutes les doses de Cd et les fortes doses de Ni peuvent être liés à la perturbation de la chaîne d'événements du métabolisme germinal, à l'altération des membranes ou du tégument, ou aussi à la perturbation de la mobilité des nutriments stockés dans les tissus de l'endosperme. Selon Hauvermale and Steber (2020), au cours du processus de la germination, la plupart des graines subissent une séquence d'événements spécifique. Les événements majeurs sont l'imbibition, l'activation enzymatique, l'initiation de la croissance de l'embryon, la rupture du tégument et l'émergence des plantules. L'enveloppe des grains et le tégument peuvent empêcher ou minimiser la pénétration de Cd et de Ni dans les tissus de réserve des graines, mais à fortes doses l'enveloppe ne pourrait pas empêcher leur accumulation dans les tissus (Léon *et al.*, 2005; Rahoui *et al.*, 2010). La pénétration du Cd et du Ni dans la graine se produit lors de l'imbibition. Le tégument ou le testa devient plus perméable avec le temps et la teneur de ces deux ETM commence à augmenter dans les tissus internes de la graine (Sfaxi-Bousbih *et al.*, 2010).

L'accumulation de Cd et de Ni dans les tissus des graines peut empêcher l'absorption et le transport de l'eau vers l'axe embryonnaire (Jaouani *et al.*, 2018). Le Cd peut aussi altérer le processus de la dégradation des sucres insolubles dans les graines ainsi que leur translocation

vers les axes embryonnaires en croissance (Anwar *et al.*, 2021). Lorsque le Ni dépasse un seuil donné, il peut engendrer une peroxydation lipidique des membranes cellulaires des tissus embryonnaires (Nimra Atta *et al.*, 2024). Les dommages aux membranes cellulaires sont souvent causés par une peroxydation lipidique induite par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), entraînant une perte de pression de turgescence due à la fuite d'eau et aux pertes excessives d'osmolytes (Gajewska *et al.*, 2012; Uruç Parlak, 2016).

Globalement, on peut dire qu'à un certain seuil, le Cd et le Ni perturbent les caractéristiques de la germination en engendrant un dysfonctionnement dans les processus physiologiques et biochimiques impliqués, comme l'imbibition, l'activité enzymatique, la respiration, ainsi que la mobilisation des réserves nutritive dans les cotylédons.

Nos résultats montrent clairement que la différence dans l'effet phytotoxique du Ni et du Cd sur la germination dépend de la dose et de l'ETM testé. Contrairement aux faibles doses de Cd (10, 30 et 100 ppb) qui ont diminué le taux de germination et ralenti la vitesse de germination, les faibles doses de Ni (30, 60 et 120 ppb) ont légèrement amélioré le taux de germination, démontrant ainsi un rôle du Ni dans le processus de germination.

Selon Bai *et al.* (2013), le Ni joue un rôle important dans un large éventail de processus physiologiques, notamment la germination des graines. Le caractère essentiel du Ni en tant que micronutriment dans les plantes a été établi car il fait partie du site actif de l'enzyme uréase, qui hydrolyse l'urée dans les tissus (Chen *et al.*, 2009). Dans les graines le Ni joue un rôle d'un cofacteur de l'uréase, une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et en dioxyde de carbone (Polacco *et al.*, 2013). Ce processus est essentiel à la germination des graines limitées en azote. L'inactivation de l'uréase entraîne une augmentation des niveaux d'urée et une inhibition de la germination (Zonia *et al.*, 1995).

Sous Cd, les indices de germination : GP%, GI, MGT, et T50% révèlent que les graines de *P. australis* étaient assez sensibles à la concentration croissante de Cd, même si les différences n'étaient pas significatives entre tous les groupes traités. Une légère augmentation de l'ordre de ppb de Cd a eu un effet négatif sur le taux et la vitesse de germination, comme en témoigne la différence significative entre la valeur de l'indice GI dans le groupe témoin et celui traité avec 10 ppb de Cd.

La sensibilité des graines de *P. australis* aux variations des doses de Cd peut également être attribuée à la faible masse des graines et à la faible teneur en réserves nutritives de cette espèce (dans notre étude, poids des graines : $16,77 \pm 0,11$ mg/100 graines). Selon Haraguchi (2014), le poids des graines de *P. australis* pourrait varier entre 25 et 11 mg. Steiner *et al.* (2019), ont montré que la taille et le poids des graines sont des indicateurs importants de

la qualité physiologique car ils peuvent affecter la germination des graines et la croissance des plantules, en particulier dans des conditions de stress. Cependant, la corrélation positive ou négative entre la taille des graines et les caractéristiques de germination dépend de l'espèce (Tumpa *et al.*, 2021).

L'objectif de tester des différentes doses mixtes de Cd et Ni était de caractériser les effets synergiques ou antagonistes entre ces deux ETMs sur les caractéristiques de germination des graines de *P. australis*. La comparaison entre l'effet des doses mixtes et des doses simples sur le taux et la vitesse de germination montre que l'addition d'une faible dose de Ni ou de Cd à une forte dose de l'un de ces deux ETM ne semble pas modifier de manière importante les effets observés avec les fortes doses simples de Cd (1000 ppm) et de Ni (1000 ppm). Les quatre indices montrent une légère inhibition de la germination sous les doses mixtes. Sauf pour l'indice MGT, où la dose mixte Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm) semble diminuer le temps moyen de germination par rapport à la dose simple de Ni (1000 ppm). Nous avons enregistré un MGT de 12,42 jours et 13,75 jours, respectivement. Globalement, cela suggère que la toxicité est principalement due aux Cd ou Ni présents à fortes doses. En revanche, l'utilisation de doses équivalentes [Cd]=[Ni]=100 ppm montre un effet synergique négatif important de la mixture par rapport aux Cd et Ni seuls.

Ces résultats pourraient s'expliquer par un effet phytotoxique supplémentaire de la dose Cd + Ni. Comparativement sous les doses simples, la présence conjointe de Cd et de Ni, à doses égales, peut interférer davantage avec l'absorption de l'eau et la mobilisation des réserves nutritives, une inhibition plus importante de voies enzymatiques ou engendrer une augmentation du stress oxydatif par une surproduction accrue des espèces réactifs de l'oxygène (ROS). La comparaison entre l'effet des doses simples et combinés (à doses égales) du Cd et du Ni sur la germination n'a pas été directement étudié dans la littérature scientifique. Mais quelques études ont montré que à certaines concentrations, la mixture d'ETMs montre des effets toxiques plus importantes. Houshmandfar and Moraghebi (2011), ont observé une diminution significative de la germination des graines de *Carthamus tinctorius* sous Cd (180 ppm) + Ni (180 ppm) en présence des doses similaires de Cu et Zn. La comparaison des effets individuels et mixtes de sept ETMs (arsenic, cadmium, chrome, plomb, mercure, nickel et zinc) sur la germination de deux dicotylédones (*Cucumis sativus* et *Sorghum saccharatum*) et d'une monocotylédone (*Lepidium sativum*) a montré que les doses mixtes avait des effets plus prononcés sur la germination que le Cd et le Ni seuls. L'étude a démontré aussi que l'effet inhibiteur sur la germination dépend à la fois de la dose appliquée et de la classe des plantes (mono ou dicotylédone) (Baderna *et al.*, 2015).

4.2 Indice de longueur de la radicule et de la racine (RLI)

En comparaison avec les résultats du groupe témoin, les valeurs de l'indice de longueur des radicules et des racines (RLI) mesurées après 10, 20 et 30 jours ont montré une diminution significative sous toutes les doses de Cd, Ni et Cd+Ni, à l'exception des groupes traités avec Cd_(10ppb) après 10 et 20 jours et Ni_(30ppb) après 20 jours.

Après 10 et 20 jours, les faibles doses ne semblent pas affecter la croissance en longueur des radicules d'une manière importante. Cependant, après 30 jours, un effet inhibiteur plus prononcé devient observable. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de détoxification cellulaire des semis de *P. australis parviennent* initialement à minimiser l'effet toxique de ces faibles doses. Mais après 30 jours, il semble que ces mécanismes protecteurs soient dépassés. Probablement une conséquence de l'augmentation de la concentration de Cd et Ni dans les cellules des racines.

À l'inverse de ce qui a été observé sous les faibles doses qui ont un effet graduel au fil du temps, la réduction de la croissance en longueur des racines dans les groupes traités avec 100, 500 et 1000 ppm a été significative dès le 10 jours. Cette réduction ne semble pas varier de manière importante entre les trois périodes (10, 20 et 30 jours). Cela montre que les doses élevées de Cd et/ou Ni ont rapidement un effet phytotoxique important dès le 10-ème jour, inhibant fortement la croissance des racines. Cet effet est probablement dû à une perturbation et une baisse de l'activité mitotique ainsi qu'à un stress oxydatif plus intense au niveau des méristèmes racinaires.

Dans la présente étude, la phytotoxicité du Cd et/ou Ni sur les racines devient évidente avec l'augmentation des doses. En plus de la réduction des valeurs de RLI dans les groupes traités avec 100, 500 et 1000 ppm de Cd, Ni et Cd+Ni, des racines nécrosées ont été observées après 20 jours, révélant l'effet toxique de Cd et Ni sur la division cellulaire au niveau des racines. Selon Nagajyoti *et al.* (2010), les effets phytotoxiques des ETM sur la croissance des plantes sont bien connus ; cependant, les réponses des plantes et le degré de phytotoxicité varient considérablement en fonction de l'espèce végétale et du type d'ETM, en plus de la concentration qui joue également un rôle déterminant dans la croissance, le développement et les activités physiologiques des plantes cibles. Une fois la germination terminée, deux processus majeurs déterminent la croissance des plantes : la division cellulaire et l'expansion cellulaire (Huybrechts *et al.*, 2019). La phytotoxicité du Cd et Ni inhibe cette croissance par différents mécanismes : elle peut affecter le cycle et la division cellulaire (Deckert, 2005; Mustafa *et al.*, 2023). Induit un stress oxydatif (Muradoglu *et al.*, 2015; Mustafa *et al.*, 2023). Affecte la respiration (Keunen *et al.*, 2013). Le Cd et Ni provoquent aussi un

dysfonctionnement dans l'absorption de l'eau (Naeem *et al.*, 2019). Ils interfèrent également avec l'absorption et la translocation des nutriments essentiels (Anjum *et al.*, 2016).

Les valeurs de l'indice RLI obtenues sous les doses simples et mixtes de Cd et Ni montrent une sensibilité différentielle de la croissance racinaire. Cette variation de sensibilité met en évidence que la croissance racinaire dans des conditions de stress métallique dépend de l'ETM présent dans le milieu, de la dose, la durée d'exposition et le stade de développement des plantules de *P. australis*. Nos résultats montrent aussi que les seuils de toxicité sont différents entre le Cd et le Ni. De manière générale, le Cd exerce un effet inhibiteur plus important sur la croissance des racines que le Ni. L'effet inhibiteur des faibles doses de Cd augmente significativement avec l'augmentation des doses. À l'inverse de ce qui a été constaté sous les faibles doses de Ni, notamment chez les plantules âgées de 30 jours. Cela montre une sensibilité graduelle des racines envers le Cd même à de faibles doses, qui est un ETM toxique à faible concentration. En revanche, pour le Ni, qui est un oligo-élément bénéfique pour les plantes, l'augmentation de la dose de 30 à 120 ppb n'induit pas un effet phytotoxique supplémentaire important. Pareille sous les fortes doses, il n'y a pas de différence significative entre les effets phytotoxiques de Ni sur la croissance en longueur des racines, à l'exception des plantules âgées de 10 jours sous Ni_(1000 ppm) où l'élongation racinaire semble particulièrement plus sensible. Ce qui suggère que le mécanisme de défense contre le stress induit par Ni_(1000 ppm) pourrait ne pas être entièrement développé à ce stade précoce de croissance.

Sous Cd, l'effet inhibiteur ou phytotoxique des fortes doses n'est pas similaire ; il est plus important sous Cd_(1000 ppm) que sous les doses de Cd_(100 ppm) et Cd_(500 ppm). Ce qui est particulièrement intéressant à noter aussi, c'est que le Ni semble avoir un effet phytotoxique plus prononcé que le Cd à la même dose de 1000 ppm, chez les plantules après 10 jours de germination. Mais après 20 et 30 jours les effets phytotoxiques sont plus au moins similaires. Cela met en évidence la complexité de la relation effet/réponse envers ces deux ETMs chez les plantules de *P. australis*. Lors de ce stade précoce de croissance racinaire (10 jours), et à ce niveau élevé de Cd et Ni, les mécanismes de défense des plantules pourraient être plus efficaces contre le Cd que contre le Ni. Au cours de ces premiers stades de l'organogenèse, le Ni pourrait avoir un effet inhibiteur plus spécifique que le Cd sur certains processus qui contrôlent la croissance des racines, comme la mitose et la signalisation hormonale. À un certain stade de développement (20 à 30 jours), les plantules semblent activer leur système de détoxification et contrôler l'absorption et l'accumulation de Ni. Selon Mustafa *et al.* (2023), lorsque les concentrations dépassent le seuil de tolérance, le Ni peut altérer de nombreux processus physiologiques et biochimiques. Il peut inhiber la germination et la croissance des racines,

réduire l'absorption d'eau et de nutriments. Des travaux antérieurs investiguant les effets différentiels du Cd et Ni sur la croissance racinaire ont montré que ces ETMs ont des effets distincts sur la perméabilité et le potentiel électrique des membranes des cellules racinaires (R Fiala *et al.*, 2015; Sanz *et al.*, 2009). La présence de 0,5 mM de Ni a provoqué une dépolarisation transitoire de la membrane, avec une récupération du potentiel membranaire initiale en quelques minutes. Mais l'utilisation de 0,1 mM de Cd entraîne une forte dépolarisation des cellules racinaire avec une récupération du potentiel membranaire initiale en 6 à 8 heures (Llamas *et al.*, 2000; Llamas *et al.*, 2008). Par rapport aux faibles doses de Cd et Ni, les travaux de R. Fiala *et al.* (2015) ont démontré que l'augmentation des concentrations de ces deux ETMs entraîne une dépolarisation plus permanente dans les cellules des racines, ce qui réduit et inhibe leur croissance. Ces observations peuvent expliquer la diminution significative des valeurs de RLI chez *P. australis* sous les fortes doses de Cd et Ni testées, et ce dès le 10-ème jour. Permettant de comprendre pourquoi les effets phytotoxiques demeurent relativement similaires pour chaque ETM durant les trois périodes d'exposition.

Quant aux résultats enregistrés sous les doses mixtes, toutes les doses ont démontré un effet phytotoxique moins important sur la croissance des racines que leurs doses individuelles respectives. Cet effet antagoniste entre Cd et Ni été plus important quand les doses de Cd et Ni sont égales ($[Cd] = [Ni] = 100 \text{ ppm}$). Deux hypothèses pourrait expliquer ces résultats : Il pourrait s'agir d'une compétition entre Cd et Ni pour les sites de liaison cellulaires, ou la présence simultanée de Cd et de Ni dans le milieu pourrait conduire à une compétition pour l'absorption par les racines. Ou encore d'une induction plus forte des systèmes de détoxification en présence des deux ETMs.

Selon Chen *et al.* (2009), le Cd et Ni pourraient être absorbés via des transporteurs peu spécifiques (protéines de type porine) par diffusion passive simple suivant le gradient de concentration (via la voie apoplastique). Mais aussi via le transport actif en empruntant la voie symplastique. En empruntant les canaux membranaires peu spécifiques des nutriments essentiels, le Cd et Ni sont capables d'interférer avec l'absorption de plusieurs éléments (Das *et al.*, 1997; Huybrechts *et al.*, 2019). Selon Sharma and Dhiman (2013), le ratio d'absorption du Cd et Ni entre le transport actif et passif varie selon les espèces.

Selon nos résultats, il est possible de suggérer que le ratio d'absorption via les transports passif et actif dépendrait aussi de la quantité de Cd ou Ni présente dans le milieu. En effet, l'effet antagoniste s'avère inférieur lorsque l'on a testé une dose mixte composée de faible dose additionnées à une forte dose, comparativement à une dose mixte où les doses de Cd et Ni étaient élevées ou équivalentes. On peut également suggérer que *P. australis* régule l'expression

des transporteurs membranaires, ce qui lui permet de s'adapter aux variations de disponibilité des ETMs essentiels ou toxiques dans le milieu.

La réponse morphologique, biochimique et physiologique des plantes dépend de l'induction des mécanismes de détoxification, laquelle dépend de l'intensité du stimulus perçu. La perception du stimulus, comme le Cd et/ou Ni au niveau de la membrane cellulaire, entraîne la production de molécules messagères secondaires et de facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes impliqués dans la réaction de la plante, comme la régulation de l'expression des transporteurs membranaires (Calatayud *et al.*, 2013; Raza *et al.*, 2022).

4.3 Indice de longueur des pousses (PLI)

Les mesures de l'indice de croissance en longueur des pousses (PLI) de *P. australis*, effectuées après 10, 20 et 30 jours d'exposition à des doses simples de Cd et de Ni, ainsi qu'à des doses combinées de ces deux ETMs, ont révélé un effet négatif sur la croissance.

Cependant, seules les doses élevées de Ni ont eu un impact négatif sur la croissance. Les faibles doses de nickel, quant à elles, semblent avoir stimulé la croissance en longueur des pousses.

Plusieurs études ont démontré que le Ni a des effets à la fois stimulants et inhibiteurs sur la croissance des plantes. Mais ces effets pourraient être spécifiques à l'espèce et dépendants de la concentration (Badawy *et al.*, 2022; Gajewska et Skłodowska, 2009; Uruç Parlak, 2016). Le Ni est bénéfique à faibles concentrations pour les plantes, il est considéré comme un nutriment important à la croissance et au développement normaux des plantes, et essentiel à l'activation de plusieurs enzymes comme l'uréase et la glyoxalase (Shahzad *et al.*, 2018). Le Ni joue un rôle important dans un large éventail de processus physiologiques, notamment la germination des graines, la croissance végétative, la reproduction, la photosynthèse ainsi que dans le métabolisme de l'azote (Bai *et al.*, 2013).

Le caractère essentiel du Ni en tant que micronutriment dans les plantes a été établi car il fait partie du site actif de l'enzyme uréase, qui hydrolyse l'urée dans les tissus (Chen *et al.*, 2009). Deux formes d'uréase sont présentes dans les plantes : l'une très active qui se trouve dans les graines et l'autre moins active dans les autres tissus de la plante. Bien qu'elle soit moins active, cette dernière joue un rôle important dans le recyclage de l'azote dans les plantes (Polacco *et al.*, 2013).

Nos résultats démontrent aussi que la croissance en longueur des pousses est davantage affectée par le Cd que par le Ni. Par ailleurs, la phytotoxicité de ces deux ETMs ne s'accroît pas systématiquement de manière significative avec l'augmentation des doses testées.

Contrairement à ce qui a été observé pour les racines, particulièrement sous les doses de Ni.

Cette constatation suggère que sous l'effet de fortes doses de Ni, les seuils de phytotoxicité sont rapidement atteints sans augmentation linéaire.

Au-delà de l'inhibition de la division et de l'expansion cellulaires, le Cd et le Ni peuvent induire un stress oxydatif ainsi que des perturbations de la respiration (Chowardhara *et al.*, 2020; Keunen *et al.*, 2013). Ces ETMs sont également susceptibles de provoquer un déséquilibre dans l'absorption des nutriments et de l'eau (Naeem *et al.*, 2019). Ils interfèrent avec l'absorption et la translocation des nutriments essentiels vers la partie aérienne de la plante (Dias *et al.*, 2013; Uruç Parlak, 2016). Perturber la photosynthèse (Dias *et al.*, 2013; Nawrot *et al.*, 2021), et la croissance totale des semis (Ashraf *et al.*, 2011; Uruç Parlak, 2016).

La littérature scientifique fournit peu d'informations concernant les effets toxiques du Cd et du Ni sur le développement des jeunes semis de *P. australis*. Peng *et al.* (2010), dans leurs travaux ont rapporté une diminution de la longueur des plantules de *P. australis* après 10 jours d'exposition au Cd²⁺, l'inhibition étant dépendante de la dose. Comparativement au groupe témoin, la réduction de la longueur des plantules était de 3% à 1 ppm, 38% à 2 ppm, 47% à 3 ppm, 66% à 4 ppm et 81% à 5 ppm de Cd²⁺. Une étude similaire a observé une diminution significative de la croissance en longueur des pousses et des racines chez les semis de *P. australis* dont les graines avaient été traitées avec 500 ppb et 1 ppm de Cd pendant 89 jours (Ye *et al.*, 1997).

Chez des plantules issues d'une multiplication végétative, l'irrigation avec des eaux contaminées par du Ni et du Cd a révélé une diminution de la biomasse totale du *P. australis* accompagnée de changements biochimiques importantes. Les teneurs en chlorophylle ont diminué durant la phase de reproduction, tandis que les teneurs en proline, en sucres solubles et les activités des enzymes antioxydantes ont augmenté. L'exposition prolongée aux eaux usées contaminées a augmenté le rapport Na/Ca²⁺ chez *P. australis* (Khalilzadeh *et al.*, 2022).

En comparaison avec les travaux de Ye *et al.* (1997), Peng *et al.* (2010) et Khalilzadeh *et al.* (2022), où les doses testées étaient plus élevées que celles évaluées dans notre étude, nous avons constaté que des doses plus faibles de Cd (30 et 100 ppb) affectent de manière significative la croissance racinaire et caulinaires de *P. australis*. Cependant, les faibles doses de Ni (30 ; 60 et 120 ppb) n'inhibent que la croissance racinaire sans affecter celle des pousses. Ces observations montrent la forte sensibilité de *P. australis* au Cd, même à de faibles doses, en comparaison avec le Ni. Cela reflète probablement son accumulation rapide dans les tissus, interférant avec de nombreux processus cellulaires.

Selon Shafiq *et al.* (2010), la réduction de la longueur des semis sous stress métallique pourrait être attribuable à une diminution du nombre de cellules méristématiques présentes dans

la partie caulinaire ainsi qu'à une altération de certaines enzymes contenues dans le cotylédon et l'endosperme. Après la germination, ces cellules deviennent actives et commencent à utiliser les nutriments stockés, lesquels sont convertis en une forme soluble et transportés vers la racine et la gemmule. L'amylase, une enzyme qui convertit l'amidon en sucre, et la protéase, agissant sur les protéines, jouent un rôle clé dans ce processus. Par conséquent, lorsque les activités des enzymes hydrolytiques sont affectées par les ETMs, les nutriments n'atteignent plus la racine et la gemmule, ce qui affecte la croissance en longueur des plantules.

Dans la présente étude, l'effet toxique du Cd et du Ni sur la croissance des plantules de *P. australis* s'est avéré variable en fonction du stade de développement, et la sensibilité des racines et des parties aériennes. L'impact négatif du Cd et du Ni sur la croissance en longueur des racines était plus prononcé après 30 jours qu'après 10 et 20 jours. En revanche, l'effet inhibiteur du Cd sur la croissance des pousses semblait plus significatif à 10 jours qu'après 20 et 30 jours d'expérience. Pareil que sous Ni, mais seulement sous les hautes doses (100 ; 500 et 1000 ppm), vu que les faibles doses (30 ; 60 et 120 ppm) n'ont pas d'effet négatif.

Cette sensibilité différentielle pourrait s'expliquer par une plus grande vulnérabilité des pousses au Cd que le Ni lors des premiers stades de germination. Dans notre étude et au début de la croissance, la gemmule et le bourgeon terminal des jeunes pousses restent immergées dans le milieu, en contact direct avec le Cd et le Ni, jusqu'à leur élongation. Après 20 et 30 jours, la longueur des pousses augmente grâce à l'utilisation des nutriments du cotylédon et à l'absorption d'eau et les nutriments par le système racinaire désormais fonctionnel. L'accumulation de Cd et Ni dans les racines permettrait de réduire la translocation du Cd et du Ni vers la partie aérienne et les feuilles. Ainsi, les pousses de *P. australis* sembleraient présenter une plus grande tolérance au Cd et au Ni à des stades de développement plus avancés (30 jours).

Les racines jouent un rôle clé en tant que première barrière contre la pénétration du Cd et du Ni, piégeant ces éléments par adsorption pariétale et séquestration intracellulaire. Aux premiers stades de développement, la croissance racinaire des plantules de *P. australis* sous exposition au Cd était meilleure en comparaison aux pousses, reflétant une moindre sensibilité intrinsèque des racines. Ceci peut s'expliquer par un système de détoxification racinaire efficace impliquant chélation, séquestration vacuolaire et activation antioxydante. Cependant, avec le temps et l'augmentation des doses, l'accumulation croissante de Cd devient délétère, entraînant l'inhibition de croissance observée après 30 jours. En revanche, les réponses au Ni semblent différentes, surtout à de faibles doses, avec un impact moindre sur la croissance caulinaire. Cette observation est cohérente avec le rôle physiologique du Ni en tant qu'oligoélément mieux régulé, et sa toxicité plus faible. En effet, plusieurs études ont montré

que *P. australis* accumule davantage le Cd et le Ni dans les racines que dans les tiges et les feuilles (Alfadul et Al-Fredan, 2013; Fediuc et Erdei, 2002; Ye *et al.*, 1997). Aussi, les mécanismes d'accumulation et de détoxification biochimique semblent être renforcés dans les racines par rapport aux feuilles chez les plants de *P. australis* (Alfadul et Al-Fredan, 2013).

Quant aux résultats enregistrés sous les doses mixtes dans les trois périodes de croissance (10, 20 et 30 jours), il semblerait que ces doses aient entraîné une inhibition de la croissance des pousses moins importante comparée aux hautes doses individuelles correspondantes. La même tendance a été observée sur la croissance en longueur des racines. L'ajout de faibles doses de Ni (étant un élément bénéfique pour la nutrition) pourrait améliorer certains processus physiologiques chez *P. australis*, conduisant ainsi à une amélioration de la croissance en longueur des racines et des pousses. Ou cela pourrait être dû à un phénomène d'hormèse, où l'addition de faibles doses de Cd et de Ni a stimulé certains processus physiologiques bénéfiques pour la croissance. L'hormèse est un phénomène dose-réponse observé chez de nombreux espèces végétales, provoqué par de faibles niveaux d'un grand nombre de facteurs de stress, parmi lesquels les ETMs comme le Cd et le Ni (Salinitro *et al.*, 2021). De nombreuses espèces végétales présentent généralement des réponses hormétiques. Les réponses hormétiques au Cd et Ni peuvent se produire dans les racines, les tiges, les feuilles, les pousses et les rhizomes. Cependant, les caractéristiques quantitatives de ces doses-réponses sont indépendantes des espèces végétales (Calabrese et Agathokleous, 2021). L'hormèse est une réponse adaptative au stress métallique, éventuellement déclenchée par une perturbation initiale de l'homéostasie, qui permet de maintenir une stabilité physiologique malgré le stress. L'hormèse est un processus de surcompensation visant à rétablir l'état antérieur et à protéger la plante par la stimulation des mécanismes de défense cellulaire (Berry et López-Martínez, 2020; Calabrese, 2015; Jalal *et al.*, 2021). Selon Carvalho *et al.* (2020), les ETMs à faibles doses peut stimuler la croissance en longueur et augmenter le nombre des racines, améliorer la teneur en pigments photosynthétiques et stimuler l'activité antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans les racines et les pousses.

Chez *Lonicera japonica*, Jia *et al.* (2015) ont découvert que la faible dose de 2.5 ppm de Cd peut améliorer la croissance des plantes. Aussi, Salinitro *et al.* (2021), ont constaté que Cd à 0,5 μM a induit une réponse hormétique marquée chez *Poa annua*, et *Cardamine hirsuta* ; montrant une forte influence sur la biomasse sèche des racines et des pousses, ainsi que sur le nombre de nœuds. Bhatia *et al.* (2005), a découvert que les plantes utilisaient le Ni pour l'ajustement osmotique. Des résultats similaires ont été observés par Iori *et al.* (2013), dans leur

travaux ils ont constaté que *Amaranthus paniculatus* exposée à de faibles niveaux de Ni présentait une biomasse et une capacité de tolérance aux ETMs plus importante.

4.4 Enzymes du système antioxydant

Dans le but d'évaluer l'état physiologique et d'estimer le degré de sensibilité des jeunes plantules de *P. australis* issus de graines, nous avons examiné l'activité de trois enzymes du système antioxydant : la gaïacol peroxydase (GPOx), la catalase (CAT) et la glutathion-S-transférase (GST). Ces enzymes sont des biomarqueurs de stress fréquemment utilisés pour évaluer la réponse des plantes face au présence des ETMs. Nous avons mesuré l'activité de ces trois enzymes dans les feuilles, les tiges et les racines des plantules exposées à des doses individuelles et combinées de Cd et de Ni.

Les résultats ont révélé des profils d'activité enzymatique variables, dépendant à la fois des doses testées et de l'organe végétal analysé. Sous les hautes doses simples de Cd et Ni ainsi que toutes les doses mixtes, l'activité de CAT, GPOx et GST a été significativement stimulée dans tous les organes (feuilles, tiges, racines) comparativement au groupe contrôle. De manière générale, un effet dose-réponse positif a été observé pour ces trois enzymes.

Rares sont les études qui se sont intéressées aux réponses enzymatiques du système antioxydant des pousses de *P. australis* issus des graines. Cependant, plusieurs études ont montré l'importante induction de ces enzymes chez des plantes de *P. australis* issues d'une multiplication végétative. Comme la CAT et la GST dans les feuilles et les racines sous 50 μM de CdSO_4 (Iannelli *et al.*, 2002). la superoxyde dismutase (SOD) et la CAT sous 0,2 ; 0,4 et 0,6 mmol.L^{-1} de Cd (He et Liu, 2007). Des résultats similaires ont été révélés par Ederli *et al.* (2004) dans les racines de *P. australis* traitées par 100 μM de Cd pendant 21 jours, où l'activité de l'ascorbate peroxydase (APX), CAT, GPOx et de la GST a été fortement stimulée. Aussi sous Ni, une stimulation importante du système antioxydant (APX, CAT, SOD) a été observée chez plusieurs espèces, comme dans les racines et les feuilles d'une plante aquatique *Nasturtium officinale* (Duman et Ozturk, 2010). De même, une stimulation de GPOx et GST a été observée dans les jeunes pousses du blé exposées à 200 μM de Ni (Gajewska *et al.*, 2006). Le Ni et le Cd à certains seuils peuvent perturber l'équilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et le système de défense antioxydant, entraînant une accumulation des ERO et induisant un stress oxydatif (Bai *et al.*, 2013; Haider *et al.*, 2021; Shahzad *et al.*, 2018).

Pour faire face au stress métallique, les plantes ont développé de multiples mécanismes adaptatifs (Qadir *et al.*, 2014). Les plantes résistantes ont la capacité de survivre et de se

reproduire en présence de concentrations élevées d'ETMs dans leur environnement. Ces mécanismes de résistance et d'adaptation peuvent être réalisés selon les deux stratégies : l'évitement et/ou la tolérance (Jutsz et Gnida, 2015). Les plantes évitantes sont capables de se protéger en empêchant les ions métalliques de pénétrer dans leur cytoplasme cellulaire, tandis que les plantes tolérantes sont capables de détoxifier les ions métalliques qui ont traversé la membrane plasmique ou les membranes internes des organites (Millaleo *et al.*, 2010).

Selon Singh *et al.* (2022), le mécanisme de tolérance au stress oxydatif induit par les ETMs implique principalement la transcription accrue des gènes codant pour des enzymes antioxydantes clés : APX, CAT, GPOx, GST et SOD. Les macrophytes comme *P. australis* sont dotés de systèmes de défense enzymatiques ou non enzymatiques qui peuvent contribuer à détruire les ERO. Le système est composé d'enzymes du système antioxydant : l'Ascorbate Peroxydase (APX), la Glutathion Réductase (GR), la Superoxyde Dismutase (SOD), la Catalase (CAT), ainsi que de composés non enzymatiques tels que l'acide ascorbique, le glutathion et les caroténoïdes (Dhir *et al.*, 2009; Unyayar *et al.*, 2006).

Dans la présente étude, il semblerait que les hautes doses de Cd, Ni et Cd+Ni aient induit un stress oxydatif chez les plantules de *P. australis*. Pour se protéger contre ce stress et neutraliser les ERO qui peuvent altérer la synthèse des protéines et des lipides, ainsi que d'autres fonctionnement cellulaire, les plantules de *P. australis* ont mis en place un système de défense impliquant la biosynthèse du CAT, GPOx, GST. Cependant une variabilité de réponse inter-organe et inter-ETMs a été observé : L'induction de l'activité de CAT, GPOx, GST n'était pas uniforme. Il y a eu des différences quantitatives dans l'induction selon l'organe (feuilles, tiges, racines) et l'ETMs utilisé (Cd, Ni, Cd+Ni). Nos résultats montrent que l'induction de l'activité de la CAT, GPOx, GST par le Cd, le Ni et le Cd+Ni était plus élevée dans les racines que dans les feuilles et les tiges, suivant l'ordre : Racine > Feuille > Tige.

En peut expliquer cela par le fait que les racines constituent le premier site d'interaction et d'absorption de Cd et Ni présents dans le milieu. En conséquence, elles subissent des niveaux d'exposition beaucoup plus élevés que les autres organes. En réponse au stress oxydatif élevé provoqué par le Cd et/ou Ni, les racines stimulent activement la biosynthèse des enzymes CAT, GPOx et GST. Dans les feuilles, bien que le degré d'exposition soit inférieur à celui des racines, la translocation indirecte du Cd et Ni depuis les racines vers les feuilles déclenche néanmoins une réponse du system antioxydant. Pour la tige, qui sert à la fois comme système de transport et de support structurel, semble présenter une sensibilité réduite au stress induit comparativement à la feuille et à la racine. Une autre hypothèse qui peut expliquer la variabilité observée dans l'induction des enzymes antioxydantes entre les organes de *P.*

australis, c'est que cette espèce accumule préférentiellement le Cd et Ni dans ses parties souterraines plutôt que dans ses parties aériennes (tiges, feuilles). Ce qui peut rendre cette hypothèse plausible ce que plusieurs études antérieures ont mis en évidence la capacité de *P. australis* à absorber et accumuler le Cd et le Ni, en particulier au niveau de racinaire (Alfadul et Al-Fredan, 2013; Nawrot *et al.*, 2021; Zheng-yub, 2008). *P. australis* est considéré comme une plante non accumulatrice et plutôt une plante dite « excluders » une stratégie d'exclusion adoptée pour minimiser la translocation du Cd et du Ni de la racine vers les parties aériennes plus sensibles (Vymazal et Březinová, 2016). Ce qui peut appuyer encore cette hypothèse, c'est que sous la quasi-totalité des doses élevées (Cd et Ni ; 100, 500, 1000 ppm) ainsi que dans tous les organes exposés à des doses combinées, le ratio des enzymes (CAT, GPOx et GST) feuille/racine était inférieur à < 1 . En revanche, dans le groupe témoin et les groupes traités avec de faibles doses de Cd et Ni, le rapport d'activité feuille/racine était supérieur à > 1 .

Concernant la variabilité de l'induction de l'activité de CAT, GPOx, GST entre les ETMs testés dans les trois organes, nos résultats montrent que l'activité de GPOx sous Cd est supérieure $>$ à celle sous Ni. En revanche, l'activité de CAT sous Cd est inférieure $<$ à celle sous Ni. Quant à l'activité de GST sous Cd, elle était proche de celle sous Ni, sauf dans les racines où GST sous Cd est inférieure $<$ à GST sous Ni. Cette variabilité de réponses de CAT, GPOx et GST reflète probablement des différences dans le mode d'action phytotoxique du Cd et du Ni. Il semble que ces deux éléments engendreraient un stress oxydatif par le biais de voies différentes, ce qui exige des réponses antioxydantes spécifiques et adaptées de la part de la plante. Il semble que chez *P. australis* la CAT, la GPOx et la GST jouent des rôles différents dans la détoxification de Cd et/ou Ni.

L'augmentation de l'activité de la CAT sous un stress métallique a été démontrée par Iannelli *et al.* (2002) dans les feuilles et les racines de *P. australis*. Aussi Pietrini *et al.* (2003), ont révélé que la présence de Cd stimule l'activité de la CAT dans les feuilles, mais il n'a pas été détecté dans les chloroplastes, ce qui laisse suggérer que l'action de cette enzyme est extra chloroplastique. Selon Arora *et al.* (2002), et Apel and Hirt (2004), les catalases sont des enzymes majoritairement peroxysomales éliminent directement H_2O_2 dans les peroxysomes. Pour Smirnoff (1998) le rôle principal du CAT est de détoxifier le peroxyde d'hydrogène produit à proximité par le cytochrome chloroplastique et surtout par les processus de β - oxydation et de photorespiration. La CAT est impliquée dans le principal mécanisme de défense contre l'accumulation du la peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans les cellules végétales. Éliminant le H_2O_2 en le décomposant directement pour former de l'eau et de l'oxygène (Malar *et al.*, 2016). Les ERO, regroupe d'autres radicaux contenant de l'oxygène tel que le radical

superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) (Das et Roychoudhury, 2014; Hasanuzzaman *et al.*, 2020). Le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), est récupéré dans les plantes stressées par la superoxyde dismutase (SOD), qui le convertit en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Reddy *et al.*, 2005). Le H_2O_2 est récupéré directement par la CAT, le convertissant en H_2O et O_2 . Les peroxydases, comme l'ascorbate peroxydase (APX) et la GPOx, piègent également indirectement le H_2O_2 en le combinant avec des composés antioxydants comme l'ascorbate et le gâïacol (Yang *et al.*, 2011).

La GPOx appartient aux peroxydases, qui sont regroupées en trois classes, dont les classes (I) et (III) se retrouvent dans les plantes (Mathé *et al.*, 2010). L'APX est une peroxydase de classe (I), active principalement dans le cytosol, les chloroplastes, les mitochondries et les peroxyosomes (Foyer et Noctor, 2003; Mathé *et al.*, 2010). Les peroxydases de classe (III) (300-350 acides aminés), comme la GPOx ils se trouvent dans le cytosol, dans la vacuole, où aucune APX n'est présente (Yamasaki et Grace, 1998). La GPOx est une enzyme qui utilise le gâïacol (o-méthoxyphénol) comme substrat réducteur pour son oxydation dépendante de H_2O_2 . Dans les parois cellulaires, elles sont impliquées dans la formation de la lignine et de la subérine. Mais contrairement à l'APX, elles ne se trouvent pas dans les organelles (Madhusudhan *et al.*, 2003). Les peroxydases sont des glycoprotéines synthétisées par la voie du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, conduisant à leur sécrétion soit vers l'espace extracellulaire, soit vers les vacuoles. Sous leur forme active, les peroxydases fonctionnent généralement comme un polypeptide dans la plupart des plantes, avec de 300 à 350 acides aminés et un poids moléculaire compris entre 33 et 55 kDa (Rajput *et al.*, 2021).

Sous une exposition chronique ou à court terme au Cd et/ou Ni, les ERO augmentent ainsi que l'activité antioxydante du GPOx dans les roseaux matures de *P. australis* issus d'une reproduction végétative (Kozłowska *et al.*, 2009). Plusieurs plantes ont montré aussi une augmentation de l'activité GPOx lorsqu'elles sont exposées au Cd, comme *Phaseolus vulgaris* (Gutiérrez-Martínez *et al.*, 2020), *Hordeum vulgare* (Jócsák *et al.*, 2020), *Vicia faba* (Issam *et al.*, 2012). Aussi sous Ni comme chez *Oryza sativa* (Maheshwari et Dubey, 2009). En revanche, l'activité GPOx a diminué chez d'autres espèces exposées au Cd, notamment *Pisum sativum* (Głowacka *et al.*, 2019), et *Brassica napus*. cv. Zheda 619 (Ali *et al.*, 2015).

Les données de la littérature relatives à l'impact du Cd et/ou Ni sur l'activité GPOx sont hétérogènes. La réponse de défense enzymatique antioxydante diffère selon les espèces végétales, le stade de développement, l'organe et la durée d'exposition, ainsi qu'entre les diverses conditions de stress et leurs fréquences (Boaretto *et al.*, 2014; Hasanuzzaman *et al.*, 2020). *P. australis* est une plante accumulatrice des ETMs dans les racines. Par conséquent,

le maintien d'une activité GPO_x élevée dans les racines sous des niveaux élevés de Cd et /ou Ni pourrait faire partie d'un mécanisme visant à prévenir les effets néfastes des ERO. Dans leurs travaux, Ederli *et al.* (2004), ont montré que *P. australis* pouvait séquestrer le Cd à l'intérieur des cellules du cortex racinaire et restreindre sa translocation vers le cylindre vasculaire puis vers la tige et la feuille. Dans des roseaux de *P. australis* régénérés à partir de tissus de cals embryonnaires traités au Cd (NO₃)₂, Fediuc and Erdei (2002) ont constaté aussi que l'activité GPO_x augmente avec l'augmentation des concentrations des ETMs dans les feuilles et les racines.

Dans notre étude, l'activité de GPO_x sous Cd est supérieure > à celle sous Ni sauf sous la plus haute dose de Cd (1000ppm) dans les feuilles qui est inférieure sous Ni (1000ppm). La diminution de l'activité GPO_x dans les feuilles exposées à des niveaux élevés de Cd après un pic d'induction sous 100 ppm pourrait s'expliquer par le fait qu'au-delà d'un certain seuil, l'efficacité de la séquestration du Cd dans les racines diminue à l'inverse sous Ni ou l'activité GPO_x est dose-dépendante. Par conséquent, les ERO générées par l'accumulation de Cd dans les tissus des feuilles peuvent avoir des effets plus délétères sur la biosynthèse du GPO_x que sous Ni. L'augmentation de la prévalence de plantules avec des anomalies et un état phénotypique anormal, notamment ; de racines nécrotiques, de jaunissement et d'atrophie des feuilles, en particulier dans les groupes traités avec Cd (500ppm) et Cd (1000ppm), renforce cette hypothèse. L'augmentation de l'activité de la GPO_x dans les racines sous les hautes doses de Cd et/ou Ni (malgré qu'elle ne soit pas toujours dose-dépendante), pourrait être une réponse cellulaire visant à neutraliser les ERO. Elle pourrait aussi contribuer à réduire la translocation du Cd et/ou du Ni via la voie apoplasmique vers les feuilles, étant donné que la GPO_x est impliquée dans la lignification des racines des plantes.

Selon, Barceló *et al.* (2004), les lignines sont des hétéropolymères phénoliques de la paroi cellulaire qui résultent du couplage oxydatif de trois monolignols ; alcools p-coumarylique, coniférylique et sinapylique, dans une réaction médiée par GPO_x. Le renforcement des parois cellulaires par lignification peut être interprété comme une réponse de la plante pour former une barrière plus efficace contre des quantités excessives d'ETMs (Loix *et al.*, 2017).

Dans notre étude, ce qui explique probablement pourquoi le rapport d'activité GPO_x feuille/racine était >1 dans les groupes témoin et traités avec de faibles doses de Cd et de Ni, c'est que dans des conditions de stress nul ou faible, les pousses de *P. australis* pourraient réguler négativement l'activité GPO_x dans la racine afin de préserver une croissance optimale. Vu que ce processus peut avoir un impact sur la croissance.

Quant aux résultats de l'activité de GST, nous avons constaté que l'activité sous Cd était

proche de celle sous Ni, sauf dans les racines où GST sous Cd été inférieure < à GST sous Ni. Ce qui peut expliquer ces résultats, c'est que le Ni pourrait être plus facilement absorbé et bioaccumulé que le Cd dans les racines, ce qui conduirait à un stress oxydatif plus fort nécessitant leur détoxification par la GST. Ce qui peut rendre cette hypothèse plausible, c'est que dans les résultats de l'indice de croissance en longueur des racines (RLI), nous avons observé que le Ni semble avoir un effet phytotoxique plus prononcé que le Cd à la même dose de 1000 ppm chez les plantules après 10 jours de germination. Au cours de ce stade de l'organogenèse, le Ni pourrait avoir un effet inhibiteur plus spécifique que le Cd sur certains processus qui contrôlent la croissance des racines, comme la mitose et la signalisation hormonale. On peut aussi suggérer que le Cd et le Ni pourraient être séquestrés dans des compartiments différents (parois, vacuoles ou autres organites...) contrôlant ainsi leur disponibilité dans le cytosol pour la conjugaison GSH dépendante par la GST.

Les travaux de Ederli *et al.* (2004) ont révélé que les cellules du parenchyme situées sous l'exoderme des racines de *P. australis* sont identifiées comme le principal site d'accumulation de Cd. Plusieurs travaux ont montré que le Cd et le Ni semblent être séquestrés dans différents compartiments cellulaires des racines des plantes. Le Cd est principalement séquestré dans l'apoplaste (irréversiblement) et se lie fortement aux composés des parois ou dans le symplaste de la racine, à l'intérieur des cellules après qu'il a franchi les membranes plasmiques (Nocito *et al.*, 2011; Van Belleghem *et al.*, 2007; Wójcik *et al.*, 2005). Le Ni, par contre, il est séquestré dans les vacuoles racinaires (Wójcik *et al.*, 2005).

Ces travaux appuient effectivement l'hypothèse selon laquelle l'induction de l'activité GST observée sous Cd comparé au Ni pourrait provenir d'une localisation différente de ces ETMs, impactant leur accessibilité par cette enzyme cytosolique. Le Cd étant piégé principalement dans l'apoplaste et moins disponible dans le cytosol, il active moins la GST que le Ni qui lui s'accumule dans les vacuoles communiquant avec le cytosol. Effectivement, les glutathion S-transférases végétales (GST) sont des enzymes essentiellement cytosoliques omniprésentes et multifonctionnelles, codées par de grandes familles de gènes. Ils constituent une grande famille de protéines qui utilisent le glutathion (GSH) tripeptidique comme cosubstrat ou coenzyme. Une fonction indirecte des GST est d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Hernández Estévez et Rodríguez Hernández, 2020).

En ce qui concerne les résultats obtenus avec les doses mixtes, l'ajout de faibles doses de Ni (120 ppb) et de Cd (100 ppb) aux fortes doses de Cd et de Ni respectivement, stimule davantage l'activité de la CAT dans les trois organes. Ceci renforce l'idée d'une activation plus importante des défenses antioxydantes de *P. australis face* à la présence d'un mélange ETM. Sous la dose

mixte de Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm), la présence de Cd (100 ppm) atténue légèrement l'activité de la CAT dans les trois organes par rapport au Ni (100 ppm) seul. Cette légère diminution pourrait s'expliquer par une compétition ou une interférence entre les deux ETMs au niveau de l'absorption dans les racines, entraînant ainsi une accumulation et une activité moindre de la CAT. Ces résultats expliquent parfaitement l'effet phytotoxique moins marqué de la dose mixte Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) sur la croissance des racines (RLI) que sous les doses individuelles respectives. Pour la GPOx sous les doses mixtes, pas de changement important dans l'activité comparé aux doses individuelles. Sous la dose de Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm), l'intensité de l'activité est dominée plus par l'action du Cd (100 ppm) que par celle du Ni (100 ppm). À l'inverse de ce qui a été observé pour la CAT, où l'activité mesurée reflétera majoritairement l'action stimulatrice du Ni (100 ppm).

Concernant l'activité de la GST, le profil d'activité était totalement différent que celui de la CAT et de la GPOx. La dose mixte de Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) diminue l'activité dans tous les organes comparativement aux doses simples qui la forment, sauf comparativement à la simple dose de Cd (100 ppm) où l'activité de la GST reste supérieure. Globalement, l'ajout de faibles doses de Ni atténue partiellement le stress induit par la forte dose de Cd et par conséquent, l'induction de la GST. L'ajout de faibles doses de Cd à une forte dose de Ni stimule la production de radicaux libres et augmente le stress, conduisant cette fois-ci à une augmentation marquée de l'activité de la GST.

Selon, Ahmad *et al.* (2017), l'exposition de la plante *Egeria densa* au Cd, Ni, Zn et Mn combinés, a augmenté l'activité des enzymes antioxydantes SOD et CAT. L'effet était plus marqué avec la mixture d'ETM : Cd + Ni, Ni + Zn, et Ni + Mn que lorsqu'ils étaient utilisés individuellement. La SOD a été stimulé par tous les ETMs, avec une augmentation moyenne de 20 %. L'effet sur la CAT était plus important avec les mixtures, sauf pour Mn + Cd et Mn + Cu. Chez *Solanum lycopersicum*, par rapport au groupe témoin, les plantes traitées au Cd présentaient des activités de la SOD significativement plus élevées, tandis que la CAT, l'APX et l'activités de la glutathion réductase (GR) ont été significativement inhibées par l'ajout de Cd. La supplémentation en Zn à faible niveau a restauré et amélioré l'activité fonctionnelle de ces enzymes (CAT, APX et GR), mais à forte dose, elle a augmenté le niveau des ERO et le stress oxydatif par rapport aux plantes traitées au Cd ou au Zn seul. L'auteur suggère que des concentrations plus élevées de Zn et de Cd ont un effet synergique sur les paramètres de croissance des plantes et sur le stress oxydatif (Cherif *et al.*, 2011). Par contre chez les plantes de *Grewia asiatica* exposées aux doses simples et combinées de Ni et/ou de Cd en utilisant 20, 40 et 60 ppm de NiSO₄ et Cd (NO₃)₂, l'activité de la SOD et du MDA était supérieure sous

Ni+Cd que sous le Cd et le Ni individuellement. En revanche, l'activité du CAT était supérieure sous Ni que sous Cd et Cd+Ni. Pour les Peroxydases (POD), l'activité était supérieure sous Cd que sous Ni et Cd+Ni.

Les observations issues de notre étude, ainsi que les informations disponibles dans la littérature scientifique, suggèrent que *P. australis* dispose d'un système de régulation face au stress oxydatif. Ce mécanisme semble être modulé par plusieurs facteurs. Il prend en compte non seulement la concentration et la nature spécifique des ETMs, mais s'adapte également en fonction de la vulnérabilité propre à chaque organe de la plante. Aussi, la durée pendant laquelle la plante est exposée à ces éléments joue également un rôle dans cette réponse adaptative.

5 Conclusion

L'étude des effets du Cd et/ou Ni sur la germination, la croissance précoce des plantules, et la réponse enzymatique antioxydante constitue un outil intéressant, non seulement elle permet d'estimer la tolérance des semis au stress oxydatif induit par le Cd et/ou le Ni, mais elle évalue également le potentiel de cette espèce à se propager et à se régénérer par reproduction sexuée dans les marais filtrants ou les habitats contaminés par Ni et Cd.

Les résultats indiquent que les graines de *P. australis* peuvent germer sous toutes les doses testées de Cd et/ou de Ni, qu'elles soient simples ou combinées. Cependant, à l'exception des faibles doses de Ni, un effet négatif du Cd et/ou du Ni sur la germination et la croissance précoce des plantules a été observé. De manière générale, l'inhibition des caractéristiques de germination s'est révélée être dose-dépendante, avec une réduction plus marquée de la germination et de la croissance précoce en présence des doses élevées de Cd et de Ni.

Les six indices de germination utilisées à savoir le pourcentage final de germination (GP%), le temps moyen de germination (MGT), le temps nécessaire pour atteindre 50 % de germination (T50%), l'indice de germination (IG), l'indice de longueur de la racine et de la racine (RLI), ainsi que l'indice de longueur des pousses (PLI) ont révélé que toutes les doses testées de Cd et/ou Ni, ont eu un impact négatif sur le taux et la vitesse de la germination des grains. À l'exception des faibles doses de Ni (30, 60 et 120 ppb) qui ont produit un effet légèrement positif sur le GP%, contrastant avec les effets inhibiteurs observés pour le Cd. L'inhibition et le retard de la germination par toutes les doses de Cd et les fortes doses de Ni peuvent être liés à la perturbation de la chaîne d'événements du métabolisme germinale. Un dysfonctionnement dans les processus physiologiques et biochimiques impliqués, comme l'imbibition, l'activité enzymatique, la respiration, ainsi que à la perturbation de la mobilité des nutriments stockés dans les tissus de l'endosperme. Concernant l'effets des doses mixtes, la toxicité est principalement due aux Cd ou Ni présents à fortes doses. En revanche, l'utilisation de doses équivalentes [Cd]=[Ni]=100 ppm montre un effet synergique négatif important de la mixture par rapport aux Cd et Ni seuls. Ce qui indique que la présence conjointe de Cd et de Ni, à doses égales, peut interférer davantage avec la mobilisation des réserves nutritives, une inhibition plus importante de voies enzymatiques ou engendrer une augmentation du stress oxydatif par une surproduction des espèces réactifs de l'oxygène (ERO).

Les valeurs des indices RLI et de PLI obtenues sous les doses simples et mixtes de Cd et Ni montrent une sensibilité différentielle de la croissance en longueur des racines et des pousses. Cette variation de sensibilité indique que la croissance des plantules dans des conditions de stress métallique dépend de l'ETM présent dans le milieu, de la dose, la durée

d'exposition et le stade de développement des plantules de *P. australis*.

Les mesures de l'indice de croissance en longueur des racines (RLI), effectuées après 10, 20 et 30 jours d'exposition à des doses simples de Cd et de Ni, ainsi qu'à des doses combinées, ont montré qu'après 10 et 20 jours, les faibles doses ne semblent pas affecter la croissance en longueur des racines d'une manière importante. Cependant, après 30 jours, un effet inhibiteur plus prononcé devient observable. Ces résultats suggèrent que les mécanismes de détoxification cellulaire des semis de *P. australis* parviennent initialement à compenser temporairement les effets toxiques des ERO et à minimiser l'effet toxique de ces faibles doses. Mais après 30 jours, il semble que ces mécanismes protecteurs soient dépassés, probablement une conséquence de l'augmentation de la concentration de Cd et Ni dans les cellules des racines. Concernant la croissance en longueur des pousses (PLI) après 10, 20 et 30 jours, les résultats montrent que l'effet du Cd et du Ni diffère. En effet, alors que les faibles doses de Cd ont un effet négativement significatif comparativement aux résultats dans le groupe témoin, les faibles doses de Ni semblent stimuler la croissance en longueur des pousses durant les trois périodes de croissance.

L'inhibition de la germination et de la croissance précoce des graines de *P. australis* sous l'effet des faibles doses de Cd (un élément hautement toxique), et la stimulation, bien que parfois non significative, sous les faibles doses de Ni (un élément essentiel à la croissance et au développement normal des plantes), révèlent la grande sensibilité du processus de germination des graines de *P. australis*.

À des doses élevées (100, 500 et 1000 ppm) de Cd et/ Ni, les résultats révèlent une inhibition significative de la croissance en longueur des racines et des pousses dès le dixième jour, illustrant l'effet phytotoxique aigu du Cd et du Ni. Ce phénomène est vraisemblablement lié à une perturbation de l'activité mitotique et à un stress oxydatif accru au niveau des méristèmes racinaires et caulinaire. L'analyse comparative entre l'effet de Cd et Ni sur la croissance en longueur des racines et des semis démontre que le Cd exerce un effet inhibiteur plus marqué que le Ni, même à des concentrations faibles.

La phytotoxicité de ces deux ETMs sur la croissance en longueur des plantules ne s'accroît pas systématiquement de manière significative avec l'augmentation des doses testées, particulièrement sous les doses de Ni. Cette constatation suggère que sous l'effet de fortes doses de Ni, les seuils de phytotoxicité sont rapidement atteints sans augmentation linéaire. Quant aux résultats enregistrés sous les doses mixtes : Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb), Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) et Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) dans les trois périodes de croissance (10, 20 et 30 jours) ; l'interaction entre les deux ETMs se manifeste par un effet antagoniste.

Il semblerait que ces doses aient entraîné une inhibition de la croissance en longueur des racines et des pousses moins importantes comparée aux hautes doses individuelles correspondantes. L'ajout de faibles doses de Ni (étant un élément bénéfique pour la nutrition) pourrait améliorer certains processus physiologiques chez *P. australis*, conduisant ainsi à une amélioration de la croissance en longueur des racines et des pousses. Ou cela pourrait être dû à un phénomène d'hormèse, où l'addition de faibles doses de Cd et de Ni a stimulé certains processus physiologiques bénéfiques pour la croissance. Ou encore d'une induction plus forte des systèmes de détoxification en présence des deux ETMs.

L'analyse des mécanismes de défense enzymatique antioxydante chez les semis de *P. australis* face au stress induit par différentes doses de Cd et de Ni, seuls ou en combinaison, révèle non seulement une grande sensibilité de la germination et de la croissance précoce à ces doses, mais aussi une réponse dynamique du système antioxydant.

Les résultats ont révélé des profils d'activité enzymatique variables, dépendant à la fois des doses testées et de l'organe végétal analysé. Sous les hautes doses simples de Cd et Ni ainsi que toutes les doses mixtes, l'activité de la catalase (CAT), la gaïacol peroxydase (GPOx) et la glutathion-S-transférase (GST) a été significativement stimulée dans tous les organes (feuilles, tiges, racines) comparativement au groupe contrôle. De manière générale, un effet dose-réponse positif a été observé pour ces trois enzymes.

Sous les faibles doses de Ni, aucune différence significative n'a été observée par rapport aux témoins. En revanche, une stimulation de l'activité enzymatique, variable selon l'enzyme et l'organe, a été notée sous les faibles doses de Cd, confirmant ainsi la sensibilité des plantules de *P. australis* à ce ETM toxique.

Les hautes doses de Cd, de Ni et de leur combinaison (Cd+Ni) ont induit un stress oxydatif chez les plantules de *P. australis*. Pour se protéger contre ce stress et neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (ERO), qui peuvent altérer la synthèse des protéines, des lipides et d'autres fonctions cellulaires, les plantules ont mis en place un système de défense impliquant la biosynthèse de la CAT, de la GPOx et de la GST. Cependant, une variabilité de réponse inter-organe et selon l'ETMs a été observée.

L'induction de l'activité de CAT, GPOx, GST n'était pas uniforme. Il y a eu des différences quantitatives dans l'induction selon l'organe (feuilles, tiges, racines) et l'ETMs utilisé (Cd, Ni, Cd+Ni). Nos résultats montrent que l'induction de l'activité de la CAT, GPOx, GST par le Cd, le Ni et le Cd+Ni était plus élevée dans les racines que dans les feuilles et les tiges, suivant l'ordre : Racine > Feuille > Tige. Cette stimulation d'activité dans les racines est due au fait que celles-ci constituent le premier site d'interaction et d'absorption du Cd et du

Ni présents dans le milieu. En outre, *P. australis* est considérée comme une plante dite « excluser » car elle accumule préférentiellement le Cd et le Ni dans ses parties souterraines plutôt que dans ses parties aériennes (tiges, feuilles). En conséquence, les racines subissent des niveaux d'exposition beaucoup plus élevés que les autres organes.

Concernant la variabilité de l'induction de l'activité de CAT, GPOx, GST entre les ETMs testés dans les trois organes, nos résultats montrent que l'activité de GPOx sous Cd est supérieure > à celle sous Ni. En revanche, l'activité de CAT sous Cd est inférieure < à celle sous Ni. Quant à l'activité de GST sous Cd, elle était proche de celle sous Ni, sauf dans les racines où GST sous Cd est inférieure < à GST sous Ni.

La variabilité des réponses enzymatiques de CAT, de la GPOx et de la GST reflète les différences dans les mécanismes d'action phytotoxique du Cd et du Ni. Ces deux ETMs semblent induire un stress oxydatif via des voies distinctes, nécessitant des réponses antioxydantes spécifiques et adaptées chez *P. australis*. La CAT, la GPOx et la GST semblent jouer des rôles complémentaires mais différents dans la détoxification du Cd et/ou du Ni, contribuant ainsi à la gestion du stress oxydatif induit par ces ETMs.

Chapitre II : Phytoépuration des eaux contaminées par le Cadmium et/ou le Nickel

1 Matériel et méthodes

Après avoir évalué l'effet de différentes doses simples et combinées de Cd et/ou de Ni sur la germination des graines de *Phragmites australis*. Ce deuxième chapitre se concentre sur le comportement et la capacité de cette espèce à se régénérer à partir des rhizomes dans un système expérimental de lagunage à macrophytes ; en analysant les effets du Cd et/ou du Ni sur le débourrement des nœuds des rhizomes et la néoformation de jeunes plants (reproduction végétative), ainsi que l'accumulation de Cd et Ni dans les plantes régénérées. Enfin, la capacité du système épuratoire est mesurée en analysant les concentrations de Cd et de Ni dans les eaux en sortie du système après phytoépuration.

1.1 Matériel végétal

Notre choix s'est porté sur *Phragmites australis* pour l'utilisation dans un système de lagunage à macrophytes, en raison de plusieurs avantages qu'elle présente par rapport à d'autres plantes. Elle se caractérise par une croissance vigoureuse, ainsi qu'un large intervalle de tolérance à la salinité, à la température, conditions hydrologiques et aux ETMs, ainsi qu'une capacité d'accumulation d'ETMs tels que le Cd, Cu, Ni, Pb et le Zn. De plus, étant une plante cosmopolite, elle possède la capacité de s'adapter à différentes conditions climatiques. Les rhizomes de *P. australis* utilisée dans notre étude ont été obtenus à partir d'une population naturelle croissante sur les berges du barrage de Babar-Khenchela (35°10'31.1"N et 7°01'15.4"E) dans le nord-est de l'Algérie. Aucun ETM ou polluant organique n'a été signalé dans les eaux du barrage. Les rhizomes ont été sélectionnés en fonction de critères morphologiques les plus homogènes possibles (diamètre et longueur et poids) et chaque rhizome contient entre 5 et 6 nœuds consécutifs.

1.2 Dispositif expérimental et conditions de culture

Notre dispositif expérimental a été installé dans la wilaya de Tébessa au début de la période de printemps, pendant 24 semaines à deux reprises (deux périodes distinctes) : du 20-03-2018 au 04-09-2018 et du 22-03-2019 au 06-09-2019.

Le système de lagunage à macrophyte est constitué de 30 bacs, chaque bac ayant une capacité de 50 litres avec un diamètre de 70 cm (\varnothing 70 cm) (Fig. 19). Pour évaluer l'efficacité du marais filtrant expérimental dans l'épuration des eaux contaminées par du Cd et/ou Ni, nous avons choisi d'utiliser 3 doses simples de Cd, 3 doses simples de Ni et 3 doses combinées ou mixtes :

- Contrôle : Eau plus solution nutritive de Hoagland.
- Cd : $Cd_{(1000\text{ ppm})} / Cd_{(100\text{ ppm})} / Cd_{(100\text{ ppb})}$ (0.1 ppm).
- Ni : $Ni_{(1000\text{ ppm})} / Ni_{(100\text{ ppm})} / Ni_{(120\text{ ppb})}$ (0.12 ppm).
- Cd + Ni : $Cd_{(1000\text{ ppm})} + Ni_{(120\text{ ppb})} / Cd_{(100\text{ ppm})} + Ni_{(100\text{ ppm})} / Cd_{(100\text{ ppb})} + Ni_{(1000\text{ ppm})}$.

Les doses ont été sélectionnées afin de reproduire les divers scénarios des quantités de Cd et de Ni que peut recevoir un système de phytoépuration. Les doses faibles (Cd = 100 ppb et Ni = 120 ppb) pourraient représenter une exposition naturelle de fond présente dans les eaux non polluées. La dose (Cd ou Ni = 100 ppm) pourrait provenir d'eaux usées contaminées par des activités agricoles ou industrielles. La dose élevée (1000 ppm) représenterait une situation de pollution extrême de l'eau.

Le chlorure de cadmium ($CdCl_2$) ($CdCl_2, H_2O$: 98 % of purity, Merck chemicals) et le chlorure de nickel ($NiCl_2$) ($NiCl_2, 5H_2O$: 98.8 % of purity, Merck chemicals) ont été sélectionnés pour préparer les doses à utiliser en raison de leur grande solubilité et phytodisponibilité.

Les doses de Cd et de Ni utilisées dans notre expérimentation ont été analysées après la préparation par la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif NexION® 300D (ICp-MS : perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA). Les résultats étaient les suivants :

- $Cd_{(100\text{ ppb})} = 100 \pm 1,8$; $Cd_{(100\text{ ppm})} = 100 \pm 6,73$; et $Cd_{(1000\text{ ppm})} = 1000 \pm 6,02$ (n = 4).
- $Ni_{(120\text{ ppb})} = 120 \pm 2,15$; $Ni_{(100\text{ ppm})} = 100 \pm 2,60$; et $Ni_{(1000\text{ ppm})} = 1000 \pm 3,02$ (n = 4).

Le type de marais filtrant utilisé dans notre étude est un marais filtrant à écoulement surfacique à trois étages. Dans chaque étage et bac, l'eau séjourne pendant 8 semaines avant d'être transférée à l'étage suivant (Fig. 18).

Cinq (05) rhizomes, chacun ayant de 5 à 6 nœuds, ont été placés dans chaque bac de chaque étage après chaque 8 semaines comme suit :

- Dans le 1er étage (semaine 1 à 8) à deux reprises : du 20-03-2018 au 15-05-2018 et du 22-03-2019 au 17-05-2019.
- Dans le 2ème étage, (semaine 9 à 16) à deux reprises : du 16-05-2018 au 10-07-2018 et du 18-05-2019 au 13-07-2019.
- Dans le 3ème étage, (semaine 17 à 24) à deux reprises : du 11-07-2018 au 04-09-2018 et du 14-07-2019 au 08-09-2019.

En guise de substrat ou de support pour les plantes et les racines, un double filet avec des mailles de $\varnothing=0,5$ cm de diamètre a été déposé au fond et également à la surface des bacs.

Dans chaque bac, nous avons submergé les rhizomes avec 15 cm (8 litres) d'eau contaminée par du Cd et/ou du Ni, contenant une solution hydroponique nutritive de Hoagland (Basal Salt Mixture : Sigma-Aldrich, Cat. no : H2395):

$(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ (115.03 mg l^{-1}), H_3BO_3 (2.86 mg l^{-1}), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (656.4 mg l^{-1}), CuSO_4 (0.08 mg l^{-1}), $\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$ (5.32 mg l^{-1}), MgSO_4 (240.76 mg l^{-1}), MnCl_2 (1.81 mg l^{-1}), MoO_3 (0.016 mg l^{-1}), KNO_3 (606.6 mg l^{-1}), ZnSO_4 (0.22 mg l^{-1}).

Nous avons dilué la solution nutritive (1/4), ce qui est la mieux adaptée pour les plantes à faibles besoins en éléments nutritifs, telles que les macrophytes (Hoagland et Arnon, 1950). Le pH de la solution nutritive diluer 1/4 utiliser dans notre expérimentation était $\approx 6,2$ à 23°C .

Le marais filtrant que nous avons mis en place inclut une faible pente de 5 % pour garantir que l'eau s'écoule par gravitation lentement et uniformément. Le marais filtrant a été placé sous un abri en polyéthylène transparent, érigé à une hauteur de 3 mètres pour minimiser l'impact des précipitations sur l'apport en eau. Pour maintenir une concentration constante des doses utilisées, nous avons évalué l'évaporation et compensé les pertes en eau en ajoutant de l'eau chaque 3- 4 jours.

La zone où nous avons installé notre marais filtrant expérimental ($35^\circ 24' 18.82''\text{N}$ et $8^\circ 3' 58.11''\text{E}$) se trouve dans la wilaya de Tébessa, caractérisée par un climat de type méditerranéen semi-aride, avec des étés chauds et secs de juin à août, et des hivers doux avec peu de pluie. Selon les données de la station météorologique de la wilaya de Tébessa (1972-2016), la température annuelle moyenne était de $15,87^\circ\text{C}$, et la pluviométrie annuelle moyenne s'élevait à 353,41 mm. Les mois les plus humides sont septembre, mars, avril et mai, avec respectivement 38,46 mm, 35,949 mm, 36,378 mm et 36,088 mm de précipitations. En revanche, le mois le plus sec est juillet, enregistrant seulement 14,17 mm de pluie. Les températures qui ont accompagné l'installation du marais filtrant, le débourrement des nœuds des rhizomes et la croissance des plantules sont résumées dans le tableau 15 (la station météorologique de la wilaya de Tébessa).

Tab.15 : Moyennes périodiques des températures enregistrées au cours de l'expérimentation

Etages du marais filtrant	Moyenne T °C	
	Du 20-03-2018 au 04-09-2018	Du 22-03-2019 au 06-09-2019
Etage 1 (semaine : 1-8)	14,49	13,28
Etage 2 (semaine : 9-16)	23,54	24,42
Etage 3 (semaine : 17-24)	28,73	26,62

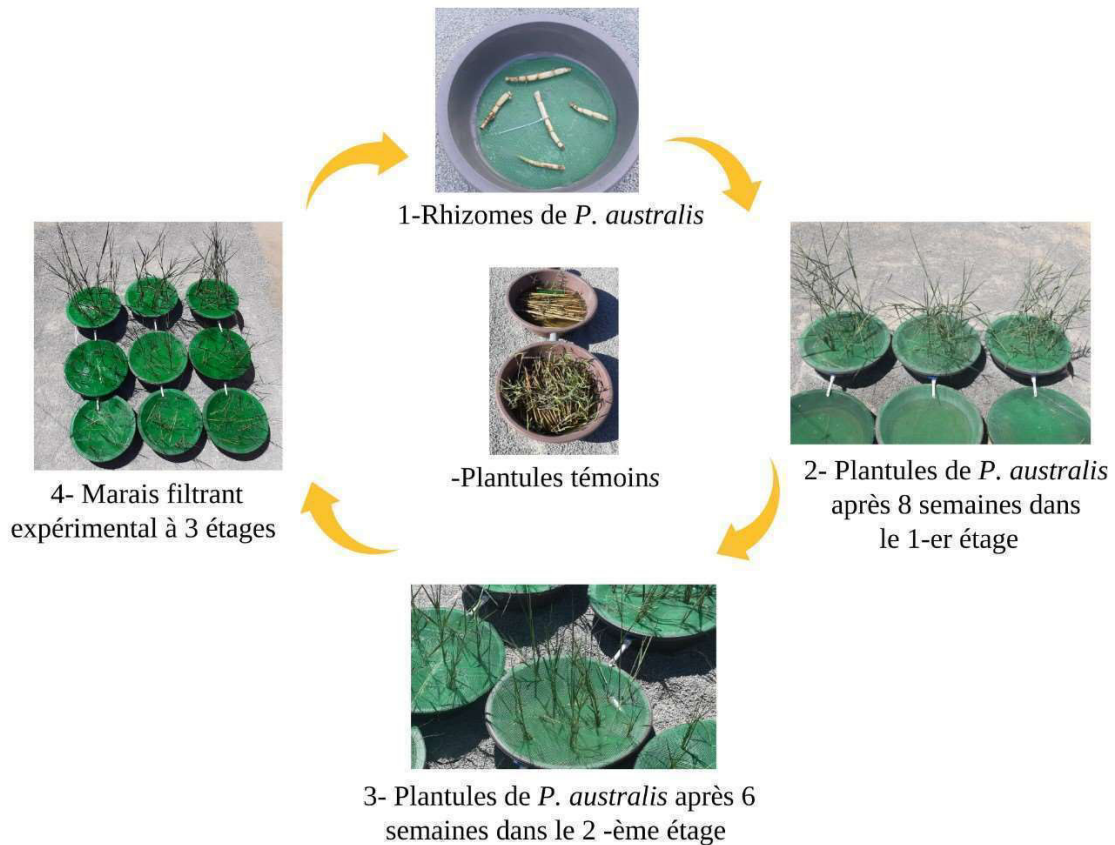
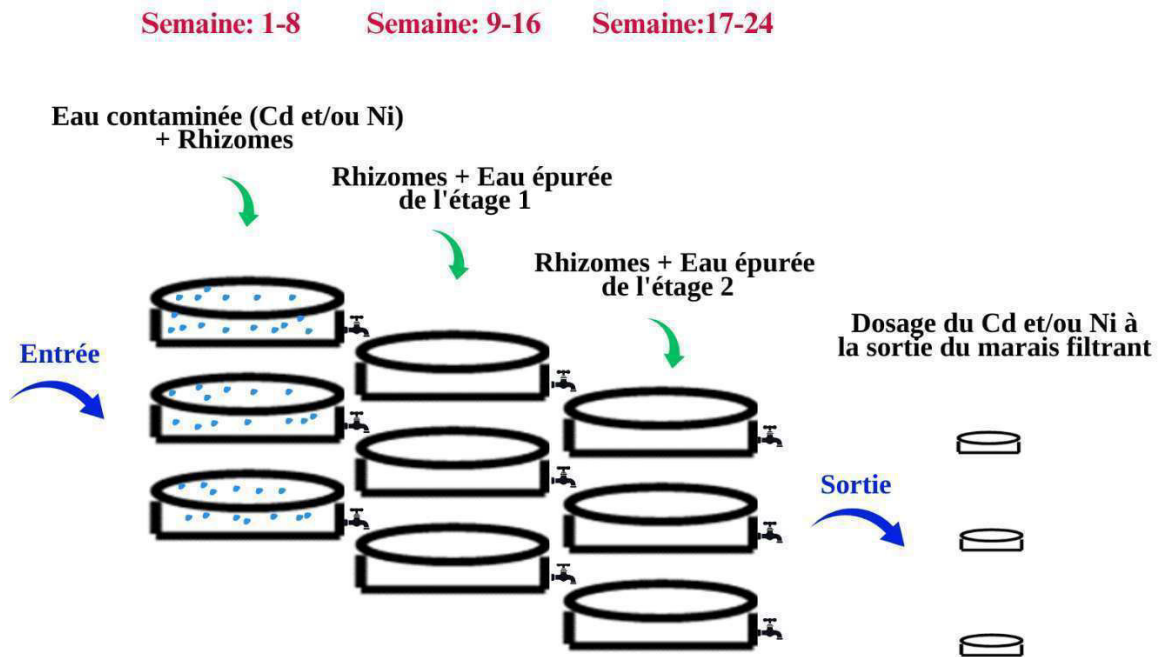


Fig. 19 : Système de lagunage à macrophytes avec marais filtrant à écoulement surfacique en trois étages (*L'eau polluée par le Cd et/ou le Ni séjourne pendant 8 semaines avant d'être transférée à l'étage suivant*).

1.3 Taux de plantules néoformées dans le marais filtrant

Afin d'analyser l'efficacité de ce système de lagunage et les effets du Cd et/ou du Ni sur la néoformation de nouvelles plantules. Les plantules néoformées après le débourrement des nœuds (5 et 6 nœuds consécutifs par rhizome : 27-28 nœuds par traitement) ont été dénombrées dans les 30 bacs pendant 8 semaines (56 jours), répartis-en : 3 étages de contrôle, 3 étages et doses de Cd, 3 étages et doses de Ni et 3 étages et doses mixtes de Cd et Ni.

L'eau contaminée et les plantules néoformées ont séjourné dans l'étage 1 pendant les semaines 1 à 8, dans l'étage 2 de la semaine 9 à 16, et dans l'étage 3 de la semaine 17 à 24 de l'expérimentation. Les données de dénombrement ont ensuite été soumises à une analyse statistique pour évaluer toute variation significative entre les groupes.

1.4 Dosage du cadmium et du nickel

L'optimisation du protocole et le dosage du Cd et du Ni à la sortie du marais filtrant et dans les plantes de *P. australis* ont été réalisés à l'École de médecine et des sciences biomédicales (ICBAS) de l'Université de Porto, Portugal, ainsi qu'au laboratoire G.F. Ingrassia de l'Université de Catane, Italie.

1.4.1 Dosage du Cd et du Ni à la sortie du marais filtrant

Les eaux récupérées à la sortie du marais filtrant expérimental ont été analysées pour quantifier les deux ETMs par la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS : Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) NexION® 300D. Pour la quantification des deux ETMs, la digestion acide (5 ml d'HNO₃ à 65 %) a été effectuée dans un système de digestion DigiPrep à 120 °C pour un cycle de 120 min.

1.4.2 Dosage du Cd et du Ni dans les plantes

Un (01) g de la partie aérienne et racinaire de chaque traitement de chaque étage a été prélevé et déposé dans des tubes de digestion. Huit (8) ml de HNO₃ (65 %) et 1 ml de H₂O₂ (30 %) ont été ajoutés, et le tout a ensuite été digéré à 85 °C pendant 120 minutes à l'aide d'un système de digestion DigiPrep. La solution dans les tubes a ensuite été diluée avec de l'eau MilliQ® jusqu'à un volume final de 50 ml. Ensuite, le tout a été filtré en utilisant des filtres seringue en nitrocellulose (0,45 µm). La détection et la quantification des Cd et Ni ont été réalisées par La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) (NexION® 300D: perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA), en suivant la méthode EPA 6020, en utilisant Yttrium (Y) et Rhénium (Re) comme étalons.

1.5 Spéciation chimique du Cd et du Ni dans le marais filtrant

Pour avoir une idée de la spéciation chimique des ETMs et de la phytodisponibilité des doses utilisées dans notre expérimentation, nous avons utilisé le logiciel PHREEQC (Version 2.0) pour prédire la spéciation de CdCl_2 et/ou NiCl_2 . Les paramètres d'entrée du modèle comprenaient les variations de la température ambiante, du pH des eaux contaminées, et de la concentration de Ni et/ou Cd mesurées à l'entrée et à la sortie de chaque étage, ainsi que la solution nutritive de Hoagland, en supposant que la composition de celle-ci reste plus ou moins constante dans chaque étage (avec l'utilisation d'une dilution de $\frac{1}{4}$). Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) des différentes espèces chimiques de Cd et Ni.

2 Analyse statistique.

Un dispositif en split-plot a été utilisé pour l'analyse des résultats. Le taux de néoformation sous chaque dose de Cd et/ou de Ni, y compris pour le groupe témoin dans chaque étage, ainsi que le taux global de néoformation de nouvelles plantules dans les trois étages (étage 1 + étage 2 + étage 3), ont été exprimés sous forme de moyennes de deux répétitions ou expériences indépendantes (\pm écart type). Une analyse de variance (ANOVA) à deux facteurs (étage et dose d'ETM) a été réalisée avec un seuil de signification $p \leq 0,05$ pour tester les différences significatives entre les valeurs moyennes obtenues dans chaque étage du marais filtrant.

La quantité de Cd et de Ni éliminée par étage du marais filtrant a été exprimée sous forme de moyennes de deux répétitions indépendantes (\pm écart type). Une analyse de variance à un seul facteur (étage) a été réalisée pour chaque dose, avec un seuil de signification $p \leq 0,05$.

Les résultats du dosage du Cd et du Ni dans la partie aérienne (feuilles et tiges) ainsi que dans la partie souterraine des plantes ont fait l'objet d'une analyse de variance à un facteur (étage), avec un seuil de signification fixé à $p \leq 0,05$.

Tous les résultats significatifs obtenus par l'analyse ANOVA ont été suivis de comparaisons des moyennes réalisées à l'aide du test de Tukey, qui permet d'effectuer des comparaisons multiples. Si $p \leq \alpha$ (avec $\alpha = 0,05$), cela indique des différences significatives entre les moyennes, entraînant le rejet de l'hypothèse d'égalité.

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel IBM SPSS version 25 (SPSS Inc. 2011). Enfin, pour une meilleure visualisation des résultats, des histogrammes ont été réalisés avec les logiciels R.

3 Résultats

3.1 Taux total de plantules néoformées dans le marais filtrant

La figure (20) illustre les variations du taux de la néoformation de nouvelles plantules de *P. australis* dans le marais filtrant (moyenne des trois étages) en fonction des différentes doses de Cd et/ou de Ni. Globalement, les résultats indiquent que la formation de nouvelles plantules diminuent à mesure que les doses de Cd et/ou de Ni augmentent. L'ANOVA à deux facteurs : étage et dose d'ETM, a révélé des effets significatifs du facteur étage ($F_{2,30} = 4,21$; $p = 0,02 < 0,05$), ainsi que pour le facteur dose ($F_{9,30} = 66,56$; $p = 0,000 < 0,05$), par contre l'interaction étage x dose, n'a pas révélé d'effet significatif sur la néoformation des plantules ($F_{18,30} = 0,54$; $p = 0,91 > 0,05$). La comparaison des taux de néoformation avec celui du groupe témoin (Moy des 3 étages : 69.33%), en utilisant le test de comparaisons multiples de Tukey a révélé un effet négatif significatif pour toutes les doses utilisés, à l'exception des doses de Cd_(100 ppb) et Ni_(120 ppb), où nous avons enregistré les taux les plus élevés 70% et 68,67%, respectivement. Les taux les plus bas ont été enregistrés dans sous Cd_(1000 ppm), Ni_(1000 ppm), Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) et Ni_(1000 ppm) + Cd_(100 ppb). Quant au taux de néoformation sous les doses individuelles et combinées de Cd_(100 ppm) et/ou Ni_(100 ppm), les résultats ont mis en évidence des différences significatives tant entre elles qu'avec le groupe témoin. De plus, l'effet combiné de Cd et Ni semble avoir un effet moins prononcé sur la néoformation que les doses individuelles Cd_(100 ppm) et Ni_(100 ppm).

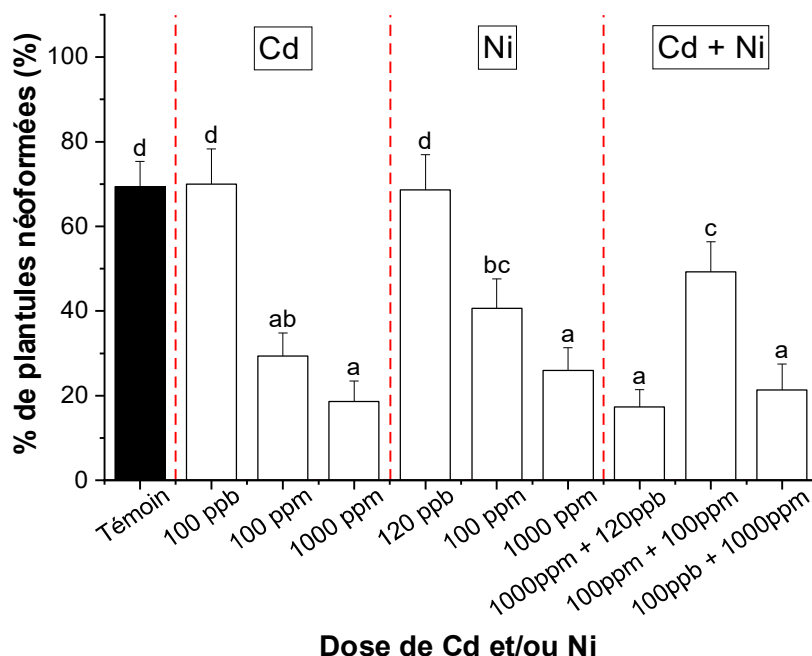


Fig. 20 : Taux de néoformation de plantules de *P. australis* dans les trois étages du marais filtrant en fonction des différentes doses de Cd et/ou de Ni. Les valeurs représentent les moyennes ($\pm Sd$) de 2 répétitions indépendantes et ceux avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).

3.2 Taux de plantules néoformées sous le Cd dans les étages du marais filtrant

Les taux de néoformation de nouvelles plantules de *P. australis* dans chaque étage du marais filtrant et sous les différentes doses de Cd sont présentés dans la figure (21). L'analyse des effets de chaque dose de Cd sur le taux de néoformation révèle une similitude marquée des résultats obtenus dans les trois étages des bacs témoins, contenant la solution hydroponique de base, et de ceux supplémentés avec Cd_(100 ppb). Nous avons enregistré respectivement 68 %, 72 % et 68 % dans les étages (1), (2) et (3) des bacs témoins, et 70 % dans tous les étages des bacs avec Cd_(100ppb).

Dans les bacs contenant Cd_(100 ppm) et Cd_(1000 ppm), où le taux de néoformation est notablement réduit (de 16 % à 34 %) comparativement au groupe control, l'émergence des plantules a généralement augmenté de l'étage 1 à l'étage 3. Cependant, l'analyse de variance pour le facteur étage de chaque dose a indiqué que cette augmentation n'était pas statistiquement significative entre les trois étages ; Cd_(100ppm) ($F_{2,3} = 3,17$; $p = 0,18 > 0,05$) et Cd_(1000 ppm) ($F_{2,3} = 4$; $p = 0,14 > 0,05$), Groupe témoin ($F_{2,3} = 0,20$; $p = 0,83 > 0,05$).

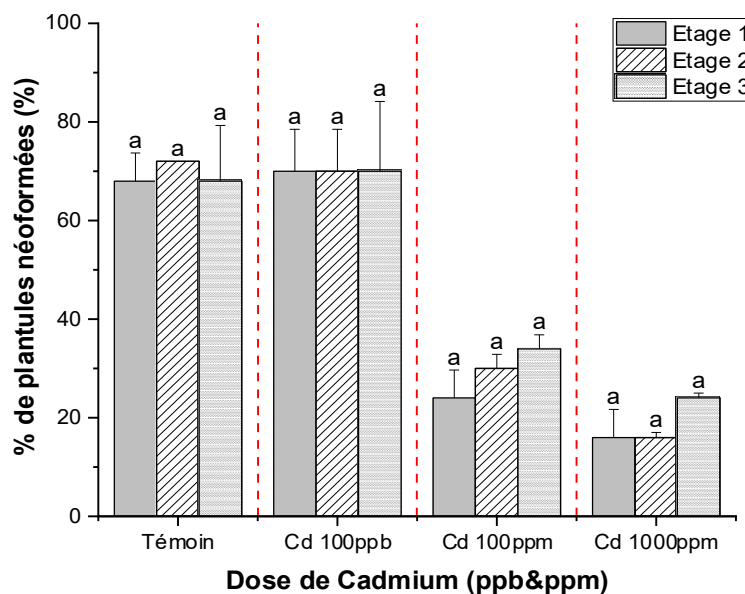


Fig. 21 : Taux de néoformation des plantules de *P. australis* selon l'étage du marais filtrant et les doses simples de Cd. Les valeurs représentent les moyennes ($\pm Sd$) de 2 répétitions indépendantes, et celles avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).

3.3 Taux de plantules néoformées sous le Ni dans les étages du marais filtrant

La figure (22) présente les taux de néoformation de nouvelles plantules de *P. australis* par étage du marais filtrant sous différentes doses de Ni.

La figure met en évidence que la formation de nouvelles plantules à partir de rhizomes est dose-dépendant. L'effet négatif sur l'émergence des plantules s'accroît à mesure que la dose augmente, particulièrement dans les eaux avec Ni_(100ppm) et Ni_(1000ppm), où nous avons enregistré respectivement 34 %, 42 % et 46 % sous Ni_(100ppm) et 22 %, 26 % et 30 % sous Ni_(1000ppm) dans les étages 1, 2 et 3.

L'analyse de variance a révélé que le facteur « étage » n'a pas d'effet significatif sur la néoformation pour toutes les doses : Groupe témoin ($F_{2,3} = 0,20$; $p = 0,83 > 0,05$), Ni_(120ppb) ($F_{2,3} = 0,59$; $p = 0,94 > 0,05$), Ni_(100ppm) ($F_{2,3} = 2,55$; $p = 0,23 > 0,05$) et aussi Ni_(1000ppm) ($F_{2,3} = 0,34$; $p = 0,73 > 0,05$).

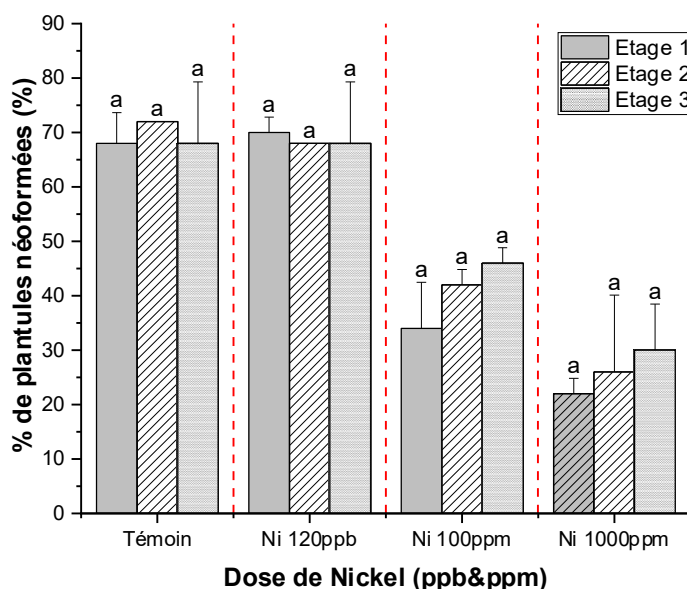


Fig. 22 : Taux de néoformation des plantules de *P. australis* selon l'étage du marais filtrant et les doses simples de Ni. Les valeurs représentent les moyennes ($\pm Sd$) de 2 répétitions indépendantes, et celles avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).

3.4 Taux de plantules néoformées sous les doses mixtes

Le taux de néoformation de nouvelles plantules de *P. australis* par étage du marais filtrant sous les différentes doses combinées de Cd et Ni est présenté par la figure (23).

Sous les doses combinées de Cd et de Ni, les résultats indiquent que dans le 3^{ème} étage du marais filtrant, on enregistre toujours les taux de néoformation les plus élevés. Nous avons enregistré 20 % dans les bacs avec Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm), 24 % dans les bacs avec Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) et 58 % dans les bacs avec la dose mixte Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm).

Contrairement à ce qui a été observé sous Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm), où le taux augmente en passant de l'étage (1) à l'étage (3), le taux était identique dans les étages (1) et (2) sous Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb), ainsi que sous Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm).

L'analyse de variance pour le facteur étage pour chaque dose mixte (Ni + Cd) a révélé que les différences entre les taux de néoformation dans les étages (1), (2) et (3) ne sont pas significatives sous Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) ($F_{2,3} = 0,50$; $p = 0,65 > 0,05$), ainsi que sous Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) ($F_{2,3} = 0,2$; $p = 0,83 > 0,05$). En revanche, sous Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) ($F_{2,3} = 16$; $p = 0,025 < 0,05$), les différences ont été statistiquement différentes, où nous avons enregistré 42 %, 50 % et 58 % dans les étages (1), (2) et (3), respectivement.

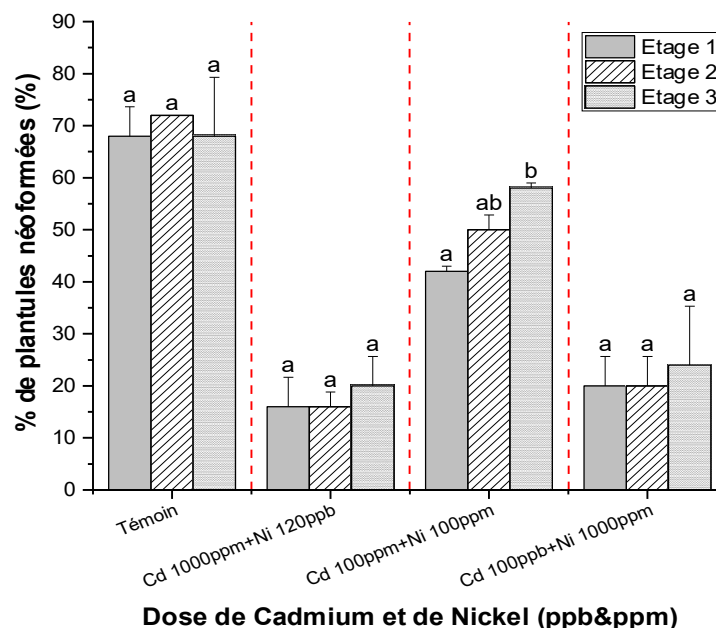


Fig. 23 : Taux de néoformation des plantules de *P. australis* selon l'étage du marais filtrant et les doses combinées de Cd + Ni. Les valeurs représentent les moyennes ($\pm Sd$) de 2 répétitions indépendantes, et celles avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).

3.5 Dosage du Cd et du Ni dans les eaux des étages du marais filtrant

3.5.1 Dosage du Cadmium

La quantité de cadmium mesurée à la sortie de chaque étage du marais filtrant, ainsi que la quantité éliminée sous des doses simples et combinées de Cd avec Ni, sont récapitulées dans les tableaux (16) et (17).

Dans les bacs avec les doses simples de Cd (Tab. 16), les résultats révèlent une diminution progressive de la quantité de Cd dans les eaux à chaque étage. Cependant, sous $Cd_{(100ppb)}$, aucune quantité de Cd n'a été détectée à la sortie de l'étage (1).

L'analyse de variance (un seul facteur : étage) pour chaque dose a montré que les différences entre les quantités éliminées dans les bacs sous $Cd_{(100ppm)}$ dans les trois étages n'ont pas été statistiquement différentes ($F_{2,9} = 2,34$; $p = 0,15 > 0,05$). Cependant, sous $Cd_{(1000ppm)}$, les différences sont significatives ($F_{2,9} = 7,98$; $p = 0,010 < 0,05$), où seulement 25.03% des 1000 ppm mis à l'entrée du marais filtrant ont été éliminés.

En ce qui concerne les résultats sous des doses combinées de Cd + Ni (Tab.17), les résultats étaient similaires à ceux enregistrés sous les doses simples de Cd, où la quantité de Cd diminue au fur et à mesure à la sortie de chaque étage. De plus, la proportion de Cd éliminée augmente en passant de l'étage (1) à l'étage (3).

Sous la dose mixte de $Cd_{(100ppb)} + Ni_{(100ppm)}$ aucune quantité de Cd n'a été détectée dans les eaux à la sortie de l'étage (1). L'analyse de variance inter-étage pour chaque dose combinée a révélé que les différences entre les quantités éliminées dans les bacs sous $Cd_{(100ppm)} + Ni_{(100ppm)}$ ne sont pas statistiquement différentes ($F_{2,9} = 0,28$; $p = 0,76 > 0,05$), où nous avons enregistré respectivement 13,71 ppm, 13,52 et 19,86 ppm.

Quant aux bacs avec la dose combinée de $Cd_{(1000ppm)} + Ni_{(120ppb)}$, seules les différences entre les quantités éliminées à l'étage (1) et (2) ne sont pas significativement distinctes, où nous avons enregistré respectivement 65,5 ppm et 70,80 ppm ($F_{2,9} = 21,75$; $p = 0,0004 < 0,05$).

Tab. 16 : Quantités de Cd mesurées et éliminées à la sortie des étages du marais filtrant selon les différentes doses de Cd testées. *Les valeurs avec des lettres différentes dans une ligne sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs représentent les moyennes (\pm SD) de 2 expériences indépendantes et 2 répétitions. Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).*

Etage [Cd] À la sortie de l'étage	Etage 1		Etage 2		Etage 3		% Total de Cd éliminé
	[Cd] dans l'eau (ppm)	[Cd] éliminé	[Cd] dans l'eau (ppm)	[Cd] éliminé	[Cd] dans l'eau (ppm)	[Cd] éliminé	
Contrôle	0	-	0	-	0	-	0
Cd (100 ppb)	0	0,10	0	-	0	-	100%
Cd (100 ppm)	87,20 \pm 5,40	12,8 ^a	63,46 \pm 2,61	15,74 ^a	40,63 \pm 1,79 ^a	18,33 ^a	59,37%
Cd (1000ppm)	927,66 \pm 4,94	72,34 ^a	847,5 \pm 3,11	80,16 ^{ab}	749,73 \pm 7,05	87,27 ^b	25.03%

Tab. 17 : Quantités de Cd mesurées et éliminées à la sortie des étages du marais filtrant selon les différentes doses mixtes testées. *Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs représentent les moyennes (\pm SD) de 2 expériences indépendantes et 2 répétitions. Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).*

Etage [Cd] À la sortie de l'étage	Etage 1		Etage 2		Etage 3		% Total de Cd éliminé
	[Cd] dans l'eau (ppm)	[Cd] éliminé	[Cd] dans l'eau (ppm)	[Cd] éliminé	[Cd] dans l'eau (ppm)	[Cd] éliminé	
Contrôle	0	-	0	-	0	-	0
Cd (100 ppb) & Ni (1000 ppm)	0	0,10	0	-	0	-	100%
Cd (100 ppm) & Ni (100 ppm)	86,29 \pm 5,00	13,71 ^a	67,77 \pm 1,47	13,52 ^a	47,91 \pm 2,71	19,86 ^a	52,09%
Cd (1000ppm) & Ni (120 ppb)	934,50 \pm 4,54	65,5 ^a	863,7 \pm 6,8	70,8 ^a	770,33 \pm 7,34	93,37 ^b	22,97%

3.5.2 Dosage du Nickel

La quantité de Ni mesurée dans les eaux à la sortie des trois étages du marais filtrant, ainsi que la quantité éliminée (Tab. 18), montrent que quelle que soit la dose utilisée, la quantité de Ni à la sortie des étages diminue en allant de l'étage (1) à (3).

Pour les bacs avec la dose la plus faible Ni_(120ppb), pas de Ni détecté dans les trois étages. Quant aux doses de Ni_(100ppm) et Ni_(1000ppm), la quantité éliminée par étage était similaire et statistiquement non différente : 16,8 ppm dans l'étage (1), 16,67 ppm pour l'étage (2), et 14,79 ppm dans les eaux à la sortie de l'étage (3) ($F_{2,9} = 0,77$; $p = 0,49 > 0,05$). La même tendance a également été observée sous Ni_(1000 ppm), bien que les différences entre les valeurs soient plus

importantes. Nous avons enregistré 120 ppm à la sortie de l'étage (1), 129,59 et 127,37 ppm dans les étages (2) et (3) respectivement ($F_{2,9} = 3,38$; $p = 0,08 > 0,05$).

Les résultats de la quantité de Ni mesurée dans les eaux des bacs qui contiennent des doses mixtes de Cd et Ni (Tab. 19), montrent que les valeurs sont très proches de celles enregistrées sous les doses individuelles de Ni. Cependant, la tendance des quantités éliminées est haussière, allant de l'étage (1) vers l'étage (3). Cette hausse des valeurs inter-étages reste non significative sous $Cd_{(100\text{ ppm})} + Ni_{(100\text{ ppm})}$ ($F_{2,9} = 3,97$; $p = 0,058 > 0,05$). Pour la dose combinée $Cd_{(1000\text{ ppm})} + Ni_{(120\text{ ppb})}$, il est évident que le système de phytoépuration dans les étages (2) et (3) était plus performant que celui de l'étage (1). L'analyse de variance et le test post-hoc de Tukey ont révélé la présence de différences significatives entre les quantités éliminées dans les étages (2) et (3) par rapport à celui de l'étage (1) ($F_{2,9} = 14,39$; $p = 0,02 < 0,05$).

Tab. 18 : Quantités de Ni mesurées et éliminées à la sortie des étages du marais filtrant selon les différentes doses de Ni testées. *Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs représentent les moyennes ($\pm Sd$) de 2 répétitions de deux expériences indépendantes. Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).*

Etage [Ni] À la sortie de l'étage	Etage 1		Etage 2		Etage 3		% Total de Ni éliminé
	[Ni] dans l'eau (ppm)	[Ni] éliminé	[Ni] dans l'eau (ppm)	[Ni] éliminé	[Ni] dans l'eau (ppm)	[Ni] éliminé	
Contrôle	0	-	0	-	0	-	0
Ni (120 ppb)	0	0,12	0	-	0	-	100%
Ni (100 ppm)	83,20 \pm 2,58	16,8 ^a	66,52 \pm 1,17	16,67 ^a	51,73 \pm 3,43	14,79 ^a	48,27%
Ni (1000 ppm)	879,96 \pm 6,28	120,04 ^a	750,37 \pm 5,72	129,59 ^a	623 \pm 4,08	127,37 ^a	37,7%

Tab. 19 : Quantités de Ni mesurées et éliminées à la sortie des étages du marais filtrant selon les différentes doses mixtes testées. *Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs représentent les moyennes ($\pm Sd$) de 2 répétitions indépendantes, les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).*

Etage [Ni] À la sortie de l'étage	Etage 1		Etage 2		Etage 3		% Total de Ni éliminé
	[Ni] dans l'eau (ppm)	[Ni] éliminé	[Ni] dans l'eau (ppm)	[Ni] éliminé	[Ni] dans l'eau (ppm)	[Ni] éliminé	
Contrôle	0	-	0	-	0	-	0
Cd (1000ppm) & Ni (120 ppb)	0	0,12	0	-	0	-	100%
Cd (100 ppm) & Ni (100 ppm)	82,10 \pm 3,46	17,90 ^a	59,96 \pm 1,15	22,14 ^a	36,3 \pm 3,65	23,62 ^a	63,70%
Cd (100 ppb) & Ni (1000 ppm)	886,30 \pm 4,33	113,70 ^a	765,90 \pm 1,1	120,4 ^b	642,34 \pm 5,29	123,56 ^b	35,77%

3.6 Spéciation chimique du Cd et du Ni dans le marais filtrant

3.6.1 Spéciation chimique des doses simples de Cd

Les résultats montrent que les formes chimiques majoritaires du Cd varient selon les doses initiales utilisées. Les facteurs : Température, pH, et la dose reçue par chaque étage n'influencent pas la dominance, mais modifient légèrement le taux de chaque forme chimique. Avec une dose initiale de Cd_(1000 ppm), les espèces majoritaires sont CdCl⁺ et Cd⁺², quelle que soit la température et le pH. Lorsque la dose initiale diminue à 100 ppm, Cd⁺² devient majoritaire, le pourcentage (%) de CdHPO₄ augmente considérablement, tandis que CdCl⁺ diminue de plus de 5 fois par rapport à ce qui a été observé avec Cd_(1000 ppm). À 100 ppb, Cd⁺² et CdHPO₄ dominant, et le % de Cd(OH)₂ triple comparativement à ce qui a été enregistré avec 100 ppm, quand a CdCl⁺ disparaît totalement sous la dose Cd_(100 ppb).

Tab. 20 : Spéciation chimique de CdCl₂ dans les eaux du marais filtrant. Le (%) de chaque espèce chimique a été prédit en fonction des variations de pH, de la température, des doses de Cd reçues par chaque étage, et en présence de la solution nutritive de Hoagland (diluée à ¼).

% Cd	% Cd : Etage 1 (Jour 1)	% Cd : Etage1 (Semaine 8)	% Cd : Etage 2 (Semaine 17)	% Cd : Etage 3 (Semaine 24)
	T (°C) = 9,45	T (°C) = 13,89	T (°C) = 23,98	T (°C) = 27,68
Forme chimique	Cd =1000 ppm	Cd =927,66 ppm	Cd =847,5 ppm	Cd =749,73 ppm
	pH= 5,97	pH=5,54	pH=5,78	pH=5,69
CdCl ⁺	50,14	50,38	50,32	50,13
Cd ⁺²	32,20	31,70	30,99	30,14
CdHPO ₄ (aq)	6,06	6,51	7,17	8,05
CdCl ₂ (aq)	4,58	4,76	4,90	5,04
Cd NH ₃ ⁺²	2,47	2,43	2,36	2,24
CdOH ⁺	1,64	2,24	2,59	2,94
Forme chimique	Cd =100 ppm	Cd = 87,20 ppm	Cd = 63,46 ppm	Cd = 40,63 ppm
	pH= 6,14	pH=6,05	pH=5,99	pH=5,93
Cd ⁺²	44,86	44,05	41,84	39,06
CdHPO ₄ (aq)	22,82	27,21	31,06	35,58
CdCl ⁺	9,16	9,24	8,97	8,53
Cd(OH) ₂ (aq)	7,62	2,73	1,27	0,49
Cd NH ₃ ⁺²	6,29	5,88	5,34	4,61
CdOH ⁺	5,53	7,59	8,53	9,02
Forme chimique	Cd =100 ppb	Cd = 0	Cd = 0	Cd = 0
	pH= 6,46	/	/	/
Cd ⁺²	35,61	0	0	0
CdHPO ₄ (aq)	25,18	0	0	0
Cd(OH) ₂ (aq)	20,99	0	0	0
Cd NH ₃ ⁺²	6,73	0	0	0
CdOH ⁺	8,25	0	0	0

3.6.2 Spéciation chimique des doses simples de Ni

La prédiction de la spéciation chimique de doses simples de NiCl_2 ; Ni (1000 ppm), Ni (100 ppm) et Ni (120 ppb) dans les eaux du marais filtrant est présentée dans le tableau (21).

Les résultats montrent que la forme chimique Ni^{2+} domine largement, quel que soit le pH, la température, la dose initiale testée et la dose reçue par chaque étage. Les formes chimiques : NiHPO_4 , NiNH_3^{+2} , NiOH^+ , NiSO_4 et Ni(OH)_2 sont présentes en faibles proportions.

À $\text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$, le Ni^{2+} domine largement (>90%) dans les trois étages. Les autres formes chimiques NiHPO_4 , NiNH_3^{+2} et NiOH^+ sont à moins de 2%. À $\text{Ni}_{(100 \text{ ppm})}$, le Ni^{2+} reste majoritaire mais diminue au profit de NiHPO_4 et NiNH_3^{+2} et NiOH^+ qui augmentent avec l'augmentation de la température et la diminution du pH. Contrairement à Ni(OH)_2 , dont le taux diminue de moitié de l'étage (1) à l'étage (3). À 120 ppb , la forme soluble Ni^{2+} prédomine dans les eaux de l'étage (1). À température similaire (étage 1), les formes NiHPO_4 , NiNH_3^{+2} et NiOH^+ présentent des taux plus élevés sous $\text{Ni}_{(120 \text{ ppb})}$ que sous $\text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$, $\text{Ni}_{(100 \text{ ppm})}$.

Tab. 21 : Spéciation chimique de NiCl_2 dans les eaux du marais filtrant. Le (%) de chaque espèce chimique a été prédit en fonction des variations de pH, de la température, des doses de Ni reçues par chaque étage, et en présence de la solution nutritive de Hoagland (diluée à $\frac{1}{4}$).

% Ni	% Ni : Etage 1 (Jour 1)	% Ni : Etage 1 (Semaine 8)	% Ni : Etage 2 (Semaine 17)	% Ni : Etage 3 (Semaine 24)
	Moy T (°C)	T (°C) = 9,45	T (°C) = 13,89	T (°C) = 23,98
Forme chimique	Ni=1000 ppm	Ni=879,96 ppm	Ni=750,37 ppm	Ni= 623 ppm
	pH= 5,56	pH=5,42	pH=5,36	pH=5,29
Ni^{2+}	92,72	92,17	91,46	90,38
NiHPO_4 (aq)	1,75	1,96	2,18	2,57
NiNH_3^{+2}	1,31	1,46	1,66	1,89
NiOH^+	1,14	1,19	1,36	1,81
Forme chimique	Ni=100 ppm	Ni=83,20 ppm	Ni=66,52 ppm	Ni=51,73 ppm
	pH= 5,89	pH=5,76	pH=5,70	pH=5,64
Ni^{2+}	77,69	76,21	74,2	72,23
NiHPO_4 (aq)	5,79	5,90	6,56	7,42
NiNH_3^{+2}	5,28	5,66	6,29	6,56
NiOH^+	4,05	4,37	6,10	8,07
Ni(OH)_2 (aq)	3,52	4,16	3,08	1,89
Forme chimique	Ni=120 ppb	Ni= 0	Ni= 0	Ni= 0
	pH= 6,45	/	/	/
Ni^{2+}	72,23	0	0	0
NiOH^+	8,07	0	0	0
NiHPO_4 (aq)	7,419	0	0	0
NiNH_3^{+2}	6,56	0	0	0
NiSO_4 (aq)	1,939	0	0	0

3.6.2 Spéciation chimique des doses mixtes de Cd et de Ni

La prédiction de la spéciation chimique de Cd et de Ni dans les eaux du marais filtrant, en utilisant différentes doses combinées de CdCl₂ et NiCl₂ sont présentée dans les tableaux (22), (23) et (24).

Les résultats de la prédiction sous la dose combinée Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) (Tab. 22), indiquent que les espèces chimiques de Cd les plus abondantes dans les eaux des trois étages sont CdCl⁺ et Cd²⁺. Globalement, le taux de CdCl⁺, CdCl₂ et CdNH₃⁺² diminuent avec l'augmentation de la température et la diminution de pH. En revanche, la proportion de Cd²⁺ et CdHPO₄ augmente graduellement en passant de l'étage (1) à l'étage (3) avec l'élévation de la température et la baisse du pH.

Quant aux résultats de la prédiction de la spéciation du Ni qui n'a pas été détecté dans les eaux à la sortie des étages (1), (2) et (3), on a constaté que Ni²⁺ prédomine largement, suivi par Ni(OH)₂, NiNH₃, NiOH⁺ et NiHPO₄ en plus faibles proportions.

Tab. 22 : Spéciation chimique de CdCl₂ et NiCl₂ dans les eaux du marais filtrant sous la dose combinée Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb). Le (%) de chaque espèce chimique a été prédit en fonction des variations de pH, de la température, des doses de Cd et/ou Ni reçues par chaque étage, et en présence de la solution nutritive de Hoagland (diluée à ¼).

% Cd et Ni Moy T (°C)	% Cd et Ni : Etage 1 (Jour 1)	% Cd et Ni : Etage 1 (Semaine 8)	% Cd et Ni : Etage 2 (Semaine 17)	% Cd et Ni : Etage 3 (Semaine 24)
	T (°C) = 9,45	T (°C) = 13,89	T (°C) = 23,98	T (°C) = 27,68
Forme chimique	pH= 5,97	pH=5,85	pH=5,77	pH=5,69
Cd (ppm)	1000	934,5	863,7	770,33
CdCl ⁺	51,056	51,022	48,402	46,211
Cd ²⁺	32,858	32,571	34,654	35,864
CdHPO ₄ (aq)	5,444	5,624	6,516	7,601
CdCl ₂ (aq)	4,747	4,778	4,04	3,568
CdNH ₃ ⁺²	2,213	2,265	2,322	2,314
Ni (ppb)	120	0	0	0
Ni ²⁺	70,449	0	0	0
Ni(OH) ₂ (aq)	10,424	0	0	0
NiNH ₃ ⁺²	7,164	0	0	0
NiOH ⁺	6,439	0	0	0
NiHPO ₄ (aq)	2,076	0	0	0

Les résultats de la prédiction de la spéciation chimique du Cd et du Ni dans les eaux des trois étages du marais filtrant, contenant la dose mixte de Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm), sont présentés dans le tableau 23.

La forme chimique Cd²⁺ est l'espèce prédominante aux trois étages du marais filtrant, avec une variation minimale de sa proportion, passant de 47,26 % à 48,06 %. Cela suggère que les facteurs : T (°C), le pH et la dose reçue par chaque étage ont peu d'influence.

Cependant, le taux de CdCl⁺ diminue de manière significative et progressive avec l'augmentation de la température et la diminution du pH, passant de 30,72 % dans l'étage (1) à 16,63 % dans les eaux à la sortie de l'étage (3).

Contrairement à ce qui a été observé sous la dose combinée de Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb), la forme CdHPO₄ semble être plus présente sous Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm). Le taux de la forme chimique CdHPO₄ augmente avec l'augmentation de la température et la diminution du pH, passant de l'étage (1) à l'étage (3). Cela suggère une complexation accrue du Cd avec les phosphates. Pour la spéciation du Ni, l'espèce chimique Ni²⁺ prédomine mais sa proportion diminue de façon notable avec l'augmentation de température et la diminution du pH au profit des formes complexes NiNH₃⁺², NiOH⁺ et NiHPO₄ qui augmentent.

Tab. 23 : Spéciation chimique de CdCl₂ et NiCl₂ dans les eaux du marais filtrant sous la dose combinée Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm). Le (%) de chaque espèce chimique a été prédit en fonction des variations de pH, de la température, des doses de Cd et/ou Ni reçues par chaque étage, et en présence de la solution nutritive de Hoagland (diluée à ¼).

% Cd et Ni	% Cd et Ni : Etage 1 (Jour 1)	% Cd et Ni : Etage 1 (Semaine 8)	% Cd et Ni : Etage 2 (Semaine 16)	% Cd et Ni : Etage 3 (Semaine 24)
	T (°C) = 9,45	T (°C) = 13,89	T (°C) = 23,98	T (°C) = 27,68
Moy T (°C)				
Forme chimique	pH=6,01	pH=5,75	pH=5,71	pH=5,68
Cd (ppm)	100	86,29	67,77	47,91
Cd ²⁺	47,26	47,87	48,06	47,74
CdCl ⁺	30,72	27,33	22,58	16,63
CdHPO ₄ (aq)	15,07	17,22	20,64	25,42
CdCl ₂ (aq)	1,13	0,88	0,60	0,33
Ni (ppm)	100	82,10	59,96	36,3
Ni ⁺²	79,207	77,278	74,437	71,201
NiNH ₃ ⁺²	4,916	5,612	6,425	6,956
Ni(OH) ₂ (aq)	4,58	4,122	3,321	2,299
NiHPO ₄ (aq)	4,491	4,944	5,684	6,742
NiOH ⁺	3,212	4,366	6,341	8,888

Le tableau (24) présente la prédiction de la spéciation chimique de la dose combinée de Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm), en fonction de la température, du pH et de la concentration de Cd et de Ni reçue par chaque étage du marais filtrant.

Les espèces chimiques chlorées CdCl^+ et CdCl_2 , ainsi que le cation divalent Cd^{2+} , sont les formes prédominantes dans les eaux de l'étage 1 (jour 1). Ces trois espèces chimiques représentent plus de 97 % de la quantité totale de Cd dans les eaux. En ce qui concerne l'étage (2) et l'étage (3), aucune quantité de Cd n'a été détectée dans les eaux.

Quant à la spéciation du Ni en présence de Cd, la forme Ni^{2+} était la plus prédominante dans toutes les eaux des trois étages. Le taux de cette espèce chimique reste relativement stable et ne présente pas de variations significatives entre les étages.

Les espèces chimiques NiHPO_4 , NiNH_3^{+2} et NiOH^+ sont présentes dans les eaux en proportions beaucoup plus faibles que Ni^{2+} , mais elles augmentent légèrement en passant de l'étage (1) à l'étage (3), notamment avec l'augmentation de la T (°C) et la diminution du pH.

Les résultats de la spéciation du Ni étaient très similaires à ceux de la dose simple de $\text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$, ce qui indique que la présence de Cd à 100 ppb n'influence pas la spéciation du Ni.

Tab. 24 : Spéciation chimique de CdCl_2 et NiCl_2 dans les eaux du marais filtrant sous la dose combinée Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm). Le (%) de chaque espèce chimique a été prédit en fonction des variations de pH, de la température, des doses de Cd et/ou Ni reçues par chaque étage, et en présence de la solution nutritive de Hoagland (diluée à ¼).

% Cd et Ni Moy T (°C)	% Cd et Ni (Etage 1 : jour 1)	% Cd et Ni Etage 1 (semaine 8)	% Cd et Ni Etage 2 (semaine 16)	% Cd et Ni Etage 3 (semaine 24)
	T (°C) = 9,45	T (°C) = 13,89	T (°C) = 23,98	T (°C) = 27,68
Forme chimique	pH= 5,56	pH=5,43	pH=5,36	pH=5,28
Cd (ppb)	100	0	0	0
CdCl ⁺	63,58	0	0	0
Cd ⁺²	20,07	0	0	0
CdCl ₂ (aq)	13,51	0	0	0
CdHPO ₄ (aq)	1,95	0	0	0
Ni (ppm)	1000	886,3	765,9	642,34
Ni ⁺²	93,18	92,39	91,57	90,53
NiHPO ₄ (aq)	1,61	1,87	2,15	2,52
NiNH ₃ ⁺²	1,19	1,44	1,63	1,85
NiCl ⁺	1,15	1,17	1,20	1,77

3.7 Accumulation de Cd et de Ni dans les plantules néoformées

3.7.1 Accumulation de Cd dans les plantules exposées à des doses individuelles

Les résultats du dosage du Cd dans les parties aérienne et souterraine des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses simples de Cd, sont illustrés dans les figures 24 et 25.

Le dosage du Cd dans la partie aérienne des plantules (fig. 24), révèle une tendance constante parmi les trois doses de Cd utilisées. La quantité de Cd accumulée demeure toujours supérieure dans l'étage (1) par rapport aux étages (2) et (3), et la quantité accumulée dans l'étage (2) dépasse celle de l'étage (3).

L'analyse de variance effectuée sur les résultats relatifs à la dose de Cd_(100 ppb) a mis en évidence des différences statistiquement significatives entre les quantités de Cd accumulées par les plantules de chaque étage ($F_{2,21} = 1108,33$; $p = 0,000 < 0,05$). Plus particulièrement, concernant les quantités de Cd accumulées par les plantules de l'étage (1) comparées à celles des étages 2 et 3, d'après le test post-hoc de Tukey. Les mêmes tendances ont été observées sous Cd_(100 ppm) ; ($F_{2,21} = 16,03$; $p = 0,000 < 0,05$). Cependant, sous Cd_(1000 ppm), les quantités accumulées dans l'étage (1) et (2) n'étaient pas significativement différentes ($F_{2,21} = 25,10$; $p = 0,000 < 0,05$).

Quant au dosage du Cd dans la partie souterraine (fig. 25), les résultats diffèrent de ceux enregistrés dans la partie aérienne. La quantité de Cd accumulée s'est avérée supérieure dans l'étage (1) uniquement sous Cd_(100 ppb). Dans le groupe témoin, nous avons détecté la présence d'une quantité de Cd très faible (0,29 ppb) dans les racines de l'étage (1), tandis qu'aucune quantité n'a été détectée dans les plantes des deux autres étages. Lorsque exposées à Cd_(100 ppm), les résultats dans les étages (1) et (3) affichent des similitudes et demeurent inférieures à ceux enregistrés dans l'étage (2). Cependant, pour la dose Cd_(1000 ppm), une augmentation de la quantité accumulée s'observe à mesure que l'on progresse de l'entrée du marais filtrant (étage 1) vers sa sortie (étage 3).

L'analyse de variance a révélé des différences statistiquement significatives entre les quantités accumulées dans les trois étages pour toutes les doses utilisées, à l'exception entre les étages (2) et (3) du groupe témoin et les étages (1) et (3) du groupe soumis à Cd_(100 ppm).

Les valeurs de p-value et le F statistique pour les différents groupes étaient les suivantes : Groupe controle ($F_{2,21} = 5887$; $p = 0,000 < 0,05$); Cd_(100 ppb) ($F_{2,21} = 7767,08$; $p = 0,000 < 0,05$) ; Cd_(100 ppm) ; ($F_{2,21} = 34,37$; $p = 0,000 < 0,05$) ; et sous Cd_(1000 ppm) ($F_{2,21} = 6,10$; $p = 0,008 < 0,05$).

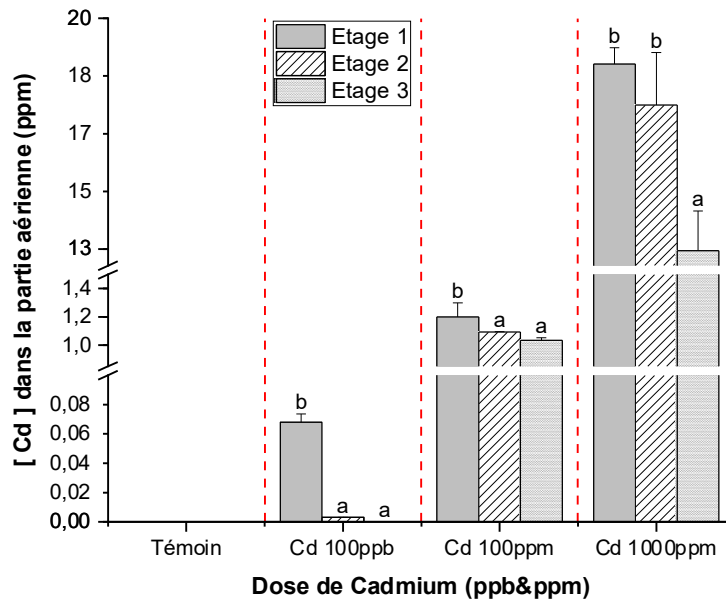


Fig. 24 : Accumulation de Cd dans les parties aériennes des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses individuelles de Cd. Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs représentent les moyennes (\pm SD) de 2 expériences indépendantes ($n=8$). Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).

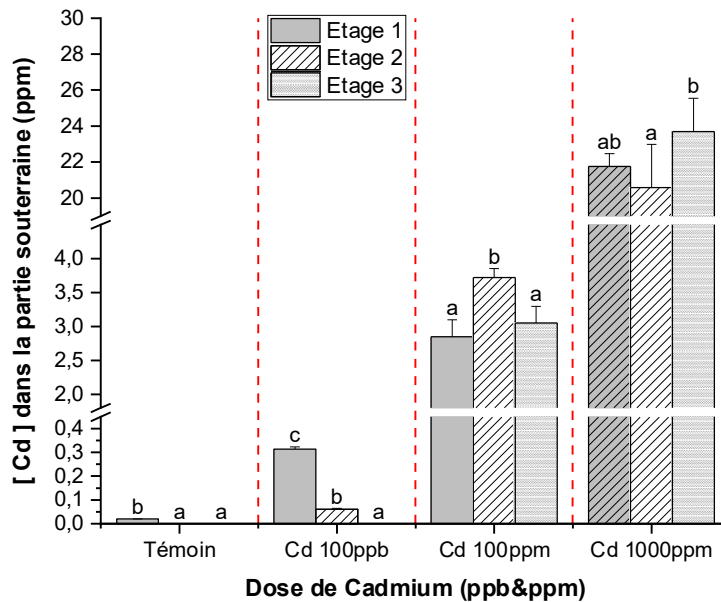


Fig. 25 : Accumulation de Cd dans les parties souterraines des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses individuelles de Cd. Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs représentent les moyennes (\pm SD) de 2 expériences indépendantes ($n=8$). Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).

3.7.2 Accumulation de Ni dans les plantules exposées à des doses individuelles

Les résultats du dosage du Ni dans les parties aérienne et souterraine des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses simples de Ni, sont illustrés dans les figures 26 et 27.

L'analyse du dosage du Ni dans la partie aérienne des plantules (fig. 26), révèle une corrélation positive directe entre la dose utilisée et la quantité de Ni accumulée.

Dans le groupe témoin ainsi que sous l'exposition à $\text{Ni}_{(120 \text{ ppb})}$, nous avons pu détecter la présence de Ni uniquement dans l'étage (1), avec des valeurs de Ni équivalant à $2,4 \cdot 10^{-3} \pm 3,3 \cdot 10^{-4}$ ppm et $4,3 \cdot 10^{-2} \pm 5,1 \cdot 10^{-3}$ ppm respectivement. L'analyse de variance menée sur le facteur étage pour chaque dose a révélé que l'augmentation n'était pas statistiquement significative entre les trois étages sous $\text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$ ($F_{2,21} = 2,46$; $p = 0,11 > 0,05$). En revanche, un résultat opposé a été observé sous $\text{Ni}_{(100 \text{ ppm})}$ ($F_{2,21} = 33,13$; $p = 0,000 < 0,05$), où les valeurs enregistrées étaient de 1,08 ppm (étage1), 1,5 ppm (étage 2) et 1,93 ppm dans la partie aérienne des plantes (étage 3).

Dans les parties souterraines des plantules (fig. 27), la tendance d'accumulation de Ni était similaire à celle enregistrés dans la partie aérienne à savoir une corrélation positive entre la dose utilisée et la quantité de Ni accumulée. La seule différence c'est la détection de Ni dans les plantes de l'étage (2) sous $\text{Ni}_{(120 \text{ ppb})}$ où nous avons enregistré 46 ppb. Aussi, la quantité enregistrée est légèrement plus élevés dans l'étage (2) que l'étage (3) sous $\text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$.

L'analyse de variance et le test post-hoc de tukey ont révélé des différences statistiquement significatives entre les quantités accumulées dans les trois étages pour toutes les doses utilisées, à l'exception entre les étages (2) et (3) du groupe témoin et les étages (2) et (3) du groupe soumis à $\text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$. Les valeurs de p-value et le F statistique pour les différents groupes étaient les suivantes : Groupe controle ($F_{2,21} = 645,92$; $p = 0,000 < 0,05$); Sous $\text{Ni}_{(120 \text{ ppb})}$ ($F_{2,21} = 564,28$; $p = 0,000 < 0,05$); $\text{Ni}_{(100 \text{ ppm})}$; ($F_{2,21} = 48,07$; $p = 0,000 < 0,05$); et sous $\text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$ ($F_{2,21} = 356,71$; $p = 0,000 < 0,05$).

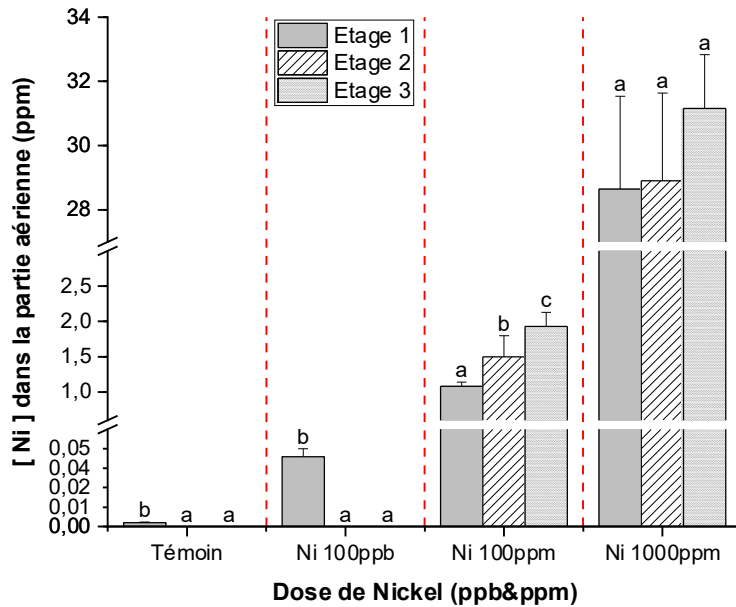


Fig. 26 : Accumulation de Ni dans les parties aériennes des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses individuelles de Ni. Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs représentent les moyennes (\pm SD) de 2 expériences indépendantes ($n=8$). Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).

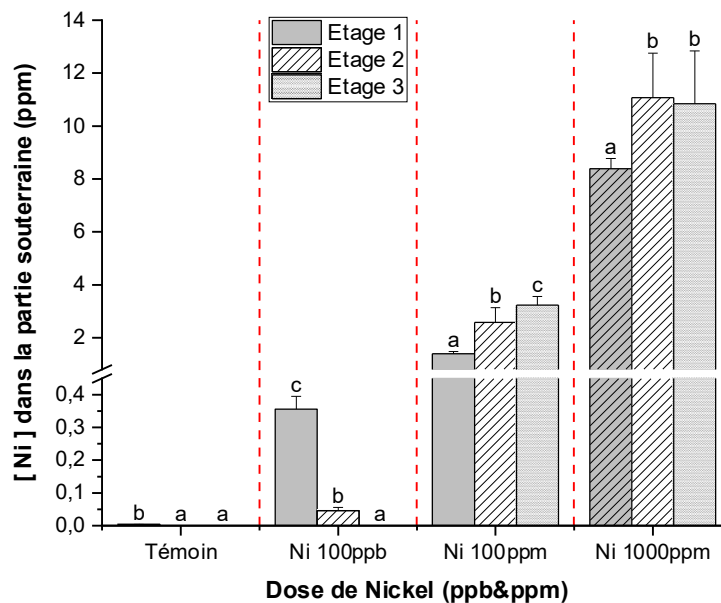


Fig. 27 : Accumulation de Ni dans les parties souterraines des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses individuelles de Ni. Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs représentent les moyennes (\pm SD) de 2 expériences indépendantes ($n=8$). Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).

3.7.3 Accumulation de Cd et de Ni dans la partie aérienne sous des doses mixtes

Les résultats du dosage du Cd et du Ni dans les parties aériennes des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans des eaux du marais filtrant contaminées par des doses mixtes de Cd et de Ni sont illustrées dans la figure (28-a).

Les résultats révèlent que la quantité de Cd accumulée diminue en progressant de l'étage (1) à l'étage (3), de manière similaire à ce qui a été enregistré sous des doses simples de Cd. L'analyse de variance a révélé des différences statistiquement significatives pour le facteur étage sous toutes les doses utilisées : Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) ($F_{2,21} = 12,70$; $p = 0,000 < 0,05$) ; Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) ($F_{2,21} = 54,62$; $p = 0,000 < 0,05$) ; et sous Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) ($F_{2,21} = 5,19$; $p = 0,01 < 0,05$). Cependant, le test post-hoc de Tukey a révélé que les résultats des étages (1) et (2) sous Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) n'ont pas montré de différences significatives, tout comme sous Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) entre les étages (2) et (3).

En ce qui concerne les résultats du Ni dans la partie aérienne, la tendance d'accumulation diffère de celle observée sous l'exposition à des doses individuelles de Ni ainsi que sous des doses mixtes de Cd. La quantité de Ni accumulée ne diminue pas systématiquement en progressant de l'étage (1) à l'étage (3).

Dans le groupe témoin, nous avons détecté des quantités minimales de Ni uniquement dans l'étage (1) : 2,4 ppb ($F_{2,21} = 408,97$; $p = 0,000 < 0,05$). Sous Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb), nous avons enregistré respectivement 0,24 ppm, 0,25 ppm et 0,22 ppm dans les étages (1), (2) et (3), où les différences n'ont pas été significatives ($F_{2,21} = 0,92$; $p = 0,42 > 0,05$). L'accumulation du Ni sous Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) diminue en passant de l'étage (1) à l'étage (3), mais les différences ne sont significatives qu'entre les résultats de l'étage (2) et (3) ($F_{2,21} = 22,97$; $p = 0,000 < 0,05$). Sous l'exposition à Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) les quantités de Ni accumulées dans la partie aérienne n'ont également pas présenté de différences significatives entre les trois étages ($F_{2,21} = 2,345$; $p = 0,12 > 0,05$), Les valeurs enregistrées étaient respectivement de 9,42 ppm, 9,67 ppm et 7,96 ppm dans les étages (1), (2) et (3).

3.7.4 Accumulation de Cd et de Ni dans la partie souterraine sous des doses mixtes

La figure (28-b) présente les résultats du dosage du Cd et du Ni dans les parties souterraines des plantules âgées de 8 semaines, poussées dans des eaux du marais filtrant contaminées par des doses mixtes de Cd et de Ni.

Globalement, les tendances d'accumulation sont similaires à celles enregistrées dans la partie aérienne sous les doses mixtes de Cd et de Ni. On observe une diminution de la quantité accumulée de Cd et de Ni à mesure que l'on progresse de l'entrée du marais filtrant (étage 1) vers sa sortie (étage 3). Sauf sous les doses mixtes de Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) et Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm), où les quantités accumulées de Cd et de Ni dans l'étage (2) étaient supérieures à celles enregistrées dans les étages (1) et (3). Une autre différence par rapport à ce qui a été observé dans la partie aérienne réside dans la détection de traces de Cd dans les racines du groupe témoin à l'étage (1). En ce qui concerne l'accumulation de Ni dans la partie souterraine des plantules témoins, les résultats étaient similaires à ce qui a été observé dans la partie aérienne, à savoir la présence de quantités traces uniquement dans l'étage (1).

Sous toutes les doses mixtes utilisées, nous avons observé l'absence de différence significative entre pratiquement toutes les valeurs de Cd et de Ni accumulées dans la partie souterraine des plantules des étages (1) et (2). Une exception survient pour les résultats d'accumulation de Ni sous Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppb), où les valeurs diminuent de manière significative de l'étage 1 à l'étage 3 ($F_{2,21} = 139,45$; $p = 0,000 < 0,05$). De même, pour la quantité de Cd accumulée sous Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm), les différences n'ont pas été significatives entre les valeurs des trois étages du marais filtrant ($F_{2,21} = 2,84$; $p = 0,083 > 0,05$).

Les valeurs du p-value, le test F pour les autres résultats sont les suivants :

Pour le Cd accumulé : sous Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) ($F_{2,21} = 12,71$; $p = 0,000 < 0,05$) ; sous Cd_(100 ppb) + Ni_(100 ppm) ($F_{2,21} = 16,786$; $p = 0,000 < 0,05$).

Pour le Ni accumulé : sous Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) ($F_{2,21} = 30,270$; $p = 0,000 < 0,05$) ; sous Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) ($F_{2,21} = 94,084$; $p = 0,000 < 0,05$).

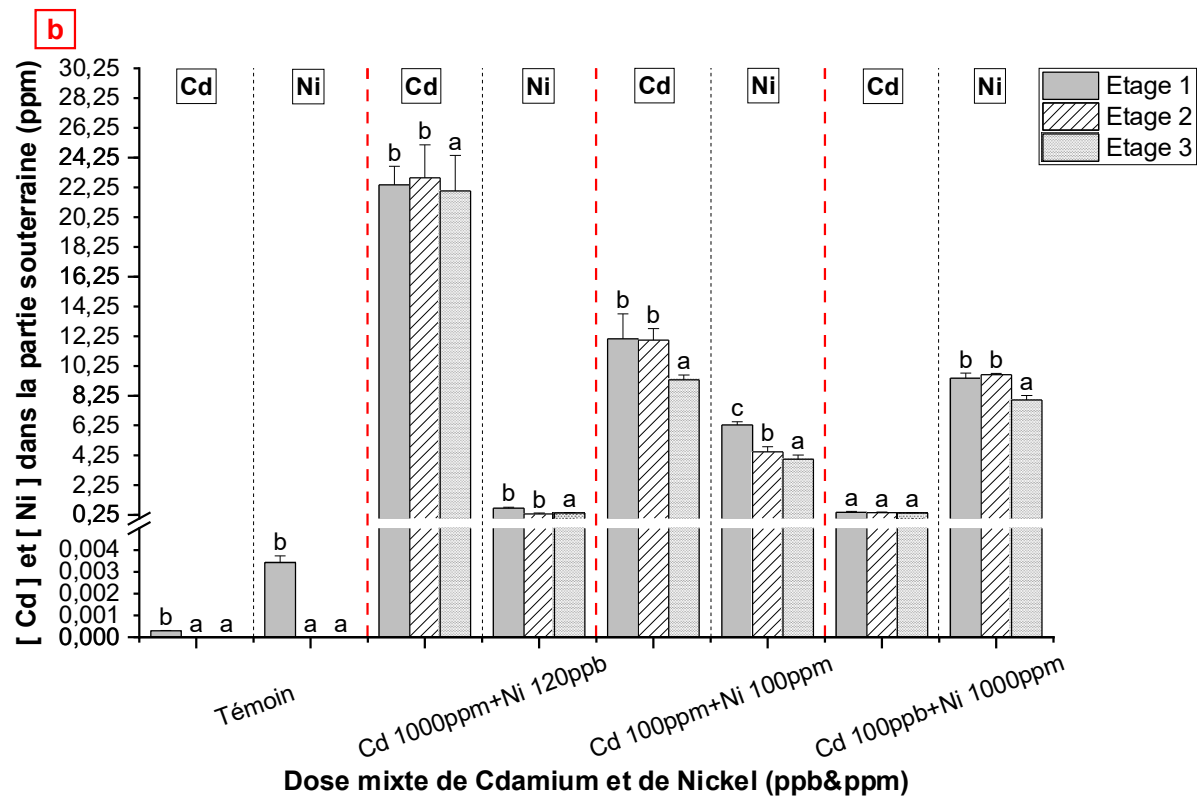
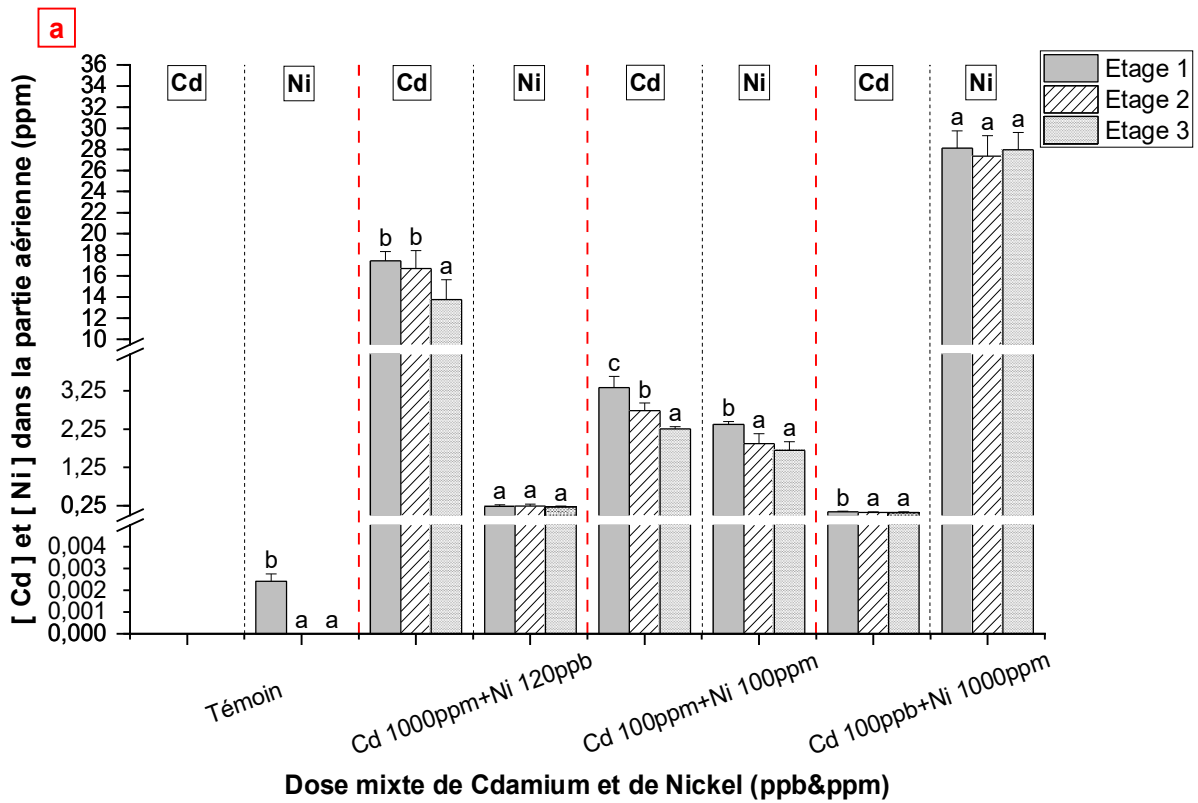


Fig. 28 : Accumulation de Cd et de Ni dans les parties aériennes (a) et souterraines (b) des plantules âgées de semaines, poussées dans les eaux du marais filtrant contaminées par des doses mixtes de Cd et Ni. Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement distinctes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs représentent les moyennes (\pm SD) de 2 expériences indépendantes ($n=8$). Les valeurs les plus basses reçoivent la lettre (a).

4 Discussion

Dans cette section, la discussion est principalement centrée sur la démonstration de la capacité de *Phragmites australis* à engendrer de nouvelles plantules à partir des rhizomes dans un environnement aquatique contaminé par diverses doses individuelles et combinées de Cd et de Ni. Nous examinons également les performances épuratoires des jeunes plantules de *P. australis* au sein d'un marais filtrant expérimental à écoulement surfacique à trois étages.

4.1 Taux de plantules néoformées dans le marais filtrant

Au cours des deux dernières décennies, *P. australis* a été largement utilisé dans des marais filtrants, ainsi que dans des systèmes de lagunage à macrophytes émergents, pour la phytoépuration des eaux contaminées par différents types de polluants. Selon Wang *et al.* (2022), les espèces appartenant au genre *Phragmites sp* représentent plus de 15 % de l'ensemble des plantes employées dans les marais filtrants pour le traitement de diverses eaux contaminées, qu'elles soient domestiques, agricoles ou industrielles.

Nos résultats ont révélé que les faibles doses de Cd_(100 ppb) et Ni_(120 ppb) n'ont pas eu d'effet négatif sur la néoformation de nouvelles plantules. En revanche, des effets adverses ont été constatés pour les autres doses individuelles et mixtes. Comparativement aux résultats des groupes témoins, une diminution de 58% et 41% a été observée respectivement sous Cd_(100 ppm) et Ni_(100 ppm). Une diminution de 73% et 62,5% sous Cd_(1000 ppm) et Ni_(1000 ppm). Cependant, sous les doses mixtes, nous avons enregistré une diminution de 29%, 69% et 75% respectivement sous Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm), Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) et Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb).

Des résultats similaires, ont été observé chez *P. australis* sous différents doses de plomb (Pb), où la formation de nouvelles plantules est inhibé de manière significative seulement sous la dose 3000 ppm de Pb (Zhang *et al.*, 2018). Kovačević *et al.* (2019), n'ont pas observé de perturbation de la régénération végétative de *P. australis* dans les bassins de stockage des eaux usées minières, qui contenaient : 11,3 ppm de Cd, 85,7 ppm de Ni, 761 ppm de cuivre (Cu), 1949 ppm de plomb (Pb), 1432 ppm de zinc (Zn) et 1940 ppm de manganèse (Mn). L'étude de Bart and Hartman (2002), a montré que la néoformation des nouvelles pousses de *P. australis* est inhiber lorsque la salinité est maintenue à un niveau entre 18-20 ‰.

D'autres macrophytes, tels que les deux espèces *Potamogeton crispus* et *Vallisneria spirulosa*, ont également démontré leur capacité à maintenir une aptitude à se reproduire et à se multiplier de manière végétative, mais en présence de doses plus faibles (Cd=5 ppm) que celles que nous avons testées (Cao *et al.*, 2019).

Cette variation de sensibilité dans la multiplication végétative met en évidence que la capacité de former de nouvelles plantules en situation de stress métallique dépend de l'espèce, des ETMs présents dans le marais filtrant ainsi que des doses de ces derniers. À dose égale, notre étude a mis en évidence de manière explicite que le Cd exerce une inhibition plus marquée sur la néoformation que le Ni. Des résultats similaires sur la germination et la croissance végétative chez d'autres espèces ont montré que la phytotoxicité et l'effet inhibiteur du Cd sont plus prononcés que ceux du Ni. Par exemple, sur *Allium cepa* sous 25 ppm, 50 ppm et 100 ppm de Cd et Ni (Justin et Vivek, 2010), sur la tomate sous 50 μ M de Cd ou Ni (Badawy *et al.*, 2022), et sur *Atriplex Halimus* sous 1000 ppm, 5000, et 10000 ppm de Cd, Pb et Zn (Fatarna *et al.*, 2017). Selon l'étude de Ryzhenko *et al.* (2018), la phytotoxicité du Cd sur *Hordeum vulgare* était supérieure à celle de tous les autres ETMs: $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+}$.

L'inhibition constatée dans nos résultats sous des doses mixtes contenant du Cd_(1000 ppm) ou du Ni_(1000 ppm) ne diffère pas de manière significative lorsque ces doses sont appliquées individuellement, bien qu'une légère augmentation du taux d'inhibition ait été observée sous les doses individuelle. Cela montre que la présence de faibles doses de Cd ou de Ni ne modifie pas l'effet toxique des fortes doses de Ni et de Cd. En revanche, lorsque la dose mixte est composée de concentrations égales de Cd et de Ni, c'est-à-dire « Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) », l'inhibition était moins prononcée que sous ces deux doses utilisées individuellement. Cela peut s'expliquer par l'effet d'antagonisme entre le Cd et le Ni à ces niveaux de doses.

Selon Côté *et al.* (2016), l'effet est antagoniste lorsque l'effet combiné des deux ETMs est inférieur à la somme de leurs effets individuels. Additif lorsque leur effet combiné est la somme de chacun individuellement, et synergique lorsque l'effet combiné est supérieur à la somme de chacun individuellement. Les données concernant l'effet des ETMs sur la multiplication végétative de *P. australis* sont rares dans la littérature scientifique. À notre connaissance, aucune étude n'a été publiée examinant les effets combinés du Cd et du Ni sur la multiplication végétative de *P. australis*. Cependant, les interactions phytotoxiques antagonistes, additives ou synergiques entre le Cd et le Ni, ainsi qu'avec les autres ETMs, ont été démontrées.

L'effet phytotoxique antagoniste du Cd et du Ni a été démontré par Wallace and Berry (1989) sur la germination et le développement des pousses de *Lactuca sativa*. Leurs résultats ont montré que Cd + Ni peuvent avoir un effet phytotoxique antagoniste, mais sous certaines doses. Des résultats contradictoires ont également été rapportés, où l'effet phytotoxique de Cd + Ni était additif ou synergique. Par exemple, chez *Vigna radiata*, le développement des nouvelles plantules a été plus impacté par les doses mixtes (mais inégales) Cd_(30ppm)+Ni_(200ppm) et Cd_(10ppm) + Ni_(100ppm) que sous ces doses individuelles (Aqeel *et al.*, 2021).

Chez l'espèce *Silene vulgaris*, l'effet phytotoxique du Cd était non additif avec le Cu et antagoniste avec le Zn, tant que les concentrations des deux ETMs étaient maintenues à un niveau de toxicité faible (Sharma *et al.*, 1999).

Globalement, dans la présente étude le taux moyen de formation de nouvelles plantules dans les trois étages pour chaque dose après 8, 16 et 24 semaines a montré que la néoformation est dose- et ETM-dépendante (fig.18).

Comparativement aux doses individuelles de Cd et Ni, la phytotoxicité sur la néoformation a diminué sous les doses mixtes, mais seulement lorsque cette dernière est composée de la même quantité de Cd et de Ni ($[Cd] = [Ni] = 100$ ppm). Les résultats détaillés dans chaque étage après 8, 16 et 24 semaines ont montré que l'effet négatif sur l'émergence des plantules augmente à mesure que la dose de Cd et de Ni augmente, ce qui est cohérent avec les observations précédentes. Cependant, la comparaison inter-étages montre que la néoformation s'améliore en allant de l'entrée (étage 1) vers la sortie (étage 3) sous presque toutes les doses testées. Cette amélioration est probablement due à la diminution de l'effet phytotoxique résultant de la réduction de la concentration de Cd et de Ni que reçoit l'étage (2) de l'étage (1) et l'étage (3) de l'étage (2). La diminution en progressant de l'entrée vers la sortie du marais filtrant est attribuable à l'abatement et à l'absorption de ces deux ETMs par les plantules néoformées. L'effet du facteur température (T °C) pourrait également avoir un impact sur l'amélioration du taux de la néoformation. La température estivale qui a accompagné l'installation des rhizomes dans les étages (2) et (3) pourrait favoriser davantage l'émergence de nouvelles plantules. La moyenne de la température au cours des 8 premières semaines de l'expérience était de 13,89 °C, entre la 9-16ème semaine était de 23,98 °C, et entre la 17-24ème semaine était de 27,68 °C. L'étude menée par Eller *et al.* (2013), sous des conditions contrôlées, a montré que la néoformation et la croissance des jeunes plantules de *P. australis* étaient meilleures à 24 °C qu'à 19 °C. Haslam (1971) a constaté qu'une litière épaisse réduisait la production de pousses de 100 à 6 par m², tandis que son retrait augmentait l'émergence de nouvelles plantules de 120 à 400 %. Il a expliqué cela par l'effet de la litière sur la diminution de la température autour des rhizomes.

En plus de la réduction de la concentration de Cd et de Ni reçue par chaque étage ; l'absorption de ces deux ETMs par les plantules et l'effet de la température, l'amélioration du taux de néoformation en progressant de l'entrée (étage 1) vers la sortie (étage 3) peut également être attribuée à la diminution des taux des espèces chimiques les plus phytodisponible. Selon Qu *et al.* (2019), la spéciation et la biodisponibilité des ETMs sont des processus complexes. Bien que l'utilisation de la modélisation puisse aider à avoir une idée générale

approximative et prédire le taux de chaque espèce chimique d'un ETM donné, cette approche reste limitée pour représenter toute la complexité des interactions affectant la spéciation réelle dans le milieu naturels. Nos résultats de la prédiction de la spéciation du Cd et du Ni (Tableaux : 20 à 24) montrent que, en passant de l'étage (1) à l'étage (3), l'augmentation de la température et la diminution du pH ont été accompagnées par la diminution mais légère des formes chimiques libres de Cd et Ni, qui sont facilement absorbables par les plantes, au profit des formes complexes plus difficiles à absorber (CdHPO_4 , Cd(OH)_2 , NiHPO_4 , NiNH_3^{+2} , NiOH^+ , et Ni(OH)_2). La prédiction de la spéciation du CdCl_2 et/ou NiCl_2 dans les eaux de chaque bac et de chaque étage du marais filtrant a montré que l'augmentation de la température et la diminution du pH en présences de toutes les composantes de la solution nutritive de Hoagland pourrait provoquer une faible diminution du taux des espèces chimiques libres de Cd et Ni (Cd^{+2} et Ni^{+2}).

En dépit de la diminution du nombre de pousses formées observée dans notre expérimentation, nos résultats a mis en évidence les capacités intrinsèques de cette espèce à se régénérer de manière végétative et à surmonter la présence de doses élevées de Cd et/ou de Ni. La multiplication végétative repose sur la division cellulaire mitotique des tissus, les rhizomes de *P. australis* ont clairement réussi à maintenir un niveau minimal de divisions mitotiques dans les bourgeons des rhizomes. Ceci a favorisé le développement de nouveaux méristèmes, à partir desquels ont émergé des méristèmes caulinaire et racinaire, contribuant ainsi à la formation de nouvelles plantules.

Il est reconnu que la reproduction végétative implique la formation de nouvelles plantules à partir des rhizomes qui renferment des nœuds dotés de bourgeons. Ces bourgeons ont la capacité de se développer en de nouvelles pousses et feuilles. Ces dernières finissent par produire leurs propres racines, devenant ainsi des plantes indépendantes, tout en restant connectées au rhizome parent (Ievinsh, 2023). La multiplication de manière végétative repose sur certaines cellules "totipotentes", capables de se multiplier indéfiniment et de se différencier (Shekhawat, 2019). Selon Armstrong and Armstrong (2001), l'inhibition du débourrement des bourgeons est due à la pénétration des polluants dans les rhizomes par les régions apicales des racines adventices ou latérales nouvellement formées, et éventuellement via les bourgeons. Le Ni et le Cd sont deux ETMs présents naturellement à l'état de traces dans la plupart des écosystèmes. Il n'existe aucune preuve que le Cd agisse comme un nutriment minéral, tandis que le Ni stimule la germination des graines, favorise la croissance des plantes et joue un rôle important dans le métabolisme de l'azote. Par conséquent, le Ni est considéré comme un nutriment essentiel pour les plantes (Larcher, 2003). Bien que le Ni soit bénéfique et que

le Cd soit inoffensif à faibles concentrations, ces deux éléments provoquent des effets phytotoxiques lorsqu'ils dépassent les seuils de tolérance des différentes espèces végétales (Clemens *et al.*, 2002). Ils sont absorbés par les plantes via des transporteurs peut spécifique (passivement via certaines protéines de type porine). De ce fait, de nombreux processus physiologiques sont perturbés par une exposition excessive au Cd et au Ni, entraînant non seulement des symptômes courants mais aussi des signes spécifiques de toxicité aux ETMs (Chen *et al.*, 2009).

Dans notre étude l'inhibition de taux de néoformation de nouvelles plantules sous 100 et 1000 ppm de Cd et Ni et sous les doses mixtes Cd_(100ppm) + Ni_(120ppb) et Cd_(100ppb) + Ni_(100ppm) pourrait être due à l'inhibition de la division cellulaire dans les bourgeons et les voies de signalisation hormonale (les auxines, cytokinines et gibbérellines) impliquées dans la multiplication végétative. Il est reconnu que les cytokinines jouent un rôle crucial dans l'initiation des racines, ils sont reconnus pour leur capacité à lever la dormance des bourgeons et des graines et la mobilisation de la nutrition. Il accélère la division cellulaire en stimulant le processus de mitose, contribuant ainsi de manière significative à la formation de nouvelles pousses (Otiende *et al.*, 2021). En revanche, l'auxine favorise la formation de racines adventives en stimulant à la fois la division et la différenciation cellulaire au niveau des primordium radicaux (Lorbiecke et Sauter, 1999; Otiende *et al.*, 2021).

Une autre hypothèse qui pourrait expliquer la diminution du taux de néoformation en présence de Cd et/ou de Ni est que, sous un seuil phytotoxique, ces ETMs pourraient inhiber la mobilisation des réserves nutritives stockées dans les rhizomes de *P. australis*. La mobilisation des réserves des rhizomes est un processus crucial pour le débourrement des bourgeons rhizomateux. Tursun *et al.* (2011), ont montré que les rhizomes de *P. australis* stockent des réserves azotées et glucidiques riches en énergie pendant l'hiver. Ces réserves sont mobilisées au printemps pour soutenir le débourrement des rhizomes et la croissance de nouvelles plantules, seulement s'il n'y a pas de perturbation.

La diminution du taux de néoformation sous de fortes doses dans notre étude pourrait être due au fait que le Cd et/ou le Ni interfèrent et inhibent l'activation des hydrolases (protéase, peptidases, lipase, glycosidases...) impliquées dans la dégradation et la conversion des réserves glucidiques et azotées (acides aminés, protéines) stockées dans les rhizomes. En se liant à des groupes fonctionnels présents dans les protéines, comme les groupement sulfhydrile (-SH), ou même en remplaçant des cofacteurs métalliques tels que les ions zinc, fer ou cuivre, nécessaires pour l'activité de certaines hydrolases.

4.2 Dosage du Cd et Ni dans les eaux du marais filtrant et les plantes néoformées

Les résultats de la quantité de Cd ou de Ni éliminée par le marais filtrant expérimental à trois étages, que ce soit en contaminant l'eau avec des doses individuelles ou combinées ont démontré une tendance plus au moins similaire. Dans l'ensemble, plus l'eau contaminée avançait dans les étages successifs du marais filtrant, plus les taux d'élimination du Cd et du Ni devenaient importants. On a constaté que les quantités de Cd et Ni retirées de l'eau augmentaient progressivement du premier étage de traitement (là où l'eau entre dans le système) et le troisième étage (là où l'eau ressort du système).

Sous la dose individuelle $Cd_{(100 \text{ ppb})}$ ou la dose mixte $Cd_{(100 \text{ ppb})} + Ni_{(1000 \text{ ppm})}$, le Cd a été totalement éliminé dès le 1^{er} étage. La proportion de Cd éliminé sous les quatre autres doses, qu'elles soient individuelles ou mixtes, a augmenté en passant de l'étage (1) à l'étage (3). En ce qui concerne le rendement d'élimination du Ni en utilisant des doses individuelles et mixtes, les résultats ont été similaires à ceux observés sous Cd. Lorsque nous avons utilisé la plus faible dose de Ni, qu'elle soit simple $Ni_{(120 \text{ ppb})}$ ou mixte $Cd_{(1000 \text{ ppm})} + Ni_{(120 \text{ ppb})}$, le Ni a été totalement éliminé dès le premier étage, et aucune quantité de Ni n'a été détectée dans les eaux à la sortie des étages (1), (2) et (3). Aussi, la proportion de Ni éliminé augmentait sous presque toutes les autres doses en passant de l'étage (1) à l'étage (3).

Globalement, en termes d'élimination du Cd et/ou Ni il est évident que l'efficacité de la phytoépuration dans les étages (2) et (3) était plus performante que celui de l'étage (1). L'efficacité de l'élimination de Cd et/ou Ni peut être influencé par plusieurs facteurs. Les facteurs qui semblent avoir influencé davantage l'efficacité de l'élimination de Cd et/ou Ni dans notre marais filtrant expérimental pourraient être : la température qui a accompagné l'émergence des plantules, le nombre de plantes néoformées, la concentration de Cd et/ou Ni reçue par chaque étage ainsi que le pH.

Comme il y a eu un écart de 8 semaines entre l'installation des rhizomes dans chaque étage (1, 2 et 3), la température lors du débourrement des nœuds et de l'émergence des plantules a été différente. La différence entre les T °C moyennes qui a accompagné l'émergence et la croissance des plantule de *P. australis* était de 10 (°C) entre l'étage (1) et (2) et de 13.8 (°C) entre l'étage (1) et (3). Les variations de la T (°C) peut avoir un impact direct et indirect sur l'efficacité de l'élimination de Cd et/ou Ni. La température influence la spéciation chimique et la phytodisponibilité du Cd et de Ni et par conséquent leur élimination. La température estivale qui a accompagné l'installation des rhizomes dans les étages (2) et (3) pourrait favoriser davantage la formation des espèces chimique plus phytodisponible. Selon Gérard (2000), l'augmentation de la température accroît généralement la solubilité du Cd et du Ni et la majorité

des ETMs qui sont sous forme de sels (chlorures, sulfates, etc.), ce qui stimule l'absorption racinaire et l'augmentation de leur phytodisponibilité. La loi de Van't Hoff, qui quantifie la relation entre la température et la solubilité, montre que la solubilité d'un élément donnée est limitée au seuil de solubilité, qui est variable en fonction de la température ; par exemple une augmentation de 10°C peut entraîner une multiplication par deux de la solubilité d'un sel (Manson *et al.*, 2022; Sluyters et Sluyters-Rehbach, 2017). Dans leur travaux sur l'effet de la température sur la phytodisponibilité de Cd, Kudo *et al.* (2023) ont montré que lorsque la température passait de 5 °C à 25 °C, la phytodisponibilité de Cd pour *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera* augmentaient ; cependant, à mesure que la température dépassait 25 °C, elles diminuaient. En présence de *Solanum nigrum*, l'élimination du cadmium d'une eau contenant 2 ppm de Cd a chuté à 29 % à 4 °C, par rapport à 60 % à 26 °C (Macek *et al.*, 1994).

Les oxydes de fer/manganèse sont généralement associés à As, Cu, Ni, Pb et Zn. La sorption de Ni sur les oxydes de fer/manganèse est réduite à des températures plus élevées. Ce qui augmente sa phytodisponibilité et l'élimination dans les eaux, sédiment et les sols (Dessai *et al.*, 2023; Hafner et Parikh, 2020; Ifeoma Mary et Onyedikachi Anthony, 2019). Selon Pereira *et al.* (2019), la cinétique de la réaction dissolution/précipitation du Ni s'accélère avec l'augmentation de la température, modifiant ainsi sa biodisponibilité. Dans une autre étude, Schück and Greger (2023) ont démontré que l'élimination de Cd, Cu, Pb et Zn dans un marais filtrant planté avec *Carex pseudocyperus*, *Carex riparia* et *Phalaris arundinacea*, augmente à mesure que la température ambiante passe de 5°C à 15°C et de 15°C à 25°C.

La température affecte la chimie des ETMs en modifiant la spéciation chimique, le pH, la solubilité, les vitesses de réaction ou la cinétique physique (Blust *et al.*, 1994). Les calculs théoriques et la prédiction de la spéciation chimique dans l'eau indiquent que les changements de température et de pH ont plus d'effets sur les complexes fortement hydrolysés et carbonés et moins d'effets sur les chlorures et les ions métalliques libres (Byrne *et al.*, 1988). L'augmentation de la température entraîne généralement une augmentation des concentrations et des activités des formes métalliques biodisponibles du Cd et Ni et, par conséquent, une augmentation de l'absorption, par les plantes du moins en théorie (Hummel et Curti, 2003; Jing *et al.*, 2023).

Une température élevée augmente les taux de diffusion du Cd et du Ni vers les racines des plantes. Et améliore également la transpiration et la cinétique d'absorption des nutriments, permettant ainsi d'absorber davantage de Cd et de Ni (Jing *et al.*, 2023; van der Ent *et al.*, 2016).

Les résultats de notre étude de la prédiction de la spéciation du CdCl_2 et/ou NiCl_2 dans les eaux de chaque bac de chaque étage du marais filtrant, a montré que l'augmentation de la température allant de l'étage (1) à (3) provoque une faible diminution des formes chimiques libres Cd^{+2} et Ni^{+2} ainsi qu'une légère augmentation des formes complexées du Cd et Ni [CdHPO_4 ; $\text{Cd}(\text{OH})_2$; NiHPO_4 ; NiNH_3^{+2} ; NiOH^+ ; et $\text{Ni}(\text{OH})_2$]. L'analyse des résultats de la prédiction des formes chimiques de Cd et Ni a montré aussi que les formes libres Cd^{+2} et Ni^{+2} étaient majoritaires sous toutes les doses simples et mixtes de Cd et/ou Ni testées ; quel que soit le pH, la température, la dose initiale testée et la dose reçue par chaque étage, sauf sous les doses $\text{Cd}_{(1000 \text{ ppm})}$ et $\text{Cd}_{(1000 \text{ ppm})} + \text{Ni}_{(120 \text{ ppb})}$, où CdCl^+ était la forme la plus dominante dans les trois étages du marais filtrant. Cela pourrait expliquer en partie pourquoi le rendement de l'élimination de Ni était plus efficace que celle de Cd (Tableaux : 16 à 19). La prédiction de la spéciation de CdCl_2 et/ou NiCl_2 a montré que les taux d'ion libre de Ni^{2+} oscillent entre 70,45 % et 93,18 %, tandis que pour le cation Cd^{2+} , il était entre 20,07 % et 48,06 %.

La température pourrait affecter la complexation du Cd et du Ni avec des ligands organiques synthétisés par les racines des plantes de *P. australis*. Ces ligands organiques sont difficiles à estimer avec précision, mais il est accepté que les constantes de stabilité de ces complexes Cd-ligand organique ou Ni-ligand organique ont tendance à diminuer à des températures élevées. De plus, une eau plus chaude pourrait réduire la liaison et la sorption du Cd et du Ni aux surfaces biotiques et abiotiques, libérant ainsi davantage d'ions métalliques libres dans l'eau.

Dans la présente étude, les résultats montrent que la dose initiale de CdCl_2 et/ou NiCl_2 utilisée pourrait être le facteur prédominant influençant la spéciation chimique, et éventuellement la phytodisponibilité et l'élimination du Cd et du Ni des eaux du marais filtrant. De manière globale, l'utilisation de la prédiction peut aider à avoir une idée des taux de chaque espèce chimique de Cd et Ni, mais cette approche reste limitée pour représenter toute la complexité des interactions affectant la spéciation réelle dans le milieu naturel.

Le dosage du Cd dans les eaux contaminées par les différentes doses simples et mixtes de CdCl_2 montre que le taux total d'élimination du Cd pour les trois étages sous la dose mixte $\text{Cd}_{(1000 \text{ ppm})} + \text{Ni}_{(120 \text{ ppb})}$ (22,97%) et la dose simple $\text{Cd}_{(1000 \text{ ppm})}$ (25,03%) ont été très proches. Il en est de même pour l'élimination du Ni où nous avons enregistré 35,77% et 37,7% pour $\text{Cd}_{(100 \text{ ppb})} + \text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$ et $\text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$, respectivement. Cependant, pour les doses mixtes ou individuelles de Cd 100ppm et/ou Ni 100ppm, l'efficacité d'élimination était nettement meilleure pour Ni sous la dose mixte de $\text{Cd}_{(100 \text{ ppm})} + \text{Ni}_{(100 \text{ ppm})}$ (63,7%) que sous la dose individuelle de $\text{Ni}_{(100 \text{ ppm})}$ (48,27%). Par contre, pour l'élimination du Cd, la tendance était différente puisque l'élimination du Cd était inférieure sous la dose mixte $\text{Cd}_{(100 \text{ ppm})} + \text{Ni}_{(100 \text{ ppm})}$

(52,09%) comparativement à la dose individuelle de Cd_(100 ppm) (59,37%).

Globalement, on peut dire qu'aux fortes doses de Cd ou de Ni, il semblerait que l'élimination de ces ETMs dans le marais filtrant ne soit pas très différente que l'on utilise des doses simples ou combinées (avec des doses faibles de Cd ou Ni). Il n'y a pas d'interaction significative entre les deux ETMs à ces niveaux de concentration. En revanche, quand les doses sont égales ([Cd] = [Ni] = 100 ppm), la présence de Ni diminue le taux d'élimination du Cd, passant de 59,37% à 52,09%. Par contre, le taux d'élimination du Ni augmente, passant de 48,27% à 63,7%. Ces résultats montrent que la spéciation, la phytodisponibilité et l'absorption de Cd et Ni par les plantes néoformées dans le marais filtrant pourraient être modifiées en présence des deux ETMs, mais seulement à certaines concentrations ou doses.

Plusieurs études ont montré que les ions libres Cd²⁺ et Ni²⁺ sont les formes les plus facilement absorbables par les racines des plantes. Selon Redjala *et al.* (2009), les racines des plantes absorbent principalement le Cd sous forme libre Cd²⁺ à un taux qui dépend de sa concentration à la surface de la racine. Berkelaar and Hale (2003), dans leur étude, ont montré que Cd²⁺ est la forme chimique la plus disponible pour les racines de blé. Cependant, le taux d'absorption dépend de la présence et de la concentration d'autres éléments tels que le SO₄ (sulfate) et l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique : un chélateur qui complexe les ETMs).

Aussi Hussain *et al.* (2010) ont indiqué que le cation Ni²⁺ dissous dans une solution hydroponique était la forme la plus absorbée par *Eichhornia crassipes* (jacinthe d'eau), et la diminution du Ni total dans les eaux est due à l'absorption de Ni²⁺ par les nouvelles plantules. En contaminant des eaux par des concentrations croissantes de NiCl₂ (25, 50 et 100 ppm), Amari *et al.* (2014) ont observé que les racines de *Mesembryanthemum crystallinum* étaient les sites préférentiels d'accumulation de Ni²⁺, tandis qu'une fraction a été transférée vers la partie aérienne.

Outre la température, le nombre croissant de plantes néoformées par bac passant de l'étage (1) à l'étage (3) observé dans notre étude, pourrait également contribuer à l'augmentation de l'élimination du Cd et du Ni. Les résultats du taux de néoformation de *P. australis* indiquent que ce taux est plus élevé aux étages (2) et (3) qu'à l'étage (1) du marais filtrant. L'augmentation progressive de la densité de plantes pourrait entraîner une amélioration de la rétention du Cd et du Ni. Les capacités d'absorption racinaire et de précipitation de Cd et Ni à la surface des racines deviennent importantes, ce qui pourrait renforcer l'élimination du Cd et du Ni dans le marais filtrant. De ce fait, l'efficacité de l'épuration des eaux contaminées par le Cd et/ ou Ni par un marais filtrant dépend des conditions environnementales, la composition de l'eau

contaminée, la spéciation et la phytodisponibilité de Cd et Ni, ainsi que la capacité d'adaptation et de tolérance de *P. australis*.

4.3 Dosage du Cd et Ni dans les plantes néoformées.

Le dosage du Cd et du Ni dans les parties aériennes et souterraines des plantes âgées de 8 semaines, a indiqué que l'accumulation de ces deux ETMs dépendait : de l'ETM utilisé et de la partie de la plante, et variaient en fonction de l'étage du marais filtrant où la plante avait poussé.

Les résultats dans les parties aériennes et souterraines des plantules ont révélé la présence d'une corrélation positive entre la dose initiale utilisée et la quantité accumulée, que la dose initiale testée soit individuellement ou combinée. La tendance d'accumulation dans la partie aérienne et souterraine sous les différentes doses utilisées a été comme suit :

$Cd_{(1000 \text{ ppm})} > Cd_{(100 \text{ ppm})} > Cd_{(100 \text{ ppb})}$ ainsi que sous Ni : $Ni_{(1000 \text{ ppm})} > Ni_{(100 \text{ ppm})} > Ni_{(120 \text{ ppb})}$.

Dans des microcosmes, des marais filtrants ou dans des solutions hydroponiques contaminées par le Cd et/ou le Ni, plusieurs études ont démontré que lorsque la quantité de ces deux ETMs augmente dans le milieu, l'accumulation par les plantes de *P. australis* augmente. Sous 1, 2, et 4 ppm de Cd (Mohsin *et al.*, 2023), ainsi que sous 4,4 et 17,6 μM de Cd (Alfadul et Al-Fredan, 2013). L'étude de Nawrot *et al.* (2021) a comparé l'accumulation de Cd et Ni chez des plantes de *P. australis* poussant dans un lac avec des plantes poussant dans des eaux contaminées par des rejets industriels. Les résultats ont montré que les plantes situées dans la zone polluée avaient accumulé davantage de Cd et de Ni que les plantes du lac. Dans une solution hydroponique contaminée par le Ni, Bello *et al.* (2018) ont observé une corrélation positive entre la concentration de Ni dans la solution et son accumulation par les plantes de *P. australis*. De même, dans diverses surfaces aquatiques, Astel *et al.* (2014), ont signalé une relation positive entre la concentration de Ni dans le milieu et son absorption par les plantes de *P. australis*.

Quant à l'accumulation de Cd et de Ni, nos résultats ont montré que la tendance d'accumulation de Cd dans la partie aérienne était différente de celle de Ni. Sous les doses individuelles de Cd, l'accumulation diminuait en allant de l'étage (1) à l'étage (3) ; tandis que sous les doses individuelles de Ni, l'accumulation de Ni augmentait en allant de l'étage (1) à (3). Sauf chez les plantules qui ont poussé sous les plus faibles doses de Cd ou Ni, où Cd et Ni ont été totalement absorbés et éliminés dans l'étage (2) et (1), respectivement.

Contrairement à ce qui a été observé dans les parties aériennes, la tendance d'accumulation dans les parties souterraines était plus ou moins similaire sous les deux ETMs, à savoir une

augmentation de l'accumulation allant de l'étage (1) à (3).

Cette divergence d'accumulation de Cd ainsi que Ni dans les étages du marais filtrant peut être due à plusieurs facteurs, notamment la dose reçue par chaque étage, la température et le pH, qui diffèrent d'un étage à un autre. Elle peut aussi être attribuée aux mécanismes qui contrôlent la biodisponibilité, l'absorption et la séquestration de Cd et Ni.

Selon Meychik *et al.* (2021), l'absorption du cadmium par les racines se fait généralement en deux étapes principales. Premièrement, une adsorption sur les racines par interactions électrostatiques entre le Cd^{2+} et les groupes carboxyles ($-\text{COOH}$: chargés négativement) des acides polygalacturonique et hydroxycinnamique présents sur les parois. À la suite de son adsorption au niveau des parois cellulaires des racines, le cadmium diffuse de façon passive et rapide dans l'apoplaste racinaire où il s'accumule. Dans la deuxième phase, le cadmium adsorbé traverse le cortex racinaire grâce à des transporteurs membranaires comme les *NRAMPs* (natural resistance-associated macrophage proteins) et finit par être absorbé à l'intérieur des cellules (voie symplastique). Il s'agit d'un processus actif qui dépend fortement de l'activité métabolique des plantes (Haider *et al.*, 2021). Selon Yi *et al.* (2023), le Cd pénètre dans la cellule par transport passif à des concentrations élevées et aussi peut également pénétrer dans les cellules racinaires par la voie de transport du Ca^{2+} , en raison de leurs similitudes en termes de charge (x^{+2}) et de rayon ionique (taille d'ion) $\text{Ca}^{2+} = 0,97 \text{ \AA}$ et $\text{Cd}^{2+} = 0,99 \text{ \AA}$.

Pour le Ni, après son adsorption électrostatique sur les parois racinaires, il est absorbé par les plantes soit par diffusion passive ou/et par transport actif. Les espèces solubles de Ni sont absorbées de manière passive, via un système de transport de cations. En revanche, les espèces chélatées sont absorbées par des mécanismes secondaires faisant intervenir le transport actif, utilisant des protéines de transport telles que les perméases. Les espèces de Ni insolubles pénètrent principalement dans les cellules racinaires par endocytose (Ahmad et Ashraf, 2011). L'endocytose est médiée par un récepteur de surface appelé la clathrine. Le processus est initié au niveau de foyers spécifiques de la membrane plasmique appelés puits recouverts de clathrine (Zelazny et Vert, 2014). Selon Van der Pas and Ingle (2019), à ce jour il n'a pas été mis en évidence de transporteur spécifique du Ni au niveau des racines. Il semblerait plutôt que l'absorption racinaire du nickel soit facilitée par des transporteurs de cations peu sélectifs, notamment certains transporteurs de la famille ZIP (ZRT/IRT-like). Ces transporteurs ZIP permettraient donc l'entrée non spécifique du nickel avec d'autres cations (Nishida *et al.*, 2015).

Outre la dose d'exposition et la présence ou non de transporteurs membranaires spécifiques, les différences de température et de pH enregistrées dans les eaux de chaque étage du marais filtrant pourraient également influencer la biodisponibilité et l'accumulation

différentielle de Cd et Ni. Au cours de notre expérimentation, les températures moyennes mesurées pendant la croissance des jeunes pousses de *P. australis* dans les différents étages du marais filtrant montraient une augmentation progressive de l'étage (1) à l'étage (3). Cette augmentation était associée à une accumulation plus importante de Cd et de Ni dans la partie souterraine. En revanche, dans la partie aérienne des plantes, l'accumulation de Ni augmentait, mais celle de Cd diminuait. Cela montre que la température influence différemment le transfert et l'accumulation de Cd et Ni dans la partie aérienne. L'augmentation de la température semble accentuer la transpiration et la vitesse d'absorption Cd et du Ni, ce qui explique l'accumulation plus importante de ces deux ETMs dans les parties souterraines. Cependant, dans la partie aérienne, la plante limite le transfert du cadmium, un élément toxique, contrairement au nickel, qui est considéré comme un oligo-élément essentiel. L'étude réalisée par Astel *et al.* (2014) portant sur les capacités de bioaccumulation du Cd et du Ni chez *P. australis* dans divers écosystèmes aquatiques en Grèce et en Pologne a révélé des résultats concordants avec nos propres observations concernant la tendance d'accumulation de Cd. En effet, une augmentation de la température de l'eau (de 14,9 à 23,4 °C), ainsi qu'une diminution de sa salinité, favorisent l'accumulation de Cd dans les tissus de *P. australis*. En revanche, contrairement à nos résultats, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la température et la salinité avec la bioaccumulation du Ni.

Cette différence dans l'accumulation du Ni par rapport à nos résultats peut s'expliquer par les spécificités biophysiques et hydrologiques de chaque écosystème aquatique (marais filtrant, lac, rivière, étang...). Ces particularités pourraient influencer différemment la biodisponibilité du Ni et son accumulation par *P. australis*. De plus, l'activité bactérienne, plus intense dans les eaux riches en matière organique, joue un rôle clé dans la complexation des oligo-éléments comme le Ni. L'oxydoréduction du Ni dans ces écosystèmes aquatiques plus ouverts, ainsi que les interactions entre les plantes et les sédiments, sont également des facteurs importants à prendre en compte. Selon Seshadri *et al.* (2015), les ETMs sont généralement moins phytodisponibles lorsqu'ils sont sous forme oxydée. Quant à l'influence de la température sur la libération des ETMs présentes dans les sédiments, Li *et al.* (2013), ont montré qu'à des températures élevées (30 à 35 °C), les taux de libération des ETMs comme le Cd et le Ni des sédiments augmentent plus rapidement qu'à basse température.

Sous les doses mixtes de Cd et de Ni, dans les parties aériennes et souterraines, la quantité de Cd et de Ni accumulée suit la même tendance décroissante entre les étages du marais filtrant : la quantité accumulée était dans l'ordre suivant : étage 1 > étage 2 > étage 3. Cette tendance était totalement différente de celle observée pour l'accumulation de Ni sous doses individuelles.

En revanche, pour l'accumulation de Cd, la tendance d'accumulation par étage semble différente seulement dans la partie racinaire par rapport aux doses individuelles. Ceci suggère que la présence simultanée des deux ETMs sous les différentes conditions de chaque étage (pH, température, etc.) modifie leur phytodisponibilité et par conséquent leur absorption racinaire et leur translocation vers les parties aériennes. Cela conduit à une tendance d'accumulation différente de celle observée sous doses individuelles. Plusieurs études antérieures ont mis en évidence la capacité de *P. australis* à absorber et accumuler le Cd et le Ni, en particulier au niveau de racinaire (Alfadul et Al-Fredan, 2013; Nawrot *et al.*, 2021; Zheng-yub, 2008).

En comparaison avec les résultats sous les doses individuelles, l'accumulation de Cd et Ni dans les racines sous les doses mixtes qui contiennent du Cd à 1000 ppm et du Ni à 1000 ppm ne semble pas avoir été affectée négativement par la présence de faibles doses de 100 ppb de Cd et 120 ppb de Ni. Au contraire, une légère augmentation a été observée. Cependant, l'accumulation de Cd sous la dose $Cd_{(100\text{ ppb})} + Ni_{(1000\text{ ppm})}$ et de Ni sous la dose $Cd_{(1000\text{ ppm})} + Ni_{(120\text{ ppb})}$ est au moins doublée dans les parties souterraines. Ceci démontre que les fortes doses de Cd ou de Ni ont un effet synergique sur l'accumulation des faibles doses de Ni ou de Cd, respectivement.

Les études s'intéressant spécifiquement à l'effet de faibles doses de Cd et de Ni sur l'accumulation de ces deux ETMs dans les plantes sont rares dans la littérature scientifique. Rodrigo *et al.* (1993), ont montré que le riz traité par du Cd et du Ni accumulait de grandes quantités de ces deux éléments traces ETMs, et que la présence de faibles doses de Ni n'affectait pas l'absorption du cadmium Cd. Ces constatations sont en accord avec nos résultats, suggérant qu'aux faibles concentrations, au niveau des transporteurs racinaires de *P. australis*, il semble ne pas y avoir de compétition entre le Ni et la forte dose de Cd, de même que la faible dose de Cd avec la forte dose de Ni.

Lorsque la dose mixte est composée des mêmes quantités de Cd et de Ni ($[Cd] = [Ni] = 100\text{ ppm}$), l'accumulation semble différente comparativement à celle obtenue sous les doses individuelles $Cd_{(100\text{ppm})}$ et $Ni_{(100\text{ppm})}$.

Dans la partie souterraine, l'accumulation de Cd et de Ni augmente de façon conséquente, passant de plus de 5 fois à 3 fois pour le Cd et de 25% à 4 fois pour le Ni. Dans la partie aérienne, l'accumulation ou la translocation du Cd double et triple selon l'étage. En revanche, sous Ni, l'accumulation double à l'étage (1), augmente de 20% à l'étage (2), et diminue de 12% à l'étage (3). Globalement, à doses égales de Cd et de Ni, le Ni semble avoir un effet synergique sur l'absorption et l'accumulation de Cd dans la partie racinaire ainsi que sa translocation vers la partie aérienne. En revanche, le Cd avait un effet synergique sur l'accumulation de Ni dans

la partie racinaire. Mais concernant la translocation vers la partie aérienne, l'effet synergique du Cd enregistré dans les étages (1) et (2) devient antagoniste avec l'augmentation de la température ($T\text{ }^{\circ}\text{C} = 27,68$) et l'acidification de l'eau ($\text{pH}=5,68$) enregistrées dans l'étage (3) du marais filtrant (Tableaux : 16 à 19).

Ceci montre bien que l'effet antagoniste ou synergique entre le Cd et le Ni, sur leur accumulation et leur translocation vers la partie aérienne chez les plantes *P. australis*, dépend de la dose de chaque ETM, de la température et du pH de l'eau, ainsi que de la spéciation chimique de ces ETMs. Les conditions particulières de la température et de pH de l'étage (3) pourraient entraîner un changement des formes chimiques du Cd et du Ni. La modification de spéciation du Cd et du Ni pourrait expliquer la diminution de la translocation de Ni dans la partie aérienne par rapport ce qui a été enregistré sous la dose individuelle $\text{Ni}_{(100\text{ppm})}$.

Sous la dose $\text{Cd}_{(100\text{ppm})}$ et $\text{Ni}_{(100\text{ppm})}$, nos résultats de la prédiction de la spéciation du Cd et du Ni ont montré que, en passant de l'étage (1) à l'étage (3), l'espèce chimique Ni^{2+} prédomine mais sa proportion diminue de façon notable au profit des formes complexes NiNH_3^{+2} , NiOH^+ et NiHPO_4 qui augmentent. Aussi le taux de CdCl^+ diminue de manière significative et progressive, passant de 30,72 % dans l'étage 1 à 16,63 % dans les eaux en sortie de l'étage (3). À notre connaissance, aucune étude n'a été publiée ni n'a examiné les effets du Cd sur l'accumulation de Ni chez *P. australis*. Cependant, l'effet antagonique mutuelle entre l'accumulation de Cd et le Ni a été démontrée chez d'autres espèces. Sous 50 μM de Cd et/ou 100 μM de Ni. Mnasri *et al.* (2015) ont constaté que l'accumulation de Cd et de Ni dans l'halophyte *Sesuvium portulacastrum* étaient plus élevées lorsqu'elles étaient appliquées individuellement que lorsqu'elles étaient appliquées ensemble, ce qui indique une compétition pour l'absorption. Thomas (2021), a observé qu'à concentration égale de Cd et de Ni dans le milieu, l'orge (*Hordeum vulgare*) qui appartient à la même famille (Graminées) que *P. australis* absorbait plus de deux fois plus de Cd que de Ni. De plus, la translocation du Ni vers la partie aérienne était nettement inférieure à celle du Cd.

Nous avons également constaté dans notre étude que l'accumulation et la translocation de Cd et Ni dans les organes des plantules de *P. australis* sont dose-dépendantes. Et le Cd et le Ni semblent s'accumuler davantage dans la partie souterraine que dans la partie aérienne, sauf sous la dose la plus élevée de Ni : $\text{Ni}_{(1000\text{ppm})}$ et $\text{Cd}_{(100\text{ppb})} + \text{Ni}_{(1000\text{ppm})}$.

Le facteur de transfert de Cd et Ni ($F_t = \text{partie aérienne} / \text{partie souterraine}$), montré que le transfert de Cd et Ni de la partie racinaire à la partie aérienne est inférieur à < 1 sous toutes les doses simples et mixtes de Cd et Ni, sauf sous la dose élevée de Ni qui varie entre 2,6 et 3,4 sous $\text{Ni}_{(1000\text{ppm})}$ et entre 2,8 à 3,5 sous $\text{Cd}_{(100\text{ppb})} + \text{Ni}_{(1000\text{ppm})}$.

Plusieurs études ont montré que l'accumulation et la séquestration de Cd et Ni sont plus élevées dans la partie souterraine que dans la partie aérienne (Bello *et al.*, 2018; Jin-mei, 2007; Xing, 2003). Selon (Dhir, 2013), *P. australis* accumule les ETMs dans ses racines et les transfère difficilement vers les parties aériennes. Cela pourrait être un mécanisme de défense pour éviter les effets potentiellement phytotoxiques de ces ETMs sur les organes photosynthétiques. Ces constatations sont cohérentes avec nos résultats, où qu'il s'agisse sous des doses simples ou combinées, les deux ETMs (Cd et Ni) montrent une tendance à une accumulation plus prononcée dans les parties souterraines par rapport à celles aériennes sauf sous la dose simple $\text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$ ou mixte $\text{Cd}_{(100 \text{ ppb})} + \text{Ni}_{(1000 \text{ ppm})}$.

Cela peut s'expliquer par des mécanismes physiologiques différentiels qui régulent la séquestration et la translocation du Ni. Sous des doses équivalentes et inférieures à 100 ppm, les plantes ont pu séquestrer le Ni dans la partie souterraine, mais à des doses élevées (Ni = 1000 ppm), le système homéostatique de séquestration semble dépassé. Le Ni parvient alors à passer les barrières physiques et biochimiques qui empêchent normalement son transfert vers les parties aériennes. En conséquence, sa mobilité au sein de la plante et vers la partie aérienne est augmentée.

5 Conclusion

Afin d'analyser l'efficacité épuratoire d'un marais filtrant expérimental à écoulement surfacique à trois étages, planté de *P. australis*, nous avons évalué la capacité de cette espèce à se multiplier par voie végétative et à générer de nouvelles plantules. Nous avons également analysé les quantités de Cd et de Ni accumulées par les plantes (parties aériennes et souterraines) ainsi que la quantité éliminée à chaque étage du marais filtrant.

Pour reproduire divers scénarios de contamination auxquels un marais filtrant pourrait être exposé, nous avons testé trois niveaux de doses : des doses faibles Cd_(100 ppb) et Ni_(120 ppb) représentatives d'une exposition naturelle de fond dans les eaux non polluées, les doses : Cd_(100 ppm) et Ni_(100 ppm) simulant une contamination par des activités agricoles ou industrielles, et des doses élevées (1000 ppm) représentant une situation de pollution extrême. Trois combinaisons de ces doses ont également été testées afin d'étudier les interactions potentielles entre ces deux ETMs.

Nos résultats ont révélé que les faibles doses de Cd_(100 ppb) et Ni_(120 ppb) n'ont pas eu d'effet négatif sur la néoformation de nouvelles plantules. En revanche, le Cd et le Ni, à des doses élevées Cd_(100 ppm) et (1000 ppm) et Ni_(100 ppm) et (1000 ppm), Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm), Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) et Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) inhibent la néoformation de plantules. Comparativement aux résultats des groupes témoins, une diminution de 58% et 41% a été observée respectivement sous Cd_(100 ppm) et Ni_(100 ppm). Une diminution de 73% et 62,5% sous Cd_(1000 ppm) et Ni_(1000 ppm). Cependant, sous les doses mixtes, nous avons enregistré une diminution de 29%, 75% et 69% respectivement sous Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm), Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) et Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm). L'inhibition du débourrement des bourgeons est due probablement à la pénétration de Cd et de Ni dans les rhizomes par les régions apicales des racines adventices ou latérales nouvellement formées, et éventuellement via les bourgeons des nœuds.

Sous les doses mixtes, le plus notable est que lorsque le Cd et le Ni sont présents ensembles en quantités égales, la dose Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) exerce un effet phytotoxique moindre que ces doses individuellement. Cela pourrait être dû à des mécanismes d'antagonisme entre ces deux ETMs. Nous avons constaté aussi que le Cd s'est révélé plus toxique que le Ni, inhibant davantage la multiplication végétative. Le Cd semble plus phytotoxique que le Ni, car il interfère fortement avec l'absorption de l'eau et induit un stress oxydatif plus intense dans les cellules des bourgeons des rhizomes. Il est bien connu pour se lier aux groupements thiols des protéines et des enzymes, perturbant ainsi leur fonction, ce qui entraîne une inhibition plus

marquée de la néoformation de nouvelles plantules de *P. australis*. Cette inhibition semble liée à la perturbation des processus cellulaires essentiels, comme la division cellulaire, l'activation des voies hormonales ou l'interférence avec la mobilisation des réserves nutritives stockées dans les rhizomes, ainsi que l'inhibition de certaines hydrolases.

La comparaison inter-étages montre que la néoformation s'améliore en allant de l'entrée (étage 1) vers la sortie (étage 3) sous presque toutes les doses testées. Cette amélioration est due à la diminution de l'effet phytotoxique résultant de la réduction de la concentration de Cd et de Ni que reçoit l'étage (2) de l'étage (1) et l'étage (3) de l'étage (2). L'amélioration du taux de néoformation en progressant de l'entrée vers la sortie du marais filtrant est attribuable à l'abattement et à l'absorption de ces deux ETMs par les plantules néoformées dans l'étage précédent et l'augmentation de la température qui a accompagné l'installation des rhizomes dans les étages (2) et (3) qui favorise davantage l'émergence de nouvelles plantules.

Effectivement, le dosage du Cd et du Ni dans les eaux des différents étages du marais filtrant, ainsi que dans les plantes néoformées, a montré que l'efficacité d'épuration augmente à mesure que l'eau progresse à travers ces étages. Les performances des étages se classent comme suit : étage (3) > étage (2) > étage (1). L'efficacité du système s'est révélée influencée par plusieurs facteurs, notamment la température, la spéciation chimique du Cd et du Ni, ainsi que la densité des plantes néoformées.

La température semble avoir un rôle crucial en affectant la spéciation chimique et la phytodisponibilité de Cd et de Ni. La température qui augmente allant de l'étage (1) à l'étage (3), favorise la solubilité de Cd et de Ni et leur phytodisponibilité pour les plantes. Cette augmentation de la température favorise également la néoformation de nouvelle plantule et la croissance contribuant ainsi à une meilleure rétention de Cd et de Ni. La modélisation de la spéciation chimique révèle que les formes ioniques libres (CdCl^+) et (Cd^{2+} et Ni^{2+}) qui sont les plus phytodisponibles, sont majoritaires dans la plupart des conditions. Cependant, le Ni présente une plus grande proportion de son espèce libre Ni^{2+} par rapport au cadmium (Cd^{2+}). Cela pourrait expliquer pourquoi le pourcentage total de Ni éliminé est supérieur à celui du Cd dans le marais filtrant, en particulier en présence de fortes doses de Cd et/ou de Ni.

Malgré les effets négatifs de Cd et/ou de Ni, *P. australis* a démontré une résilience significative et une capacité à maintenir un niveau minimal de régénération, même face à des concentrations élevées de Cd et de Ni dans les eaux du marais filtrant, ainsi qu'après leur accumulation dans les parties aériennes et souterraines des plantes. Cette capacité d'adaptation pourrait expliquer l'abattement du Cd, qui s'élevait à 52-59 % sous Cd ($_{100 \text{ ppm}}$) et à 22-25 % sous Cd ($_{1000 \text{ ppm}}$), et aussi l'abattement du Ni qui variait de 48-63 % sous Ni ($_{100 \text{ ppm}}$) et de 35-37 % sous Ni ($_{1000 \text{ ppm}}$).

Chapitre III : Réponses métabolique, enzymatique

1 Matériel et méthodes

1.1 Dispositif expérimental

Afin d'évaluer la réponse métabolique, enzymatique de *P. australis* dans des eaux contaminées par Cd et/ou de Ni, nous avons installé un dispositif composé de 16 récipients cylindrique de 11 cm de diamètre et de 50 cm de hauteur pouvant contenir 4,75 litres d'eau (figure 27). Chaque récipient représente un traitement ou un groupe :

- Un groupe témoin non traité : Eau distillée plus solution nutritive de Hoagland diluée.
- Six groupes traités avec des doses croissantes de Cd : 10 ; 30 et 100 ppb ; 100 ; 500 et 1000 ppm.
- Six groupes traités avec des doses croissantes de Ni : 30 ; 60 et 120 ppb ; 100 ; 500 et 1000 ppm.
- Trois groupes traités avec des doses mixtes de Cd + Ni :
- Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) ; Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) ; Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm).

Les trois doses élevées (100, 500 et 1000 ppm) ont été choisies pour évaluer la capacité des plantes à tolérer des niveaux élevés de Cd et de Ni. Les trois faibles doses de Cd et de Ni ont été utilisées pour évaluer le niveau de sensibilité des plantes. Concernant les doses mixtes, l'objectif de leur utilisation est de tester les effets de synergie ou d'antagonisme entre le Cd et le Ni.

1.2 Conditions de culture

Pour avoir le même nombre de plants dans chaque récipient du dispositif expérimental, nous avons d'abord fait germer des rhizomes pour les repiquer après. Des rhizomes avec un ou deux nœuds ont été placés dans des bouteilles. Chaque bouteille contenait l'un des 16 traitements (15 traitements plus le témoin). Après une période de 6-11 jours permettant l'émergence et le débourrement des nœuds, cinq rhizomes présentant des bourgeons ou nœuds débourrés, ont été repiquées ou transférées dans leur récipient respectif contenant la dose qui leur était assignée (figure 29).

Dans chaque récipient qui contient de l'eau contaminée par du Cd et/ou du Ni, en plus d'une solution hydroponique nutritive de Hoagland (Basal Salt Mixture : Sigma-Aldrich, Cat. no : H2395), cinq 5 rhizomes ont été placés dans des pots panier pour la culture hydroponique.

Le dispositif expérimental ensuite a été placé sous une serre avec des températures de $23 \pm 3^\circ\text{C}$ le jour et de $11 \pm 4^\circ\text{C}$ la nuit, ainsi qu'une intensité lumineuse ≥ 5400 lux et une photopériode de 12 heures. L'alternance des températures et de la photopériode était similaire à celles des conditions réelles au printemps dans le nord-est de l'Algérie, offrant ainsi des conditions propices au débourrement de nœuds des rhizomes et l'émergence de nouvelle plantule *P. australis* (Alfadul et Al-Fredan, 2013; Gorai *et al.*, 2006).

Après 10 semaines de début du débourrement des bourgeons des rhizomes nous avons évalué les réponses métaboliques et enzymatiques des plants de *P. australis*, nous avons quantifié la chlorophylle, les protéines, les lipides et mesuré la réponse enzymatique du système antioxydant de la Gaiacol peroxydase (EC 1.11.1.7 ; GPOx), la catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) et la glutathion-S-transférase (GST) (EC 2.5.1.18). Le dosage de la chlorophylle, protéine, lipide et la réponse des enzymes du système antioxydant ont été réalisés au laboratoire G.F. Ingrassia de l'Université de Catane, Italie.

La zone où nous avons installé notre dispositif expérimental ($37^\circ26'21.5''\text{N}$ $15^\circ04'31.3''\text{E}$) se trouve dans la ville de Catane, Italie. La région est caractérisée par un climat de type méditerranéen tempéré, avec des étés chauds et secs de juin à août, et des hivers doux et relativement pluvieux. Les températures diurnes varient de 15°C en janvier à 36°C en août. Les températures nocturnes les plus élevées pourraient être enregistrées en août avec 21°C , les plus basses en janvier avec -3°C . Le mois le plus sec est juillet et le mois où il pleut le plus est décembre (Liuzzo *et al.*, 2017).

1.3 Dosage du Cadmium et du Nickel dans les plantes

Un (01) g de la partie aérienne et racinaire de chaque traitement de chaque étage a été prélevé et déposé dans des tubes de digestion. Huit (8) ml de HNO_3 (65 %) et 1 ml de H_2O_2 (30 %) ont été ajoutés, et le tout a ensuite été digéré à 85°C pendant 120 minutes à l'aide d'un système de digestion DigiPrep. La solution dans les tubes a ensuite été diluée avec de l'eau MilliQ® jusqu'à un volume final de 50 ml. Ensuite, le tout a été filtré en utilisant des filtres seringues en nitrocellulose ($0,45 \mu\text{m}$). La détection et la quantification des Cd et Ni ont été réalisées par la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) (NexION® 300D: perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA), en suivant la méthode EPA 6020, en utilisant Yttrium (Y) et Rhénium (Re) comme étalons.

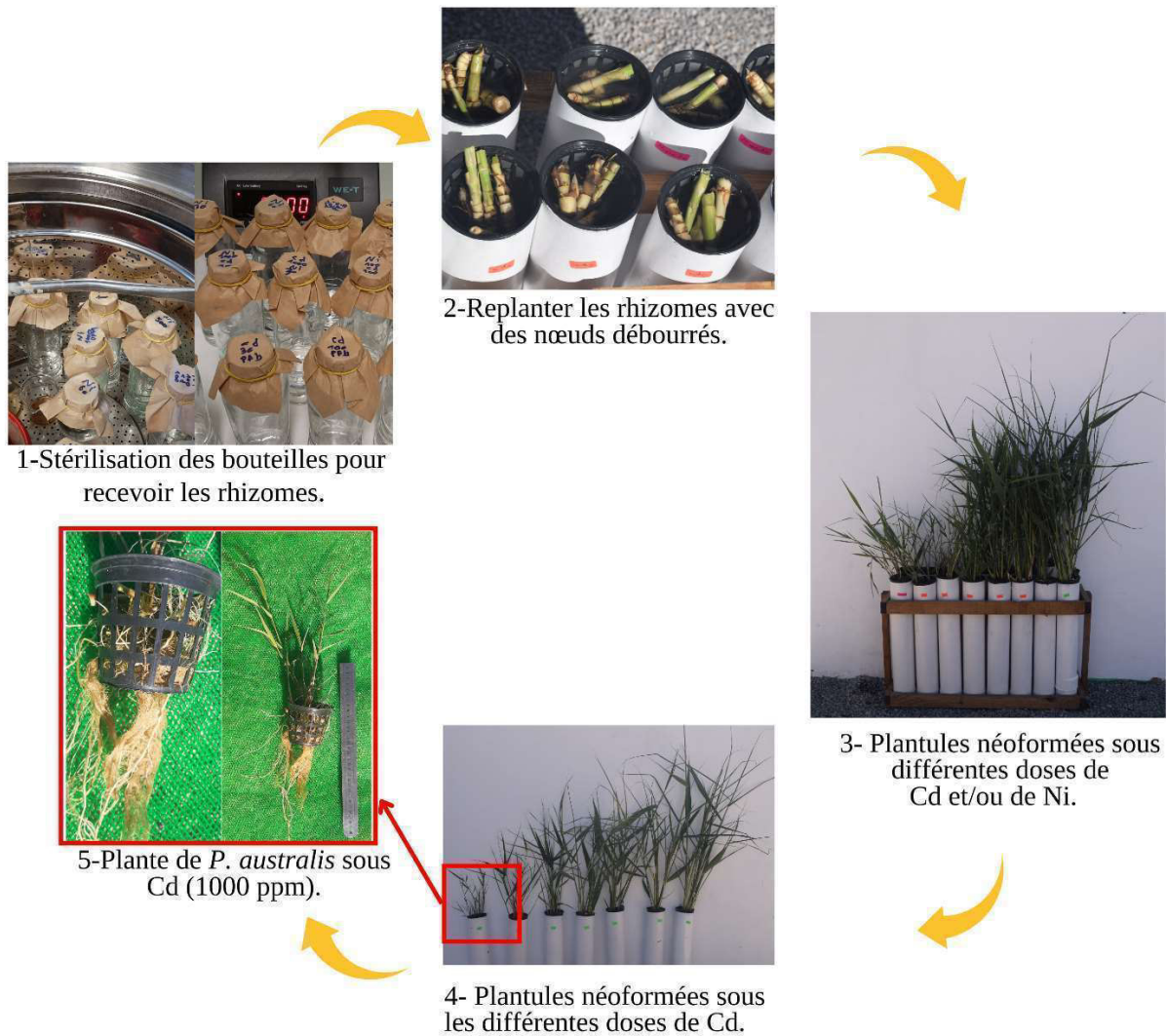


Fig. 29 : Dispositif expérimental installé pour l'évaluation des réponses métaboliques et enzymatiques chez des plantes de *Phragmites australis* âgées de 10 semaines, exposées à différentes doses simples et combinées de Cd et/ou de Ni.

1.4 Dosage de la chlorophylle total

L'extraction et le dosage de la chlorophylle a été réalisée selon le protocole établi par Porra *et al.* (1989) et Porra (2002). Un échantillon de 1g de feuilles de *P. australis*, préalablement découpées, a été broyé dans un mortier en présence de 20 ml d'acétone à 80%. Afin d'assurer ainsi une meilleure fiabilité des résultats, nous avons effectué un échantillonnage dans les feuilles basales, médianes et apicales mais seulement si ces jeunes feuilles sont complètement déployées. Une fois la partie médiane des feuilles totalement broyée, la solution a été filtrée et conservée à l'abri de la lumière dans des récipients opaques afin de prévenir l'oxydation. Le dosage a ensuite été effectué par spectrophotométrie (Shimadzu-mini1240). Les mesures d'absorbance ont été réalisées à deux longueurs d'onde distinctes, DO = 646,6 nm et 663,6 nm, après étalonnage préalable de l'appareil à l'aide d'une solution témoin d'acétone à 80%. Si l'absorbance est supérieure à 0,8 les solutions doivent être diluées avec 1 ml d'acétone à 80 % et remesurées. Les teneurs en chlorophylle ont finalement été calculées au moyen de formules :

$$\text{Chlorophylle a (ug/ml)} = 12.25 (\text{DO } 663,6) - 2.55 (\text{DO } 646,6)$$
$$\text{Chlorophylle b (ug/ml)} = 20.31 (\text{DO } 646,6) - 4.91 (\text{DO } 663,6)$$
$$\text{Chlorophylle total (ug/ml)} = 7.34 (\text{DO } 663,6) + 17.76 (\text{DO } 646,6)$$

1.5 Dosages des lipides totaux

La quantification des lipides totaux a été réalisée selon la méthode décrite par Goldsworthy *et al.* (1972), tandis pour l'extraction nous avons utilisé le protocole établi par (Shibko *et al.*, 1967). Pour chaque échantillon composé de 0,5 g (feuilles, tiges et racines), le matériel végétal a été découpé et macéré dans 10 ml d'acide tri-chloroacétique à 20 %. Après un broyage, une filtration et une centrifugation à 5000 tours par minute pendant 10 minutes, le surnageant a été éliminé, tandis que le culot a été conservé. Par la suite, 1 ml d'un mélange éther/chloroforme (1/1) a été ajouté au culot. Une seconde centrifugation (5000 tours par minute pendant 10 minutes) a permis d'obtenir deux phases distinctes : un culot contenant les protéines et un surnageant renfermant les lipides. Une aliquote de 100 µl du surnageant a été prélevée et mélangée à 1 ml d'acide sulfurique, puis incubée dans un bain-marie à 100 °C pendant 10 minutes. Après refroidissement, 200 µl de l'extrait ont été prélevés et combinés à 2,5 ml d'un réactif sulfophospho-vanillinique à 85 % (0,38 g de vanilline + 195 ml d'acide orthophosphorique + 55 ml d'eau distillée). Après une incubation de 30 minutes à l'obscurité, la lecture spectrophotométrique (Shimadzu-mini 1240) a été effectuée à une longueur d'onde de 530 nm. Les concentrations ont été calculées à partir de l'équation déduite

de la courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution mère préparée avec de l'huile de tournesol (Annexe. 01 : Courbe. 01).

1.6 Dosage des protéines

Pour la quantification des protéines, la méthode de Bradford (1976) a été utilisée, employant la sérum albumine bovine (BSA) comme standard, sur le même échantillon utilisé pour doser les lipides, on récupère le culot issu de la deuxième centrifugation auquel on a ajouté 1ml du NaOH (0.1N) et on agite énergétiquement pour la dissolution des protéines. Un volume de 100 µl de l'extrait a été prélevé et mélangé à 4 ml de réactif de coloration au Bleu Brillant de Coomassie (BBC) (50 mg de BBC + 50 ml d'acide orthophosphorique à 85 %, complété à 500 ml avec de l'eau distillée). Les échantillons ont ensuite été directement analysés par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm. Le calcul des concentrations en protéines a été effectué à partir de l'équation dérivée de la courbe d'étalonnage réalisée avec une solution d'albumine de sérum bovin (Annexe. 01 : Courbe. 02).

1.7 Dosage des enzymes du système antioxydant

L'activité de la gaïacol peroxydase (EC 1.11.1.7 ; GPOx), l'activité de la catalase (EC 1.1.1.6 ; CAT) et l'activité glutathion-S-transférase (EC 2.5.1.18 ; GSTs) ont été mesurées dans les trois organes : feuille, tige et racine des plantes exposées à différentes doses de Cd et/ou Ni. Chaque échantillon de 0,5 g été prélevé et conservé à -80 °C (dans de l'azote liquide) jusqu'au début de l'analyse. La détermination quantitative des activités enzymatiques de la CAT, de la GPOX et de la GST est effectuée par spectrophotométrie, en appliquant l'équation établie par Servais (2004). Pour le dosage des enzymes du système antioxydant, les mêmes protocoles que ceux utilisés pour le dosage dans les plantules issues de graines de *P. australis* (chapitre I : pages 52 et 53) ont été suivis. La CAT (Cakmak et Horst, 1991), la GPOx (Fielding et Hall, 1978; Lin et Kao, 1999; Loggini *et al.*, 1999) et la GST (Habig *et al.*, 1974)

2 Analyse statistique

Un dispositif en split-plot a été utilisé pour l'analyse des résultats. Les teneurs en chlorophylle totale, en lipides, en protéines, ainsi que l'activité des enzymes du système antioxydant (GPOx, CAT, GST) ont été exprimées sous forme de moyennes de deux expériences indépendantes (n = 10 ; 5 par répétition) (\pm écart-type). À l'aide d'une analyse de variance à un facteur (ANOVA), avec un seuil de $p \leq 0,05$, les résultats ont été testés pour identifier les différences significatives entre les moyennes des différents traitements avec Cd

et/ou Ni. Le test de Tukey, avec $p = 0,05$, a été utilisé pour comparer les moyennes des résultats significativement différents.

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel IBM SPSS version 25 (SPSS Inc., 2011). Enfin, afin d'évaluer et d'identifier de possibles relations, synergies ou oppositions dans la régulation métabolique et la réponse enzymatique dans les différents organes de *P. australis* soumis à diverses doses (faibles et élevées, simples et combinées) de Cd et de Ni, des corrélogrammes ont été réalisés avec le logiciel R.

3 Résultats

3.1 Accumulation du Cadmium et du Nickel dans les organes de *P. australis*

Les résultats de l'accumulation du Cd et du Ni dans les différents organes (feuilles, tiges, racines) de *P. australis* en fonction des différentes doses simples et mixtes de Cd et/ou Ni appliquées sont représentés dans les tableaux 25, 26, 27 et 28.

À faibles doses (10, 30 et 100 ppb), le Cd s'accumule principalement dans les racines, puis dans les tiges, et enfin dans les feuilles. À fortes doses (100, 500 et 1000 ppm), le Cd s'accumule davantage dans les racines, puis dans les feuilles et les tiges.

Concernant l'accumulation de Ni : À faibles doses (30 ; 60 et 120 ppb), le Ni s'accumule principalement dans les racines, tandis que dans les tiges et les feuilles, l'accumulation est plus ou moins similaire. À fortes doses (100 ; 500 et 1000 ppm), nous constatons qu'avec l'augmentation de la dose, l'accumulation s'inverse de la racine vers la feuille, tandis que dans les tiges, l'accumulation est la plus faible.

Sous les doses mixtes Cd+Ni : En présence d'une forte dose de Cd (1000 ppm) et d'une faible dose de Ni (120 ppb), l'accumulation de Cd et Ni est supérieure dans les racines que dans les feuilles et les tiges. Sous Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm), le Cd et le Ni s'accumulent préférentiellement dans les racines, puis dans les feuilles et les tiges.

Sous Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm), le Ni s'accumule massivement dans les feuilles, et la quantité accumulée dans les racines est presque la moitié de celle accumulée dans les feuilles. Pour le Cd, il est détecté seulement dans les racines.

Tab. 25 : Accumulation de Cd dans les différents organes de *P. australis* en fonction des doses de Cd appliquées.

Cd Traitement	[Cd] en ppb ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS) et ppm (mg.kg^{-1} MS)		
	Feuille	Tige	Racine
Control	Nd	Nd	Nd
10 ppb	4,38 ± 0,31	5,83 ± 0,76	36,86 ± 4,95
30 ppb	15,59 ± 4,54	30,62 ± 5,19	335,08 ± 31,64
100 ppb	33 ± 5,95	34,97 ± 3,40	300,19 ± 45,96
100 ppm	0,39 ± 0,026	0,80 ± 0,11	2,39 ± 0,33
500 ppm	10,01 ± 0,91	7,08 ± 0,25	12,19 ± 1,71
1000 ppm	16,57 ± 2,38	8,03 ± 1,28	20,41 ± 3,04

Tab. 26 : Accumulation de Ni dans les différents organes de *P. australis* en fonction des doses de Ni appliquées

Ni Traitement	[Ni] en ppb ($\mu\text{g.kg}^{-1}$ MS) et ppm (mg.kg^{-1} MS)		
	Feuille	Tige	Ra�ine
Control	0,83 \pm 0,29	1,58 \pm 0,16	3,43 \pm 0,61
30 ppb	19,32 \pm 4,09	16,19 \pm 4,89	65,32 \pm 11,61
60 ppb	19,18 \pm 1,54	30,75 \pm 5,73	144,6 \pm 18,18
120 ppb	20,09 \pm 5,47	22,82 \pm 2,34	335,40 \pm 41,82
100 ppm	0,64 \pm 0,06	0,45 \pm 0,04	1,67 \pm 0,09
500 ppm	10,13 \pm 0,62	1,95 \pm 0,33	6,81 \pm 1,09
1000 ppm	23,92 \pm 2,88	4,72 \pm 0,39	10,87 \pm 4,16

Tab. 27 : Accumulation de Cd dans les différents organes de *P. australis* en fonction des doses mixtes de Cd +Ni appliquées.

Traitement Cd+Ni	Cd en ppm (mg.kg^{-1} MS)		
	Feuille	Tige	Ra�ine
Control	Nd	Nd	Nd
Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb)	15,20 \pm 0,93	6,01 \pm 0,77	20,61 \pm 1,35 ^c
Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm)	3,09 \pm 0,31	0,92 \pm 0,08	11,87 \pm 1,81 ^b
Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm)	Nd	Nd	0,37 \pm 0,06 ^c

Tab. 28 : Accumulation de Ni dans les différents organes de *P. australis* en fonction des doses mixtes de Cd +Ni appliquées.

Traitement Cd+Ni	Ni en ppm (mg.kg^{-1} MS)		
	Feuille	Tige	Ra�ine
Control	8,3.10 ⁻⁴ \pm 2,9.10 ⁻⁴	1,58.10 ⁻³ \pm 1,6.10 ⁻⁴	3,43.10 ⁻³ \pm 6,1.10 ⁻⁴
Cd(1000 ppm) + Ni (120 ppb)	0,20 \pm 0,04	0,020 \pm 0,003	0,55 \pm 0,08
Cd(100 ppm) + Ni (100 ppm)	2,13 \pm 0,07	0,98 \pm 0,08	6,92 \pm 0,25
Cd(100 ppb) + Ni (1000 ppm)	22,52 \pm 1,74	4,84 \pm 0,14	14,76 \pm 0,37

3.2 Teneur en chlorophylle totale

Les résultats de la teneur en chlorophylle totale dans les feuilles des plantes de *P. australis* exposées à des doses simples et combinées de Cd et/ou de Ni sont récapitulées dans le tableau (29). L'analyse de variance à un facteur (dose) effectuée sur les résultats a mis en évidence des différences statistiquement significatives pour les trois traitements : Cd ($F_{6,63} = 365,62$; $p = 0,000 < 0,05$), Ni ($F_{6,63} = 315,23$; $p = 0,000 < 0,05$), et Cd+Ni ($F_{6,63} = 394,13$; $p = 0,000 < 0,05$).

Sous les fortes doses de Cd et de Ni (100 ; 500 et 1000 ppm), les résultats indiquent qu'à mesure que la dose augmentait, les valeurs moyennes de la teneur en chlorophylle totale diminuaient de manière significative. Sous les traitements Cd (500 ppm) et Cd (1000 ppm), la teneur en chlorophylle totale a chuté de plus de 75 % par rapport au témoin (14,74 µg/ml). Une tendance similaire a été enregistrée sous les fortes doses de Ni, mais la diminution était moins importante que celle observée sous Cd, où la diminution atteignait 66 % sous Ni (1000 ppm) et 59 % sous Ni (500 ppm). Globalement, les résultats, indiquant un effet néfaste plus élevé du Cd.

Sous les faibles doses de Cd [Cd(10ppb) ; Cd(30ppb) et Cd(100ppb)], aucune différence significative n'a été observée par rapport au groupe témoin. En revanche, les faibles doses de Ni [Ni(30ppb) ; Ni(60ppb) ; Ni(120ppb)] ont entraîné une légère augmentation de la teneur en chlorophylle totale ; 6,5 % sous Ni(30ppb) et Ni(60ppb), et 7,4 % sous Ni(120ppb).

Les combinaisons : Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) ; Cd (100 ppm) + Ni (1000 ppm) et Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) ont entraîné une diminution significative de la teneur en chlorophylle totale par rapport aux résultats chez les plantes témoins. Cependant, ces valeurs restaient légèrement supérieures à celles observées sous les hautes doses individuelles, sauf pour la dose Cd(100 ppm) + Ni(100ppm), où la teneur semblait être plus faible comparativement à celle obtenue sous la dose Ni (100 ppm) et plus élevée que celle observée sous Cd (100 ppm).

Tab. 29 : La teneur en chlorophylle totale dans les feuilles des plantes de *P. australis* exposées à des doses simples et combinées de Cd et/ou Ni. Les valeurs représentent les moyennes ($\pm Sd$), $n = 10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différentes dans une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Chlorophylle ug.ml ⁻¹					
Traitement	Cd	Traitement	Ni	Traitement	Cd+Ni
Control	14,74 \pm 0,53 ^a	Control	14,74 \pm 0,53 ^b	Control	14,74 \pm 0,53 ^a
10 ppb	14,90 \pm 0,66 ^a	30 ppb	15,70 \pm 0,77 ^{ab}	Cd(1000ppm)+Ni(120ppb)	3,53 \pm 0,57 ^d
30 ppb	14,31 \pm 0,35 ^a	60 ppb	15,71 \pm 0,43 ^{ab}	Cd(100 ppm)+Ni(100ppm)	7,81 \pm 0,85 ^b
100 ppb	14,81 \pm 1,04 ^a	120 ppb	16,01 \pm 0,70 ^a	Cd(100 ppb)+Ni(1000 ppm)	5,27 \pm 0,34 ^c
100 ppm	7,26 \pm 0,89 ^b	100 ppm	8,92 \pm 0,76 ^c	/	/
500 ppm	3,58 \pm 0,35 ^c	500 ppm	6,04 \pm 0,66 ^d	/	/
1000 ppm	3,31 \pm 0,42 ^c	1000 ppm	4,99 \pm 0,31 ^d	/	/

3.3 Teneur en protéines

Les résultats de la teneur en protéines dans les feuilles, les tige et les racines des plantes de *P. australis* exposées à des doses simples et combinées de Cd et de Ni sont récapitulés dans les tableaux 30 ; 31 et 32.

Que ce soit pour les feuilles, les tiges ou les racines, les différentes doses de Cd ont eu un effet statistiquement significatif sur les teneurs en protéines : feuille ($F_{6,63} = 151,62$; $p = 0,000 < 0,05$) ; tige ($F_{6,63} = 92,82$; $p = 0,000 < 0,05$), et racine ($F_{6,63} = 199,83$; $p = 0,000 < 0,05$).

Sous les faibles doses de Cd, bien qu'une légère augmentation ait été enregistrée, particulièrement dans les feuilles et les racines, aucune différence significative n'a été observée par rapport au groupe témoin. En revanche, sous les fortes doses de Cd, les résultats indiquent qu'à Cd_(100 ppm), une augmentation significative des teneurs en protéines a été notée dans les feuilles et les racines, mais pas dans les tiges. Sous les doses Cd_(500 ppm) et Cd_(1000 ppm), on observe une diminution drastique des teneurs en protéines dans les feuilles et les tiges par rapport au contrôle. Dans les racines, cependant, la teneur en protéines a fortement augmenté sous 500 ppm à 49,38 mg.g⁻¹ mais a diminué à 7,86 mg.g⁻¹ sous 1000 ppm.

Sous les six doses de Ni, les résultats de la teneur en protéines étaient similaires à ceux enregistrés sous Cd. L'ANOVA effectuée sur les résultats a mis en évidence des différences statistiquement significatives entre les teneurs en protéines pour le facteur dose dans chaque organe : feuille ($F_{6,63} = 237,268$; $p = 0,000 < 0,05$), tige ($F_{6,63} = 159,762$; $p = 0,000 < 0,05$), et racine ($F_{6,63} = 167,899$; $p = 0,000 < 0,05$) (Tab. 31).

De la même manière que sous les faibles doses de Cd, sous les faibles doses de Ni, aucun effet significatif n'a été observé sur les teneurs en protéines dans les différentes parties de la plante par rapport au contrôle. Les valeurs étaient très proches de celles enregistrées sous Cd. Pareil qu'à Cd_(100ppm), à Ni_(100 ppm) on observe une augmentation significative des teneurs en protéines dans les feuilles, ainsi que dans les racines. Cependant, contrairement à ce qui a été enregistré sous Cd_(100ppm), la teneur en protéines diminue significativement dans les tiges. Aux fortes doses de Ni_(500ppm) et à Ni_(100ppm), une forte diminution des teneurs en protéines est observée dans tous les organes par rapport au contrôle. Sous Ni_(100ppm), les résultats sont très proches de ceux enregistrés sous Cd_(100ppm), mais la dose Ni_(500ppm) semble affecter davantage la teneur en protéine dans les racines et moins dans les feuilles que la dose Cd_(500ppm).

Sous les doses mixtes, l'analyse statistique a montré que par rapport au contrôle, ces doses ont entraîné une diminution significative des valeurs moyennes de la teneur en protéines dans la feuille ($F_{6,63} = 328,41$; $p = 0,000 < 0,05$), tige ($F_{6,63} = 315,90$; $p = 0,000 < 0,05$), et racine ($F_{6,63} = 374,95$; $p = 0,000 < 0,05$). Comparativement aux doses individuelles, l'ajout de faibles

doses de de Cd_(100 ppb) et de Ni_(120ppb) au Ni_(1000 ppm) et Cd_(1000 ppm), respectivement, semble légèrement améliorer la teneur en protéines dans tous les organes des plantes exposées aux doses simples Ni_(1000 ppm) et Cd_(1000 ppm). En revanche, sous Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm), on observe une diminution importante de la teneur en protéines par rapport aux doses individuelles de Cd_(100 ppm) et de Ni_(100 ppm), particulièrement dans les racines et les feuilles.

Tab. 30 : La teneur en protéines dans les organes de *P. australis* sous des doses simples de Cd. Les valeurs représentent les moyennes ($\pm Sd$) de $n = 10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différentes dans une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Cd Traitement	Protéines (mg.g ⁻¹ MF)		
	Feuille	Tige	Racine
Control	44,7 \pm 3,15 ^b	26,07 \pm 1,84 ^a	32,72 \pm 2,31 ^c
10 ppb	45,79 \pm 3,12 ^b	26,37 \pm 1,8 ^a	33,55 \pm 2,12 ^c
30 ppb	45,14 \pm 2,25 ^b	26 \pm 1,4 ^a	33,14 \pm 1,33 ^c
100 ppb	47,58 \pm 4,69 ^b	26,77 \pm 2,64 ^a	32,5 \pm 3,01 ^c
100 ppm	54,08 \pm 3,65 ^a	23,59 \pm 2,53 ^a	41,85 \pm 2,34 ^b
500 ppm	14,63 \pm 1,53 ^c	10,13 \pm 1,06 ^b	49,38 \pm 0,98 ^a
1000 ppm	12,26 \pm 1,88 ^c	8,49 \pm 1,3 ^b	7,86 \pm 1,21 ^d

Tab. 31 : La teneur en protéines dans les organes de *P. australis* sous des doses simples de Ni. Les valeurs représentent les moyennes ($\pm Sd$) de $n = 10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Ni Traitement	Protéines (mg.g ⁻¹ MF)		
	Feuille	Tige	Racine
Control	44,7 \pm 3,15 ^b	26,07 \pm 1,84 ^a	32,72 \pm 2,31 ^b
30 ppb	44,6 \pm 1,06 ^b	27,20 \pm 1,79 ^a	29,74 \pm 1,98 ^b
60 ppb	45,77 \pm 1,98 ^b	27,22 \pm 1,14 ^a	29,3 \pm 1,26 ^b
120 ppb	45,49 \pm 2,29 ^b	27,48 \pm 2,07 ^a	30,05 \pm 2,44 ^b
100 ppm	51,7 \pm 1,16 ^a	16,94 \pm 0,62 ^b	48,29 \pm 3,97 ^a
500 ppm	23,58 \pm 1,05 ^c	12,6 \pm 0,56 ^c	15,1 \pm 0,67 ^c
1000 ppm	16,73 \pm 1,75 ^d	8,94 \pm 0,94 ^d	10,71 \pm 1,12 ^c

Tab. 32 : La teneur en protéines dans les organes de *P. australis* sous des doses combinées de Cd et de Ni. Les valeurs représentent les moyennes ($\pm Sd$) de $n = 10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Traitement Cd+Ni	Protéines (mg.g ⁻¹ MF)		
	Feuille	Tige	Racine
Control	44,7 \pm 3,15 ^a	26,07 \pm 1,84 ^a	32,72 \pm 2,31 ^a
Cd _(1000ppm) + Ni _(120ppb)	15,06 \pm 0,7 ^c	9,2 \pm 0,43 ^c	9,44 \pm 0,44 ^c
Cd _(100 ppm) + Ni _(100ppm)	35,1 \pm 1,27 ^b	21,45 \pm 0,78 ^b	22 \pm 0,8 ^b
Cd _(100 ppb) + Ni _(1000 ppm)	17,74 \pm 0,39 ^c	10,84 \pm 0,24 ^c	11,12 \pm 0,24 ^c

3.4 Teneur en lipide

Les résultats de la teneur en lipide dans les feuilles, tiges et racines des plantes de *P. australis* soumis à différents doses simples et combinées de Cd et de Ni sont récapitulée dans le tableau (33 ; 34 et 35). L'analyse statistique a mis en évidence des différences significatives pour les trois traitements et dans les trois organes.

Les résultats de l'analyse de variance ont mis en évidence un effet hautement significatif ($p < 0,05$) des différentes doses de Cd sur les teneurs en lipides dans chacun des organes étudiés : feuille ($F_{6,63} = 86,22$; $p = 0,000 < 0,05$) ; tige ($F_{6,63} = 246,38$; $p = 0,000 < 0,05$), et racine ($F_{6,63} = 486,43$; $p = 0,000 < 0,05$).

Les différentes doses de Ni ont également affecté de manière significative les niveaux lipidiques foliaires ($F_{6,63} = 297,17$; $p = 0,000 < 0,05$) ; caulinaires ($F_{6,63} = 273,18$; $p = 0,000 < 0,05$), et radiculaires ($F_{6,63} = 196,57$; $p = 0,000 < 0,05$).

L'exposition combinée au Cd et au Ni a induit aussi des variations significatives des niveaux de lipides dans chacun des organes des plantes : feuille ($F_{6,63} = 393,92$; $p = 0,000 < 0,05$) ; tige ($F_{6,63} = 428,57$; $p = 0,000 < 0,05$), et racine ($F_{6,63} = 215,81$; $p = 0,000 < 0,05$). Le test post-hoc de Tukey a révélé des différences non significatives entre les faibles doses de Cd et aussi de Ni par rapport au groupe contrôle. Cependant, des niveaux lipidiques significativement inférieurs à ceux des plantes témoins ont été observés dans les tiges exposées à Cd_(100 ppb). En revanche, un niveau de lipides supérieur au contrôle a été enregistré dans les tiges des plantes exposées à Ni_(120 ppb).

Sous l'exposition aux fortes doses de Cd et de Ni, une diminution des teneurs en lipides a été observée dans les feuilles, les tiges et les racines avec l'augmentation des doses appliquées. Les différences entre les résultats sous Cd_(100ppm), Cd_(500ppm) et Cd_(1000ppm) n'étaient pas significatives, en revanche, une différence significative a été mise en évidence entre les résultats sous les doses Ni_(100ppm), Ni_(500ppm) et Ni_(1000ppm). De manière générale, dans l'ensemble des organes étudiés, l'effet du Cd sur les niveaux lipidiques s'est avéré plus marqué que celui du Ni, à l'exception du traitement Cd_(100ppm) (2,99 mg.g⁻¹ MF) qui a induit des teneurs en lipides supérieures à Ni_(100ppm) (2,3 mg.g⁻¹ MF).

Sous les doses mixtes, l'analyse statistique a révélé une diminution significative des teneurs moyennes en lipides par rapport au contrôle dans l'ensemble des organes étudiés (feuilles, tiges et racines). Comparativement aux doses individuelles, l'addition de faibles doses de Cd_(100 ppb) et Ni_(120ppb) au Ni_(1000 ppm) et Cd_(1000 ppm), respectivement semble légèrement améliorer les niveaux lipidiques foliaires et radiculaires, mais pas caulinaires.

En revanche, la dose Cd_(100 ppm)+Ni_(100 ppm) a entraîné une baisse des teneurs en lipides par

rapport aux expositions individuelles Cd (100 ppm) et Ni (100 ppm) dans les feuilles, une augmentation dans les racines, tandis que dans les tiges, cette dose combinée a induit une teneur supérieure à celle sous Cd seul mais inférieure à celle sous Ni seul.

Tab. 33 : La teneur en lipides dans les organes de *P. australis* sous des doses simples de Cd. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Cd Traitement	Lipides ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)		
	Feuille	Tige	Racine
Control	4,71 \pm 0,34 ^a	1,79 \pm 0,13 ^a	6,92 \pm 0,5 ^a
10 ppb	4,86 \pm 0,52 ^a	1,78 \pm 0,15 ^a	6,89 \pm 0,46 ^a
30 ppb	4,72 \pm 0,31 ^a	1,77 \pm 0,1 ^a	6,96 \pm 0,28 ^a
100 ppb	5,05 \pm 0,85 ^a	1,56 \pm 0,14 ^b	6,36 \pm 0,19 ^a
100 ppm	2,99 \pm 0,36 ^b	0,37 \pm 0,06 ^c	1,24 \pm 0,21 ^b
500 ppm	1,13 \pm 0,15 ^c	0,33 \pm 0,06 ^c	1,04 \pm 0,18 ^b
1000 ppm	0,8 \pm 0,12 ^c	0,30 \pm 0,05 ^c	0,96 \pm 0,14 ^b

Tab. 34 : La teneur en lipides dans les organes de *P. australis* sous des doses simples de Ni. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Ni Traitement	Lipides ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)		
	Feuille	Tige	Racine
Control	4,71 \pm 0,34 ^b	1,79 \pm 0,13 ^a	6,92 \pm 0,5 ^a
30 ppb	4,84 \pm 0,18 ^b	1,79 \pm 0,1 ^a	7,15 \pm 0,54 ^a
60 ppb	4,75 \pm 0,22 ^b	1,8 \pm 0,09 ^a	6,94 \pm 0,22 ^a
120 ppb	5,66 \pm 0,21 ^a	1,78 \pm 0,08 ^a	7,54 \pm 0,71 ^a
100 ppm	2,3 \pm 0,31 ^c	0,72 \pm 0,06 ^b	2,73 \pm 0,37 ^b
500 ppm	1,78 \pm 0,07 ^d	0,68 \pm 0,03 ^{bc}	2,12 \pm 0,09 ^{bc}
1000 ppm	1,44 \pm 0,15 ^d	0,55 \pm 0,06 ^c	1,71 \pm 0,17 ^c

Tab. 35 : La teneur en lipides dans les organes de *P. australis* sous des doses combinées de Cd et de Ni. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Traitement Cd+Ni	Lipides ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)		
	Feuille	Tige	Racine
Control	4,71 \pm 0,34 ^a	1,79 \pm 0,13 ^a	6,92 \pm 0,5 ^a
Cd _(1000ppm) + Ni _(120ppb)	1,08 \pm 0,1 ^d	0,29 \pm 0,03 ^c	1,19 \pm 0,07 ^d
Cd _(100 ppm) + Ni _(100ppm)	2,23 \pm 0,07 ^b	0,58 \pm 0,05 ^b	2,84 \pm 0,09 ^b
Cd _(100 ppb) + Ni _(1000 ppm)	1,52 \pm 0,04 ^c	0,52 \pm 0,04 ^b	1,76 \pm 0,12 ^c

3.5 Activité des enzymes du système antioxydant

3.5.1 Activité enzymatique de la catalase (CAT)

Les tableaux (36 ; 37 et 38) présentent les variations de l'activité enzymatique de la Catalase (CAT), dans les différents organes des plantes de *P. australis* exposés à diverses doses simples et mixtes de Cd et/ou Ni.

L'analyse de variance a révélé un effet hautement significatif des différentes doses de Cd sur l'activité de la CAT dans les feuilles ($F_{6,63} = 419,89$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,63} = 1129,95$; $p = 0,000 < 0,05$) et racines ($F_{6,63} = 350,03$; $p = 0,000 < 0,05$). Les différentes doses de Ni ont significativement affecté l'activité de la CAT dans les feuilles ($F_{6,63} = 326,02$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,63} = 168,69$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{6,63} = 127,11$; $p = 0,000 < 0,05$).

De manière générale, l'activité de la CAT a augmenté avec l'accroissement des doses de Cd et de Ni appliquées. Cependant, une diminution de cette activité enzymatique a été observée dans les feuilles et les tiges sous l'exposition à $Ni_{(1000 \text{ ppm})}$ comparativement sous $Ni_{(500 \text{ ppm})}$ où nous avons enregistré l'activité la plus élevée.

Le test post-hoc de Tukey a révélé de différences non significatives entre les activités de la CAT enregistrées sous les faibles doses de Cd et de Ni et celles du groupe contrôle. Cependant, une augmentation significative de cette activité enzymatique a été révélée dans les feuilles, les tiges et les racines des plantes exposées aux fortes doses de Cd et aussi de Ni.

Dans les racines, la comparaison entre les résultats sous les hautes doses a montré que le pic d'activité de la CAT a été atteint sous $Ni_{(1000 \text{ ppm})}$ et $Cd_{(1000 \text{ ppm})}$. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les traitements 100 ppm et 500 ppm de Cd d'une part, et de Ni d'autre part. Dans les feuilles et les tiges, des niveaux d'activité distincts ont été observés entre les différentes doses de Cd. Mais les doses croissantes de Ni ne semblent pas avoir induit de variations significatives de l'activité enzymatique dans ces organes aériens.

Sous les doses mixtes, l'analyse statistique a révélé une augmentation significative de l'activité de la CAT par rapport au contrôle dans l'ensemble des organes étudiés : feuilles ($F_{3,63} = 1119,90$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{3,63} = 348,96$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{3,63} = 508,84$; $p = 0,000 < 0,05$). Comparativement aux expositions individuelles $Ni_{(1000 \text{ ppm})}$ et $Cd_{(1000 \text{ ppm})}$, l'ajout de faibles doses de $Cd_{(100 \text{ ppb})}$ et $Ni_{(120 \text{ ppb})}$, semble avoir légèrement stimulé l'activité de la CAT dans les feuilles, les tiges et les racines. En revanche, la mixture $Cd_{(100 \text{ ppm})} + Ni_{(100 \text{ ppm})}$ a entraîné une diminution de l'activité enzymatique au niveau foliaire et une augmentation au niveau racinaire par rapport aux doses individuelles correspondantes $Cd_{(100 \text{ ppm})}$ et $Ni_{(100 \text{ ppm})}$. Dans les tiges, cette dose mixte a induit une activation de la catalase supérieure à celle observée

sous Ni (100 ppm) seul, mais une inhibition de l'activité comparativement au traitement Cd (100 ppm) appliqué individuellement. L'activité est globalement plus élevée dans les racines que dans les autres organes. Le ratio feuilles/racines demeure relativement similaire sous les faibles doses de Cd et de Ni. Cependant, sous les doses élevées, ce ratio augmente sous l'effet du Cd et diminue sous l'effet du Ni.

Tab. 36 : Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des plantes de *P. australis* exposés à différentes doses de Cd. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Traitement	CAT activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	0,516 \pm 0,05 ^d	0,131 \pm 0,03 ^d	0,809 \pm 0,09 ^c	0,64 \pm 0,09 ^{bc}
10 ppb	0,517 \pm 0,08 ^d	0,130 \pm 0,01 ^d	0,788 \pm 0,11 ^c	0,66 \pm 0,07 ^{bc}
30 ppb	0,514 \pm 0,05 ^d	0,129 \pm 0,02 ^d	0,859 \pm 0,05 ^c	0,60 \pm 0,09 ^c
100 ppb	0,519 \pm 0,05 ^d	0,144 \pm 0,01 ^d	0,946 \pm 0,03 ^c	0,55 \pm 0,05 ^c
100 ppm	13,63 \pm 0,36 ^c	10,70 \pm 0,03 ^b	21,14 \pm 0,33 ^b	0,64 \pm 0,02 ^{bc}
500 ppm	18,61 \pm 0,86 ^b	10,87 \pm 0,04 ^b	21,64 \pm 0,34 ^b	0,86 \pm 0,03 ^a
1000 ppm	63,2 \pm 1,87 ^a	41,45 \pm 0,06 ^a	83,49 \pm 2,98 ^a	0,76 \pm 0,04 ^{ab}

Tab. 37 : Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des plantes de *P. australis* exposés à différentes doses de Ni. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Traitement	CAT activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	0,516 \pm 0,05 ^b	0,131 \pm 0,03 ^b	0,809 \pm 0,09 ^c	0,64 \pm 0,09 ^a
30 ppb	0,526 \pm 0,09 ^b	0,243 \pm 0,04 ^b	0,873 \pm 0,10 ^c	0,60 \pm 0,11 ^{ab}
60 ppb	0,534 \pm 0,06 ^b	0,248 \pm 0,03 ^b	0,889 \pm 0,08 ^c	0,61 \pm 0,06 ^{ab}
120 ppb	0,532 \pm 0,05 ^b	0,288 \pm 0,01 ^b	0,875 \pm 0,04 ^c	0,61 \pm 0,08 ^{ab}
100 ppm	13,81 \pm 0,37 ^a	15,34 \pm 2,5 ^a	30,74 \pm 3,40 ^b	0,45 \pm 0,06 ^{bc}
500 ppm	14,35 \pm 1,08 ^a	16,97 \pm 3,68 ^a	34,37 \pm 4,50 ^b	0,42 \pm 0,04 ^{cd}
1000 ppm	11,86 \pm 3,69 ^a	15,79 \pm 2,86 ^a	45,08 \pm 7,03 ^a	0,26 \pm 0,11 ^d

Tab. 38 : Activité de la Catalase (CAT) dans les organes des plantes de *P. australis* exposés à différentes doses de Cd+Ni. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Traitement Cd+Ni	CAT activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	0,516 \pm 0,05 ^c	0,131 \pm 0,03 ^c	0,809 \pm 0,09 ^d	0,64 \pm 0,09 ^b
Cd _(100ppm) + Ni _(120ppb)	69,48 \pm 2,06 ^a	42,98 \pm 0,86 ^a	88,34 \pm 2,80 ^a	0,78 \pm 0,04 ^a
Cd _(100 ppm) + Ni _(100ppm)	8,63 \pm 0,23 ^b	16,05 \pm 3,07 ^b	31,59 \pm 4,13 ^c	0,27 \pm 0,04 ^c
Cd _(100 ppb) + Ni _(1000 ppm)	11,94 \pm 3,68 ^b	16,41 \pm 2,81 ^b	48,51 \pm 5,24 ^b	0,24 \pm 0,08 ^c

3.5.2 Activité enzymatique de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx)

Les tableaux (39 ; 40 et 41) présentent les variations de l'activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les différents organes des plantes de *P. australis* exposés à diverses doses simples et mixtes de Cd et/ou Ni.

L'analyse de variance a révélé un effet hautement significatif des différentes doses de Cd sur l'activité de la GPOx dans les feuilles ($F_{6,63} = 326,01$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,63} = 168,66$; $p = 0,000 < 0,05$) et racines ($F_{6,63} = 127,11$; $p = 0,000 < 0,05$). Pareil sous Ni, les différentes doses ont significativement affecté l'activité de la GPOx : Feuilles ($F_{6,28} = 149,99$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{6,63} = 116,37$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{6,63} = 146,37$; $p = 0,000 < 0,05$).

Globalement, l'activité GPOx s'est avérée dose-dépendante, augmentant avec l'accroissement des doses de Cd et de Ni appliquées. Cependant, une diminution de cette activité a été constatée sous $Ni_{(1000\text{ ppm})}$ dans les feuilles et les tiges après avoir atteint un maximum sous $Ni_{(500\text{ ppm})}$.

Le test de Tukey n'a pas révélé de différences significatives entre l'activités de la GPOx enregistrées sous les faibles doses de Cd et aussi sous celles de Ni, comparativement aux résultats dans le groupe contrôle. En revanche, pour les fortes doses (100, 500 et 1000 ppm) de Cd, le pic d'activité GPOx a été observé sous $Cd_{(1000\text{ ppm})}$. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les activités sous $Cd_{(500\text{ ppm})}$ et $Cd_{(100\text{ ppm})}$.

Concernant les résultats sous Ni, dans les feuilles et les racines l'activité maximale a été enregistrée sous $Ni_{(500\text{ ppm})}$. Cependant, dans les tiges, le pic d'activité a été atteint sous $Ni_{(1000\text{ ppm})}$.

Sous les doses mixtes, l'analyse statistique a révélé des différences significatives de l'activité de la GPOx dans l'ensemble des organes étudiés : feuilles ($F_{3,63} = 82,33$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{3,63} = 236,95$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{3,63} = 89,44$; $p = 0,000 < 0,05$).

Comparativement aux expositions individuelles à $Ni_{(1000\text{ ppm})}$ et $Cd_{(1000\text{ ppm})}$, l'ajout de faibles doses de $Cd_{(100\text{ ppb})}$ et $Ni_{(120\text{ ppb})}$, semble avoir diminuer l'activité de la GPOx dans les feuilles, mais l'avoir stimulée dans les racines. Dans les tiges, cette dose mixte a induit une activité supérieure à celle observée sous $Cd_{(100\text{ ppm})}$ seul, mais inférieure à celle induite par $Ni_{(100\text{ ppm})}$ appliqué individuellement. En revanche, la dose mixte $Cd_{(100\text{ ppm})}+Ni_{(100\text{ ppm})}$ a entraîné une légère diminution de l'activité enzymatique de la GPOx au niveau foliaire et une augmentation importante au niveau caulinaire et racinaire par rapport au traitement individuel au $Cd_{(100\text{ ppm})}$. Par contre, l'inverse a été observé comparativement au traitement au $Ni_{(100\text{ ppm})}$, à savoir une faible augmentation de l'activité dans les feuilles et une diminution dans les tiges et les racines. L'activité est globalement plus élevée dans les racines que dans

les feuilles et les tiges. Comme pour l'activité de la CAT, le ratio feuilles/racines de l'activité GPOx est relativement similaire sous les faibles doses de Cd et de Ni. Cependant, sous les doses élevées, ce ratio augmente sous l'effet du Cd et diminue sous l'effet du Ni.

Tab. 39 : Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des plantes de *P. australis* exposés à différentes doses de Cd. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Traitement	GPOx activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	4,201 \pm 0,95 ^c	0,941 \pm 0,04 ^c	6,388 \pm 0,26 ^c	0,66 \pm 0,08 ^c
10 ppb	4,088 \pm 0,91 ^c	0,946 \pm 0,03 ^c	6,392 \pm 0,30 ^c	0,64 \pm 0,08 ^c
30 ppb	4,429 \pm 0,98 ^c	0,923 \pm 0,06 ^c	6,359 \pm 0,37 ^c	0,70 \pm 0,07 ^{bc}
100 ppb	4,564 \pm 0,92 ^c	0,950 \pm 0,03 ^c	6,955 \pm 0,04 ^c	0,65 \pm 0,04 ^c
100 ppm	22,92 \pm 2,09 ^b	2,22 \pm 0,03 ^b	24,93 \pm 0,33 ^b	0,92 \pm 0,17 ^a
500 ppm	23,38 \pm 2,19 ^b	2,63 \pm 0,57 ^b	28,78 \pm 4,30 ^b	0,81 \pm 0,09 ^{abc}
1000 ppm	35,54 \pm 4,67 ^a	4,97 \pm 0,34 ^a	39,94 \pm 4,37 ^a	0,89 \pm 0,08 ^{ab}

Tab. 40 : Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des plantes de *P. australis* exposés à différentes doses de Ni. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Traitement	GPOx activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	4,201 \pm 0,46 ^d	0,941 \pm 0,04 ^d	6,388 \pm 0,26 ^c	0,66 \pm 0,08 ^a
30 ppb	4,282 \pm 0,61 ^d	0,945 \pm 0,03 ^d	6,383 \pm 0,30 ^c	0,64 \pm 0,05 ^{ab}
60 ppb	4,322 \pm 0,22 ^d	0,901 \pm 0,05 ^d	6,458 \pm 0,42 ^c	0,67 \pm 0,07 ^a
120 ppb	4,604 \pm 0,32 ^d	0,958 \pm 0,03 ^d	6,737 \pm 0,44 ^c	0,68 \pm 0,04 ^a
100 ppm	25,77 \pm 2,79 ^b	2,50 \pm 0,04 ^c	52,07 \pm 8,27 ^b	0,49 \pm 0,09 ^{bc}
500 ppm	31,94 \pm 2,68 ^a	3,59 \pm 0,78 ^b	73,01 \pm 10,91 ^a	0,44 \pm 0,05 ^c
1000 ppm	19,33 \pm 4,23 ^c	4,80 \pm 0,33 ^a	71,65 \pm 7,83 ^a	0,27 \pm 0,07 ^d

Tab. 41 : Activité de la Guaïcol-Peroxydase (GPOx) dans les organes des plantes de *P. australis* exposés à différentes doses de Cd+Ni. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=10$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Traitement Cd+Ni	GPOx activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine
Control	4,201 \pm 0,04 ^c	0,941 \pm 0,04 ^c	6,388 \pm 0,26 ^d	0,66 \pm 0,08 ^a
Cd _(1000ppm) + Ni _(120ppb)	28,56 \pm 0,36 ^a	5,26 \pm 0,36 ^a	42,29 \pm 4,62 ^c	0,67 \pm 0,08 ^a
Cd _(100 ppm) + Ni _(100ppm)	19,75 \pm 0,27 ^b	4,07 \pm 0,27 ^b	65,64 \pm 7,18 ^b	0,30 \pm 0,03 ^b
Cd _(100 ppb) + Ni _(1000 ppm)	18,91 \pm 0,30 ^b	4,39 \pm 0,30 ^b	84,64 \pm 13,45 ^a	0,22 \pm 0,05 ^b

3.5.3 Activité enzymatique de la glutathion-S-transférase (GST)

Les tableaux (42 ; 43 et 44) présentent les variations de l'activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les différents organes des plantes de *P. australis* exposés à diverses doses simples et mixtes de Cd et/ou Ni.

L'analyse de variance a révélé des différences significatives entre les résultats de l'activité de la GST sous les différentes doses de Cd dans les trois organes des plantes : feuille ($F_{6,63} = 207,59$; $p = 0,000 < 0,05$), tige ($F_{6,63} = 203,64$; $p = 0,000 < 0,05$) et racine ($F_{6,63} = 342,08$; $p = 0,000 < 0,05$). Pareil sous Ni, les différentes doses ont significativement affecté l'activité de la GST dans les feuille ($F_{6,63} = 206,20$; $p = 0,000 < 0,05$), tige ($F_{6,63} = 203,76$; $p = 0,000 < 0,05$), racine ($F_{6,63} = 341,69$; $p = 0,000 < 0,05$).

L'activité de GST s'est avérée dose-dépendante, globalement sous toutes les doses elle augmentant avec l'accroissement des doses de Cd et de Ni appliquées, et ce, dans les trois organes (feuilles, tiges et racines). Comme pour la CAT et la GPOx, le test de Tukey n'a pas révélé de différences significatives entre l'activité de la GST enregistrée sous les faibles doses de Cd et celle enregistrée dans le groupe contrôle. Des résultats similaires ont également été constatés sous les faibles doses de Ni.

Sous les fortes doses (100, 500 et 1000 ppm) de Cd et de Ni, et dans les trois organes des plantes, l'activité maximale de la GST a été enregistrée sous la dose de 1000 ppm. Ensuite, elle a diminué de manière significative sous les doses de 500 et 100 ppm.

Concernant les résultats sous les doses mixtes, l'analyse statistique a révélé aussi des différences significatives entre les valeurs de l'activité de la GST dans : feuilles ($F_{3,63} = 101,43$; $p = 0,000 < 0,05$), tiges ($F_{3,63} = 118,64$; $p = 0,000 < 0,05$), racines ($F_{3,63} = 1082,25$; $p = 0,000 < 0,05$). Comparativement aux résultats sous l'exposition individuelle au Cd (1000 ppm), l'ajout de faibles doses de Ni (120 ppb) semble avoir affecté positivement l'activité de la GST dans les trois organes, particulièrement dans les racines. La comparaison entre les effets de la dose mixte Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm) et ceux de la dose simple Ni (1000 ppm) a révélé que l'ajout de la faible dose de Cd (100 ppb) dans l'eau n'a pas modifié l'activité de la GST. Les résultats observés étaient très similaires à ceux obtenus sous la dose simple dans les trois organes de la plante.

Sous la dose mixte Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm), nos résultats ont montré que l'activité de la GST était très proche de celle observée sous la dose individuelle Ni (100 ppm), mais supérieure à celle enregistré sous Cd (100 ppm), et ce, dans les feuilles, les tiges et les racines des plantes de *P. australis*.

Tab. 42 : Activité la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des plantes de *P. australis* exposés à différentes doses de Cd. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=5$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

	GST activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine %
Control	0,234 \pm 0,01 ^d	0,046 \pm 0,004 ^d	0,766 \pm 0,04 ^d	0,31 \pm 0,01 ^a
10 ppb	0,229 \pm 0,01 ^d	0,045 \pm 0,003 ^d	0,766 \pm 0,08 ^d	0,30 \pm 0,02 ^a
30 ppb	0,23 \pm 0,03 ^d	0,046 \pm 0,006 ^d	0,782 \pm 0,14 ^d	0,29 \pm 0,03 ^a
100 ppb	0,241 \pm 0,03 ^d	0,048 \pm 0,006 ^d	0,80 \pm 0,12 ^d	0,30 \pm 0,2 ^a
100 ppm	4,23 \pm 0,63 ^c	0,99 \pm 0,14 ^c	20,17 \pm 2,98 ^c	0,21 \pm 0,06 ^b
500 ppm	10,99 \pm 1,23 ^b	2,18 \pm 0,25 ^b	55,75 \pm 7,32 ^b	0,20 \pm 0,01 ^b
1000 ppm	13,60 \pm 1,91 ^a	3,39 \pm 0,47 ^a	67,93 \pm 4,84 ^a	0,20 \pm 0,02 ^b

Tab. 43 : Activité la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des plantes de *P. australis* exposés à différentes doses de Ni. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=5$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Traitement	GST activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Feuille	Tige	Racine	Feuille/Racine %
Control	0,234 \pm 0,02 ^d	0,046 \pm 0,004 ^d	0,766 \pm 0,04 ^d	0,31 \pm 0,01 ^{ab}
30 ppb	0,233 \pm 0,01 ^d	0,046 \pm 0,003 ^d	0,774 \pm 0,03 ^d	0,30 \pm 0,02 ^{ab}
60 ppb	0,249 \pm 0,03 ^d	0,050 \pm 0,007 ^d	0,771 \pm 0,09 ^d	0,32 \pm 0,05 ^a
120 ppb	0,258 \pm 0,03 ^d	0,051 \pm 0,006 ^d	0,775 \pm 0,08 ^d	0,33 \pm 0,05 ^a
100 ppm	9,48 \pm 1,37 ^c	2,35 \pm 0,33 ^c	38,50 \pm 5,68 ^c	0,25 \pm 0,03 ^{bc}
500 ppm	23,76 \pm 2,83 ^b	4,63 \pm 0,53 ^b	118,39 \pm 15,55 ^b	0,20 \pm 0,02 ^c
1000 ppm	28,47 \pm 3,96 ^a	6,83 \pm 0,96 ^a	136,86 \pm 9,76 ^a	0,21 \pm 0,02 ^c

Tab. 44 : Activité de la glutathion-S-transférase (GST) dans les organes des plantes de *P. australis* exposés à différentes doses de Cd+Ni. Les valeurs représentent les moyennes (\pm Sd) de $n=5$ répétitions. Les valeurs avec des lettres différents d'une colonne sont significativement différentes ($p \leq 0,05$, test de Tukey). Les valeurs les plus élevées reçoivent la lettre (a).

Traitement Cd+Ni	GST activité ($\mu\text{M. min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Fw}$)			
	Leaf	Stem	Root	Leaf/ Root %
Control	0,234 \pm 0,004 ^d	0,046 \pm 0,004 ^d	0,766 \pm 0,04 ^d	0,31 \pm 0,01 ^a
Cd _(1000ppm) +Ni _(120ppb)	15,57 \pm 0,60 ^b	4,778 \pm 0,60 ^b	77,80 \pm 5,01 ^b	0,20 \pm 0,03 ^b
Cd _(100 ppm) +Ni _(100ppm)	9,0 \pm 0,34 ^c	2,38 \pm 0,34 ^c	44,85 \pm 2,96 ^c	0,20 \pm 0,04 ^b
Cd _(100 ppb) +Ni _(1000 ppm)	28,72 \pm 0,84 ^a	6,77 \pm 0,89 ^a	136,71 \pm 4,91 ^a	0,21 \pm 0,02 ^b

3.5.4 Rapport d'activité de feuille/racine sous l'effet du Cd

Le rapport d'activité de la CAT feuille/racine sous l'effet du Cd était similaire entre le groupe témoin et les groupes exposés aux faibles doses (10 ; 30 et 100 ppb), ainsi que sous la dose élevée de Cd_(100 ppm). Ce ratio oscillait entre 0,55 et 0,64, très proche de celui du groupe témoin qui était de 0,64. Cependant, une augmentation considérable du ratio a été observée sous les doses de 500 et 1000 ppm, atteignant respectivement 0,86 et 0,76.

Aussi, sous les doses de Ni, le ratio de l'activité de la CAT feuille/racine était très similaire à celui enregistré dans le groupe témoin et sous l'effet des faibles doses, oscillant entre 0,60 et 0,61. Cependant, lors de l'exposition aux fortes doses de Ni, contrairement à ce qui a été observé sous les hautes doses de Cd, une diminution considérable de ce ratio a été constatée, atteignant 0,26 sous la dose de Ni_(1000 ppm).

Sous les doses mixtes le ratio de la CAT feuille/racine était similaire sous la dose Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) et la dose simple Cd_(1000 ppm), ainsi qu'entre Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) et Ni_(1000 ppm). En revanche, la dose mixte de Ni_(100 ppm) + Cd_(100 ppm) a entraîné une baisse considérable de ce ratio, l'abaissant à 0,27 comparativement à 0,45 sous Ni_(100 ppm) et 0,64 sous Cd_(100 ppm).

Concernant les résultats de la GPOx, le ratio d'activité de la GPOx feuille/racine sous l'effet du Cd oscillait entre 0,64 et 0,70 dans les groupes exposés aux faibles doses (10, 30 et 100 ppb) très proche de celui du groupe témoin qui était de 0,66. Sous la dose de Cd_(100 ppm), une augmentation considérable du ratio a été observée, atteignant 0,92. Cette hausse s'est poursuivie sous les doses de Cd_(500 ppm) et Cd_(1000 ppm), avec des valeurs respectives de 0,81 et 0,89.

Sous les faibles doses de Ni, le ratio d'activité de la GPOx feuille/racine était comparable à celui du groupe témoin, variant entre 0,64 et 0,68. Cependant, lors de l'exposition aux fortes doses de Ni, contrairement au cas du Cd, une baisse marquée de ce ratio a été notée, atteignant 0,27 sous la dose de Ni_(1000 ppm). Comparativement aux doses individuelles, toutes les doses mixtes ont entraîné une diminution du ratio de l'activité enzymatique de la GPOx feuille/racine. La dose mixte de Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) a engendré une baisse importante de ce ratio, l'abaissant à 0,30 comparé à 0,49 pour la dose de Ni_(100 ppm) et 0,92 pour la dose de Cd_(100 ppm). Aussi, une diminution considérable a été enregistrée sous la dose Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) par rapport à la dose de Cd_(1000 ppm), avec un ratio de 0,67 contre 0,89 respectivement.

Le rapport d'activité de la GST feuille/racine sous l'effet du Cd seul était similaire entre le groupe témoin et les groupes exposés aux faibles doses (10, 30 et 100 ppb). Le ratio oscillait entre 0,29 et 0,30 ; très proche de celui du groupe témoin qui était de 0,31.

Sous les doses élevées de 100 ; 500 et 1000 ppm de Cd, une diminution importante du ratio a été observée, atteignant respectivement 0,20 et 0,21.

Sous les doses de Ni, le ratio d'activité de la GST feuille/racine était aussi comparable à celui du groupe témoin. Il variait entre 0,30 et 0,33. Cependant, lors de l'exposition aux fortes doses de Ni, une baisse de ce ratio a été constatée, avec 0,25 sous Ni (100 ppm), 0,20 sous Ni (500 ppm) et 0,21 sous Ni (1000 ppm).

Concernant les résultats sous les doses mixtes, le ratio était similaire sous Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) et Cd (1000 ppm) seul, avec 0,20. De même, des valeurs proches ont été enregistrées entre Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) et Cd (100 ppm) seul, soit 0,20 et 0,21. En revanche, une légère diminution a été observée sous la doses mixte Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm) par rapport à Ni (1000 ppm) seul, avec 0,20 contre 0,21.

3.6 Corrélation entre les différentes réponses métaboliques et enzymatiques

3.6.1 Corrélation entre les différentes réponses des plantes témoins

La Matrice de corrélation montre de très fortes corrélations positives entre les teneurs en protéines dans les trois organes des plantes, de même qu'entre les teneurs en lipides, et également entre les teneurs en lipides et en protéines (Fig. 30). Les coefficients de corrélation entre les paires de variables Prot F/Prot T, Prot F/Prot R et Prot T/Prot R étaient de $r = 0,99$, tout comme ceux entre Lip F/Lip T, Lip F/Lip R et Lip T/Lip R ($r = 0,98-0,99$) (Annexe 2 ; Fig. 01). En ce qui concerne la corrélation entre les paires de l'activité du système antioxydant entre eux et avec les variables métaboliques, une forte corrélation de $r = 0,99$ a seulement été observée entre GST F / GST T et GST F / GST R. Quant à la corrélation entre GST T / GST R, $p = 0,054$ (annexe). Ces résultats suggèrent que ces réponses métaboliques et enzymatiques varient de manière similaire chez les plantes témoins.

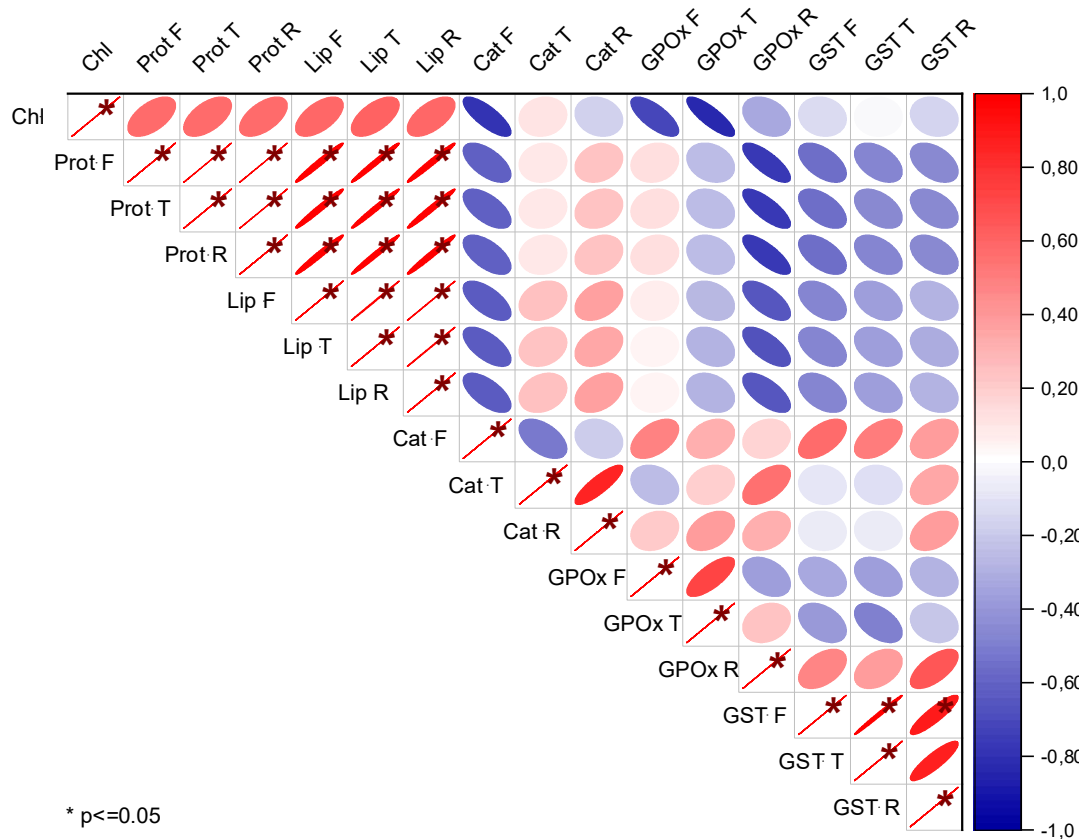


Fig. 30 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe contrôle. *Chl* (Chlorophylle), *Prot* (Protéine), *Lip* (Lipide), *CAT* (la Catalase), *GPOx* (la Guaïcol-Peroxydase) et *GST* (la glutathion-S-transférase). *F* : feuille, *T* : tige, *R* : racine. Les cases marquées d'une étoile (*) indiquent des corrélations statistiquement significatives au seuil de $p = 0,05$. Les corrélations positives sont affichées en rouge et les corrélations négatives en bleu. L'intensité de la couleur et la taille des ellipses sont proportionnelles aux coefficients de corrélation.

3.6.2 Corrélation entre les différentes réponses des plantes exposées au Cd

Sous la faible dose de Cd (10 ppb) (Fig. 31) et comparativement au corrélogramme enregistré chez le groupe contrôle (Fig. 28), une inversion de la corrélation de positive à négative, bien que non significative ($P > 0,05$), a été observée entre les paires suivantes : Chl avec Prot F, Prot T et Prot R. De plus, entre la variable Chl et la quasi-totalité des enzymes du système antioxydant mesurées, la corrélation est passée de négative à positive. Le fait le plus remarquable est que la corrélation positive entre la teneur en protéines et en lipides est devenue non significative, particulièrement entre les paires Prot T/Lip F, Lip T et Lip R, ainsi qu'entre Prot R/Lip F, Lip T et Lip R. L'apparition d'une corrélation négativement significative a été observée aussi entre les protéines et les enzymes du système antioxydantes, comme entre les paires Prot F/Cat R et Prot T avec Cat F et Cat T, de même que pour les lipides entre les paires : Lip F/Cat R et Lip T et Lip R avec Cat R (Annexe.2 ; Fig. 2).

Les résultats sous Cd à 30 ppb, représentés par le corrélogramme (Fig. 32), montrent une corrélation similaire à celle enregistrée sous Cd à 10 ppb. Cependant, la corrélation entre les variables protéines et lipides devient non significative. Le corrélogramme révèle également l'apparition d'une corrélation négative entre les protéines et la variable GPOx, particulièrement entre les paires Prot F/GPOx F ($r = 0,91$), Prot T/GPOx R ($r = -0,90$) et Prot R/GPOx T ($r = 0,91$) (Annexe 2 ; Fig. 3).

Sous Cd à 100 ppb (Fig. 33), le corrélogramme montre des résultats similaires à ceux sous Cd à 10 et 30 ppb, sauf que les variables protéines et lipides sont davantage corrélées négativement que positivement avec la variable GPOx. Cependant, la corrélation négative est significative uniquement entre les paires Prot F/GPOx F ($r = -0,88$), Prot T/GPOx F ($r = -0,60$), Prot R/GPOx F ($r = -0,24$) et également pour la paire Lip T/GPOx F ($r = -0,90$). Nous constatons également une forte corrélation positive entre les enzymes Cat R/GST ($r = 0,87$) et Cat R/GST R ($r = 0,90$) (Annexe 2 ; Fig. 4).

Les résultats sous la forte dose de Cd à 100 ppm (Fig. 34) montrent que la chlorophylle (Chl) semble avoir une corrélation positive mais non significative avec la teneur en protéine et en lipide dans les feuilles, tiges et racines, similaire à ce qui a été enregistré dans le groupe contrôle mais différent sous les faibles doses de Cd (10 ; 30 et 100 ppb). Contrairement aux résultats de la corrélation sous les faibles doses de Cd, les activités de la GPOx et de la GST dans les trois organes présentent des corrélations négatives avec les variables protéines et lipides. Cependant, cette corrélation n'est significative qu'avec GPOx T, entre les paires

Prot F/GPOx T ($r = -0,92$), Prot T/GPOx T ($r = -0,92$), Prot R/GPOx T ($r = -0,92$), ainsi que pour les paires Lip F/GPOx T ($r = -0,89$) et Lip T/GPOx (Annexe 2 ; Fig. 5). Nous constatons également une forte corrélation négative entre Chl/GST F ($r = -0,87$) et Chl/GST R ($r = -0,94$), ce qui n'a pas été observé sous les faibles doses de Cd (10 ;30 et 100ppb) et dans le groupe contrôle (Annexe 2 ; Fig. 5).

Sous Cd à 500 ppm (Fig. 35), le corrélogramme montre des résultats similaires à ceux sous Cd à 100 ppm, mais seulement pour ce qui est de la relation entre protéines et lipides. Cependant, des différences ont été observées concernant la corrélation entre les paires protéines/GPOx et lipides/GPOx. La corrélation est presque nulle entre les paires Prot F/GPOx T ($r = 0,01$), Prot T/GPOx T ($r = 0,01$), Prot R/GPOx T ($r = 0,01$), ainsi que pour les paires Lip F/GPOx T ($r = -0,07$), Lip T/GPOx T ($r = -0,1$) et Lip R/GPOx T ($r = -0,08$). Une autre différence notable est l'apparition d'une forte corrélation négative entre GPOx F et GST F, GST T, et GST R (Annexe 2 ; Fig. 6).

Les résultats obtenus sous la forte dose de Cd_(1000 ppm) (Fig. 36) indiquent que la chlorophylle (Chl) semble présenter une corrélation négative, bien que non significative, avec les teneurs en protéines, en lipides et l'activité de CAT. Cette corrélation est similaire à celle observée sous la dose de 500 ppm et diffère de celle constatée dans le groupe contrôle.

Une corrélation positive significative a été observée entre Prot F/Prot T, Prot F/Prot R et Prot T/Prot R ainsi qu'entre les paires Lip F/Lip T, Lip F/Lip R et Lip T/Lip R. Contrairement à la corrélation nulle observée entre les paires Prot/GPOx et Lip/GPOx sous Cd_(500 ppm), une corrélation négative significative ($r = -0,98$ à $-0,99$) a été constatée entre ces mêmes paires, similaire à la relation observée sous la dose Cd_(100 ppm) (Annexe 2 ; Fig. 7).

De façon contrastante avec les résultats obtenus sous toutes les autres doses de Cd, la corrélation entre les paires Cat F/GST F et Cat F/GST T été positivement significative ($r = 0,89$) (Annexe 2 ; Fig. 7).

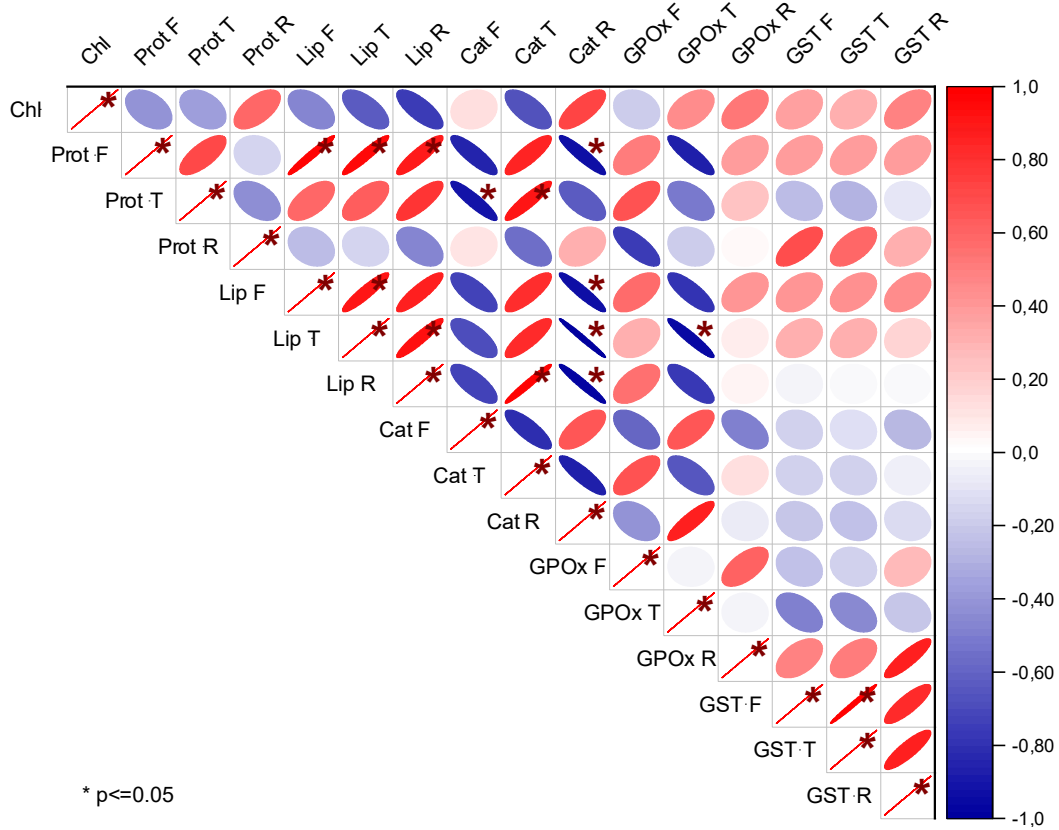


Fig. 31 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd(10 ppb).

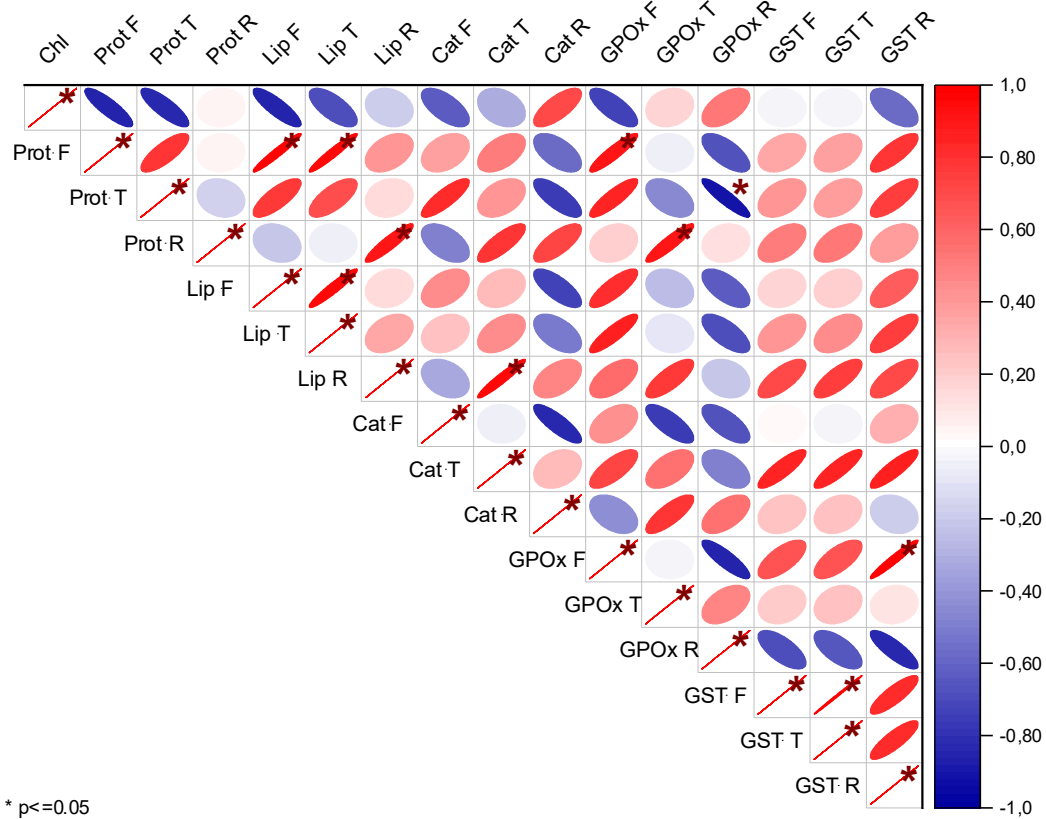


Fig. 32 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd(30 ppb)

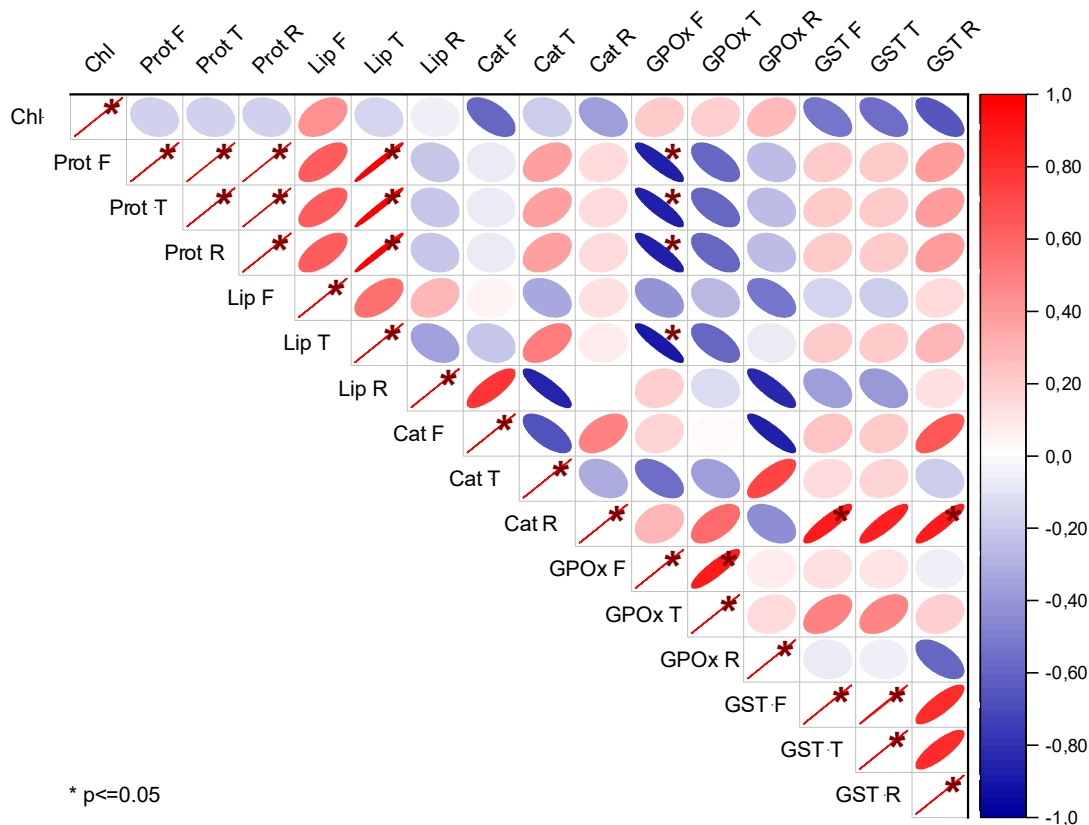


Fig. 33 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd_(100 ppb).

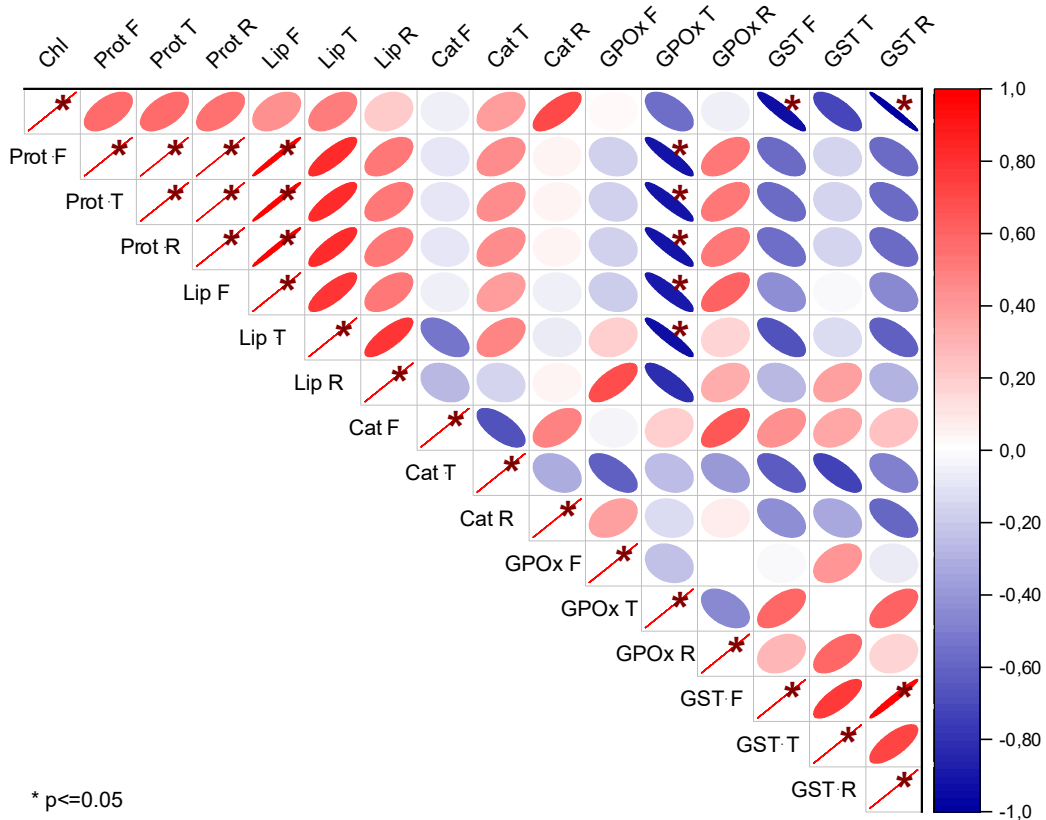


Fig. 34 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd_(100 ppm)

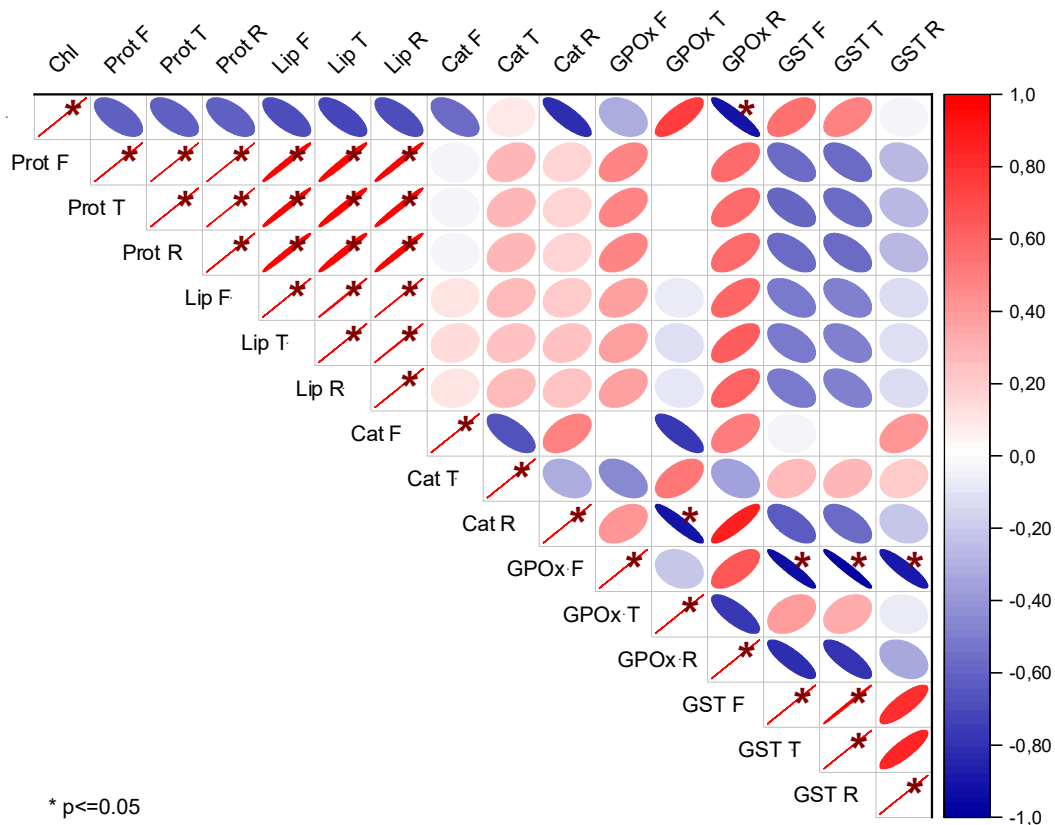


Fig. 35 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd_(500 ppm).

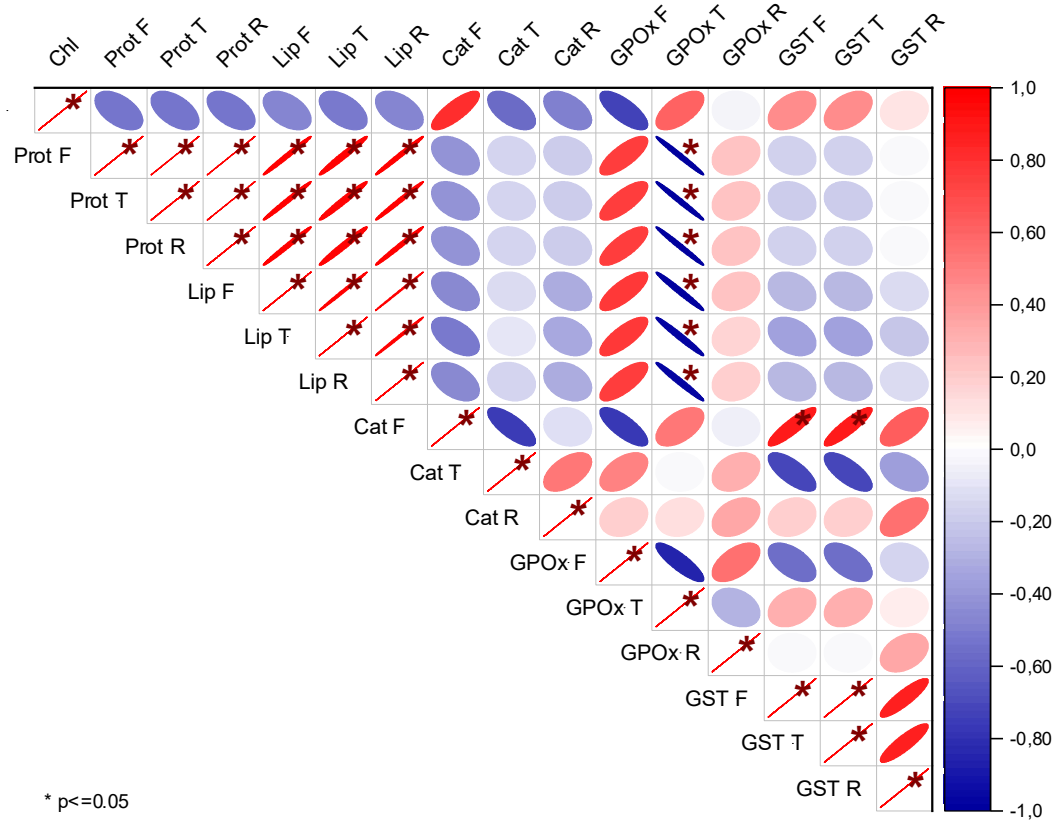


Fig. 36 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd_(1000 ppm).

3.6.3 Corrélation entre les différentes réponses des plantes exposées au Ni

Les résultats obtenus sous l'exposition au Ni (30 ppb) (Fig. 37) indiquent que la chlorophylle (Chl) semble présenter une corrélation positive, bien que non significative, avec les teneurs en protéines et en lipides, à l'instar des observations effectuées dans le corrélogramme du groupe contrôle. En contraste avec les résultats obtenus dans le groupe contrôle, une corrélation positive significative a été observée entre les paires Chl/GPOx T, Prot T/GPOx R et Prot R/GST F sous l'exposition au Ni (30 ppb) (Annexe 2 ; Fig. 8).

Contrairement aux résultats obtenus dans le groupe contrôle où une corrélation positive significative a été observée entre toutes les paires protéines/lipides dans les trois organes, sous l'exposition au Ni (30 ppb), une corrélation positive non significative a été constatée entre les paires : Prot F/Prot T et Prot R, ainsi qu'entre les paires Prot F/Lip F, Prot F/Lip R, Lip F/Lip T, Lip F/Lip R et Lip T/Lip R.

Sous la dose Ni (60 ppb) (Fig. 38), le corrélogramme montre que la Chl a une corrélation positive significative avec Prot F, Prot T et Prot R ($r = 0,96-0,99$) (Annexe 2 ; Fig. 9); différent de celui observé dans le groupe contrôle et sous la dose Ni (30 ppb). Pour ce qui est de la corrélation entre Prot/Lip, les résultats ont été similaires à ceux dans le groupe contrôle, à savoir une corrélation positive significative. Des différences ont été observées par rapport au groupe contrôle et sous la dose Ni (30 ppb) où la corrélation était significativement positive entre les paires : Prot T/GPOx F ($r = 0,89$) et Lip (F, T et R)/GPOx F ($r = 0,89$). Aussi entre Prot (F et R)/GST R ($r = 0,89$) et Lip (F, T et R)/GST R ($r = 0,99$), ainsi qu'entre GPOx F/GPOx R ($r = 0,86$) (Annexe 2 ; Fig. 9).

Les résultats obtenus sous l'exposition au Ni (120 ppb) (Fig. 39) indiquent que la corrélation entre les paires est majoritairement négative et non significative (faible à très faible) (Annexe 2 ; Fig. 10). Cependant, la corrélation a été significativement positive entre les paires : Prot F/Prot T ; Prot R/Prot T ; Lip F/Lip T. Aussi entre les paires : Lip R/Cat R, Lip R/GPOx R, Cat F/GST R, Cat R/GPOx R et GPOx F/GPOx T. La corrélation a été significativement négative seulement entre trois paires : Prot R/GPOx T ($r = -0,94$), Lip F/Cat T ($r = -0,84$) et Lip R/GST R ($r = -0,90$) (Annexe 2 ; Fig. 10).

Sous la dose élevée de Ni à 100 ppm (Fig. 40), les résultats montrent globalement que la corrélation entre les paires est différente de celle enregistrée sous les faibles doses de Ni et dans le groupe contrôle. La Chl semble présenter une corrélation plus négative que positive avec les autres variables, bien que non significative à $p=0,05$, comme entre

Chl/Prot R ($r = -0,72$), Chl/CAT T ($r = -0,51$) et Chl/GPOx ($r = -0,81$) (Annexe 2 ; Fig. 11). Même tendance entre les paires Prot/Prot, Prot/Lip et Lip/Lip, sauf entre Prot F/Prot T, Prot R/Lip T et Lip F/Lip R où la corrélation était significativement positive.

D'autres corrélations positives ont été observées entre Lip (F, R)/CAT F, ainsi qu'entre Lip (F, R)/GST R et GST F/GST T. La seule corrélation négative significative a été entre Prot (F et T)/GPOx T ($r = -0,93$) (Annexe 2 ; Fig. 11).

Sous Ni à 500 ppm (Fig. 41), le corrélogramme montre des résultats différents de ceux sous Ni à 100 ppm. La corrélation entre Chl/Prot et Chl/Lip a été très faible ($r = 0,39$ à $0,44$) (Annexe 2 ; Fig. 12). À l'inverse des résultats sous toutes les autres doses de Ni où la corrélation a été très faible ou faiblement positive, une corrélation négativement significative a été observée entre Chl/GST F, GST T et GST R. Une corrélation positivement significative a également été observée entre Chl/GPOx F, ainsi qu'entre les paires enzymatiques : GPOx F/GST F, GST T et GST R. Aussi, une corrélation positivement significative a été observée entre Lip (F, T et R)/CAT T ($r = 0,94$). Le plus marquant est également la corrélation positivement significative entre toutes les variables Prot/Prot, Prot/Lip et Lip/Lip, comme ce qui a été enregistré dans le groupe control.

Les résultats obtenus sous la forte dose de Ni (1000 ppm) (Fig. 42) indiquent que la corrélation était très faible entre plusieurs paires de variables, particulièrement entre les paires Prot/Cat, GST et Lip/Cat et GST (Annexe 2 ; Fig. 13). Similaire aux résultats sous Ni (500 ppm), Ni (60 ppb) et dans le groupe contrôle, la corrélation a été positivement significative entre toutes les variables Prot/Prot, Prot/Lip et Lip/Lip. Également, une corrélation positive a été observée entre GST F/GST T. Contrairement aux résultats sous les autres doses de Ni, sous Ni (1000 ppm), nous avons observé une relation négativement significative entre les variables Prot (F, T et R), Lip (F, T et R) avec GPOx T ($r = -0,98$ et -1) (Annexe 2 ; Fig. 13). Ces résultats sont similaires à ceux enregistrés sous Cd (1000 ppm).

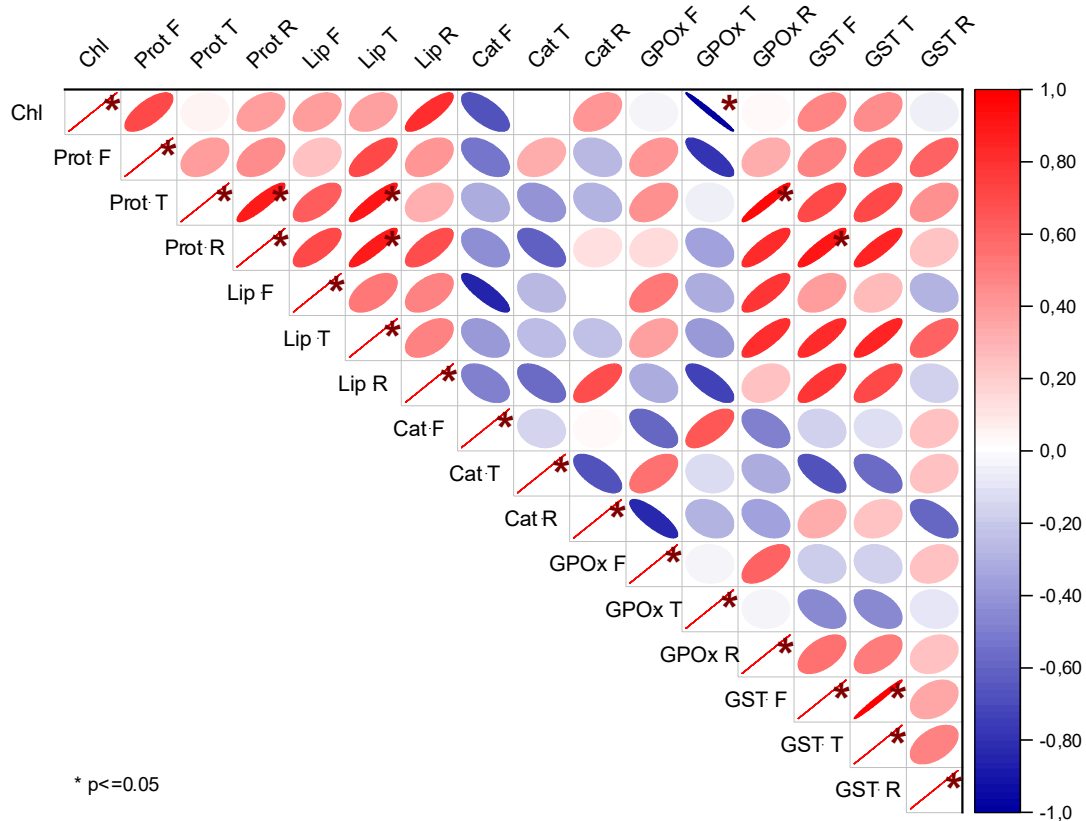


Fig. 37 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni_(30 ppb).

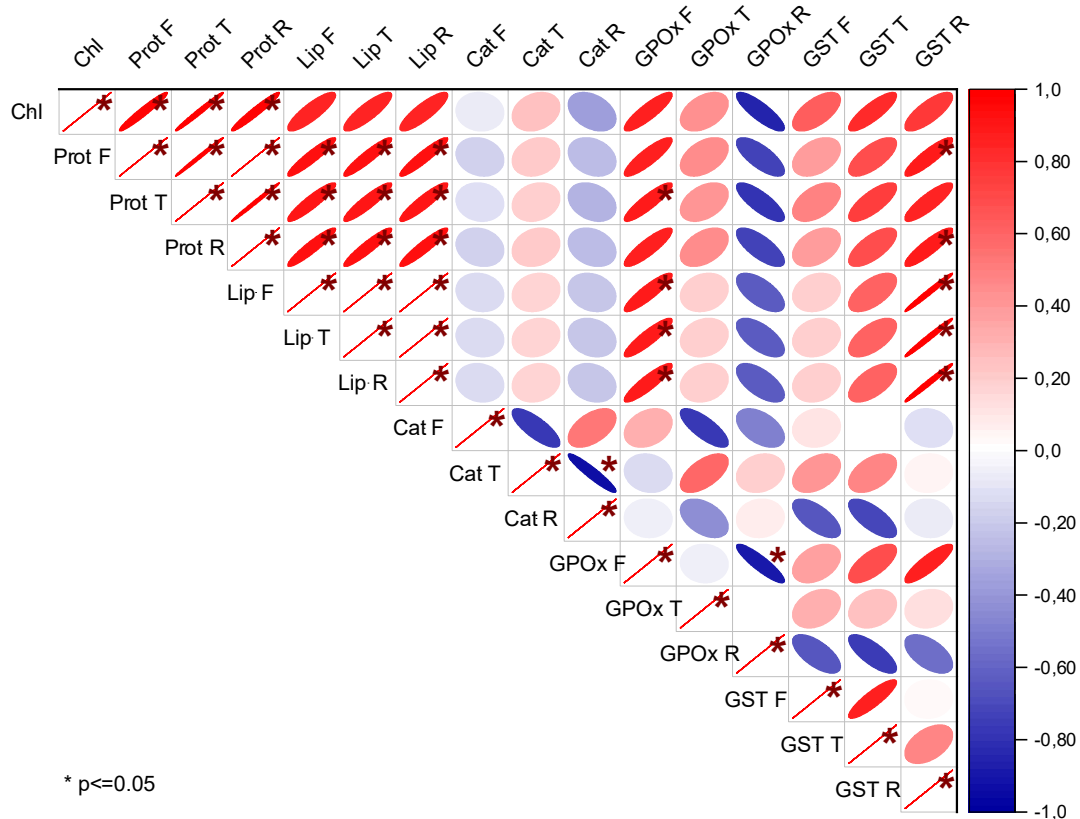


Fig. 38 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni_(60 ppb).

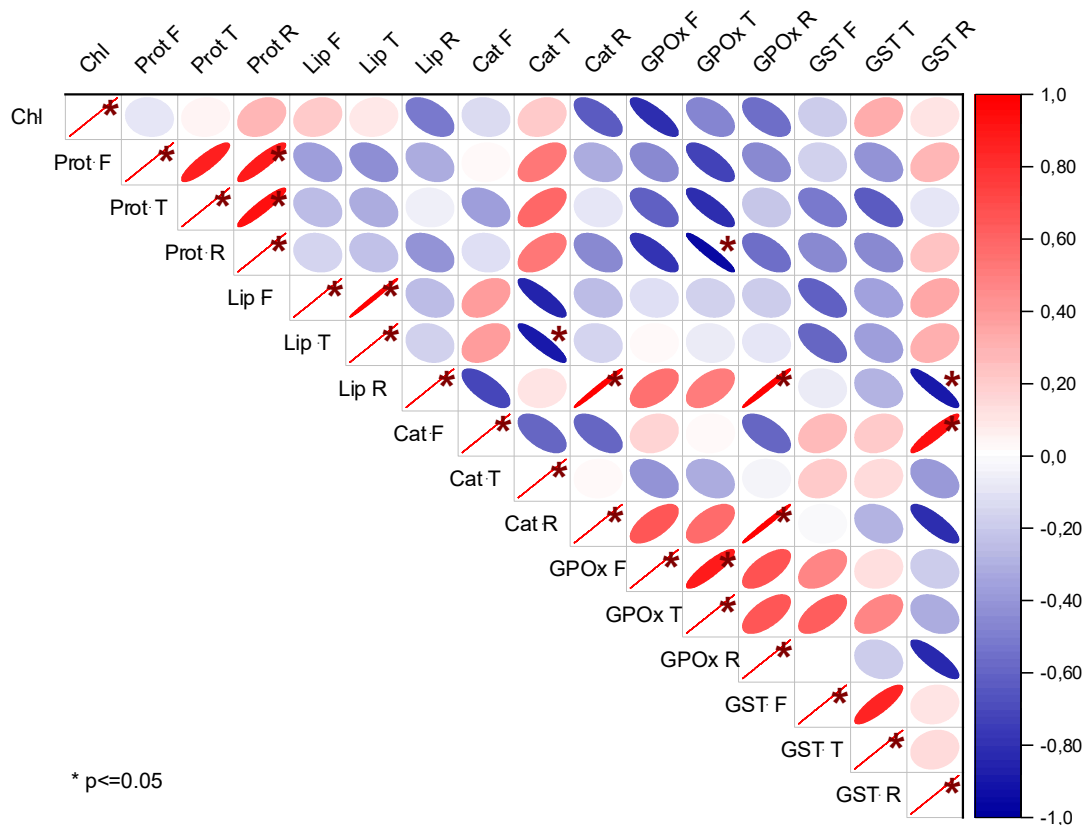


Fig. 39 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni_(120 ppb).

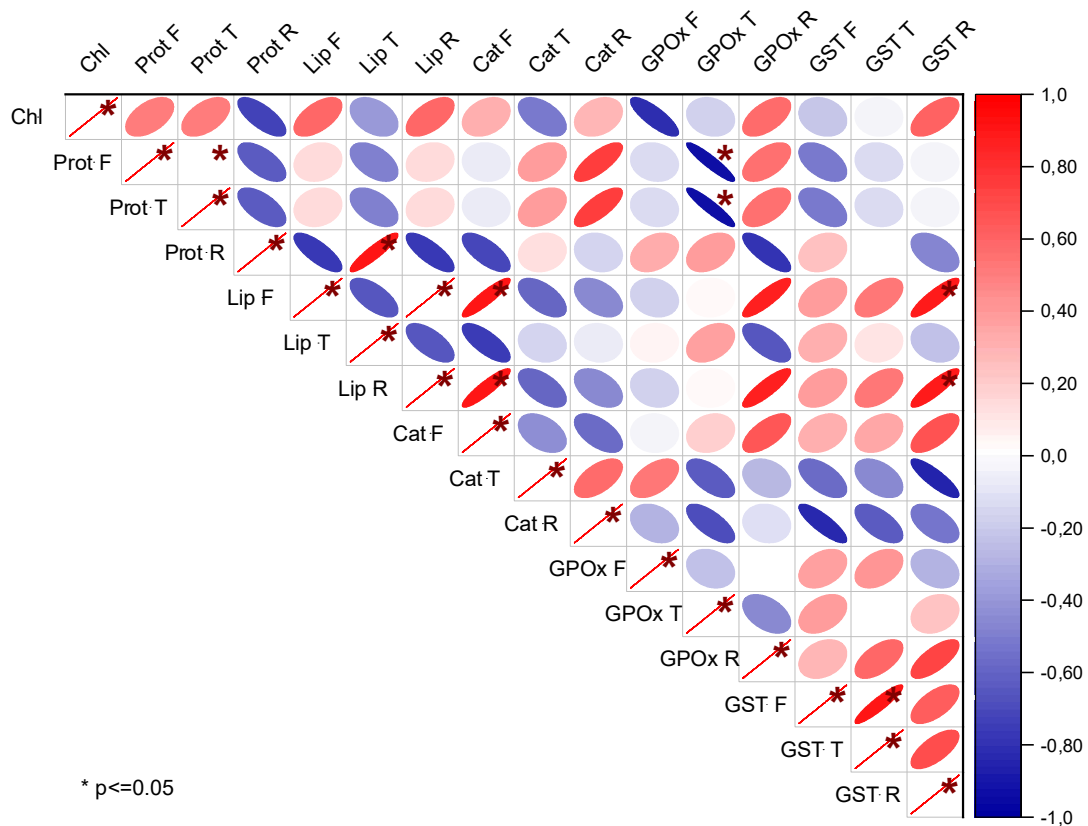


Fig. 40 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni_(100 ppm).

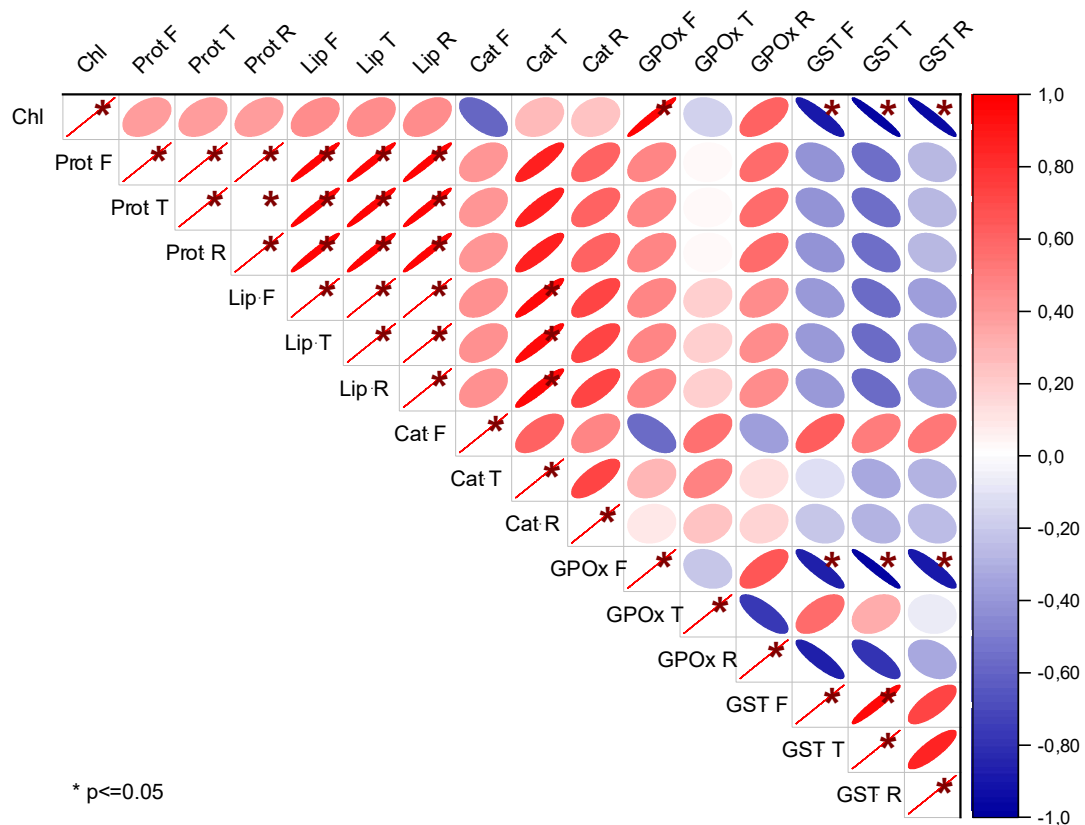


Fig. 41 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni_(500 ppm).

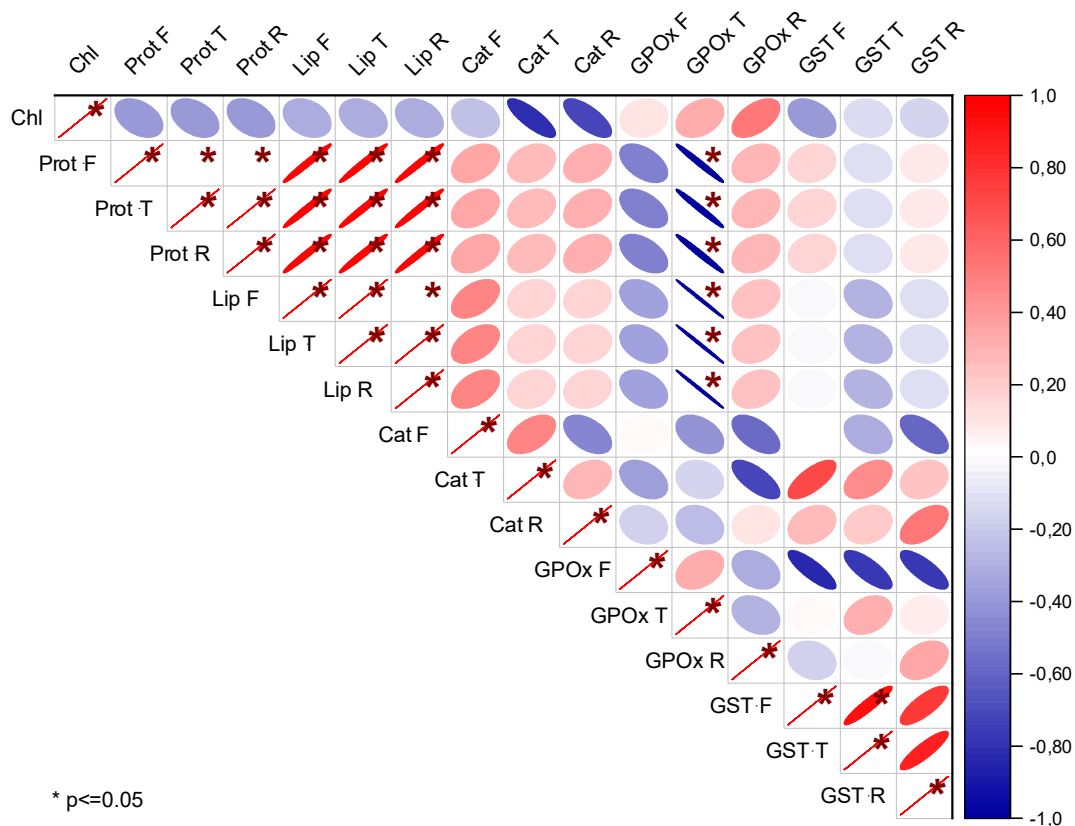


Fig. 42 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni_(1000 ppm).

3.6.4 Corrélation entre les réponses des plantes exposées aux doses mixtes

Les résultats obtenus sous l'exposition à la dose mixte Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) (Fig. 43) indiquent que la Chl semble présenter une corrélation positive, bien que non significative, avec les teneurs en Prot et en Lip, différente des résultats sous Cd_(1000 ppm) (corrélation négative non significative), mais similaire à celles enregistrées dans le groupe contrôle. En contraste avec les résultats obtenus sous Cd_(1000 ppm), une corrélation positive significative a été observée seulement entre les paires Prot/Prot, et non entre les paires Prot/Lip.

Une autre différence est la présence d'une corrélation négative significative entre Lip T/Cat T ($r = -0,97$) (Annexe 2 ; Fig. 14). Aussi, aucune corrélation significative négative n'a été observée entre les paires Prot (F, T, R)/GPOx T et Lip (F, T, R)/GPOx T. Comparativement aux résultats sous la dose simple Cd (1000 ppm), le corrélogramme a montré également qu'aucune corrélation positive significative n'a été relevée entre les paires Cat F/GST (F, T). La seule similitude est la très faible corrélation entre Prot/GST, Lip/GST, Cat/GPOx et GPOx/GST.

Sous la dose mixte de Cd_(100 ppm)+Ni_(100 ppm) (Fig. 44), les résultats montrent globalement que la corrélation entre les paires est différente de celle enregistrée sous les doses simples Cd_(100 ppm) ou Ni_(100 ppm).

La Chl semble présenter une corrélation positive significative seulement avec la variable Cat T ($r = 0,93$) (Annexe 2 ; Fig. 15). Différemment de sous Cd_(100 ppm) où une forte corrélation négative a été constatée entre Chl/GST F et Chl/GST R, et différemment aussi de sous Ni_(100 ppm) où aucune corrélation significative n'a été observée.

La tendance de corrélation (positivement corrélée) entre les paires Prot/Prot, Prot/Lip et Lip/Lip était plus similaire à celle sous Cd_(100 ppm) que sous Ni_(100 ppm) ou la relation était plus négative (non significative). Sous la dose mixte, la corrélation était non significative entre les paires Prot/Cat et Lip/Cat, similaire à sous Cd_(100 ppm) et Ni_(100 ppm), sauf qu'une corrélation positive a été observée entre les Lip (F, R)/CAT F sous Ni_(100 ppm).

La corrélation Prot/GPOx et Lip/GPOx était non significative sous la dose mixte, mais négativement significative sous les doses simples Cd_(100 ppm) et Ni_(100 ppm), particulièrement entre les paires Prot (F, T, R)/GPOx T et Lip (F, T)/GPOx T sous Cd_(100 ppm) et Prot (F et T)/GPOx T sous Ni_(100 ppm).

En comparant les résultats entre les paires enzymatiques CAT/GPOx, CAT/GST et GPOx/GST sous Cd_(100 ppm), Ni_(100 ppm) et Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) dans les trois organes de la plante, le corrélogramme a montré qu'il y a plus de corrélations significatives entre ces variables enzymatiques sous la dose mixte que sous les doses simples. Avec une corrélation positive entre

Cat F/GPOx F ($r = 1$), une corrélation positive entre GST F/GST T ($r = 0,95$), ainsi qu'une corrélation négative entre Cat R/GST F ($r = -0,90$) (Annexe 2 ; Fig. 15).

Les résultats obtenus sous la dose mixte Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm) (Fig. 45) révèlent une corrélation plus positive entre les paires Chl/Prot et Chl/Lip que sous la dose simple de Ni à 1000 ppm (Fig. 40). Cependant, cette corrélation n'est significative qu'entre la paire Chl/GPOx T ($r = 0,89$) (Annexe 2 ; Fig. 16), contrairement à Ni 1000, où aucune corrélation significative n'a été observée. Une autre différence est que la corrélation entre les variables Prot/Lip était non significative, alors qu'une corrélation positive significative a été notée entre toutes les paires Prot/Prot, Prot/Lip et Lip/Lip sous la dose simple. Aussi, aucune corrélation significative n'a été relevée entre Lip (F, T et R)/GPOx T, contrairement sous la dose simple. Une autre distinction est la présence d'une corrélation négative entre Cat T/GPOx F et d'une corrélation positive entre Cat R/GST R, non observées sous Ni 1000. Enfin, une corrélation négative mais non significative a été observée entre les paires Lip (F, T et R)/GST F et GST T, alors qu'elle était presque nulle sous la dose simple (Annexe 2 ; Fig. 16).

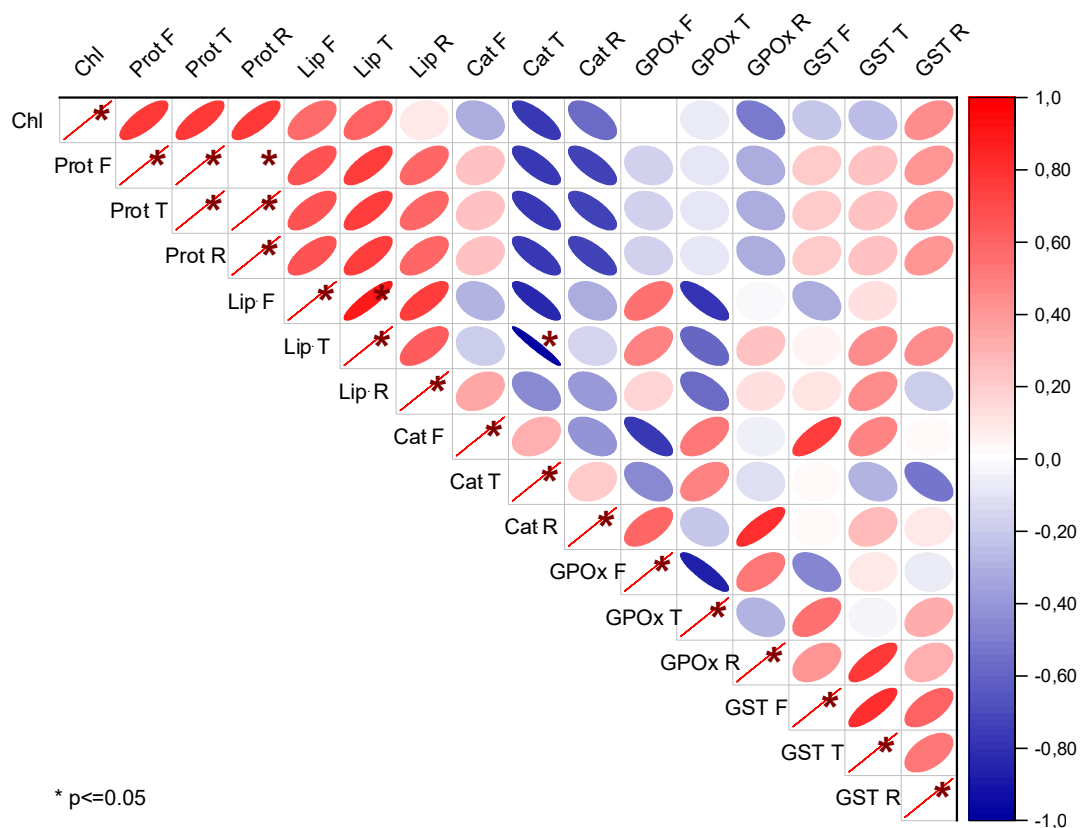


Fig. 43 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé à Cd(1000 ppm) + Ni(120 ppb).

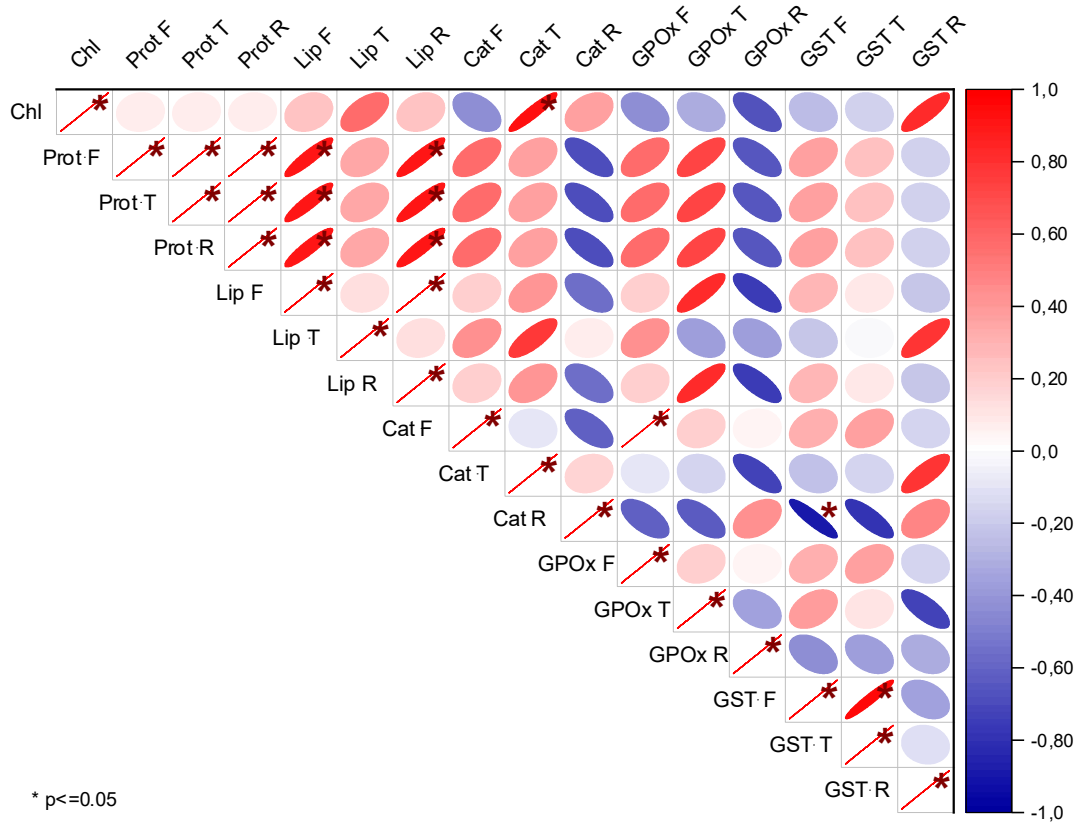


Fig. 44 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé à Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm).

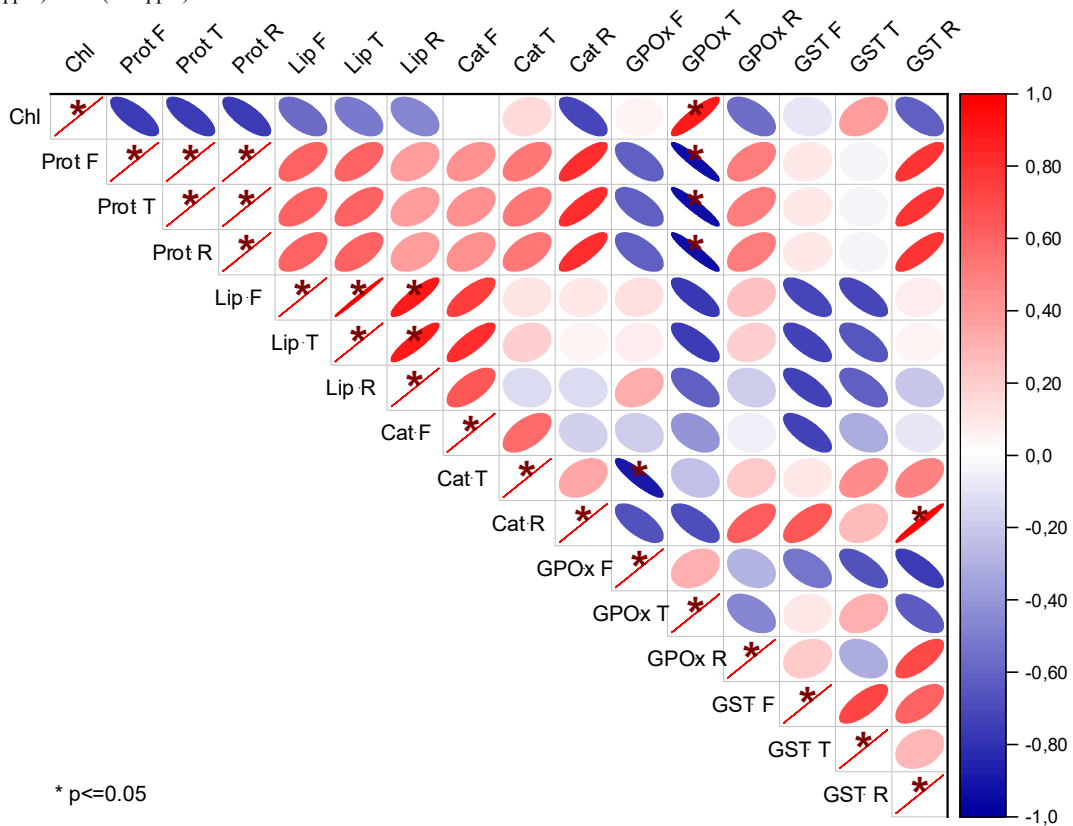


Fig. 45 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes de *P. australis* exposée à Cd_(100 ppb) + Ni_(1000ppm).

4 Discussion

La discussion sera composée de trois parties : une première partie concernant les effets du cadmium et du nickel sur les paramètres métaboliques (teneur en chlorophylle, lipides et protéines) ; une deuxième où on évaluera la réponse du système antioxydant (CAT, GPOX et GST) dans les différentes parties de la plante ; et enfin une dernière partie où l'on discutera de la corrélation entre les paramètres métaboliques et la réponse du système de défense antioxydant enzymatique.

4.1 Teneur en chlorophylle et réponse métabolique

La teneur en chlorophylles est souvent utilisée pour évaluer les impacts du stress causé par les ETMs. Nos résultats ont montré que sous de fortes doses de Cd (100, 500 et 1000 ppm), les valeurs moyennes de la teneur en chlorophylle totale diminuaient de manière significative à mesure que la dose augmentait. Une tendance similaire a été enregistrée sous les fortes doses de Ni, mais la diminution était moins importante que celle observée sous Cd.

De nombreuses études ont démontré que le Cd réduit de manière significative la teneur en chlorophylle dans les feuilles de *P. australis*. Pietrini *et al.* (2003), en présence de 50µM de Cd ont observé une réduction de 30 % des niveaux de chlorophylle, entraînant une diminution importante de la photosynthèse. Les travaux de Ederli *et al.* (2004) et Ait Ali *et al.* (2004) ont tous deux noté une diminution de la teneur en chlorophylle dans les feuilles de *P. australis* sous l'effet du Cd. Des résultats similaires ont été observés par Khalilzadeh *et al.* (2022) chez *P. australis* qui a poussé dans des eaux usées contenant de la Ni. Il a été démontré aussi que le stress lié au Ni a un impact négatif sur la teneur en chlorophylle de diverses espèces ; *Egeria densa* (Harguinteguy *et al.*, 2015) et *Alisma plantago-aquatica L.* (Lapirov *et al.*, 2017).

La diminution de la teneur en chlorophylle chez les plantes de *P. australis* soumises au Cd et au Ni peut être attribuée au stress oxydatif induit par Cd et Ni. Ces ETMs peuvent s'accumuler dans les feuilles et provoquer un stress oxydatif en stimulant la production excessive d'ERO. Les ERO sont très réactives et peuvent dégrader directement la chlorophylle ou perturber sa biosynthèse en inhibant certaines enzymes impliquées dans ce processus.

Selon Küpper *et al.* (2002), les ETMs tels que le Cd, Cu, Zn et le Pb peuvent inhiber la biosynthèse de la chlorophylle et dégrader l'appareil photosynthétique. Ces effets dépendent de la concentration, du temps d'exposition et du type d'ETM (Ouyang *et al.*, 2012). L'inhibition de la biosynthèse de la chlorophylle par les ETMs est due à leur interaction avec les enzymes impliquées dans le processus, ainsi qu'à leur capacité à activer les dommages oxydatifs et à modifier les propriétés de la membrane cellulaire (Shakya *et al.*, 2008).

Selon Qian *et al.* (2009), le Cd induit un effet diminutif sur les teneurs en chlorophylle et en caroténoïdes, ce qui pourrait s'expliquer par l'effet inhibiteur du Cd sur les enzymes impliquées dans la biosynthèse des pigments. Le Cd est susceptible d'inhiber l'activité enzymatique impliquée dans la biosynthèse de la chlorophylle, notamment celle de la protochlorophyllide réductase et de la chlorophylle synthase. Cette perturbation de la voie biosynthétique engendre une diminution de la production de la chlorophylle (Hayat *et al.*, 2021). D'après Myśliwa-Kurdziel and Strzałka (2002), le Cd interfère avec la biosynthèse de la chlorophylle en deux étapes distinctes. Premièrement, il inhibe la production d'acide aminolévulinique, qui est un précurseur essentiel. Deuxièmement, il réduit la conversion du protochlorophyllide en chlorophyllide, qui est une étape tardive dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle. À certaines doses, le Cd peut altérer la structure et le fonctionnement chloroplastique chez plusieurs espèces végétales. Son action peut compromettre l'intégrité des membranes thylakoïdiennes et interférer avec le transport des électrons photosynthétiques. Cette perturbation engendre une diminution de l'efficacité photosynthétique et, par conséquent, une baisse des teneurs en chlorophylle (Bashir *et al.*, 2015; Küpper *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2020). Selon Haider *et al.* (2021), le Cd peut interférer avec l'absorption et la répartition de nutriments minéraux essentiels, tels que le fer, le magnésium et l'azote, nécessaires à la synthèse et au fonctionnement optimal des molécules chlorophylliennes.

Contrairement au Cd, le Ni est connu comme micronutriment végétal et sert de composant à de nombreuses enzymes importantes. Cependant, il peut être extrêmement toxique pour les plantes lorsqu'il est présent en concentration excessive (N. Atta *et al.*, 2024). Sous des doses élevées, le Ni est associé à l'inhibition de la photosynthèse par diverses voies directes et indirectes : une désorganisation structurelle des chloroplastes, un blocage de la biosynthèse chlorophyllienne, une perturbation du transport des électrons, une inhibition des activités enzymatiques du cycle de Calvin ainsi qu'une carence en CO₂ induite par la fermeture stomatique (Molas, 1997; Sachan et Lal, 2017; Sreekanth *et al.*, 2013). Le Ni induit une diminution de la taille et du nombre de chloroplastes, ainsi qu'une réduction de ceux des grana et des thylakoïdes. Il affecte également négativement le complexe antennaire collecteur de lumière II (LHCII : *light-harvesting complex II*) (Chen *et al.*, 2009; Molas, 1997). Chez *Brassica oleracea*, Molas (1997) a observé une altération de la composition lipidique membranaire en présence de NiSO₄ (850-1700 ppm), ces modifications sont induites par une peroxydation des lipides membranaires.

Le Cd et le Ni à fortes doses réduisent la teneur en chlorophylle des plantes. Cependant, le Cd semble avoir un effet particulièrement plus néfaste sur les processus photosynthétiques comparé au Ni. Sous les traitements Cd (500 ppm) et Cd (1000 ppm), la teneur en chlorophylle totale a chuté de plus de 75 % par rapport au témoin (14,74 µg/ml). Sous les fortes doses de Ni, la diminution était moins importante que celle observée sous Cd, où elle atteignait 66 % sous Ni (1000 ppm) et 59 % sous Ni (500 ppm). Cette différence d'effet s'explique par le fait que le Ni est un micronutriment essentiel aux plantes, qui disposent de systèmes permettant de réguler son absorption, son transport, sa compartimentation et son homéostasie intracellulaire. En revanche, pour le Cd non essentiel, son accumulation et son mouvement dans les plantes se fait probablement d'une manière moins contrôlée, causant une toxicité supérieure.

Selon les travaux de Küpper *et al.* (1998) et Böddi *et al.* (1995), le Cd pourrait remplacer le Mg²⁺ dans les molécules de la chlorophylle et exercer une action directe sur les enzymes impliquées dans la biosynthèse chlorophyllienne.

Contrairement au Cd, le Ni est présent naturellement dans les tissus végétaux à des concentrations allant de 0,05 à 10 ppm de matière sèche, selon les plantes (Adriano, 2001; Hassan *et al.*, 2019; Nieminen *et al.*, 2007). Il est un constituant important de certaines métalloenzymes (un cofacteur enzymatique) dont les uréases, les glyoxalases (famille I), les peptides déformylases, méthyl Co-M réductases, hydrogénases et quelques superoxydes dismutases (Nimra Atta *et al.*, 2024).

Les mécanismes de régulation de l'homéostasie du Ni chez *P. australis* lui confèrent probablement une meilleure tolérance à cet élément par rapport Cd, pour lequel ces systèmes de contrôle sont moins efficaces. Cette tolérance au Ni est confirmée par le fait que la teneur en chlorophylle sous Ni (1000 ppm) (4,99 µg.ml⁻¹) était supérieure à celle sous la dose Cd (1000 ppm) (3,31 µg.ml⁻¹), malgré l'accumulation de 23,92 ppm de Ni et seulement 10,57 ppm de Cd dans les feuilles (Tab. 29).

Sous les faibles doses de Cd [Cd_(10ppb) ; Cd_(30ppb) et Cd_(100ppb)], aucune différence significative n'a été observée par rapport au groupe témoin. En revanche, les faibles doses de Ni [Ni_(30ppb) ; Ni_(60ppb) ; Ni_(120ppb)] ont entraîné une légère augmentation de la teneur en chlorophylle totale. Ces résultats sont parfaitement en accord avec le rôle du Ni dans les végétaux. Depuis 2004, l'Association américaine officielle pour le contrôle des nutriments des végétaux (AAPFCO) reconnaît le Ni comme un élément essentiel pour les plantes, compte tenu de sa relation avec l'enzyme uréase (Wood *et al.*, 2004). Plusieurs études ont démontré que le Ni a des effets à la fois stimulants et inhibiteurs sur la croissance des plantes. Mais ces effets pourraient être spécifiques à l'espèce et dépendants de la concentration (Badawy *et al.*, 2022;

Gajewska et Skłodowska, 2009; Uruç Parlak, 2016). Selon Shahzad *et al.* (2018), le Ni est bénéfique à faibles concentrations pour les plantes, il est considéré comme un nutriment important à la croissance et au développement normaux des plantes, et essentiel à l'activation de plusieurs enzymes. Le Ni joue un rôle important dans un large éventail de processus physiologiques, notamment la germination des graines, la croissance végétative, la reproduction, la photosynthèse ainsi que dans le métabolisme de l'azote (Bai *et al.*, 2013). La voie de biosynthèse de la chlorophylle dans les plantes supérieures est complexe il est médié par plus de 17 enzymes. La formation peut être subdivisée en quatre parties : (1) synthèse de l'acide 5-aminolévulinique (ALA), précurseur de la Chl; (2) formation de l'uroporphyrinogène III ; (3) synthèse de la protoporphyrine et (4) insertion de Mg dans la protoporphyrine IX (PPIX) conduisant à la formation de la Chlorophylle.

Plusieurs études ont montré aussi que la présence de Ni à certaine concentration contribue à la biosynthèse et à la protection de la chlorophylle (Bai *et al.*, 2006; Polacco *et al.*, 2013; Tripathy et Pattanayak, 2012). Le Ni joue un rôle clé dans le métabolisme de l'azote, il est un cofacteur essentiel de l'enzyme uréase, qui hydrolyse l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac. Cela permet d'éviter l'accumulation toxique d'urée et de recycler l'azote issu de la dégradation des composés azotés (Mazzafera *et al.*, 2013). L'azote produit par l'action de l'uréase est ensuite assimilé dans les acides aminés comme le glutamate, précurseurs de la biosynthèse de l'acide 5-aminolévulinique (ALA), qui est la molécule initiatrice de la voie de biosynthèse de la chlorophylle (Nimra Atta *et al.*, 2024; Tripathy et Pattanayak, 2012).

Les combinaisons : Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) ; Cd (100 ppb) + Ni (1 000 ppm) et Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) ont entraîné une diminution significative des valeurs moyennes de la teneur en chlorophylle totale par rapport aux plantes témoins. Cependant, ces valeurs restaient légèrement supérieures à celles observées sous les hauts traitements individuels de Cd et de Ni. Ces résultats démontrent qu'une addition de faibles doses Cd (100 ppb) et de Ni (120 ppb) aux fortes doses de Ni (1000 ppm) et de Cd (1000 ppm), respectivement, semble améliorer légèrement les teneurs foliaires en chlorophylle. L'hypothèse la plus plausible serait que la présence de Ni(120 ppb) (étant un micronutriment) avec le Cd (1000 ppm) atténue légèrement l'effet toxique de ce dernier sur la biosynthèse et la dégradation de la chlorophylle (3,53 contre 3,31 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). L'addition de Cd (100 ppb) (élément toxique) au Ni (1000 ppm) (4,99 contre 5,27 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) pourrait conduire à une induction plus forte des systèmes de détoxification ou même une réduction de l'absorbance et la translocation vers les feuilles.

Les résultats relatifs à l'accumulation foliaire du Cd et du Ni obtenus sous les doses mixtes et simples de Cd et/ou Ni (Tab. 25 ; 26 ; 27 et 28), corroborent les hypothèses précédemment émises. En effet, les résultats révèlent que sous les doses mixtes, on observe une légère réduction des quantités de Cd et de Ni accumulées dans les feuilles, comparativement à ce qui est constaté sous l'effet des doses simples. Cette diminution des quantités accumulées pourrait être due à une baisse de l'absorption et/ou de la translocation du Cd et du Ni depuis les racines vers les parties aériennes de la plante.

Lorsque la dose mixte est composée des mêmes quantités de Cd et de Ni ($[Cd] = [Ni] = 100 \text{ ppm}$), la teneur en chlorophylle semble était plus faible ($7,81 \mu\text{g.ml}^{-1}$) comparativement à celle obtenue sous la dose individuelle Ni (100ppm) ($8,92 \mu\text{g.ml}^{-1}$) et plus élevée ($7,26 \mu\text{g.ml}^{-1}$) que sous Cd (100ppm). L'effet combiné de Cd et Ni semble être moins toxique que Cd seul mais plus toxique que Ni seul, ce qui pourrait indiquer une forme d'interaction antagoniste où le Ni atténue partiellement les effets négatifs du Cd sur la teneur en chlorophylle.

4.2 Teneur en protéines

Sous l'effet de faibles doses de Cd (10, 30 et 100 ppb) et de Ni (30, 60 et 120 ppb), une légère augmentation de la teneur en protéines totales a été enregistrée, en particulier dans les feuilles et les racines exposées au Cd, ainsi que dans les feuilles exposées au Ni. Cependant, aucune différence statistiquement significative n'a été relevée entre les résultats enregistrés sous ces faibles doses et ceux du groupe témoin, et ce, dans les trois organes.

Ces résultats démontrent que lorsque les plantes de *P. australis* sont exposées à de faibles doses de Cd et de Ni, elles peuvent tolérer ces niveaux sans manifester de signes évidents de stress ou de dommages. Cependant, cette très légère augmentation de la teneur en protéines dans les feuilles et les racines peut s'expliquer par une réaction adaptative liée à l'absorption, la translocation et l'accumulation de Cd et de Ni dans les racines, les tiges et les feuilles. Ou cela pourrait être dû à un phénomène d'hormèse, où l'addition de faibles doses de Cd et de Ni a stimulé certains processus physiologiques bénéfiques pour la croissance comme la synthèse protéique. Selon Salinitro *et al.* (2021), l'hormèse est un phénomène dose-réponse observé chez de nombreux espèces végétales, provoqué par de faibles niveaux d'un grand nombre de facteurs de stress, parmi lesquels les ETMs comme le Cd et le Ni.

En effet, les résultats de l'accumulation de Cd et de Ni dans les trois organes de *P. australis* (Tab. 25 ; 26 ; 27 et 28) révèlent une augmentation de l'accumulation en fonction de l'élévation des doses appliquées. De nombreuses études ont rapporté l'effet hormèse provoqué par le Cd sur des espèces végétales telles que *Lonicera japonica* (Jia *et al.*, 2015), *Dianthus*

carhusianorum (Muszyńska *et al.*, 2018), chez *Brassica juncea* où 10µM de Cd a augmenté la teneur en protéines total et les phytochélatines (Seth *et al.*, 2008). Chez *Nasturtium officinale* à 1 et 5 ppm de Ni, la biomasse a augmenté, aussi une augmentation de la teneur en protéines et des activités enzymatiques a été observée à dans les feuilles et les racines par rapport au témoin (Duman et Ozturk, 2010). En revanche, sous les fortes doses de Cd et de Ni, les résultats indiquent qu'à Cd_(100 ppm) et Ni_(100 ppm) une augmentation significative des teneurs en protéines a été observé dans les feuilles et les racines, mais dans les tiges sous Ni une diminution significative mais pas d'augmentation ou de diminution dans les tiges sous Cd.

Cette augmentation des protéines foliaires et racinaires est une réponse au stress induit par de fortes concentrations de Cd et Ni accumuler dans les différents organes. Nos résultats suggèrent qu'un processus de détoxification est induit, initié par une augmentation de la biosynthèse des phytochélatines, constatée dans notre cas par l'augmentation du taux de protéines totales. Plusieurs études ont démontré que sous un stress métallique modéré, la teneur en protéines de *P. australis* augmente. Sous 18,33 ppm et 36,66 ppm de CdCl₂ (Jiang et Wang, 2007). Sous 100 µM de Cd (Ederli *et al.*, 2004). Sous 0,1 -100 µM de Cd²⁺ pendant 100 jours (Fediuc et Erdei, 2002). Sous 10 et 100 ppm de Cu et 1-10 ppm de Cd (Rocha *et al.*, 2014). Aussi chez d'autres espèces comme chez *Nasturtium officinale* sous 25 ppm de Ni (Rocha *et al.*, 2014). Selon Stolt *et al.* (2003), en présence des ETMs, les végétaux intensifient la synthèse protéique, notamment celle des phytochélatines, qui sont essentielles à la détoxification. Les phytochélatine représentent un groupe de chélateurs intracellulaires de nature peptidique synthétisés en réponse à la présence d'ETMs (Hartley-Whitaker *et al.*, 2001; Remon, 2006). Ces phytochélatines se lient avec les ETMs via le groupe SH (sulfhydryle), formant ainsi un complexe thiolate-métal. Cette réaction rend le métal inactif, permettant son stockage dans les vacuoles (Seregin et Kozhevnikova, 2023). Face à un stress métallique, la cellule végétale réoriente le flux des molécules carbonées, azotées et soufrées vers la synthèse d'acides aminés, de peptides et de phytochélatines, essentiels à la lutte contre le stress oxydatif, et qui jouent un rôle clé dans la chélation des ETMs (Sarry *et al.*, 2006; Xing, 2003).

Dans les feuilles et les racines, une augmentation significative des teneurs en protéines a été observée sous les deux ETMs à 100 ppm. Mais le Ni a provoqué une diminution des protéines dans les tiges tandis que le Cd n'a eu aucun effet sur les niveaux protéiques dans cette partie de la plante. Cela pourrait indiquer une distribution ou un mécanisme de réponse différent au stress induit par le Cd par rapport au Ni. La stimulation de la synthèse protéique dans les racines et les feuilles montre que *P. australis* privilège plus la protection de ces deux parties que celle des tiges. Ce qui nécessite une production importante de protéines de défense dans

ces deux organes, essentiels pour la photosynthèse, ainsi que pour l'absorption de l'eau et des nutriments. Cela pourrait aussi indiquer que ces deux ETMs s'accumulent moins dans les tiges. Effectivement, Nos résultats de l'accumulation de Cd et de Ni dans les trois organes de *P. australis* ont montré que à faibles doses Cd (10-100 ppb) et Ni (30-120 ppb), l'ordre d'accumulation était : racines > tiges > feuilles. Sous Cd (100 ppm), l'ordre d'accumulation est aussi : racines > tiges > feuilles. Mais sous Ni(100 ppm) l'ordre devient : racines > feuilles > tiges. Sous les autres hautes doses, Cd et Ni (500 ppm) et Cd et Ni (1000 ppm), une diminution drastique des teneurs en protéines a été observée dans les trois organes par rapport aux résultats enregistrés sous Cd ou Ni (100 ppm), sauf dans les racines des plantes exposées à Cd (500 ppm) où la teneur a augmenté, atteignant la teneur maximale enregistrée (49,38 mg/g). Cette baisse pourrait s'expliquer par une toxicité excessive de Cd et Ni, dépassant les capacités de défense de *P. australis*. Cette toxicité a induit une dégradation et/ou une inhibition de la synthèse protéique. Cela indique que sous ces doses les plantes de *P. australis* ne peuvent plus maintenir la même production des phytochélatines protéiques ou protéines de fonctionnement général.

L'augmentation de la teneur en protéines dans les racines Cd (500 ppm) pourrait refléter une forte induction des mécanismes de tolérance au Cd par la synthèse massive de protéines chélatrices, de transport, de séquestration et de détoxification dans cet organe qui constitue la première ligne de défense. Mais au-delà de 500 ppm de Cd, les racines semblent atteindre leur limite de tolérance, avec probablement une saturation des mécanismes de défense protéiques. Comparativement aux doses individuelles, l'addition de faibles doses de Cd(100 ppb) et Ni(120ppb) au Ni(1000 ppm) et Cd (1000 ppm), respectivement, semble légèrement améliorer la teneur en protéines dans tous les organes des plantes qui sont sous les simples doses de Ni(1000 ppm) et Cd (1000 ppm).

Cette légère augmentation de la teneur en protéines peut être dû à un phénomène d'interaction où de faibles dose d'un ETM (Cd ou Ni) peuvent atténuer les effets toxiques de l'autre (Ni ou Cd), stimulant ainsi la synthèse des protéines ou améliorant d'autres mécanismes de défense, ou le transport et absorption des nutriments. *P. australis* peuvent activer des mécanismes de défense qui améliore sa tolérance au stress induit par la présence de Cd et/ou Ni comme l'induction des phytochélatines. Les résultats de la teneur en chlorophylle corroborent et appuient cette hypothèse, où les valeurs sous ces deux doses mixtes étaient légèrement supérieures à celles observées sous les traitements individuels élevés de Cd et de Ni. Les résultats relatifs à l'accumulation foliaire du Cd et du Ni obtenus sous les doses mixtes et simples de Cd et/ou Ni révèlent aussi que sous les doses mixtes et comparativement à ce qui est constaté sous l'effet des doses simples, une légère réduction des quantités de Cd et de Ni

accumulées dans les feuilles et les tiges mais pas dans les racines. Cela peut s'expliquer par le fait que *P. australis*, sous des doses élevées, séquestre et minimise la translocation vers la partie aérienne plus sensible au Cd et Ni. Effectivement, plusieurs études antérieures ont mis en évidence la capacité de *P. australis* à absorber et accumuler le Cd et le Ni, en particulier au niveau de racinaire (Alfadul et Al-Fredan, 2013; Nawrot *et al.*, 2021; Zheng-yub, 2008). selon Vymazal and Březinová (2016), *P. australis* est considéré comme une plante non accumulatrice et plutôt une plante dite « excluders » une stratégie d'exclusion adoptée pour minimiser la translocation du Cd et du Ni de la racine vers les parties aériennes plus sensibles.

En revanche, sous Cd (100 ppm)+Ni (100 ppm), on observe une diminution importante de la teneur en protéines par rapport aux doses individuelles, particulièrement dans les racines et les feuilles. Cette diminution indiquant une interaction synergique négative. Probablement dû à une amplification des effets toxiques de chaque ETM. Cette amplification peut être due à une augmentation d'absorption, d'accumulation et de séquestration de Cd et de Ni entraînant une perturbation métabolique plus sévère sur la synthèse des protéines ou/et une dégradation des protéines. Les résultats relatifs à l'accumulation du Cd et du Ni dans les trois organes de *P. australis* obtenus sous les doses mixtes et simples de Cd et/ou Ni appuient cette hypothèse. Lorsque la dose mixte est composée des mêmes quantités de Cd et de Ni ([Cd] = [Ni] = 100 ppm), l'accumulation semble supérieure comparativement à celle obtenue sous les doses individuelles Cd (100ppm) et Ni (100ppm). Il est possible que la présence de Cd et Ni ensemble modifie la perméabilité des membranes cellulaires ou active des transporteurs spécifiques qui augmentent l'absorption des deux ETMs chez *P. australis*.

La co-existence de Cd et Ni pourrait entraîner une synergie positive, où l'un des métaux facilite l'absorption de l'autre, augmentant ainsi leur accumulation totale dans les organes *P. australis*. Le Cd et Ni peuvent aussi interférer avec l'absorption d'autres nutriments essentiels chez *P. australis*, qui sont importants pour de nombreux processus métaboliques, y compris la synthèse des protéines. Rubio *et al.* (1994) ont observé que les traitements au Cd et/ou Ni dans les plants de riz entraînaient une diminution des teneurs en K, Ca et Mg, indiquant une interférence avec l'absorption et la distribution des nutriments. Selon Chen *et al.* (2009), le Cd et Ni pourraient être absorbés via des transporteurs peu spécifiques (protéines de type porine) par diffusion passive simple suivant le gradient de concentration (via la voie apoplastique). Mais aussi via le transport actif en empruntant la voie symplastique. En empruntant les canaux membranaires peu spécifiques des nutriments essentiels, le Cd et Ni sont capables d'interférer avec l'absorption de plusieurs éléments (Das *et al.*, 1997; Huybrechts *et al.*, 2019).

4.3 Teneur en lipides

Les résultats de l'analyse de la teneur en lipides n'ont révélé aucune différence significative entre les faibles doses testées de Cd et de Ni par rapport au groupe témoin, pour les trois organes étudiés (feuilles, racines et tiges). Cependant, une diminution a été observée dans les tiges exposées à 100 ppb de Cd, tandis qu'une augmentation des niveaux lipidiques a été constatée dans les feuilles exposées à 120 ppb de Ni.

Cela pourrait indiquer que, à de faibles doses, ces deux ETMs ne perturbent pas les mécanismes métaboliques liés à la production ou au stockage des lipides dans les feuilles, tiges et racines. Mais à 100 ppb, le Cd induit une diminution des lipides, mais uniquement dans les tiges, suggérant une sensibilité particulière de cet organe au Cd.

Ederli *et al.* (2004), en traitant *P. australis* avec 100 mM de Cd pendant 21 jours, n'ont observé aucun changement structurel ou ultrastructural important dans les racines. Selon Pietrini *et al.* (2003), le CdSO₄ à 100 uM semble provoquer des modifications ultrastructurales plus importantes au niveau des tiges que des racines. L'exposition au Cd a entraîné des modifications du volume et de l'organisation des plastoglobules, ayant potentiellement un impact sur la fonction de ces structures plastidiennes. Selon Hakmaoui *et al.* (2007), chez *P. australis* le CdCl₂ augmente le nombre et la taille des plastoglobules. Ces organites sont responsables de la synthèse et du recyclage des composés lipophiles produits au cours de la peroxydation lipidique.

À 120 ppb, le Ni a provoqué une augmentation des lipides, mais seulement dans les feuilles, indiquant un effet organe-spécifique distinct de celui du Cd. L'augmentation de la teneur en lipides observée dans les feuilles des plantes exposées à Ni_(120 ppb) peut être liée au rôle du Ni en tant que micronutriment. Le Ni joue un rôle important dans l'activation du système glyoxalase, un système enzymatique responsable de la dégradation du méthylglyoxal (pyruvaldéhyde et 2-oxopropanal), un puissant composé cytotoxique produit naturellement par le métabolisme cellulaire lors de la glycolyse, la peroxydation des lipides et dans des conditions de stress (Ghosh *et al.*, 2016; Sankaranarayanan *et al.*, 2017).

Sous l'exposition aux fortes doses de Cd et de Ni, une diminution des teneurs en lipides a été observée dans les feuilles, les tiges et les racines. Plusieurs études, dans des conditions contrôlées ou non, ont montré une diminution de la teneur en lipides chez *P. australis* sous Cd, Ni et d'autres ETMs (Al-Sodany *et al.*, 2013; Chaplygin *et al.*, 2022; Ederli *et al.*, 2004; Kovačević *et al.*, 2020). Ces travaux ont attribué la réduction des niveaux de lipides observée à la peroxydation des lipides membranaires, provoquée par la formation d'espèces réactives de

l'oxygène (ERO). Ces molécules hautement réactives, générées en présence d'ETMs, endommagent les lipides constitutifs des membranes cellulaires. Selon Ayala *et al.* (2014), une accumulation excessive des ETMs peut interférer avec le métabolisme cellulaire en augmentant la production de ERO. Les ERO peuvent alors provoquer des dommages cellulaires, ainsi qu'une peroxydation des lipides. Les ETMs peuvent perturber le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant une fuite d'électrons et une production importante d'anions superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), précurseurs des ERO (Mansoor *et al.*, 2023; Turrens, 2003). La peroxydation lipidique consiste en une série de réactions en chaîne initiées par les ERO qui ciblent préférentiellement les lipides contenant des acides gras polyinsaturés (doubles liaisons carbone-carbone) (Yin *et al.*, 2011). Ces radicaux libres amorcent le processus en arrachant un atome d'hydrogène à un groupement méthylène ($-CH_2-$) adjacent à une double liaison. Cette abstraction d'hydrogène entraîne la formation d'un radical lipidique instable qui réagit rapidement avec le dioxygène moléculaire pour former un radical peroxyde lipidique. Ce dernier peut alors soustraire un nouvel hydrogène à une molécule d'acide gras voisine, propageant ainsi la réaction en chaîne de peroxydation lipidique conduisant à la formation de nombreux produits d'oxydation délétères comme le malon-dialdéhyde (MDA) un bio-marqueur couramment utilisée pour estimer la peroxydation lipidique (Mansoor *et al.*, 2023; Panda *et al.*, 2003; Younis *et al.*, 2018).

Les glycolipides, les phospholipides et le cholestérol sont également des cibles bien connues de modifications peroxydatives dommageables et potentiellement mortelles pour les mitochondries et les plantes (Ayala *et al.*, 2014). Selon Sanità di Toppi and Gabbrielli (1999), le Cd et le Ni peuvent provoquer une accumulation des ERO pour trois raisons principales : Ils perturbent certaines voies métaboliques, ce qui favorise la production de ERO. Ils inactivent et réduisent l'expression des enzymes du système antioxydant qui normalement éliminent les ERO. Ils épuisent les réserves de petites molécules comme la vitamine C, le glutathion, la vitamine E ou les caroténoïdes qui possèdent des propriétés antioxydantes permettant de neutraliser les ERO.

Sous les doses mixtes, une diminution significative des teneurs moyennes en lipides a été observée par rapport au contrôle dans l'ensemble des organes étudiés (feuilles, tiges et racines). Comparativement aux doses individuelles, l'addition de faibles doses de Cd_(100 ppb) et Ni_(120ppb) au Ni_(1000 ppm) et Cd_(1000 ppm), respectivement semble légèrement améliorer les niveaux lipidiques foliaires et radiculaires, mais pas caulinaires.

L'exposition aux doses mixtes de Cd et Ni entraîne globalement une diminution des lipides totaux en raison du stress oxydatif amplifié chez *P. australis*. Cependant, l'addition de faibles

doses de Cd et de Ni semble légèrement atténuer cette diminution dans les feuilles et racines, probablement grâce à une induction modérée des défenses antioxydantes et de la régulation du métabolisme lipidique. Néanmoins, cet effet bénéfique n'est pas observé dans les tiges, reflétant des différences de sensibilité et de réponses au stress entre les tige et les autres organes.

Nos résultats de la teneur en chlorophylle et en protéines corroborent et appuient cette hypothèse, où les valeurs sous ces deux doses mixtes étaient légèrement supérieures à celles observées sous les traitements individuels élevés de Cd et de Ni. Ces résultats montrent que *P. australis* peut activer des mécanismes de défense qui améliorent sa tolérance au stress induit par la présence de Cd et/ou Ni, tels que l'induction des phytochélatines et du système antioxydant, minimisant la translocation vers la partie aérienne et privilégiant davantage la protection des racines et des feuilles. Contrairement aux résultats sous les autres doses mixtes, la dose Cd (100 ppm)+Ni (100 ppm), a entraîné une baisse des teneurs en lipides dans les feuilles par rapport aux expositions individuelles Cd (100 ppm) et Ni (100 ppm), une augmentation dans les racines, tandis que dans les tiges, cette dose combinée a induit une teneur supérieure à celle sous Cd seul mais inférieure à celle sous Ni seul.

La diminution des teneurs en lipides foliaires sous cette doses mixtes, par rapport aux traitements Cd ou Ni seuls, indique un effet synergique négatif prononcé sur le métabolisme lipidique. Probablement dû à une amplification des effets toxiques de chaque ETM. Le Cd et le Ni peut impacté des voies métaboliques différent. Leurs effets combinés pourraient donc perturber de multiples processus liés à la biosynthèse des lipides. Ou leur combinaison pourrait engendrer une quantité encore plus importante des ERO, amplifiant la peroxydation lipidique. Cela expliquerait également les diminutions concomitantes de la teneur en chlorophylle et en protéines précédemment observées dans les feuilles de *P. australis*.

Par contre l'augmentation de la teneur en lipides racinaires par rapport aux expositions individuelles suggère une induction des mécanismes de défense membranaire au niveau racinaire. Sous la dose mixte Cd (100 ppm)+Ni (100 ppm), l'accumulation de lipides pourrait être une réponse des plants de *P. australis* pour renforcer les membranes pour limiter l'absorption et la translocation de Cd et Ni vers les parties aériennes (feuille et tige).

Dans les tiges, les effets opposés du Cd (augmentation) et du Ni (diminution) pourraient s'expliquer par des mécanismes de toxicité différents. Le Cd pourrait induire une production des lipides pour protéger les membranes des tissus conducteurs, tandis que le Ni perturberait ces voies de biosynthèse. Selon Verkleij *et al.* (2009), la toxicité du Cd provient de sa forte affinité pour les groupements sulfhydriles (-SH) présents dans les protéines. En revanche, la toxicité du Ni est principalement liée à son affinité pour les ligands oxygénés et azotés, ce

qui entraîne une inhibition de la croissance des racines et des feuilles des plantes (Clemens, 2006).

4.4 Réponse des enzymes de system antioxydant

4.4.1 Activité enzymatique de la catalase (CAT)

De manière générale, l'activité de la CAT a augmenté avec l'accroissement des doses de Cd et de Ni appliquées. Cependant, une diminution de cette activité enzymatique a été observée dans les feuilles et les tiges sous l'exposition à Ni_(1000 ppm) comparativement sous Ni_(500 ppm) où nous avons enregistré l'activité la plus élevée. Sous

les faibles doses de Cd et Ni, l'absence de différence significative avec les résultats des plants témoins indique que le stress oxydatif engendré est limité et que le système antioxydants existant suffise à y faire face, et ne nécessitant pas une augmentation importante de l'activité de la CAT.

L'augmentation de l'activité de la CAT dans les trois organes sous les doses croissantes de Cd et Ni reflète une réponse antioxydante visant à contrer la production d'ERO induite par ces deux ETMs. Plusieurs études ont observé une induction de l'activité de la CAT chez *P. australis* exposée aux ETMs. Dans les feuilles et les racines sous 50 µm de CdSO₄ (Iannelli *et al.*, 2002). Dans les plantes sous 0,2 ; 0,4 et 0,6 mmol.L⁻¹ de Cd (He et Liu, 2007). Dans les racines de *P. australis* traitées par 100 µM de Cd (Ederli *et al.*, 2004). L'induction de la CAT chez *P. australis* sous exposition au Ni seul n'a pas été étudiée, mais plusieurs travaux ont montré que l'exposition au Ni peut entraîner des dommages chez plusieurs espèces (Baccouch *et al.*, 2001). Ces dommages s'accompagnent souvent d'une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes, notamment de la CAT (Amjad *et al.*, 2020; Baccouch *et al.*, 2001). Chez *Zea mays* sous 250 µM NiCl₂ (Baccouch *et al.*, 2001). Chez *Zea mays* sous 0, 20, and 40 ppm (Amjad *et al.*, 2020). Chez *Luffa cylindrica*, sous 50-800 µM de Ni (Wang *et al.*, 2010).

Ces études démontrent que l'augmentation de l'activité CAT fait partie intégrante des mécanismes de défense des plantes contre le stress oxydatif induit par le Cd et le Ni. Cependant, la réponse de la CAT au stress peut varier selon l'espèce végétale et la concentration d'exposition. Sous 10 et 200 µM de NiSO₄, l'étude de Gajewska *et al.* (2006) portant sur *Triticum aestivum* a révélé des réponses différentes de l'activité CAT en fonction de la concentration en Ni. Une exposition à 10 µM de NiSO₄ n'a induit aucun dommage visible, n'a pas affecté la croissance des plantes ni l'activité enzymatique de la CAT par rapport aux plantes témoins. En revanche, une concentration de 200 µM de Ni a inhibé la croissance végétative, provoqué des symptômes visibles de toxicité et entraîné une diminution

significative de l'activité CAT. Ces résultats soulignent l'effet dose-dépendant du Ni sur la réponse de la CAT, avec une tolérance à de faibles concentrations mais une inhibition de l'activité antioxydante à des niveaux élevés de Ni.

Nos résultats montrent une tendance similaire à celle observée par Gajewska *et al.* (2006) chez *Triticum aestivum*. Aux faibles doses testées, l'activité de la CAT n'a pas été significativement affectée ou stimulée malgré que l'accumulation de Cd et de Ni dans les différents organes de *P. australis* augmentait de manière proportionnelle aux doses appliquées. Cette observation suggère que les plantes de *P. australis* peuvent tolérer et accumuler de faibles quantités de Cd et de Ni sans induire une réponse antioxydante de la CAT significative.

Sous les trois doses les plus élevées (100 ; 500 et 1000 ppm), une tendance dose-dépendante a été observée, où l'augmentation de Cd et de Ni accumulé s'est accompagnée d'une hausse de l'activité CAT. A l'exception des feuilles et des tiges exposées à Ni_(1000 ppm), pour lesquelles une diminution de l'activité a été enregistrée par rapport aux résultats obtenus à Ni_(500 ppm). Cette diminution de l'activité CAT dans les parties aériennes à la plus forte dose de Ni pourrait s'expliquer par une dégradation ou une inactivation de l'enzyme sous des conditions de stress oxydatif sévère. Ou elle pourrait également être attribuée à une perturbation de l'absorption des macro et/ou des micronutriments, ainsi que de leur translocation vers les parties aériennes qui perturbe la biosynthèse et l'activation du CAT. Selon Gautam and Pandey (2008), le Ni à une concentration extrêmement faible (0,05 mM), améliore l'activité des enzymes de système antioxydant chez *Lens esculentum* (la POD, la SOD et de la GOPX). Chez *Ocimum basilicum*, Georgiadou *et al.* (2018) ont constaté que à des concentrations élevées de Ni_(500 ppm), l'activité enzymatique antioxydante diminue et entraîne des dommages oxydatifs chez les plantes. La toxicité du Ni perturbe non seulement l'absorption des micronutriments essentiels, mais entrave également leur translocation depuis les racines vers les pousses, les grains et les fruits (Pandey et Sharma, 2002).

Plusieurs études ont rapporté que la toxicité du Ni tend à réduire le transfert de l'azote des racines vers les parties aériennes (Ameen *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2009). Le Ni interfère aussi avec la translocation des micronutriments, en particulier celle du fer dont les propriétés chimiques sont similaires (Ahmad *et al.*, 2010). Il a été démontré que l'une des causes de la carence en fer sous conditions de toxicité au Ni est la diminution de sa translocation des racines vers les pousses (Myśliwa-Kurdziel et Strzałka, 2002).

Dans la présente étude, la diminution de l'activité de la CAT observée dans les feuilles et les tiges sous l'effet du Ni à 1000 ppm pourrait résulter d'une carence en fer dans les parties aériennes de *P. australis*. À cette dose élevée, le Ni accumulé dans les organes a

vraisemblablement perturbé l'absorption et la translocation du fer vers les feuilles et les tiges. Les résultats relatifs à l'accumulation du Cd et du Ni dans les organes des plantes révèlent qu'à 1000 ppm, les plantes ont accumulé davantage de Ni que de Cd. Ceci pourrait expliquer la poursuite de l'augmentation de l'activité de la CAT sous Cd (1000 ppm), contrairement à la diminution observée sous Ni à la même dose Ni (1000 ppm). Selon Kaushal *et al.* (2018), la CAT est un tétramère de quatre chaînes polypeptidiques, chacune longue de plus de 500 acides aminés. Il contient quatre groupes porphyrine hème (fer) qui permettent à l'enzyme de réagir avec le peroxyde d'hydrogène.

Dans la présente étude, vu que le fer est essentiel à la biosynthèse des hèmes, une carence en fer dans les feuilles et les tiges de *P. australis* pourrait réduire la production de groupes hème, affectant ainsi l'assemblage et la biosynthèse de la CAT.

Sous les doses mixtes, comparativement aux expositions individuelles Ni_(1000 ppm) et Cd_(1000 ppm), l'ajout de faibles doses de Cd_(100 ppb) et Ni_(120ppb), semble avoir légèrement stimulé l'activité de la CAT dans les feuilles, les tiges et les racines. Les deux ETMs ensemble à ces doses pourraient activer des voies de signalisation différentes mais complémentaires, conduisant à une réponse antioxydante légèrement plus élevée. La présence d'un ETM à faible dose pourrait ne pas altérer significativement la biodisponibilité ou la toxicité d'un autre ETM présent à forte dose. Néanmoins, il semblerait que cette interaction puisse induire un effet hormétique. Selon Carvalho *et al.* (2020), les ETMs à faibles doses peut améliorer la teneur en pigments photosynthétiques et stimuler l'activité antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans les racines et les pousses.

Nos résultats, en revanche ont montré que la mixture Cd_(100 ppm)+Ni_(100 ppm) a entraîné une diminution de l'activité enzymatique au niveau foliaire et une augmentation au niveau racinaire par rapport aux doses individuelles correspondantes Cd_(100 ppm) et Ni_(100 ppm). Dans les tiges, cette dose mixte a induit une activation de la CAT supérieure à celle observée sous Ni_(100 ppm) seul, mais une inhibition de l'activité comparativement au traitement Cd_(100 ppm) appliqué individuellement. Ces résultats mettent en évidence que la réponse au stress métallique combiné, induit par le Cd + Ni aux doses testées, est spécifique à chaque organe de *P. australis*. Cette spécificité est probablement attribuable à des modifications des processus d'absorption et de translocation, ainsi qu'à des altérations de la biodisponibilité ou de la toxicité de chaque ETM en présence de l'autre.

Dans la présente étude, l'activité est globalement plus élevée dans les racines que dans les autres organes. Le ratio feuilles/racines demeure relativement similaire sous les faibles doses de Cd et de Ni. Cependant, sous les doses élevées, ce ratio augmente sous l'effet du Cd et

diminue sous l'effet du Ni. Cela pourrait s'expliquer par l'hypothèse selon laquelle *P. australis* concentrerait ses mécanismes de détoxification dans les racines afin de protéger les organes photosynthétiques, plus sensibles. Cette stratégie serait cohérente avec le statut de *P. australis* en tant qu'espèce dite "excluser", caractérisée par sa capacité à limiter l'accumulation de Cd et de Ni dans ses parties aériennes.

4.4.2 Activité enzymatique de la GPOx

Le profil d'activité de la GPOx en réponse aux doses croissantes de Cd et de Ni s'est avéré très similaire à celui observé pour l'activité de la CAT. L'activité de la GPOx s'est avérée dose-dépendante, augmentant avec l'accroissement des doses de Cd et de Ni appliquées.

Sous les faibles doses de Cd (10 ; 30 et 100 ppb) ainsi que sous celles de Ni (10 ; 30 et 120 ppb), comparativement aux résultats du groupe témoin, une augmentation, mais non significative, de l'activité a été observée. En revanche, pour les fortes doses de Cd et de Ni (100, 500 et 1000 ppm), une augmentation significative a été observée.

L'augmentation significative de l'activité GPOx dans tous les organes, démontrant une réponse antioxydante importante pour contrer le stress oxydatif engendré par les doses élevées de Cd et de Ni. Dans des études *in-situ* et *in-vitro*, plusieurs travaux ont démontré la capacité de *P. australis* à accroître l'activité de la GPOx en conditions de stress métallique (Alfadul et Al-Fredan, 2013; Kozłowska *et al.*, 2009; Marchand *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2023). Les résultats de ces travaux convergent vers l'hypothèse selon laquelle la stimulation de l'activité enzymatique est due à l'augmentation des ERO causée par l'accumulation des ETMs dans les différents organes de *P. australis*. Nos résultats corroborent cette hypothèse, puisqu'une corrélation positive a été observée entre l'accumulation de Cd et de Ni (Tab.25 ; 26 ; 27 et 28) et la stimulation de l'activité de la GPOx (Tab. 39 ; 40 et 41).

Dans la présente étude, le pic d'activité de la GPOx a été observé à Cd_(1000 ppm) dans les trois organes. Cela suggère un stress oxydatif important à cette dose nécessitant une réponse antioxydante maximale impliquant la GPOx dans tous les tissus. En revanche sous l'effet du Ni, l'activité maximale a été enregistrée à Ni_(500 ppm) dans les feuilles et les racines, et à Ni_(1000 ppm) dans les tiges. Comme pour les résultats de la CAT, ces résultats de la GPOx révèlent des profils d'activité enzymatique variables, dépendant à la fois de l'ETM, de la dose testée et de l'organe analysé. Les travaux menés par Sat (2008) ont mis en évidence que l'activité GPOx est dépendante du type d'ETM et de la concentration appliquée. Leurs résultats ont montré une inhibition de 50% de l'activité de GPOx à 6 mM du plomb (Pb²⁺), 7,32 mM pour le mercure (Hg²⁺) et 10,57 mM pour Ni²⁺.

Nos résultats démontrent que l'activité de la GPOx chez *P. australis* est non seulement dépendante de la concentration, mais également de l'organe. Cela suggère une sensibilité distincte au stress oxydatif et/ou des capacités antioxydantes différentes selon les tissus. L'activité GPOx semble être plus perturbée dans les feuilles et les racines que dans les tiges à Ni_(1000 ppm). Cette différence de réponse est probablement liée à une accumulation différentielle du Ni dans les trois organes étudiés. Cette accumulation différentielle crée alors des niveaux contrastés de stress oxydatif selon les organes, nécessitant une induction variable de la GPOx pour y faire face efficacement. Nos résultats concernant l'accumulation du Cd et du Ni dans les différents organes de *P. australis* (feuilles, tiges, racines) en fonction des doses de Cd et de Ni confirme cette hypothèse. Sous l'effet de fortes doses de Cd, l'accumulation suivait l'ordre décroissant racines > feuilles > tiges. Un profil similaire a été observé sous Ni, à l'exception sous les doses de Ni_(500 ppm) et Ni_(1000 ppm) où l'accumulation était plus importante dans les feuilles que dans les racines (feuilles > racines > tiges).

Ces résultats sous les doses Ni_(500 ppm) et Ni_(1000 ppm), suggèrent une altération probable des mécanismes impliqués dans la séquestration de Ni au niveau des racines, ainsi qu'une perturbation de la régulation de son transport et de sa translocation vers les parties aériennes. En revanche, sous Cd_(1000 ppm), *P. australis* semble conserver un meilleur contrôle des processus de séquestration et de translocation de Cd. Cela suggère que les voies de la détoxification et de la régulation du mouvement du Cd et du Ni chez *P. australis* sont différentes.

Selon Peralta-Videa *et al.* (2002), une fois absorbés par les racines, les ETMs peuvent soit être stockés dans les racines, soit exportés vers les parties aérienne. À certaines concentrations, le Ni et le Cd peuvent être transportés vers les organes aériens par le flux de transpiration via le xylème (Zhao *et al.*, 2006). Ce transport est étroitement régulé par divers chélateurs, comme les acides organiques, en particulier les acides citrique et malique, qui constituent des chélateurs du Ni dans le xylème (Fomina *et al.*, 2005). Les acides aminés et les peptides comme l'histidine, la nicotianamine et les métallothionéines sont des ligands potentiels qui se lient spécifiquement aux ETMs dans le cytosol ou dans les compartiments subcellulaires pour le transport, la translocation et/ou l'accumulation (Douchkov *et al.*, 2005; Fomina *et al.*, 2005). Le Ni est chélaté par l'histidine (Richau *et al.*, 2009) et les peptides (Kowalik-Jankowska *et al.*, 2007). Selon Pál *et al.* (2023), le Ni a une forte affinité avec le groupe imidazole qui se retrouve dans la structure de l'histidine. L'histidine qui joue un rôle clé en tant que chélateur du Ni en raison de la présence de groupes carboxyle, amino, et aussi de l'imidazole. Ce qui pourrait entraîner une augmentation du transport du Ni au sein de la plante et entre ses différents organes (Callahan *et al.*, 2006).

La biosynthèse des phytochélatines peut être induite par divers ETMs. Ces peptides riches en cystéine sont capables de complexer les ETMs via leurs groupements thiol (-SH). Ils sont principalement impliqués dans la détoxification du Cd, mais aussi de As, Hg, Zn, Pb et du Cu (Seregin et Kozhevnikova, 2023). La biosynthèse des phytochélatines peut également être induite par la présence de Ni, mais les résultats concernant l'induction de la biosynthèse des phytochélatines par le Ni sont contrastés dans la littérature scientifique. Vatamaniuk *et al.* (2000), ont rapporté une augmentation de la production de phytochélatines en présence de Ni²⁺. En revanche, Oven *et al.* (2002) n'ont pas observé d'augmentation de la biosynthèse de ces peptides suite à un traitement au Ni²⁺. L'efficacité des différents ETMs pour stimuler la biosynthèse des phytochélatines fait l'objet de résultats contrastés dans la littérature scientifique. Mais, un consensus se dégage quant à la hiérarchie de leur capacité à induire cette biosynthèse, qui diminue selon l'ordre suivant : Cd²⁺ > Ag⁺ > Pb²⁺ > Zn²⁺ > Cu²⁺ > Hg²⁺ (Clemens et Peršoh, 2009; Cobbett, 2000).

Les diverses voies de détoxification, de chélation et de régulation du transport du Cd et du Ni au sein des tissus pourraient expliquer les variations observées dans la capacité de *P. australis* à accumuler ces deux ETMs. Ces différences d'accumulation pourraient, par conséquent, influencer le degré de stimulation de l'activité de la GPOx dans chaque organe. Les phytochélatines peuvent participer non seulement à la détoxification, mais aussi au transport des ETMs dans les plantes. D'après Flis *et al.* (2016), même en présence de complexes ETM-phytochélatine dans le phloème et le xylème, les ETMs sont principalement transportés via les tissus conducteurs sous forme de complexes avec des acides organiques. Le niveau d'expression des gènes codant pour les phytochélatines peut varier entre les différents organes végétaux et évoluer de manière distincte en réponse à une exposition aux ETMs. Chez *Brassica juncea* sous Cd, l'expression du gène des phytochélatines s'est révélée plus élevée dans les racines que dans les parties aériennes (Heiss *et al.*, 2003). En revanche, chez *Helianthus annuus* sous Cd le schéma d'expression inverse a été observé (Zha *et al.*, 2021).

Sous les doses mixtes, les résultats observés pour l'activité de la GPOx diffèrent de ceux enregistrés pour l'activité de la CAT. L'ajout de faibles doses de Cd_(100 ppb) et Ni_(120 ppb) aux hautes doses Ni_(1000 ppm) et Cd_(1000 ppm), respectivement a engendré une légère stimulation de l'activité de la CAT dans les trois organes de *P. australis* comparativement à ces doses hautes individuelles (un effet hormétique). En revanche, cette combinaison semble avoir induit une diminution de l'activité de la GPOx dans les feuilles, et la stimuler dans les racines. Dans les tiges, Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb) a induit une activité supérieure à celle observée sous Cd_(1000 ppm) seul,

mais la dose mixte Ni_(1000 ppm)+Cd_(100 ppb) a induit une activité inférieure à celle observée sous Ni_(1000 ppm) appliqué individuellement.

Ces résultats mettent en évidence une différence marquée dans la réponse de la CAT et de la GPOx aux doses combinées. L'ajout de faibles doses de Cd_(100 ppb) et de Ni_(120ppb) aux hautes doses Ni_(1000 ppm) et Cd_(1000ppm), respectivement a engendré un effet hormétique sur l'activité de la CAT et de la GPOx dans tous les organes, sauf pour la GPOx dans les feuilles.

Dans les tiges, l'ajout de Ni_(120 ppb) avait un effet hormétique sur la GPOx, mais pas l'ajout de Cd_(100 ppb).

La GPOx présente une réponse plus variable, indiquant une régulation plus spécifique selon l'organe. La diminution de la GPOx dans les feuilles sous les doses mixtes comparativement aux doses simples pourrait indiquer un redéploiement de cette enzyme dans les racines ou une moindre nécessité de cette enzyme dans la feuille.

P. australis est caractérisée par sa capacité à accumuler préférentiellement le Cd et le Ni dans ses tissus racinaires. Donc le maintien d'une activité élevée de la GPOx dans les racines, pourrait s'inscrire dans un mécanisme de défense visant à neutraliser les ERO. Elle pourrait aussi contribuer à réduire la translocation du Cd et/ou du Ni via la voie apoplasmique vers les feuilles, étant donné que la GPOx est impliquée dans la lignification des parois cellulaires.

Les lignines sont des hétéropolymères phénoliques de la paroi cellulaire, la GPOx joue un rôle clé dans la biosynthèse des lignines impliquées dans le renforcement des parois cellulaires. Ce processus de lignification constitue un mécanisme de défense des plantes contre les stress induits par les excès d'ETMs, en limitant leur entrée dans les cellules (Barceló *et al.*, 2004; Loix *et al.*, 2017).

De nombreuses études ont mis en évidence la capacité des cellules végétales à tolérer la présence d'ETMs en modifiant la structure et la composition de leurs parois cellulaires. Ces adaptations se manifestent par plusieurs mécanismes : Un épaississement des parois cellulaires (Mehrabanjoubani *et al.*, 2019). Une augmentation de la teneur en polysaccharides pariétaux, favorisant l'adsorption des ETMs (Wang *et al.*, 2019). Plusieurs constituants pariétaux, tels que la cellulose, l'hémicellulose, et plus particulièrement la lignine et la pectine, jouent également un rôle crucial dans la séquestration des ETMs comme le Cd et le Ni (Jia *et al.*, 2019; Lao *et al.*, 2023). La présence des groupes fonctionnels : hydroxyle (-OH), amino (-NH₂), amide (-CONH₂) et carboxyle (-COOH) confère à la paroi cellulaire une capacité significative d'adsorption et de séquestration des ETMs, contribuant ainsi à la tolérance de la plante face au stress métallique (He *et al.*, 2020).

Selon He *et al.* (2020), l'exposition à des doses élevées de Cd induit une redistribution de son

accumulation au sein des compartiments cellulaires. Une augmentation de la séquestration du Cd dans la paroi cellulaire est concomitante à une diminution de sa présence dans les organites et la fraction soluble du cytoplasme. L'espèce *P. australis* utilise diverses stratégies pour la détoxification du Cd, notamment la rétention dans les racines, le dépôt sur les parois cellulaires et la liaison aux protéines et aux phytochélatines (Ederli *et al.*, 2004; Xing, 2003). La plante présente également une augmentation des dépôts de lignine et de l'activité antioxydante en réponse à l'exposition au Cd (Ederli *et al.*, 2004). Des tendances similaires ont été observées par Wu *et al.* (2019) pour le cuivre chez *P. australis*. Selon Küpper *et al.* (2001), la compartimentation est cruciale pour la tolérance et la détoxification du Ni. Le nickel qui est souvent associé à des composés organiques, tels que le citrate, dans les vacuoles et les parois cellulaires riche en lignine.

Dans la présente étude, l'activité de la GPOx et de la CAT sous Ni est généralement supérieure à celle sous Cd dans les trois organes et pour les trois doses élevées testées (100 ; 500 ; 1000 ppm), à l'exception sous Cd (1000 ppm) où l'activité de la GPOx dans les feuilles et la CAT dans les trois organes est supérieure que sous Ni (1000 ppm). À 1000 ppm, le Ni semble atteindre un seuil de toxicité qui dépasse les capacités d'adaptation de *P. australis*. L'analyse du ratio d'activité feuille/racine pour la CAT et la GPOx a révélé que l'activité enzymatique dans les racines sous l'effet du Ni était de deux à trois fois supérieure à celle observée sous l'effet du Cd. Ces résultats confirment que les mécanismes de toxicité et de tolérance différents pour Ni et Cd. *P. australis* semble avoir une capacité d'adaptation plus élevée au Ni à des doses modérées (Ni :100 ;500 ppm), mais elle pourrait être plus efficace dans la gestion du stress oxydatif induit par le Cd à forte dose Cd (1000ppm).

Lorsque la dose mixte testée est composée de quantités équivalentes de Cd et de Ni ([Cd] = [Ni] = 100 ppm), comparativement aux traitements individuels correspondants Cd (100 ppm) et Ni (100 ppm). Nous avons constaté que la dose mixte a entraîné une diminution de l'activité enzymatique de la GPOx au niveau foliaire et une augmentation aux niveaux caulinaire et racinaire. Ces résultats sont très similaires à ceux de l'activité de la CAT. L'effet antagoniste entre le Cd et le Ni dans les feuilles indique que la combinaison des deux ETMs à ces doses active moins ou inhibe davantage l'activité de la GPOx et de la CAT. Nos résultats d'accumulation du Ni et du Cd dans les différents organes de *P. australis* montrent que la dose mixte inhibe plutôt plus l'activité, étant donné que l'accumulation de Cd et de Ni était supérieure à celle observée sous les doses individuelles, et ce dans les trois organes.

Dans les tiges et les racines, un effet synergique a été constaté sur la GPOx et également pour la CAT, bien que l'accumulation de Cd et de Ni ait été supérieure à celle observée sous les doses

individuelles. Cela suggère que chaque ETM pourrait activer des voies de signalisation distinctes qui ensemble conduisent à une surexpression de GPOx et CAT. Cette augmentation d'activité dans les tiges et les racines, mais pas dans les feuilles, indique que *P. australis* réoriente son système antioxydant dans les tiges et les racines, visant à contenir la toxicité des ERO et à protéger les tissus photosynthétiques dans les feuilles.

4.4.3 Activité enzymatique de la glutathion-S-transférase GST

Le profil d'activité de la GST en réponse aux doses croissantes de Cd et de Ni ainsi qu'aux doses mixtes s'est avéré similaire à celui observé pour l'activité de la CAT et de la GPOx. L'activité de la GST dans les trois organes a été dose-dépendante, augmentant avec l'accroissement des doses de Cd et de Ni appliquées.

Sous les faibles doses de Cd et de Ni, et comparativement aux résultats du groupe témoin, les différences n'ont pas été significatives, mais une très faible augmentation d'activité a été observée. Cette faible augmentation sous les faibles doses de Cd et de Ni démontre la sensibilité du système de défense antioxydant (CAT, GPOx et GST) de *P. australis*, capable de détecter et de réagir même à de faibles niveaux de Cd et de Ni. L'absence de différences significatives sous ces faibles doses par rapport au témoin suggère l'existence d'un seuil de tolérance en dessous duquel *P. australis* ne déclenche pas de réponse marquée. En revanche, pour les fortes doses de Cd et de Ni (100, 500 et 1000 ppm) et les doses mixtes, une augmentation significative a été observée. L'augmentation de l'activité GST avec l'accroissement des doses de Cd et Ni démontre la capacité de *P. australis* à ajuster sa réponse défensive en fonction de l'intensité du stress.

Nos observations sont en accord avec celles d'Iannelli *et al.* (2002), où leur étude a mis en évidence une augmentation de l'activité GST dans les feuilles et les racines de plantes exposées à 50 μM de CdSO_4 , comparativement aux plantes témoins. Ces résultats sont corroborés par Pietrini *et al.* (2003), qui ont constaté des effets similaires dans les feuilles de *P. australis* soumises à des concentrations de 50 μM et 100 μM de CdSO_4 . Ederli *et al.* (2004), ont observé aussi une augmentation d'activité dans les racines de plantes exposées à 100 μM de CdSO_4 pendant une période de 21 jours. Chez le blé, Gajewska and Skłodowska (2008) ont observé une forte augmentation de l'activité de la GST dans les tissus racinaires et caulinaires en réponse au stress induit par le Ni (100 et 200 μM). L'isolement d'un ADNc (ADN complémentaire synthétisé artificiellement à partir de l'ARN messenger) codant pour la gamma-glutamylcystéine synthétase (GCS) (enzyme précurseur de la synthèse de la GSH) à partir de *P. australis*, met en évidence le potentiel de cette plante à résister aux sols contaminés par des

ETMs. Cette résistance serait due à la régulation positive des GSTs et d'autres enzymes impliquées dans la synthèse des phytochélatines (Wu *et al.*, 2022). Une étude menée par Dixit *et al.* (2011) a mis en évidence que les plants de tabac surexprimant le gène GST (TvGST) manifestaient une résistance accrue au Cd. Cette tolérance améliorée se traduisait par une accumulation réduite de Cd dans les tissus végétaux et une diminution de la peroxydation lipidique. Selon Gao *et al.* (2020), la capacité de tolérance des plantes aux ETMs est attribuée à leur aptitude à ajuster l'activité de la GST et à l'augmenter en réponse à l'accroissement de la concentration en ETM dans le milieu. Zhang and Ge (2008), ont mis en évidence une relation étroite entre le niveau de Cd dans le milieu et la teneur en Glutathion (GSH) ainsi que l'activité de la GST. Selon Dalton *et al.* (2009), la GST agit en catalysant la conjugaison du GSH avec des composés électrophiles toxiques, ce processus aboutit à la formation des complexes qui peuvent être soit expulsés de la cellule, soit séquestrés dans la vacuole.

Dans notre étude, sous le stress oxydatif induit par les doses élevées de Cd et de Ni, la production des ERO, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), augmente significativement. Cette augmentation des ERO agit comme un signal déclencheur, induisant une élévation des taux de GST dans les trois organes de *P. australis*. L'induction de l'activité de la GST inter-organe a été similaire à celle de la CAT et de la GPOx. Elle était plus élevée dans les racines que dans les feuilles et les tiges, suivant l'ordre : Racine > Feuille > Tige. Cela s'explique par le fait que les racines constituent le premier site d'interaction et d'absorption du Cd et du Ni. L'activité élevée de la GST dans les racines peut être interprétée comme une tentative pour limiter l'absorption excessive de Cd et de Ni, et/ou pour détoxifier rapidement ces ETMs une fois absorbés. Cette activité pourrait également contribuer à minimiser leur translocation vers les parties aériennes. L'augmentation de l'activité dans les feuilles avec les doses indique qu'une partie du Cd et du Ni est tout de même transférée aux parties aériennes. L'activité plus faible dans les tiges pourrait refléter le rôle de cet organe principalement comme tissu de transport, avec moins d'accumulation que dans les racines ou les feuilles.

Nos résultats montrent que *P. australis* déploie une réaction antioxydante synchronisée et coordonnée (impliquant la CAT, la GPOx et la GST) en réponse au stress métallique induit par le Cd et le Ni. La différence entre l'activité de la GST et celles de la CAT et de la GPOx dans la présente étude réside dans le ratio feuille/tige. Ce ratio était plus faible pour la GST, se situant entre 29-30% et 30-33% sous les faibles doses de Cd et Ni respectivement, et entre 19-20% et 20-24% sous les hautes doses de Cd et de Ni respectivement. L'activité de la GST a été plus induite dans les racines que dans les feuilles, comparativement à la CAT et la GPOx.

Cela suggère que, chez *P. australis*, la GST joue un rôle différent de celui de la CAT et de la GPOx. Étant donné que la GST catalyse la conjugaison du GSH avec les ETMs, lesquels peuvent être séquestrés dans la vacuole, on peut en déduire que la GST contribue directement au processus de détoxification du Cd et du Ni dans les racines. En revanche, la CAT et la GPOx semblent davantage impliquées dans la régulation du stress oxydatif et des ERO générées par la présence de Cd et de Ni.

Selon Lauritano *et al.* (2021), les GSTs sont des enzymes de détoxification de phase II qui jouent un rôle central dans la protection de l'ADN et des protéines contre les dommages en catalysant la conjugaison du glutathion (GSH) à divers composés électrophiles comme les ETMs. Les enzymes de phase II font référence aux enzymes catalysant les réactions de conjugaison, telles que la GST et l'uridine diphosphate glycosyltransférases (UGT) (Zhang, 2011). Alors que les GST sont principalement impliqués dans les processus de détoxification, des enzymes de phase I comme la CAT et la GPOx sont directement responsables dans la lutte contre le stress oxydatif en éliminant les ERO et en maintenant l'homéostasie cellulaire (Rajput *et al.*, 2021).

Les glutathion S-transférases (GSTs) appartiennent à une famille d'enzymes multifonctionnelles et constituent l'une des familles d'enzymes détoxifiantes les plus importantes dans la nature. Chez les végétaux, les analyses récentes ont montré qu'il existe dix classes différentes de GST : GSTU (Tau), GSTF (Phi), GSTL (Lambda), GSTT (Theta), GSTZ (Zeta), DHAR (déhydroascorbate réductase), TCHQD (tétrachloro hydroquinone déshalogénase), EF1B γ (facteur d'élongation 1B), hémérythrine et Iota (Hernández Estévez et Rodríguez Hernández, 2020). Chez les végétaux, la majorité des GSTs appartiennent aux classes GSTU (Tau) et GSTF (Phi), avec une présence moins importante des classes DHAR et Lambda (Hernández Estévez et Rodríguez Hernández, 2020). Les GSTs sont impliqués dans divers événements intracellulaires comme, la protection des plantes contre les dommages causés par l'ozone, la détoxification des herbicides et les ETMs, ainsi que dans divers aspects du développement des plantules, notamment l'élongation des hypocotyles et l'accumulation d'anthocyanes (Dixon et Edwards, 2010; Hernández Estévez et Rodríguez Hernández, 2020). Selon Ju-Chen (2021), le rôle des GSTs ne se limitent pas à l'élimination des sous-produits toxiques issus de la peroxydation lipidique, mais pourraient également participer au transport des complexes phytochélatine- ETM vers la vacuole. Pflugmacher *et al.* (1999) ont étudié l'activité antioxydante chez *P. australis* collecté dans un lac pollué. Ils ont constaté que cette espèce présente des enzymes de détoxification de phase I (glutathion peroxydase : GPx, GPOx ; 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase : EROD) et de phase II (glutathion S-transférase : GST),

avec les activités les plus élevées observées dans les racines et les feuilles. En revanche, les tiges présentent des activités enzymatiques plus faibles.

Cette tendance d'induction différentiel de la GST, la GPOx et la CAT inter-organe est très similaires à nos résultats enregistrés sous Cd et Ni. Elle est dû à une accumulation différentielle du Cd et Ni de dans les trois organes étudiés. Cette accumulation différentielle crée alors des niveaux contrastés de stress oxydatif selon les organes, nécessitant une induction variable pour y faire face efficacement.

Sous l'effet de fortes doses de Cd, l'intensité de l'induction des trois enzymes (CAT, GPOx et GST) a augmenté proportionnellement à l'accroissement des doses dans les trois organes étudiés. En revanche, pour les fortes doses de Ni, la réponse enzymatique diffère. L'induction de la GST continue d'augmenter sous Ni (1000 ppm), contrairement à la CAT et à la GPOx (particulièrement dans les feuilles) pour lesquelles une diminution est enregistrée à cette même dose, après un pic observé sous Ni (500 ppm).

Cette modulation de l'activité du system antioxydant suggère un rôle continu de la GST dans la détoxification du Ni, même à très fortes concentrations. La diminution de l'activité de la CAT et la GPOx à 1000 ppm de Ni pourrait indiquer une possible toxicité du Ni sur ces enzymes à très forte concentration, une saturation du système antioxydant face à un stress métallique extrême, ou un potentiel changement de stratégie de défense, privilégiant la détoxification directe via la GST plutôt que la gestion des ERO à très forte dose.

Sous les hautes doses de Cd et Ni (100, 500 et 1000 ppm), *P. australis* semble utiliser la GST plus pour le transport et la séquestration des complexes phytochélatine-Cd ou Ni vers la vacuole, particulièrement dans les tissus racinaires. La CAT et la GPOx sont davantage orientées vers la neutralisation des ERO dans tous les organes. Pietrini *et al.* (2003) ont montré que sous CdSO₄ à 50 et 100 µM, la CAT a augmenté dans les feuilles de *P. australis*, mais la GST a diminué. Malgré le fait que l'étude de Pietrini *et al.* (2003) a testé de faibles doses de Cd et n'a pas évalué l'activité de la CAT et de la GST dans les racines, les résultats confirment en partie notre hypothèse. La diminution de l'activité de la GST observée dans les feuilles pourrait être une stratégie de défense adaptative où la plante priorise la détoxification du Cd et du Ni dans les racines par la GST.

Sous les doses mixtes Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) et Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm), comparativement aux expositions individuelles Cd (1000 ppm) et Ni (1000 ppm), les résultats observés pour l'activité de la GST ont été plus similaires à ceux de la CAT (un effet hormétique dans les trois organes) qu'à ceux de la GPOx. Globalement, l'ajout de faibles doses semble avoir affecté positivement

l'activité de la GST dans les trois organes, bien que l'induction d'activité sous la dose mixte Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) a été très similaire à celle obtenue sous la dose simple Ni_(1000 ppm).

La réponse différentielle de la GST et de la CAT par rapport à celle de la GPOx suggère l'existence d'une régulation enzymatique coordonnée chez *P. australis*. Cette variabilité dans la réponse pourrait s'expliquer par des seuils d'activation distincts et une sensibilité spécifique aux signaux cellulaires induits par diverses combinaisons de Cd+Ni. L'effet des doses combinées ait été principalement dominé par celui des fortes doses, mais la présence de faibles doses semble induire une activité plus élevée de la GST comparativement aux doses individuelles élevées. Ce phénomène pourrait s'expliquer par un effet hormétique (faibles doses) qui atténue l'effet toxique (hautes doses), où les faibles doses ajoutées auraient potentiellement déclenché des voies de signalisation supplémentaires, entraînant une surexpression ou une stimulation de la GST.

De nombreuses études ont démontré que l'effet hormétique du Cd et du Ni sur les enzymes antioxydantes, la photosynthèse et la croissance végétale est dose-dépendant et varie selon les espèces et les tissus végétaux (Jalal *et al.*, 2021; Jia *et al.*, 2015). Selon Małkowski *et al.* (2019), le Cd et le Ni, lorsqu'ils sont présents à faible dose, peuvent avoir un effet hormétique sur les plantes en stimulant la croissance. Cette réponse hormétique peut également s'étendre à l'activité de certaines enzymes impliquées dans les mécanismes de réponse au stress aux ETMs, comme la GST, CAT et GPOx, la superoxyde dismutase (SOD), l'ascorbate peroxydase (APX) et la glutathion réductase (GR).

Quant aux résultats sous la dose mixte Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm), l'effet semble être plus dominé par l'effet de la dose Ni_(100 ppm). Les résultats ont été très proche à celle enregistré sous la dose simple Ni_(100 ppm) où l'induction de l'activité a été plus que le double que sous Cd_(100 ppm) et cela dans les trois organes. Comparativement aux doses simples, la dose mixte Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) a induit une activité différentielle de la GPOx, de la CAT et de la GST. Elle a entraîné une diminution de l'activité de la CAT et de la GPOx au niveau foliaire, phénomène potentiellement attribuable à un dépassement des capacités antioxydantes foliaires face au stress combiné. L'augmentation de l'activité de la CAT et de la GPOx aux niveaux caulinaire et racinaire suggère un effet synergique du Cd et du Ni, induisant un stress oxydatif plus important. Cette réponse pourrait refléter une stratégie adaptative de *P. australis* visant à protéger les organes inférieurs, afin de maintenir l'absorption des nutriments et de limiter la translocation des ETMs.

En ce qui concerne la GST sous la dose mixte, son activité a augmenté dans les trois organes comparativement à la dose simple de Cd_(100 ppm). Cette augmentation est positivement corrélée

à l'accroissement de l'accumulation de Cd, qui s'est avérée neuf fois supérieure dans les feuilles et cinq fois supérieure dans les racines. En revanche, comparativement à la dose simple de Ni (100 ppm), une augmentation importante de l'activité de la GST a été observée dans les racines. Cette réponse enzymatique est attribuable à une accumulation de Ni quatre fois supérieure. Parallèlement, l'augmentation de l'activité de la GST dans les racines, couplée à une diminution marginale dans les feuilles et les tiges malgré une accumulation plus importante de Ni, suggère que la GST joue un rôle plus important dans la neutralisation du Ni au niveau racinaire. On sait aussi que ces organes aériens utilisent d'autres mécanismes de défense.

4.5 Corrélation entre les différentes réponses métaboliques et enzymatiques

La réponse des plantes au stress métallique est un processus complexe impliquant une coordination entre divers paramètres métaboliques et enzymatiques, ainsi qu'entre les différents organes de la plante. Dans cette partie, nous discutons les relations entre les différents paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes de *P. australis* soumise à différentes doses (faibles et fortes, simples et combinées) de Cd et Ni. Cette partie vise à évaluer et mettre en évidence d'éventuelles relations, synergies ou antagonismes dans leur régulation métabolique et leur réponse enzymatique.

Chez les plantes témoin, on a observé de très fortes corrélations positives entre les teneurs en protéines dans les trois organes des plantes, de même qu'entre les teneurs en lipides, et également entre les teneurs en lipides et en protéines. En ce qui concerne la corrélation entre les paires de l'activité du système antioxydant entre eux et avec les variables métaboliques, une forte corrélation a seulement été observée entre GST F / GST T et GST F / GST R.

Cela montre qu'en conditions normales *P. australis* maintient un équilibre protéique et lipidique dans tous leurs organes. La corrélation entre les teneurs en lipides et en protéines indique un équilibre métabolique global dans la plante, où la synthèse des protéines et des lipides est régulée de manière coordonnée. L'absence de corrélations significatives entre les activités enzymatiques antioxydantes et les teneurs en chlorophylle, protéines et lipides montre que, dans des conditions normales ou en l'absence de stress, ces systèmes fonctionnent de manière plus ou moins indépendante. Concernant la corrélation positive observée entre l'activité de la GST dans les feuilles et celle dans les tiges et les racines, elle pourrait être liée au rôle de cette enzyme dans d'autres mécanismes physiologiques.

Selon Lin *et al.* (2020), au-delà de leur rôle dans le système antioxydant, les GST jouent un rôle dans le métabolisme normal des métabolites secondaires des plantes comme les anthocyanines, qui constituent une sous-classe de flavonoïdes synthétisés dans le cytosol et transférés dans

la vacuole responsable la coloration (rouge-violet) chez les végétaux. Les GST sont considérées comme responsables du transport des anthocyanines dans la vacuole (Jiang *et al.*, 2019). Les GST végétales sont majoritairement cytosoliques et peuvent représenter jusqu'à 2 % des protéines solubles (Pascal et Scalla, 1999). Selon Bilang and Sturm (1995), plusieurs GST sont inductibles par l'auxine, elles se lient aux auxines en tant que ligands et non comme substrats, ainsi qu'elles participent à leur transport. L'auxine qui favorise la formation de racines adventives en stimulant à la fois la division et la différenciation cellulaire au niveau des primordium radicaux (Lorbiecke et Sauter, 1999; Otiende *et al.*, 2021).

Dans les plantes témoins de *P. australis*, la corrélation positive observée entre les niveaux de GST dans les feuilles et les racines pourrait donc être due au rôle de transport des anthocyanines du cytosol à l'intérieur de la vacuole dans les feuilles et au transport de l'auxine entre les tissus racinaires.

Les corrélogrammes des faibles doses de Cd montrent une inversion de la corrélation entre la chlorophylle (Chl) et les protéines (Prot F, T, R), ainsi qu'entre la chlorophylle et les lipides, par rapport au groupe contrôle. Bien que non significative, cette inversion suggère une réponse métabolique chez *P. australis*. La corrélation négative non significative observée entre la chlorophylle et le contenu en lipides et protéines peut être due à cette réponse. Une perturbation de la biosynthèse de la chlorophylle peut engendrer une stimulation de la synthèse des phytochélateurs pour protéger les feuilles et les chloroplastes. Quant à la corrélation négative avec les lipides sous les faibles doses de Cd, elle pourrait être due à un effet d'hormèse pour le renforcement des parois cellulaires, le maintien de l'homéostasie cellulaire et le contrôle de l'entrée du Cd.

Le plus marquant, comparativement au corrélogramme du groupe contrôle, c'est que la corrélation entre le contenu en protéines et en lipides, ainsi que le contenu inter-organe de chaque métabolite, devient non significative, voire négative entre certaines paires, sauf entre Prot F/Lip (F, T et R). Ce changement suggère qu'il y avait un réajustement des processus métaboliques, pouvant résulter d'une réorientation du métabolisme pour faire face au stress, même s'il a été minime. En effet, des corrélations négatives significatives apparaissent entre les protéines, les lipides et certaines enzymes, notamment la CAT sous Cd_(10 ppb) et la GPOX sous Cd_(30 ppb) et Cd_(100 ppb), Ces corrélations négatives montrent que lorsque la synthèse des protéines et des lipides diminue, l'activité de ces enzymes antioxydantes augmente.

Par rapport au groupe contrôle et comme sous les faibles doses de Cd, l'exposition au Ni a entraîné aussi des modifications dans les corrélations entre les différents métabolites et les enzymes.

La relation chlorophylle/protéines et chlorophylle/lipides sous les faibles doses de Ni demeurent positives comme chez les plantes témoins, et deviennent même positivement significatives à Ni (60 ppb). Cependant, cette corrélation devienne neutre à Ni (120 ppb), Ce qui contraste avec les corrélations à faibles doses de Cd, où la corrélation passe de positive à négative. Cela montre que le Ni et le Cd ont des modes d'action différents sur les voies métaboliques et par conséquent les relations entre le contenu en chlorophylle, en protéines et en lipides.

Selon Böddi *et al.* (1995), le Cd est un élément toxique il pourrait remplacer le Mg^{2+} dans les molécules de chlorophylle et exercer une action directe sur les enzymes impliquées dans la biosynthèse chlorophyllienne. Il inhibe la production d'acide amino-lévulinique, l'activité enzymatique de la protochlorophyllide réductase et de la chlorophylle synthase (Hayat *et al.*, 2021; Myśliwa-Kurdziel et Strzałka, 2002). Contrairement au Cd, le Ni contribue à la biosynthèse et à la protection de la chlorophylle (Polacco *et al.*, 2013). Il joue un rôle clé dans le métabolisme de l'azote, il est un cofacteur essentiel de l'enzyme uréase, qui hydrolyse l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac. Cela permet d'éviter l'accumulation toxique d'urée et de recycler l'azote issu de la dégradation des composés azotés (Mazzafera *et al.*, 2013). L'azote produit par l'action de l'uréase est ensuite assimilé dans la synthèse des acides aminés comme le glutamate, qui sont les précurseurs de la biosynthèse de l'acide 5-amino-lévulinique, molécule initiatrice de la voie de biosynthèse de la chlorophylle (Nimra Atta *et al.*, 2024). Cela explique parfaitement la corrélation positive observée entre la chlorophylle et les protéines. En effet, la présence de Ni stimule le recyclage de l'azote issu de la dégradation des composés azotés en acides aminés et en enzymes, qui seront ensuite utilisés dans le processus de la biosynthèse chlorophyllienne. Quant à la corrélation positive mais non significative entre la chlorophylle et les lipides à ces faibles doses, elle peut s'expliquer par le rôle indirect du Ni sur le métabolisme lipidique dans les chloroplastes.

En améliorant le recyclage de l'azote, la synthèse de protéines, y compris les enzymes, et en minimisant la quantité d'urée toxique, le Ni peut indirectement permettre une meilleure activité des enzymes responsables de la biosynthèse des lipides membranaires des chloroplastes et des thylacoïdes, favorisant ainsi la biosynthèse de la chlorophylle. Selon Ahmad and Ashraf (2011), le besoin en Ni varie considérablement entre les espèces végétales. Chez les espèces qui souffrent d'une carence en Ni, il y a une accumulation d'urée toxique aux extrémités des feuilles

en raison de la diminution de l'activité de l'uréase. Le Ni joue un rôle important dans l'activation du système glyoxalase, un système enzymatique responsable de la dégradation du méthylglyoxal (pyruvaldéhyde et 2-oxopropanal), un puissant composé cytotoxique produit naturellement par le métabolisme cellulaire lors de la glycolyse, la peroxydation des lipides et dans des conditions de stress (Ghosh *et al.*, 2016; Sankaranarayanan *et al.*, 2017). Wood *et al.* (2006) ont montré que parmi les symptômes de la carence en Ni figure le développement d'une chlorose foliaire prématurée pouvant s'étendre à la nécrose de feuilles entières et/ou des extrémités des folioles.

Sous l'effet du Ni et comparativement aux résultats sous Cd et au contrôle, des différences concernant la corrélation entre les métabolites et le système antioxydant ont également été observées. À quelques exceptions près dans les tiges et les feuilles, sous l'effet du Cd, toutes les corrélations significatives observées ont été négatives : CAT/Lip et Prot, ainsi qu'entre GPOX/Lip et Prot, mais aucune corrélation significative n'a été trouvée entre GST/Lip et Prot. Comme dans le groupe contrôle, sous l'effet du Ni, aucune corrélation significative n'a été observée entre CAT/Lip et Prot, sauf entre CAT T/Lip T. L'absence de corrélation significative montre que le Ni chez *P. australis* n'engendre pas de déséquilibre ou d'excès en ERO susceptibles d'attaquer les lipides et les protéines. Les ERO comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui pourraient être décomposées en eau et en dioxygène par la CAT.

Pour la relation GST/Lip et Prot sous Ni, les corrélations étaient différentes de celles sous Cd et du contrôle. Les corrélations variaient selon la dose de Ni : positives mais non significatives sous Ni (30 ppb), positives et significatives sous Ni (60 ppb), et négatives mais significatives uniquement entre GST R/Lip R sous Ni (120 ppb).

La corrélation positive et l'évolution dose-dépendante sous l'effet du Ni indiquent un rôle de la GST qui va au-delà de la simple réponse antioxydante. Par son rôle dans l'amélioration du recyclage de l'azote issu de la dégradation des composés azotés en acides aminés et protéines, ainsi que dans la diminution de la quantité d'urée toxique, la GST peut indirectement permettre une meilleure activité des enzymes responsables de la biosynthèse des lipides.

Pour la relation entre GPOx/Lip et Prot, à Ni (30 ppb), les corrélations étaient globalement non significatives. Cela montre que la GPOx ne semble pas être liée aux changements dans les contenus en lipides et en protéines à cette dose. Ces derniers sont donc probablement synthétisés normalement, sans stress particulier, comme chez les plantes témoins non exposées au Ni. Sous 60 ppb de Ni, la corrélation positivement significative entre GPOx F/Lip et Prot, indique une coordination étroite entre l'activité de la GPOx et la synthèse des lipides et protéines dans les feuilles. Sous 120 ppb de Ni, la corrélation devient non significative entre l'activité de

la GPOx et les teneurs en protéines. Mais elle reste positivement significative entre l'activité de la GPOx des racines et les teneurs en lipides racinaires GPOx R/ Lip R.

Ces différences de corrélation entre les trois faibles doses de Ni (30, 60 et 120 ppb) indiquent que la coordination entre l'activité de la GPOx, les teneurs en lipides et en protéines pourrait être un mécanisme permettant de maintenir l'homéostasie cellulaire chez *P. australis* en présence de niveaux variables de Ni. Le maintien de la corrélation positive entre GPOx et lipides dans les racines à 120 ppb pourrait représenter une réponse préventive pour préserver l'intégrité des membranes racinaires, en cas d'une accumulation plus importante de Ni dans les racines.

Le Ni est un microélément présent dans les sites actifs de plusieurs enzymes chez les plantes. Une stimulation modérée de l'activité GPOx par le Ni ne serait pas nécessairement liée à une réponse antioxydante, mais pourrait refléter un rôle de ces enzymes dans la régulation de processus métaboliques. Aux faibles doses testées dans la présente étude, le Ni pourrait stimuler la synthèse de la GPOx, qui jouerait alors un rôle différent de sa fonction antioxydante. Les GPOx se trouvent dans les cytoplasme et l'apoplasme, elles sont impliquées dans une large gamme de processus liés à la croissance et au développement des plantes, autres que la réponse au stress oxydatif (Csiszár *et al.*, 2012; Dragišić Maksimović *et al.*, 2008; Loix *et al.*, 2017).

Sous les hautes doses (100, 500 et 1000 ppm), les corrélations entre les paires de variables changent selon l'ETM et la dose de Ni et de Cd, ce qui indique que *P. australis* ajuste sa réponse métabolique et enzymatique en fonction de l'intensité du stress.

L'absence de corrélation significative entre Chl/ Prot, Lip et CAT sous les trois hautes doses de Cd et de Ni ne signifie pas nécessairement une régulation indépendante de ces variables. Cela pourrait indiquer que la relation n'est pas linéaire ou n'est pas suffisamment forte pour être détectée. Les variables Chl, Prot, Lip et CAT peuvent être liés par des voies métaboliques intermédiaires ou des facteurs de régulation communs sans nécessairement créer une corrélation linéaire directe entre elles. Selon Gu *et al.* (2024), les familles de facteurs de transcription *bZIP* et *WRKY* sont deux importantes régulateurs chez les végétaux. Elles régulent divers processus liés au développement et à la réponse au stress. Ces facteurs de transcription sensibles au stress peuvent réguler simultanément l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de chlorophylle, de protéines de stress et d'enzymes antioxydante. La biosynthèse de la chlorophylle et les systèmes antioxydants des plantes sont interconnectés par des métabolites intermédiaires. Les précurseurs de la chlorophylle, en particulier les porphyrines libres peuvent générer des ERO lorsqu'ils reçoivent la lumière, ce qui nécessite des mécanismes de régulation efficaces pour empêcher leur accumulation (Brzezowski *et al.*, 2015).

Les plastoglobules, particules de lipoprotéines associées aux thylakoïdes, jouent un rôle crucial dans l'allocation des transporteurs d'électrons et des antioxydants lipidiques aux membranes, contribuant à la synthèse et au métabolisme des antioxydants (Shanmugabalaji *et al.*, 2022).

La variable chlorophylle semble ne pas dépendre aussi directement de l'activité de la GPOx sous les trois hautes doses de Cd et de Ni, sauf sous la dose Ni (500 ppm) où elle a été significativement positive dans les feuilles et sous Cd (500 ppm) où elle était significativement négative dans les racines. Les différences de corrélation organe et ETM montrent que sous 500 ppm, le Ni peut avoir un effet plus phytotoxique dans les feuilles que dans les racines. Le Ni est relativement mobile dans la plante et peut être transporté depuis les racines vers les parties aériennes via le xylème, ce qui provoque une diminution de la teneur en chlorophylle et impacte directement la synthèse de la GPOx dans les feuilles. Par contre, sous Cd (500 ppm), *P. australis* augmente probablement l'activité de la GPOx dans les racines afin de participer à la neutralisation des ERO et/ou à la séquestration du Cd. La GPOx qui est impliquée dans la synthèse de lignine, ce qui peut contribuer à l'immobilisation du Cd dans les parois cellulaires, limitant sa toxicité et sa translocation.

Pour la GST, seule une relation positivement significative a été observée entre Chl/GST sous Cd (100 ppm) et aussi sous Ni (500 ppm). Cela montre que non seulement le Cd et le Ni impactent différemment les relations entre la chlorophylle et l'activité enzymatique du système antioxydant, mais aussi que l'effet est dose-dépendant. Cette différence peut s'expliquer par le rôle physiologique du Ni et la toxicité du Cd.

Concernant la relation entre le contenu en protéine et lipide dans les trois organes et aussi entre le contenu en protéine et en lipide (Prot/Lip) une corrélation positive significative a été observée sous tous les doses sauf sous la faible dose Ni(100 ppm) où nous avons constaté des corrélations négatives mais non significative particulièrement entre le contenu en protéine dans les racines avec celui dans les tiges et les feuilles (Prot R / Prot F et Prot T) aussi entre le contenu en lipide dans les feuilles avec celui dans les racines (Lip F /Prot R).

Sous 500 et 1000 ppm de Cd et Ni, la corrélation positive significative entre le contenu en protéines et en lipides dans les trois organes indique que ces contenus diminuent ou augmentent de façon concomitante.

Dans le groupe témoin et sous les faibles doses de Cd et Ni, la corrélation positive entre Prot/Prot et Lip/Lip et Prot/Lip peut être attribuée à une condition normale de non-stress chez *P. australis*, qui maintient un équilibre protéique et lipidique dans tous ses organes, où la synthèse est régulée de manière coordonnée. En revanche, sous les hautes doses

particulièrement 500 et 1000 ppm, cela indique plutôt une diminution de la teneur due à un dépassement du système de défense contre le Cd et le Ni.

Sous la dose de Ni (100 ppm), les corrélations négatives indiquent probablement que *P. australis* utilise plutôt les phytochélatines pour séquestrer le Ni et réduire la peroxydation lipidique, que les enzymes CAT, GPOx et GST qui semblent moins corrélées avec les protéines et les lipides. Ces enzymes du système antioxydant semblent plus corrélées avec le contenu en protéines et en lipides sous les autres hautes doses, afin de faire face aux effets secondaires de Cd et au Ni, comme la génération d'ERO. Cela suggère que, sous 100 ppm de Ni, la réponse est principalement médiée par des voies enzymatiques. Pareil sous 100 ppm de Cd, où la relation entre le contenu en Prot/Lip n'est pas significative, contrairement à ce qui est observé sous 500 et 1000 ppm de Cd.

Une autre différence par rapport aux corrélogrammes de 500 ppm est que, sous 1000 ppm de Cd et de Ni, une corrélation négative significative a été observée entre l'activité de la GPOx dans les tiges et le contenu en protéines et lipides (GPOx T / Prot et Lip). Cela pourrait être dû au fait qu'à ces hautes doses, les mécanismes de détoxification ne sont pas suffisants pour maintenir l'intégrité des protéines et des lipides, qui subissent des dommages oxydatifs importants. Dans ce contexte de stress très intense, *P. australis* peut adopter une stratégie de protection des tiges, qui ont accumulé moins de Cd et de Ni que les racines, afin de maintenir un minimum d'activité physiologique pour la reproduction végétative, si les conditions stressantes deviennent moins fortes.

Comparativement aux doses individuelles, l'addition de faibles doses de Cd (100 ppb) et de Ni (120 ppb) au Ni (1000 ppm) et au Cd (1000 ppm), respectivement semble légèrement modifier les corrélations, qui deviennent non significatives entre Prot/Lip, mais qui restent positives. Ce changement montre que l'ajout de faibles doses de Cd et de Ni aux fortes doses peut activer d'autres voies métaboliques, affectant différemment la synthèse ou la dégradation des protéines et des lipides, modifiant par conséquent les liens entre le contenu en protéines et lipides.

Sous Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb), toutes les relations entre Prot/CAT, GPOx et GST, ainsi que CAT/GST, deviennent non significatives. La différence la plus importante est que la relation Chl/Prot et Lip devient positive après avoir été négative sous la forte dose de Cd à 1000 ppm. Ces différences pourraient être liées au rôle physiologique du Ni. Le Ni, en tant que micronutriment, pourrait à faible dose stimuler des mécanismes de protection du système photosynthétique ou d'autres voies métaboliques impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle, contrebalançant et atténuant partiellement les effets négatifs de la haute dose de Cd.

Sous la dose mixte Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm), la corrélation entre Lip/GPOx devient non significative, à l'inverse de Prot/GPOx, qui demeure similaire que sous la dose forte simple Ni (1000 ppm). Cela montre que l'ajout de Cd modifier la relation entre Lip/ GPOx et pas entre Prot/ GPOx. Cela pourrait indiquer également que, la régulation de l'activité de la GPOx est plus étroitement liée aux protéines qu'aux lipides. La présence de Cd, même à faible dose, peut modifier les voies métaboliques qui impliquent les lipides, réduisant ainsi l'interaction entre les lipides et GPOx. Par contre, l'interaction entre GPOx et les protéines reste stable, suggérant que les protéines continuent de jouer un rôle central dans la réponse antioxydante médiée par la GPOx. La corrélation négative observée entre CAT T/GPOx F suggère une répartition des rôles entre ces deux enzymes dans les différentes parties de la plante. Cela pourrait être expliqué par le fait que *P. australis* active les enzymes de manière complémentaire, mais différente dans les feuilles et les autres tissus. L'activation de la CAT dans certaines parties de la plante pourrait réduire le besoin d'une activité élevée de la GPOx dans les mêmes tissus, ou vice versa, afin d'équilibrer la réponse antioxydante.

Par contre, la corrélation positive entre CAT R/GST R suggère une co-régulation de ces deux enzymes dans les racines. La présence de Cd, même à faible dose, pourrait envoyer un signal aux racines de *P. australis*, déclenchant une réponse coordonnée de la CAT et de la GST pour renforcer le système de défense antioxydant ou même pour d'autres rôles physiologiques.

5 Conclusion

L'étude des effets du cadmium et/ou du nickel sur les paramètres métaboliques, ainsi que l'évaluation de la réponse du système antioxydant et la corrélation entre les paramètres métaboliques et enzymatiques, ont montré que *P. australis* module sa réponse en fonction de l'intensité du stress métallique, du type d'ETM, et de la quantité de Cd et de Ni accumulée dans chaque organe. *P. australis* semble activer les enzymes du système antioxydant de manière complémentaire, avec une co-régulation différenciée selon les tissus, afin d'équilibrer la réponse antioxydante et de lutter contre les EROs générées après l'accumulation différentielle de Cd et de Ni dans les feuilles, tiges et racines.

La teneur en chlorophylles s'avère être un indicateur essentiel pour évaluer les impacts du stress causé par le Cd et le Ni sur les plantes de *P. australis*.

Nos résultats montrent clairement que l'exposition à des doses élevées de Cd (100, 500 et 1000 ppm) induit une réduction significative de la teneur en chlorophylle totale, avec une diminution dépassant 75 % sous l'effet du Cd (1000 ppm), comparativement aux plantes témoins.

Des tendances similaires ont été observées sous l'effet du Ni, mais la diminution de la teneur en chlorophylle était moins prononcée, atteignant 66 % à Ni (1000 ppm), bien que l'accumulation de Ni ait été supérieure à celle du Cd à la même dose.

La diminution de la teneur en chlorophylle peut être attribuée au stress oxydatif induit par le Cd et le Ni. Ces ETMs peuvent s'accumuler dans les feuilles et provoquer un stress oxydatif en stimulant la production excessive d'ERO. Les ERO sont très réactives et peuvent dégrader directement la chlorophylle ou perturber sa biosynthèse en inhibant certaines enzymes impliquées dans ce processus. La différence d'effet entre le Cd et le Ni s'explique par le fait que le Ni est un micronutriment essentiel pour les plantes, qui disposent de mécanismes permettant de réguler son absorption, son transport, sa compartimentation et son homéostasie intracellulaire. En revanche, le Cd, qui n'est pas un élément essentiel, s'accumule et se déplace dans les plantes de manière probablement moins contrôlée, entraînant une toxicité plus élevée.

Les effets du Cd et du Ni sur l'appareil photosynthétique sont également différents. Le Cd peut compromettre l'intégrité des membranes thylakoïdiennes et interférer avec le transport des électrons, ainsi que l'absorption et la répartition de nutriments minéraux essentiels, comme le magnésium nécessaire à la synthèse et au fonctionnement optimal des molécules chlorophylliennes. Par contre, à fortes doses, le Ni est associé à la désorganisation structurelle des chloroplastes, à une inhibition des activités enzymatiques du cycle de Calvin ainsi qu'à une carence en CO₂ induite par la fermeture stomatique.

Le Cd à faibles doses (10, 30 et 100 ppb) n'induit pas de changements significatifs. En revanche, à faibles doses, le Ni peut avoir un effet stimulant sur la chlorophylle, comme cela a été observé avec une légère augmentation de la teneur en chlorophylle sous Ni (120 ppb), confirmant ainsi son rôle de micronutriment essentiel à faible dose.

L'effet des doses mixtes : Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb), Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) et Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm), semble révéler des interactions complexes, notamment une forme d'antagonisme partiel. Lorsque les deux métaux sont appliqués ensemble, il a été observé que l'effet combiné est généralement moins toxique que le Cd seul, mais plus toxique que le Ni seul. Cela pourrait suggérer que le Ni, bien qu'étant potentiellement toxique à des doses élevées, pourrait atténuer partiellement la toxicité du Cd.

Les modifications des teneurs en protéines totales dans les trois organes de *P. australis*, mesurées sous les différentes doses simples et combinées de Cd et/ou Ni, mettent en évidence la complexité des effets de ces deux ETM sur les processus métaboliques chez *P. australis*.

L'augmentation, bien qu'elle soit non significative par rapport aux résultats du groupe témoin observée dans les feuilles et les racines sous les faibles doses, particulièrement celles de Ni (30 ; 60 et 120 ppb), suggère que *P. australis* peut tolérer ces niveaux sans montrer de signes de stress manifeste. Cette augmentation pourrait être due au rôle bénéfique du Ni en tant que micronutriment et peut également être attribuée à un phénomène d'hormèse, où de faibles doses de Cd et de Ni stimulent des réponses physiologiques bénéfiques.

En revanche, à des doses élevées de Cd et de Ni (100, 500 et 1000 ppm), où nous avons enregistré une accumulation plus importante de Cd et de Ni, surtout dans les racines ; nous avons observé une réponse ou un effet différent, dépendant de l'organe, de l'ETM et de la dose testée.

Sous l'exposition au Cd (100 ppm) et au Ni (100 ppm), une augmentation significative des teneurs en protéines a été observée dans les feuilles et les racines. Cette réponse physiologique est indicative d'un mécanisme de défense, reflétant l'induction de la synthèse de phytochélatines ainsi que de protéines de transport et de séquestration. En se liant au Cd et au Ni, ces protéines permettent leur stockage inoffensif dans les vacuoles cellulaires.

Cependant, sous 500 et 1000 ppm de Cd et de Ni, une diminution significative des teneurs en protéines a été observée, suggérant que la toxicité induite par ces deux ETMs dépasse les capacités de défense. *P. australis* semble atteindre sa limite de tolérance, manifestant une probable saturation des mécanismes de défense protéiques. Sauf dans les racines des plantes exposées à Cd (500 ppm), où la teneur en protéines a augmenté de manière significative. Cette réponse différentielle suggère qu'à 500 ppm, les racines de *P. australis* possèdent des

mécanismes de défense mieux adaptés au Cd qu'au Ni.

L'étude de l'interaction entre le Cd et le Ni a révélé qu'une association combinant de faibles et de fortes doses exerce un effet légèrement protecteur par rapport aux fortes doses individuelles. La présence de faibles doses associées à des fortes doses peut activer d'autres mécanismes de défense qui n'ont pas été stimulés ou activés sous les doses élevées individuelles.

En revanche, la combinaison Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) a démontré une synergie négative comparativement aux doses individuelles, entraînant une diminution importante des protéines. Cette synergie négative, marquée par une accumulation importante de ces ETMs dans les tissus, pourrait résulter d'une altération de la perméabilité des membranes cellulaires et d'une interférence avec l'absorption de nutriments essentiels.

Les résultats de l'effet de Cd et/ou Ni sur la teneur en lipides chez *P. australis* montre que l'exposition à de faibles doses de Cd et de Ni n'a pas entraîné de différences significatives par rapport au groupe témoin. Cependant, une diminution marquée de la teneur en lipides a été observée dans les tiges exposées à 100 ppb de Cd, tandis qu'une augmentation significative a été notée dans les feuilles exposées à 120 ppb de Ni. Cela suggère que, à de faibles doses, ces ETMs n'interfèrent pas avec les mécanismes métaboliques associés à la production et au stockage des lipides.

La réduction observée dans les tiges révèle la sensibilité de cet organe, essentiel au transport et au maintien de la structure de la plante. À l'inverse, l'augmentation observée dans les feuilles sous l'effet du Ni_(120 ppb) pourrait être attribuée à son rôle en tant que micronutriment, exerçant potentiellement un effet bénéfique à faible dose en stimulant l'activation de certaines enzymes. En revanche, l'exposition à des doses plus élevées de Cd et de Ni a conduit à une diminution des lipides dans l'ensemble des organes, ce qui pourrait être attribué à la peroxydation des lipides membranaires (glycolipides, phospholipides et cholestérol) causée par la formation d'EROs.

Sous l'effet des doses mixtes Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb), Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) et Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm), une diminution significative des lipides a été observée par rapport aux résultats des plantes témoins. Néanmoins, l'ajout de faibles doses aux fortes semble atténuer légèrement le stress oxydatif dans les feuilles et les racines, constaté sous les doses individuelles de Cd_(1000 ppm) et Ni_(1000 ppm). Cela indique une activation plus marquée des mécanismes de défense antioxydants, renforçant ainsi la tolérance de la plante au stress causé par ces ETMs. Toutefois, cet effet bénéfique n'a pas été constaté dans les tiges, ce qui met en évidence une sensibilité différente du métabolisme lipidique entre les divers organes.

Le profil d'activité des enzymes du système antioxydant (CAT, GPOx et GST) en réponse aux doses croissantes de Cd et de Ni, ainsi qu'à leurs combinaisons, a présenté des tendances similaires. L'analyse de l'accumulation de ces deux ETMs dans les différents organes a révélé une réponse enzymatique dose-dépendante dans les trois organes étudiés, augmentant proportionnellement avec l'élévation des doses appliquées, à l'exception de certaines variations observées dans les tissus foliaires.

Sous les faibles doses de Cd et de Ni, et comparativement aux résultats du groupe témoin, une très faible augmentation d'activité a été observée. Cette faible augmentation démontre la sensibilité du système de défense antioxydant (CAT, GPOx et GST) de *P. australis*, capable de détecter et de réagir même à de faibles niveaux de Cd et de Ni.

En revanche, pour les fortes doses de Cd et de Ni (100, 500 et 1000 ppm) et les doses mixtes, une augmentation significative a été observée. L'augmentation de l'activité avec l'accroissement des doses de Cd et de Ni démontre la capacité de *P. australis* à ajuster sa réponse défensive en fonction de l'intensité du stress. Le stress oxydatif causé par les doses élevées de Cd et de Ni entraîne une surproduction des ERO, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le superoxyde (O₂•-) et le radical hydroxyle (OH•). Cette augmentation des EROs agit comme un signal déclencheur, induisant une élévation des taux (CAT, GPOx et GST) dans les trois organes de *P. australis*.

Cependant, cette induction enzymatique s'est révélée organe-spécifique, présentant une activité significativement plus élevée dans les racines comparativement aux tissus foliaires et caulinaires, selon un gradient décroissant : racines > feuilles > tiges. Cette distribution différentielle s'explique par le fait que le système racinaire constitue le premier site d'interaction, d'absorption et d'accumulation du Cd et du Ni.

La stimulation d'activité dans les racines peut être interprétée comme une tentative pour limiter l'absorption excessive de Cd et de Ni et minimiser leur translocation vers les parties aériennes. L'activité plus faible dans les tiges pourrait refléter le rôle de cet organe principalement comme tissu de transport, avec moins d'accumulation que dans les racines ou les feuilles.

Nos résultats montrent que *P. australis* déploie une réaction antioxydante synchronisée et coordonnée en réponse au stress métallique induit par le Cd et le Ni.

L'activité de la GST a été plus induite dans les racines que dans les feuilles, comparativement à la CAT et la GPOx. Cela suggère que, chez *P. australis*, la GST joue un rôle différent de celui de la CAT et de la GPOx. *P. australis* semble utiliser la GST plus pour le transport et la séquestration des complexes phytochélatine-Cd ou Ni vers la vacuole, particulièrement dans les tissus racinaires. La CAT et la GPOx sont davantage orientées vers la neutralisation des

ERO dans tous les organes.

L'intensité de l'induction des trois enzymes s'est également révélée dépendante des ETMs. Sous l'effet de doses élevées de Cd, l'activité des trois enzymes a augmenté proportionnellement aux doses appliquées dans l'ensemble des organes étudiés. En revanche, en présence de fortes doses de Ni, une réponse différentielle a été observée : l'activité de la GST continue de croître jusqu'à 1000 ppm de Ni, tandis que les activités de la CAT et de la GPOx présentent une diminution à cette même concentration, après avoir atteint un pic d'activité à 500 ppm de Ni. Cette modulation de l'activité du système antioxydant suggère un rôle continu de la GST dans la détoxification du Ni, même à très fortes doses. La diminution de l'activité de la CAT et la GPOx à 1000 ppm de Ni pourrait indiquer une possible saturation du système antioxydant face à un stress métallique extrême, ou un potentiel changement de stratégie de défense, privilégiant la détoxification directe via la GST plutôt que la neutralisation des EROs par la CAT et la GPOx.

L'analyse des corrélations entre les métabolites (chlorophylle, protéines et lipides) et les enzymes du système antioxydant (CAT, GPOx et GST) chez *P. australis*, effectuée dans des conditions sans stress métallique et en présence de doses variables de Cd et/ou de Ni, a révélé des modifications significatives des profils de corrélation en fonction des ETMs testés, de leurs doses et des organes étudiés (feuilles, tiges et racines).

L'analyse des résultats de la corrélation entre les différentes réponses métaboliques et enzymatiques montrent que, dans des conditions normales, *P. australis* maintient un équilibre métabolique, caractérisé par des corrélations positives significatives entre les teneurs en protéines et en lipides dans les trois organes étudiés. Toutefois, l'exposition à des doses de Cd et de Ni, tant faibles que fortes, perturbe cet équilibre.

L'absence de corrélations significatives entre les activités enzymatiques antioxydantes et les teneurs en chlorophylle, protéines et lipides montre que, dans des conditions normales ou en l'absence de stress, ces systèmes fonctionnent de manière plus ou moins indépendante.

Sous des faibles doses de Cd, une inversion de la corrélation entre la chlorophylle, les protéines et les lipides a été observée, suggérant une réponse adaptative qui pourrait entraîner une stimulation de la synthèse des phytochélateurs. À l'inverse, le Ni semble jouer un rôle protecteur dans la biosynthèse chlorophyllienne, favorisant le recyclage de l'azote, ce qui renforce les corrélations positives entre la chlorophylle et les protéines.

Sous les faibles doses de Cd, des corrélations négatives significatives apparaissent entre les protéines, les lipides et certaines enzymes, notamment la CAT sous Cd_(10 ppb) et la GPOX sous Cd_(30 ppb) et Cd_(100 ppb). Ces corrélations négatives montrent que lorsque

la synthèse des protéines et des lipides diminue, l'activité de ces enzymes antioxydantes augmente. Par contre, sous l'effet du Ni et comparativement aux résultats sous Cd et au contrôle, des différences concernant la corrélation entre les métabolites et le système antioxydant ont été observées. À quelques exceptions dans les tiges et les feuilles, sous l'effet du Cd, toutes les corrélations significatives observées ont été négatives : CAT/Lip et Prot, ainsi qu'entre GPOX/Lip et Prot, mais aucune corrélation significative n'a été trouvée entre GST/Lip et Prot. L'absence de corrélation significative montre que le Ni chez *P. australis* n'engendre pas de déséquilibre ou d'excès en ERO susceptibles d'attaquer les lipides et les protéines.

Sous les hautes doses (100, 500 et 1000 ppm), les corrélations entre les paires de variables changent selon l'ETM et la dose de Ni et de Cd, ce qui indique que *P. australis* ajuste sa réponse métabolique et enzymatique en fonction de l'intensité du stress.

L'absence de corrélation significative entre Chl/ Prot, Lip et CAT sous les trois hautes doses de Cd et de Ni ne signifie pas nécessairement une régulation indépendante de ces variables. Cela pourrait indiquer que la relation n'est pas linéaire ou n'est pas suffisamment forte pour être détectée. Les relations observées entre Prot/Lip montrent une corrélation positive significative aux doses élevées, indiquant que ces métabolites fluctuent de manière concomitante, probablement en réponse à une dégradation des défenses métaboliques sous stress.

Comparativement aux doses individuelles, l'addition de faibles doses de Cd ($_{100 \text{ ppb}}$) et de Ni ($_{120 \text{ ppb}}$) au Ni ($_{1000 \text{ ppm}}$) et au Cd ($_{1000 \text{ ppm}}$), respectivement semble légèrement modifier les corrélations. Ce changement montre que l'ajout de faibles doses de Cd et de Ni aux fortes doses peut activer d'autres voies métaboliques, affectant différemment la synthèse ou la dégradation des protéines et des lipides, modifiant par conséquent les liens entre le contenu en protéines, en lipides et l'activité enzymatique. L'impact différentiel des hautes doses mixtes sur les enzymes antioxydantes révèle des interactions spécifiques en fonction de la localisation dans la plante. La co-régulation observée entre la CAT et la GST dans les racines, mais absente dans les feuilles, pourrait refléter une stratégie de défense distincte entre les différents tissus de *P. australis*, où l'activation complémentaire des enzymes antioxydantes permet d'équilibrer la réponse au stress oxydatif induit par la présence de Cd et de Ni.

Sous la dose mixte de Cd ($_{100 \text{ ppm}}$) + Ni ($_{100 \text{ ppm}}$), des interactions différentes par rapport aux doses individuelles sont observées. Une corrélation positive significative entre Chl/CAT contraste avec les corrélations négatives entre Chl/ GST F et GST R sous Cd($_{100 \text{ ppm}}$) et l'absence de corrélations sous Ni($_{100 \text{ ppm}}$). Les corrélations positives entre Prot/Lip sous la dose mixte ont été similaires à celles observées sous Cd. Cela indique que la présence de Cd en quantités égales avec le Ni peut accroître la peroxydation lipidique tout en réduisant la quantité de protéines.

Chapitre IV : Caractérisation histologique sous Cd et/ou Ni

1 Matériel et méthodes

1.1 Echantillonnage

Les échantillons (feuille, tige et racine) ont été prélevés en respectant des critères morphologiques homogènes (longueur et diamètre). Les feuilles ont été prélevées au deuxième niveau à partir de l'apex, en évitant les feuilles drapeau, les jeunes feuilles non complètement déployées et les feuilles basales. Les tiges et les racines proviennent de plantes mesurant entre 85 et 90 cm de hauteur et ayant un diamètre de 1 à 1,2 cm. Les échantillons ont été conservés dans de l'eau distillée MilliQ® jusqu'à la réalisation des coupes histologiques.

1.2 Coupe histologique et coloration

Les coupes histologiques ont été réalisées en utilisant un microtome à main équipé de lame de rasoir qui assure des coupes de 14- 25 μm . Les coupes ont été colorées ensuite par le phloroglucinol-HCl. La coloration au phloroglucinol, également connue sous le nom de coloration de Wiesner, est utilisée pour détecter la présence de lignine dans la paroi cellulaire végétale. La lignine est un constituant commun de la paroi secondaire des cellules végétales, (parois des éléments du xylème et du tissu sclérenchyme). Les groupes terminaux cinnamaldéhyde de la lignine semblent réagir avec le phloroglucinol-HCl pour donner une couleur rouge-violet (Davidson *et al.*, 1995; Yeung, 2015).

Pour préparer la solution de coloration, 1 g de phloroglucinol a été dissous dans 40 ml d'éthanol à 20 %. Ensuite, 20 ml d'HCl concentré (2 N) ont été ajoutés à cette solution (Gahan, 1984; Yeung, 2015). L'étude histologique a été réalisée au laboratoire G.F. Ingrassia de l'Université de Catane, en Italie.

1.3 Caractérisation ultrastructurale des tissus racinaires

Nous avons réalisé des coupes histologiques dans les racines en utilisant la microscopie électronique à balayage pour observer et détecter les changements ultrastructuraux au niveau racinaire sous différentes doses de Cd et/ou Ni.

Les échantillons de racines ont été immergés dans du glutaraldéhyde à 2,5% et un tampon phosphate 0,1M (pH 7,2), laissés à reposer 24 heures à 4°C afin de préserver les structures cellulaires. Ensuite, une déshydratation progressive des échantillons a été réalisée à l'aide d'une série de solutions d'éthanol (40%, 60%, 80%, 99%) pendant 10 minutes dans chaque solution. Après la déshydratation, les échantillons ont été montés sur des supports en aluminium (stubs)

pour le revêtement par pulvérisation cathodique d'une fine couche d'or (matériau conducteur) (Cressington 108 Sputter Coaters) afin d'améliorer la qualité de l'imagerie et de réduire les artefacts de charge. Les microphotographies ont été réalisées par MEB (Zeiss DSM 962). Les observations ont été réalisées au laboratoire G.F. Ingrassia de l'Université de Catane, en Italie.

2 Résultats et discussion

2.1 Effet de doses simples et combinée de Cd et de Ni sur l'histologie de la feuille

Dans les coupes transversales, les paramètres examinés étaient : l'intensité de la coloration de l'épiderme abaxial et adaxial, le sclérenchyme, les cellules de la gaine périvasculaire, et le phloème et le xylème.

L'examen des coupes transversales de feuilles des plantes exposées à des doses individuelles et combinées de Cd et/ou de Ni après la réaction de coloration de Wiesner, a montré des changements dans l'intensité de coloration comparée au groupe témoin. Ces modifications étaient plus prononcées sous l'effet des doses de Cd que de Ni, et plus évidentes à fortes doses qu'à faibles doses.

Sous les faibles doses de Ni (30 ;60 ;120 ppb), les résultats (fig. 50) n'ont pas montré de différence importante ou flagrante par rapport au groupe témoin (fig. 47). On n'observe pas de coloration de l'épiderme supérieur (adaxial : Ed) et inférieur (abaxial : Eb), qui sont constitués d'une seule couche de cellules. Il n'y a pas non plus de différence notable avec le parenchyme palissadique, riche en chloroplastes (site principal de la photosynthèse), ni avec le parenchyme lacuneux ou spongieux (caractérisé par de grands espaces intercellulaires favorisant les échanges gazeux). La seule différence observée est une coloration rouge très discrète du sclérenchyme, qui assure le soutien structural des vaisseaux conducteurs (xylème et phloème). Concernant ces vaisseaux conducteurs qui sont entourés par le métaphloème, le métaxylème, le protophloème et le protoxylème, l'intensité de leur coloration ne semble pas significativement différente de celle observée dans les feuilles témoins.

Les parois extérieures du phloème et les parois du métaphloème et protophloème semble plus rouge que celles observé dans les coupes des feuilles témoins. Les observations microscopiques après coloration au réactif de phloroglucinol-HCl n'ont pas mis en évidence de changement notable dans l'intensité de coloration du sclérenchyme situé au niveau des faisceaux conducteurs supérieurs et inférieurs de la nervure centrale des feuilles, comparativement aux témoins. L'absence de différences dans la structure anatomique des feuilles de *P. australis* exposées aux faibles doses de Ni, par rapport aux feuilles témoins, indique que les mécanismes

de défense n'ont pas été déclenchés. L'intégrité des tissus foliaires clés (épiderme, parenchymes palissadique et lacuneux, faisceaux vasculaires) ne semble pas être affectée par ces faibles doses de Ni. Par conséquent, un bon fonctionnement des processus physiologiques fondamentaux comme la photosynthèse, le transport des sèves peut être maintenu. L'absence de changements anatomiques à faibles doses pourrait être due au fait que ces niveaux de Ni sont proches des besoins physiologiques normaux de *P. australis*.

Selon l'indication de la coloration par le phloroglucinol-HCl et contrairement aux faibles doses de Ni, les faibles doses de Cd, particulièrement les doses Cd_(60ppb) et Cd_(100ppb), semblent avoir légèrement modifié la couleur des tissus foliaires de *P. australis*. Une décoloration (verdissement moins intense) des parenchymes palissadique et lacuneux indique une perturbation au niveau de la photosynthèse et du métabolisme chloroplastique. La coloration rougeâtre plus prononcée des tissus phloémiens (parois extérieures), ainsi que des cellules du métaphloème et du protophloème, indique un dépôt de lignine sur leurs parois.

Ces observations corroborent les résultats présentés précédemment (Chapitre III ; Tab. 29). Ces résultats ont en effet mis en évidence des réponses différentielles selon l'ETM testé. Sous les faibles doses de Cd [Cd_(10ppb) ; Cd_(30ppb) et Cd_(100ppb)], aucune augmentation ou diminution significative n'a été observée par rapport au groupe témoin. En revanche, les faibles doses de Ni [Ni_(30ppb) ; Ni_(60ppb) ; Ni_(120ppb)] ont entraîné une légère augmentation de la teneur en chlorophylle totale.

Sous les hautes doses de Cd et de Ni (100, 500 et 1000 ppm) et aussi sous les doses mixtes (fig. 49, 451, 52), la coloration de Wiesner a montré que l'intensité de la coloration était plus prononcée et plus visible comparativement aux résultats dans le groupe contrôle et les faibles doses de Cd et de Ni. Le changement le plus visible est la chlorose observée dans les tissus parenchymateuse avec l'augmentation des doses de Cd et Ni, ce qui montre un dysfonctionnement dans le processus de la photosynthèse et/ou la dégradation de la chlorophylle. D'après Chaplygin *et al.* (2022), l'exposition de *P. australis* aux ETMs induit des modifications ultrastructurale au niveau des chloroplastes. Ces altérations de la structure interne des chloroplastes pourraient avoir des répercussions sur leurs fonctions physiologiques et métaboliques, ainsi que sur celles des mitochondries. Le changement de leur ultrastructure pourrait engendrer des dysfonctionnements métaboliques majeurs au niveau des tissus foliaires exposés à ces ETM.

Sous Cd_(100 ppm) et aussi sous Ni_(100 ppm), la coloration histochimique au réactif de phloroglucinol-HCl a révélé une augmentation de l'intensité de coloration rouge au niveau des sclérenchymes situés dans la face abaxiale des feuilles. Cette coloration rouge est le signe d'une

lignification de ces tissus sclérenchimateux. Cependant, sous les doses plus élevées de 500 ppm et 1000 ppm de Cd et de Ni, l'intensité de cette coloration rouge s'est atténuée, indiquant une diminution de la lignification dans ces conditions de stress métallique plus sévère. Le renforcement des structures de soutien et des barrières physiques dans les tissus sous 100 ppm pourrait être interprété comme une réponse défensive de la plante visant à limiter la translocation du Cd et du Ni.

La coloration histochimique au phloroglucinol-HCl des différents tissus vasculaires conducteurs (xylème, phloème, méta-xylème, méta-phloème, proto-xylème et proto-phloème) a révélé des variations d'intensité en fonction des doses de Cd et de Ni appliquées. Une coloration intense et généralisée a été observée sous 100 ppm de Cd, indiquant une forte lignification des parois cellulaires. En revanche, une diminution de l'intensité de coloration a été constatée sous 500 et 1000 ppm de Cd, suggérant une lignification réduite. Ces observations sous Cd_(100 ppm) peut être due à un mécanisme de défense visant à renforcer les parois cellulaires pour limiter la translocation du Cd vers les tissus parenchymateux et augmenter la rigidité des tissus pour maintenir l'intégrité structurelle des cellules. À 500 et 1000 ppm, la diminution de l'intensité de coloration suggère une réduction de la lignification. Cela pourrait être dû à une toxicité excessive qui perturbe les processus de biosynthèse de la lignine.

Concernant le traitement au Ni, la coloration était plus faible sous 100 ppm comparée à celle observée sous 100 ppm de Cd. Cependant, une coloration forte et généralisée a été observé sous 500 ppm de Ni qui baisse à nouveau sous 1000 ppm de Ni. La coloration plus faible sous Ni_(100 ppm), par rapport au Cd à la même dose indique une réponse moins intense. Cela peut s'expliquer par une toxicité moindre du Ni à cette dose ou des mécanismes de détoxification plus efficaces pour le Ni. À Ni_(500 ppm), la coloration forte et généralisée suggère une activation importante des mécanismes de lignification. Cela pourrait indiquer un seuil de tolérance plus élevé pour le Ni. À Ni_(1000 ppm), la diminution de la coloration pourrait être à cause d'une perturbation des processus de lignification due à une toxicité excessive a cette dose.

Pour les traitements mixtes, les niveaux de coloration observés sous Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppm) et Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) étaient similaires à ceux obtenus respectivement sous Cd_(1000 ppm) et Ni_(1000 ppm) seuls. Le traitement Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm) a produit une coloration plus proche de celle observée sous Cd_(100 ppm) que sous Ni_(100 ppm).

La similarité avec les traitements individuels montre une dominance de l'effet du Cd et Ni présent à plus forte dose. Sous Cd_(100 ppm) + Ni_(100 ppm), la ressemblance des niveaux de coloration, et donc de lignification, avec ceux obtenus sous Cd_(100 ppm) plutôt que sous

Ni (100 ppm), montre une prépondérance de l'effet du Cd sur celui du Ni en ce qui concerne l'induction de la réponse de lignification.

Sous une pollution importante par les ETMs plusieurs travaux ont mis en évidence des changements ultrastructuraux significatifs au niveau des feuilles de *P. australis* ainsi que des modifications morphologiques de la plante. Il a été démontré que l'accumulation des ETMs dans les tissus foliaires induit des altérations de la structure des chloroplastes, se traduisant notamment par une augmentation du nombre de plastoglobules, une réduction des grana lamellaires et des modifications de l'ultrastructure des mitochondries et des peroxysomes (Chaplygin *et al.*, 2022; Minkina *et al.*, 2018). Les travaux de Shiryayev *et al.* (2021) ont mis en évidence les modifications structurales majeures induites au niveau des tissus foliaires de *P. australis* en réponse à une augmentation des concentrations en divers ETMs (Ni, Zn, Mn, Pb, Cd, Hg et Co) dans le milieu. Leurs observations ont révélé une augmentation d'environ 10% du volume des cellules du parenchyme palissadique et lacuneux, laissant supposer une accumulation vacuolaire des ETM. Aussi parallèlement, une réduction du nombre total de cellules a été constatée, probablement causée par une diminution de l'activité mitotique sous l'effet de la toxicité des ETMs. Les chloroplastes ont subi aussi une diminution moyenne de 25% de leur nombre et volume dans les tissus par rapport aux conditions non contaminées. Ces résultats peuvent expliquer la chlorose observée sous les hautes doses de Cd et/ou de Ni dans notre étude. Concernant la lignification des parois cellulaires des feuilles, plusieurs travaux ont montré que la paroi cellulaire joue un rôle crucial dans la défense contre les ETMs. La paroi des cellules foliaires subit des modifications pour améliorer sa capacité de protection (Krzesłowska, 2011; Parrotta *et al.*, 2015). Les principales modifications comprennent une lignification accrue et un épaississement, qui réduisent le mouvement des ETMs (Jia *et al.*, 2021). Ces modifications améliorent la capacité de la paroi cellulaire à fixer les ETMs et à diminuer leur perméabilité, réduisant ainsi efficacement la translocation vers le tonoplaste (Parrotta *et al.*, 2015). L'immobilisation et la fixation des ETMs au niveau de la paroi cellulaire s'effectuent principalement via les nombreux groupements fonctionnels réactifs présents dans sa matrice complexe. Ces groupements fonctionnels sont portés principalement par la lignine, les composés lipidiques et protéique et les hétéropolysaccharides complexes (Mohan *et al.*, 2002). La matrice constitutive des parois cellulaires végétales présente une grande diversité de groupements réactifs, notamment des groupes hydroxyle (-OH), phosphoryle (-PO₃O₂), amino (-NH₂), amide (-CONH₂), carboxyle (-COOH), sulfhydryle (-SH) ainsi que d'autres groupes ioniques (He *et al.*, 2020; Mohan *et al.*, 2002).

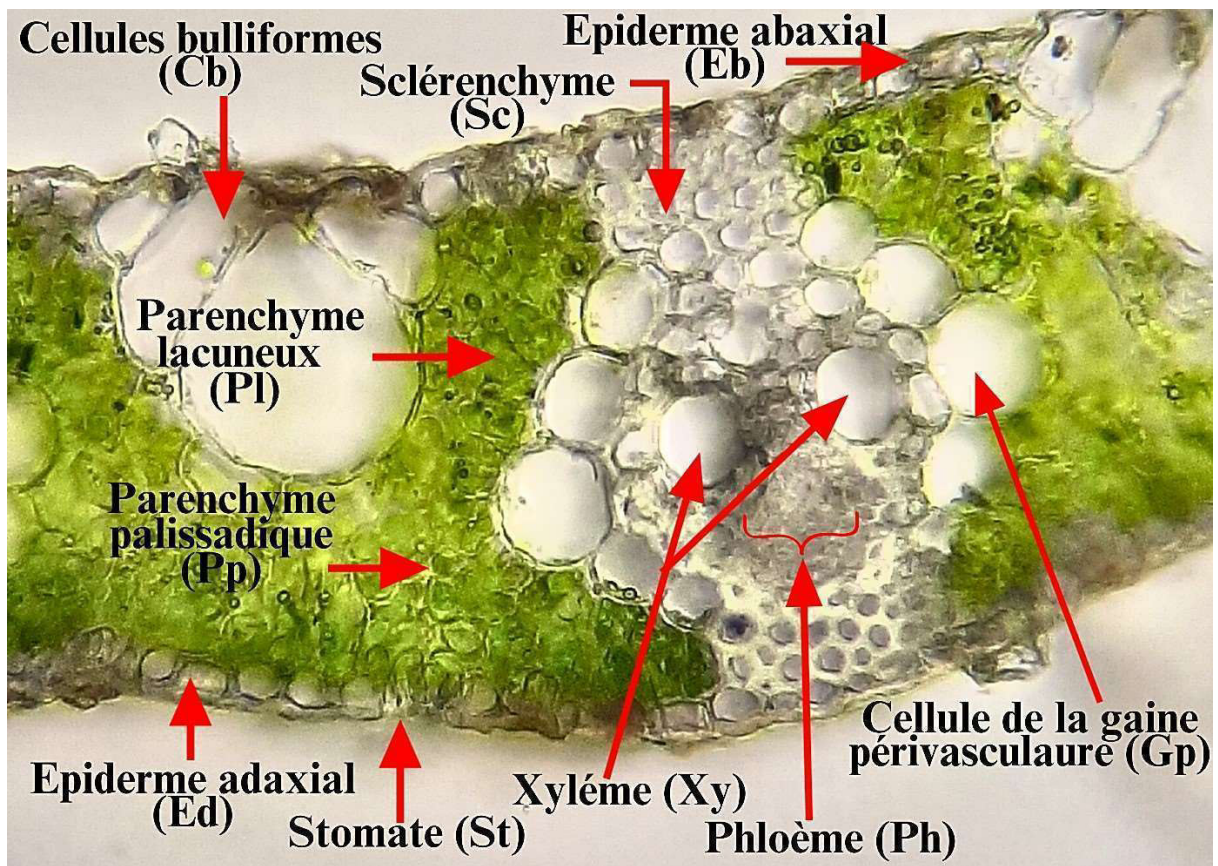


Fig. 46 : Section transversale de feuille de *Phragmites australis* du groupe témoin (x80).

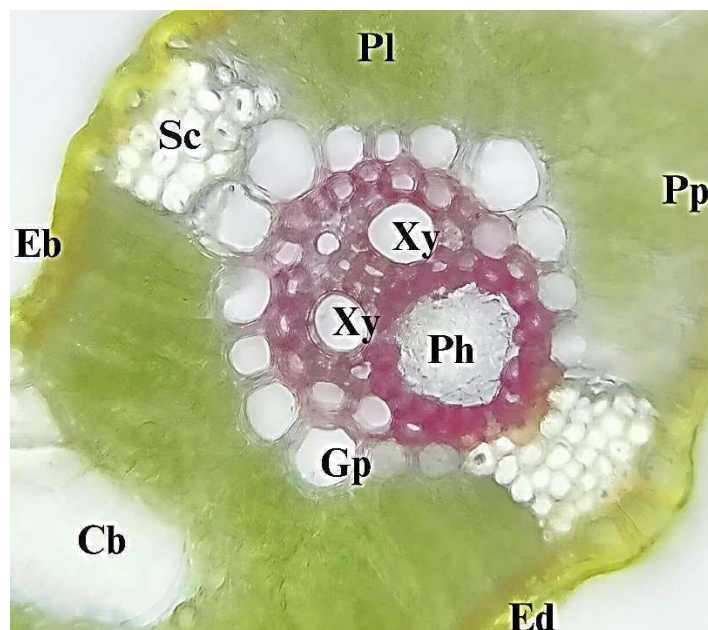


Fig. 47 : Section transversale de feuille de *Phragmites australis* du groupe témoin colorée au phloroglucinol-HCl (x80)

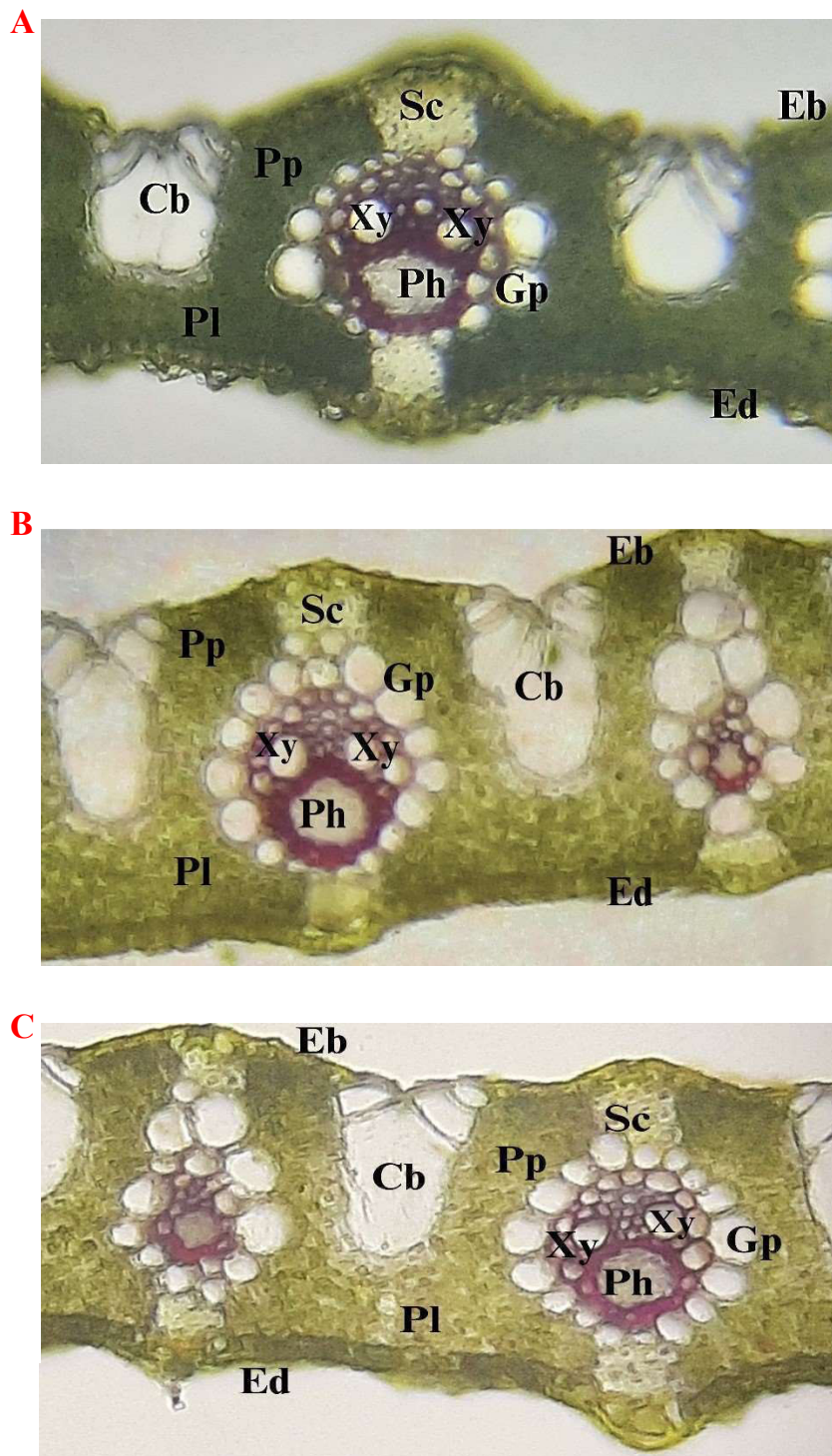


Fig. 48 : Sections transversales de feuilles de *Phragmites australis* exposées aux faibles doses de Cd : (A) 10 ppb, (B) 30 ppb, (C) 100 ppb, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).

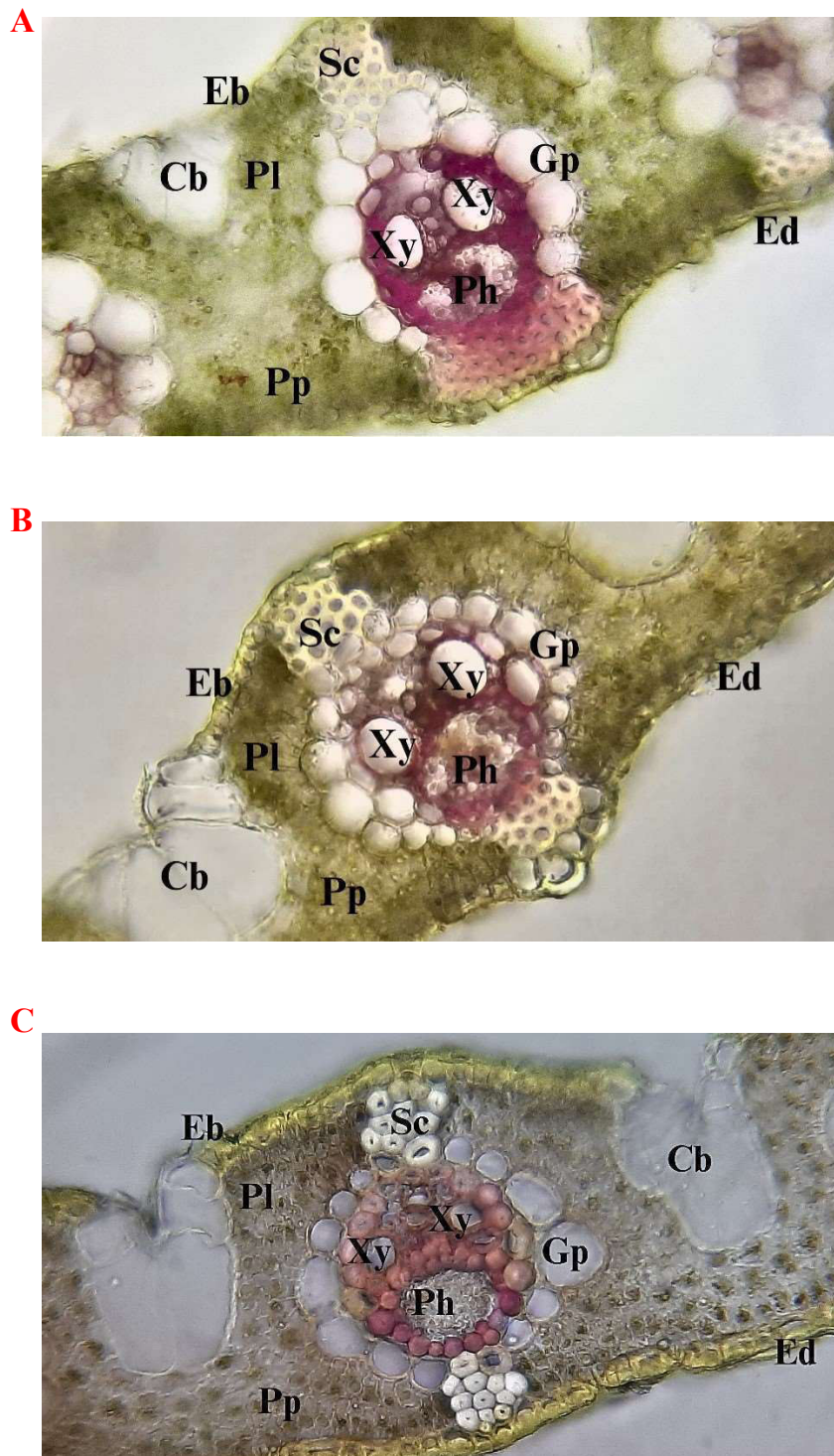


Fig. 49 : Sections transversales de feuilles de *Phragmites australis* exposées aux doses élevées de Cd : (A) 100 ppm, (B) 500 ppm, (C) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).

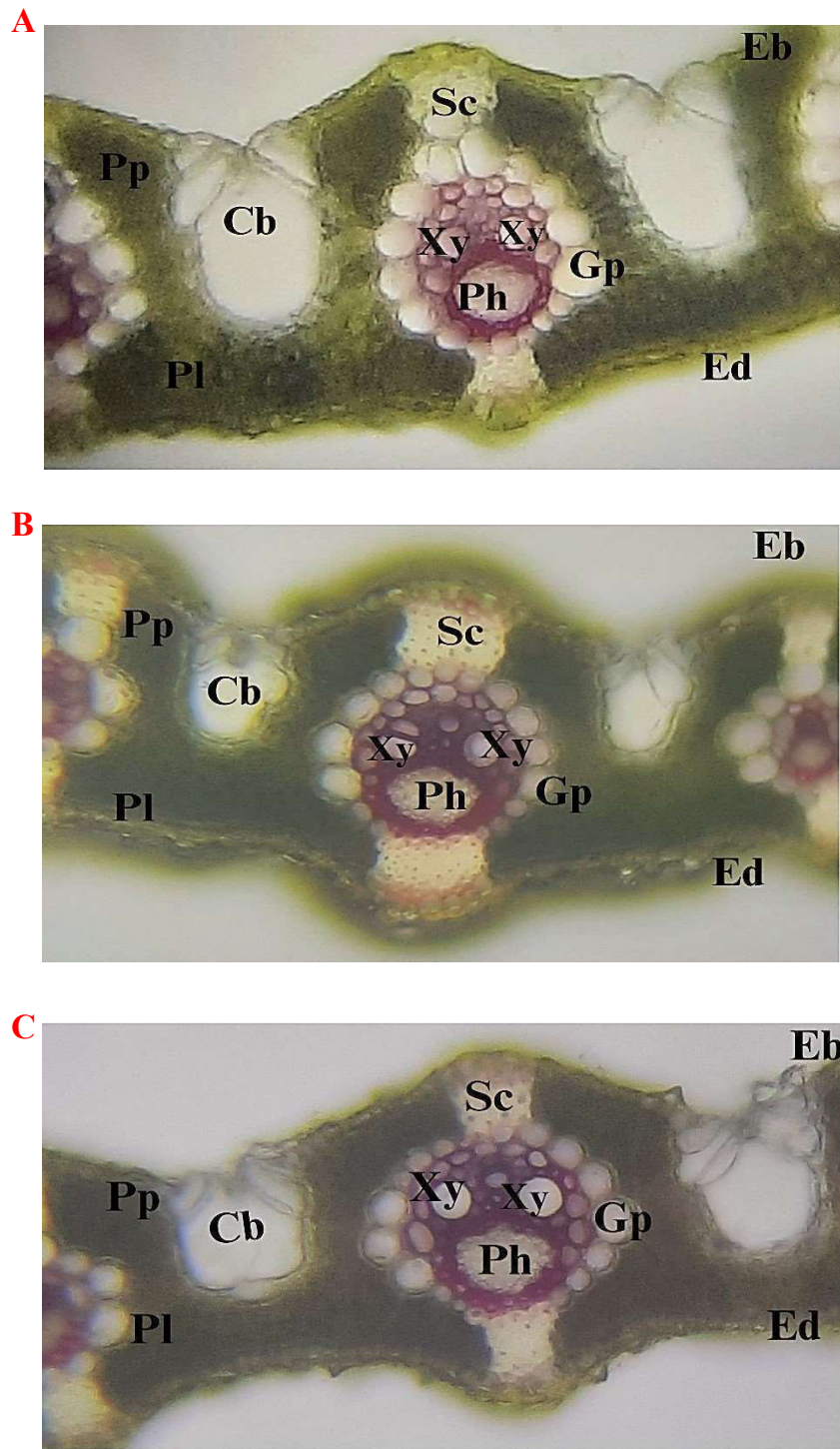


Fig. 50 : Sections transversales de feuilles de *Phragmites australis* exposées aux faibles doses de Ni : (A) 30 ppb, (B) 60 ppb, (C) 120 ppb, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).

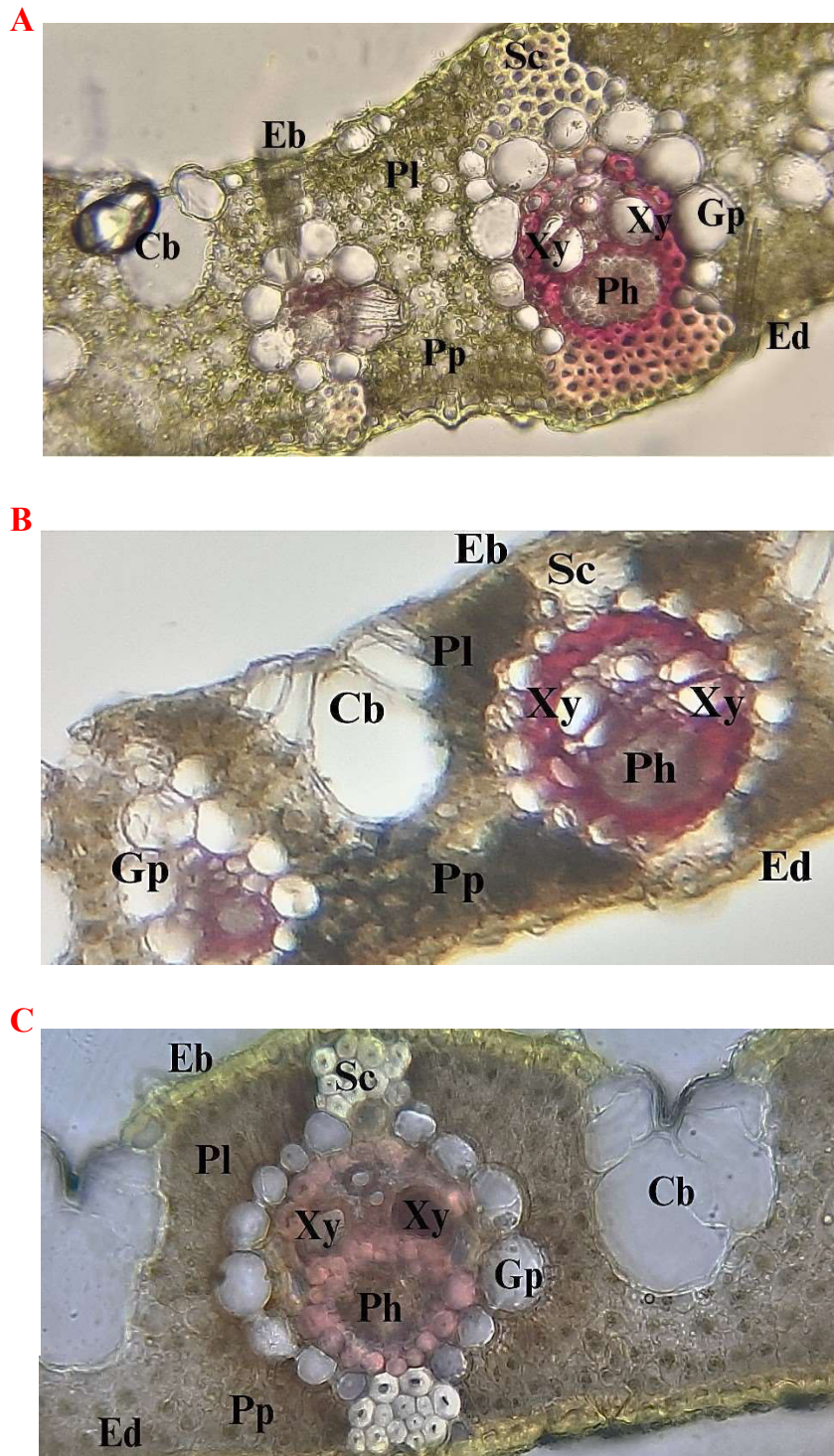


Fig. 51 : Sections transversales de feuilles de *Phragmites australis* exposées aux doses élevées de Ni : (A) 100 ppm, (B) 500 ppm, (C) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).

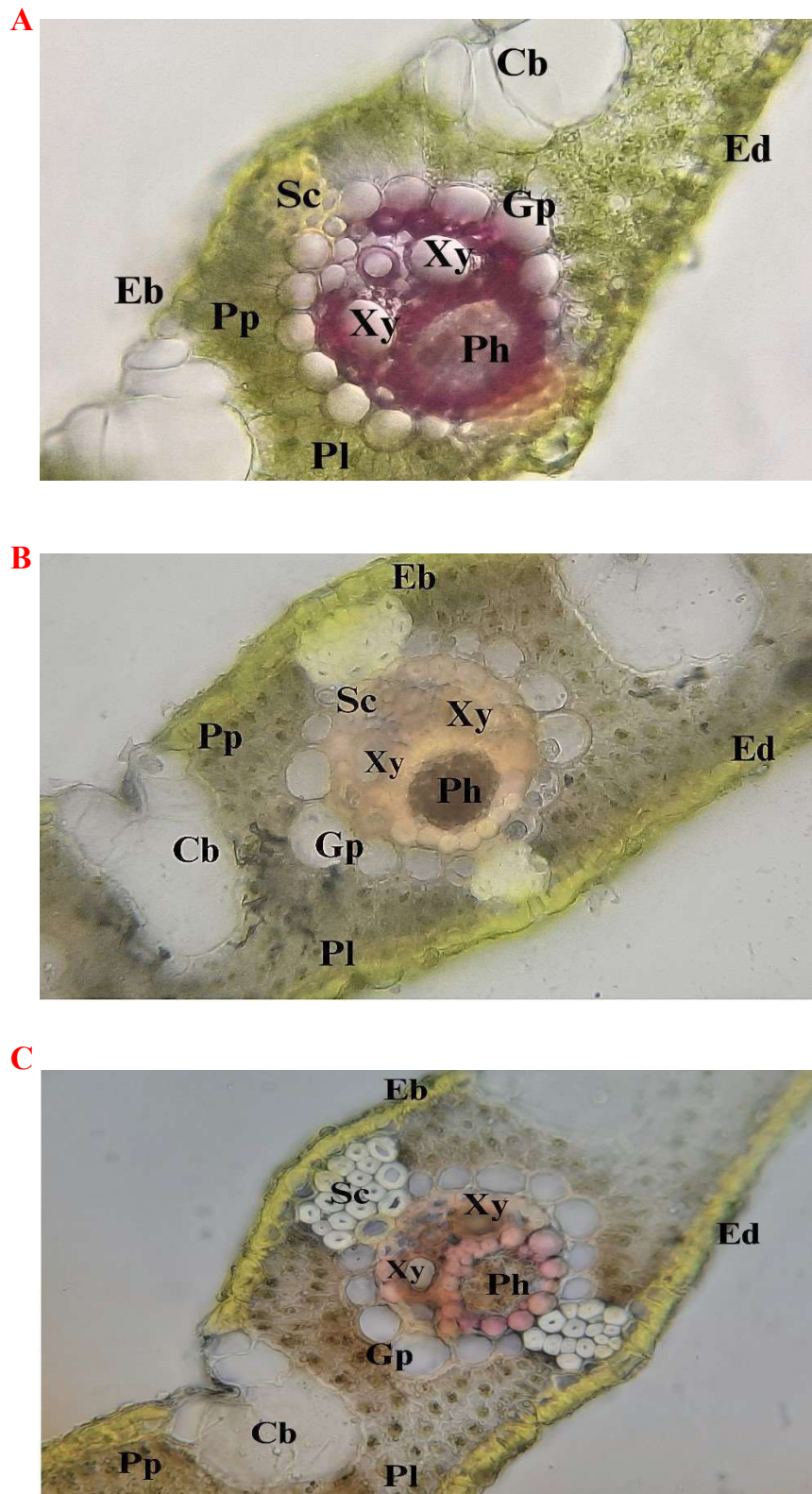


Fig. 52 : Sections transversales de feuilles de *Phragmites australis* exposées à différentes doses mixtes de Cd et Ni : (A) Cd (100 ppm)+Ni (100 ppm), (B) Cd (100 ppb)+Ni (1000 ppm), (C) Cd (1000 ppm)+Ni (120 ppb), colorées au phloroglucinol-HCl (x80).

2.2 Effet de doses simples et combinée de Cd et de Ni sur l'histologie de la tige

L'analyse des coupes transversales de tiges de plantes exposées à différentes doses individuelles ou combinées de Cd et/ou Ni, après application du réactif de coloration de Wiesner spécifique de la lignine (Fig. 55-57), a révélé des modifications notables de la coloration des parois cellulaires des tissus de la tige, en comparaison au groupe témoin non exposé (Fig. 53-54).

Contrairement à ce qui a été observé dans les feuilles sous les faibles doses de Cd et Ni, où nous avons noté une légère différence de coloration, les parois des tissus caulinaires exposées à de faibles doses (Fig. 55-56 : A, B, C) présentaient une coloration très similaire à celle du groupe contrôle, sans changement visible de l'intensité de coloration, et par conséquent de la lignification. Une coloration rouge-pourpre caractéristique d'un niveau normal de lignine était observée au niveau des parois cellulaires des différents tissus de la tige : l'épiderme lignifié (El), le parenchyme cortical chlorophyllien (Pc), le parenchyme médullaire (Pm), sclérenchyme (Sc), le phloème (Ph) et les vaisseaux du xylème (Xy).

Comparativement aux observations dans le groupe contrôle, les résultats sous les faibles doses montrent une sensibilité plus élevée des tissus foliaires par rapport aux tissus caulinaires aux Cd et/ou Ni. Cette moindre sensibilité dans les tiges s'explique par le rôle de chaque organe dans la plante. En tant qu'organe de structure, assurant le soutien et la conduction de la sève, la tige possède naturellement des parois cellulaires lignifiées. Cette lignification des parois est sans doute la raison pour laquelle il n'y a pas d'augmentation notable de la lignification sous les faibles doses, comparativement aux parois cellulaires foliaires.

Comme dans les tissus foliaires, sous les hautes doses de Cd et de Ni (100, 500 et 1000 ppm), ainsi que sous les doses mixtes (fig. 55-56 : D, E, F), la coloration de Wiesner a montré que l'intensité de la coloration des parois était plus forte et plus visible comparativement aux résultats observés dans le groupe contrôle et sous les faibles doses de Cd et de Ni. Cette forte coloration est caractéristique d'un enrichissement en composés lignifiés, qui était particulièrement évidente au sein des parois des cellules du parenchyme cortical chlorophyllien (Pc) et du parenchyme médullaire (Pm). Une diminution progressive de l'épaisseur du parenchyme cortical chlorophyllien, ainsi qu'une décoloration totale de ce tissu, ont été notées avec l'augmentation des doses de Cd et de Ni testées. D'après Molas (2002), l'augmentation de la disponibilité des ETMs est l'une des raisons de la perturbation du transport et de la translocation des nutriments des racines vers les tiges et les feuilles. Cela provoque des changements ultrastructuraux dans la paroi, la membrane cellulaire, le cytoplasme, les organites et les vacuoles des cellules des parties aériennes. Les perturbations de l'ultrastructure des

chloroplastes en présence d'ETMs sont l'une des causes de la diminution de la teneur en pigments des plantes et de la réduction générale du taux de photosynthèse. De nombreuses études ont mis en évidence que les peroxydases pariétales des tiges, en particulier la GPOx, sont capables d'augmenter leurs activités antioxydantes et de lignification en réponse à une exposition au Cd et au Ni (Elobeid *et al.*, 2012; Leškoví *et al.*, 2020; Loix *et al.*, 2017). La GPOx stimule la polymérisation oxydative des monolignols en composés lignine au niveau pariétal, conduisant à un renforcement de la lignification (Hadj Bachir *et al.*, 2022).

Sous les doses mixtes de Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb), Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm), les résultats étaient similaires à ceux observés respectivement sous Cd (1000 ppm) et Ni (1000 ppm) seuls. La similarité avec les traitements individuels montre une dominance de l'effet du Cd et du Ni présent à plus forte dose. Le traitement avec Cd (100 ppm) et Ni (100 ppm) a produit une coloration similaire à celle observée avec Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm). Contrairement à ce qui a été observé dans les feuilles, les tiges semblent moins sensibles d'un point de vue structural aux effets de ces deux ETMs. Cela suggère une résilience relative des tiges par rapport aux feuilles face aux stress induits par le Cd et le Ni.

Sur le plan structural, et sous de hautes doses, la présence de zones nécrosées a été observée au niveau de la cuticule et de l'épiderme caulinaire de certaines coupes des tiges de plantes soumises à Cd (500 ppm), et ces nécroses s'accroissaient à Cd (1000 ppm). Cependant, aucune nécrose tissulaire n'a été observée sous de fortes doses de Ni. Cette différence de réponse structurale entre le Cd et le Ni à fortes doses pourrait s'expliquer par une sensibilité différentielle des tissus caulinaires face à l'accumulation de ces deux ETM. Selon Lourenço *et al.* (2016) et Plomion *et al.* (2001), les variations des teneurs en lignine observées en réponse à un stress environnemental, comme une exposition aux ETMs, peuvent varier considérablement : entre espèces, entre organes, entre tissus et même au niveau intercellulaire dans un tissu, où les différents types cellulaires peuvent moduler différemment leur lignification pariétale. Dans la présente étude, la réduction progressive de l'épaisseur du parenchyme cortical chlorophyllien des tiges exposées à de fortes doses de Cd et/ou Ni pourrait être la conséquence d'une inhibition de la division cellulaire au sein de ce tissu après l'accumulation de Cd et Ni. Avec l'augmentation des doses de Cd et Ni, les capacités de séquestration pariétale sont dépassées, conduisant à une pénétration plus importante dans les compartiments intracellulaires, affectant ainsi divers processus cellulaires, dont la division cellulaire.

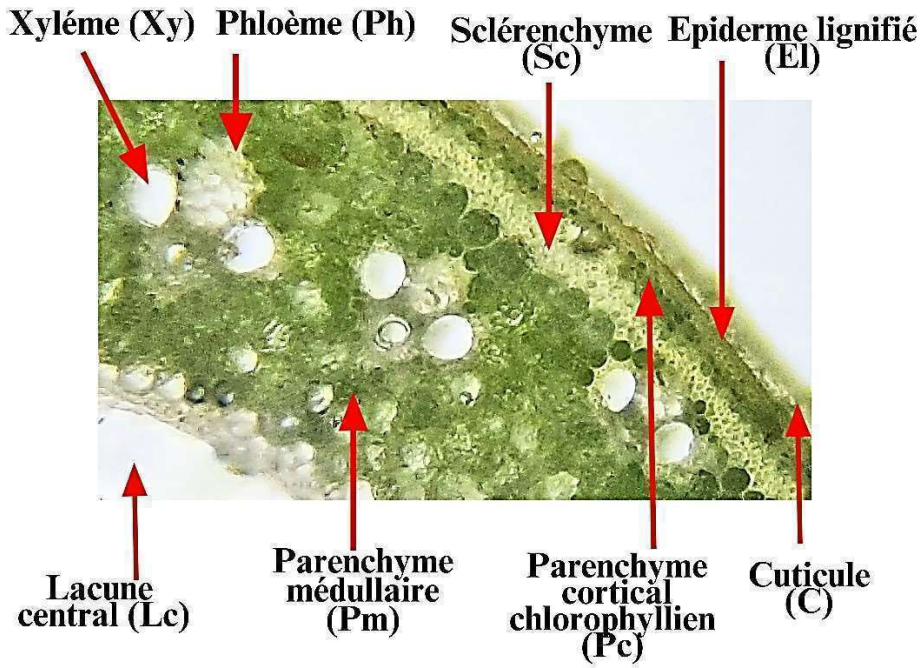


Fig. 53 : Section transversale de tige de *Phragmites australis* du groupe témoin (x80).

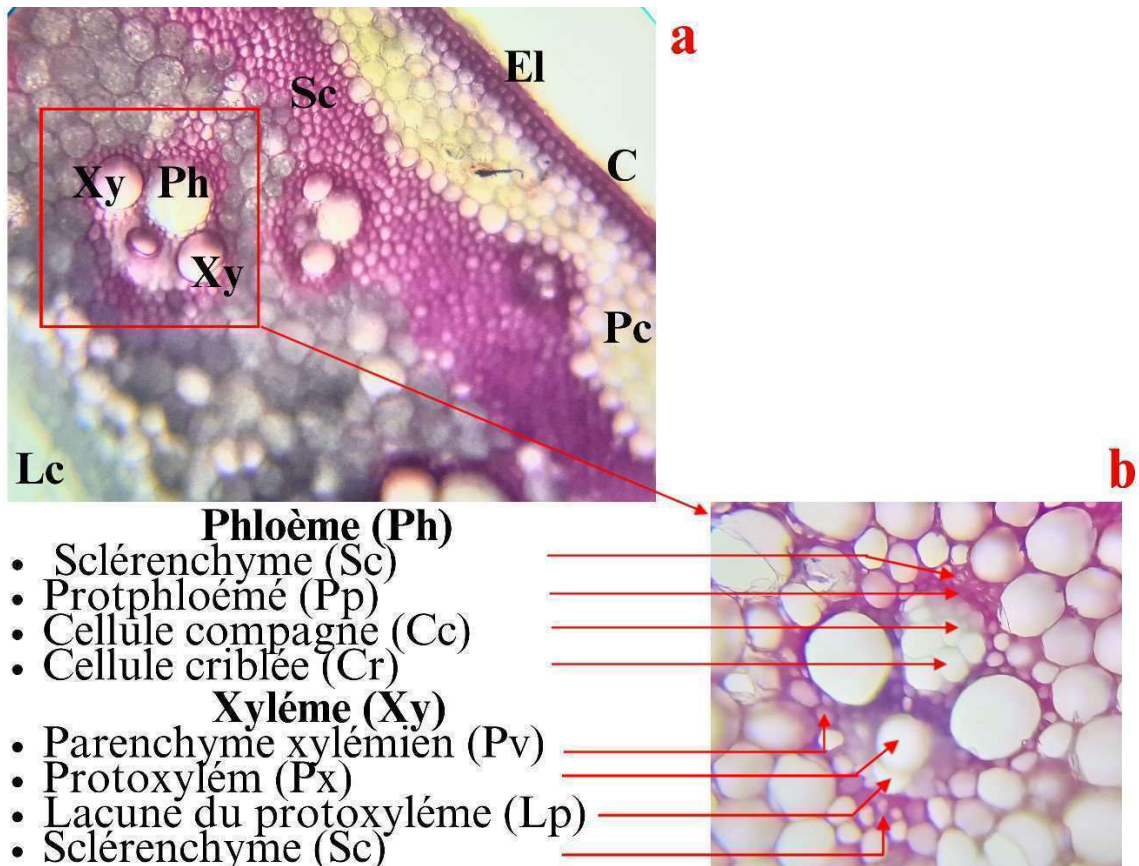


Fig. 54 : Section transversale de tige de *Phragmites australis* du groupe témoin colorée au phloroglucinol-HCl (x80).

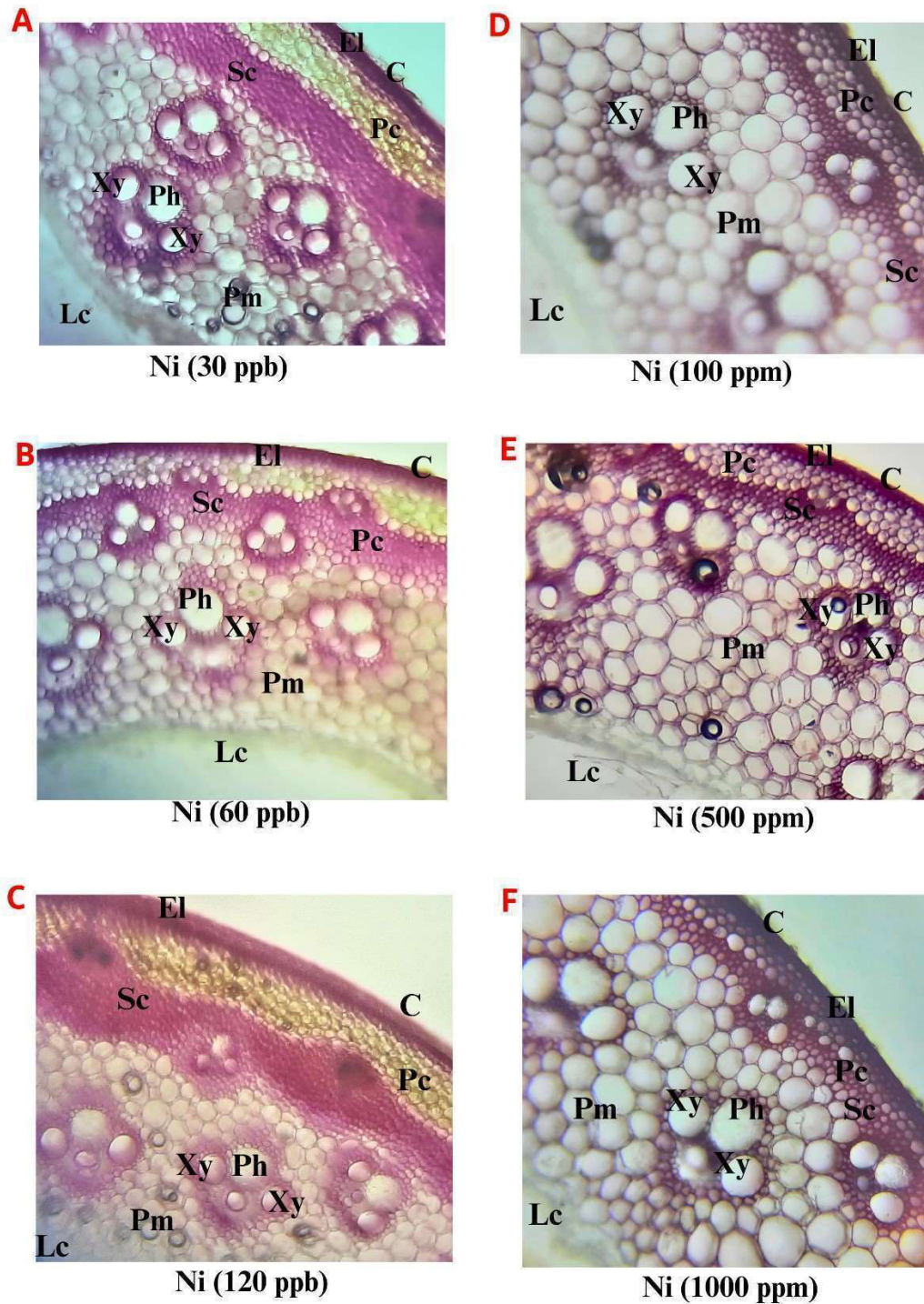


Fig 55 : Sections transversales de tiges de *Phragmites australis* exposées à différentes doses de Ni : (A) 30 ppb, (B) 60 ppb, (C) 120 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).

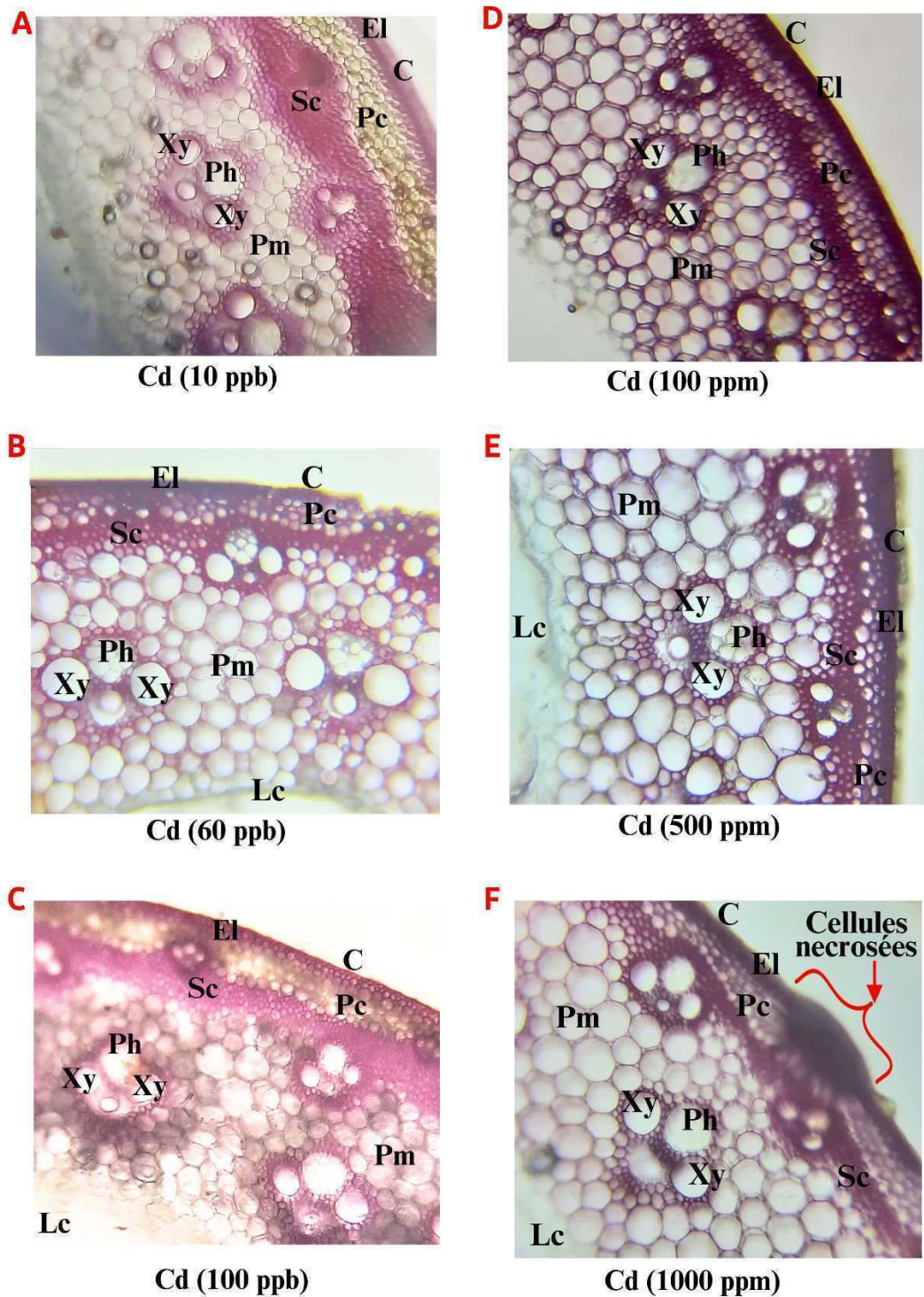
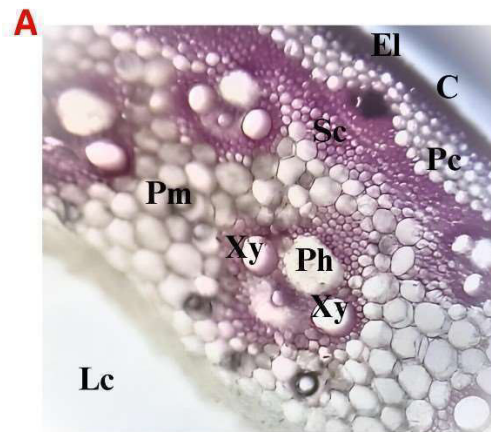
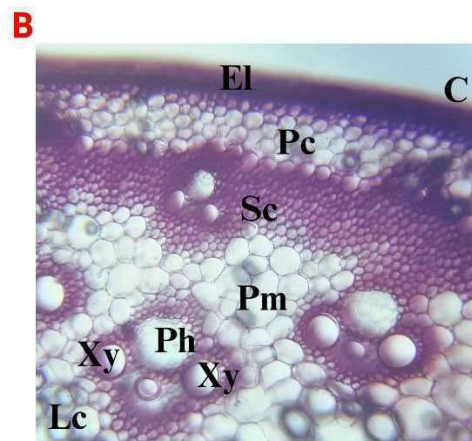


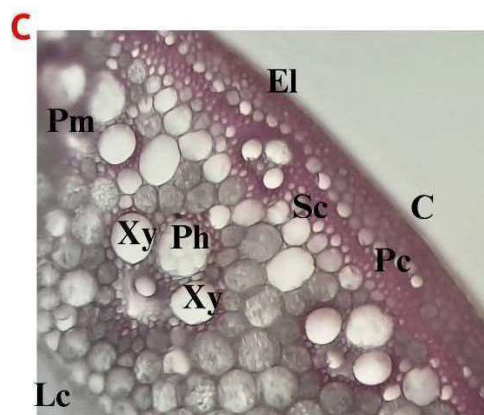
Fig 56 : Sections transversales de tiges de *Phragmites australis* exposées à différentes doses de Cd : (A) 10 ppb, (B) 30 ppb, (C) 100 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80).



Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm)



Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm)



Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb)

Fig 57 : Sections transversales de tiges de *Phragmites australis* exposées à différentes doses mixtes de Cd et Ni : (A) Cd (100 ppm)+Ni (100 ppm), (B) Cd (100 ppb)+Ni (1000 ppm), (C) Cd (1000 ppm)+Ni (120 ppb), colorées au phloroglucinol-HCl (x80).

2.3 Effet de doses simples et combinée de Cd et de Ni sur l'histologie de la racine

L'observation des coupes transversales de racines des plantes exposées à des doses individuelles et combinées de Cd et/ou de Ni (Fig. 60-62), après coloration au phloroglucinol-HCl, a révélé que la lignification des tissus dépendait de la dose et de l'ETM appliqué.

Contrairement aux coupes de feuilles, et de manière similaire aux coupes de tiges, l'exposition aux faibles doses de Cd et de Ni n'a pas induit de changement majeur au niveau de la lignification dans les principaux tissus racinaires : rhizoderme (Rd), épiderme (Ep), exoderme (Ex), parenchyme cortical aérifère (Pa), endoderme (Ed), phloème (Ph), xylème (Xy) et moelle (M). La différence de réponse entre les organes de *P. australis* pourrait être liée au système de défense et aux fonctions spécifiques de chaque organe. Les racines, étant en contact direct avec le Cd et Ni, pourraient avoir des mécanismes plus importants pour neutraliser les effets des faibles doses d'ETM.

Sous les faibles doses de Cd et/ou Ni (Fig. 60-61 : A, B et C), l'examen des coupes histologiques a montré que les racines sont constituées d'un rhizoderme ou d'une assise pilifère (épiderme et poils absorbants), les parois de l'épiderme ne semblent pas être lignifiées. Un exoderme, composé de trois rangées de cellules, présente une couche interne fortement lignifiée. À l'intérieur, on trouve un parenchyme cortical aérifère à parois minces, non coloré, avec des aérénchymes (canaux d'air intercellulaires). L'endoderme a également été coloré en rouge. Cette couche, qui contrôle le passage de l'eau et des solutés vers la stèle ou le cylindre central, est constituée de cellules étroitement regroupées. Elle régule le passage de l'eau et des minéraux vers le xylème grâce à la bande de Caspary. Les vaisseaux conducteurs de phloème et de xylème présentent des parois lignifiées, entourés de protophloèmes et métaphloèmes, ainsi que de protoxylèmes et métaxylèmes, qui semblent non lignifiés ou très discrètement lignifiés. Le centre de la moelle, qui sert au stockage des nutriments, ne semble pas lignifié sous de faibles doses, ni dans les racines du groupe témoin. Ces résultats sont très similaires à ceux observés par Soukup *et al.* (2002) dans les racines des plantes de *P. australis* ayant poussé dans un milieu non pollué, ainsi que par Minkina *et al.* (2018) chez *P. australis* en présence de 200 ppb de Cd et de 41 ppm de Ni.

L'analyse des coupes sous les fortes doses de Cd et Ni (100, 500 et 1000 ppm) (Fig. 60-61 : D, E et F), a montré que la structure, la coloration et par conséquent la lignification des tissus racinaires étaient dose-dépendante et ETM-dépendante.

L'épaisseur du rhizoderme (non lignifier) apparaît similaire entre Cd (100 ppm) et Ni (100 ppm), mais devenait plus épais sous Cd (500 ppm) et Cd (1000 ppm) comparé à Ni (500 ppm) et Ni (1000 ppm). Cela suggère que l'épaississement observé n'est pas dû à un dépôt de lignine, mais pourrait

impliquer d'autres modifications cellulaires. D'après Yadav *et al.* (2021), en présence des ETMs, les changements les plus courants dans les racines incluent des modifications de la paroi cellulaire et une imprégnation par des métabolites secondaires, en particulier dans les tissus périphériques (rhizoderme, exoderme et endoderme), qui sont en contact direct avec les polluants. Guo *et al.* (2021) ont montré que l'épaississement du rhizoderme contribue à la fixation du Cd et minimise sa pénétration dans les tissus internes des racines. L'épaississement du rhizoderme n'est pas seulement associé à une lignification, mais également à des changements dans la composition des polysaccharides, en particulier dans la méthylation de la pectine (Guo *et al.*, 2021; Krzesłowska *et al.*, 2016). L'épaississement plus prononcé du rhizoderme chez *P. australis* sous Cd (500 ppm et 1000 ppm) comparé au Ni aux mêmes doses, indique une réponse adaptative spécifique au Cd, visant à limiter son absorption et sa translocation vers les parties aériennes de la plante plus sensibles.

Dans la présente étude, le fait que le rhizoderme des racines de *P. australis* reste non lignifié pourrait permettre une meilleure flexibilité dans l'absorption sélective des nutriments tout en limitant l'entrée de Cd et Ni. Cela permet également de modifier la composition lipidique ou protéique des parois, ainsi qu'une elongation cellulaire continue. Chez les plantes soumises à un stress par le Cd, la lignification agit de manière paradoxale en offrant une protection à la plante tout en pouvant entraver la croissance des racines si elle se produit dans les zones d'elongation (Finger-Teixeira *et al.*, 2010). Par ailleurs, une comparaison des arbres de mangrove en fonction de leur sensibilité aux ETMs comme le plomb (Pb), le zinc (Zn) et le cuivre (Cu) a révélé que les espèces les plus tolérantes à ces éléments présentaient une lignification plus importante au niveau des extrémités des racines, loin de la zone d'elongation (Cheng *et al.*, 2014). Si l'exoderme ne semble pas montrer de différence de lignification pariétale, les parois des cellules du parenchyme cortical aérifère des racines de *P. australis* étaient plus lignifiées que celles des plantes témoins et sous les faibles doses de Cd et Ni. Ces cellules du parenchyme cortical aérifère étaient plus lignifiées sous 100 ppm de Cd que sous Ni, et cette différence s'accroissait davantage à 500 et 1000 ppm.

Ederli *et al.* (2004) ont montré que *P. australis* pouvait séquestrer le Cd à l'intérieur des cellules du parenchyme cortical aérifère, restreignant ainsi sa translocation vers le cylindre vasculaire, puis vers la tige et les feuilles. L'examen des sections de racines par microscopie électronique n'a pas révélé de modifications structurelles ou ultra-structurelles significatives induites par le Cd. Cependant, la localisation histochimique du Cd a révélé une accumulation dans les cellules du parenchyme cortical aérifère, situées sous l'exoderme. Dans la présente étude, l'endoderme, le phloème (protophloèmes et métaphloèmes), le xylème (protoxylèmes et

métaxylèmes) et la moelle présentaient également une lignification plus importante que celle observée dans les racines des plantes témoins et sous les faibles doses. Cette lignification était plus intense sous Cd (100, 500 et 1000 ppm) que sous les doses équivalentes de Ni. Cette lignification importante sous les hautes doses constitue une réponse défensive de *P. australis* face au stress induit par le Cd et le Ni. Elle renforce les parois cellulaires, créant une barrière physique qui peut limiter l'absorption et la translocation vers les parties aériennes. Plusieurs travaux ont montré des réponses similaires dans les parois des différents tissus racinaires de *P. australis* ; sous une salinité de 16 g/L (Holmes *et al.*, 2016). Sous 100 μ M de Cd (Ederli *et al.*, 2004), ainsi que dans des eaux contenant 8,6 ppm de Cd et 152 ppm de Ni (Minkina *et al.*, 2018). Concernant l'effet des doses mixtes sur les cellules racinaires, la lignification sous Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppm) (fig. 62-C) et Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm) (fig. 62-B) était similaire à celle obtenue respectivement sous Cd (1000 ppm) et Ni (1000 ppm) seuls. Cependant, la dose mixte Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm) (fig. 62-A) a entraîné un épaississement légèrement supérieur du rhizoderme dans certaines coupes, comparativement à celui observé sous Cd (100 ppm) et Ni (100 ppm) seuls. L'augmentation de l'épaisseur du rhizoderme sous la dose mixte indique que *P. australis* adapte sa réponse en fonction de la quantité et du type d'ETM présents dans l'eau. Cette réponse, plus marquée que sous les doses individuelles, pourrait suggérer que la combinaison des deux ETM à cette dose (100 ppm) a provoqué un stress plus élevé. Effectivement, nos résultats sur l'accumulation de Cd et Ni sous la dose mixte (Fig. 25-28) montrent que l'accumulation a été supérieure à celle observée sous les doses individuelles. Cette augmentation de l'épaisseur du rhizoderme pourrait constituer la première étape de défense avant la lignification des parois des cellules du parenchyme cortical aérifère, qui a été observée sous 500 et 1000 ppm de Cd et Ni.

À côté des changements dans la composition des polysaccharides et de la pectine dans les racines, le stress dû aux ETMs chez les plantes déclenche d'autres réponses défensives, notamment la formation de dépôts de subérine (nature lipidique agit comme une barrière) dans les parois cellulaires des racines. Des études sur les racines de maïs et de soja exposées au plomb, au cadmium et à l'arsenic ont révélé des schémas de dépôt de subérine spécifiques aux ETM et à leur dose (Piršlová *et al.*, 2012). Dans les racines de radis, le stress dû au cuivre a induit la formation d'un dépôt apical subéro-lignifié près de l'extrémité de la racine, associé à une différenciation du xylème (Kováč *et al.*, 2018). Cheng *et al.* (2014) ont démontré que les espèces ayant une tolérance plus élevée aux ETMs présentaient un rhizoderme et un exoderme plus épais avec une lignification et une subérisation accrues, suggérant qu'un exoderme lignifié/subérisé à l'entrée des ETMs, améliorant ainsi la tolérance.

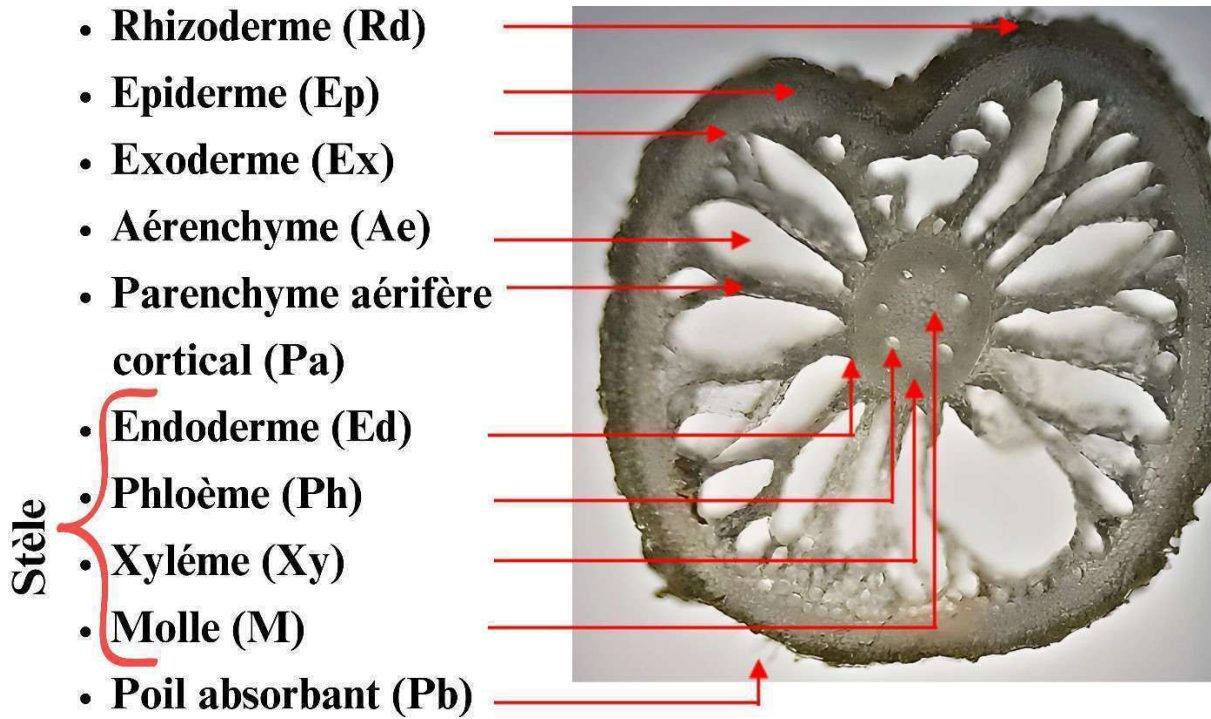


Fig. 58: Section transversale de racine de *Phragmites australis* du groupe témoin (x80)



Fig. 59 : Section transversale de racine de *Phragmites australis* du groupe témoin colorée au phloroglucinol-HCl (x80).

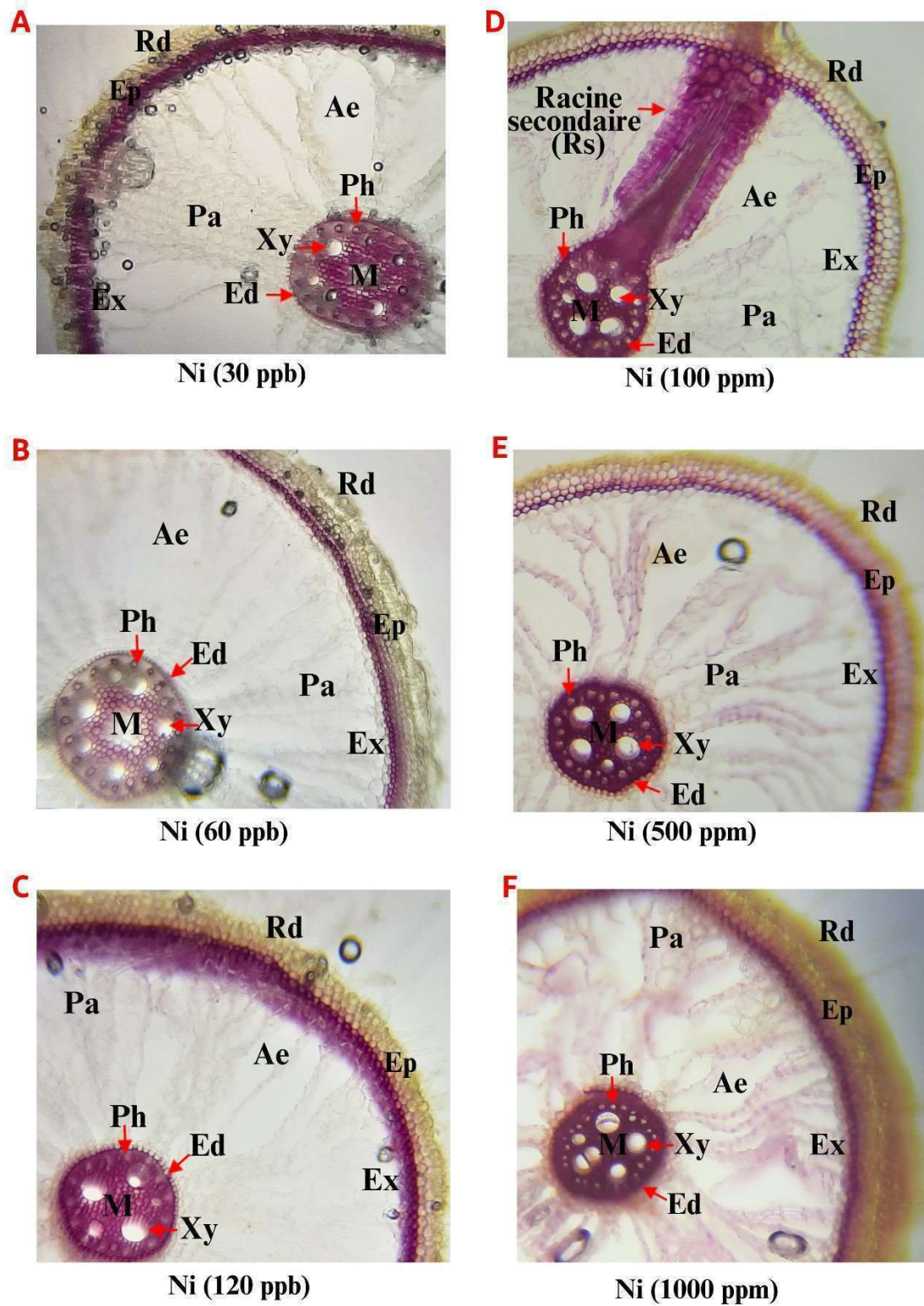


Fig 60 : Sections transversales de tiges de *Phragmites australis* exposées à différentes doses de Cd : (A) 10 ppb, (B) 30 ppb, (C) 100 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80)

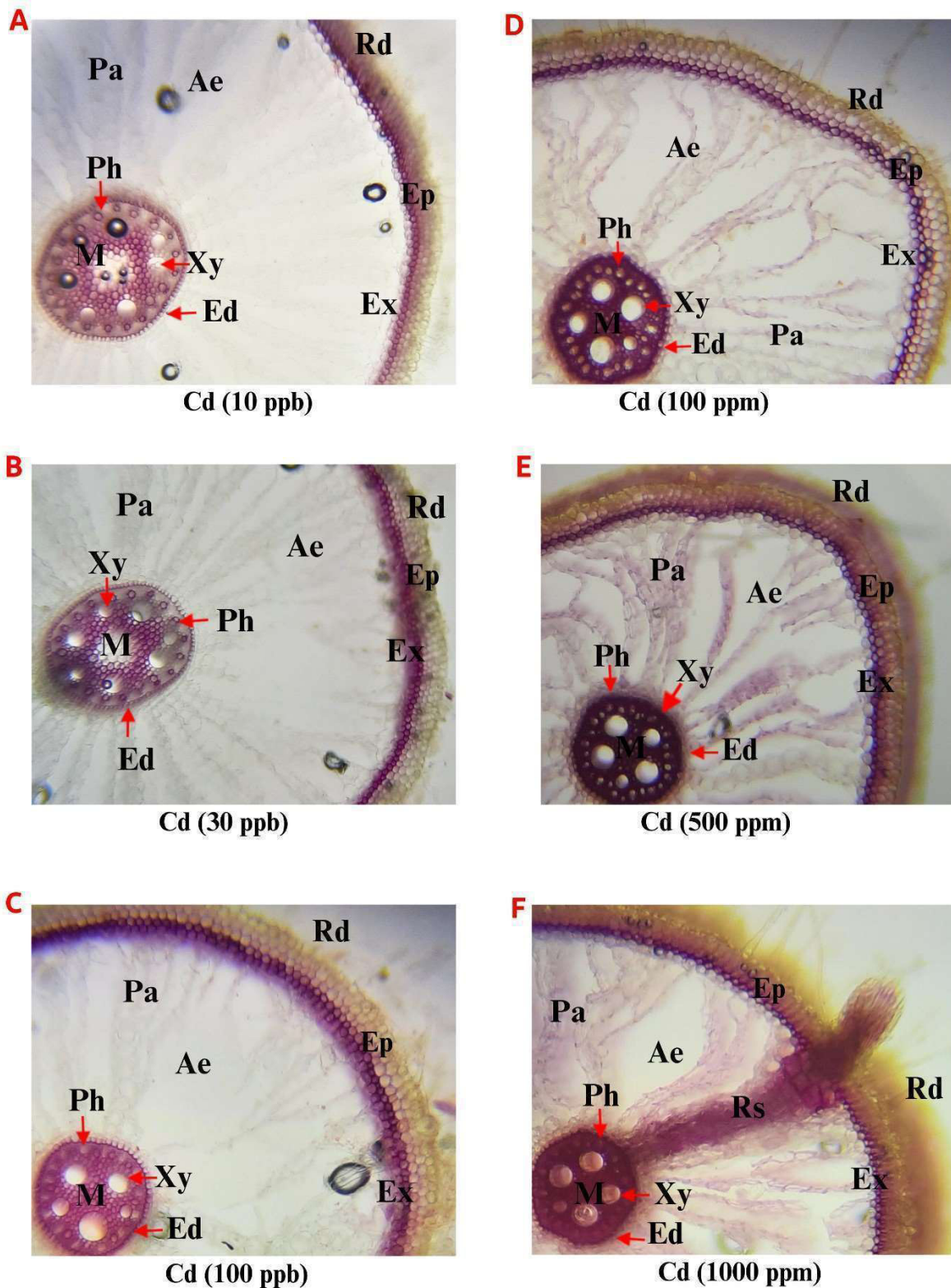
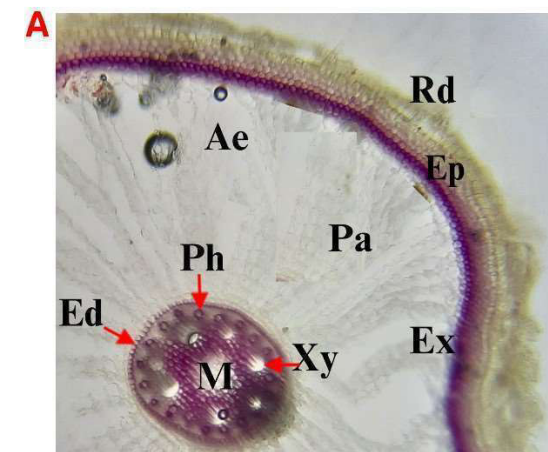
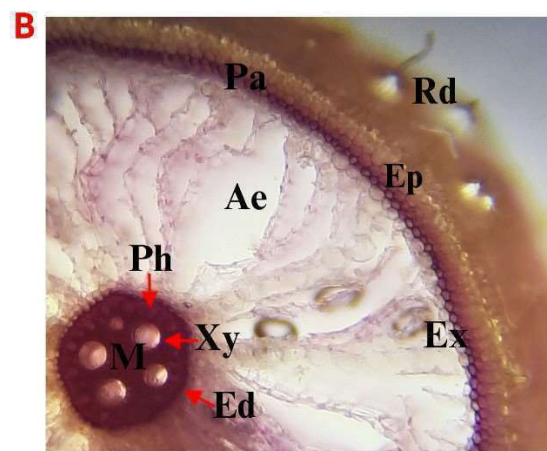


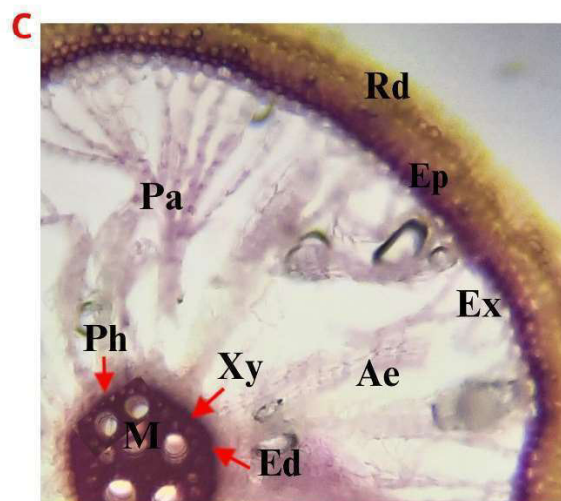
Fig 61 : Sections transversales de racines de *Phragmites australis* exposées à différentes doses de Cd : (A) 10 ppb, (B) 30 ppb, (C) 100 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm, colorées au phloroglucinol-HCl (x80)



Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm)



Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm)



Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb)

Fig 62 : Sections transversales de racines de *Phragmites australis* exposées à différentes doses mixtes de Cd et Ni : (A) Cd (100 ppm)+Ni (100 ppm), (B) Cd (100 ppb)+Ni (1000 ppm), (C) Cd (1000 ppm)+Ni (120 ppb), colorées au phloroglucinol-HCl (x80).

2.4 Effet de doses simples et combinée de Cd et de Ni sur l'ultrastructure de la racine

L'espèce *P. australis* est une plante non accumulatrice et plutôt une plante dite "excluser". Elle accumule davantage les ETMs comme le Cd et le Ni dans les tissus racinaires que dans les autres organes, ce qui a été confirmé par notre étude (chapitre III). Une stratégie d'exclusion est adoptée pour minimiser la translocation du Cd et du Ni de la racine vers les parties aériennes, plus sensibles. Afin d'observer plus en détail les racines, nous avons utilisé la microscopie électronique à balayage (MEB) pour identifier et analyser les changements ultrastructuraux dans les racines des plants exposés à différentes doses de Cd et/ou de Ni.

L'observation des coupes transversales de racines des plantes exposées à des doses individuelles et combinées de Cd et/ou de Ni a révélé des changements dans les tissus, dépendant de la dose et de l'ETM appliqué

En comparaison avec les racines des plantes témoins (Fig. 63), les observations révèlent que la densité et le diamètre des poils absorbants varient en fonction de la dose et de l'ETM testé. Globalement, nous avons constaté que la densité des poils absorbants était plus élevée sous l'effet du Ni que du Cd. Pour le Cd (Fig. 64), la densité des poils absorbants augmente dans les racines des plantes soumises à 10 ; 30 et 100 ppb, aussi à 100 ppm, puis diminue à 500 ppm et 1000 ppm, mais le diamètre a augmenté sous ces deux doses. De façon similaire pour le Ni (Fig. 65), nous avons observé une augmentation de la densité avec l'augmentation des doses testées, mais l'augmentation du diamètre des poils absorbants n'a été constatée qu'à 1000 ppm de Ni. Concernant les traitements mixtes Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) et Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm), aucun changement significatif n'a été observé par rapport aux fortes doses individuelles de Cd (1000 ppm) et Ni (1000 ppm). Cependant, sous le traitement mixte Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm), la densité et la longueur des poils absorbants étaient plus proches de celles observées sous Ni (100 ppm) que sous Cd (100 ppm).

Les variations observées dans la densité et le diamètre des poils absorbants en réponse au Cd et/ou au Ni indiquent que *P. australis* modifie ces paramètres pour contrôler et réguler l'entrée du Cd et du Ni. Plusieurs travaux ont montré que le Cd, à des concentrations spécifiques, inhibe la croissance des racines mais augmente la densité et la longueur des poils absorbants, comme chez le radis (Vitória *et al.*, 2003), l'orge (Đurčėková *et al.*, 2007), le sorgho (Kuriakose et Prasad, 2008) et la graminée *Chloris gayana* (Kopittke *et al.*, 2010). Bahmani *et al.* (2016) ont observé que sous 20 μM de CdSO_4 , et 10 μM de AsNaO_2 , le nombre et la longueur des poils racinaires dans les 5 mm apicaux de la racine ont augmenté. Sous Ni également, Lin *et al.* (2016), ont observé que les plantes de *Hordeum vulgare* cultivées en culture aquatique présentaient des poils absorbants racinaires plus longs que celles cultivées dans le sable où

le Ni est moins disponible. Selon Takeda *et al.* (2008), à certaines doses, les ETMs comme le Cd augmentent l'allongement des poils racinaires en stimulant la production de ERO, ce qui active l'élongation des cellules des poils racinaires. Cette hypothèse est soutenue par d'autres travaux qui ont associé l'augmentation de la densité des poils absorbants dans les racines et la production des ERO comme sous l'effet du Cu (Pasternak *et al.*, 2005) et du Cr (Castro *et al.*, 2007). Les poils racinaires sont des excroissances tubulaires de cellules épidermiques qui augmentent la surface racinaire et rendent ainsi la racine plus efficace pour absorber l'eau et les nutriments. Leur expansion et croissance se déroulerait de manière pulsatoire contrôlée par les ERO apoplastiques et de Ca^{2+} cytoplasmique (Hocq *et al.*, 2017; Stéger et Palmgren, 2022). Les ERO contrôlent l'extensibilité et le relâchement de la paroi cellulaire. Une augmentation de la concentration apoplastique de H_2O_2 affecte la paroi cellulaire en oxydant les composés de celle-ci, modifiant ainsi leur degré de relâchement (Velasquez *et al.*, 2011). Les ions Ca^{2+} fonctionnent comme messagers secondaires, des niveaux élevés de Ca^{2+} déclenchent l'exocytose des vésicules et ainsi la délivrance du matériau de construction de l'apex du poil absorbant en croissance (Campanoni et Blatt, 2007).

Dans la présente étude, on peut déduire que l'augmentation de la densité des poils absorbants observée sous les doses de Cd et de Ni peut être attribuée à l'effet stimulant des ERO. À des doses plus élevées (500 ppm de Cd et 1000 ppm de Ni), la production d'ERO dépasse probablement la capacité antioxydante de *P. australis*. Ce déséquilibre conduit à un stress oxydatif qui endommage les parois, les membranes et les protéines racinaires, ce qui explique la diminution de l'émergence de nouveaux poils absorbants à ces concentrations élevées. Face à la réduction du nombre de poils absorbants, *P. australis* augmente leur diamètre pour maintenir une certaine capacité d'absorption de l'eau et des nutriments, ou potentiellement augmenter la capacité de stockage du Cd et du Ni dans les vacuoles des cellules des poils absorbants. L'augmentation de l'épaisseur du rhizoderme constatée dans les racines exposées à de fortes doses de Cd et de Ni pourrait être due aux dépôts d'exsudats ou même à des cellules mortes des poils absorbants ou de l'épiderme. Fageria and Moreira (2011) ont montré que les dépôts tels que les exsudats racinaires, les mucilages et les cellules mortes, peuvent augmenter l'épaisseur du rhizoderme des racines.

Sous les faibles doses individuelles ne semblent pas affecter le xylème, le phloème, les aerenchymes, l'endoderme et les tissus du parenchyme cortical. En revanche, avec l'augmentation des doses Cd et Ni (100, 500 et 1000 ppm) (Fig. 64 et 65 : D, E et F) et Cd (100 ppm) + Ni (100 ppm), Cd (100 ppb) + Ni (1000 ppm) et Cd (1000 ppm) + Ni (120 ppb) (Fig. 66 : A, B et C), on constate une diminution du diamètre du xylème à toutes les doses, sauf

à 1000 ppm de Cd.

Concernant l'aérenchyme et le parenchyme cortical, l'augmentation des doses de Cd et de Ni augmente le diamètre de l'aérenchyme tout en réduisant la taille du parenchyme cortical. Une autre particularité a été observée sous Cd 1000 ppm, comparativement à Ni 1000 ppm : une déformation de la forme cylindrique des racines, ainsi qu'une augmentation de la taille du xylème et des cellules de l'endoderme. D'après Pandey *et al.* (2022), l'effet des ETMs sur les structures cellulaires racinaires des plantes dépend de plusieurs facteurs, notamment l'espèce, le type d'ETM et sa dose. Les travaux de Krzesłowska *et al.* (2019) ont montré que les ETMs peuvent provoquer des altérations significatives de l'architecture racinaire et de l'ultrastructure cellulaire. Ces changements incluent une réduction de la taille de l'apex racinaire, un positionnement anormal du tissu vasculaire et un effondrement interne des tissus. Au niveau cellulaire, les plantes peuvent développer des réponses défensives, telles qu'une augmentation de l'épaisseur de la paroi cellulaire et des épaissements locaux, afin d'améliorer leur capacité à séquestrer les ETMs (Hamim *et al.*, 2018; Krzesłowska *et al.*, 2019).

Dans la présente étude, la diminution du diamètre du xylème observée en présence des doses élevées de Cd et/ou Ni (sauf pour 1000 ppm de Cd) pourrait être une réponse adaptative visant à réduire le transport du Cd et Ni vers les parties aériennes de la plante. Cette réduction pourrait aussi être le résultat d'une inhibition de la différenciation des cellules du xylème due au stress métallique. L'augmentation du diamètre des aérenchymes et la réduction du parenchyme cortical avec l'accroissement des doses de Cd et Ni pourrait être une réponse de *P. australis* pour réduire la densité et le volume ou la surface des tissus racinaires exposés aux Cd et Ni. Ce qui pourrait diminuer la pénétration de ces deux ETMs à la stèle et la concentration de Cd et/ou Ni dans le cortex racinaire et la racine. Des résultats similaires ont été observés dans les racines de *Cicer arietinum*, qui ont montré une réduction de la taille et du nombre des vaisseaux du xylème sous l'effet de l'exposition au Cd (Liza *et al.*, 2020).

Pita-Barbosa *et al.* (2015) ont également enregistré une réduction du diamètre des vaisseaux du xylème, accompagnée d'une augmentation du rapport cylindre vasculaire/diamètre de la racine dans les racines de *Cajanus cajan* traitées avec de l'As à $1,5 \text{ mg L}^{-1}$. Concernant la déformation de la racine, l'augmentation de la taille du xylème et des cellules de l'endoderme suggèrent que le Cd à forte dose (1000 ppm) provoque des perturbations sévères du développement racinaire. Ces altérations tissulaires pourraient être dues à une destruction totale de ces tissus, causée par une production excessive d'ERO. Cette surproduction dépasse largement la capacité du système antioxydant des racines de *P. australis*, conduisant à un stress oxydatif sévère. L'augmentation de la taille du xylème et des cellules de l'endoderme pourrait également être une réponse

compensatoire de la plante, visant à maintenir le transport d'eau et de nutriments malgré les dommages aux autres tissus. Une expansion cellulaire anormale due à la perte de contrôle de la turgescence cellulaire ou à des perturbations du cytosquelette causées par le stress oxydatif.

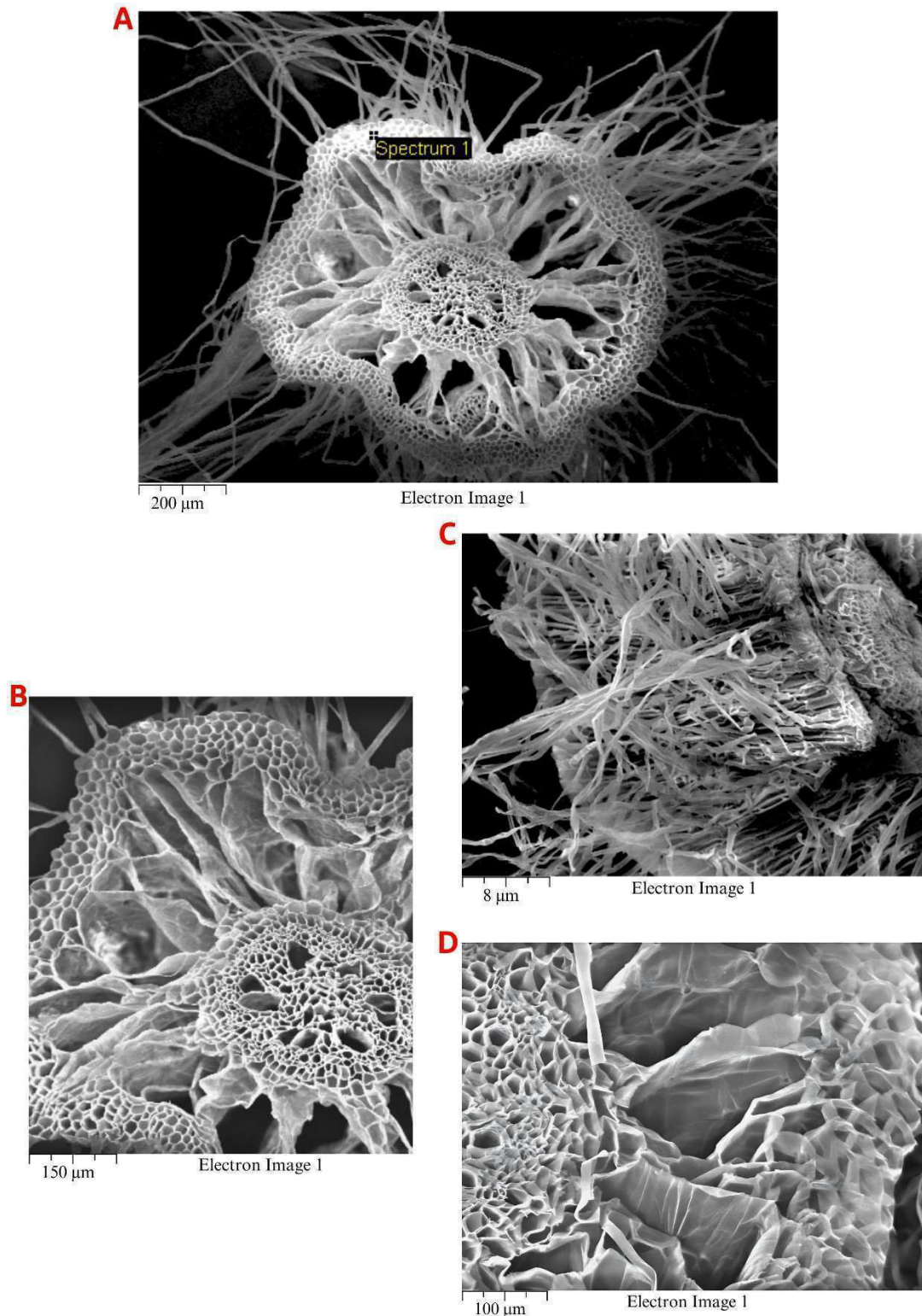


Fig. 63 : Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des coupes transversales d'une racine témoin. (A) et (B) vue d'ensemble de la racine. (C) poils absorbants. (D) Détail de l'aérenchyme.

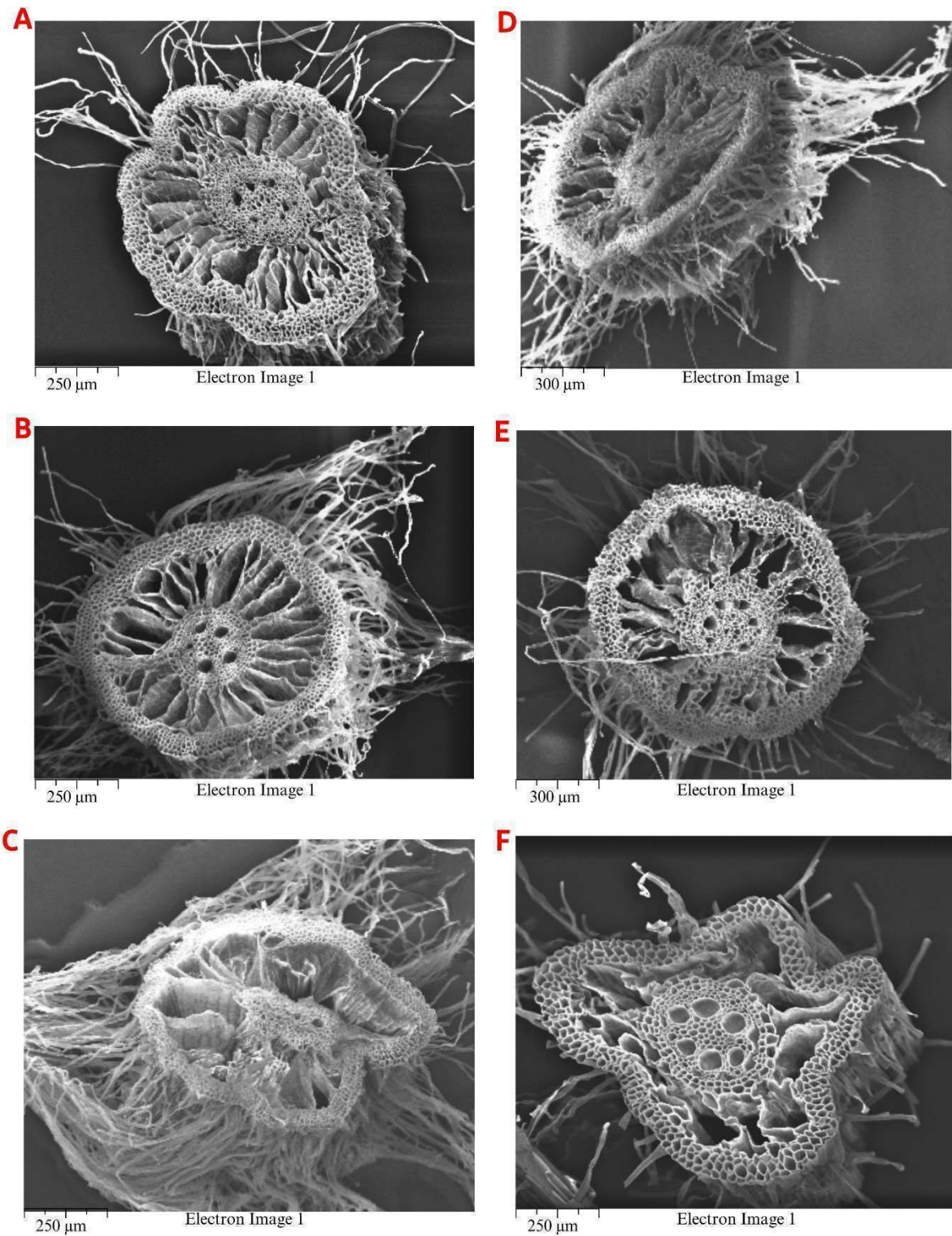


Fig. 64 : Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des coupes transversales des racines de *P. australis* exposées à différentes doses de Cd : (A) 10 ppb, (B) 30 ppb, (C) 100 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm.

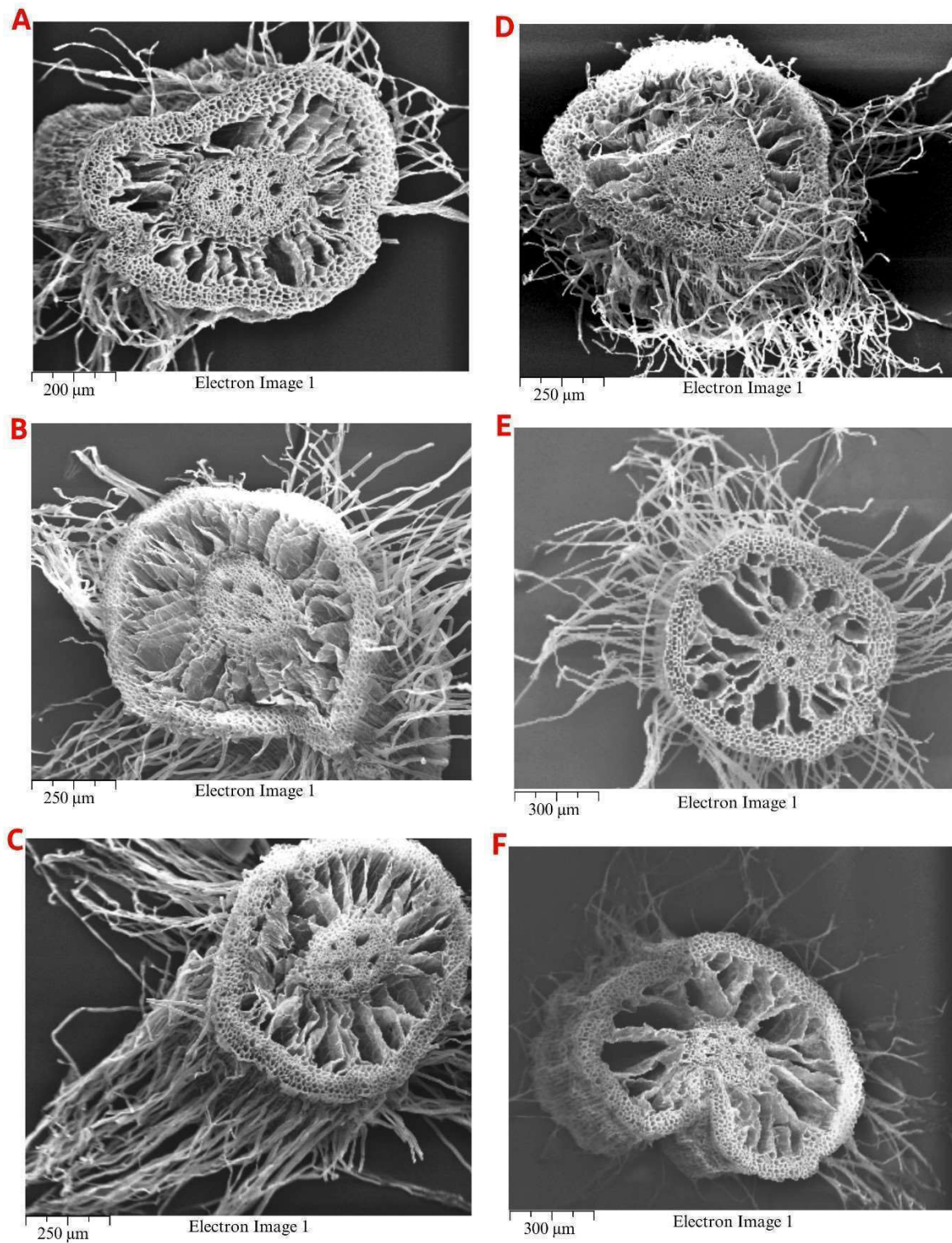


Fig. 65 : Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des coupes transversales des racines de *P. australis* exposées à différentes doses de Ni : (A) 30 ppb, (B) 60 ppb, (C) 120 ppb, (D) 100 ppm, (E) 500 ppm, (F) 1000 ppm.

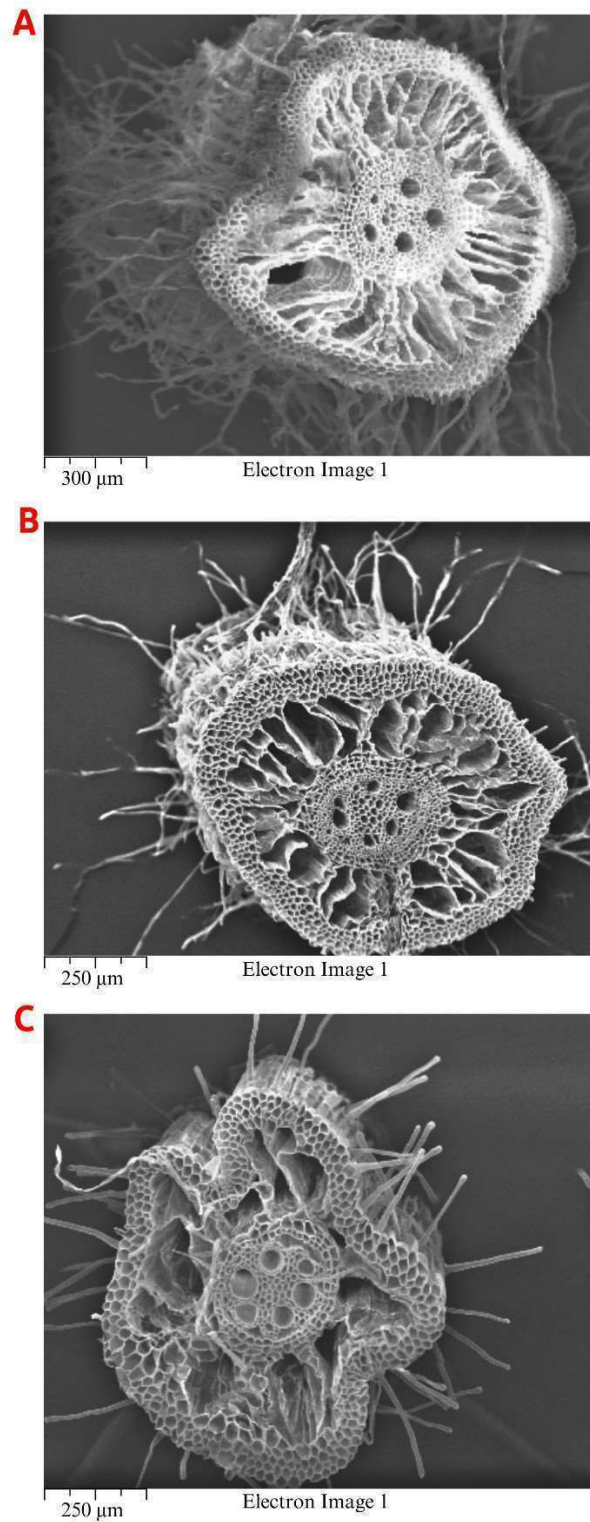


Fig. 66 : Observation au microscope électronique à balayage (MEB) des coupes transversales des racines de *P. australis* exposées à différentes doses mixtes de Cd et Ni : (A) Cd (100 ppm)+ Ni (100 ppm), (B) Cd (100 ppb)+Ni (1000 ppm), (C) Cd (1000 ppm)+Ni (120 ppb)

3 Conclusion

Cette étude a examiné les effets des doses simples et combinées du Cd et/ou du Ni sur l'anatomie des feuilles, des tiges et des racines de *P. australis*. Les observations histologiques effectuées sur des coupes transversales, en utilisant la coloration au phloroglucinol-HCl (réaction de Wiesner), ont révélé plusieurs modifications anatomiques significatives, en fonction de la dose et de l'ETM testé. L'observation au microscope électronique à balayage (MEB) des coupes transversales des tissus racinaires des plantes exposées à différentes doses simples et combinées de Cd et/ou de Ni a montré également des modifications ultrastructurales, particulièrement sous l'effet des doses de Cd et des fortes doses de Cd et de Ni. Ces altérations anatomiques peuvent indiquer des effets toxiques significatifs sur l'organisation tissulaire des racines.

Selon l'indication de la coloration par le phloroglucinol-HCl, les faibles doses de Ni (10, 30, 100 ppb) n'ont pas provoqué de modifications notables par rapport au groupe témoin, préservant ainsi l'intégrité des tissus essentiels. Aucune coloration n'a été observée dans les parois des cellules de l'épiderme supérieur (adaxial : Ed) et inférieur (abaxial : Eb), ni dans le parenchyme palissadique, lacuneux, xylème ou phloème. La seule différence constatée est une coloration rouge très discrète du sclérenchyme, qui assure le soutien structural des vaisseaux conducteurs. En revanche, les faibles doses de Cd, notamment Cd_(60 ppb) et Cd_(100 ppb), ont montré des effets plus marqués. On a observé une légère décoloration des cellules du parenchyme palissadique et lacuneux, indiquant une perturbation de la photosynthèse. En plus, une coloration rougeâtre plus prononcée des tissus phloémiens suggère un dépôt de lignine. Contrairement aux feuilles, l'analyse des tiges de *P. australis* exposées aux faibles doses de Cd et Ni a montré peu de changements. À faibles doses, la coloration des parois cellulaires reste similaire au groupe témoin, témoignant d'une résilience des tissus caulinaires, probablement liée à leur structure naturellement lignifiée. Un Maintien d'une coloration rouge-pourpre normale dans tous les tissus : l'épiderme lignifié (El), le parenchyme cortical chlorophyllien (Pc), le parenchyme médullaire (Pm), sclérenchyme (Sc), le phloème (Ph) et les vaisseaux du xylème (Xy).

Contrairement aux feuilles, et de manière similaire aux tiges, l'exposition aux faibles doses de Cd et de Ni n'a pas induit de changement majeur au niveau de la lignification dans les principaux tissus racinaires : rhizoderme (Rd), épiderme (Ep), exoderme (Ex), parenchyme cortical aérifère (Pa), endoderme (Ed), phloème (Ph), xylème (Xy) et moelle (M). Selon l'indication de la coloration par le phloroglucinol-HCl des tissus racinaires, à faibles doses les racines n'ont montré que peu ou pas de changement dans la lignification des tissus

principaux. Cela indique que les racines possèdent des mécanismes de défense efficaces pour neutraliser les effets des faibles doses d'ETM.

Globalement, les faibles doses de Cd et de Ni n'ont pas entraîné une lignification importante des parois cellulaires dans les trois organes, sauf dans les feuilles sous les faibles doses de Cd (60 ppb et 100 ppb). Où une légère décoloration des cellules du parenchyme palissadique et lacuneux a été observée, indiquant une perturbation dans le processus de photosynthèse.

Cependant, à des doses élevées de Cd et de Ni (100, 500, 1000 ppm), des symptômes de chlorose plus prononcés ont été observés, indiquant une altération des processus photosynthétiques ainsi que des modifications ultrastructurales des chloroplastes. En plus, une modification de la lignification des tissus a également été constatée, comparativement aux faibles doses.

Dans les feuilles des plantes exposées à 100 ppm de Cd et de Ni, une augmentation de la lignification a été notée au niveau des sclérenchymes. En revanche, à des doses plus élevées de Cd et de Ni (500 et 1000 ppm), l'intensité de cette lignification et de la coloration rouge s'est atténuée, indiquant une diminution de la lignification dans ces conditions de stress métallique plus sévère, due à une toxicité excessive. La coloration histochemique des différents tissus vasculaires conducteurs (xylème, phloème) des feuilles a révélé des variations d'intensité en fonction des doses de Cd et de Ni appliquées. Sous Cd (100 ppm), Ni (100 ppm) et Ni (500 ppm), une forte lignification des parois cellulaires peut être attribuée à un mécanisme de défense visant à renforcer ces parois. Cela permet de limiter la translocation du Cd et de Ni vers les tissus parenchymateux et d'augmenter la rigidité des tissus pour maintenir l'intégrité structurelle des cellules.

En revanche, à Cd (500 et 1000 ppm) et Ni (1000 ppm), une diminution de l'intensité de coloration a été constatée, suggérant une réduction de la lignification. Cela pourrait être dû à une toxicité excessive qui perturbe les processus de biosynthèse de la lignine.

Dans les tiges exposées à de fortes doses de Cd et Ni (100, 500 et 1000 ppm), une intensification de la coloration a été observée, notamment dans le parenchyme cortical et médullaire, indiquant un enrichissement en lignine. Les doses élevées ont également provoqué des nécroses au niveau de l'épiderme, particulièrement sous Cd (500 et 1000 ppm), tandis que l'impact du Ni semble être moindre. Ainsi, les tiges apparaissent plus résistantes que les feuilles, suggérant des mécanismes de défense plus robustes contre les stress métalliques.

À des doses élevées (100, 500 et 1000 ppm), une réponse dose-dépendante a été observée, avec une augmentation de la lignification dans divers tissus racinaires. L'épaisseur du rhizoderme a augmenté, particulièrement sous l'effet du Cd, ce qui pourrait indiquer une adaptation morphologique pour limiter l'absorption de Ni et de Cd.

L'épaississement du rhizoderme pourrait être dû à des changements dans la composition des polysaccharides, notamment la méthylation de la pectine, qui jouent un rôle crucial dans la séquestration du Cd et du Ni. Ces adaptations limitent la translocation des métaux vers les parties aériennes de la plante, contribuant ainsi à la protection contre la toxicité métallique.

Conclusion générale

L'évaluation des effets des doses simples et combinées du Cd et/ou du Ni sur la germination, la croissance précoce et la réponse enzymatique antioxydante de *Phragmites australis* par six indices (GP%, MGT, T50%, IG, RLI, PLI) a démontré que la germination est possible sous toutes les doses testées, mais avec des effets négatifs dose-dépendants.

Toutes les doses testées de Cd et/ou Ni ont eu un impact négatif sur le taux et la vitesse de germination des graines. À l'exception des faibles doses de Ni (30, 60 et 120 ppb) qui ont produit un effet légèrement positif, contrastant avec les effets inhibiteurs observés pour le Cd (10, 60 et 120 ppb). Bien que les faibles doses de Ni aient montré un effet légèrement stimulateur, le Cd a systématiquement produit des effets inhibiteurs.

La croissance des plantules a présenté une sensibilité différentielle, où les racines et les pousses ont réagi différemment selon l'ETM et sa dose. Les résultats ont mis en évidence que le Cd exerce un effet inhibiteur sur la germination et la croissance plus prononcé que celui du Ni, et ce, même à faibles doses. De plus, la durée d'exposition s'est avérée être un facteur primordial, les effets toxiques des deux ETMs se manifestant de manière plus marquée après 30 jours d'exposition comparativement à 10 ou 20 jours d'exposition.

Les interactions entre le Cd et le Ni ont montré des effets complexes. À doses égales (Cd = Ni = 100 ppm), un effet synergique négatif sur les caractéristiques de germination a été observé, tandis que les autres combinaisons : Cd_(100 ppb) + Ni_(1000 ppm) et Cd_(1000 ppm) + Ni_(120 ppb), ont révélé des effets antagonistes, suggérant des interactions complexes entre les deux ETM. La réponse enzymatique antioxydante a démontré une adaptation au stress métallique, avec une stimulation de l'activité des enzymes (CAT, GPX, GST), particulièrement sous fortes doses. Cette réponse s'est avérée plus importante dans les racines que dans les parties aériennes.

Il en ressort que les jeunes pousses de *P. australis* issues des graines possèdent une certaine tolérance aux stress métalliques, mais celle-ci dépend fortement des concentrations, de la durée d'exposition et du type d'ETM. L'espèce montre une plus grande sensibilité au Cd qu'au Ni, ce qui correspond à leurs rôles biologiques respectifs (le Ni étant un oligoélément alors que le Cd est un métal non essentiel).

En dépit de la réduction du taux de germination et de la croissance précoce des plantules, les jeunes pousses de *P. australis* ont montré qu'elles pouvaient moduler leur système antioxydant et neutraliser les effets du Cd et du Ni. Cela démontre que cette espèce pourrait se propager et se régénérer par reproduction sexuée dans les marais filtrants ou dans les habitats contaminés par le Ni et/ou le Cd.

L'étude de l'efficacité épuratoire de notre marais filtrant expérimental à écoulement surfacique à trois étages, planté de *P. australis* a révélé des résultats significatifs. Alors que les faibles doses de Cd et Ni n'ont pas affecté la néoformation de plantules, les doses élevées ont montré des effets inhibiteurs importants, avec des diminutions allant de 41% à 75% selon les doses. Comme chez les jeunes pousses issues de graines, les plantules provenant de rhizomes ont montré également que le Cd est plus toxique que le Ni, probablement en raison de sa forte interférence avec l'absorption d'eau et de l'induction d'un stress oxydatif plus intense.

L'efficacité épuratoire de notre marais filtrant expérimental s'est améliorée progressivement de l'entrée vers la sortie du marais (étage 3 > étage 2 > étage 1), phénomène attribué à la réduction progressive des concentrations métalliques et à l'augmentation de la température favorisant la solubilité et la phytodisponibilité des métaux. La modélisation de la spéciation chimique a montré une prédominance des formes ioniques libres (CdCl^+ , Cd^{2+} et Ni^{2+}), avec le Ni présentant une plus grande proportion de son espèce libre Ni^{2+} , expliquant son taux d'élimination supérieur à celui du Cd.

Malgré les effets toxiques, *P. australis* a démontré une résilience remarquable, maintenant un niveau minimal de régénération et assurant des taux d'abattement significatifs : 52-59% pour Cd ($_{100 \text{ ppm}}$), 22-25% pour Cd ($_{1000 \text{ ppm}}$), 48-63% pour Ni ($_{100 \text{ ppm}}$) et 35-37% pour Ni ($_{1000 \text{ ppm}}$), confirmant ainsi son potentiel pour la phytoremédiation des eaux contaminées.

L'étude des effets du cadmium et/ou du nickel sur les paramètres métaboliques et enzymatiques de *P. australis* révèle une réponse complexe et modulée. Face au stress métallique, la plante présente une diminution significative de la teneur en chlorophylle, particulièrement marquée sous l'effet du Cd (75% de réduction à 1000 ppm) comparativement au Ni (66% à 1000 ppm), reflétant la toxicité supérieure du Cd.

Les teneurs en protéines et lipides montrent également une sensibilité différentielle selon les organes et les doses, avec une tendance à l'augmentation sous faibles doses de Ni (démontrant son rôle de micronutriment) et une diminution significative sous fortes doses des deux ETMs. Le système antioxydant (CAT, GPOx et GST) répond de manière dose-dépendante, avec une activation plus prononcée dans les racines suivant le gradient : racines > feuilles > tiges.

L'analyse des corrélations entre métabolites et enzymes révèle des interactions complexes variant selon les organes et les doses, notamment un effet protecteur des faibles doses de Ni sur la biosynthèse chlorophyllienne et une co-régulation différenciée des enzymes antioxydantes selon les tissus. Les doses mixtes montrent des interactions particulières, avec un effet antagoniste partiel lorsque de faibles doses sont combinées aux fortes doses, suggérant

l'activation de mécanismes de défense complémentaires. Cette modulation fine des réponses métaboliques et enzymatiques démontre la capacité adaptative de *P. australis* face au stress métallique.

L'étude histologique des effets du cadmium et du nickel sur l'anatomie de *P. australis* révèle une réponse tissulaire différentielle selon les organes et les doses de Cd et de Ni. Sous faibles doses, le Ni n'induit pas de modifications notables, préservant l'intégrité tissulaire, tandis que le Cd provoque déjà des perturbations légères, notamment une décoloration du parenchyme foliaire et une lignification accrue des tissus phloémiens. À fortes doses (100-1000 ppm), les modifications anatomiques deviennent plus prononcées, avec une réponse biphasique de la lignification : une augmentation initiale à 100 ppm, interprétée comme un mécanisme de défense, suivie d'une diminution à 500-1000 ppm, suggérant une toxicité excessive perturbant la biosynthèse de la lignine.

Les tiges montrent une plus grande résilience que les feuilles, avec une intensification de la lignification du parenchyme cortical et médullaire sous fortes doses. Les racines présentent des adaptations spécifiques, notamment un épaississement du rhizoderme, particulièrement marqué sous l'effet du Cd, constituant probablement une barrière protectrice contre l'absorption excessive de Cd et de Ni. Ces modifications anatomiques reflètent la plasticité adaptative de *P. australis* face au stress métallique, avec des réponses tissulaires spécifiques selon l'organe et l'intensité du stress.

À l'issue de ce travail et au vu des résultats obtenus, *P. australis* démontre une capacité remarquable à moduler son métabolisme, son anatomie et sa physiologie face aux différentes doses simples et combinées de Cd et de Ni. L'espèce ajuste son système antioxydant pour neutraliser les effets toxiques. De plus, elle développe des adaptations anatomiques et des modifications de la lignification en réponse aux stress métalliques. Ces résultats soulignent le potentiel de cette espèce pour son utilisation dans les marais filtrants et les systèmes de lagunage plantés, où elle pourrait jouer un rôle crucial dans la phytoépuration des eaux contaminées par les ETMs. L'intégration de *P. australis* dans ces systèmes pourrait améliorer l'efficacité de l'élimination des ETMs, tout en favorisant la biodiversité et la santé des écosystèmes aquatiques.

Globalement, cette étude contribue à une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation de *P. australis* aux stress métalliques et ouvre des perspectives pour l'optimisation des stratégies de phytoremédiation dans les écosystèmes aquatiques contaminés

Références bibliographiques

- Abrahams, P. (2002). Soils: their implications to human health. *Science of the Total Environment*, 291(1-3), 1-32. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(01\)01102-0](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(01)01102-0)
- Adriano, D. C. (2001). *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals*. Springer Science & Business Media.
- Agency, U. E. P. (2012). Guidelines for water reuse, Anchorage, EPA/600/R-12/004, USEPA Office of Wastewater Management, Washington, United States.
- Agency, U. S. E. P. (2000). Wastewater technology fact sheet wetlands: subsurface flow. In (Vol. EPA 832-F-00-023, pp. 9). Washington, D.C: USEPA Washington.
- Agriculture, U. S. D. o. (2009). National Engineering Handbook, Chapter 3, “Constructed Wetlands Part 637.
- Ahmad, I. Z., et al. (2017). Effects of Different Metal Stresses on the Antioxidant Defense Systems of Medicinal Plants. In M. I. R. Khan & N. A. Khan (Eds.), *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress* (pp. 215-256). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5254-5_9
- Ahmad, M. S. A., & Ashraf, M. (2011). Essential Roles and Hazardous Effects of Nickel in Plants. In D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 125-167). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0668-6_6
- Ahmad, P., et al. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(3), 161-175. <https://doi.org/10.3109/07388550903524243>
- Ait Ali, N., et al. (2004). Tolerance and bioaccumulation of cadmium by *Phragmites australis* grown in the presence of elevated concentrations of cadmium, copper, and zinc. *Aquatic Botany*, 80(3), 163-176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2004.08.008>
- Al-Haddad, A., et al. (2015). Optimum soil depth for removal of coliphage viruses from treated wastewater, Kuwait. *Desalination and Water Treatment*, 53(10), 2727-2731. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.869662>
- Al-Sodany, Y. M., et al. (2013). Elements Accumulation and Nutritive Value of *Phragmites Australis* (Cav.) Trin. Ex Steudel in Lake Burullus : A Ramsar Site , Egypt.
- Albert, A., et al. (2015). Strategies for a successful plant invasion: the reproduction of *Phragmites australis* in north-eastern North America. *Journal of Ecology*, 103(6), 1529-1537. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1365-2745.12473>
- Aleya, L., et al. (2007). Coupling of Abiotic and Biotic Parameters to Evaluate Performance of Combining Natural Lagooning and Use of Two Sand Filters in the Treatment of Landfill Leachates. *Environmental Technology*, 28(2), 225-234. <https://doi.org/10.1080/09593332808618785>
- Alfadul, S. M. S., & Al-Fredan, M. A. A. (2013). Effects of Cd, Cu, Pb, and Zn Combinations on *Phragmites australis* Metabolism, Metal Accumulation and Distribution. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 38(1), 11-19. <https://doi.org/10.1007/s13369-012-0393-0>
- Algérienne, J. O. d. l. R. (2006). *Décret n ° 06-141 correspondant au 19 avril 2006 réglémentant les rejets d'effluents liquides et industriels, vol 26 du 23-04-2006. Secrétariat Général du Gouvernement. Algérie*
- Algérienne, J. O. d. l. R. (2012). *Arrêté interministériel : fixant les spécifications des eaux usées épurées utilisées à des fins d'irrigation. vol 41 du 15-07-2012. Secrétariat Général du Gouvernement. Algérie*
- Ali, B., et al. (2015). Deteriorative Effects of Cadmium Stress on Antioxidant System and Cellular Structure in Germinating Seeds of *Brassica napus* L. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(1), 63-74. <http://jast.modares.ac.ir/article-23-313-en.html>
- Ali, H., et al. (2019). Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 2019, 6730305. <https://doi.org/10.1155/2019/6730305>
- Ali, S., et al. (2020). Application of Floating Aquatic Plants in Phytoremediation of Heavy Metals Polluted Water: A Review. *Sustainability*, 12(5), 1927. <https://www.mdpi.com/2071-1050/12/5/1927>

- Alshahri, F. (2017). Heavy metal contamination in sand and sediments near to disposal site of reject brine from desalination plant, Arabian Gulf: Assessment of environmental pollution. *Environ Sci Pollut Res Int*, 24(2), 1821-1831. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7961-x>
- Amari, T., et al. (2014). Comparative Ni tolerance and accumulation potentials between *Mesembryanthemum crystallinum* (halophyte) and *Brassica juncea*: Metal accumulation, nutrient status and photosynthetic activity. *Journal of Plant Physiology*, 171(17), 1634-1644. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.020>
- Ameen, N., et al. (2019). Biogeochemical behavior of nickel under different abiotic stresses: toxicity and detoxification mechanisms in plants. *Environ Sci Pollut Res Int*, 26(11), 10496-10514. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04540-4>
- Amenhyd. (2012). *Epuration des eaux usées par lagunage*. <https://www.amenhyd.com/epuration-des-usees-par-lagunage/#>
- Amin, A., et al. (2013). Bioremediation of different waste waters-a review. *Continental Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7(2), 7.
- Amjad, M., et al. (2020). Nickel Toxicity Induced Changes in Nutrient Dynamics and Antioxidant Profiling in Two Maize (*Zea mays* L.) Hybrids. *Plants*, 9(1), 5. <https://www.mdpi.com/2223-7747/9/1/5>
- Anand, S., et al. (2019). Phytoremediation of Heavy Metals and Pesticides Present in Water Using Aquatic Macrophytes. In N. K. Arora & N. Kumar (Eds.), *Phyto and Rhizo Remediation* (pp. 89-119). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-32-9664-0_4
- Ananda, J. (2019). Explaining the environmental efficiency of drinking water and wastewater utilities. *Sustainable Production and Consumption*, 17, 188-195.
- Angelakis, A. N., & Snyder, S. A. (2015). Wastewater Treatment and Reuse: Past, Present, and Future. *Water*, 7(9), 4887-4895. <https://www.mdpi.com/2073-4441/7/9/4887>
- Anjum, M., et al. (2016). Wastewater sludge stabilization using pre-treatment methods. *Process Safety and Environmental Protection*, 102, 615-632. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psep.2016.05.022>
- Anning, A. K., et al. (2013). Phytoremediation of wastewater with *Limnocharis flava*, *Thalia geniculata* and *Typha latifolia* in constructed wetlands. *International Journal of Phytoremediation*, 15(5), 452-464. <https://doi.org/10.1080/15226514.2012.716098>
- Anwar, S., et al. (2021). Effect of cadmium stress on seed germination, plant growth and hydrolyzing enzymes activities in mungbean seedlings. *Journal of Seed Science*, 43.
- AOSA. (1983). Association of Official Seed Analysts (AOSA). 1983. Seed vigor testing handbook Contribution No. 32. Association of Official Seed Analysts 88.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Aqeel, M., et al. (2021). Elucidating the distinct interactive impact of cadmium and nickel on growth, photosynthesis, metal-homeostasis, and yield responses of mung bean (*Vigna radiata* L.) varieties. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(21), 27376-27390. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12579-5>
- Armstrong, J., & Armstrong, W. (2001). An overview of the effects of phytotoxins on *Phragmites australis* in relation to die-back. *Aquatic Botany*, 69(2), 251-268. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3770\(01\)00142-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3770(01)00142-5)
- Arora, A., et al. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, 82(10), 1227-1238. <http://www.jstor.org/stable/24107045>
- Ashraf, M. Y., et al. (2011). Toxic Effect of Nickel (Ni) on Growth and Metabolism in Germinating Seeds of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biological Trace Element Research*, 143(3), 1695-1703. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-8955-7>
- Astel, A., et al. (2014). An assessment of metals content in *Phragmites australis* (cav.) Trin. Ex steudel grown in natural water reservoirs according to climate zone and salinity. *Desalination and Water Treatment*, 52(19-21), 3928-3937. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.887491>
- Atma, W., et al. (2017). Evaluation of the phytoremediation potential of *Arundo donax* L. for nickel-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 19(4), 377-386. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1225291>

- Atta, N., et al. (2024). Proline-mediated redox regulation in wheat for mitigating nickel-induced stress and soil decontamination. *Sci Rep*, 14(1), 456. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50576-5>
- Atta, N., et al. (2024). Proline-mediated redox regulation in wheat for mitigating nickel-induced stress and soil decontamination. *Scientific Reports*, 14(1), 456. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-50576-5>
- Ayala, A., et al. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Baccouch, S., et al. (2001). NICKEL TOXICITY INDUCES OXIDATIVE DAMAGE IN ZEA MAYS ROOTS. *Journal of Plant Nutrition*, 24(7), 1085-1097. <https://doi.org/10.1081/PLN-100103805>
- Bacha, H., et al. (2017). Impact of salt stress on morpho-physiological and biochemical parameters of *Solanum lycopersicum* cv. Microtom leaves. *South African Journal of Botany*, 108, 364-369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.08.018>
- Badawy, I. H., et al. (2022). Alleviation of Cadmium and Nickel Toxicity and Phyto-Stimulation of Tomato Plant L. by Endophytic *Micrococcus luteus* and *Enterobacter cloacae*. *Plants (Basel)*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/plants11152018>
- Baderna, D., et al. (2015). Acute phytotoxicity of seven metals alone and in mixture: Are Italian soil threshold concentrations suitable for plant protection? *Environmental Research*, 140, 102-111. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.03.023>
- Baechler, L. (2012). La bonne gestion de l'eau : un enjeu majeur du développement durable. *L'Europe en Formation*, 365(3), 3-21. <https://doi.org/10.3917/eufor.365.0003>
- Bahmani, R., et al. (2016). The Density and Length of Root Hairs Are Enhanced in Response to Cadmium and Arsenic by Modulating Gene Expressions Involved in Fate Determination and Morphogenesis of Root Hairs in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci*, 7, 1763. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01763>
- Bai, C., et al. (2013). Nickel affects xylem Sap RNase a and converts RNase A to a urease. *BMC Plant Biology*, 13, 207. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-207>
- Bai, C., et al. (2006). Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. *Plant Physiology*, 140(2), 433-443. <https://doi.org/10.1104/pp.105.072983>
- Barbafieri, M. (2000). The Importance of Nickel Phytoavailable Chemical Species Characterization in Soil for Phytoremediation Applicability. *International Journal of Phytoremediation*, 2(2), 105-115. <https://doi.org/10.1080/15226510008500033>
- Barbier, R. (2009). Le buveur d'eau et le recyclage des eaux usées. *Espaces et sociétés*, 139(4), 107-121. <https://doi.org/10.3917/esp.139.0107>
- Barceló, A. R., et al. (2004). Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? *Phytochemistry Reviews*, 3(1), 61-78. <https://doi.org/10.1023/B:PHYT.0000047803.49815.1a>
- Barka, S. (2012). Contribution of X-ray spectroscopy to marine ecotoxicology: Trace metal bioaccumulation and detoxification in marine invertebrates. In *Ecotoxicology*. InTech.
- Bart, D., & Hartman, J. M. (2002). Environmental constraints on early establishment of *Phragmites Australis* in salt marshes. *Wetlands*, 22(2), 201-213. [https://doi.org/10.1672/0277-5212\(2002\)022\[0201:ECOEEO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1672/0277-5212(2002)022[0201:ECOEEO]2.0.CO;2)
- Bashir, H., et al. (2013). Limited sulfur resource forces *Arabidopsis thaliana* to shift towards non-sulfur tolerance under cadmium stress. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 19-32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.05.004>
- Bashir, H., et al. (2015). Chloroplast and photosystems: Impact of cadmium and iron deficiency. *Photosynthetica*, 53(3), 321-335. <https://doi.org/10.1007/s11099-015-0152-z>
- Begum, W., et al. (2022). A comprehensive review on the sources, essentiality and toxicological profile of nickel. *RSC Adv*, 12(15), 9139-9153. <https://doi.org/10.1039/d2ra00378c>
- Bello, A. O., et al. (2018). Phytoremediation of cadmium-, lead- and nickel-contaminated water by *Phragmites australis* in hydroponic systems. *Ecological Engineering*, 120, 126-133. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.05.035>
- Beltrán, J. M., & Koo-Oshima, S. (2006). Water desalination for agricultural applications. *FAO Land and water discussion paper*, 5, 48.

- Berkelaar, E. J., & Hale, B. A. (2003). Cadmium accumulation by durum wheat roots in ligand-buffered hydroponic culture: uptake of Cd–ligand complexes or enhanced diffusion? *Canadian Journal of Botany*, *81*(7), 755-763. <https://doi.org/10.1139/b03-061>
- Berry, R., 3rd, & López-Martínez, G. (2020). A dose of experimental hormesis: When mild stress protects and improves animal performance. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, *242*, 110658. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110658>
- Bert, V. (2000). *Tolérance aux métaux lourds et accumulation chez Arabidopsis halleri (Brassicaceae)* [Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille1].
- Bhatia, N. P., et al. (2005). A role for nickel in osmotic adjustment in drought-stressed plants of the nickel hyperaccumulator *Stackhousia tryonii* Bailey. *Planta*, *223*(1), 134-139. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0133-8>
- Bilal Hussain, M., et al. (2013). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to nickel stress: A review. *African journal of agricultural research*, *8*, 1596-1602. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.407>
- Bilang, J., & Sturm, A. (1995). Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. *Plant Physiology*, *109*(1), 253-260.
- Blust, R., et al. (1994). Effect of temperature on the uptake of copper by the brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Aquatic Toxicology*, *30*(4), 343-356. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-445X\(94\)00049-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-445X(94)00049-2)
- Boaretto, L. F., et al. (2014). Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry*, *74*, 165-175. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.11.016>
- Böddi, B., et al. (1995). Effect of cadmium on organization and photoreduction of protochlorophyllide in dark-grown leaves and etioplast inner membrane preparations of wheat.
- Bolan, N. S., et al. (2013). Chapter Four - Cadmium Contamination and Its Risk Management in Rice Ecosystems. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 119, pp. 183-273). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407247-3.00004-4>
- Bouchama, K. (2022). Efficiency of Constructed Wetlands and Wastewater Stabilization Ponds for Wastewater Treatment in Northern Algerian Sahara. In A. Stefanakis (Ed.), *Constructed Wetlands for Wastewater Treatment in Hot and Arid Climates* (pp. 21-42). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-031-03600-2_2
- Bouchama, K., et al. (2016). Behavior of *Phragmites australis* (CAV.) Trin. Ex Steud used in phytoremediation of wastewater contaminated by cadmium. *Desalination and Water Treatment*, *57*(12), 5325-5330. <https://doi.org/10.1080/19443994.2015.1022001>
- Bourrelier, P.-H., et al. (1998). *Contamination des sols par les éléments en traces: les risques et leur gestion: [organisé par l'Académie des sciences, 11 mai 1998]*. Tec & Doc.
- Boutin, C., et al. (2018). Ouvrages de traitement par lagunage naturel. Filière classique et filières combinées. Guide d'exploitation. In.
- Boutin, C., et al. (2007). Les filtres plantés de roseaux, le lagunage naturel et leurs associations: comment? pourquoi? In *Cemagref, UR Qualité des eaux et prévention des pollutions*
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Briat, J. F., & Lebrun, M. (1999). Plant responses to metal toxicity. *C R Acad Sci III*, *322*(1), 43-54. [https://doi.org/10.1016/s0764-4469\(99\)80016-x](https://doi.org/10.1016/s0764-4469(99)80016-x)
- Brisson, J. (2014). Roseau commun : le Dr Jekyll et Mr Hyde du monde végétal Institut de recherche en biologie végétale, Québec, Canada, 71. .
- Brooks, R. R. (1994). Plants that hyperaccumulate heavy metals. *Plants and the chemical elements: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity*, 87-105.
- Bruch, I., et al. (2011). Improving the treatment efficiency of constructed wetlands with zeolite-containing filter sands. *Bioresource Technology*, *102*(2), 937-941. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.041>

- Brzezowski, P., et al. (2015). Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1847(9), 968-985. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.05.007>
- Byrne, R. H., et al. (1988). The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. *Marine Chemistry*, 25(2), 163-181. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203\(88\)90062-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4203(88)90062-X)
- Cakmak, I., & Horst, W. J. (1991). Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83(3), 463-468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x>
- Calabrese, E. J. (2015). Hormesis: principles and applications. *Homeopathy*, 104(2), 69-82. <https://doi.org/10.1016/j.homp.2015.02.007>
- Calabrese, E. J., & Agathokleous, E. (2021). Accumulator plants and hormesis. *Environmental Pollution*, 274, 116526. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116526>
- Calamari, D., & Naeve, H. (1994). *Revue de la pollution dans l'environnement aquatique africain* (Vol. 25). Food & Agriculture Org.
- Calatayud, P.-A., et al. (2013). Adaptation des plantes aux stress environnementaux. *Interactions Insectes-Plantes; Sauvion, N., Calatayud, P.-A., Thiéry, D., Marion-Poll, M., Eds*, 229-245.
- Callahan, D. L., et al. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11(1), 2-12. <https://doi.org/10.1007/s00775-005-0056-7>
- Campanoni, P., & Blatt, M. R. (2007). Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *Journal of Experimental Botany*, 58(1), 65-74. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl059>
- Canadian Environmental Protection. (1994). *Prioloty Substances List Assessment Report, Nickel and its Compounds, Ministry of Supply and Services*
- Cao, Y., et al. (2019). Responses of propagule germination and sexual reproduction of submerged macrophytes exposed to cadmium. *Chemosphere*, 219, 436-443. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.056>
- Carvalho, M. E. A., et al. (2020). Hormesis in plants under Cd exposure: From toxic to beneficial element? *Journal of Hazardous Materials*, 384, 121434. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121434>
- Castro, R. O., et al. (2007). Corrigendum to “Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings” [Plant Sci. 172 (2007) 684–691]. *Plant Science*, 173(1), 71. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.11.021>
- Caussy, D., et al. (2003). Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 45-51. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00049-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00049-6)
- Chaignon, V. (2001). *Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides* Université Paul Cézanne (Aix Marseille 3)]. <https://hal.inrae.fr/tel-02833874>
- Chandra, R., & Yadav, S. (2011). Phytoremediation of Cd, Cr, Cu, Mn, Fe, Ni, Pb and Zn from aqueous solution using *Phragmites cummunis*, *Typha angustifolia* and *Cyperus esculentus*. *International Journal of Phytoremediation*, 13(6), 580-591. <https://doi.org/10.1080/15226514.2010.495258>
- Chang, Y.-T., et al. (2014). Evaluation of Phytoavailability of Heavy Metals to Chinese Cabbage (*Brassica chinensis* L.) in Rural Soils. *The Scientific World Journal*, 2014, 309396. <https://doi.org/10.1155/2014/309396>
- Chaplygin, V., et al. (2022). *Phragmites australis* cav. As a bioindicator of hydromorphic soils pollution with heavy metals and polyaromatic hydrocarbons. *Chemosphere*, 308, 136409. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136409>
- Chen, C., et al. (2009). Functions and Toxicity of Nickel in Plants: Recent Advances and Future Prospects. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 37(4-5), 304-313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/clen.200800199>
- Cheng, H., et al. (2014). Metal (Pb, Zn and Cu) uptake and tolerance by mangroves in relation to root anatomy and lignification/suberization. *Tree Physiol*, 34(6), 646-656. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu042>

- Cherif, J., et al. (2011). Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Environmental Sciences*, 23(5), 837-844. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60415-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60415-9)
- Choubert, J.-M., et al. (2012). Élimination des micropolluants par les stations d'épuration domestiques. *Sciences Eaux & Territoires, Numéro* 9(4), 6-15. <https://doi.org/10.3917/set.009.0003>
- Chowardhara, B., et al. (2020). Differential oxidative stress responses in *Brassica juncea* (L.) Czern and Coss cultivars induced by cadmium at germination and early seedling stage. *Acta physiologiae plantarum*, 42(7), 105. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03094-0>
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88(11), 1707-1719. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>
- Clemens, S., et al. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, 7(7), 309-315. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02295-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02295-1)
- Clemens, S., & Peršoh, D. (2009). Multi-tasking phytochelatase synthases. *Plant Science*, 177(4), 266-271.
- Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, 123(3), 825-832. <https://doi.org/10.1104/pp.123.3.825>
- Côté, I. M., et al. (2016). Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proc Biol Sci*, 283(1824). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2592>
- Cremiato, R., et al. (2018). Environmental impact of municipal solid waste management using Life Cycle Assessment: The effect of anaerobic digestion, materials recovery and secondary fuels production. *Renewable Energy*, 124, 180-188.
- Csiszár, J., et al. (2012). Different peroxidase activities and expression of abiotic stress-related peroxidases in apical root segments of wheat genotypes with different drought stress tolerance under osmotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 119-129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.12.006>
- Cunha, I. L. C., et al. (2021). A Multi-Criteria Decision-Making Approach to Evaluate Different UVC/H₂O₂ Systems in Wastewater Treatment. *Processes*, 9(12), 2252. <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/12/2252>
- Dalton, D. A., et al. (2009). Physiological roles of glutathione s-transferases in soybean root nodules. *Plant Physiology*, 150(1), 521-530. <https://doi.org/10.1104/pp.109.136630>
- Darre, N. C., & Toor, G. S. (2018). Desalination of Water: a Review. *Current Pollution Reports*, 4(2), 104-111. <https://doi.org/10.1007/s40726-018-0085-9>
- Das, A., & Goel, M. (2019). Constructed Wetland: A Green Approach to Handle Wastewater. In C. M. Hussain (Ed.), *Handbook of Environmental Materials Management* (pp. 1445-1468). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73645-7_42
- Das, K., & Roychoudhury, A. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants [Review]. *Frontiers in Environmental Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>
- Das, P., et al. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental Pollution*, 98(1), 29-36. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(97\)00110-3](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(97)00110-3)
- Davidson, R. S., et al. (1995). The reaction of phloroglucinol in the presence of acid with lignin-containing materials. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 91(1), 87-93. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1010-6030\(95\)04101-K](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/1010-6030(95)04101-K)
- Davis, L. (1995). A handbook of constructed wetlands, a guide to creating wetlands for agricultural wastewater, domestic wastewater, coal mine drainage and stormwater in the Mid-Atlantic Region 1, general considerations. *USDA-NRCS, US EPA-Region III, and PA. Department of Environmental Resources*, 53.
- Debele Negewo, B., & Ward, C. S. (2019). *The role of desalination in an increasingly water-scarce world. Technical Paper (English)*. World Bank Group, Washington, D.C.
- Deckert, J. (2005). Cadmium toxicity in plants: is there any analogy to its carcinogenic effect in mammalian cells? *BioMetals*, 18(5), 475-481. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-1245-0>
- Deshwal, N., et al. (2023). A review on recent advancements on removal of harmful metal/metal ions using graphene oxide: Experimental and theoretical approaches. *Science of the Total Environment*, 858, 159672. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159672>

- Desjardins, R. (1997). *Le traitement des eaux*. Presses internationales Polytechnique.
<https://books.google.dz/books?id=i3Jnfi13pQwC>
- Dessai, N. S. P., et al. (2023). Assessment of metal bioavailability in sediments and bioaccumulation in edible bivalves, and phyto-remediation potential of mangrove plants in the tropical (Kali) estuary, India. *Marine Pollution Bulletin*, 194, 115419.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115419>
- Dhir, B. (2013). Aquatic Plant Species and Removal of Contaminants. In B. Dhir (Ed.), *Phytoremediation: Role of Aquatic Plants in Environmental Clean-Up* (pp. 21-50). Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1307-9_2
- Dhir, B., et al. (2009). Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(6), 1790-1797.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.015>
- Dias, M. C., et al. (2013). Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta physiologiae plantarum*, 35(4), 1281-1289. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1167-8>
- Dixit, P., et al. (2011). Glutathione Transferase from *Trichoderma virens* Enhances Cadmium Tolerance without Enhancing Its Accumulation in Transgenic *Nicotiana tabacum*. *PLoS One*, 6(1), e16360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016360>
- Dixon, D., & Edwards, R. (2010). The Arabidopsis Book. *American Society of Plant Biologists*, 8, e0131.
- Doig, L. E., & Liber, K. (2007). Nickel speciation in the presence of different sources and fractions of dissolved organic matter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(2), 169-177.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.12.011>
- Dong, Q., et al. (2019). Silicon Amendment Reduces Soil Cd Availability and Cd Uptake of Two Pennisetum Species. *Int J Environ Res Public Health*, 16(9).
<https://doi.org/10.3390/ijerph16091624>
- Douchkov, D., et al. (2005). Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco. *Plant, Cell & Environment*, 28(3), 365-374. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01273.x>
- Dragišić Maksimović, J., et al. (2008). Peroxidase activity and phenolic compounds content in maize root and leaf apoplast, and their association with growth. *Plant Science*, 175(5), 656-662.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.06.015>
- Du, W., et al. (2017). Composition and Biomass of Aquatic Vegetation in the Poyang Lake, China. *Scientifica*, 2017, 8742480. <https://doi.org/10.1155/2017/8742480>
- Duman, F., & Ozturk, F. (2010). Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of Environmental Sciences*, 22(4), 526-532.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(09\)60137-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1001-0742(09)60137-6)
- Duplay, J., et al. (2014). Copper, zinc, lead and cadmium bioavailability and retention in vineyard soils (Rouffach, France): The impact of cultural practices. *Geoderma*, 230-231, 318-328.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.04.022>
- Đurčeková, K., et al. (2007). Cadmium induces premature xylogenesis in barley roots. *Plant and Soil*, 290(1), 61-68. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9111-6>
- Edeline, F. (1993). *L'épuration biologique des eaux: théorie et technologie des réacteurs*. CEBEDOC éditeur. <https://books.google.dz/books?id=200dAgAACAAJ>
- Ederli, L., et al. (2004). Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. *Physiol Plant*, 121(1), 66-74. <https://doi.org/10.1111/j.0031-9317.2004.00295.x>
- Ellis, R. H. (1981). The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology*, 9, 373-409.
- Elobeid, M., et al. (2012). Cadmium interferes with auxin physiology and lignification in poplar. *Journal of Experimental Botany*, 63(3), 1413-1421. <https://doi.org/10.1093/jxb/err384>
- Engelhardt, K. A., & Ritchie, M. E. (2001). Effects of macrophyte species richness on wetland ecosystem functioning and services. *Nature*, 411(6838), 687-689.
<https://doi.org/10.1038/35079573>

- Englande, A. J., et al. (2015). Wastewater Treatment & Water Reclamation☆. In *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09508-7>
- EPA, U. (1996). US environmental protection agency: ecological effects test guidelines (OPPTS 850.4200): seed/germination/root elongation toxicity test. *US environmental protection agency, Washington, DC*.
- Fageria, N. K., & Moreira, A. (2011). Chapter Four - The Role of Mineral Nutrition on Root Growth of Crop Plants. In D. L. Sparks (Ed.), *Advances in Agronomy* (Vol. 110, pp. 251-331). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385531-2.00004-9>
- FAO. (2020). *La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture 2020. Relever le défi de l'eau dans l'agriculture* (The State of Food and Agriculture (SOFA), Issue. FAO).
- FAO. (2021). *AQUASTAT - FAO's Global Information System on Water and Agriculture*.
- Farooq, M., et al. (2005). Thermal Hardening: A New Seed Vigor Enhancement Tool in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, 47(2), 187-193. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00031.x>
- Fatarna, L., et al. (2017). Impact du cadmium, du zinc et du plomb sur la germination des graines d'Atriplex halimus (Amaranthaceae). *Revue d'Écologie (La Terre et La Vie)*, 61-72.
https://www.persee.fr/doc/revue_0249-7395_2017_num_72_1_1872
- Faulwetter, J. L., et al. (2009). Microbial processes influencing performance of treatment wetlands: A review. *Ecological Engineering*, 35(6), 987-1004.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2008.12.030>
- Fediuc, E., & Erdei, L. (2002). Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity and protective mechanisms induced in Phragmites australis and Typha latifolia. *Journal of Plant Physiology*, 159(3), 265-271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1078/0176-1617-00639>
- Fiala, R., et al. (2015). Dissimilar Responses of Membrane Potential (EM), Permeability Properties and Respiration to Cadmium and Nickel in Maize Root Cells. *Cereal Research Communications*, 43(1), 52-60. <https://doi.org/10.1556/CRC.2014.0021>
- Fiala, R., et al. (2015). Early cadmium-induced effects on reactive oxygen species production, cell viability and membrane electrical potential in grapevine roots. *VITIS-Journal of Grapevine Research*, 54(4), 175-182.
- Fielding, J. L., & Hall, J. (1978). A biochemical and cytochemical study of peroxidase activity in roots of Pisum sativum: II. Distribution of enzymes in relation to root development. *Journal of Experimental Botany*, 29(4), 983-991.
- Finger-Teixeira, A., et al. (2010). Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73(8), 1959-1964. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.08.021>
- Fletcher, J., et al. (2020). Phytoremediation Using Aquatic Plants. In B. R. Shmaefsky (Ed.), *Phytoremediation: In-situ Applications* (pp. 205-260). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-00099-8_7
- Flis, P., et al. (2016). Inventory of metal complexes circulating in plant fluids: a reliable method based on HPLC coupled with dual elemental and high-resolution molecular mass spectrometric detection. *New Phytologist*, 211(3), 1129-1141.
- Flores, C., et al. (2006). Extraction of cadmium from aqueous solutions by emulsion liquid membranes using a stirred transfer cell contactor. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17.
<https://doi.org/10.1590/S0103-50532006000700023>
- Fomina, M. A., et al. (2005). Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 851-866.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.013>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 119(3), 355-364.
- Frank, H., et al. (2017). Short-term effects of SWRO desalination brine on benthic heterotrophic microbial communities. *Desalination*, 417, 52-59.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.desal.2017.04.031>
- Gabert, J., et al. (2010). *Choisir des solutions techniques adaptées pour l'assainissement liquide. Eau et Assainissement pour tous. Guides méthodologiques n°4*.
- Gagnon, V. (2012). Effet de l'espèce de plante en marais filtrants artificiels selon la saison, le type de marais filtrant et la nature des polluants.

- Gahan, P. B. (1984). Plant histochemistry and cytochemistry; an introduction.
- Gajewska, E., et al. (2012). Effect of Nickel on Membrane Integrity, Lipid Peroxidation and Fatty Acid Composition in Wheat Seedlings. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 198(4), 286-294. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-037X.2012.00514.x>
- Gajewska, E., & Skłodowska, M. (2008). Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation. *Plant Growth Regulation*, 54(2), 179-188. <https://doi.org/10.1007/s10725-007-9240-9>
- Gajewska, E., & Skłodowska, M. (2009). Nickel-induced changes in nitrogen metabolism in wheat shoots. *Journal of Plant Physiology*, 166(10), 1034-1044. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.12.004>
- Gajewska, E., et al. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum*, 50(4), 653-659. <https://doi.org/10.1007/s10535-006-0102-5>
- Gao, J., et al. (2020). Identification and characterization of the glutathione S-Transferase (GST) family in radish reveals a likely role in anthocyanin biosynthesis and heavy metal stress tolerance. *Gene*, 743, 144484. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144484>
- Gaussen, H., et al. (1982). *Précis de botanique . Tome II, Végétaux supérieurs* (2e édition revue et augmentée ed.). Masson.
- Gautam, S., & Pandey, S. (2008). Growth and biochemical responses of nickel toxicity on leguminous crop (*Lens esculentum*) grown in alluvial soil. *Res. Environ. Life Sci*, 1, 25-28.
- Georgiadou, E. C., et al. (2018). Influence of Heavy Metals (Ni, Cu, and Zn) on Nitro-Oxidative Stress Responses, Proteome Regulation and Allergen Production in Basil (*Ocimum basilicum* L.) Plants. *Front Plant Sci*, 9, 862. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00862>
- Gérard, É. (2000). *Caractérisation du cadmium phytodisponible des sols par méthodes isotopiques* Vandoeuvre-les-Nancy, INPL].
- Gerendas, J., & Sattelmacher, B. (1999). Influence of Ni Supply on Growth and Nitrogen Metabolism of *Brassica napus* L. Grown with NH₄NO₃ or Urea as N Source. *Annals of Botany*, 83(1), 65-71.
- Ghosh, A., et al. (2016). Presence of unique glyoxalase III proteins in plants indicates the existence of shorter route for methylglyoxal detoxification. *Sci Rep*, 6, 18358. <https://doi.org/10.1038/srep18358>
- Gikas, G. D., et al. (2021). Removal of Emerging Pollutants in Horizontal Subsurface Flow and Vertical Flow Pilot-Scale Constructed Wetlands. *Processes*, 9(12), 2200. <https://www.mdpi.com/2227-9717/9/12/2200>
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>
- Głowacka, K., et al. (2019). The Effect of Cadmium on the Activity of Stress-Related Enzymes and the Ultrastructure of Pea Roots. *Plants*, 8(10), 413. <https://www.mdpi.com/2223-7747/8/10/413>
- Goldsworthy, G. J., et al. (1972). Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology*, 18(3), 545-551. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0016-6480\(72\)90034-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0016-6480(72)90034-2)
- Gorai, M., et al. (2006). Seed Germination Characteristics of *Phragmites communis*: Effects of Temperature and Salinity. *Belgian Journal of Botany*, 139, 78-86. <https://doi.org/10.2307/20794596>
- Green, C. E., et al. (2017). Increased zinc supply does not inhibit cadmium accumulation by rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 40(6), 869-877. <https://doi.org/10.1080/01904167.2016.1262407>
- Grisson, C., et al. (2015). *L'écocatalyse: Nouvelle approche intégrée de l'écologie scientifique*. ISTE Editions.
- Gu, C., et al. (2024). Identification and expression analysis of the bZIP and WRKY gene families during anthocyanins biosynthesis in *Lagerstroemia indica* L. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 65(1), 169-180. <https://doi.org/10.1007/s13580-023-00551-w>
- Guilpain, M., et al. (2018). Speciation of nickel extracted from hyperaccumulator plants by water leaching. *Hydrometallurgy*, 180, 192-200. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2018.07.024>

- Guitttony-Philippe, A., et al. (2015). Proposal of a new ecotoxicity evaluation tool based on morphological responses of five helophytes to mixtures of pollutants: The Helophyte Development Index. *Ecological Engineering*, 77, 180-188.
- Guitttony-Philippe, A., et al. (2014). Constructed wetlands to reduce metal pollution from industrial catchments in aquatic Mediterranean ecosystems: A review to overcome obstacles and suggest potential solutions. *Environment International*, 64, 1-16.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.11.016>
- Guo, T., et al. (2014). Review of cost versus scale: water and wastewater treatment and reuse processes. *Water Science and Technology*, 69(2), 223-234.
- Guo, X., et al. (2021). Coordination between root cell wall thickening and pectin modification is involved in cadmium accumulation in *Sedum alfredii*. *Environmental Pollution*, 268, 115665.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115665>
- Guterres, J., et al. (2019). Assessing germination characteristics of Australian native plant species in metal/metalloid solution. *J Hazard Mater*, 364, 173-181.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.10.019>
- Gutiérrez-Martínez, P., et al. (2020). Assessment of antioxidant enzymes in leaves and roots of *Phaseolus vulgaris* plants under cadmium stress//Evaluación de enzimas antioxidantes en hojas y raíces de plantas *Phaseolus vulgaris* bajo estrés de cadmio. *Biotecnia*, 22, 110-118.
<https://doi.org/10.18633/biotecnia.v22i2.1252>
- Habig, W. H., et al. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249(22), 7130-7139.
- Hadj Bachir, I., et al. (2022). Chapter Nine - Regulation of secondary cell wall lignification by abiotic and biotic constraints. In R. Sibout (Ed.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 104, pp. 363-392). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.abr.2022.03.008>
- Hafner, S. C., & Parikh, S. J. (2020). Sorption and abiotic transformation of monensin by iron and manganese oxides. *Chemosphere*, 253, 126623.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126623>
- Haider, F. U., et al. (2021). Cadmium toxicity in plants: Impacts and remediation strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111887.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111887>
- Hakmaoui, A., et al. (2007). Copper and cadmium tolerance, uptake and effect on chloroplast ultrastructure. Studies on *Salix purpurea* and *Phragmites australis*. *Z Naturforsch C J Biosci*, 62(5-6), 417-426. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-5-616>
- Hamim, H., et al. (2018). Cellular and Ultrastructure Alteration of Plant Roots in Response to Metal Stress. In R. Diah & Hamim (Eds.), *Plant Growth and Regulation* (pp. Ch. 2). IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.79110>
- Handbook, W. T. (1991). *sixth edition ISBN: 2950398413, pp 1482-1489* (Vol. 2 Degremont). Lavoisier
- Haraguchi, A. (2014). Effects of Salinity on Germination, Seedling Growth and Ecological Properties of *Phragmites australis* Communities in the Estuary of the Chikugogawa River, Southwestern Japan. *American Journal of Plant Sciences*, 05, 584-595.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2014.55073>
- Harguinteguy, C. A., et al. (2015). Nickel, lead and zinc accumulation and performance in relation to their use in phytoremediation of macrophytes *Myriophyllum aquaticum* and *Egeria densa*. *Ecological Engineering*, 82, 512-516.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.05.039>
- Hartley-Whitaker, J., et al. (2001). Phytochelatins are involved in differential arsenate tolerance in *Holcus lanatus*. *Plant Physiology*, 126(1), 299-306. <https://doi.org/10.1104/pp.126.1.299>
- Hasanuzzaman, M., et al. (2020). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants (Basel)*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Haslam, S. M. (1971). The Development and Establishment of Young Plants of *Phragmites communis* Trin. *Annals of Botany*, 35(143), 1059-1072. <http://www.jstor.org/stable/42751992>
- Hassan, M. U., et al. (2019). Nickel toxicity in plants: reasons, toxic effects, tolerance mechanisms, and remediation possibilities—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(13), 12673-12688. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04892-x>

- Hatamian, M., et al. (2020). Interaction of lead and cadmium on growth and leaf morphophysiological characteristics of European hackberry (*Celtis australis*) seedlings. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 7(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s40538-019-0173-0>
- Hauvermale, A. L., & Steber, C. M. (2020). GA signaling is essential for the embryo-to-seedling transition during Arabidopsis seed germination, a ghost story. *Plant Signaling & Behavior*, 15(1), 1705028. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1705028>
- Hayat, K., et al. (2021). Ameliorative Effects of Exogenous Proline on Photosynthetic Attributes, Nutrients Uptake, and Oxidative Stresses under Cadmium in Pigeon Pea (*Cajanus cajan* L.). *Plants (Basel)*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/plants10040796>
- He, C., et al. (2020). Phytoremediation of soil heavy metals (Cd and Zn) by castor seedlings: Tolerance, accumulation and subcellular distribution. *Chemosphere*, 252, 126471. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126471>
- He, D., & Liu, Y.-g. (2007). Effects of calcium on chlorophyll and antioxidant enzymes in *Phragmites australis* under cadmium stress. *Journal of Agro-Environment Science*, 26(1), 197-201.
- Heiss, S., et al. (2003). Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. *Journal of Experimental Botany*, 54(389), 1833-1839. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg205>
- Hejna, M., et al. (2022). Pharmaceuticals in the aquatic environment: A review on eco-toxicology and the remediation potential of algae. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(13), 7717.
- Hernández Estévez, I., & Rodríguez Hernández, M. (2020). “Plant Glutathione S-transferases: An overview”. *Plant Gene*, 23, 100233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plgene.2020.100233>
- Hipfinger, C., et al. (2022). Comparison of four nickel hyperaccumulator species in the temperate climate zone of Central Europe. *Journal of Geochemical Exploration*, 234, 106933. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2021.106933>
- Hizal, J., & Apak, R. (2006). Modeling of cadmium(II) adsorption on kaolinite-based clays in the absence and presence of humic acid. *Applied Clay Science*, 32(3), 232-244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.02.002>
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347(2nd edit).
- Hocq, L., et al. (2017). Connecting Homogalacturonan-Type Pectin Remodeling to Acid Growth. *Trends in Plant Science*, 22(1), 20-29. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.10.009>
- Holmes, G. D., et al. (2016). Using Transcriptomics to Identify Differential Gene Expression in Response to Salinity among Australian *Phragmites australis* Clones. *Front Plant Sci*, 7, 432. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00432>
- Houshmandfar, A., & Moraghebi, F. (2011). Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc on seed germination and seedling growth of safflower. *African journal of agricultural research*, 6(5), 1182-1187.
- Hreiz, R., et al. (2015). Optimal design and operation of activated sludge processes: State-of-the-art. *Chemical Engineering Journal*, 281, 900-920. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.06.125>
- Hummel, W., & Curti, E. (2003). Nickel Aqueous Speciation and Solubility at Ambient Conditions: A Thermodynamic Elegy. *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 134(7), 941-973. <https://doi.org/10.1007/s00706-003-0010-8>
- Hussain, S. T., et al. (2010). Phytoremediation technologies for Ni ++ by water hyacinth. *African Journal of Biotechnology*, 9, 8648-8660.
- Huybrechts, M., et al. (2019). Cadmium and Plant Development: An Agony from Seed to Seed. *Int J Mol Sci*, 20(16). <https://doi.org/10.3390/ijms20163971>
- Iannelli, M. A., et al. (2002). Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(11), 977-982. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(02\)01455-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0981-9428(02)01455-9)
- Iannone, M. F., et al. (2010). Reactive oxygen species formation and cell death in catalase-deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium. *Protoplasma*, 245(1-4), 15-27. <https://doi.org/10.1007/s00709-009-0097-9>

- Ievinsh, G. (2023). Halophytic Clonal Plant Species: Important Functional Aspects for Existence in Heterogeneous Saline Habitats. *Plants*, 12(8), 1728. <https://www.mdpi.com/2223-7747/12/8/1728>
- Ifeoma Mary, U., & Onyedikachi Anthony, I. (2019). Sorption of Heavy Metals on Clay Minerals and Oxides: A Review. In E. Serpil (Ed.), *Advanced Sorption Process Applications* (pp. Ch. 7). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80989>
- Ilyas, H., & van Hullebusch, E. D. (2020). Performance comparison of different types of constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and their transformation products: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(13), 14342-14364. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08165-w>
- Iori, V., et al. (2013). Growth Responses, Metal Accumulation and Phytoremoval Capability in Amaranthus Plants Exposed to Nickel Under Hydroponics. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(2), 1450. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1450-3>
- Issam, N., et al. (2012). Effects of CaCl₂ pretreatment on antioxidant enzyme and leaf lipid content of faba bean (*Vicia faba* L.) seedlings under cadmium stress. *Plant Growth Regulation*, 68(1), 37-47. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9691-5>
- Iwema, A., et al. (2005). Épuration des eaux usées domestiques par filtres plantés de macrophytes. Recommandations techniques pour la conception et la réalisation. In (pp. 44).
- Iyaka, Y. A. (2011). Nickel in soils: A review of its distribution and impacts. *Scientific Research and Essays*, 6(33), 6774-6777.
- Jackson, A. P., & Alloway, B. J. (2017). The transfer of cadmium from agricultural soils to the human food chain. *Biogeochemistry of trace metals*, 121-170.
- Jalal, A., et al. (2021). Hormesis in plants: Physiological and biochemical responses. *Ecotoxicol Environ Saf*, 207, 111225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111225>
- Jaouani, K., et al. (2018). Cadmium effects on embryo growth of pea seeds during germination: Investigation of the mechanisms of interference of the heavy metal with protein mobilization-related factors. *Journal of Plant Physiology*, 226, 64-76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.02.009>
- Jia, H., et al. (2021). Exogenous salicylic acid regulates cell wall polysaccharides synthesis and pectin methylation to reduce Cd accumulation of tomato. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111550. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111550>
- Jia, H., et al. (2019). Accumulation and fixation of Cd by tomato cell wall pectin under Cd stress. *Environmental and Experimental Botany*, 167, 103829. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103829>
- Jia, L., et al. (2015). Hormesis Effects Induced by Cadmium on Growth and Photosynthetic Performance in a Hyperaccumulator, *Lonicera japonica* Thunb. *Journal of Plant Growth Regulation*, 34(1), 13-21. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9433-1>
- Jiang, S., et al. (2019). MdGSTF6, activated by MdMYB1, plays an essential role in anthocyanin accumulation in apple. *Horticulture Research*, 6(1), 40. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0118-6>
- Jiang, X., & Wang, C. (2007). Cadmium distribution and its effects on molybdate-containing hydroxylases in *Phragmites australis*. *Aquatic Botany*, 86(4), 353-360. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.01.002>
- Jin-mei, L. (2007). Distribution, Accumulation and Correlation of Heavy Metal Elements in the Muddy Tidal Plant System around Chongming Island. *Research of Environmental Sciences*.
- Jin, Y. H., et al. (2003). Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair. *Nature Genetics*, 34(3), 326-329. <https://doi.org/10.1038/ng1172>
- Jing, H., et al. (2023). Exploring the mechanism of Cd uptake and translocation in rice: Future perspectives of rice safety. *Science of the Total Environment*, 897, 165369. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165369>
- Jócsák, I., et al. (2020). Effect of cadmium stress on certain physiological parameters, antioxidative enzyme activities and biophoton emission of leaves in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *PLoS One*, 15(11), e0240470. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240470>
- Jost-Tse, Y.-C. (2018). *Les plantes hyperaccumulatrices de métaux lourds: Une solution à la pollution des sols et de l'eau?* Editions Publibook.

- Ju-Chen, C. (2021). Phytochelatin Synthase in Heavy Metal Detoxification and Xenobiotic Metabolism. In M. Kassio Ferreira, S. Rodrigo Nogueira de, & M. Kamila Cabral (Eds.), *Biodegradation Technology of Organic and Inorganic Pollutants* (pp. Ch. 18). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99077>
- Justin, M., & Vivek, B. (2010). Studies on the effect of heavy metal (Cd and Ni) stress on the growth and physiology of *Allium cepa*. *Annals of Biological Research*, 1(3), 139-144.
- Jutsz, A. M., & Gnida, A. (2015). Mechanisms of stress avoidance and tolerance by plants used in phytoremediation of heavy metals. *Archives of Environmental Protection*, 41(4), 104.
- Kabata-Pendias, A., & Sadurski, W. (2004). Trace Elements and Compounds in Soil. In *Elements and Their Compounds in the Environment* (pp. 79-99). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9783527619634.ch5>
- Kamnev, A. A., & van der Lelie, D. (2000). Chemical and Biological Parameters as Tools to Evaluate and Improve Heavy Metal Phytoremediation. *Bioscience Reports*, 20(4), 239-258. <https://doi.org/10.1023/a:1026436806319>
- Karimidastenaie, Z., et al. (2022). Unconventional water resources: Global opportunities and challenges. *Science of the Total Environment*, 827, 154429. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154429>
- Kaur, C., et al. (2014). Glyoxalases and stress tolerance in plants. *Biochemical Society Transactions*, 42(2), 485-490. <https://doi.org/10.1042/bst20130242>
- Kaushal, J., et al. (2018). Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 192-199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.07.035>
- Kesari, K. K., et al. (2021). Wastewater Treatment and Reuse: a Review of its Applications and Health Implications. *Water, Air, & Soil Pollution*, 232(5), 208. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-05154-8>
- Keunen, E., et al. (2013). Alternative respiration as a primary defence during cadmium-induced mitochondrial oxidative challenge in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 91, 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2013.02.008>
- Khalilzadeh, R., et al. (2022). Physiological and biochemical responses of *Phragmites australis* to wastewater for different time duration. *Acta physiologiae plantarum*, 44(12), 130. <https://doi.org/10.1007/s11738-022-03469-5>
- Kiiskila, J. D., et al. (2017). A preliminary study to design a floating treatment wetland for remediating acid mine drainage-impacted water using vetiver grass (*Chrysopogon zizanioides*). *Environ Sci Pollut Res Int*, 24(36), 27985-27993. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0401-8>
- Kim, Y. X., et al. (2018). Composite Transport Model and Water and Solute Transport across Plant Roots: An Update [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00193>
- Kochi, L. Y., et al. (2020). Aquatic Macrophytes in Constructed Wetlands: A Fight against Water Pollution. *Sustainability*, 12(21), 9202. <https://www.mdpi.com/2071-1050/12/21/9202>
- Kopittke, P. M., et al. (2010). Toxicity of Cd to signal grass (*Brachiaria decumbens* Stapf.) and Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth.). *Plant and Soil*, 330(1), 515-523. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0224-6>
- Kováč, J., et al. (2018). Formation of a subero-lignified apical deposit in root tip of radish (*Raphanus sativus*) as a response to copper stress. *Annals of Botany*, 122(5), 823-831. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy013>
- Kovačević, M., et al. (2019). Bioaccumulation of heavy metals in common reed (*Phragmites australis*) growing spontaneously on highly contaminated mine tailing ponds in Serbia and potential use of this species in phytoremediation. *Botanica Serbica*, 43, 85-95. <https://doi.org/10.2298/BOTSERB1901085P>
- Kovačević, M., et al. (2020). Effects of high metal concentrations on antioxidative system in *Phragmites australis* grown in mine and flotation tailings ponds. *Plant and Soil*, 453(1), 297-312. <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04598-x>
- Kowalik-Jankowska, T., et al. (2007). Nickel Ion Complexes of Amino Acids and Peptides. In *Nickel and Its Surprising Impact in Nature* (pp. 63-107). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470028131.ch3>

- Kozłowska, M., et al. (2009). Biological aspects of cadmium and lead uptake by *Phragmites australis* (Cav. Trin ex steudel) in natural water ecosystems. *Journal of Elemntology*, 14. <https://doi.org/10.5601/jelem.2009.14.2.10>
- Krzyszowska, M. (2011). The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta physiologiae plantarum*, 33(1), 35-51. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0581-z>
- Krzyszowska, M., et al. (2016). Pectinous cell wall thickenings formation - A common defense strategy of plants to cope with Pb. *Environmental Pollution*, 214, 354-361. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.04.019>
- Krzyszowska, M., et al. (2019). Alterations of root architecture and cell wall modifications in *Tilia cordata* Miller (Linden) growing on mining sludge. *Environmental Pollution*, 248, 247-259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.019>
- Kubier, A., et al. (2019). Cadmium in soils and groundwater: A review. *Applied Geochemistry*, 108, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2019.104388>
- Kudo, H., et al. (2023). Temperature Dependence of Metals Accumulation and Removal Kinetics by *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmaifera*. *Plants (Basel)*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/plants12040877>
- Kumar, A., & Verma, J. (2018). Effects of nickel chloride on germination and seedling growth of different wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) cultivars. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(4), 2227-2234.
- Küpper, H., et al. (1998). In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Research*, 58(2), 123-133. <https://doi.org/10.1023/A:1006132608181>
- Küpper, H., et al. (2001). Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiaicum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2291-2300. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.365.2291>
- Küpper, H., et al. (2007). Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 175(4), 655-674. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02139.x>
- Küpper, H., et al. (2002). HEAVY METAL-INDUCED INHIBITION OF PHOTOSYNTHESIS: TARGETS OF IN VIVO HEAVY METAL CHLOROPHYLL FORMATION1. *Journal of Phycology*, 38(3), 429-441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.01148.x>
- Ladislav, S., et al. (2013). Performances of Two Macrophytes Species in Floating Treatment Wetlands for Cadmium, Nickel, and Zinc Removal from Urban Stormwater Runoff. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(2), 1408. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1408-x>
- Lane, T. W., et al. (2005). A cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature*, 435(7038), 42-42. <https://doi.org/10.1038/435042a>
- Lao, R., et al. (2023). The Role of Lignin in the Compartmentalization of Cadmium in Maize Roots Is Enhanced by Mycorrhiza. *J Fungi (Basel)*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/jof9080852>
- Lapirov, A. G., et al. (2017). Effect of nickel chloride on seed germination and morphophysiological parameters of seedlings of *Alisma plantago-aquatica* L. and *Sium latifolium* L. *Inland Water Biology*, 10(3), 308-314. <https://doi.org/10.1134/S1995082917030099>
- Larcher, W. (2003). *Physiological Plant Ecology: Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups*. Springer. <https://books.google.dz/books?id=BgtzD4fr98C>
- Lauritano, C., et al. (2021). Glutathione S-Transferases in Marine Copepods. *Journal of Marine Science and Engineering*, 9(9), 1025. <https://www.mdpi.com/2077-1312/9/9/1025>
- Lee, H., & Tan, T. P. (2016). Singapore's experience with reclaimed water: NEWater. *International Journal of Water Resources Development*, 32(4), 611-621.
- Léon, V., et al. (2005). Effects of three nickel salts on germinating seeds of *Grevillea exul* var. *rubiginosa*, an endemic serpentine Proteaceae. *Annals of Botany*, 95(4), 609-618. <https://doi.org/10.1093/aob/mci066>
- Leškovi, A., et al. (2020). Nickel Toxicity Targets Cell Wall-Related Processes and PIN2-Mediated Auxin Transport to Inhibit Root Elongation and Gravitropic Responses in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology*, 61(3), 519-535. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz217>
- Lévêque, C. (1996). *Ecosystèmes Aquatiques—Les Fondamentaux*. HACHETTE Livre, Paris, 159.

- Lhuillier, L. (1994). *Biodisponibilité du nickel dans les sols ferrallitiques ferritiques de Nouvelle-Calédonie. Effets toxiques de Ni sur le développement et la physiologie du maïs* Université de Montpellier II].
- Li, F., et al. (2014). Three-stage horizontal subsurface flow constructed wetlands for organics and nitrogen removal: Effect of aeration. *Ecological Engineering*, 68, 90-96. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.03.025>
- Li, H., et al. (2013). Effect of pH, Temperature, Dissolved Oxygen, and Flow Rate of Overlying Water on Heavy Metals Release from Storm Sewer Sediments. *Journal of Chemistry*, 2013, 434012. <https://doi.org/10.1155/2013/434012>
- Li, J., et al. (2022). Coordinated allocation of conventional and unconventional water resources considering uncertainty and different stakeholders. *Journal of Hydrology*, 605, 127293. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2021.127293>
- Li, S., et al. (2022). Physiological and transcriptional response of carbohydrate and nitrogen metabolism in tomato plant leaves to nickel ion and nitrogen levels. *Scientia Horticulturae*, 292, 110620. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110620>
- Lin, C. C., & Kao, C. H. (1999). NaCl induced changes in ionically bound peroxidase activity in roots of rice seedlings. *Plant and Soil*, 216(1), 147. <https://doi.org/10.1023/A:1004714506156>
- Lin, Y., et al. (2016). Barley root hair growth and morphology in soil, sand, and water solution media and relationship with nickel toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(8), 2125-2133. <https://doi.org/10.1002/etc.3389>
- Lin, Y., et al. (2020). Identification of Anthocyanins-Related Glutathione S-Transferase (GST) Genes in the Genome of Cultivated Strawberry (*Fragaria × ananassa*). *Int J Mol Sci*, 21(22). <https://doi.org/10.3390/ijms21228708>
- Liu, S., et al. (2012). The Effects of Cadmium on Germination and Seedling Growth of *Suaeda salsa*. *Procedia Environmental Sciences*, 16, 293-298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.proenv.2012.10.041>
- Liu, W. T., et al. (2013). Uptake of heavy metals by trees: prospects for phytoremediation. *Materials Science Forum*,
- Liu, Y., et al. (2019). The roles of free ammonia (FA) in biological wastewater treatment processes: A review. *Environment International*, 123, 10-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.039>
- Liuzzo, L., et al. (2017). Long-term temperature changes in Sicily, Southern Italy. *Atmospheric Research*, 198, 44-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2017.08.007>
- Liza, S. J., et al. (2020). Effects of cadmium on the anatomical structures of vegetative organs of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Dhaka Univ. J. Biol. Sci*, 29(1), 45-52.
- Llamas, A., et al. (2000). Cd²⁺ effects on transmembrane electrical potential difference, respiration and membrane permeability of rice (*Oryza sativa* L) roots. *Plant and soil*, 219(1-2), 21-28.
- Llamas, A., et al. (2008). Ni²⁺ toxicity in rice: effect on membrane functionality and plant water content. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(10), 905-910. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.05.006>
- Loganathan, P., et al. (2012). Cadmium Sorption and Desorption in Soils: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(5), 489-533. <https://doi.org/10.1080/10643389.2010.520234>
- Loggini, B., et al. (1999). Antioxidative defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant physiology*, 119(3), 1091-1100.
- Loix, C., et al. (2017). Reciprocal Interactions between Cadmium-Induced Cell Wall Responses and Oxidative Stress in Plants. *Front Plant Sci*, 8, 1867. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01867>
- Lorbiecke, R., & Sauter, M. (1999). Adventitious root growth and cell-cycle induction in deepwater rice. *Plant Physiology*, 119(1), 21-30. <https://doi.org/10.1104/pp.119.1.21>
- Lourenço, A., et al. (2016). Lignin Composition and Structure Differs between Xylem, Phloem and Phellem in *Quercus suber* L [Original Research]. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01612>
- Ma, J. F., et al. (1997). Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature*, 390(6660), 569-570. <https://doi.org/10.1038/37518>
- Macek, T., et al. (1994). Accumulation of cadmium by hairy-root cultures of *Solanum nigrum*. *Biotechnology Letters*, 16(6), 621-624. <https://doi.org/10.1007/BF00128611>

- Madhusudhan, R., et al. (2003). Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY-2 cells. *Physiologia Plantarum*, 117(4), 550-557. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00066.x>
- Maestri, E., & Marmioli, M. (2012). Genetic and Molecular Aspects of Metal Tolerance and Hyperaccumulation. In D. K. Gupta & L. M. Sandalio (Eds.), *Metal Toxicity in Plants: Perception, Signaling and Remediation* (pp. 41-63). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22081-4_3
- Maheshwari, R., & Dubey, R. S. (2009). Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings. *Plant Growth Regulation*, 59(1), 37-49. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9386-8>
- Maheu-Giroux, M., & de Blois, S. (2007). Landscape ecology of *Phragmites australis* invasion in networks of linear wetlands. *Landscape Ecology*, 22(2), 285-301. <https://doi.org/10.1007/s10980-006-9024-z>
- Mal, T. K., & Narine, L. (2004). The biology of Canadian weeds. 129. *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. *Canadian Journal of Plant Science*, 84(1), 365-396. <https://doi.org/10.4141/p01-172>
- Malar, S., et al. (2016). Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Bot Stud*, 55(1), 54. <https://doi.org/10.1186/s40529-014-0054-6>
- Małkowski, E., et al. (2019). Heavy Metal Toxicity: Physiological Implications of Metal Toxicity in Plants. In G. Sablok (Ed.), *Plant Metallomics and Functional Omics: A System-Wide Perspective* (pp. 253-301). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-19103-0_10
- Manson, A., et al. (2022). Temperature Dependence of Solubility Predicted from Thermodynamic Data Measured at a Single Temperature: Application to α , β , and γ -Glycine. *Crystal Growth & Design*, 22(3), 1691-1706. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.1c01217>
- Mansoor, S., et al. (2023). Heavy Metal Induced Oxidative Stress Mitigation and ROS Scavenging in Plants. *Plants (Basel)*, 12(16). <https://doi.org/10.3390/plants12163003>
- Marchand, L., et al. (2016). Intra-specific variability of the guaiacol peroxidase (GPOD) activity in roots of *Phragmites australis* exposed to copper excess. *Ecological Engineering*, 90, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.055>
- Marnotte, P., & Carrara, A. (2006). *Plantes des rizières de Camargue*. Editions Quae.
- Martin-Garin, A., et al. (2004). Fiche radionucléide: Cadmium 109 et environnement. *IRSN La recherche publications-documentation, France*.
- Martin, H., et al. (1996). Evaluation of three herbaceous index plant species for bioavailability of soil cadmium, chromium, nickel and vanadium. *Plant and Soil*, 182(2), 199-207.
- Masse, M. R., & Houde, M. F. (2018). Revue toxicologique de l'encadrement réglementaire de l'industrie du nickel pour le volet air ambiant.
- Mathé, C., et al. (2010). Evolution and expression of class III peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 500(1), 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.007>
- Maton, D., & Le comte, P. (1996). Les systèmes alternatifs de traitement des eaux usées de petites collectivités locales. synthèse bibliographique, rapport BRGM.Orleans, France
- 97.
- Mazzafera, P., et al. (2013). Nickel in Plants. In R. H. Kretsinger, V. N. Uversky, & E. A. Permyakov (Eds.), *Encyclopedia of Metalloproteins* (pp. 1496-1501). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_87
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(2), 153-162. [https://doi.org/10.1016/s1369-5266\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(99)00054-0)
- Meers, E., et al. (2007). Phytoavailability assessment of heavy metals in soils by single extractions and accumulation by *Phaseolus vulgaris*. *Environmental and Experimental Botany*, 60(3), 385-396. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.12.010>
- Mehrabanjoubani, P., et al. (2019). Silicon increases cell wall thickening and lignification in rice (*Oryza sativa*) root tip under excess Fe nutrition. *Plant Physiology and Biochemistry*, 144, 264-273. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.047>

- Melanie, M.-S., et al. (2013). Coping Mechanisms of Plants to Metal Contaminated Soil. In S. Steven & Y. Stephen (Eds.), *Environmental Change and Sustainability* (pp. Ch. 3). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/55124>
- Mens, B. (1986). Le roseau : 1ère partie. Office national de la chasse et de la faune sauvage (ONC), N° 105, France, p 27-35.
- Meychik, N., et al. (2021). The significance of ion-exchange properties of plant root cell walls for nutrient and water uptake by plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 166, 140-147. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.05.048>
- Michalak, I., et al. (2018). Trace Elements as Fertilizer Micronutrients. In *Recent Advances in Trace Elements* (pp. 299-318). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781119133780.ch15>
- Millaleo, R., et al. (2010). Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(4), 470-481.
- Minkina, T., et al. (2018). Morphological and anatomical changes of *Phragmites australis* Cav. due to the uptake and accumulation of heavy metals from polluted soils. *Science of the Total Environment*, 636, 392-401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.306>
- Miransari, M. (2011). Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology Advances*, 29(6), 645-653. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.006>
- Mitra, G. (2017). Essential Plant Nutrients and Recent Concepts about their Uptake. In M. Naeem, A. A. Ansari, & S. S. Gill (Eds.), *Essential Plant Nutrients: Uptake, Use Efficiency, and Management* (pp. 3-36). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58841-4_1
- Mitra, S., et al. (2022). Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University - Science*, 34(3), 101865. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101865>
- Mnasri, M., et al. (2015). Cd and Ni transport and accumulation in the halophyte *Sesuvium portulacastrum*: implication of organic acids in these processes. *Frontiers in Plant Science*, 6.
- Mohan, S. V., et al. (2002). Treatment of simulated Reactive Yellow 22 (azo) dye effluents using *Spirogyra* species. *Waste Manag*, 22(6), 575-582. [https://doi.org/10.1016/s0956-053x\(02\)00030-2](https://doi.org/10.1016/s0956-053x(02)00030-2)
- Mohsin, M., et al. (2023). Cadmium accumulation by *Phragmites australis* and *Iris pseudacorus* from stormwater in floating treatment wetlands microcosms: Insights into plant tolerance and utility for phytoremediation. *Journal of Environmental Management*, 331, 117339. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117339>
- Molas, J. (1997). Changes in morphological and anatomical structure of cabbage (*Brassica oleracea* L.) outer leaves and in ultrastructure of their chloroplasts caused by an in vitro excess of nickel. *Photosynthetica*, 34(14), 513-522. <https://doi.org/10.1023/a:1006805327340>
- Molas, J. (2002). Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni(II) complexes. *Environmental and Experimental Botany*, 47(2), 115-126. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(01\)00116-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0098-8472(01)00116-2)
- Mukherjee, A. B. (1998). Nickel: a review of occurrence, uses, emissions, and concentration in the environment in Finland. *Environmental Reviews*, 6(3-4), 173-187. <https://doi.org/10.1139/a99-001>
- Muradoglu, F., et al. (2015). Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry. *Biological Research*, 48(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0001-3>
- Mustafa, A., et al. (2023). Nickel (Ni) phytotoxicity and detoxification mechanisms: A review. *Chemosphere*, 328, 138574. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138574>
- Muszyńska, E., et al. (2018). Studies on lead and cadmium toxicity in *Dianthus carthusianorum* calamine ecotype cultivated in vitro. *Plant Biol (Stuttg)*, 20(3), 474-482. <https://doi.org/10.1111/plb.12712>
- Myśliwa-Kurdziel, B., & Strzałka, K. (2002). Influence of Metals on Biosynthesis of Photosynthetic Pigments. In M. N. V. Prasad & K. Strzałka (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 201-227). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2660-3_8

- Naeem, A., et al. (2019). Chapter 12 - Cadmium-Induced Imbalance in Nutrient and Water Uptake by Plants. In M. Hasanuzzaman, M. N. V. Prasad, & M. Fujita (Eds.), *Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants* (pp. 299-326). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814864-8.00012-7>
- Nagajyoti, P. C., et al. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199-216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Nawrot, N., et al. (2021). Heavy metal accumulation and distribution in Phragmites australis seedlings tissues originating from natural and urban catchment. *Environ Sci Pollut Res Int*, 28(12), 14299-14309. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07343-9>
- Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006). Olive processing waste management: literature review and patent survey.
- Nieminen, T. M. (2004). Effects of soil copper and nickel on survival and growth of Scots pine. *Journal of Environmental Monitoring*, 6(11), 888-896.
- Nieminen, T. M., et al. (2007). Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. *Nickel and Its Surprising Impact in Nature*, 2, 1-29.
- Nishida, S., et al. (2015). Induction of Nickel Accumulation in Response to Zinc Deficiency in Arabidopsis thaliana. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9420-9430.
- Nizamuddin, S., et al. (2019). Chapter 17 - Iron Oxide Nanomaterials for the Removal of Heavy Metals and Dyes From Wastewater. In S. Thomas, D. Pasquini, S.-Y. Leu, & D. A. Gopakumar (Eds.), *Nanoscale Materials in Water Purification* (pp. 447-472). Elsevier.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813926-4.00023-9>
- Nocito, f. f., et al. (2011). Cadmium retention in rice roots is influenced by cadmium availability, chelation and translocation. *Plant, Cell & Environment*, 34(6), 994-1008.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02299.x>
- Nzengue, Y., et al. (2011). The toxicity redox mechanisms of cadmium alone or together with copper and zinc homeostasis alteration: its redox biomarkers. *J Trace Elem Med Biol*, 25(3), 171-180.
<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2011.06.002>
- OECD. (2003). OECD guideline for the testing of chemicals proposal for updating guideline 208 terrestrial plant test: 208: seedling emergence and seedling growth test. *TEST*, 227, 1-19.
- Olguín, E. J., & Sánchez-Galván, G. (2011). 6.18 - Phytofiltration of Heavy Metals: Assessment of the Key Factors Involved in the Design of a Sustainable Process. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (pp. 207-213). Academic Press.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00379-2>
- Omerspahic, M., et al. (2022). Characteristics of Desalination Brine and Its Impacts on Marine Chemistry and Health, With Emphasis on the Persian/Arabian Gulf: A Review [Review]. *Frontiers in Marine Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.845113>
- Organization, W. H. (2006). *A compendium of standards for wastewater reuse in the Eastern Mediterranean Region*.
- Otiende, M. A., et al. (2021). Involvement of the auxin-cytokinin homeostasis in adventitious root formation of rose cuttings as affected by their nodal position in the stock plant. *Planta*, 254(4), 65. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03709-x>
- Ouyang, H., et al. (2012). Effects of five heavy metals at sub-lethal concentrations on the growth and photosynthesis of Chlorella vulgaris. *Chinese Science Bulletin*, 57(25), 3363-3370.
<https://doi.org/10.1007/s11434-012-5366-x>
- Oven, M., et al. (2002). Molecular characterization of the homo-phytochelatin synthase of soybean Glycine max: relation to phytochelatin synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4747-4754. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108254200>
- Pál, P., et al. (2023). Identification of histidine-Ni (II) metal complex by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 54(3), 278-287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jrs.6490>
- Panda, S. K., et al. (2003). Heavy Metals Induce Lipid Peroxidation and Affect Antioxidants in Wheat Leaves. *Biologia Plantarum*, 46(2), 289-294. <https://doi.org/10.1023/A:1022871131698>
- Pandey, A. K., et al. (2022). The Anatomical Basis of Heavy Metal Responses in Legumes and Their Impact on Plant-Rhizosphere Interactions. *Plants*, 11(19), 2554. <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/19/2554>
- Pandey, N., & Sharma, C. P. (2002). Effect of heavy metals Co²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺ on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, 163(4), 753-758.

- Parde, D., et al. (2021). A review of constructed wetland on type, treatment and technology of wastewater. *Environmental Technology & Innovation*, 21, 101261. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101261>
- Parrotta, L., et al. (2015). Target or barrier? The cell wall of early- and later-diverging plants vs cadmium toxicity: differences in the response mechanisms. *Front Plant Sci*, 6, 133. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00133>
- Pascal, S., & Scalla, R. (1999). Purification and characterization of a safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum*, 106(1), 17-27.
- Pasternak, T., et al. (2005). Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 53(3), 299-314. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.04.009>
- Peijnenburg, W. J. G. M., & Jager, T. (2003). Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 63-77. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00051-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00051-4)
- Peng, H., et al. (2010). Effect of heavy metal stress on emerging plants community constructions in wetland. *Water Sci Technol*, 62(10), 2459-2466. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.496>
- Peralta-Videa, J. R., et al. (2002). Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. *Environmental Pollution*, 119(3), 291-301. [https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00105-7](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00105-7)
- Pereira, C. M. S., et al. (2019). Effect of temperature on nickel uptake and elimination in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(4), 784-793. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/etc.4352>
- Pérez, S., et al. (2011). Wastewater reuse in the Mediterranean area of Catalonia, Spain: case study of reuse of tertiary effluent from a wastewater treatment plant at el prat de Llobregat (Barcelona). *Waste Water Treatment and Reuse in the Mediterranean Region*, 249-294.
- Perrono, P. (1999). Les micropolluants métalliques des boues de stations d'épuration urbaine et l'épandage agricole. *Mém. DUESS, DEP, Univ. Picardie, Amiens*, 62.
- Pescod, M. (1992). Wastewater quality guidelines for agriculture use. *Wastewater treatment and use in agriculture*. *FAO Available online: <http://www.fao.org/3/t0551e/t0551e04.htm> (accessed on 11 November 2020)*.
- Piepho, M. (2017). Assessing maximum depth distribution, vegetated area, and production of submerged macrophytes in shallow, turbid coastal lagoons of the southern Baltic Sea. *Hydrobiologia*, 794(1), 303-316. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3107-5>
- Pietrini, F., et al. (2003). Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Plant Physiology*, 133(2), 829-837. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026518>
- Piršelová, B., et al. (2012). Study on metal-triggered callose deposition in roots of maize and soybean. *Biologia*, 67(4), 698-705. <https://doi.org/10.2478/s11756-012-0051-8>
- Pita-Barbosa, A., et al. (2015). Morpho-anatomical and growth alterations induced by arsenic in *Cajanus cajan* (L.) DC (Fabaceae). *Environ Sci Pollut Res Int*, 22(15), 11265-11274. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4342-9>
- Plomion, C., et al. (2001). Wood formation in trees. *Plant Physiology*, 127(4), 1513-1523.
- Polacco, J. C., et al. (2013). Opinion: nickel and urease in plants: still many knowledge gaps. *Plant Science*, 199-200, 79-90. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.10.010>
- Poonkothai, M., & Vijayavathi, B. S. (2012). Nickel as an essential element and a toxicant. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(4), 285-288.
- Porra, R. J. (2002). The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research*, 73(1), 149-156. <https://doi.org/10.1023/A:1020470224740>
- Porra, R. J., et al. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975(3), 384-394. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80347-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80347-0)
- Prasad, M. N. V. (2001). *Metals in the Environment: Analysis by Biodiversity*. Taylor & Francis. https://books.google.dz/books?id=cyp_1kq39IUC

- Qadir, S., et al. (2014). Modulation of plant growth and metabolism in cadmium-enriched environments. *Rev Environ Contam Toxicol*, 229, 51-88. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03777-6_4
- Qian, H., et al. (2010). Photoperiod and temperature influence cadmium's effects on photosynthesis-related gene transcription in *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73(6), 1202-1206. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.006>
- Qian, H., et al. (2009). Combined effect of copper and cadmium on *Chlorella vulgaris* growth and photosynthesis-related gene transcription. *Aquatic Toxicology*, 94(1), 56-61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.014>
- Qu, C., et al. (2019). Heavy metal behaviour at mineral-organo interfaces: Mechanisms, modelling and influence factors. *Environment International*, 131, 104995. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104995>
- Quadros, I. P. S., et al. (2022). Cadmium-mediated toxicity in plant cells is associated with the DCD/NRP-mediated cell death response. *Plant Cell Environ*, 45(2), 556-571. <https://doi.org/10.1111/pce.14218>
- Quézel, P., et al. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.
- Racault, Y., et al. (1997). *Le lagunage naturel : les leçons tirées de 15 ans de pratique en France*.
- Rahoui, S., et al. (2010). Membrane damage and solute leakage from germinating pea seed under cadmium stress. *J Hazard Mater*, 178(1-3), 1128-1131. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.115>
- Rajput, V. D., et al. (2021). Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology (Basel)*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/biology10040267>
- Ramade, F. (2007). *Introduction à l'écotoxicologie: Fondements et applications*. Lavoisier, 648P.
- Rameau, J.-C., et al. (1993). Flore forestière française (guide écologique illustré. Tome 2, Montagnes).
- Rao, R. A. K., & Kashifuddin, M. (2016). Adsorption studies of Cd(II) on ball clay: Comparison with other natural clays. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1233-S1241. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.01.010>
- Raskin, I., et al. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(3), 285-290.
- Rausch, N., et al. (2005). Comparison of Atmospheric Deposition of Copper, Nickel, Cobalt, Zinc, and Cadmium Recorded by Finnish Peat Cores with Monitoring Data and Emission Records. *Environmental Science & Technology*, 39(16), 5989-5998. <https://doi.org/10.1021/es050260m>
- Raynal-Roques, A. (1994). *La Botanique redécouverte*. Quae, 512p. <https://books.google.dz/books?id=YmQjCwAAQBAJ>
- Raza, A., et al. (2022). Advances in “Omics” Approaches for Improving Toxic Metals/Metalloids Tolerance in Plants [Review]. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.794373>
- Razzak, S. A., et al. (2022). A comprehensive review on conventional and biological-driven heavy metals removal from industrial wastewater. *Environmental Advances*, 7, 100168. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100168>
- Reddy, A. M., et al. (2005). Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere*, 60(1), 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.092>
- Redjala, T., et al. (2009). Cadmium uptake by roots: Contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 235-242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.012>
- Remon, E. (2006). *Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution* Université Jean Monnet - Saint-Etienne]. <https://theses.hal.science/tel-00362527>
- Richau, K. H., et al. (2009). Chelation by histidine inhibits the vacuolar sequestration of nickel in roots of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 183(1), 106-116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x>
- Rocha, A. C. S., et al. (2014). Antioxidant response of *Phragmites australis* to Cu and Cd contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 109, 152-160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.027>

- Rodrigo, M. A. M., et al. (1993). Heavy metal accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interaction of plant hormones.
- Rubio, M. I., et al. (1994). Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. *Plant Growth Regulation*, 14(2), 151-157. <https://doi.org/10.1007/BF00025217>
- Ryzhenko, N., et al. (2018). Cd, Zn, Cu, Pb, Co, Ni phytotoxicity assessment. *Polish Journal of Soil Science*, 50, 197. <https://doi.org/10.17951/pjss.2017.50.2.197>
- Sabria, B. (2012). Contribution of X-Ray Spectroscopy to Marine Ecotoxicology: Trace Metal Bioaccumulation and Detoxification in Marine Invertebrates. In B. Ghousia (Ed.), *Ecotoxicology* (pp. Ch. 1). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/28853>
- Sachan, P., & Lal, N. (2017). An Overview of Nickel (Ni²⁺) Essentiality, Toxicity and Tolerance Strategies in Plants. *Asian Journal of Biology*, 2(4), 1-15. <https://doi.org/10.9734/AJOB/2017/33931>
- Saha, A., et al. (2022). A review on phyto-remediation by aquatic macrophytes: A natural promising tool for sustainable management of ecosystem. *International Journal of Experimental Research and Review*, 27(0), 9-31. <https://doi.org/10.52756/ijerr.2022.v27.002>
- Salinitro, M., et al. (2021). Induction of hormesis in plants by urban trace metal pollution. *Sci Rep*, 11(1), 20329. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99657-3>
- Salomon, J.-N. (2012). Le dessalement de l'eau de mer est-il une voie d'avenir? *Revista de geografia e ordenamento do territorio*, 1(1), 237- 262.
- Salt, D. E., et al. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio/technology*, 13(5), 468.
- Sanità di Toppi, L., & Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41(2), 105-130. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(98\)00058-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0098-8472(98)00058-6)
- Sankaranarayanan, S., et al. (2017). Glyoxalase Goes Green: The Expanding Roles of Glyoxalase in Plants. *Int J Mol Sci*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040898>
- Sanz, A., et al. (2009). Distinctive phytotoxic effects of Cd and Ni on membrane functionality. *Plant Signal Behav*, 4(10), 980-982. <https://doi.org/10.4161/psb.4.10.9668>
- Sarry, J.-E., et al. (2006). The early responses of Arabidopsis thaliana cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analyses. *Proteomics*, 6(7), 2180-2198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pmic.200500543>
- Sat, I. (2008). The effect of heavy metals on peroxidase from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *African journal of biotechnology*, 7, 2248-2253.
- Sauvé, S., et al. (2000). Solid-Solution Partitioning of Metals in Contaminated Soils: Dependence on pH, Total Metal Burden, and Organic Matter. *Environmental Science & Technology*, 34(7), 1125-1131. <https://doi.org/10.1021/es9907764>
- Schat, H., et al. (2002). The role of phytochelatin in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany*, 53(379), 2381-2392. <http://www.jstor.org/stable/23697729>
- Schück, M., & Greger, M. (2023). Salinity and temperature influence removal levels of heavy metals and chloride from water by wetland plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(20), 58030-58040. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-26490-8>
- Selvaraj, D., & Velvizhi, G. (2021). Sustainable ecological engineering systems for the treatment of domestic wastewater using emerging, floating and submerged macrophytes. *Journal of Environmental Management*, 286, 112253. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112253>
- Seregin, I. V., & Kozhevnikova, A. D. (2023). Phytochelatin: Sulfur-Containing Metal(loid)-Chelating Ligands in Plants. *Int J Mol Sci*, 24(3). <https://doi.org/10.3390/ijms24032430>
- Servais, S. (2004). *Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: effets de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3* Université Claude Bernard-Lyon I].
- Seshadri, B., et al. (2015). Rhizosphere-induced heavy metal(loid) transformation in relation to bioavailability and remediation. *Journal of soil science and plant nutrition*, 15, 524-548. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-95162015000200015&nrm=iso

- Seth, C. S., et al. (2008). The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicol Environ Saf*, 71(1), 76-85.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.10.030>
- Sfaxi-Bousbih, A., et al. (2010). Cadmium impairs mineral and carbohydrate mobilization during the germination of bean seeds. *Ecotoxicol Environ Saf*, 73(6), 1123-1129.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.005>
- Shafiq, M., et al. (2010). Effect of lead and cadmium on germination and seedling growth of *Leucaena leucocephala*. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management (ISSN: 1119-8362) Vol 12 Num 3, 12*. <https://doi.org/10.4314/jasem.v12i3.55497>
- Shahzad, B., et al. (2018). Nickel; whether toxic or essential for plants and environment - A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 641-651.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.10.014>
- Shakya, K., et al. (2008). Impact of Heavy Metals (Copper, Zinc, and Lead) on the Chlorophyll Content of Some Mosses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(3), 412-421. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9060-y>
- Shammas, N. K., et al. (2009). Waste Stabilization Ponds and Lagoons. In L. K. Wang, N. C. Pereira, & Y.-T. Hung (Eds.), *Biological Treatment Processes* (pp. 315-370). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-60327-156-1_8
- Shanmugabalaji, V., et al. (2022). Chapter Three - Plastoglobules: A hub of lipid metabolism in the chloroplast. In F. Rébeillé & E. Maréchal (Eds.), *Advances in Botanical Research* (Vol. 101, pp. 91-119). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.abr.2021.09.002>
- Sharma, A., & Bhatti, M. S. (2022). Simultaneous Removal of Organic Matter and Nutrients from High Strength Organic Wastewater Using Sequencing Batch Reactor (SBR). *Processes*, 10(10), 1903. <https://www.mdpi.com/2227-9717/10/10/1903>
- Sharma, A., & Dhiman, A. K. (2013). NICKEL AND CADMIUM TOXICITY IN PLANTS. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 2, 20-24.
- Sharma, S. S., et al. (1999). Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binary mixtures: Concentration-dependent antagonistic, nonadditive, and synergistic effects on root growth in *Silene vulgaris*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(2), 348-355.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/etc.5620180235>
- Shekhawat, M. (2019). *Plant Biotechnology: In Vitro Principles, Techniques and Applications*. MJF Publisher. <https://books.google.fr/books?id=hqacDwAAQBAJ>
- Shibko, S., et al. (1967). A method for sequential quantitative separation and determination of protein, RNA, DNA, lipid, and glycogen from a single rat liver homogenate or from a subcellular fraction. *Analytical Biochemistry*, 19(3), 514-528. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90242-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(67)90242-4)
- Shiryaev, G. I., et al. (2021). Effects of extremal technogenic pollution on structure of *Phragmites australis* photosynthetic apparatus. *AIP Conference Proceedings*, 2388(1).
<https://doi.org/10.1063/5.0068516>
- Sigg, L., & Behra, R. (2005). Speciation and bioavailability of trace metals in freshwater environments. *Met Ions Biol Syst*, 44, 47-73.
- Singh, A., et al. (2022). How to Cope with the Challenges of Environmental Stresses in the Era of Global Climate Change: An Update on ROS Scavenging in Plants. *Int J Mol Sci*, 23(4).
<https://doi.org/10.3390/ijms23041995>
- Sluyters, J. H., & Sluyters-Rehbach, M. (2017). Deviation from van't Hoff Behavior of Solids at Low Temperature. *ACS Omega*, 2(5), 2317-2325. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00169>
- Smirnov, N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(2), 214-219. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80118-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80118-3)
- Song, W.-Y., et al. (2014). ABC Transporters and Heavy Metals. In M. Geisler (Ed.), *Plant ABC Transporters* (pp. 1-17). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-06511-3_1
- Song, Y., et al. (2017). Cadmium absorption and transportation pathways in plants. *International Journal of Phytoremediation*, 19(2), 133-141.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207598>
- Souak, F. (2008). La politique de l'eau en Algérie valorisation et développement durable. *Revue d'économie et de statistique appliquée*, 5, 96-114. <https://www.asjp.cerist.dz/en/article/60022>

- Soukup, A., et al. (2002). Development of anatomical structure of roots of *Phragmites australis*. *New Phytologist*, 153(2), 277-287. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00317.x>
- Sreekanth, T. V. M., et al. (2013). Occurrence, physiological responses and toxicity of nickel in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10(5), 1129-1140. <https://doi.org/10.1007/s13762-013-0245-9>
- Stefanakis, A. (2016). Constructed Wetlands: Description and Benefits of an Eco-Tech Water Treatment System. In (pp. 281-303). <https://doi.org/10.4018/978-1-4666-9559-7.ch012>
- Stefanakis, A., et al. (2014). Chapter 2 - Constructed Wetlands Classification. In A. Stefanakis, C. S. Akrotos, & V. A. Tsihrintzis (Eds.), *Vertical Flow Constructed Wetlands* (pp. 17-25). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-404612-2.00002-7>
- Stéger, A., & Palmgren, M. (2022). Root hair growth from the pH point of view. *Front Plant Sci*, 13, 949672. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.949672>
- Steiner, F., et al. (2019). Does seed size affect the germination rate and seedling growth of peanut under salinity and water stress? *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 49.
- Steinmann, C. R., et al. (2003). A combined system of lagoon and constructed wetland for an effective wastewater treatment. *Water Research*, 37(9), 2035-2042. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00441-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00441-4)
- Stolt, J. P., et al. (2003). Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. *Environmental and Experimental Botany*, 49(1), 21-28. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00045-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00045-X)
- Takeda, S., et al. (2008). Local Positive Feedback Regulation Determines Cell Shape in Root Hair Cells. *Science*, 319(5867), 1241-1244. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1152505>
- Tang, L., et al. (2018). Variations in cadmium and nitrate co-accumulation among water spinach genotypes and implications for screening safe genotypes for human consumption. *J Zhejiang Univ Sci B*, 19(2), 147-158. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1700017>
- Tanner, C. C., & Headley, T. R. (2011). Components of floating emergent macrophyte treatment wetlands influencing removal of stormwater pollutants. *Ecological Engineering*, 37(3), 474-486. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2010.12.012>
- Teh, C. Y., et al. (2016). Recent Advancement of Coagulation–Flocculation and Its Application in Wastewater Treatment. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(16), 4363-4389. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b04703>
- Thomas, M. (2021). A comparative study of the factors affecting uptake and distribution of Cd with Ni in barley. *Plant Physiology and Biochemistry*, 162, 730-736. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.043>
- Tripathy, B. C., & Pattanayak, G. K. (2012). Chlorophyll Biosynthesis in Higher Plants. In J. J. Eaton-Rye, B. C. Tripathy, & T. D. Sharkey (Eds.), *Photosynthesis: Plastid Biology, Energy Conversion and Carbon Assimilation* (pp. 63-94). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1579-0_3
- Tumpa, K., et al. (2021). The Effect of Seed Size on Germination and Seedling Growth in Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Forests*, 12(7), 858. <https://www.mdpi.com/1999-4907/12/7/858>
- Türker, O. C., et al. (2016). Phyto-management of boron mine effluent using native macrophytes in mono-culture and poly-culture constructed wetlands. *Ecological Engineering*, 94, 65-74.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552(Pt 2), 335-344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Tursun, N., et al. (2011). Seasonal dynamics of soluble carbohydrates in rhizomes of *Phragmites australis* and *Typha latifolia*. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(8), 731-735. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.01.011>
- Unyayar, S., et al. (2006). Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis*, 21(1), 77-81. <https://doi.org/10.1093/mutage/gel001>
- Uruç Parlak, K. (2016). Effect of nickel on growth and biochemical characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, 76, 1-5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.njas.2012.07.001>

- Van Belleghem, F., et al. (2007). Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 173(3), 495-508. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01940.x>
- van der Ent, A., et al. (2016). Delimiting soil chemistry thresholds for nickel hyperaccumulator plants in Sabah (Malaysia). *Chemoecology*, 26(2), 67-82. <https://doi.org/10.1007/s00049-016-0209-x>
- Van der Pas, L., & Ingle, R. A. (2019). Towards an Understanding of the Molecular Basis of Nickel Hyperaccumulation in Plants. *Plants*, 8(1).
- Vatamaniuk, O. K., et al. (2000). Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31451-31459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002997200>
- Vavasseur, A., et al. (2009). Des plantes pour depolluer ou stabiliser des elements toxiques dans les sols et les eaux. *Biofutur*(295), 23.
- Velasquez, S. M., et al. (2011). O-glycosylated cell wall proteins are essential in root hair growth. *Science*, 332(6036), 1401-1403. <https://doi.org/10.1126/science.1206657>
- Verkleij, J. A. C., et al. (2009). Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 10-22. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.05.009>
- Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
- Vitória, A. P., et al. (2003). Structural Changes in Radish Seedlings Exposed to Cadmium. *Biologia Plantarum*, 46(4), 561-568. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000041062.00539.7a>
- Vymazal, J. (2013). The use of hybrid constructed wetlands for wastewater treatment with special attention to nitrogen removal: A review of a recent development. *Water Research*, 47(14), 4795-4811. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.029>
- Vymazal, J., & Březinová, T. (2016). Accumulation of heavy metals in aboveground biomass of *Phragmites australis* in horizontal flow constructed wetlands for wastewater treatment: A review. *Chemical Engineering Journal*, 290, 232-242. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.12.108>
- Wallace, A., & Berry, W. L. (1989). DOSE-RESPONSE CURVES FOR ZINC, CADMIUM, AND NICKEL IN COMBINATIONS OF ONE, TWO, OR THREE. *Soil Science*, 147(6). https://journals.lww.com/soilsci/fulltext/1989/06000/dose_response_curves_for_zinc_cadmium_and_nickel.4.aspx
- Wang, D., et al. (2022). The *Phragmites* Root-Inhabiting Microbiome: A Critical Review on Its Composition and Environmental Application. *Engineering*, 9, 42-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.05.016>
- Wang, L., et al. (2021). Warming enhances the cadmium toxicity on macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verd. seedlings. *Environmental Pollution*, 268, 115912. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115912>
- Wang, M.-q., et al. (2019). Transcriptomic analysis of *Verbena bonariensis* roots in response to cadmium stress. *BMC Genomics*, 20(1), 877. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6152-9>
- Wang, S., et al. (2010). Responses of growth and antioxidant metabolism to nickel toxicity in *Luffa cylindrica* seedlings. *J Anim Plant Sci*, 7(2), 810-821.
- Wang, T. C., et al. (1996). Parameters for removal of toxic heavy metals by water milfoil (*Myriophyllum spicatum*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(5), 779-786. <https://doi.org/10.1007/s001289900257>
- Wang, Y., et al. (2023). Effects of biochar on heavy metal speciation and microbial activity in red soil at a mining area. *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04904-x>
- Wójcik, M., et al. (2005). Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens*: II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany*, 53(2), 163-171. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.03.011>
- Wood, B. W., et al. (2004). Mouse-ear of Pecan: A Nickel Deficiency. *HortScience HortSci*, 39(6), 1238-1242. <https://doi.org/10.21273/hortsci.39.6.1238>
- Wood, B. W., et al. (2006). Field deficiency of nickel in trees: symptoms and causes. *Acta Hort* 83-98. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.721.10>

- Wu, J., et al. (2022). Investigating *Phragmites australis* response to copper exposure using physiologic, Fourier Transform Infrared and metabolomic approaches. *Functional Plant Biology*, 49(4), 365-381. <https://doi.org/10.1071/fp21258>
- Wu, J., et al. (2019). The speciation and distribution characteristics of Cu in *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex. Steudel. *Plant Biology*.
- Wu, W., et al. (2018). Regional risk assessment of trace elements in farmland soils associated with improper e-waste recycling activities in Southern China. *Journal of Geochemical Exploration*, 192, 112-119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2018.06.009>
- Xing, J. (2003). Study on the mechanism of cadmium resistance in *Phragmites australis*. *Acta Ecologica Sinica*.
- Xu, P., et al. (2013). Critical review of desalination concentrate management, treatment and beneficial use. *Environmental Engineering Science*, 30(8), 502-514.
- Yadav, S. C. (2019). Effects of Nickel on seed germination of *Pisum sativum*. *FLORA AND FAUNA*.
- Yadav, V., et al. (2021). Structural modifications of plant organs and tissues by metals and metalloids in the environment: A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 159, 100-112. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.047>
- Yamasaki, H., & Grace, S. C. (1998). EPR detection of phytophenoxyl radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H₂O₂-peroxidase system. *FEBS Letters*, 422(3), 377-380. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00048-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00048-9)
- Yang, D., et al. (2023). Effects of Ag nanoparticles on plant growth, Ag bioaccumulation, and antioxidant enzyme activities in *Phragmites australis* as influenced by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(2), 4669-4679. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22540-9>
- Yang, J., et al. (2017). The reliability evaluation of reclaimed water reused in power plant project. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science,
- Yang, Y., et al. (2011). Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress. *Ecotoxicol Environ Saf*, 74(4), 733-740. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.035>
- Ye, Z. H., et al. (1997). Zinc, Lead and Cadmium Tolerance, Uptake and Accumulation by the Common Reed, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. *Annals of Botany*, 80(3), 363-370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0456>
- Yeung, E. C. (2015). A Guide to the Study of Plant Structure with Emphasis on Living Specimens. In E. C. T. Yeung, C. Stasolla, M. J. Sumner, & B. Q. Huang (Eds.), *Plant Microtechniques and Protocols* (pp. 3-22). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-19944-3_1
- Yi, Y., et al. (2023). Cadmium Accumulation in Plants: Insights from Phylogenetic Variation into the Evolution and Functions of Membrane Transporters. *Sustainability*, 15(16).
- Yin, H., et al. (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*, 111(10), 5944-5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>
- Younis, M. E., et al. (2018). Symptomatic parameters of oxidative stress and antioxidant defense system in *Phaseolus vulgaris* L. in response to copper or cadmium stress. *South African Journal of Botany*, 117, 207-214. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.05.019>
- Yueya, C., et al. (2017). Artificial floating islands for water quality improvement. *Environmental Reviews*, 25(3), 350-357. <https://www.jstor.org/stable/90012982>
- Zelazny, E., & Vert, G. (2014). Plant nutrition: root transporters on the move. *Plant Physiology*, 166(2), 500-508. <https://doi.org/10.1104/pp.114.244475>
- Zha, Y., et al. (2021). Cloning of PCS gene (TpPCS1) from *Tagetes patula* L. and expression analysis under cadmium stress. *Plant Biology*, 23(3), 508-516.
- Zhang, C.-h., & Ge, Y. (2008). Response of Glutathione and Glutathione S-transferase in Rice Seedlings Exposed to Cadmium Stress. *Rice Science*, 15(1), 73-76. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1672-6308\(08\)60023-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1672-6308(08)60023-2)
- Zhang, H., et al. (2020). Overexpression of Trx CDSP32 gene promotes chlorophyll synthesis and photosynthetic electron transfer and alleviates cadmium-induced photoinhibition of PSII and PSI in tobacco leaves. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122899. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122899>

- Zhang, J. (2020). Chapter 8 - Recent trends and research strategies for wastewater treatment in China. In P. Singh, Y. Milshina, K. Tian, D. Gusain, & J. P. Bassin (Eds.), *Water Conservation and Wastewater Treatment in BRICS Nations* (pp. 169-186). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818339-7.00008-4>
- Zhang, N., et al. (2018). Resistance strategies of *Phragmites australis* (common reed) to Pb pollution in flood and drought conditions. *PeerJ*, 6, e4188. <https://doi.org/10.7717/peerj.4188>
- Zhang, Y. (2011). Phase II Enzymes. In M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer* (pp. 2853-2855). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16483-5_4510
- Zhao, F. J., et al. (2006). Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist*, 172(4), 646-654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01867.x>
- Zheng-yub, B. (2008). Resistance and Toxic Heavy Metal Uptake and Accumulation by *Phragmites Australis* in a Wetland. *Geological Science and Technology Information*.
- Zheng, N., et al. (2021). Responses of Soil Cadmium Desorption under Different Saline Environments and Its Controlling Factors. *Agronomy*, 11(11), 2175. <https://www.mdpi.com/2073-4395/11/11/2175>
- Zhou, Q., et al. (2022). Simultaneous biological removal of nitrogen and phosphorus from secondary effluent of wastewater treatment plants by advanced treatment: A review. *Chemosphere*, 296, 134054. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134054>
- Zonia, L. E., et al. (1995). Essential Role of Urease in Germination of Nitrogen-Limited *Arabidopsis thaliana* Seeds. *Plant Physiology*, 107(4), 1097-1103. <https://doi.org/10.1104/pp.107.4.1097>

Annexes

Annexe 1

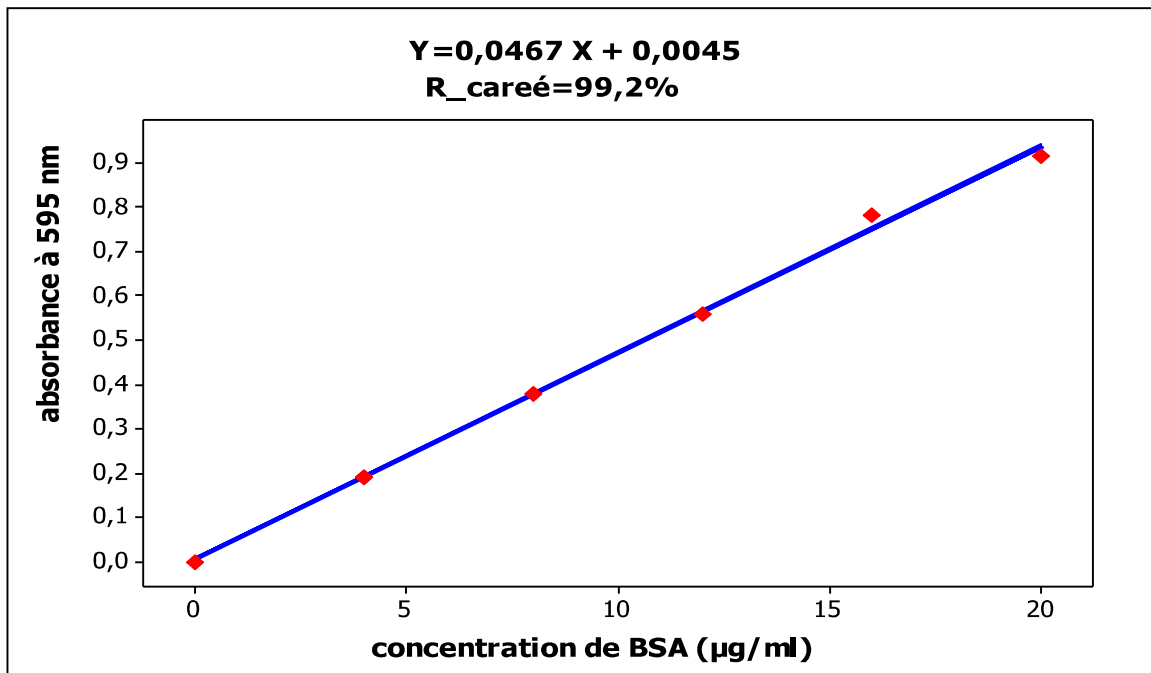


Fig. 01. Courbe d'étalonnage réalisée avec une solution d'albumine de sérum bovin (BSA)

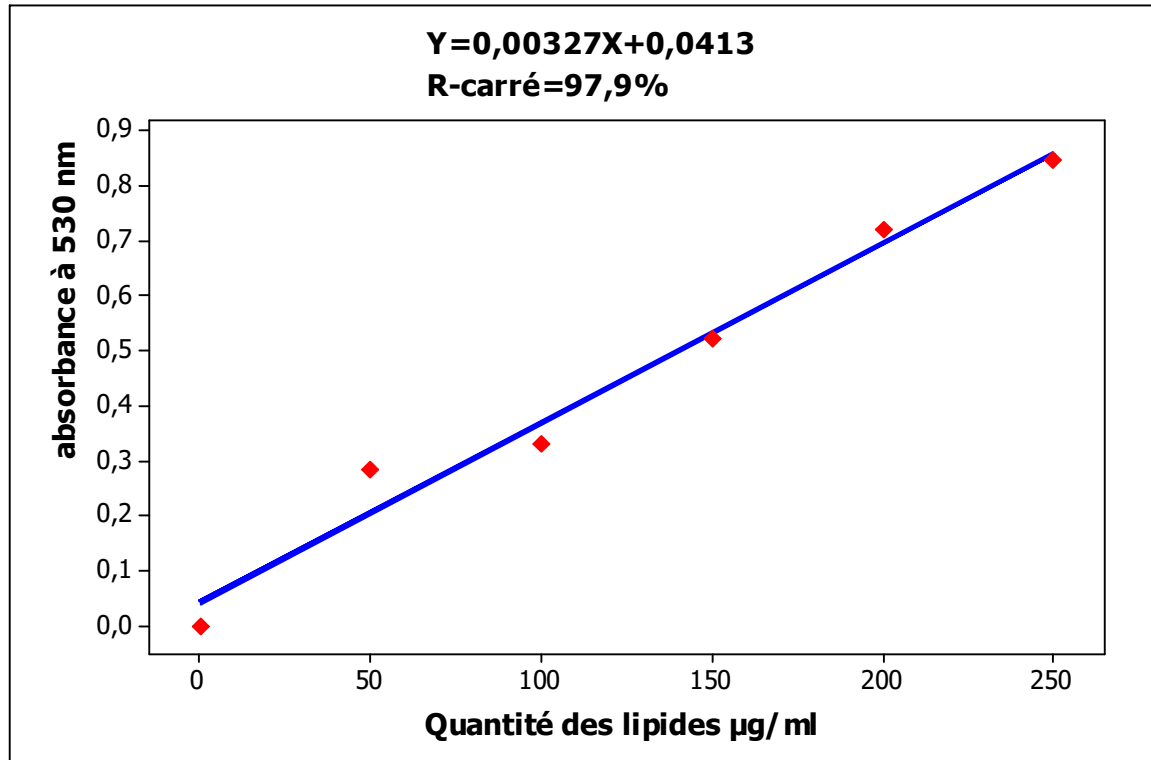


Fig. 02. Courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'une solution mère préparée avec de l'huile de tournesol

Annexe 2

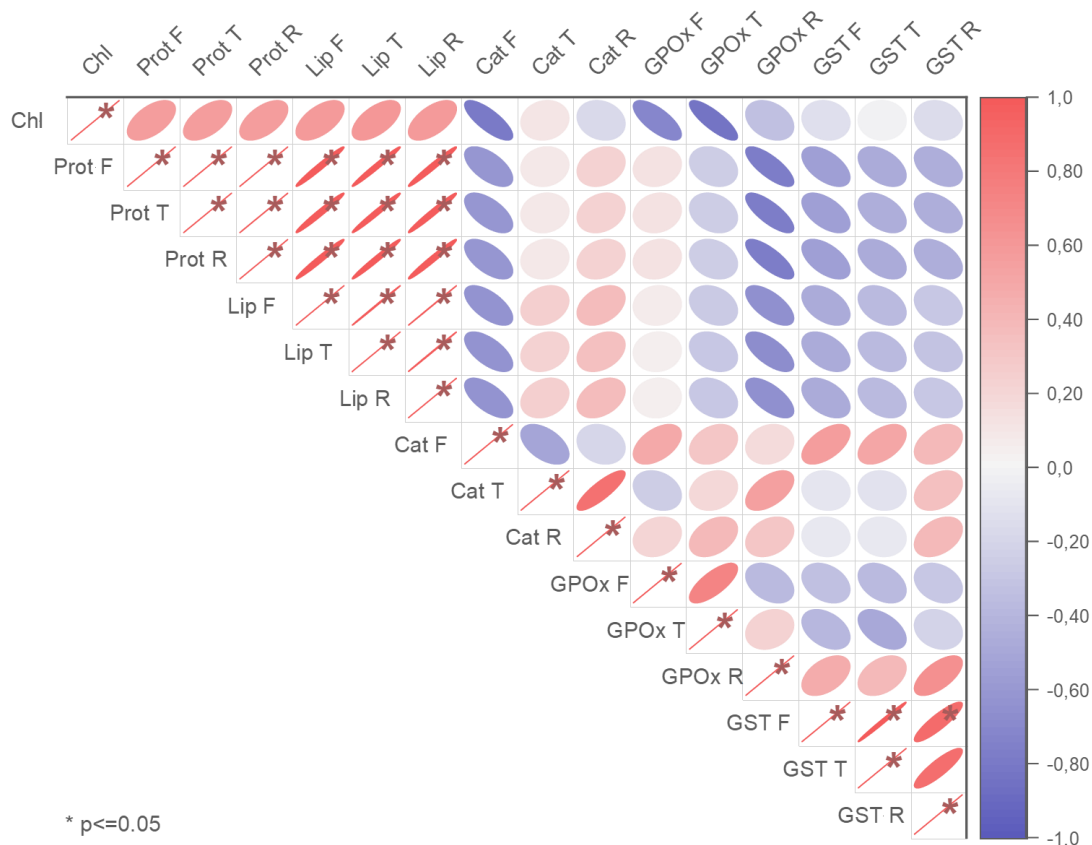


Fig. 1 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe contrôle. *Chl* (Chlorophylle), *Prot* (Protéine), *Lip* (Lipide), *CAT* (la Catalase), *GPOx* (la Guaïcol-Peroxydase) et *GST* (la glutathion-S-transférase). *F* : feuille, *T* : tige, *R* : racine. Les cases marquées d'une étoile (*) indiquent des corrélations statistiquement significatives au seuil de $p = 0,05$. Les corrélations positives sont affichées en rouge et les corrélations négatives en bleu. L'intensité de la couleur et la taille des ellipses sont proportionnelles aux coefficients de corrélation.

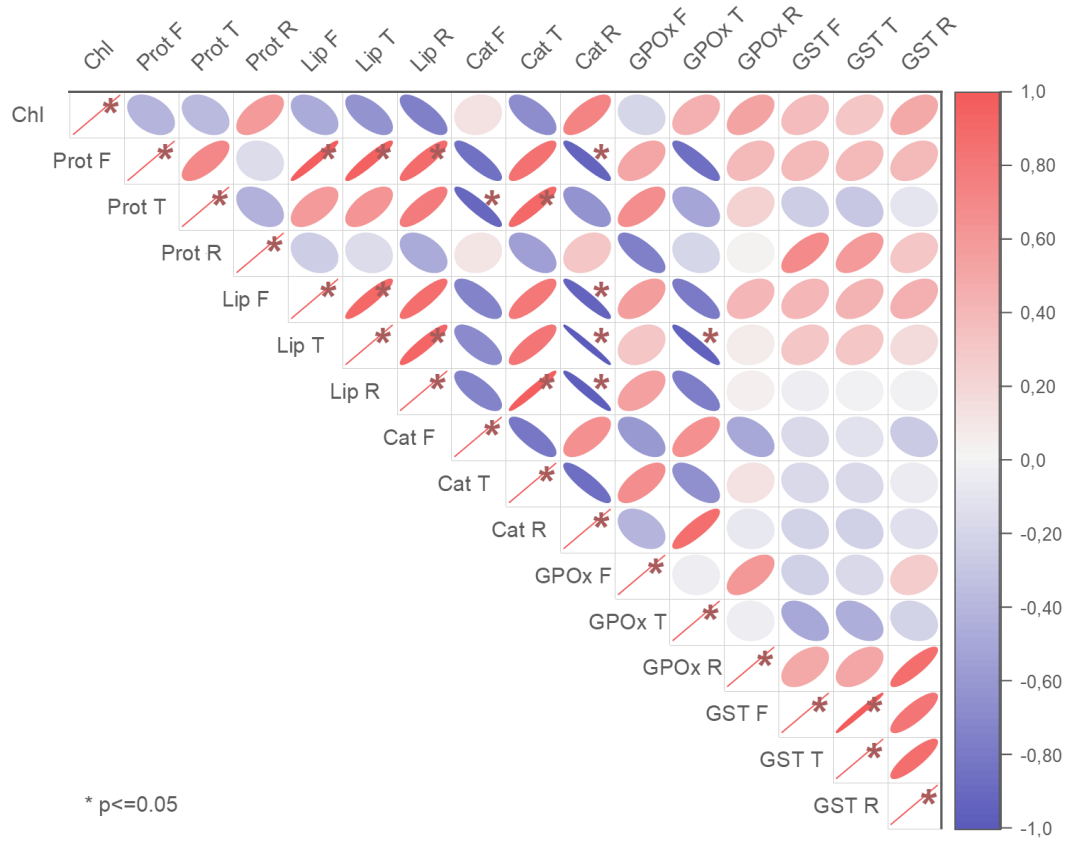


Fig. 2 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd_(10 ppb).

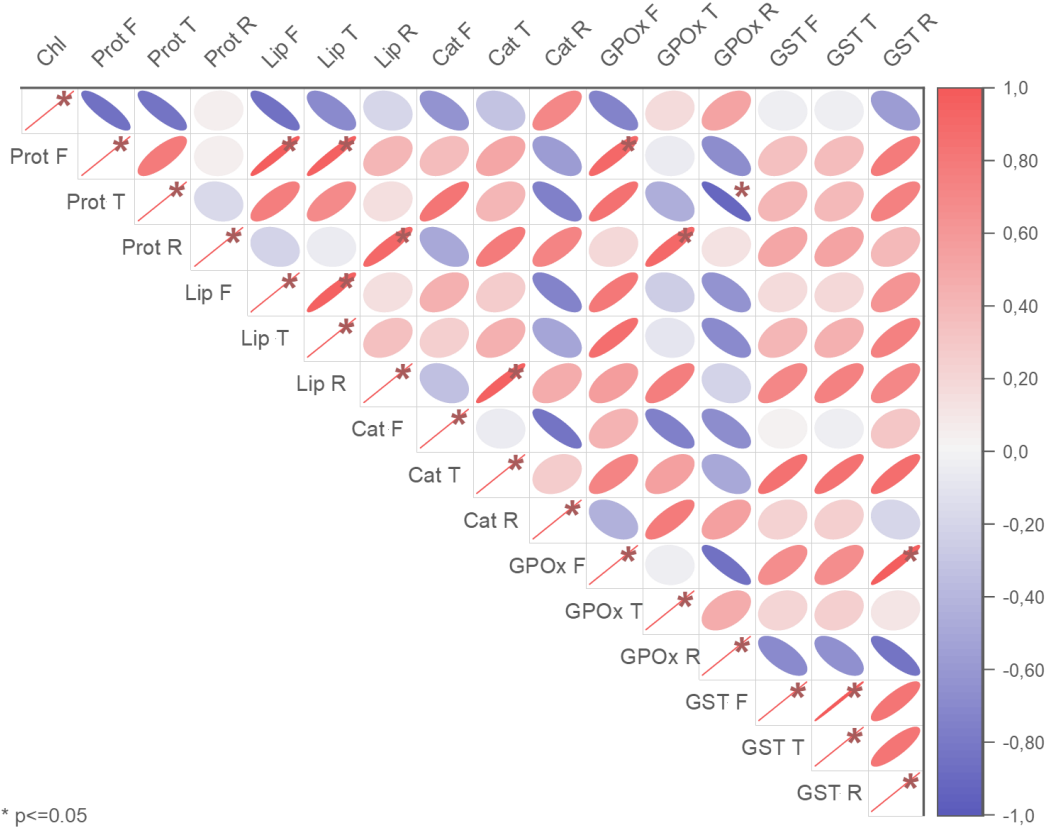


Fig. 3 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd_(30 ppb)

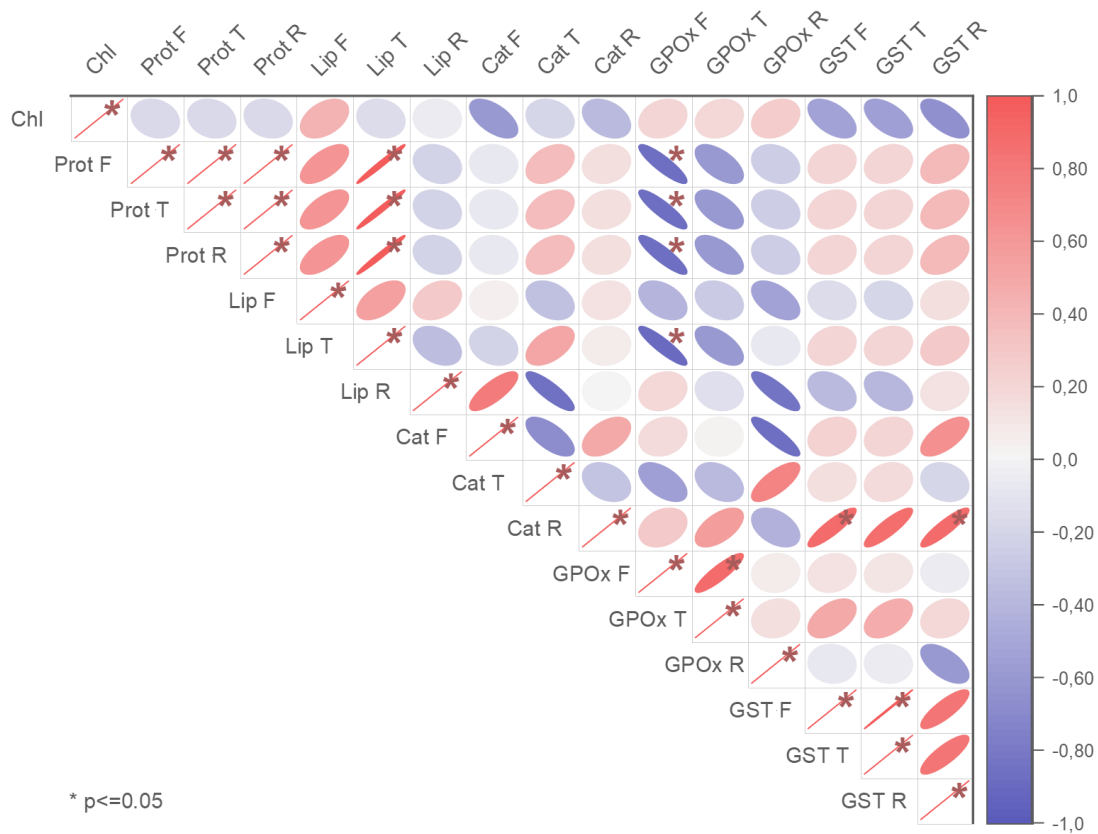


Fig. 4 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd(100 ppb).

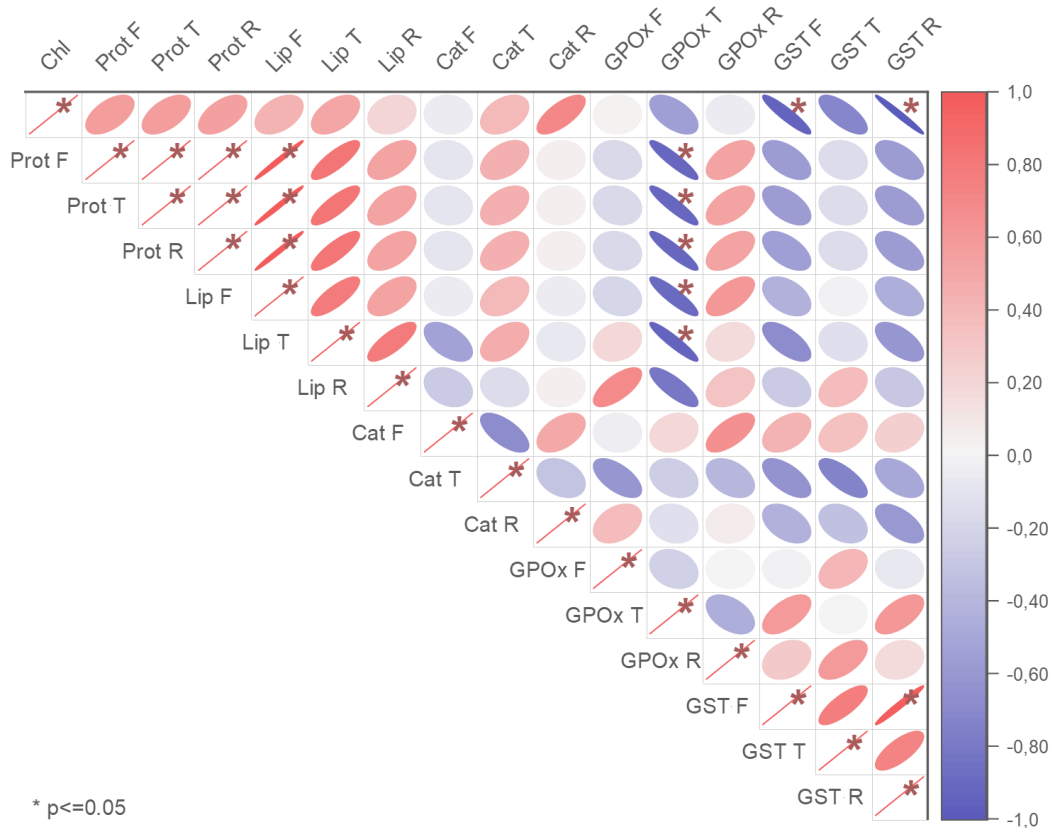


Fig. 5 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd(100 ppm)

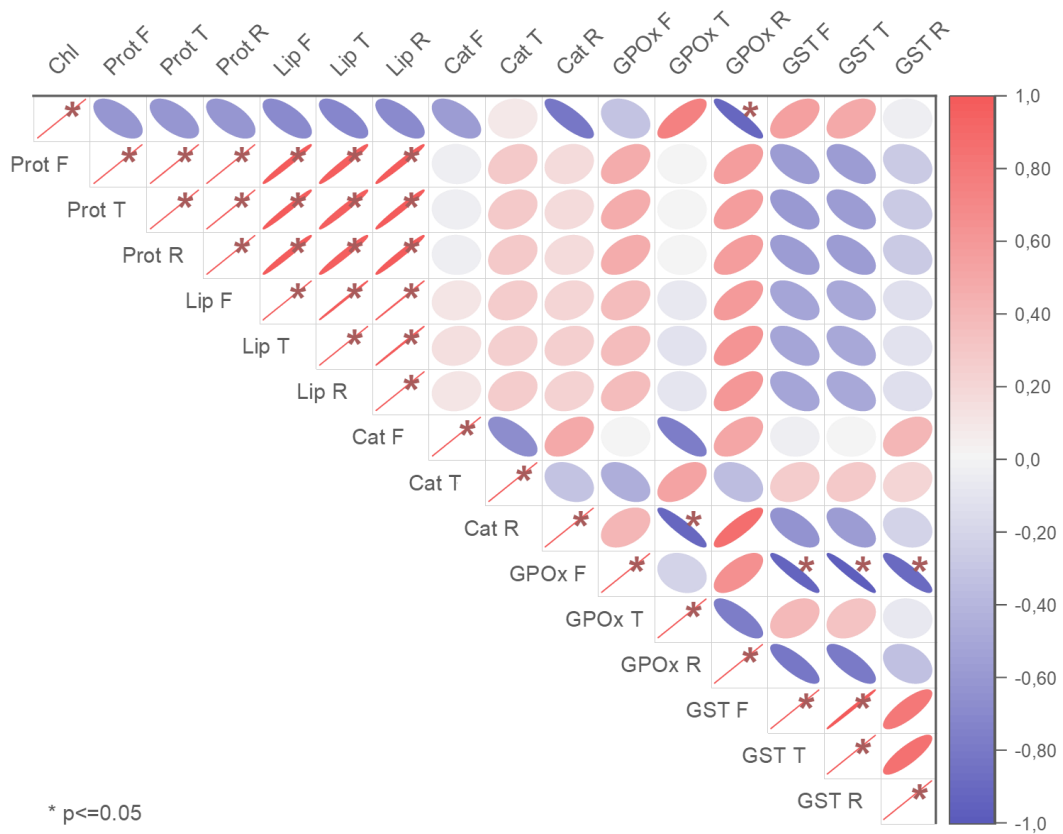


Fig. 6 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd(500 ppm).

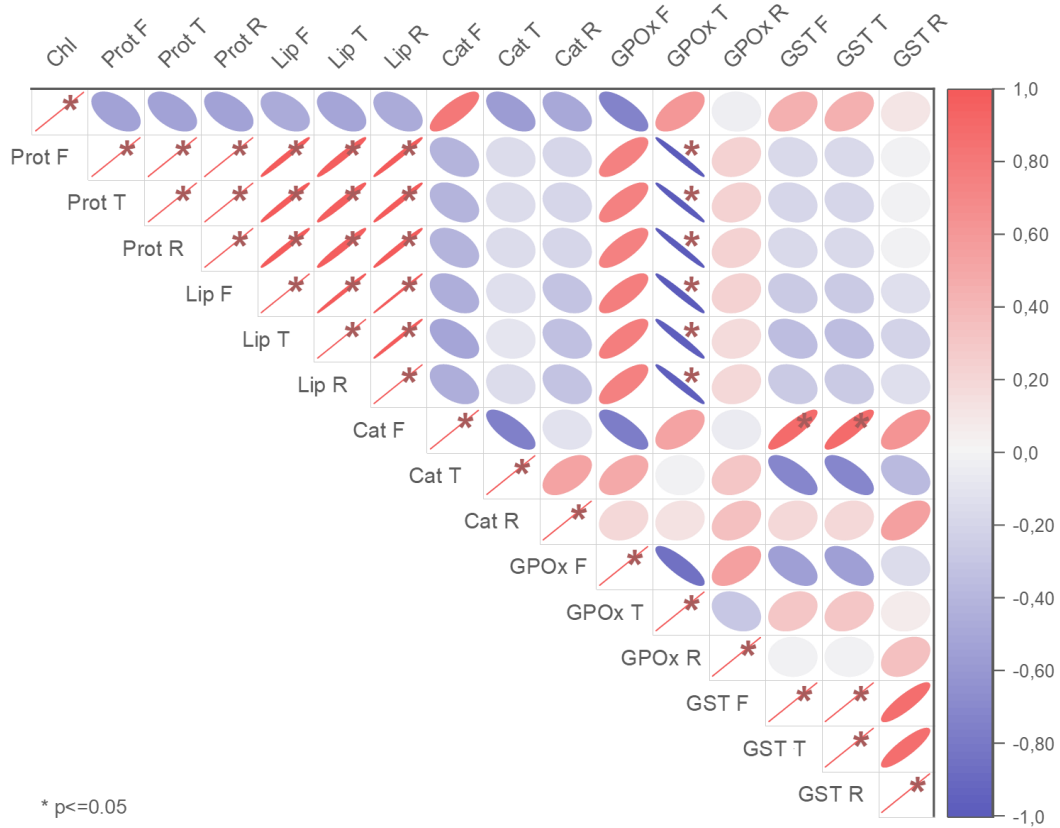


Fig. 7 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd(1000 ppm).

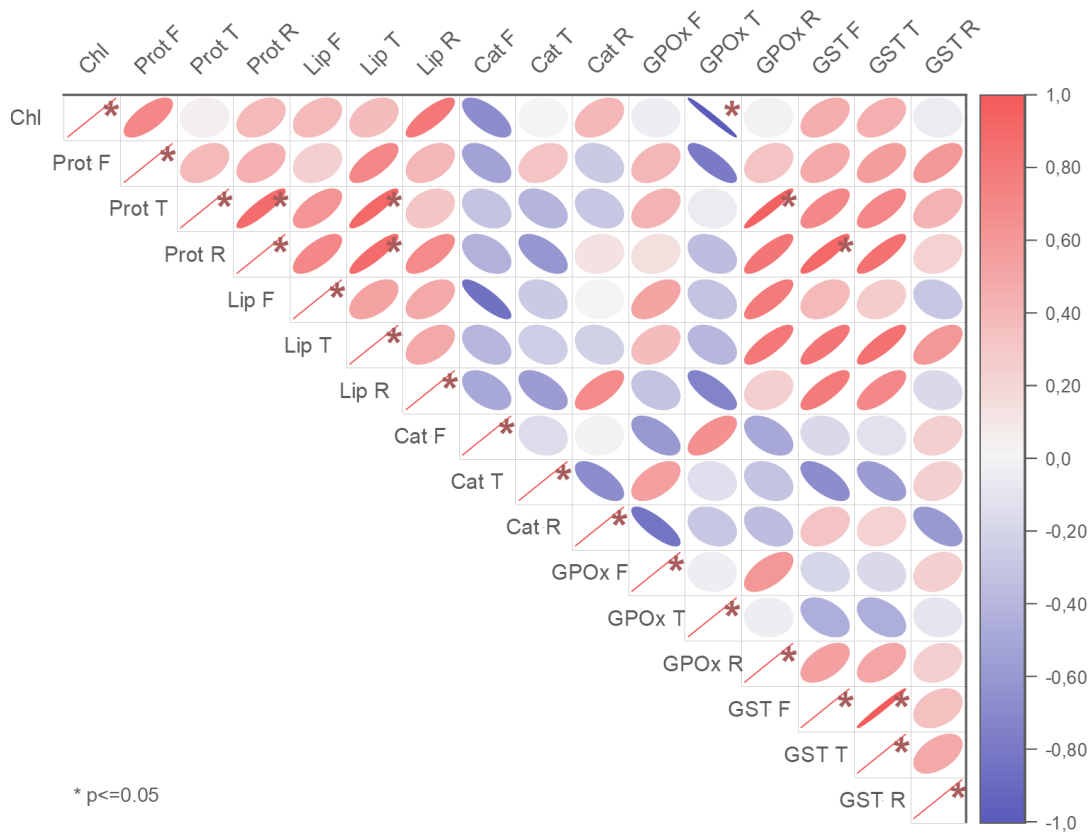


Fig. 8 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni_(30 ppb).

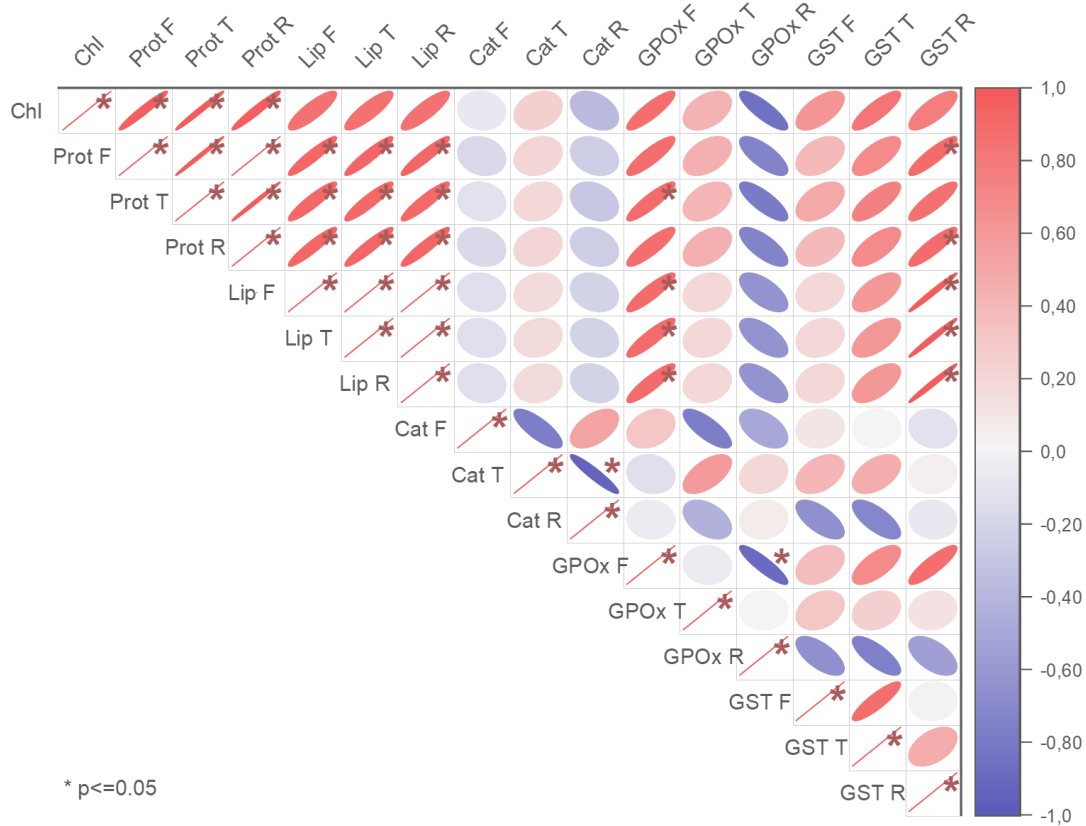


Fig. 9 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni_(60 ppb).

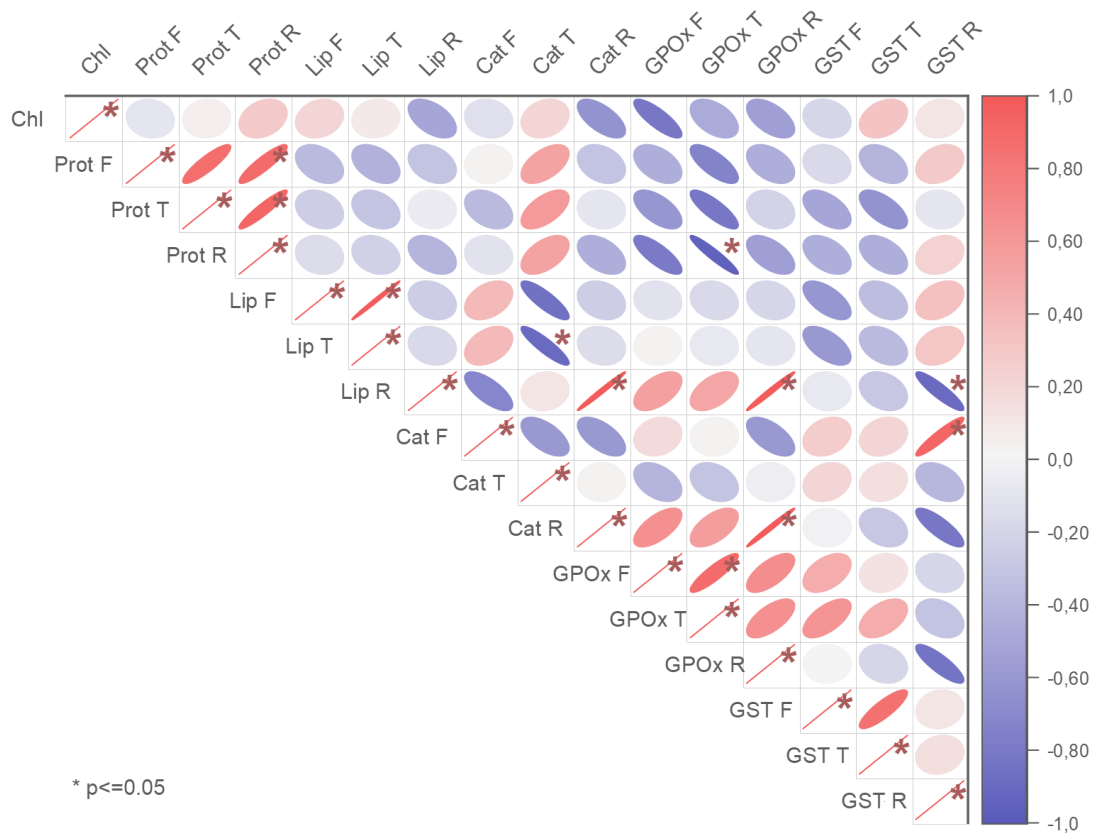


Fig. 10 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni(120 ppb).

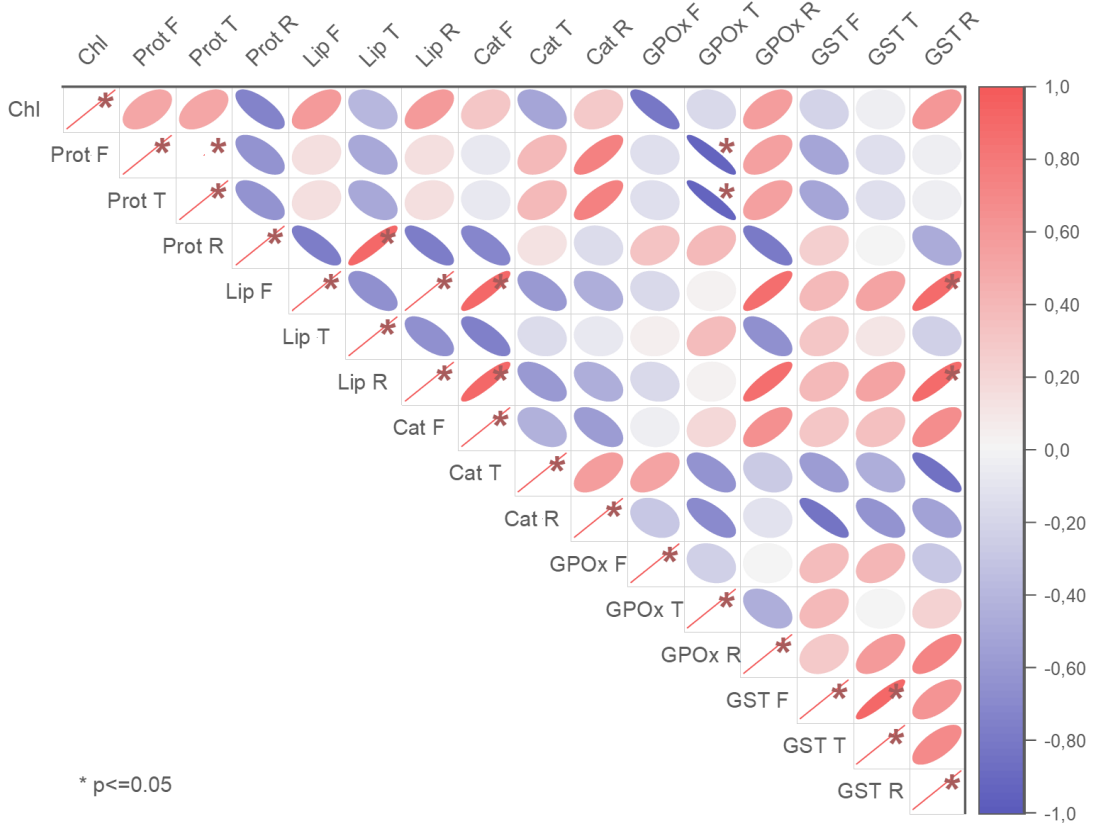


Fig. 11 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni(100 ppm).

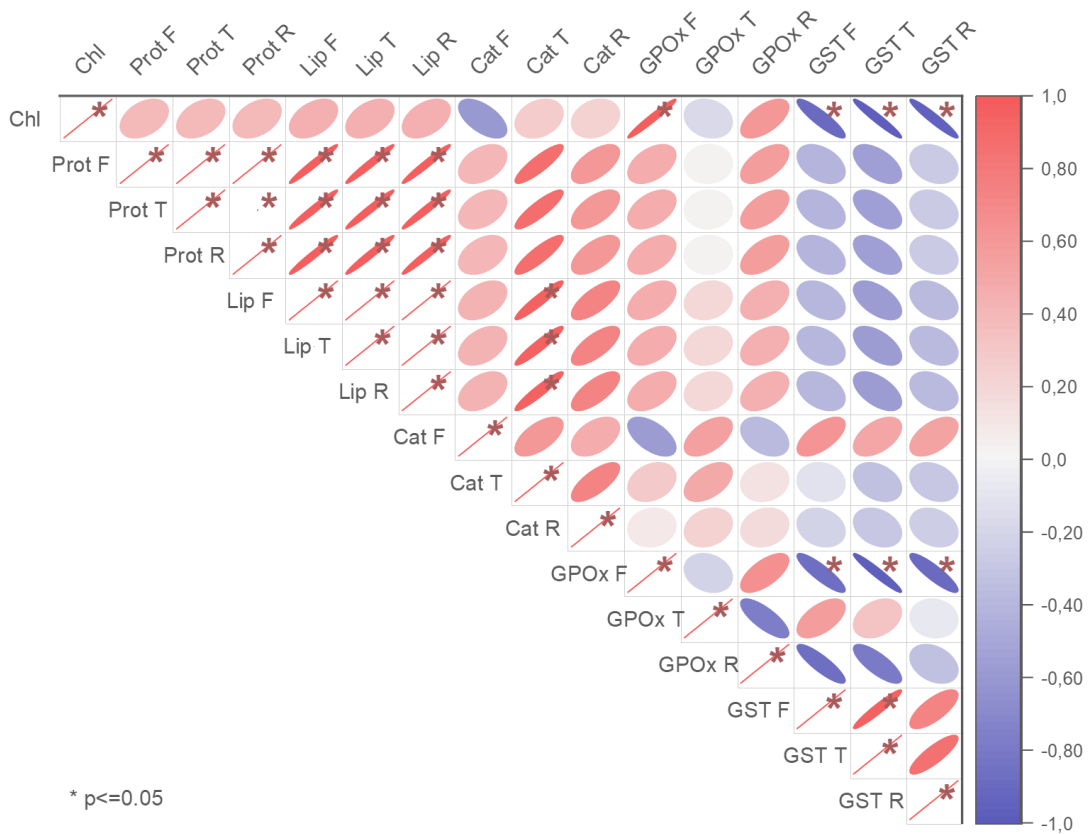


Fig. 12 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni(500 ppm).

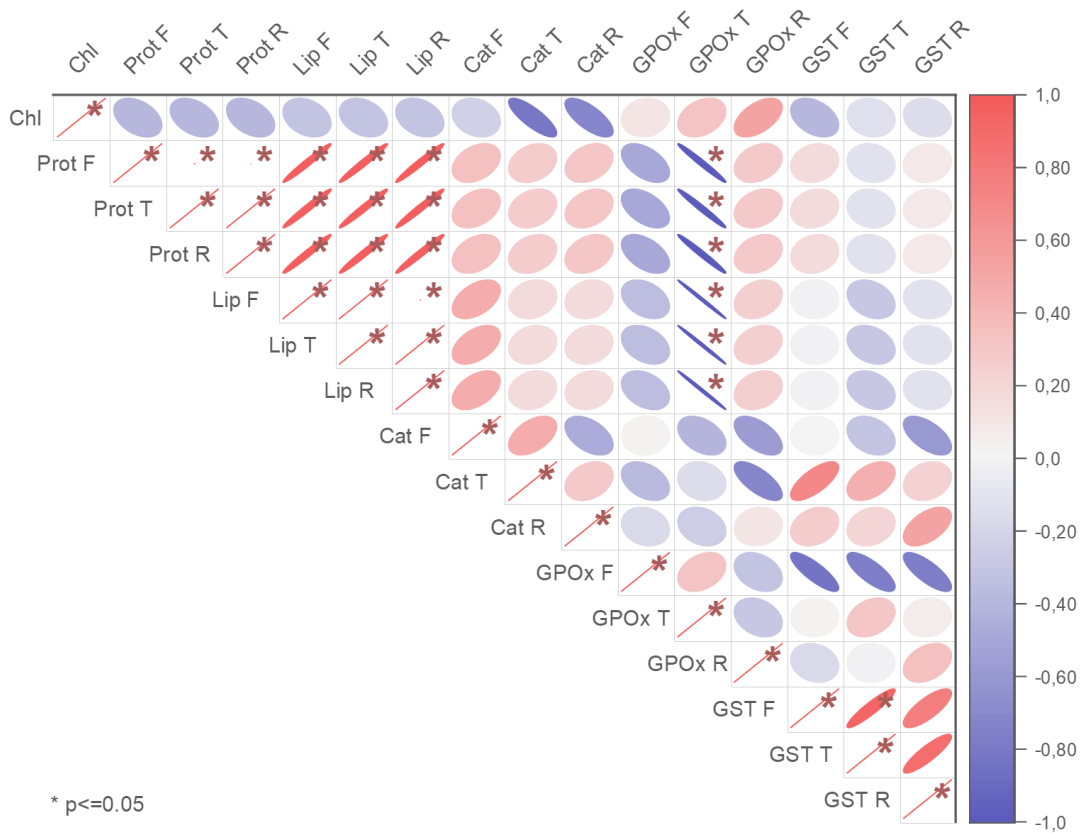


Fig. 13 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Ni(1000 ppm).

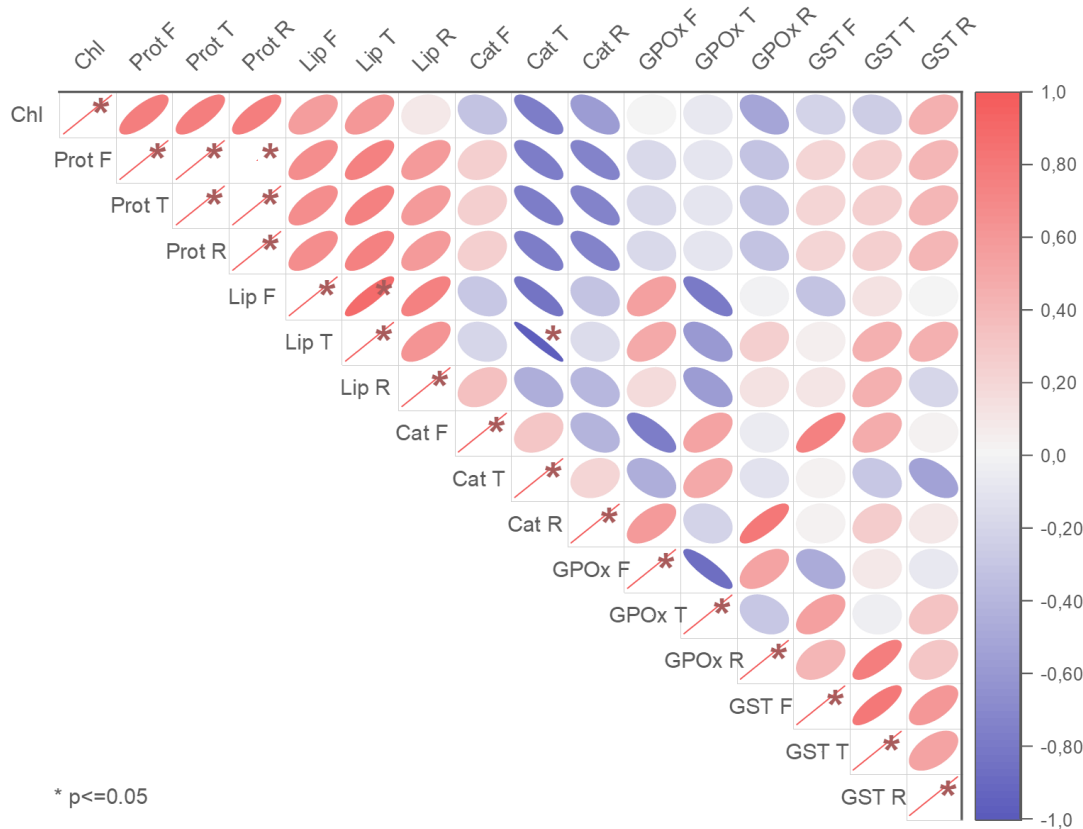


Fig. 14 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd(1000 ppm) + Ni(120ppb).

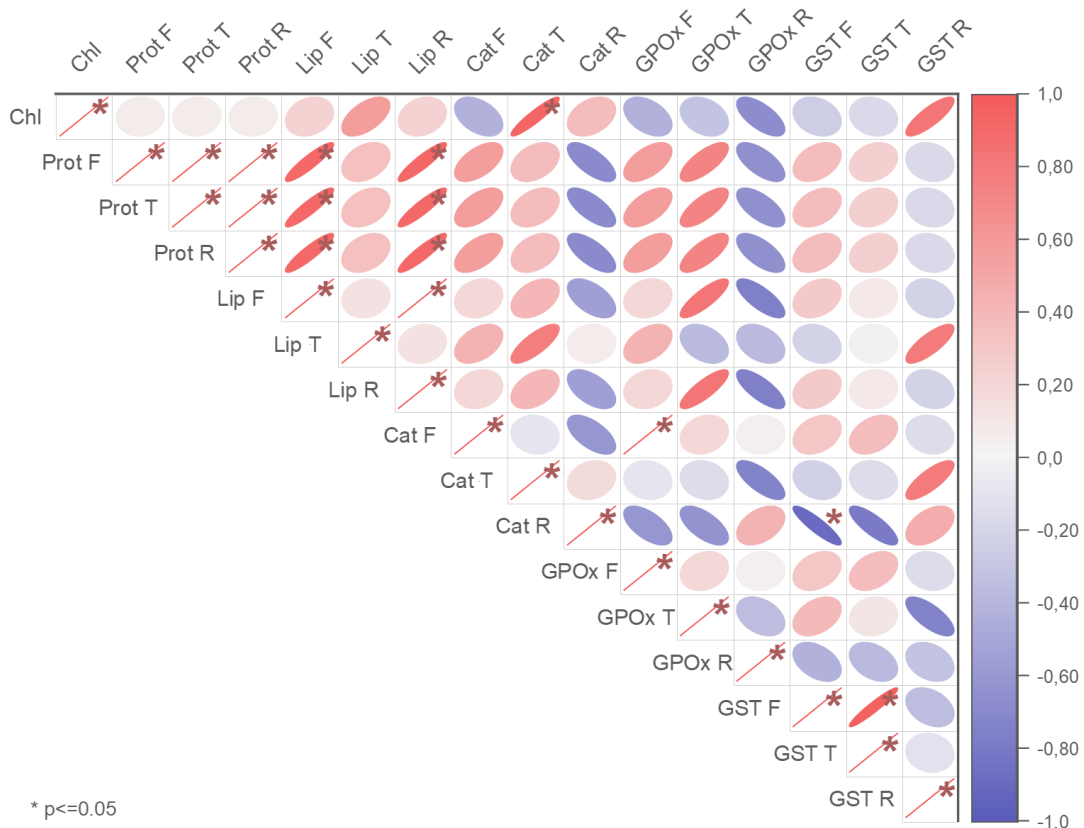


Fig. 15 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes des plantes du groupe exposé a Cd(100 ppm) + Ni(100 ppm).

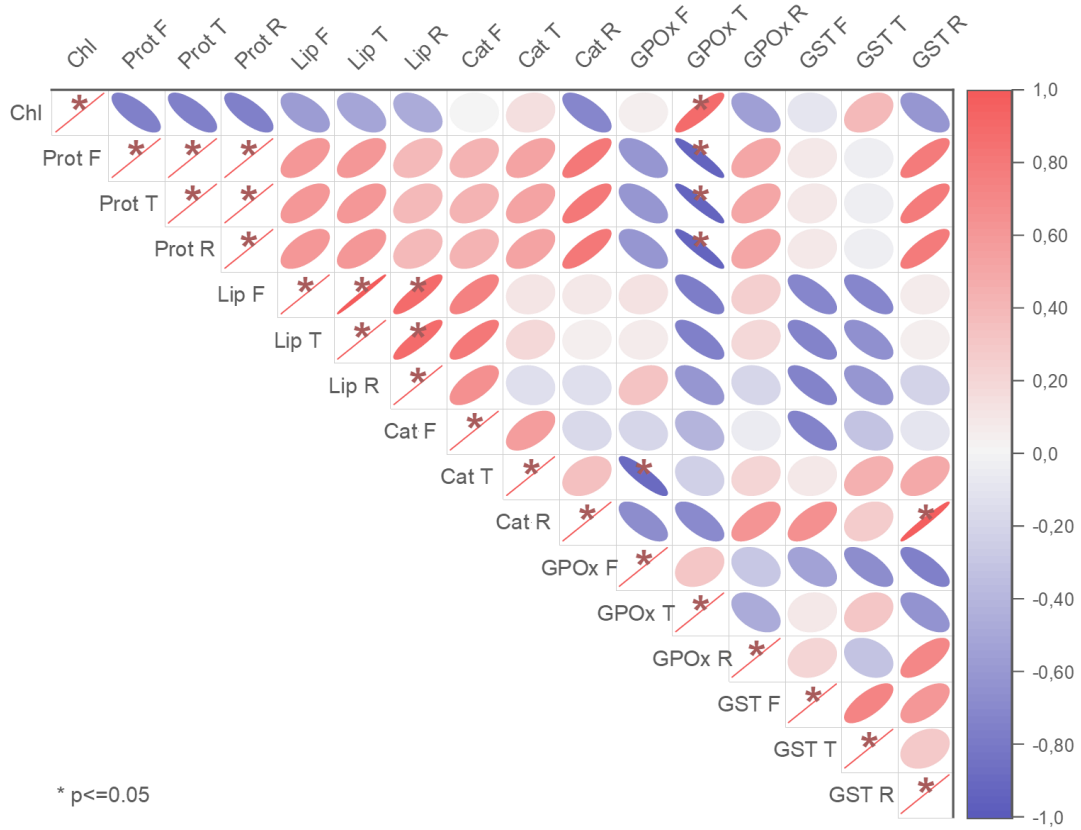


Fig. 16 : Matrice de corrélation de Spearman entre les paramètres métaboliques et enzymatiques mesurés dans les différents organes de *P. australis* exposée à $Cd_{(100\text{ ppb})} + Ni_{(1000\text{ ppm})}$.