

I. Matériel d'étude

1.1. La semence

Les semences d'*A. nummularia* proviennent de la plantation pastorale d'El Baraka à Ain Maabad, à 23Km Nord de la ville de Djelfa. La récolte des graines a été effectuée au mois de décembre 2012, cette récolte est réalisée sur des touffes d'*A. nummularia* présentant un bon état végétatif. Suivant le quadrillage kilométrique *Lambret* Nord de l'Algérie, les coordonnées géographiques de notre zone sont:

- 2°, 39' E longitude.
- 34°, 50' N latitude.
- 934 m d'altitude.

Après décortication manuelle de leurs valves fructifères (bractéoles), les graines sont désinfectées par un séjour de 10 minutes dans l'éthanol à 70 %, suivi de 10 minutes dans l'eau oxygénée 8 %, ensuite elles sont rincées 05 fois par l'eau distillée pour éliminer toute trace de produit désinfectant (Nedjimi et al., 2014).

1.2. Le chlorure de cadmium

Le facteur de variation étudié est le chlorure de cadmium(CdCl_2). Ce métal a été retenu car il est considéré avec d'autres cinq métaux lourds (Pb, Cu, Zn, Cr et Ni) comme les plus fréquemment trouvés dans le sol et les plus représentatifs de la contamination des sols (Lafuente et al., 2008). En plus sa forte mobilité le rend facilement absorbable par les plantes (Moussavou Moudouma, 2010).

Pour déterminer l'effet de CdCl_2 sur la germination et la croissance d'*A. nummularia* et cerner le seuil critique de sensibilité de cette espèce halophyte, nous avons utilisés différentes concentrations de CdCl_2 , c'est ainsi que 04 concentrations du sel du cadmium sont retenues dans ce travail (0, 100, 200 et 400 μM CdCl_2)

II. Démarche expérimentale

2.1. Test germinatif

Les graines sont mises à germer par lot de 100 graines pour chaque traitement dans les boîtes de pétri de 9cm de diamètre et tapissées de papier filtre stérilisé, en raison de 25 graines/boîte, soit 04 répétition par traitement (Nedjimi et al., 2014). Le papier filtre est humecté au départ, et ensuite toute les 24 heures avec 05 ml d'eau distillée (témoin) ou avec les différentes solutions de $CdCl_2$.

Les boîtes sont déposées dans un incubateur dont la température est réglée à $25\pm 1^\circ C$. La photopériode est de 16 heures de lumière et 08 heures d'obscurité, l'éclairage est assuré par un dispositif lumineux composé de tubes fluorescents.

Les graines germées sont dénombrées toutes les 24 heures, comme critère de germination, l'apparition d'une radicule de 1mm environ a été utilisé (Bajji et al., 1998).

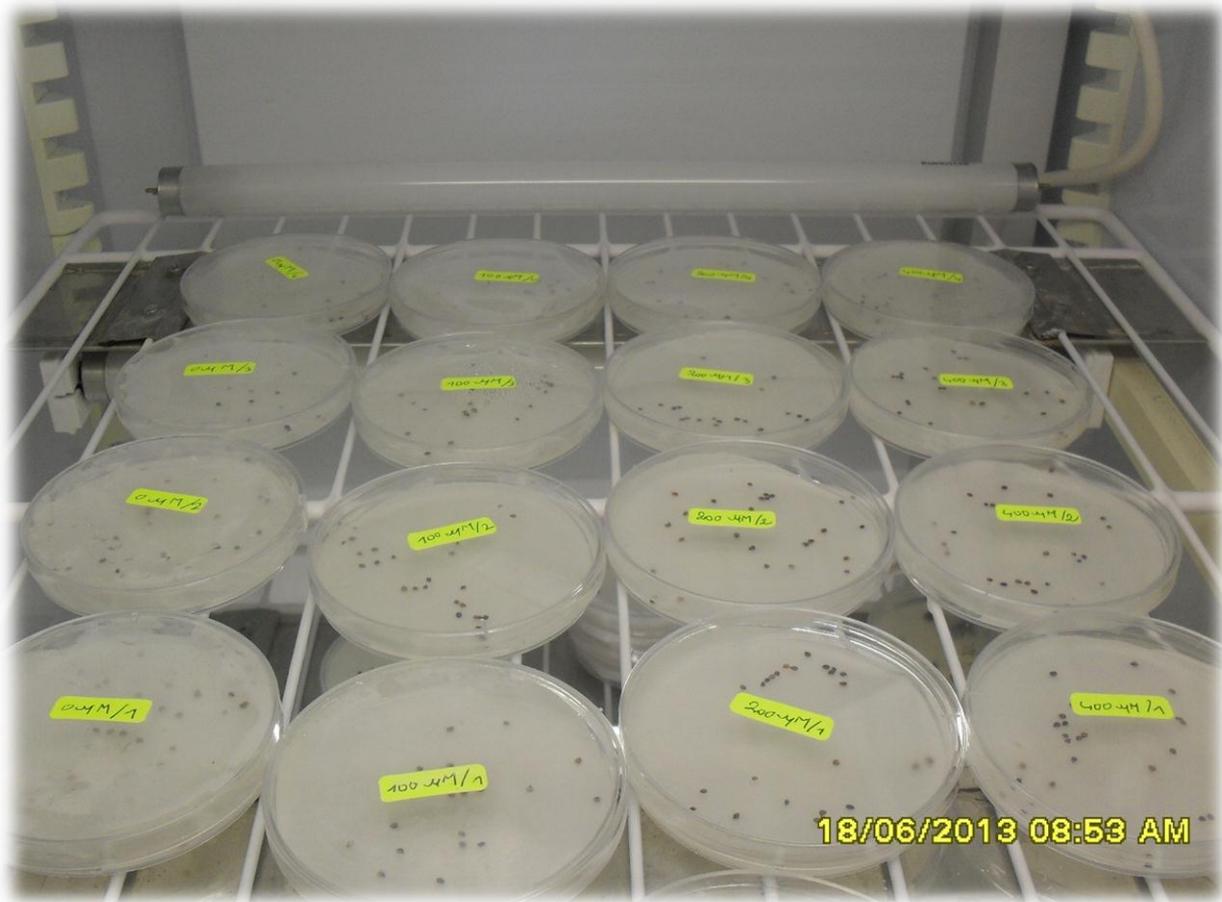


Figure 14. Mise en place des graines d'*A. nummularia* dans l'incubateur.

2.1.1. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental utilisé est le bloc aléatoire complet à un seul facteur de variation (Dagnelie, 1981). Le dispositif expérimental utilisé est présenté dans la **Figure 15** :

T ₂ r ₂	T ₁ r ₂	T ₂ r ₁	T ₂ r ₃
T ₁ r ₄	T ₃ r ₁	T ₀ r ₃	T ₁ r ₃
T ₁ r ₁	T ₃ r ₃	T ₀ r ₂	T ₂ r ₄
T ₀ r ₄	T ₀ r ₁	T ₃ r ₄	T ₃ r ₂

Figure 15. Schéma du dispositif expérimental du test germinatif.

2.2. Culture hydroponique

2.2.1. Repiquage

Après germination dans l'eau distillée, des plantules âgées de 7 jours sont placées dans des bacs de 2 litres contenant une solution nutritive modifiée de Hoagland continuellement aérée (Hoagland et Arnon, 1938), dont le pH est maintenu entre 5.5 et 6 par l'ajout de KOH.

Chaque traitement comporte 10 plantules (soit 10 répétitions par traitement). La solution est remplacée chaque semaine. Après 15 jours de culture, quand les plantules ont 22 jours elles sont traitées avec les différentes concentrations de CdCl₂.

L'expérience s'est déroulée dans une chambre de culture conditionnée dont la température et la photopériode sont contrôlées. La température est réglée à 25 °C ± 1° C, sous un éclairage de 400 μmol m⁻²s⁻¹ assuré par une série de Néons fluorescents. La photopériode est de 16 heures de lumière, et 8 heures d'obscurité (Nedjimi et Daoud, 2009a).

Les matières fraîches et sèches, la transpiration, la concentration de la chlorophylle, la teneur en proline et le dosage ionique ont été mesurés après 15 jours de traitement, quand les plantules sont âgées de 37 jours.

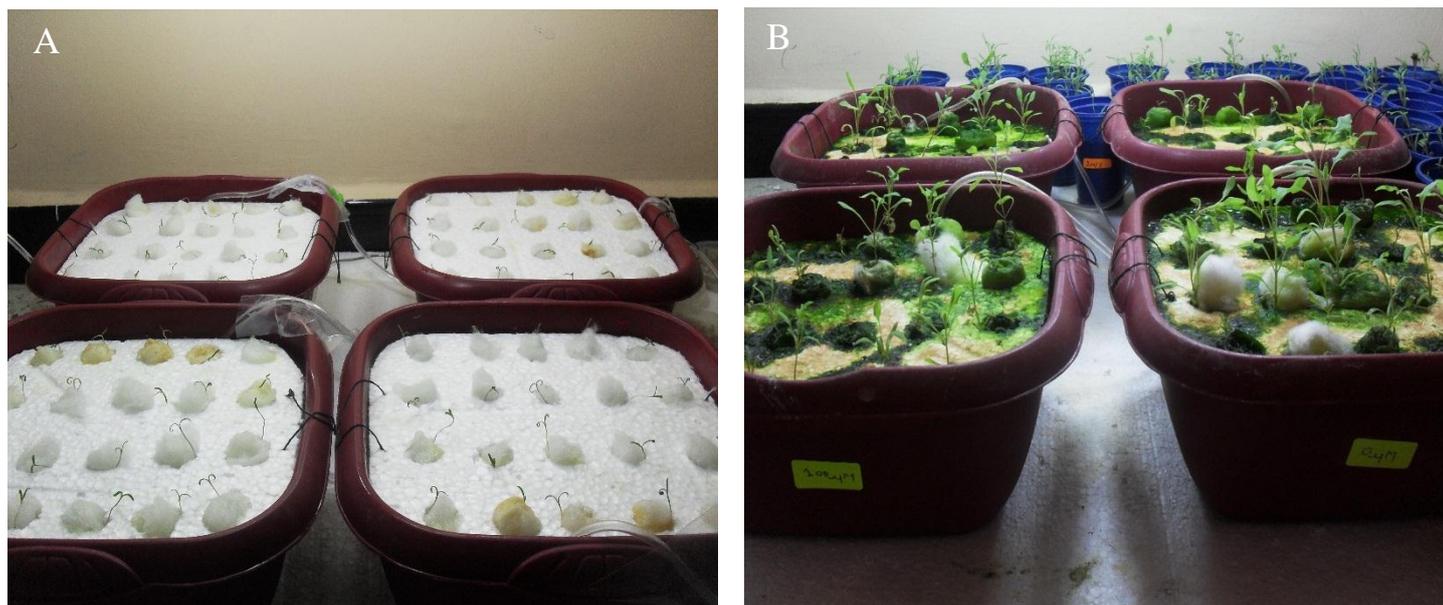


Figure 16. Culture hydroponique d'*A. nummularia*
A : 1^{er} jour de culture **B** : après 37 jours de culture.

2.2.2. Composition du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est composé de macro et micro éléments d'Hoagland et Arnon (1938) modifié:

Tableau 2. La composition du milieu de culture

Ca(NO₃)₂	2.5 mM
KCl	2.5 mM
MgSO₄	1.0 mM
Ca(H₂PO₄)₂	0.25 mM
H₃BO₃	12.5 μM
MnSO₄	1.0 μM
ZnSO₄	1.0 μM
CuSO₄	0.25 μM
(NH₄)₆Mo₇O₂₄	0.2 μM
Fe EDTA	10 μM

2.2.3. Description des différentes concentrations utilisées

Quatre (04) solutions de CdCl₂ ont été testées :

- T0 : eau distillée (témoin).
- T1: eau distillée contenant 100 µM CdCl₂.
- T2 : eau distillée contenant 200 µM CdCl₂.
- T3 : eau distillée contenant 400 µM CdCl₂.

2.2.4. Dispositif expérimental

L'expérience correspond à un ensemble de 04 traitements, chaque concentration est testée sur 10 plantes correspondant à 10 répétitions. Le dispositif expérimental utilisé est le bloc aléatoire complet (Dagnelie, 1981), dont les traitements correspondent aux différentes concentrations en CdCl₂ (**Figure 17**).

T ₂ r ₉	T ₀ r ₉	T ₀ r ₃	T ₂ r ₇	T ₁ r ₁₀	T ₀ r ₁₀	T ₀ r ₄	T ₃ r ₃	T ₃ r ₇	T ₀ r ₂
T ₃ r ₉	T ₁ r ₇	T ₃ r ₁₀	T ₁ r ₁	T ₀ r ₅	T ₁ r ₂	T ₂ r ₃	T ₁ r ₅	T ₃ r ₄	T ₂ r ₈
T ₀ r ₈	T ₀ r ₁	T ₁ r ₆	T ₀ r ₇	T ₃ r ₁	T ₁ r ₈	T ₃ r ₂	T ₁ r ₄	T ₂ r ₅	T ₂ r ₁₀
T ₀ r ₆	T ₁ r ₃	T ₃ r ₈	T ₂ r ₂	T ₂ r ₄	T ₂ r ₆	T ₃ r ₅	T ₃ r ₆	T ₁ r ₉	T ₂ r ₁

Figure 17. Schéma du dispositif expérimental de la culture hydroponique.

2.2.5. Les paramètres étudiés

2.2.5.1. La croissance

Les mesures ont lieu après 29 jours après la mise en culture, et portent sur 10 plantules pour chaque traitement. Les indicateurs de croissance considérée sont :

- Longueur de la partie aérienne et racinaire.
- Le nombre de feuilles.
- La matière fraîche de la partie aérienne et racinaire.
- La matière sèche de la partie aérienne et racinaire.
- La teneur en eau de la partie aérienne et racinaire.

Le poids de la matière fraîche (MF) des plantules a été rapidement déterminé après leur récolte à l'aide d'une balance de précision.

Le poids de la matière sèche (MS) des plantules a été obtenu après séchage des échantillons dans une étuve pendant 02 jours à 60°C.

La teneur en eau a été calculée par la formule suivante : $(M.F - M.S) \times 100/M.F$.

2.2.5.2. La transpiration

L'eau transpirée a été estimée à partir de la perte de poids sur une période de 6 h (11: 00-18: 00 h). La transpiration moyenne (par g de poids frais) a été calculée sur la base de la quantité d'eau transpirée par rapport au poids frais total de la plante (**Figure 18**).



Figure 18. Mesure de la transpiration.

2.2.5.3. Dosage des pigments chlorophylliens

La chlorophylle (a et b) est extraite selon la méthode décrite par Arnon (1949) qui consiste en une macération du végétal dans de l'acétone ; le végétal est coupé en petits morceaux et broyé à l'aide d'un mortier dans de l'acétone à 80 %. Après le broyage total, la solution obtenue est filtrée et mise dans des boîtes noires (pour éviter l'oxydation de la chlorophylle par la lumière) puis on procède à la lecture des densités optiques des solutions à l'aide d'un spectrophotomètre à deux longueurs d'ondes : 645 et 663 nm, après l'étalonnage de l'appareil avec la solution témoin d'acétone à 80%.

$$CH\ a\ (\text{mg/l}) = 12,41\ DO\ (663) - 2,59\ DO\ (645).$$

$$CH\ b\ (\text{mg/l}) = 22,9\ DO\ (645) - 4,68\ DO\ (663).$$

$$CH\ t = CH\ a + CH\ b.$$

CH a: concentration en chlorophylle a.

CH b: concentration en chlorophylle b.

CH t: concentration en chlorophylle totale.

DO : densité optique.

2.2.5.4. Dosage de la proline

La méthode utilisée est celle de Troll et Lindsley (1955) simplifiée par Dreier et Goring (1974). Elle consiste à prendre 100mg de matière végétale. Puis à ajouter 3ml de méthanol à 40 %. Le tout est chauffé à 85°C dans un bain marie pendant 1 heure. Après refroidissement, on prélève 1ml d'extrait auquel il faut ajouter :

- 1ml d'acide acétique (CH_3COOH).
- 25mg de ninhydrine ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$).
- 1ml de mélange contenant : (120ml d'eau distillée; 300ml d'acide acétique; 80ml d'acide orthophosphorique (H_3PO_4 , $d = 1.7$)).

Le mélange est porté à ébullition durant 30mn, la solution vire au rouge, après refroidissement, 5ml de benzène sont rajoutés à la solution qui est agitée. Deux phases se séparent (une phase supérieure et une phase inférieure). Après avoir éliminer la phase inférieure, la phase supérieure est récupérée et déshydratée par l'ajout d'une spatule de sulfate du sodium Na_2SO_4 anhydre.

La lecture est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 528nm. Les valeurs obtenues sont converties en teneur de proline à partir de courbe étalon construit à partir des échantillons contenant des quantités de proline à concentration connue.

2.2.5.5. Dosage ionique

La préparation des échantillons consiste à prendre un poids déterminé de la matière végétale sèche (aérienne et racinaire) puis le compresser sous forme de capsules.

La lecture de ces échantillons est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à rayons X (la méthode XRF) (**Figure 19**).

Afin de pouvoir déterminer les teneurs du Cd, Fe, Ca et K dans les échantillons à analyser, nous avons appliqué la méthode comparative qui nécessite la connaissance parfaite de la teneur en ces éléments contenus dans un standard.

La mesure de la concentration des éléments (Cd, Fe, Ca et K) a été déduite par comparaison directe avec les teneurs connues du même élément dans le standard.

La concentration des éléments dans l'échantillon est donnée par l'expression suivante:

$$C_x = C_s \times \frac{I_x \cdot m_x}{I_s \cdot m_s}$$

C_x: concentration élément dans l'échantillon

C_s: concentration élément dans le standard

m_x: masse de l'échantillon

m_s: masse du standard

I_x: intensité nette élément dans l'échantillon

I_s: intensité nette élément dans le standard



Figure 19. Disposition des échantillons dans le spectrophotomètre à rayons X.

2.2.5.6. Translocation du cadmium

La translocation du cadmium de la solution nutritive vers la plante (BAC) et des racines vers la partie aérienne (TF) est déterminée par les formules suivantes :

- **Coefficient de Bioaccumulation (BAC) :**

$$\text{BAC} = [\text{Cd}] \text{ PA} / [\text{Cd}] \text{ solution} \quad (\text{Liu et al., 2009}).$$

- **Facteur de Translocation (TF) :**

$$\text{TF} = [\text{Cd}] \text{ PA} / [\text{Cd}] \text{ PR} \quad (\text{Riffat et al., 2010}).$$

[Cd] PA : concentration du cadmium de la partie aérienne.

[Cd] PR : concentration du cadmium de la partie racinaire.

[Cd] solution : concentration du cadmium dans la solution nutritive.

2.2.6. Analyse statistique

Les résultats sont soumis à une analyse de la variance (ANOVA) à un facteur de variation, avec le test de *Tukey* au seuil de 5% ($P < 0.05$) pour identifier les groupes homogènes. Le logiciel utilisé est STATISTICA version 10.0.