



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de MASTER en biologie
Spécialité : Protection de l'environnement

Thème

Contribution à l'étude du stress métallique sur le Colza (*Brassica napus*) soumis à différentes doses de plomb : Approche expérimentale.

Soutenu le 28/10/2015

Présenté par :

M^r AMROUCHE Omar.

Devant le jury :

Président : M^r OUDJIANE. A

Promoteur : M^r ASLA. T

Examineur1 : M^r BENGHANEM. N

Examineur2 : M^r MEUDJBEUR. D

MAA. UMMTO

MAA .UMMTO

MAA. UMMTO

MAA. UMMTO

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mon promoteur M^r Asla.T pour son suivi et ses conseils précieux tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

J'exprime également ma gratitude aux membres du jury M^r OUDJIANE.D, M^r BENGHANEM.N, et M^r MEUDJBER.D qui m'ont honoré en acceptant de juger ce modeste travail.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Toutes les louanges sont à Allah.

Dédicaces

Je tiens à dédier ce modeste travail à :

*Mes très chers parents
Mon frère Madjid,
Ma sœur Kahina
Kima*

*Mes très chers amis:
Massi, Kouceila, Hamou, Khaled*

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, en mal ou
en bien à me donner la volonté de réaliser ce travail.*

Farid

Liste des figures

Figure 1 : Evolution de la production mondiale de plomb depuis 5 000 ans. (National Academy of Sciences, 1980).....	01
Figure 2 : Dynamique du plomb dans le système sol-plante (Alloway, 1995).....	06
Figure 3 : Interactions au niveau de la rhizosphère entre le sol, la plante et les microorganismes, influençant la phytodisponibilité (Lombi <i>et al.</i> , 2001).....	07
Figure 4 : Processus d'extraction, d'absorption des contaminants présents dans le sol, (Interstate Technology and Regulatory Cooperation work group ITRC, 2001).....	11
Figure 5 : Schéma de principe de traitement des sols pollués par phyto-extraction (Emilie chevrier, 2013).....	12
Figure 6 : Schéma représentant une phytoextraction induite par des chélateurs (Salt <i>et al.</i> 1998).....	14
Figure 7 : Schéma représentant une phytoextraction continue (Salt <i>et al.</i> , 1998).....	16
Figure 8 : The soil-plant system showing the key components concerned with the dynamics of heavy metal (Alloway, 1995).....	20
Figure 9 : Interactions chimiques ayant lieu dans la rhizosphère (hinsinger, 2001).....	23
Figure 10 : Coupe longitudinale de racine (Gobat et al., 1998).....	24
Figure 11 : Coupe transversale de racine, avec le passage des ions selon les voies symplastiques et apoplastiques (Gobat et al, 1998).....	25
Figure 12 : Représentation schématique d'une cellule végétale, avec représentation des zones impliquées dans la séquestration du plomb (1 à 4) (Pourrut Bertrand, 2008).....	33
Figure 13 : Structure chimique d'une phytochélatine (Pourrut Bertrand, 2008).....	34
Figure 14 : Voies de passage des racines de l'eau et des minéraux depuis le sol vers le système vasculaire : symplaste et apoplaste (Thomas DURAN, 2008).....	40
Figure 15 : Trois stratégies de réponse à la présence de métaux lourds dans l'environnement (Callahan, 2006).....	42
Figure 16 : Site d'expérimentation (ITMAS) (Photo Google Earth , 2015).....	43
Figure 17 : La plante de <i>Brassica napus</i> (Photo originelle, 2014).....	44
figure 18 : Graines de <i>Brassica napus</i> (Photo originelle, 2014).....	44
Figure 19 : Structure chimique de l'EDTA.....	46
Figure 20 : Pots (unités expérimentales) Photo originelle, 2014.....	47
Figure 21 : Présentation du dispositif expérimental en bloc aléatoire complet (Photo originelle, 2014).....	48
Figure 22 : Le dispositif expérimental (P : la dose de plomb, E : la dose d'EDTA, B : le bloc).....	49
Figure 23 : Récolte du colza (Photo originelle, 2014).....	51
Figure 24 : Rinçage des racines de colza. (Photo originelle, 2014).....	51
Figure 25 : Séchage à l'étuve (Photo originelle, 2014).....	51
figure 26 : Le matériel végétal broyé (Photo originelle, 2014).....	51
Figure 27 : Spectrophotomètre UV 9200 (Photo originelle, 2015).....	55

Liste des figures

Figure 28 : Courbe étalon du glucose.....	56
Figure 29 : Tube à essai contenant la fraction de proline de couleur rose (Photo originelle, 2015).....	56
Figure 30 : Courbe étalon de la proline.....	58
Figure 31 : Minéralisation sous la hotte (Photo originelle, 2014).....	58
Figure 32 : Récupération de la matière minérale (Photo originelle, 2014).....	59
Figure 33 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(1).....	64
Figure 34 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(2).....	65
Figure 35 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses de Plomb (P1,P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(3).....	66
Figure 36 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(4).....	66
Figure 37 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(1).....	67
Figure 38 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(2).....	68
Figure 39 : distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(3).....	68
Figure 40 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(4).....	69
Figure 41 : Corrélation entre les concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et les doses de plomb.....	71
Figure 42 : Corrélation entre les concentrations en sucres solubles de la partie racinaire et les doses de plomb.....	73
Figure 43 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(1).....	74
Figure 44 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(2).....	75
Figure 45 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(3).....	75

Liste des figures

Figure 46 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(4).....	76
Figure 47 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(1).....	77
Figure 48 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(2).....	77
Figure 49 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(3).....	78
Figure 50 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses d'EDTA(E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(4).....	79
Figure 51 : Corrélation entre les concentrations en proline de la partie aérienne et les doses de Plomb.....	81
Figure 52 : Corrélation entre les concentrations en proline de la partie racinaire et les doses de Plomb.....	83
Figure 53 : Rapport de transfert des sucres solubles (Aérienne/Racinaire) en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4).....	83
Figure 54 : Rapport de transfert de la proline (Aérienne / Racinaire) en fonction des doses de plomb.....	84

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales propriétés physico-chimiques du plomb.....	1
Tableau 2 : Voies d'exposition au plomb (Laperche et <i>al</i> , 2004).....	4
Tableau 3 : Exemples de métaux accumulés : J.L. Morel, G. Bitton, C. Schwartz, M. Schiavon. (1997). Rapport pour l'OCDE Ecotoxicology: responses, biomarkers and risk assessment.....	19
Tableau 4 : Les différentes doses d'EDTA utilisées et les pH résultants.....	47
Tableau 5 : Résultats d'analyse du sol.....	62
Tableaux 6 : Résultats de l'analyse de variance des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne pour les deux facteurs « plomb » et « EDTA ».....	70
Tableau 7 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS de la variable « sucres solubles » de la partie aérienne pour les différentes doses de Plomb	70
Tableau 8 : Résultats de l'analyse de variance des concentrations en sucres solubles de la partie racinaire pour les deux facteurs « plomb » et « EDTA ».....	72
Tableau 9 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS de la variable « sucres solubles » de la partie racinaire pour les différentes doses de Plomb.....	72
Tableau 10 : Résultats de l'analyse de variance des concentrations en proline de la partie aérienne pour les deux facteurs « Plomb » et « EDTA ».....	79
Tableau 11 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS de la variable « proline » de la partie aérienne pour les différentes doses de Plomb.....	80
Tableau 12 : Résultats de l'analyse de variance des concentrations en proline de la partie racinaire pour les deux facteurs « Plomb » et « EDTA »	81
Tableau 13 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS de la variable « proline » de la partie racinaire pour les différentes doses de Plomb	82

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale

Chapitre I : Pollution des sols par le Plomb (Pb)

I.1. Généralités sur le plomb.....	1
I.1.1. Propriétés physico-chimiques du Plomb.....	1
I.1.2. Le plomb dans l'environnement.....	1
I.1.2.1. Histoire de l'utilisation du plomb.....	1
I.1.2.2. Les sources de pollution par le Plomb.....	1
I.1.2.3. Les différentes formes de plomb dans l'environnement.....	1
I.1.3. les voies de pénétration du plomb dans l'organisme.....	4
I.2. La phytodisponibilité du plomb.....	4
I.2.1. Notion de phytodisponibilité.....	5
I.2.2. la distribution du plomb dans le sol	5
I.2.3. les facteurs influençant la phytodisponibilité du plomb	7

Chapitre II : La phytoextraction

Introduction.....	10
II.1 La phytoextraction.....	10
II.2. Description du procédé de phytoextraction	11
II.3. Les différents types de phytoextraction.....	12
II.3.1. La phytoextraction induite.....	12
II.3.1.1. Concept de la phytoextraction induite.....	12
II.3.1.2. Développement de la phytoextraction induite.....	14
II.3.2. La phytoextraction continue.....	15
II.3.2.1. Concept de la phytoextraction continue	15
II.3.2.2. Développement de la phytoextraction continue	15
II.4. Les avantages et limites de la phytoextraction	16
II.4.1. Les avantages.....	16
II.4.2. Les limites.....	16
II.4.2.1. Limites liées à la nature de la pollution.....	17
II.4.2.2. Limites de mise en œuvre des techniques : (in-situ)	17
II.4.2.3. Limites liées aux caractéristiques du sol, de la pollution et des polluants.....	17
II.5. Paramètres complémentaires influençant la phytoextraction	18
II.5.1. Profondeur de la pollution.....	18
II.5.2. Fertilité physique et chimique du sol	18
II.5.3. Concentration des polluants.....	18
II.5.4. Application d'un agent chélateur	18
II.6. Caractéristiques des espèces utilisées en phytoextraction.....	19
II.7. Le plomb dans le système sol-plante.....	20
II.7.1. Mécanisme d'interaction sol-plante (impact des activités racinaires)	21
II.7.1.1. Modification du pH.....	21
II.7.1.2. Modification des concentrations ioniques dans la rhizosphère.....	21

II.7.2.3. Exsudation d'acides organiques dans la rhizosphère.....	21
II.7.2.3.1. Définition.....	21
II.7.2.3.2. Nature.....	21
II.7.2.3.3. Rôle	22
II.8. Absorption du plomb par la plante	22
II.8.1. Rappel de la structure racinaire.....	23
II.8.2. Mécanisme d'absorption.....	24
II.8.2.1. Absorption racinaire.....	24
II.8.2.1.1. Transfert du plomb du sol vers les racines.....	24
II.8.2.1.2. Translocation du plomb des racines vers les parties aériennes.....	28
II.8.2.2. Absorption foliaire	29
II.8.3. Effets du plomb sur la plante.....	29
II.8.3.1. Actions sur les activités enzymatiques.....	29
II.8.3.2. Effets sur la nutrition minérale.....	30
II.8.3.3. Stress hydrique.....	30
II.8.3.4. Génération de stress oxydant.....	30
II.8.3.5 Croissance et morphogénèse.....	31
II.8.4. Mécanismes de tolérance.....	32

Chapitre III: Le stress métallique

III.1. Phytotoxicité des métaux lourds.....	36
III.2. Effet du stress métallique sur les plantes.....	36
III.2.1. Effet du stress métallique sur l'activité enzymatique.....	36
III.2.2. Accumulation des acides aminés.....	37
III.2.3. Accumulation de glucides solubles.....	38
III.3. Tolérance aux métaux lourds.....	39
III.4. Accumulation et compartimentation des métaux lourds.....	39
III.5. Stratégies d'adaptation des plantes au stress métallique.....	40

Chapitre IV : Matériels et méthodes

IV.1. Présentation de la zone d'étude.....	43
IV.2. Matériel utilisé.....	43
IV.2.1. Matériel biologique.....	43
IV.2.1.1. Classification botanique phyllogénétique du colza (Mounnah, 2008).....	44
IV.2.1.2. Morphologie de la plante.....	44
IV.2.1.3. Caractéristiques du colza.....	45
IV.2.2 Matériel physique.....	46
IV.2.2.1. Le sol.....	46
IV.2.2.2. Le métal.....	46
IV.2.2.3. L'E.D.T.A.....	46
IV.3. Méthodes.....	47
IV.3.1. Préparation du sol.....	47
IV.3.2. Dispositif expérimental.....	48
IV.3.3. Chronologie de l'expérimentation.....	50
IV.3.3.1. Test de germination.....	50
IV.3.3.2. Semi.....	50
IV.3.3.3. Suivi de la culture.....	50
IV.3.3.4. Ajout d'EDTA.....	50
IV.3.3.5. La récolte.....	51

IV.4. Méthodes d'analyse.....	52
IV.4.1. Analyses physico-chimiques du sol.....	52
IV.4.1.1. Détermination du pH.....	52
IV.4.1.2. Conductivité électrique au conductimètre sur une suspension terre/liquide de 1/5 .	53
IV.4.1.3. Analyse granulométrique.....	53
IV.4.1.4. Détermination de l'humidité du sol.....	53
IV.4.1.5. Le carbone organique : méthode de Walkey-Black (attaque au froid).....	53
IV.4.1.6. Matière organique.....	54
IV.4.1.7. Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldhal.....	54
IV.4.1.8. Rapport C/N.....	54
IV.4.1.9. Dosage du calcaire total.....	54
IV.5. Analyse du matériel végétal.....	54
IV.5.1. Extraction et Dosage des sucres solubles.....	54
IV.5.1.1. Extraction des sucres solubles.....	55
IV.5.1.2. Dosage des sucres solubles.....	55
IV.5.1.3. Préparation de la courbe étalon.....	56
IV.5.2. Extraction et dosage de la proline	57
IV.5.2.1. Mode opératoire	57
IV.5.2.2. Préparation de la courbe étalon.....	58
IV.5.3. Minéralisation et dosage du plomb.....	59
IV.5.3.1. Minéralisation	59
IV.5.3.2. Dosage du plomb.....	61

Chapitre V : Résultat et discussion

V.1. Caractéristiques physico-chimiques du sol.....	62
V.1.1 La granulométrie.....	63
V.1.2 Le pH.....	63
V.1.3 Calcaire total.....	63
V.1.4 La CEC.....	63
V.1.5 La matière organique.....	63
V.2. Analyse des données statistiques.....	63
V.2.1. Analyse des données statistiques de la variable « sucres solubles ».....	64
V.2.1.1. Facteur « Plomb (Pb) ».....	64
V.2.1.1.1 Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E1) d'EDTA	64
V.2.1.1.2. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E2) d'EDTA	65
V.2.1.1.3. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E3) d'EDTA	65
V.2.1.1.4. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E4) d'EDTA	66
V.2.1.2. Facteur « EDTA (E) ».....	67
V.2.1.2.1. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P1) de Plomb.....	67
V.2.1.2.2. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P2) de Plomb.....	67
V.2.1.2.3. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P3) de Plomb.....	68
V.2.1.2.4. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P4) de Plomb	69
V.2.1.3. Analyse de variance pour la variable « sucres soluble » de la partie	69

aérienne à deux facteurs « Plomb » et « EDTA ».....	
V.2.1.3.1. Test de NEWMAN et KEULS de la variable « sucres soluble » de la	70
partie aérienne pour les différentes doses de Plomb	
V.2.1.3.2. Etude de la relation entre les concentrations en sucres solubles de la	71
partie aérienne et le facteur «plomb »	
V.2.1.4. Analyse de variance pour la variable « sucres soluble » de la partie racinaire à	71
deux facteurs « Plomb » et « EDTA ».....	
V.2.1.4.1. Test de NEWMAN et KEULS de la variable « sucres soluble » de la	72
partie racinaire pour les différentes doses de Plomb	
V.2.1.4.2. Etude de la relation entre les concentrations en sucres solubles de la	73
partie racinaire et le facteur «plomb »	
V.2.2. Analyse statistique de la variable « Proline ».....	73
V.2.2.1. Facteur « Plomb (Pb) ».....	73
V.2.2.1.1. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et	74
racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E1) d'EDTA	
V.2.2.1.2. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et	74
racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E2) d'EDTA	
V.2.2.1.3. Distribution des concentrations en Proline de la partie aérienne et	75
racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E3) d'EDTA	
V.2.2.1.4. Distribution des concentrations en Proline de la partie aérienne et	76
racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E4) d'EDTA	
V.2.2.2. Facteur « EDTA ».....	76
V.2.2.2.1. Distribution des concentrations en Proline de la partie racinaire en	76
fonction des doses d'EDTA pour la dose (P1) de Plomb.....	
V.2.2.2.2. Distribution des concentrations en Proline de la partie racinaire en	77
fonction des doses d'EDTA pour la dose (P2) de Plomb	
V.2.2.2.3. Distribution des concentrations en Proline de la partie racinaire en	78
fonction des doses d'EDTA pour la dose (P3) de Plomb.....	
V.2.2.2.4. Distribution des concentrations en Proline de la partie racinaire en	78
fonction des doses d'EDTA pour la dose (P4) de Plomb.....	
V.2.2.3. Analyse de variance pour la variable « proline » de la partie aérienne à deux	79
facteurs « Plomb » et « EDTA ».....	
V.2.2.3.1. Teste de NEWMAN et KEULS de la variable « proline » de la partie	80
aérienne pour les différentes doses de Plomb	
V.2.2.3.2. Etude de la relation entre les concentrations en proline de la partie	80
aérienne et les différentes doses de Plomb	
V.2.2.4. Analyse de variance pour la variable « proline » de la partie racinaire à deux	81
facteurs « Plomb » et « EDTA ».....	
V.2.2.4.1. Teste de NEWMAN et KEULS de la variable « proline » de la partie	82
racinaire pour les différentes doses de Plomb.....	
V.2.2.4.2. Etude de la relation entre les concentrations en proline de la partie	82
racinaire et les différentes doses de Plomb	
V.2.3.. Etude du transfert du stress métallique (partie Aérienne/partie Racinaire).....	83
Discussion des résultats	85
Conclusion générale	87
Références bibliographiques.....	88

Introduction générale

Introduction

Le sol est une ressource naturelle non renouvelable, un milieu où minéral et vivant sont étroitement imbriqués et par conséquent indissociables (Pierre Stengel et *al*, 2009). Le sol est en continuel interaction avec l'hydrosphère, l'atmosphère, et les êtres vivants, par conséquent sa perturbation ou sa pollution peut porter atteinte à la santé de l'homme ainsi que tous les êtres vivants. La pollution métallique représente l'une des menaces majeures auxquelles le sol est exposé, accentuée depuis le développement industriel, elle constitue un véritable défis pour la santé de l'homme et l'environnement, pour cela le sol est une ressource qu'il faudra mieux connaître pour mieux maîtriser l'utilisation que nous en faisons, d'autre part, développer des technologies de dépollution du sol devient de plus en plus nécessaire et alarmant.

Bien que les techniques physico-chimiques soient nombreuses et variées, elles nécessitent des équipements spéciaux et leurs coûts restent très élevés. De plus, ces techniques perturbent profondément l'activité biologique et la structure physique des sols traités, (Abdelly, 2006). Afin de contrer cette problématique, développer de nouvelles approches est nécessaire, la Phytoremédiation se présente comme l'une de ces approches prometteuses. La Phytoremédiation est l'utilisation de plantes vertes pour éliminer, contenir, ou rendre moins toxiques les contaminants environnementaux. Cette technique peut faire l'objet de plusieurs stratégies, telles que : la phytoextraction, la phytodégradation, la phytostabilisation, la phytovolatilisation et la rhizofiltration (Hamroun, 2011).

Notre travail fait suite aux travaux de Ouadjer, (2010) ; Hamroun et Hamitouche, (2011), qui ont mis en évidence le pouvoir extracteur du colza pour la dépollution d'un sol contaminé par le plomb. Dans notre cas nous nous intéressons toujours à la dépollution d'un sol contaminé par le plomb en utilisant le colza comme plante hyperaccumulatrice, mettant en évidence l'influence du pH et de l'EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid) sur cette capacité de phytoextraction.

Pour cela nous avons divisé notre travail en deux parties ;

- La première partie présente une synthèse bibliographique portant sur trois chapitres ;
 - la pollution par le plomb
 - la Phytoremédiation
 - Généralité sur le stress métallique
- La deuxième concerne la partie expérimentale composée de deux chapitres ;
 - Le premier dont lequel nous représentant le matériel utilisés et les méthodes d'analyses adoptées

Introduction

-Dans le second, figure les résultats obtenus et leurs discussions. Et on termine par une conclusion générale.

I.1. Généralités sur le plomb

I.1.1. Propriétés physico-chimiques du Plomb

Le plomb, du latin « *plombum* », est un métal mou, gris, sans goût ni odeur caractéristique, se trouvant habituellement en petite quantité dans la croûte terrestre. Il appartient au groupe IV b de la classification périodique des éléments. Ses principales propriétés physicochimiques sont présentées dans le Tableau 1. De configuration électronique [Xe] 4f14 5d10 6s2 6p2, il possède deux électrons non appariés sur sa couche électronique externe. Cette configuration électronique autorise les degrés d'oxydation (+2) et (+4), en plus de la forme métal (0). (Laperche *et al.*, 2004)

Le cation Pb^{2+} est un acide au sens de Lewis, c'est-à-dire qu'il est susceptible d'accepter un doublet d'électrons venant d'une base, pour former une liaison covalente. C'est également une espèce chargée, susceptible d'interactions électrostatiques avec des ions de signes contraires pour former une liaison ionique (Sposito *et al.* 1982).

Tableau 1 : Principales propriétés physico-chimiques du plomb.

Symbole	Pb
Numéro Atomique	82
Masse atomique	207,2 g.mol⁻¹
Point de fusion	327 °C
Point d'ébullition	1740 °C
Densité	11,35
Configuration électronique	[Xe] 4f14 5d10 6s2 6p2
Valence	0, +2, +4
Pb²⁺	0,94 à 1,49 Å
Pb⁴⁺	0,78 à 0,94 Å

I.1.2. Le plomb dans l'environnement

I.1.2.1. Histoire de l'utilisation du plomb

Le plomb a été l'un des premiers métaux utilisés par l'homme dès l'âge du bronze, il y a plus de 7 000 ans (Figure 1). Du fait de sa relative disponibilité et de ses propriétés physico-chimiques (malléabilité, ductilité, bas point de fusion, propriété anticorrosion), le plomb a été largement utilisé par les Grecs et les Romains comme pigments (oxyde de plomb) ou pour réaliser des canalisations, de la vaisselle, des pièces de monnaie, des toitures...etc.

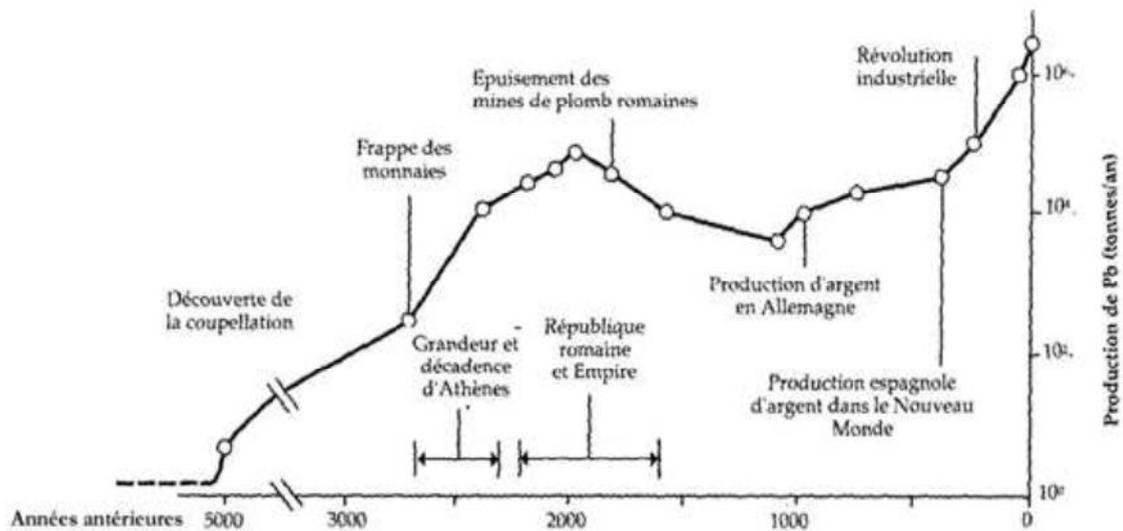


Figure 1 : Evolution de la production mondiale du plomb depuis 5 000 ans.
D'après *National Academy of Sciences*– 1980.

L'utilisation du plomb a ensuite explosé au cours de la Révolution industrielle. Pendant la première moitié du XX^{ème} siècle, le plomb a été utilisé dans l'industrie, l'imprimerie et les peintures. Dans la seconde moitié du siècle, l'utilisation dominante était liée aux carburants automobiles (le plomb était ajouté dans l'essence comme antidétonant) puis aux accumulateurs de voitures et industriels. Depuis les années 1970, le développement de nouvelles technologies, la prise en compte des problèmes environnementaux et de santé publique, ont conduit à la diminution ou à l'arrêt de certaines utilisations du plomb (canalisations, soudure, peinture, pesticides, antidétonant dans l'essence... etc.).

Dans les pays industrialisés, la production secondaire (à partir de la valorisation des déchets) ne cesse de progresser par rapport à la production primaire (à partir de minerai). En 2005, la France a produit environ 300 000 tonnes de Pb dont 94,5 % provenaient du recyclage du métal (ADEME, 2006). Environ 72 % de cette production était destinée à la fabrication d'accumulateurs.

I.1.2.2. Les sources de pollution par le Plomb

Le plomb retrouvé dans l'environnement provient à la fois de sources naturelles et anthropiques. Le métal est présent dans le sol, mais également dans tous les autres compartiments de l'environnement : eau, air et même les êtres vivants

Le plomb a une teneur moyenne dans la croûte terrestre de 0,002 % (36ème élément), et est présent dans la plupart des roches mères. La présence naturelle du plomb dans le sol est essentiellement due à sa mise en disponibilité par les processus d'altérations chimiques. En quantité plus faible, le plomb peut être libéré dans l'atmosphère lors de l'activité volcanique ou lors de feux de forêt, et être déposé sur les sols par des retombées atmosphériques. En l'absence de toute action anthropique, les teneurs naturelles moyennes des sols en plomb sont de 32 mg/kg (Pais et Benton Jones, 2000).

En France, les teneurs naturelles varient entre 9 et 50 mg.kg-1 (Baize, 1997). Dans le cas d'anomalies géochimiques, cette teneur peut atteindre plus de 3 000 mg.kg-1, comme dans les paléosols ferrallitiques du Poitou, les "terres rouges".

Les activités anthropiques sont à l'origine d'un flux de plomb très important pouvant conduire à des contaminations locales aiguës. Ce flux représentait, en 1980, 332 000 t.an-1 contre 12 000 t.an-1 d'origine naturelle (Nriagu, 1990). Le rapport parlementaire du sénateur Miquel (Miquel, 2001) met en évidence que l'enrichissement moyen annuel en plomb des terres émergées, à l'échelle de la planète, s'effectue en grande partie via les retombées atmosphériques (68 %). Toutefois, dans les pays industrialisés, la part des émissions atmosphériques, dans les pollutions au plomb, a fortement diminué. Elle ne représente plus que 33 % en France (mesure sur les sols agricoles), (SOGREAH, 2007) soit une baisse de 97 % en quinze ans (CITEPA, 2007). Cette diminution s'explique notamment par l'application du protocole d'Aarhus, et surtout par l'interdiction du plomb dans l'essence. Par ailleurs, bien que les pays industrialisés aient fortement réduit leurs émissions en plomb, la très forte croissance économique de pays comme la Chine ou l'Inde ne permet pas de constater, à l'échelle mondiale, une baisse du flux de plomb d'origine anthropique vers l'environnement (notamment des émissions atmosphériques).

I.1.2.3. Les différentes formes de plomb dans l'environnement

Le plomb est présent dans de nombreux minéraux et ne se rencontre que rarement à l'état natif. Les principaux minéraux porteurs de plomb, sont des sulfates (anglésite : PbSO_4), des carbonates (cérusite : PbCO_3), des oxydes (oxyde, dioxyde tétraoxyde.), des hydroxydes (Pb(OH)_2), des sulfates (galène) ou encore des phosphates. L'ensemble de ces minéraux présente une solubilité à l'eau très faible (DENEUX-MUSTIN et *al*, 2003).

Le plomb peut également être présent dans les systèmes naturels sous la forme de solutions solides qui, dans certain cas, peuvent contrôler sa concentration dans la phase aqueuse. Parmi ces solutions solides on peut citer les solutions avec l'apatite ($[\text{Ca} (1-x)\text{Pb}_x(\text{PO}_4)_3\text{OH}]$), la calcite

($[(Ca(1-x)Pb_xCO_3)]$), la barite ($[Ba(1-x)Pb_xSO_4]$) ou encor les sulfures de fer ($[Fe(1-x)Pb_xS]$) (DENEUX-MUSTIN, et *al*).

I.1.3. les voies de pénétration du plomb dans l'organisme

Le plomb peut pénétrer dans l'organisme humain par trois voies :

- a- Par inhalation de vapeur de plomb ou de poussière (oxyde de plomb)
- b- Par ingestion, qu'il s'agisse du plomb d'abord inhalé et ingéré à la suite des processus d'épuration pulmonaire, ou du plomb ingéré directement avec les aliments ou avec les poussières se trouvant sur les mains ou les objets portés à la bouche notamment chez les jeunes enfants.
- c- Par voie cutanée, plus rarement. Il s'agit de l'absorption du plomb organique liposoluble qui peut être présent dans les crèmes. Le tableau 2 résume les différentes voies d'exposition au plomb.

Tableau 2 : Voies d'exposition au plomb (Laperche et *al*, 2004).

Alimentation	Ingestion	Plantes contaminées par des dépositions de poussières de plomb et/ou accumulation depuis le sol Gibier Procédés de stockage des aliments
Poussières	Inhalation	Poussières fines Fumées de cigarettes Emissions automobiles des véhicules à essence
Peintures	Ingestion Inhalation	Ecailles de peintures anciennes (5 à 40 % de Pb) ; Poussières de peinture lors des travaux de rénovation.
Activités Professionnelles / Loisirs	Inhalation	Métallurgie du plomb et du zinc Fabrication d'accumulateurs et de batteries Récupération des métaux Oxydécoupage des tôles Soudure Décapage des vieilles peintures Manipulation des pigments aurifères Poussières transportées sur les vêtements au domicile Activités de poterie, brûlage de vieilles peintures, fonte de soldats en plomb, imprimerie

I.2. La phytodisponibilité du plomb

Les plantes peuvent absorber le plomb présent dans le sol par l'intermédiaire de leurs racines. Une partie de ce métal, présent dans les retombées atmosphériques ou dans les amendements agricoles (impuretés), peut également être absorbée par leurs feuilles. Cependant, en dehors de

zones proches d'installations générant la production de grandes quantités de plomb dans l'atmosphère, la plus grande partie du plomb absorbée par les plantes l'est par absorption racinaire.

I.2.1. Notion de phytodisponibilité

La notion de phytodisponibilité découle directement de la notion de biodisponibilité, définie comme « l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment du sol vers un organisme vivant (bactérie, végétal, animal, homme) » (Baize, 1997). Ainsi, selon Hinsinger *et al.* (2005), est biodisponible pour une plante (= phytodisponible), la fraction d'un élément susceptible d'être absorbée par les racines.

La phytodisponibilité des ETM est fortement corrélée à la concentration d'espèces ioniques dans la solution du sol (Kabata-Pendias et Pendias, 1992). Elle est également largement dépendante des propriétés du sol, de l'espèce végétale considérée et de l'élément en question.

La phytodisponibilité va donc dépendre des différents paramètres permettant le transfert de la phase solide du sol vers le végétal (Hinsinger *et al.*, 2005) :

- La disponibilité ou mobilité chimique.
- L'accessibilité ou mobilité physique.
- L'assimilation ou mobilité biologique.

I.2.2. la distribution du plomb dans le sol

Le comportement du plomb dans la solution du sol (disponibilité au transport ou immobilisation) et aux interfaces solution/solide et solution/plante dépend d'un grand nombre de paramètres biogéochimiques liés à la nature du sol (teneur en argile, pH, capacité d'échange cationique...), au contexte microbiologique, et aux formes chimiques du métal présentes dans la solution du sol ou associées à la phase solide. Ces différents paramètres sont trop nombreux et les interactions trop complexes (Cecchi, 2008) pour être développées dans cette étude bibliographique.

Notons toutefois que la mobilité du plomb va être particulièrement conditionnée par la teneur en phases adsorbantes du sol (matière organique, argile, oxydes...). En effet, ce métal possède une forte affinité pour ces constituants du sol (Ross, 1994). Les différentes interactions avec les composants du sol et la distribution du plomb dans le sol sont résumées dans la Figure 2.

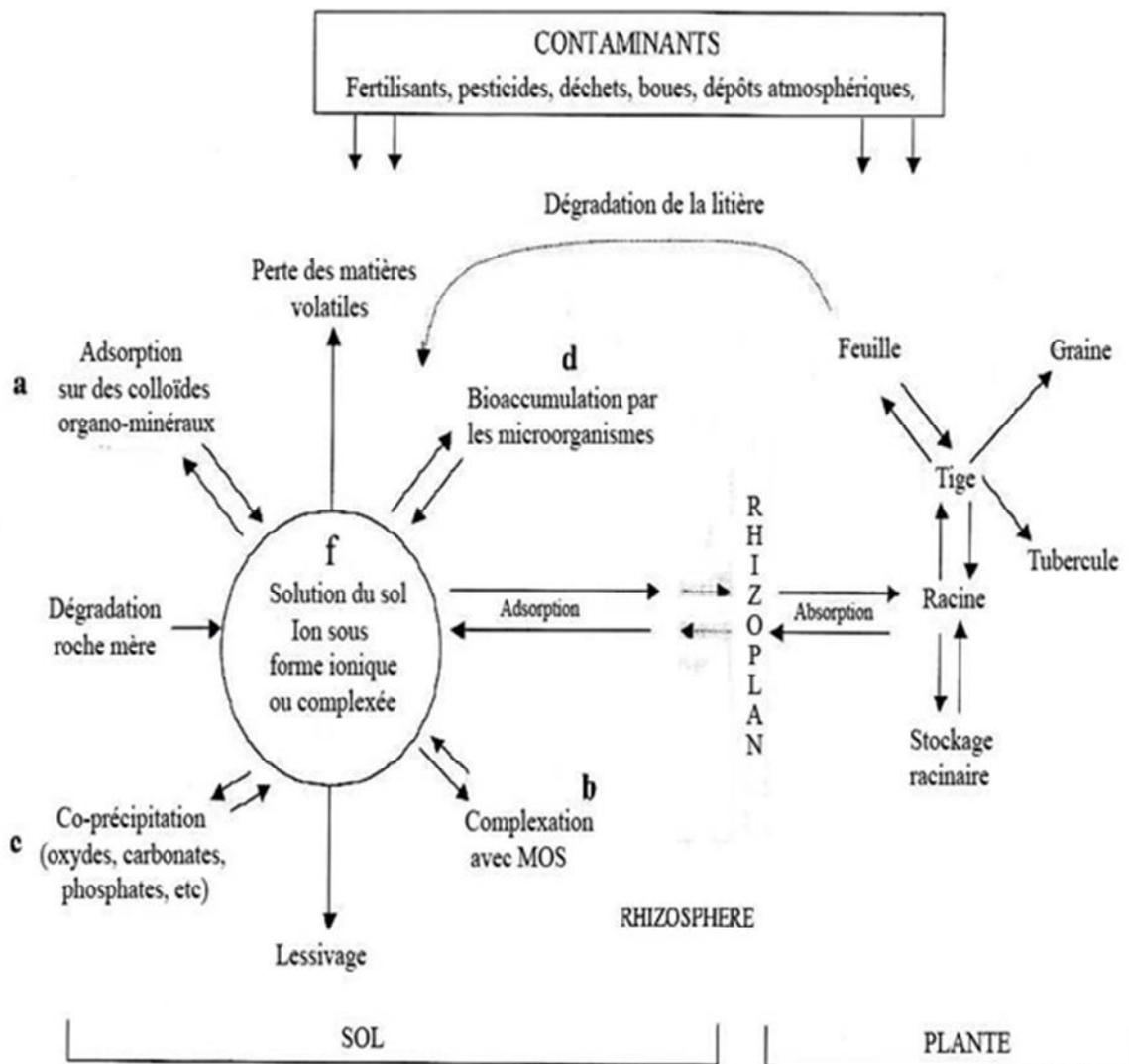


Figure 2 : Dynamique du plomb dans le système sol-plante (Alloway, 1995).

Le plomb va ainsi se retrouver :

- Inclus dans des minéraux primaires hérités de la roche-mère (Figure 2.a) ou dans des minéraux secondaires suite à des précipitations ou co-précipitations (Figure 2.b) notamment avec des oxydes (Fe, Al, Mn),
- Adsorbé à la surface de la matière organique du sol (MOS ; Figure 2.c),
- Adsorbé à la surface des méso et microorganisme du sol ou absorbé par eux (Figure 20.d),
- Dans la solution du sol, associé à des colloïdes (Figure 2.e),
- Dans la solution du sol, complexé par des molécules organiques ou sous forme libre (f). Les principales espèces du plomb présentes dans la solution du sol sont Pb^{2+} , et $PbCO_3$ (BRGM, 2004). Ces formes solubles, bien que très minoritaires, ont un rôle fondamental, puisque les racines prélèvent uniquement le plomb dans la solution du sol (Bourrelier et Berthelin, 1998).

II.2.3. les facteurs influençant la phytodisponibilité du plomb

De nombreux facteurs influencent la solubilisation du plomb et son passage dans la solution de sol (Hinsinger, 2001; Lombi *et al.*, 2001; Cecchi, 2008). Les principaux sont résumés dans la Figure 3.

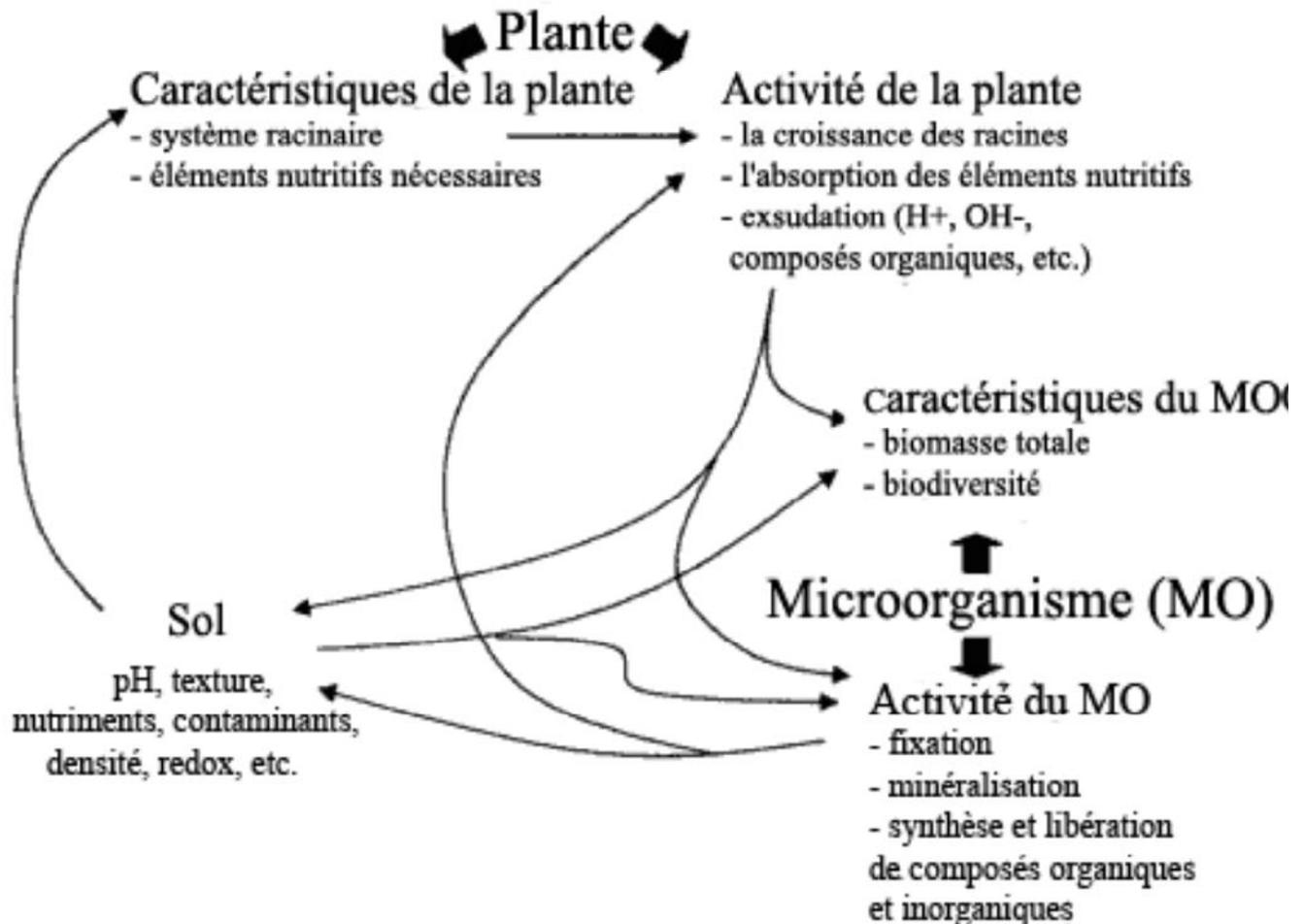


Figure 3 : Interactions au niveau de la rhizosphère entre le sol, la plante et les microorganismes, influençant la phytodisponibilité (Lombi *et al.*, 2001).

Notons que les deux facteurs les plus importants dans la phytodisponibilité du plomb sont la teneur en MOS et le pH du sol. En effet, la disponibilité du plomb est fortement corrélée à la teneur en matière organique du sol (McBride *et al.*, 1997 ; Lee *et al.*, 1998). La fraction minérale n'intervient de façon importante dans la mobilité du métal que lorsque le sol contient peu de matière organique et a une teneur importante en oxydes métalliques (Pulford *et al.*, 1982).

De très nombreuses études ont également montré que l'autre paramètre important du sol est le pH (McBride *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2006a). Il influence fortement la spéciation du métal, mais également les interactions entre celui-ci et les différents composants du sol. La mobilité du plomb est plus grande dans les milieux acides, alors que sa solubilité diminue

avec l'élévation du pH. Gerriste et Van Driel (1984) ont démontré des relations linéaires entre la constante d'adsorption du plomb, les teneurs en matière organique et le pH des sols étudiés.

La plante influence énormément les propriétés physico-chimiques de la rhizosphère. Elle prélève de l'eau et des éléments nutritifs nécessaires à sa croissance, et libère diverses substances minérales et organiques : exsudats, sécrétions et excréctions racinaires. La plante modifie ainsi le pH de la rhizosphère. Le prélèvement des nutriments par les racines affecte ce pH en libérant des ions H^+ (pour prélever des cations comme NH_4^+) ou OH^- (pour prélever des anions comme NO_3^-) dans le milieu (Hinsinger, 2001; Lasat, 2002). L'extrémité des racines est également nettement plus acide que le reste du sol, et l'on observe un gradient de pH le long de la racine. L'amplitude de la variation peut dépasser deux unités pH. Cette acidification apicale est due à une intense excrétion de protons lors du processus d'élongation racinaire.

D'autres paramètres, comme l'activité biologique d'un sol, peuvent modifier la phytodisponibilité du plomb. Les paramètres physico-chimiques d'un sol influencent fortement l'activité biologique (micro- et méso-biologique) se déroulant en son sein.

Cette activité biologique modifie en retour les paramètres du sol (pH, matière organique, structure...), et joue un rôle dans la biodisponibilité du plomb par des processus de biosorption, bioaccumulation et de solubilisation. Lorsque l'on considère la mobilité du plomb dans la rhizosphère, le pH rhizosphérique n'est pas le facteur le plus important (Lasat, 2002 ; Tao *et al.*, 2005). Dans la rhizosphère, zone bien particulière du sol, les éléments organiques (d'origine végétale ou microbienne) présents et l'activité microbiologique semblent jouer un rôle plus important que l'acidification. En effet, les acides organiques comme l'acide citrique, malique ou oxalique ont la capacité de désorber le plomb et de favoriser sa solubilisation dans le sol (Wu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006a). Le plomb réagirait avec les acides organiques dans la solution du sol selon les réactions suivantes :



Avec

- ✓ **R-COOH** : acide carboxylique ;
- ✓ **R-OH** : alcool ou phénols (ligands organiques).

Plusieurs auteurs ont également mis en évidence la capacité de certains sidérophores microbiens à désorber le plomb (Kraemer *et al.*, 1999; Dubbin and Louise Ander, 2003), démontrant ainsi l'importance des microorganismes présents dans le sol dans les mécanismes de solubilisation du plomb. Ces résultats sont confirmés par les nombreuses expérimentations de

Phytoremédiation (de sols pollués en plomb) assistées par une bio-augmentation de la biomasse microbienne du sol (Lebeau *et al.*, 2008).

Introduction

La Phytoremédiation est une technologie émergente qui utilise des plantes pour extraire, dégrader ou immobiliser les polluants dans un sol pollué. On parle de Phytoremédiation aidée lorsqu'il y a ajout d'amendement au sol pour faciliter l'action des plantes. Cette technologie regroupe un ensemble de techniques parmi lesquelles on peut citer les deux plus importantes, appliquées sur des contaminations métalliques :

La phytostabilisation qui utilise des plantes tolérantes aux métaux, et capables d'immobiliser les polluants dans le sol pour réduire les risques de transfert vers les autres compartiments de l'environnement et la phytoextraction qui est une technique de dépollution utilisant des plantes tolérantes les polluants et qui les concentrent dans leurs parties aériennes.

II.1 La phytoextraction

La phytoextraction est la méthode de Phytoremédiation la plus utilisée compte tenu du fait qu'il y a isolation des polluants, sans altérer la structure et l'activité biologique des sols (Ghosh et Singh, 2005). C'est la voie dans laquelle les chercheurs se sont le plus investis depuis le début de cette décennie (Chedly, 2006). Aussi appelée phytoaccumulation, la phytoextraction réfère à l'absorption des contaminants présents dans le sol par les racines de la plante. Par la suite, ces contaminants sont transférés (ou transloqués) et accumulés dans les parties aériennes de la plante, comme les tiges et les feuilles, qui sont ensuite récoltées (Etats-Unis united states Environnemental Protection EPA, 1999). Certaines plantes sont appelées « hyperaccumulatrices », puisqu'elles possèdent la capacité d'absorber une grande quantité de métaux comparativement aux autres plantes (United Nations Environnement Program UNEP, 2002).

Ces plantes hyperaccumulatrices doivent être capables d'accumuler au moins 1 000 mg d'un métal spécifique par kilogramme (kg) de matière sèche, sans qu'il y ait de dommage apparent sur leur physiologie (Interstate Technology and Regulatory Cooperation work group ITRC, 2009) (fig II.4)

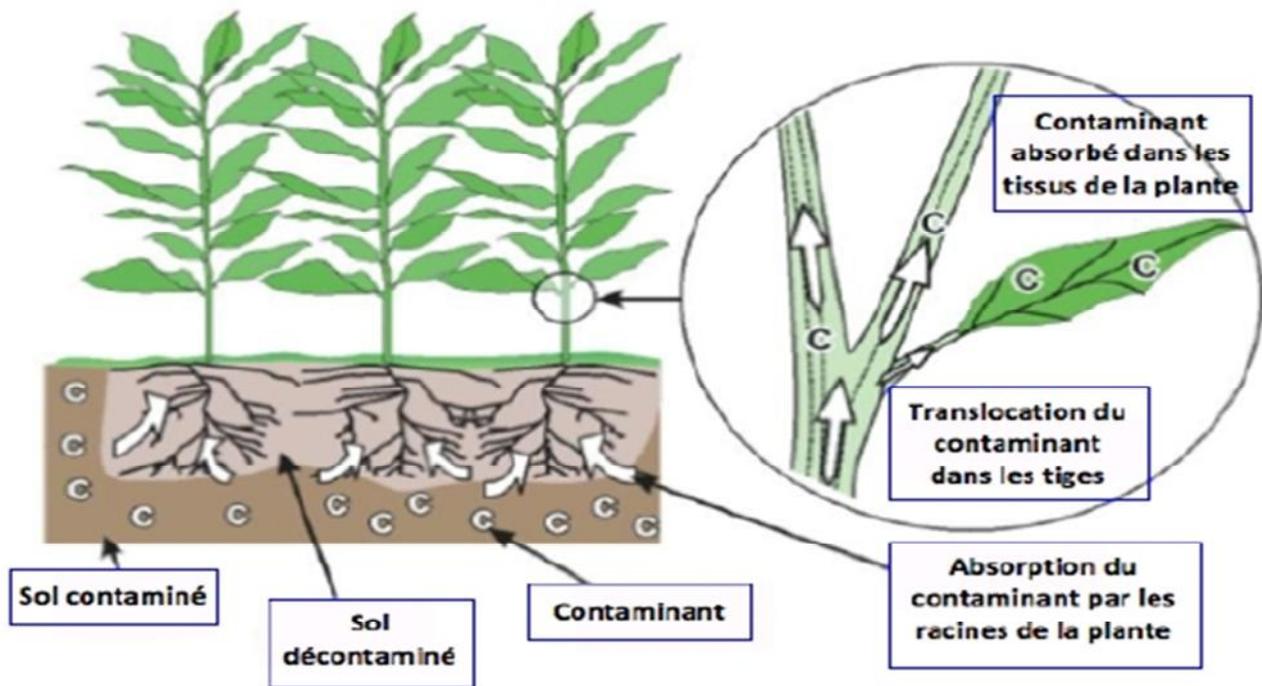


Figure 4 : Processus d'extraction, d'absorption des contaminants présents dans le sol, (Interstate Technology and Regulatory Cooperation work group ITRC, 2001)

II.2. Description du procédé de phytoextraction

La technique de phytoextraction consiste à utiliser les plantes afin d'extraire les contaminants (essentiellement les métaux disponibles) et de les stocker dans leur biomasse, de préférence dans les parties récoltables (transfert vers les parties aériennes). Les plantes sont par la suite récoltées et incinérées. L'avantage du procédé est la réduction du volume de polluants à traiter par concentration dans les cendres. Celles-ci peuvent ensuite être mises en décharge ou recyclées en métallurgie. Il faut néanmoins noter que la phytoextraction est une technique de traitement en développement, les filières d'élimination et/ou de valorisation de la biomasse récoltée ne sont pas encore définies. Les plantes utilisées sont des espèces végétales sauvages hyper-tolérantes et/ou hyperaccumulatrices capables de prélever des métaux toxiques dans les horizons de surface des sols (profondeur < 80cm) et de les accumuler dans leurs parties aériennes.

Ces plantes hyperaccumulatrices sont endémiques de sites métallifères et ont la capacité d'accumuler des métaux à des concentrations pouvant atteindre et dans certains cas dépasser 2 % de la matière sèche des parties aériennes. Les plantes doivent aussi produire beaucoup de biomasse car le facteur qui détermine leur utilisation en phytoextraction est leur capacité extractrice, égale au produit biomasse par concentration dans les parties aériennes.

La phytoextraction des métaux limite leur accumulation dans les sols, leur lessivage et leur transport par érosion éolienne ou hydrique. Le traitement peut concerner des sols industriels ou encore des sols agricoles ayant reçu des épandages de déchets urbains ou industriels.

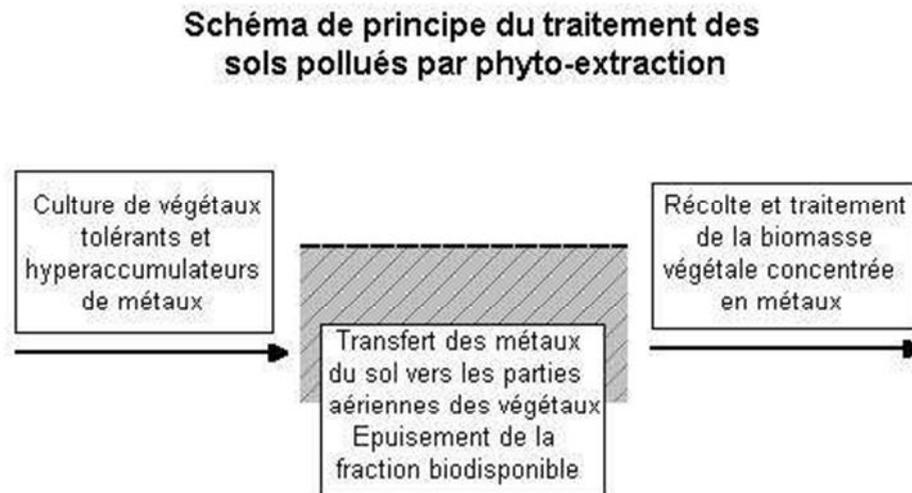


Figure 5 : Schéma de principe de traitement des sols pollués par phyto-extraction (Emilie chevrier, 2013)

Il y a la *phytoextraction assistée* par des chélateurs de métaux. Cette méthode est désignée également par la *phytoextraction induite* et la *phytoextraction continue*. Parmi ces deux procédés la phytoextraction assistée est la plus développée. Cependant, la phytoextraction continue commence à être appliquée pour la dépollution des métaux lourds (Plomb, Zinc, Cadmium, nickel) et des métalloïdes (Sélénium, Arsenic). Les deux stratégies ont fait l'objet d'essais en plein champ et les résultats, bien qu'encourageants, nécessitent plus d'efforts pour améliorer le processus (Chedly ,2006).

II.3. Les différents types de phytoextraction

II.3.1. La phytoextraction induite

II.3.1.1. Concept de la phytoextraction induite

Pour le plomb, le cadmium, et l'arsenic, on ne connaît pas de nos jours des plantes capables d'accumuler naturellement de grandes quantités de ces éléments. Par exemple, la végétation qui croît sur un milieu contaminé par le plomb renferme seulement 0.01 à 0.06 % de ce polluant dans la partie aérienne. Ces teneurs sont inférieures à celles requises pour une phytoextraction efficace. Des expériences réalisées ont montré que l'application d'un chélateur synthétique comme l'acide éthylène diamine tétra acétique EDTA aux sols stimulait l'absorption et l'accumulation du plomb dans la partie aérienne (Figure 6). Ces travaux ont montré que le taux de plomb dans la partie aérienne pouvait dépasser 1% de la matière sèche.

Cette découverte a été à l'origine de l'amélioration du procédé de la phytoextraction du plomb et a ouvert la voie au développement de cette technologie à d'autres métaux en utilisant des chélateurs appropriés (Chedly, 2006).

La quantité du métal extraite du sol est représentée par sa teneur dans le matériel végétal multipliée par la quantité de biomasse récoltée. Le fait que des plantes produisant une grande quantité de biomasse, comme par exemple le colza, le maïs, le tournesol puissent être stimulées pour accumuler le plomb dans leur partie aérienne, représente un autre atout pour le développement de la phytoextraction assistée par les chélateurs. Le concept de la phytoextraction induite est également applicable à d'autres métaux. D'autres expériences réalisées sur des sols contaminés par plusieurs métaux, montrent une accumulation simultanée du plomb, du cadmium, du cuivre, et du zinc chez des plantes de colza après application de l'EDTA. La stimulation de l'accumulation du métal est directement reliée à l'affinité du chélateur pour le métal et suggère que, pour obtenir une phytoextraction, un chélateur synthétique ayant une grande affinité pour le métal à extraire doit être utilisé. Sur la base de cette information, un protocole pour la phytoextraction assistée par des chélateurs a été récemment proposé :

- ✓ le site contaminé est évalué et une étude préliminaire permet de déterminer la combinaison appropriée chélateur / plante,
- ✓ le site est préparé et les plantes sont cultivées,
- ✓ une fois que la production de biomasse est optimale, le chélateur approprié est appliqué,

Après une période d'accumulation pouvant s'étendre de quelques jours à quelques semaines, la récolte est réalisée (Chedly, 2006).

Selon la saison et la fréquence des récoltes, le site peut être cultivé de nouveau pour d'autres phytoextraction. Les estimations suggèrent que les plantes peuvent extraire entre 180 et 530 kg ha⁻¹ de plomb par an et que la dépollution d'un sol qui renferme plus de 2500 mg / Kg de plomb est possible sur une dizaine d'années. Après chaque récolte, le matériel végétal contaminé est réduit par incinération et les cendres sont déposées en décharge. Si le coût le permet, le métal extrait d'un sol pollué peut être réutilisé de nouveau dans les différentes activités industrielles (Chedly, 2006).

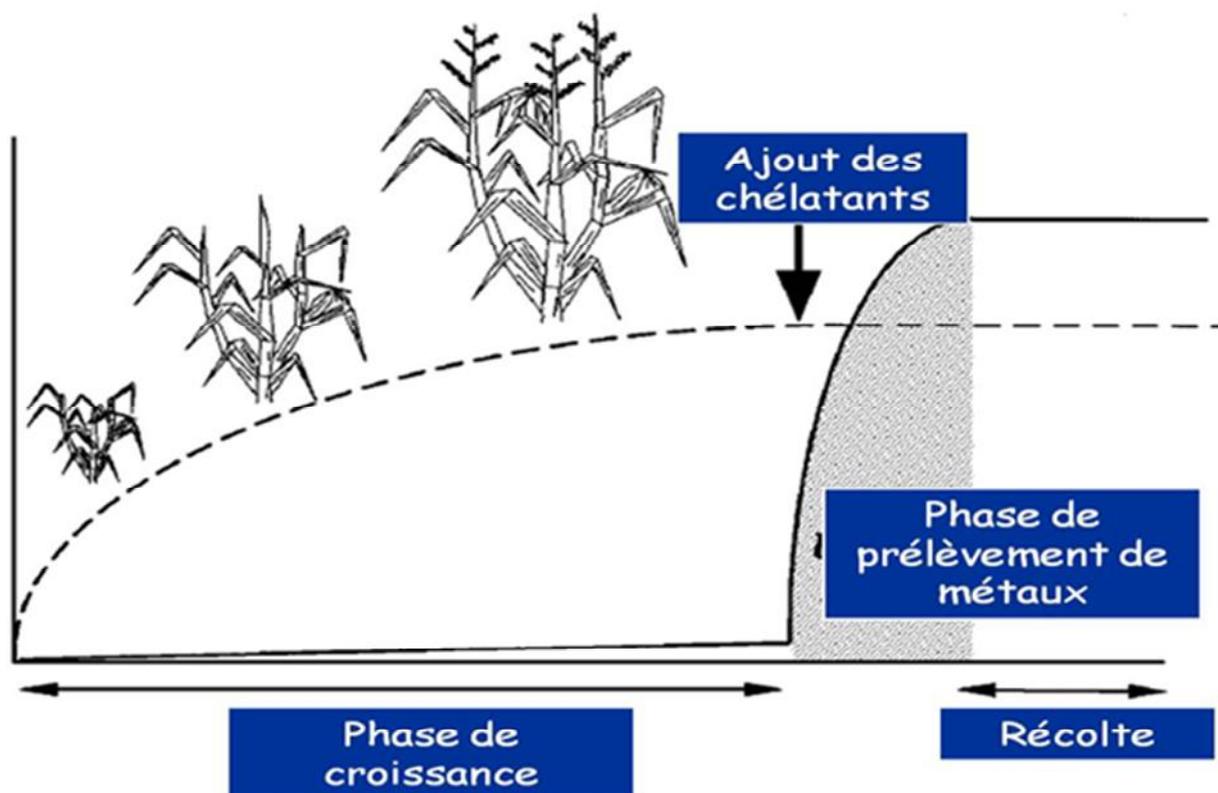


Figure 6: Schéma représentant une phytoextraction induite par des chélateurs (Salt *et al.* 1998).

II.3.1.2. Développement de la phytoextraction induite

La découverte de l'absorption assistée par des chélateurs chez les plantes est très récente. La phytoextraction assistée est basée sur deux principes : (i) augmenter la concentration du métal dans la solution du sol, (ii) augmenter l'absorption et le transport de ce métal vers la partie aérienne de la plante, qui est plus facile à récolter. L'augmentation de la concentration du métal dans la solution du sol peut s'expliquer par la forte affinité du chélateur utilisé. Ce dernier peut se lier au métal et passer dans la solution du sol.

Cependant, les mécanismes impliqués dans l'absorption et la translocation, assistée par des chélateurs, ne sont pas encore connus.

Après application de l'EDTA, l'accumulation du plomb dans la partie aérienne est directement corrélée avec l'accumulation de l'EDTA. Ce résultat suggère clairement que ce métal est transporté dans la plante sous la forme du complexe Pb-EDTA. La présence d'une teneur élevée en EDTA dans les tissus de la plante pourrait augmenter la concentration du plomb soluble par la formation du complexe Pb-EDTA et augmenter ainsi sa migration vers la partie aérienne où il s'accumule. Cette migration vers la partie aérienne est assurée par le courant de la transpiration. Au niveau de la feuille, l'eau s'évapore et le complexe métal-chélateur se concentre (ou s'accumule).

II.3.2. La phytoextraction continue

II.3.2.1. Concept de la phytoextraction continue

Parallèlement au développement de l'accumulation assistée par des chélateurs, d'autres auteurs se sont intéressés aux processus physiologiques particuliers qui permettent aux plantes d'accumuler les métaux durant toute la période de leur croissance. Le mode d'absorption des métaux est optimisé chez les plantes hyperaccumulatrices qui poussent sur des sols riches en métaux lourds et capables d'accumuler de grandes quantités de métaux dans leur partie aérienne où le taux de Zn, Ni, Mn est parfois supérieur à 1% de la matière sèche (Chedly, 2006).

Contrairement à la phytoextraction induite, elle dépend plutôt des capacités génétiques et physiologiques des plantes, c'est-à-dire que les plantes doivent être en mesure d'accumuler des quantités particulièrement élevées de contaminants durant leur vie (Peer *et al.*, 2006). On parle de « plante hyperaccumulatrice ». Brooks *et al.* (1997) ont utilisé le terme « hyperaccumulateur = hyperaccumulatrice » la première fois pour décrire des plantes avec une teneur en nickel supérieure à 0,1% de leur matière sèche, ce qui correspond à une valeur nettement plus élevée que celle rencontrée chez les plantes non accumulatrices (Brooks *et al.*, 1977).

II.3.2.2. Développement de la phytoextraction continue

La capacité des plantes hyper accumulatrices à concentrer les métaux lourds au niveau de la feuille représente un facteur important pour leur utilisation dans le développement de la phytoextraction continue. La majorité des plantes hyper accumulatrices présentent une faible production de biomasse et une croissance lente, tandis que les plantes à croissance rapide et produisant beaucoup de biomasse sont sensibles aux métaux lourds et les accumulent généralement au niveau des racines. Pour pallier à ces inconvénients et développer avec succès une phytoextraction continue, deux stratégies sont actuellement envisageables.

La première consiste à prospecter d'autres sites pollués avec pour objectif la découverte de plantes ayant une forte production de biomasse. La deuxième approche consiste à comprendre et exploiter les mécanismes impliqués dans la résistance, l'absorption et l'accumulation des métaux. Les données bibliographiques sur la nutrition minérale sont riches en informations concernant ces mécanismes. Ceci permet d'identifier des gènes utilisables pour la transformation par génie génétique des plantes sensibles à forte production de biomasse en plantes hyper accumulatrices. (Chedly A, 2006).

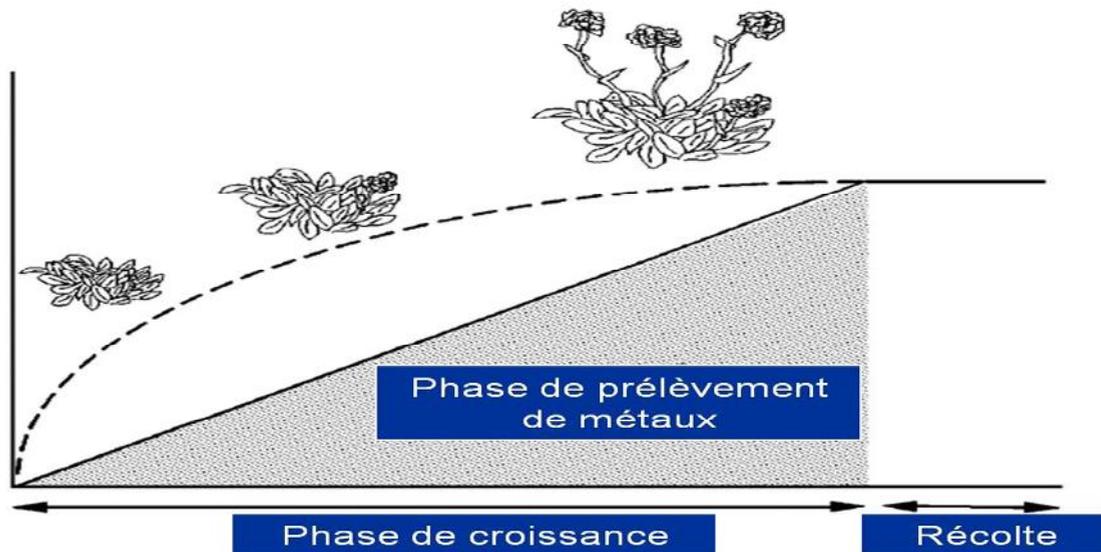


Figure 7: Schéma représentant une phytoextraction continue (Salt *et al.*, 1998)

II.4. Les avantages et limites de la phytoextraction

II.4.1. Les avantages

La technique de phytoextraction présente de nombreux intérêts, d'ordre environnemental et économique. En effet, l'activité biologique et la structure des sols sont maintenues après le traitement. En plus, le coût de la technique est bien moindre que celui de procédés traditionnels *in situ* et *ex situ* et varie selon les contaminants. Le coût d'un traitement *in situ* en présence de contaminants organiques et inorganiques est de l'ordre de 10\$ à 40\$ par tonne de sols (Mulligan *et al.*, 2001).

D'autre part, les plantes permettent de conserver un paysage agréable (reverdissement et floraison), et aussi d'installer une communauté de microflore et de microfaune métallo-résistantes pouvant agir en synergie avec ces plantes afin d'accélérer le processus de décontamination. Les plantes peuvent être facilement surveillées et récoltées à des fins de traitement et la biomasse végétale réutilisée (Kumar *et al.*, 1995 ; Raskin *et al.*, 1997 ; Blaylock et Huang, 2000 ; Garbisu et Alkorta, 2001).

En outre, les métaux lourds peuvent aussi être récupérés et réutilisés. Enfin, cette technique biologique est facilement acceptée par le public dans le contexte de la préservation de l'environnement, du développement durable, et dans l'aspect esthétiquement plaisant de son application.

II.4.2. Les limites

II.4.2.1. Limites liées à la nature de la pollution

La phytoextraction concerne le traitement de pollutions minérales : métaux et radionucléides. La phytoextraction du plomb est difficile. Même si certaines plantes peuvent accumuler le plomb, elles requièrent de faibles teneurs en phosphate et un pH du sol bas. L'apport d'agents chélatants comme l'EDTA peut solubiliser le plomb et éviter sa précipitation par les ions phosphate dans les racines. Cette technique, si elle n'est pas contrôlée, engendre des risques de lessivage du plomb vers les eaux souterraines (ADEME, 2011)

II.4.2.2. Limites de mise en œuvre des techniques : (in-situ)

Après avoir défini le type de métal à extraire, sa concentration, son niveau de biodisponibilité, et la présence éventuelle de multipollutions, il faudra vérifier l'adéquation entre métaux à extraire et espèces végétales hyper-accumulatrices connues et disponibles.

Les principales contraintes de mise en œuvre in situ sont :

- la profondeur d'enracinement des végétaux limitée aux horizons de surface (au maximum 80 cm),
- l'hétérogénéité de la pollution (les plantes hyper-accumulatrices développent leur système racinaire dans les zones du sol les plus polluées),
- le niveau de fertilité physique et chimique des sols (des pratiques agronomiques raisonnées peuvent permettre d'optimiser les niveaux de fertilité),
- les conditions climatiques (essentiellement précipitations),
- le travail du sol (éventuelle décompactations),
- l'adaptation de la méthode de récolte,
- la mise en sécurité du site pendant les cultures.

La phytoextraction a été initialement développée pour être appliquée in situ mais peut s'envisager sur site, sur des terres excavées, criblées, homogénéisées et disposées en andains. Il est alors possible d'accéder à des pollutions profondes.

La possibilité de disposer du site pendant plusieurs mois voire plusieurs années devra être vérifiée. (ADEME, 2011)

II.4.2.3. Limites liées aux caractéristiques du sol, de la pollution et des polluants

La phytoextraction n'est particulièrement appropriée qu'au cas de traitement de polluants en équilibre entre les phases solide et dissoute du sol. (ADEME, 2011).

II.5. Paramètres complémentaires influençant la phytoextraction

II.5.1. Profondeur de la pollution

L'enracinement des plantes hyperaccumulatrices dépend des caractéristiques physicochimiques des sols (paramètres décrits plus loin) et est en général limité aux horizons de surface des profils de sols. Une limite inférieure peut être fixée à 80 cm de profondeur.

La technique de phytoextraction reste néanmoins applicable pour une pollution localisée à un niveau inférieur à cette limite, dès lors que l'excavation des terres et la mise en œuvre d'un traitement sur site est envisageable (ADEME, 2011).

II.5.2. Fertilité physique et chimique du sol

Comme toutes les espèces végétales, les plantes hyperaccumulatrices requièrent un niveau de fertilité du sol compatible avec leur bon fonctionnement et leurs besoins nutritifs. Des carences nutritionnelles ou des propriétés physiques défavorables (compaction, rétention en eau insuffisante ou excessive) peuvent alors compromettre le développement du couvert végétal. L'ensemble des paramètres de fertilité chimique du sol doivent être pris en compte.

L'analyse agronomique de la terre permettra de définir les pratiques nécessaires pour corriger sa qualité.

Une attention particulière sera portée aux paramètres nutritifs (azote, phosphore assimilable, soufre) et à ceux qui influencent majoritairement la disponibilité des éléments nutritifs et des polluants (pH, taux d'argile, teneur en matière organique) (ADEME, 2011)

II.5.3. Concentration des polluants

Une certaine valeur de la concentration en polluants peut s'avérer inhibitrice pour les mécanismes d'action biologique envisagés par la technique de traitement par phytoextraction.

La toxicité des métaux vis à vis des espèces végétales hyper-accumulatrices disponibles en climat tempéré n'est pas encore bien connue (ADEME, 2011).

II.5.4. Application d'un agent chélateur

La végétation qui croît sur un milieu contaminé par le plomb renferme seulement 0.01 à 0.06 % de ce polluant dans la partie aérienne (Chedly A, 2007). Ces teneurs sont inférieures à celles requises pour une phytoextraction efficace.

L'ajout d'un agent chélateur synthétique tel que l'éthylène diamine tétra-acétique EDTA est possible pour augmenter le nettoyage des sols contaminés avec des effets plus ou moins importants sur la disponibilité des métaux traces (Philippe et al., 2009).

Pour palier ces inconvénients et développer avec succès une phytoextraction, la plupart des études ont pour objectif de découvrir des plantes hyperaccumulatrices ayant une forte production de biomasse. La transformation par génie génétique des plantes sensibles à forte production de biomasse en plantes hyper-accumulatrices pourrait également être envisagée. Pour cela, il est nécessaire de comprendre les mécanismes biochimiques et moléculaires intervenant dans la réponse de la plante survenant lors d'un stress aux métaux lourds. (Kärenlampi *et al.*, 2000).

II.6. Caractéristiques des espèces utilisées en phytoextraction

La phytoextraction est une méthode de décontamination des sols pollués par des métaux lourds (cuivre, argent, or, mercure, zinc, cadmium, fer, plomb,...). Elle est basée sur la culture de plantes possédant des propriétés de tolérance et d'accumulation de ces métaux.

Il existe environ 400 espèces reconnues de plantes hyper accumulatrices tolérantes aux métaux. Elles sont ainsi capables d'accumuler une certaine concentration d'un métal donné. On peut citer par exemple le tournesol, le pissenlit, le colza, l'orge, différentes Crucifères, l'ortie. Les américains travaillent beaucoup sur des arbres comme le peuplier (Dabouineau *et al.*, 2005)

Tableau 3 : Exemples de métaux accumulés : J.L. Morel, G. Bitton, C. Schwartz, M. Schiavon. (1997).
Rapport pour l'OCDE Ecotoxicology: responses, biomarkers and risk assessment

Métal	Concentration dans les feuilles (% de matière sèche)	Nombre de familles de plantes
Cadmium	>0.001	1
Cobalt	>0.1	12
Cuivre	>0.1	11
Plomb	>0.1	3
Nickel	>0.1	35
Zinc	>1	5

II.7. Le plomb dans le système sol-plante

Le système sol-plante est un système ouvert avec des inputs, parmi lesquels on trouve les contaminants, et des outputs liés à l'érosion, la lixiviation, la volatilisation. Au sein de ce système, certaines plantes sont capables de prélever les éléments traces métalliques via leurs racines ou de les absorber via leurs feuilles. Des transferts ont également lieu à l'intérieur de la plante (Alloway, 1995) (Figure 8)

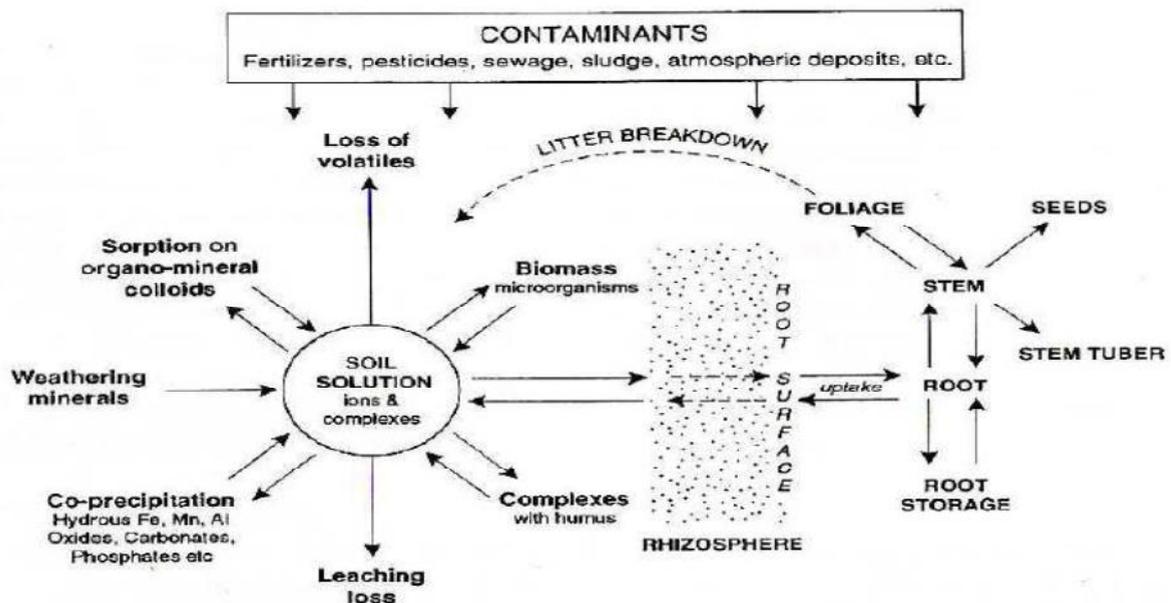


Figure 8: The soil-plant system showing the key components concerned with the dynamics of heavy metal (Alloway, 1995).

Les travaux de Marie Cecchi, 2008 ont montré que le plomb est très sensible au pH. Or, la plante peut modifier le milieu dans lequel elle se développe (modifications de pH, Eh, DOC, etc.) et donc peut influencer la spéciation des métaux présents dans sa rhizosphère.

Le terme de rhizosphère est défini comme « le volume du sol soumis à l'influence de l'activité racinaire » (DARRAH, 1993). Ce volume de sol varie avec la nature des plantes, en particulier l'extension du système racinaire et ses propriétés de surface, les éléments nutritifs considérés et les propriétés physiques du sol (ALLOWAY, 1995). Pour les éléments peu mobiles, la rhizosphère se limite aux premiers millimètres de sol situés autour des racines (HINSINGER, 1998). La rhizosphère est le lieu d'activités biologiques et biochimiques intenses. La plante prélève de l'eau et des éléments nutritifs nécessaires à sa croissance et elle libère diverses substances minérales et organiques (exsudats racinaire). Les racines elles-mêmes sont capables de mobiliser les métaux contenus dans les phases solides du sol par modification des concentrations ioniques de la rhizosphère, du potentiel redox et du pH ou par formation de complexes organométalliques (HINSINGER, 1998 ; MACLAUGHLIN, 1998 ; HINSINGER 2001 ; DUMAT, 2006).

II.7.1. Mécanisme d'interaction sol-plante (impact des activités racinaires)

II.7.1.1. Modification du pH

Le prélèvement des nutriments par les racines peut affecter le pH du sol. Le sens de modification induit dépend pour partie du type de prélèvement réalisé par la plante. En effet, pour maintenir leur

neutralité les plantes doivent compenser leur absorption ionique par une excrétion de charges au niveau racinaire (ROMHELD et *al*, 1984) :

- Quand elles prélèvent davantage de cations que d'anions, les racines compensent en relâchant un excès de charges positives (H^+) dans la rhizosphère, ce qui entraîne alors une acidification du milieu (LASAT, 2002).
- Dans le cas contraire, la plante relâche des ions hydroxydes ou bicarbonates (HINSINGER, 2001) et induisent une augmentation de pH. Par ailleurs, la respiration racinaire augmente la pression partielle de CO_2 dans la rhizosphère contribuant une fois encore à son acidification (NYE, 1986 ; HINSINGER, 1998). La contribution de ce dernier phénomène à l'acidification rhizosphérique est particulièrement importante dans les sols calcaires ou dans des sols où la diffusion du CO_2 se fait mal (NYE, 1986), par contre, dans les sols acides, l'acide carbonique n'est pas dissocié et la contribution de la respiration racinaire à l'acidification de la rhizosphère est alors négligeable.

II.7.1.2. Modification des concentrations ioniques dans la rhizosphère

Le prélèvement d'eau et d'éléments nutritifs en solution entraîne une modification des concentrations en ions dans la solution du sol au niveau de la rhizosphère (Hinsinger, 2001). Cela est surtout vrai pour les macroéléments que les plantes absorbent en plus grande quantité que les oligoéléments

II.7.2.3. Exsudation d'acides organiques dans la rhizosphère

II.7.2.3.1. Définition :

L'exsudation de composés organiques par les racines est un phénomène important. Le terme d'exsudats racinaires est un nom générique donné à une large gamme de substances allant des ions H^+ à des molécules complexes d'un poids moléculaire élevé. Il s'agit des mucilages qui sont décrits comme étant du matériel gélatineux formé de polysaccharides, des aminoacides, des peptides et des acides organiques excrétés par les racines dans la rhizosphère (Morel, 1997).

Ils constituent 30 à 40% des produits de la photosynthèse de la plante et jouent un rôle central dans les processus rhizosphériques. Leurs natures varient selon les espèces végétales, l'association avec des microorganismes, et les conditions de croissance de la plante (Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

II.7.2.3.2. Nature :

Ces molécules peuvent être de faible poids moléculaire, comme les sucres, les acides organiques et phénoliques ainsi que les acides aminés (Marschner, 1995). Mais il existe également des exsudats racinaires à poids moléculaire élevé tels que les mucilages, les ectoenzymes et les protéines. La production d'acides varie selon l'espèce végétale et le stade de développement de la plante, mais les plus complexants sont les acides citrique, malique et oxalique (Hinsinger et al., 2005), même s'il en existe de nombreux autres types.

II.7.2.3.3. Rôle :

Ces exsudats racinaires entrent en jeu dans :

- La nutrition de la plante : ils influencent la mobilité des éléments nutritifs dans le sol
- La régulation du développement de la plante. En outre, ils favorisent les associations plantes/microorganismes du sol (par exemple les bactéries symbiotiques fixées sur les racines des légumineuses)
- La protection des zones apicales des racines grâce aux mucilages
- L'amélioration des contacts sol-plantes
- La modification des conditions physico-chimiques de la rhizosphère (force ionique, concentration en carbone organique dissous, pH et potentiel redox).

L'excrétion de ces acides peut être la conséquence d'une carence en élément essentiel (Jones, 1998) ou bien un moyen défensif contre la toxicité d'un élément. Ils ont la capacité de complexer les métaux et également d'augmenter la mobilité du fer, du manganèse, du cuivre, du plomb et du zinc (Mench, 1988 ; Marschner, 1995 ; Jones, 1998).

L'exemple des sols calcaires est souvent cité. En effet, dans ces sols, le fer et le phosphore sont peu disponibles, entraînant des carences nutritionnelles. Les plantes calcicoles s'adaptent en excréant les acides malique et citrique qui permettent la dissolution des oxydes de fer, afin de le rendre plus disponible (Marschner, 1995 ; Jones, 1998 ; Hinsinger, 2001). Les travaux de Neuman et Romheld (1999) montrent qu'en cas de déficience en phosphore, le lupin augmente sa production d'acide citrique. D'autres travaux ont montré que le colza excrète des quantités importantes d'acides organiques afin de mobiliser le phosphore des roches phosphatées. Un deuxième exemple intéressant est l'excrétion par les graminées déficientes en fer d'acides aminés non protéinogéniques ou phytosidérophores (acide avénique) (Kochian, 1993 ; Fan et al., 1997). Ils ont une très forte affinité pour le Fe³⁺ et extraient très efficacement ce fer de la rhizosphère.

Le complexe Fe-phytosidérophores est ensuite réabsorbé par la racine, le fer Fe^{3+} réduit en Fe^{2+} , puis libéré et utilisé par la racine (Hopkins, 2003). Leur synthèse et leur libération sont stimulées en réponse à une inhibition de la synthèse des protéines due à une carence en fer (Marschner et Romhled, 1994). Ces phytosidérophores ont, outre le fer, la capacité de complexer d'autres nutriments, en particulier les métaux traces comme le plomb.

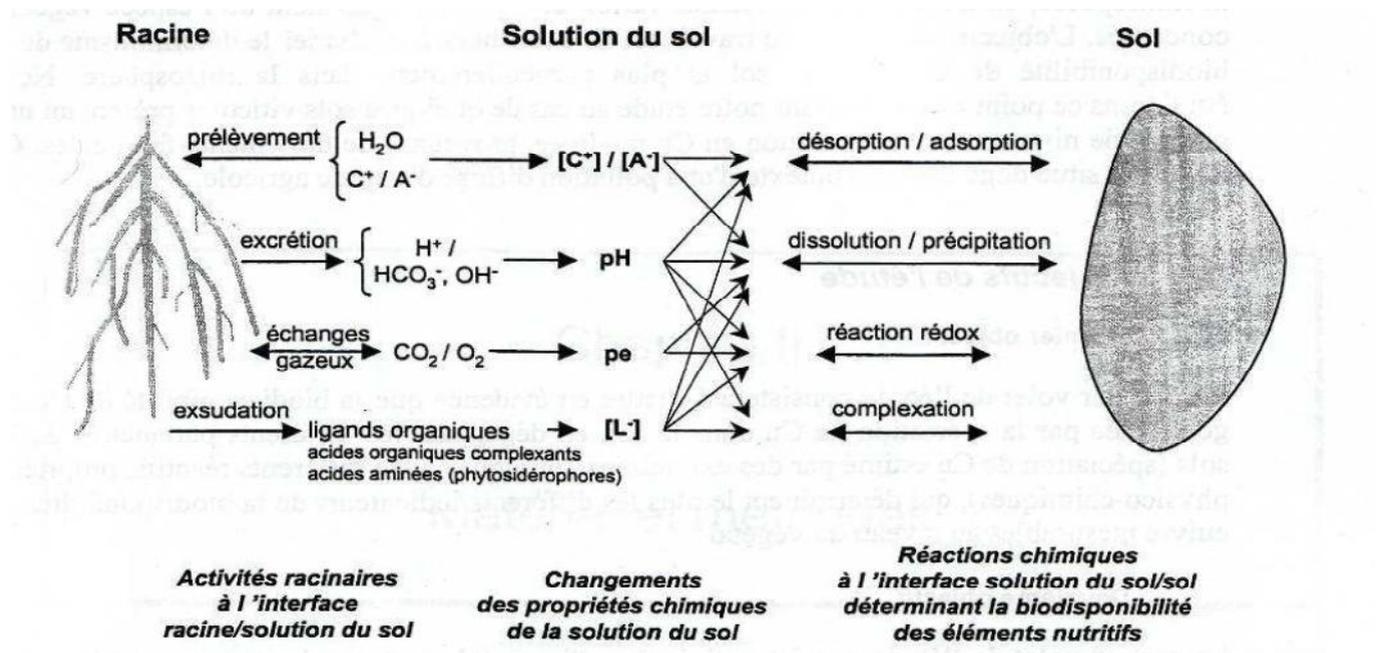


Figure 9 : Interactions chimiques ayant lieu dans la rhizosphère (hinsinger, 2001)

II.8. Absorption du plomb par la plante

II.8.1. Rappel de la structure racinaire

La structure des racines (Figure 10), longitudinalement, de l'apex (pointe) vers la base est constituée de:

- La coiffe, composée de cellules subérisées se renouvelant constamment. Cette coiffe joue un rôle de lubrifiant améliorant la pénétration de la racine dans le sol, grâce à la sécrétion d'un mucilage (polyosides).
- Le méristème apical, qui est une zone de multiplication cellulaire, où se fait la croissance primaire des racines.
- La zone d'élongation principale des cellules, et de différenciation des tissus racinaires
- Le rhizoderme (ou épiderme racinaire), qui est une zone contenant les poils absorbants permettant d'augmenter la surface d'absorption de l'eau et des éléments minéraux.
- L'exoderme, qui est la zone de lyse des cellules du rhizoderme.

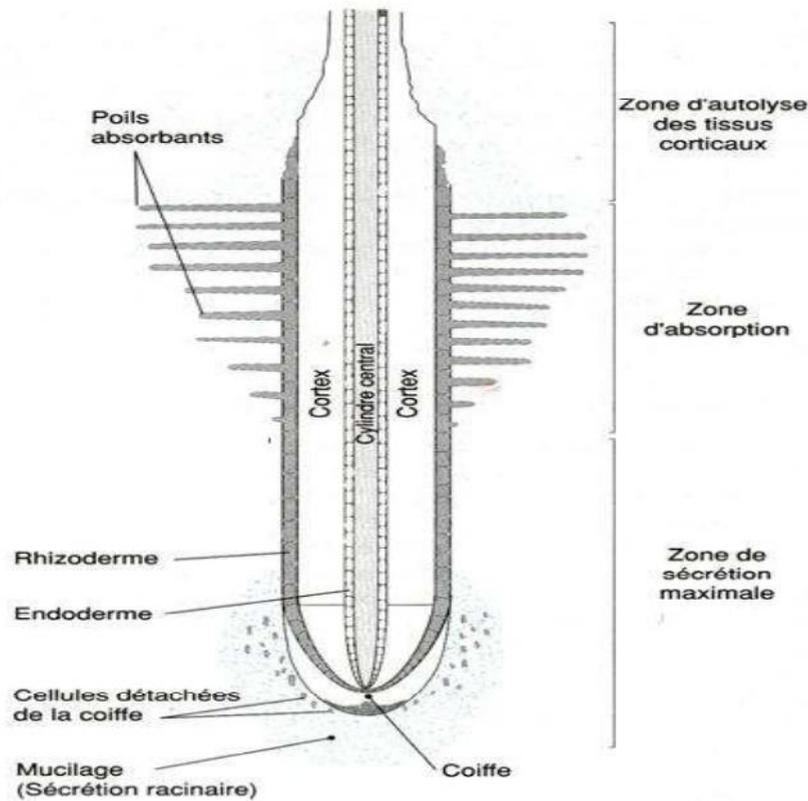


Figure 10 : Coupe longitudinale de racine (Gobat et al., 1998)

Transversalement, de l'extérieur vers l'intérieur les racines sont constituées de plusieurs couches successives (Figure x) :

- ✓ L'exoderme
- ✓ Le cortex
- ✓ L'endoderme
- ✓ Le cylindre central ou stèle, qui contient les vaisseaux.

II.8.2. Mécanisme d'absorption

II.8.2.1. Absorption racinaire

Dans le sol, l'absorption racinaire correspond au prélèvement par la plante des éléments minéraux du milieu extérieur et elle peut se faire de plusieurs manières. Soit la pénétration des éléments dans les racines se fait grâce à un transport actif interne par le symplaste (cytoplasmes des cellules reliés entre eux par les plasmodesmes).

Après avoir traversé la paroi cellulaire, les ions métalliques atteignent la surface de la membrane plasmique, puis pénètrent dans le symplaste. Ensuite, ces ions métalliques peuvent passer d'une cellule à l'autre en empruntant les plasmodesmes, qui relient les cellules. C'est la voie dite symplastique. Ce

transport peut aussi se faire par voie passive ou apoplastique, c'est-à-dire par un transport dans les espaces intercellulaires (ou Espaces Libres Apparents).

Ce phénomène s'arrête le plus souvent au niveau de l'endoderme, du fait de la présence de cadres de subérines, ou bandes de Caspary, qui bloquent le passage des molécules et des ions. A ce moment-là, l'eau et les molécules sont obligées de traverser les membranes plasmiques des cellules de l'endoderme, afin de pouvoir parvenir dans le cylindre central contenant les vaisseaux du xylème. Après avoir traversé la membrane plasmique de la face interne de l'endoderme, les ions peuvent à nouveau reprendre le chemin apoplastique. Il reste néanmoins possible qu'une faible partie de l'absorption des ions se fasse par l'apoplasme complètement.

En effet, certaines cellules de l'endoderme, nommées cellules de transfert ne sont pas subérifiées.

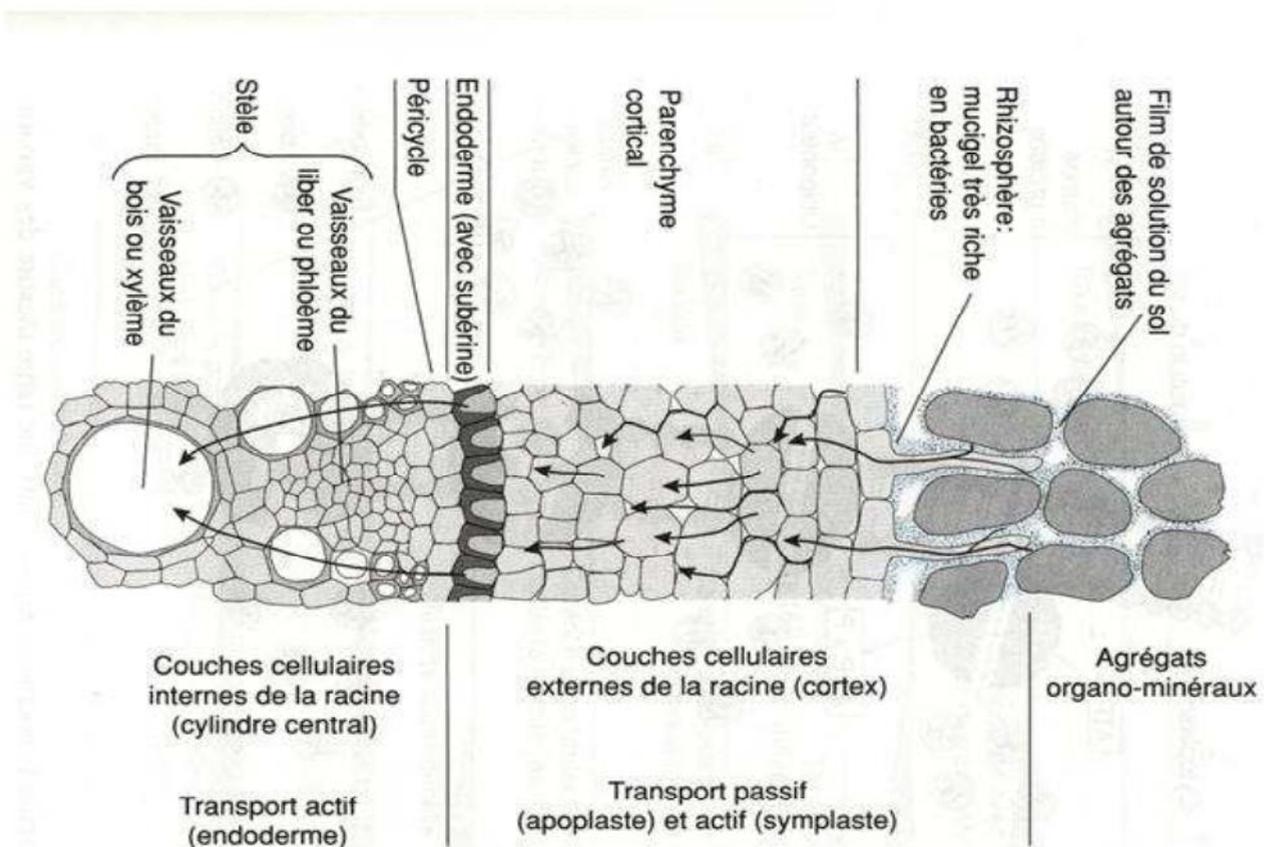


Figure 11 : Coupe transversale de racine, avec le passage des ions selon les voies symplastiques et apoplastiques (Gobat et al, 1998).

Au départ, le Pb^{2+} présent dans la solution du sol se lie aux groupements carboxyle de l'acide uronique composant le mucilage autour des racines (Sharma et Dubey, 2005). Ce mucilage permet donc de restreindre le passage du plomb à l'intérieur des cellules racinaires, et constitue ainsi une protection du système racinaire.

Une fois adsorbé à la surface des racines, la voie apoplastique pourrait être une voie importante pour le plomb qui peut être immobilisé par les charges négatives des parois cellulaires (espace libre de Donnan).

Il aurait donc tendance à s'accumuler dans l'espace libre, étant fortement lié aux groupements carboxyliques des composés pectocellulosiques des parois. Des études ont montré que le plomb était majoritairement présent dans l'apoplaste et que seule une faible proportion pénètre dans l'endoderme (Tung et Temple, 1996 ; Seregin *et al.*, 1998 ; Patra *et al.*, 2004).

II.8.2.1.1. Transfert du plomb du sol vers les racines

La pénétration d'un élément dans une plante peut être évaluée par le facteur de transfert sol/plante ou également appelé facteur de bioconcentration, noté FBC Il représente la possibilité de transfert d'un contaminant du sol vers les plantes, et il est généralement défini comme le ratio entre la concentration dans les plantes et celle dans le sol où ont poussé les plantes, et calculé comme suit (Chumbley and Unwin, 1982 ; Cui *et al.*, 2004, Zheng *et al.*, 2007) :

$$FBC = [Pb] \text{ plante} / [Pb] \text{ substrat de culture}$$

Avec les concentrations exprimées en mg.kg⁻¹ et relatives aux masses sèches du sol et des plantes. Plus la plante absorbe facilement le plomb, plus le facteur de transfert est grand. Ce transfert du sol vers les plantes est fonction :

- de la nature du métal (Zheng *et al.*, 2007),
- de la nature des plantes (de l'espèce ou du cultivar) et également de leur âge (Yoon *et al.*, 2006),
- des caractéristiques des sols telles que le pH, la teneur en matière organique, ou la capacité d'échange cationique (Roselli *et al.*, 2003 ; Yoon *et al.*, 2006 ; Zheng *et al.*, 2007). D'après Roselli *et al.* (2003), la mobilité des métaux et donc leur transfert est faible dans le sol, surtout si le pH ou la teneur en matières organiques sont élevés.

Bien que le facteur de transfert soit assez largement utilisé dans les études portant sur l'impact de la contamination d'un sol sur les plantes, il existe de nombreuses ambiguïtés quant à son calcul. Tout d'abord, même s'il est la plupart du temps calculé à partir de la teneur totale en métal dans le sol, certains auteurs suggèrent que l'utilisation du métal biodisponible est plus judicieuse (Brun *et al.*, 1998 ; McLaughlin *et al.*, 2000 ; Pichtel *et al.*, 2000). Elle permet selon eux de mieux prédire le transfert potentiel du plomb du sol vers les plantes, en comparaison avec les teneurs totales.

Une autre ambiguïté dans le calcul de ce facteur de transfert réside dans la manière de calculer la concentration dans la plante. En effet, après la récolte de plantes ayant été en contact direct avec le sol, les

racines sont soigneusement rincées avant de procéder à la minéralisation et au dosage. Ce rinçage n'est jamais complet et il est possible que des particules de sols soient analysées en même temps que les tissus des racines. En effectuant ce rinçage avec des solutions acidulées, il est possible de réaliser également une désorption acide, qui permet de détacher le plomb adsorbé à la surface des racines. Chaignon et Hinsinger (2003) par exemple utilisent cette technique pour la désorption du cuivre. Cette quantité retrouvée dans la désorption représente souvent une majorité du plomb total de la plante. On peut donc se poser la question de savoir s'il faut tenir compte de cette quantité désorbée pour calculer le facteur de transfert. En effet, ce plomb n'a pas pénétré à proprement parler dans la plante, cependant, il est malgré tout étroitement lié aux racines et donc peut à terme être absorbé.

Certains auteurs tels que Zheng et al. (2007) calculent d'ailleurs plusieurs facteurs de transfert dans une même étude dans des sols contaminés environnant une usine de métallurgie. Dans un premier temps, ils ne tiennent compte que des parties comestibles des végétaux, en utilisant pour cela les concentrations dans ces organes végétaux, mais sur une base de matière fraîche.

Ils obtiennent alors des facteurs de transfert allant de 0,001 pour l'aubergine à 0,025 pour l'épinard ou le poireau, en passant par 0,003 pour le haricot rouge, dans des sols contenant en moyenne 320 mg.kg⁻¹ de plomb. Ces résultats montrent l'influence de l'espèce végétale dans le transfert du sol vers les plantes, en effet, pour un même sol à chaque fois, les données sont très différentes selon l'espèce considérée.

Dans un deuxième temps, ils calculent également des facteurs de transfert dans les parties non comestibles des plantes. Dans ce cas-là, le facteur de bioconcentration est calculé pour chaque organe séparément en utilisant les concentrations par rapport à la matière sèche. Ceci entraîne un facteur beaucoup plus élevé, qui passe à 0,032 dans le fruit du haricot rouge et à 0,265 dans les racines de ces mêmes plantes par exemple. Une étude de Yanqun et al (2004) dans une zone minière de Chine reporte des concentrations moyennes de 133,5 mg.kg⁻¹ Pb dans des plantes endémiques pour des concentrations moyennes en plomb dans le sol autour de 1630 mg.kg⁻¹, ce qui donne un facteur de transfert moyen de 0,08, en considérant la concentration dans les plantes entières (en matière sèche). Les travaux de Fytianos et al. (2001) sur la contamination de légumes cultivés dans une zone industrielle de Grèce ont mis en évidence des facteurs de transfert allant de 0,07 pour la carotte à 0,46 pour les épinards. Là aussi, ils utilisaient la concentration totale dans les plantes calculée sur une base de matière sèche.

Cette ambiguïté sur le calcul des concentrations totales dans les plantes est assez peu soulignée dans la littérature, mais ces quelques résultats soulèvent une constatation majeure. Ceci démontre l'importance des paramètres pris en compte dans le calcul du facteur de transfert, qui est à adapter en fonction de

l'objectif visé par l'étude : santé humaine liée à la consommation de végétaux (risques sanitaires) ou risques environnementaux de propagation des toxiques dans les chaînes alimentaires.

II.8.2.1.2. Translocation du plomb des racines vers les parties aériennes

Après l'absorption par les racines, la translocation correspond au transfert des éléments traces métalliques vers les parties aériennes. Elle peut varier considérablement en fonction du métal, mais également de l'espèce végétale. Pour être conduits vers les parties aériennes, les éléments prélevés dans le sol par les racines doivent être transportés dans le cortex puis déversés dans les vaisseaux du xylème (par circulation de la sève brute).

Ce flux d'ions métalliques dans le xylème nécessite leur chélation à des acides organiques (tels que le citrate) ou à des acides aminés (comme l'histidine) (Briat et Lebrun, 1999).

Pour la plupart des espèces, la majorité du plomb absorbé par les plantes réside dans les racines, et seulement une faible proportion est transloquée vers les parties aériennes. Ce transport limité des racines vers les feuilles peut être expliqué par la barrière formée par l'endoderme des racines. Les bandes de Caspary peuvent en effet être un facteur majeur limitant le franchissement de l'endoderme jusqu'au cylindre central (Seregin et al, 2004 ; Sharma et Dubey, 2005). Pour illustrer ce propos, différents auteurs ont défini un facteur de translocation, qui est calculé comme suit (Mattina et al., 2003 ; Tanhan et al., 2007):

$$\frac{[\text{Pb}]_{\text{parties aériennes}}}{[\text{Pb}]_{\text{racines}}}$$

Yoon et al (2006) dans une étude des concentrations en métaux dans des plantes natives sur un site contaminé ont montré que dans 95% des cas, les concentrations en plomb dans les racines étaient beaucoup plus élevées que dans les feuilles, soulignant une faible mobilité du plomb des racines vers les parties aériennes et donc une immobilisation dans les racines. De plus, ils trouvent des facteurs de translocation assez faibles, avec une valeur moyenne de 0,58, indiquant que les plantes séquestrent le plomb dans les parties racinaires et limitent le transport interne, des racines vers les parties aériennes. De même, Del-Rio Celestino et al (2006) ont trouvé des facteurs de translocation compris entre 0 et 0,7 dans des plantes sauvages ayant poussé sur du sol artificiellement contaminé avec 500 mg Pb.kg-1. Quant à Ding et Pan (2003), ils ont montré que s'ils retrouvaient du plomb dans les parties aériennes de plantes ayant poussé sur site contaminé, au moins 50% était d'origine atmosphérique. Pour Verkleij et al (1990), cette restriction du transport vers les parties aériennes représente un facteur de tolérance des plantes à la présence de contaminants dans leur milieu de culture. En effet, il est important que le moins de plomb possible soit transféré vers les feuilles, car c'est un élément toxique, notamment pour l'activité photosynthétique, pour la synthèse de chlorophylle ou encore pour la synthèse d'enzymes anti-oxydantes (Kim et al, 2003).

Ceci n'est cependant pas vrai pour les espèces hyperaccumulatrices, qui ont la capacité de transloquer une grande quantité du plomb vers les parties aériennes (Seregin et Ivanov, 2001), et qui présentent donc des facteurs de translocation supérieurs à 1 (Baker, 1981).

II.8.2.2. Absorption foliaire

Bien qu'elle ait été peu étudiée par rapport à l'absorption racinaire, l'assimilation du plomb par les feuilles peut représenter une part importante dans le taux de contamination de la plante. Du plomb peut être apporté sur les feuilles par des retombées atmosphériques, mais également dans les champs par des apports en engrais et pesticides (plomb sous forme d'impuretés). La majorité de ce plomb est lessivée, mais une partie va s'adsorber aux lipides épicuticulaires et être absorbée par les feuilles (Prasad and Hagemeyer, 1999). La capacité des plantes à absorber le plomb disponible via leurs feuilles dépend à la fois de l'âge de celles-ci, mais également de leurs morphologies. Les feuilles pubescentes ont en particulier la capacité de fixer et d'absorber ce plomb (Godzik, 1993). Dans le cas de « légume-feuilles », comme l'épinard, ou de céréales, comme le blé, exposés à de fortes retombées atmosphériques, la quantité de métal absorbée par les parties aériennes peut atteindre jusqu'à 95 % de la quantité totale absorbée (Dalenberg and Van Driel, 1990).

II.8.3. Effets du plomb sur la plante

II.8.3.1. Actions sur les activités enzymatiques

Le plomb peut inhiber l'action de certaines enzymes, notamment celles qui possèdent un groupement -SH, ce dernier présentant une forte affinité pour le plomb. Dans la plupart des cas, l'inhibition se fait par interaction du plomb avec ce groupement qui est indispensable pour l'activité et le bon fonctionnement des enzymes. Le plomb affecte donc la conformation de nombreuses enzymes, les empêchant de fonctionner convenablement (Seregin et Ivanov, 2001). Parmi les enzymes fondamentales qui peuvent être inhibées par le plomb, se trouvent des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle ou bien la RUBISCO qui permet la fixation du CO₂ (Seregin et Ivanov, 2001 ; Patra et al, 2004). L'inhibition de ce type d'enzyme entraîne une forte perturbation de la photosynthèse. Ceci entraîne une réduction de la teneur en chlorophylle ainsi que celle de tous les pigments photosynthétiques, et également une croissance réduite des feuilles. Une concentration plus élevée en plomb provoque une substitution de l'atome de magnésium au centre de la molécule de chlorophylle par un atome de plomb, provoquant un arrêt de la photosynthèse (Kupper et al., 1996). La photosynthèse reste de ce fait un des mécanismes les plus affectés par la présence du plomb.

II.8.3.2. Effets sur la nutrition minérale

Le plomb affecte également la nutrition minérale, en perturbant le prélèvement et le transport des nutriments par la plante, tels que Ca, Fe, Mg, Mn, P et Zn en bloquant leur entrée ou en se liant à eux, les

rendant indisponibles pour les plantes (Xiong, 1997). Burzynski (1987) a montré que la présence de plomb entraînait une diminution du contenu en potassium dans tous les tissus du concombre, ainsi qu'une diminution du calcium dans les cotylédons et l'hypocotyle, mais aussi du fer dans les racines. Le plomb affecte aussi le métabolisme azoté en diminuant le prélèvement de nitrate et en perturbant le fonctionnement du nitrate reductase (Seregin et Ivanov, 2001).

II.8.3.3. Stress hydrique

Le plomb peut également affecter l'état hydrique de la plante, en provoquant un stress hydrique, notamment par la fermeture des stomates. Cette fermeture des stomates a un impact sur divers processus dans la cellule, tel que la photosynthèse, en induisant une déficience en CO₂. Le stress hydrique s'exprime également par une réduction de la surface foliaire, ainsi que globalement de tous les organes sièges de la transpiration, afin de limiter les pertes en eau. On observe ensuite un flux transpiratoire diminué, une pression osmotique plus faible ou un potentiel hydrique réduit dans le xylème. Le plomb provoque une perte globale de turgescence et de plasticité, et enfin une réduction globale du contenu en eau de la plante (Parys et al., 1998).

II.8.3.4. Génération de stress oxydant

Un des effets très importants provoqué par le plomb dans les cellules est la génération de stress oxydant, qui est défini comme un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants, en faveur des premiers et source d'effets toxiques potentiels (Sies, 1991). Les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), normalement produites dans les cellules se retrouvent en excès. Ces espèces réactives de l'oxygène incluent l'anion superoxyde (O₂⁻), le radical hydroxyle (OH⁻) ou encore le peroxyde d'hydrogène. Le stress oxydant entraîne un ralentissement de la croissance végétale, mais également des dommages moléculaires en interagissant avec des substrats biologiques (dénaturation de protéines, inactivation d'enzymes, des cassures au niveau de l'ADN...). Les travaux de Pourrut et al. (2008) démontrent une induction d'espèces réactives de l'oxygène dose dépendante dans des racines de fèves exposées à une solution plombée contenant 1 mg.kg⁻¹ de plomb sous forme Pb(NO₃). La première étape de l'induction de stress oxydatif étant la production de O₂.

Pour Schützendübel et Polle (2002) le stress oxydant peut être généré par l'inactivation de certaines enzymes, par fixation sur leur groupement -SH ou par déplacement d'ions métalliques essentiels à l'enzyme. Pour combattre ces ERO, les cellules végétales disposent de deux grands types de défense:

- **Un système enzymatique**, visant à détruire les ERO :

- Les superoxydes dismutases (SOD) qui peuvent éliminer l'anion superoxyde par dismutation, pour former de l'oxygène et de l'eau.
- Les catalases, qui détruisent le peroxyde d'hydrogène, en aboutissant également à la formation d'oxygène et d'eau.
- Les peroxydases, détruisant également le peroxyde d'hydrogène en formant de l'eau.
-
- **Un système non enzymatique**, avec des macromolécules capables de piéger ces ERO :
 - Le glutathion (GSH) est le plus abondant chez les êtres vivants.
 - L'acide ascorbique
 - Les tocophérols
 - Les caroténoïdes

Lorsque le stress oxydant est trop important, la capacité des enzymes antioxydantes est dépassée, provoquant un excès de radicaux. Cet excès va entraîner des lésions sur les molécules telles que l'ADN, les protéines ou les lipides. A ce moment-là, l'apparition des symptômes visibles a lieu, notamment un brunissement des racines, ainsi que des chloroses et des nécroses sur les feuilles, entraînant une perturbation de la croissance pouvant aller jusqu'à la mort de l'organisme.

II.8.3.5 Croissance et morphogénèse

Globalement, le plomb affecte la croissance et la morphogénèse des plantes, en perturbant de très nombreux mécanismes physiologiques. Il inhibe fortement la germination et la croissance des plantes, entraînant la formation de plantes de taille réduite. Le plomb affecte considérablement la morphologie des racines, en diminuant la taille des racines primaires ainsi qu'en réduisant le nombre de racines secondaires. L'inhibition de la division et de l'élongation cellulaire sont les phénomènes les plus souvent reportés pour expliquer ces effets du plomb sur les racines (Seregin et Ivanov, 2001 ; Malkowski et al, 2002 ; Patra et al., 2004 ; Kopittke et al., 2007). Ceci avait déjà été mis en évidence il y a près de 80 ans par Hammett (1929) qui avait montré une diminution de l'index mitotique dans les racines de maïs et d'oignon, provoquée par la présence de $Pb(NO_3)_2$, et qu'il avait expliqué par la fixation du plomb sur les groupements $-SH$ des protéines. Les concentrations en plomb toxiques pour les végétaux varient considérablement selon les études. En effet, cette toxicité dépend fortement des interactions du plomb avec les espèces végétales considérées, mais également du mode de culture et des facteurs environnementaux. Les travaux de Rooney et al. (1999) ont montré que pour des concentrations extractibles à l'EDTA dans un sol atteignant 800 mg.kg^{-1} , la croissance du Raygrass n'était pas affectée. Päivöke (2002), quant à lui a montré que la toxicité du plomb vis-à-vis du pois dépendait fortement de l'âge de la plante en plus de la concentration en plomb dans le sol. Cependant, il reporte des effets néfastes sur la croissance des plantes pour des concentrations en plomb inférieures à 500 mg.kg^{-1} . Liu et

al. (2003) ont démontré que la sensibilité ou la tolérance des plantes au plomb était cultivar-dépendante. En effet, leurs travaux réalisés sur différents cultivars de riz mettent en évidence des retards de croissance et de développement provoqués par 800 mg.kg⁻¹, mais uniquement pour certains cultivars, d'autres n'y étant pas sensibles. Ceci démontre bien que la toxicité du plomb dépend fortement du comportement des plantes vis-à-vis de ce métal.

En hydroponie, les données sont différentes, le plomb étant connu pour être toxique à de plus faibles concentrations. Malkowski et al. (2002) ont montré que la croissance du maïs était inhibée par la présence de 10µM de plomb dans la solution de culture. Fodor et al. (1996) et Wozny and Jerzynska (1991) ont également mis en évidence la toxicité de 10µM de plomb en solution sur la croissance et le développement du concombre et du haricot respectivement. Kopittke et al (2007) dans une étude réalisée sur la cornille (une plante de la famille des fabaceae, proche du haricot) montrent que les racines sont plus sensibles que les parties aériennes à l'exposition au plomb. En effet, la production de biomasse racinaire est inhibée dès 0,1µM de plomb dans la solution, avec une apparition de symptômes visibles sur les racines à partir de 1,5µM. L'inhibition de la biomasse des parties aériennes se manifestant quant à elle à partir de 0,3µM.

II.8.4. Mécanismes de tolérance

Seules les plantes qui ont développé des mécanismes de tolérance peuvent survivre à un environnement contaminé. Elles développent en général deux grands types de stratégies. Le mécanisme le plus répandu est l'évitement du stress métallique par exclusion, qui se fait par fixation du métal sur la paroi cellulaire ou bien par sécrétion de chélates. Ceci a pour but de limiter au maximum le prélèvement par les racines, mais également de limiter un éventuel transport des racines vers les parties aériennes. De nombreux auteurs suggèrent que cette restriction a lieu grâce à l'endoderme, qui fonctionne comme une barrière au transport radial du plomb dans la racine, et de ce fait restreint son mouvement vers les organes supérieurs (Seregin et Ivanov, 2001). Pour Kopittke et al (2007), d'autres facteurs entrent en jeu, notamment une immobilisation du plomb dans la paroi cellulaire, par fixation sur les pectines, chargées négativement. Une partie de ce plomb peut alors se déplacer à travers la membrane et atteindre le symplaste.

Une deuxième stratégie est donc mise en place par les plantes, qui consiste à détoxifier le plomb qui a pénétré. La tolérance au stress métallique dépendra donc de l'efficacité des mécanismes internes qu'elles mettent en place. Ces mécanismes peuvent être (Patra et al., 2004 ; Do Nascimento et Xing, 2006) :

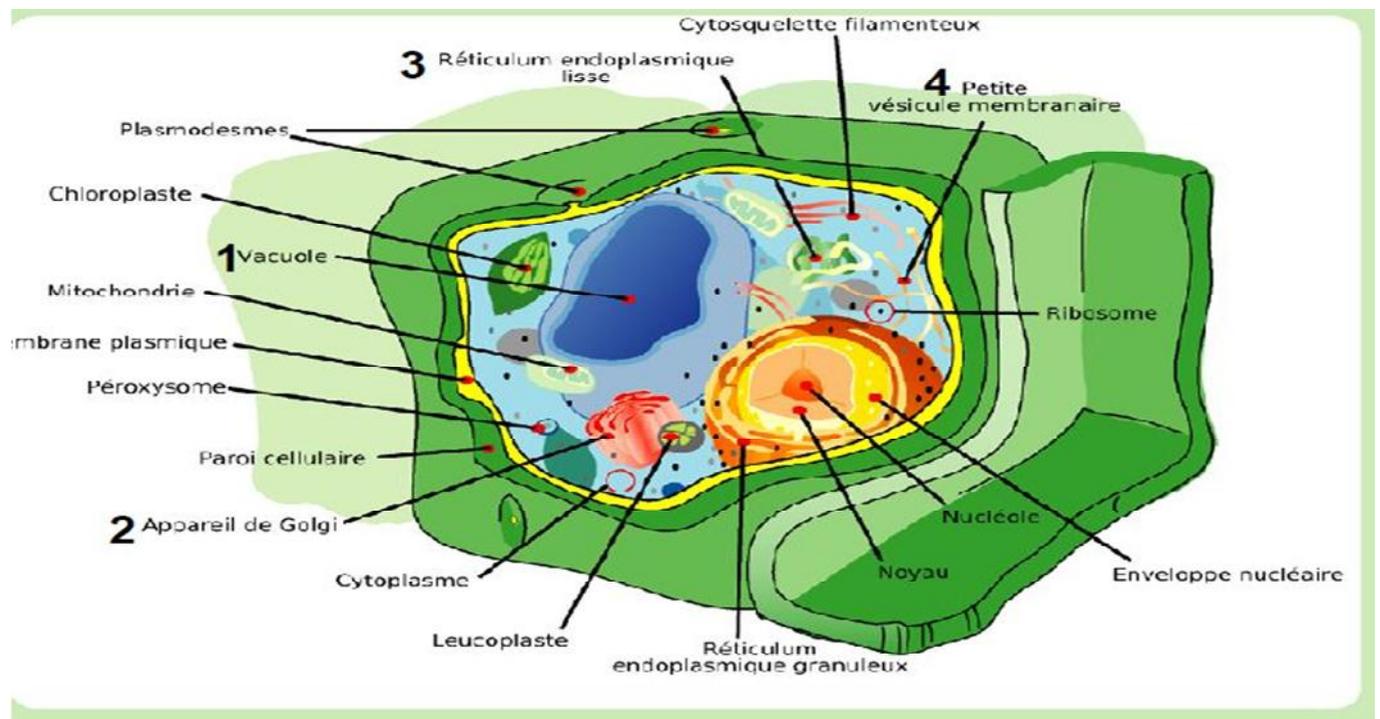


Figure 12 : Représentation schématique d'une cellule végétale, avec représentation des zones impliquées dans la séquestration du plomb (1 à 4) (Pourrut Bertrand, 2008).

Les mécanismes de tolérance interne ne sont pas encore parfaitement connus, mais la chélation du plomb dans le cytoplasme et la séquestration dans les vacuoles seraient des mécanismes prépondérants. La vacuole est en effet considérée comme le lieu principal de stockage du plomb (Tong et al., 2004).

Selon Wierzbicka et Antosiewicz (1993), ces vacuoles peuvent en effet contenir plus de 96% du métal. Ceci permet de diminuer considérablement la quantité de métal dans le cytoplasme, compartiment cellulaire à forte activité métabolique. Des ligands spécialement synthétisés en cas de stress métalliques sont capables de se lier au plomb une fois dans le cytoplasme, pour former des complexes stables, qui peuvent ensuite être séquestrés dans les vacuoles. Les plus connus sont des protéines telles que les métallothionéines ou les phytochélatines, ainsi que des acides organiques de faible poids moléculaires.

- **Métallothionéines**

Ce sont des petites molécules qui séquestrent certains ions métalliques en excès (Rauser, 1999). Elles ont d'abord été identifiées comme peptides liant le cadmium dans les cellules végétales (Salt et al., 1995). Mais actuellement quelques gènes codant pour les métallothionéines ont été identifiés chez les végétaux (Yang et al., 2005).

- **Phytochélatines**

Chez de nombreuses espèces, l'entrée de métaux toxiques dans le cytoplasme induit la synthèse de composés appelés phytochélatines. Ce sont donc des polypeptides dérivés de la glutathione (GSH), composés de cystéine.

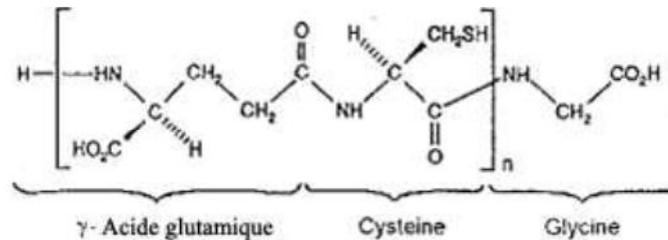


Figure 13 : Structure chimique d'une phytochélatine (Pourrut Bertrand, 2008).

La présence de plomb induit la phytochélatine synthase ainsi que les gènes *gsh1* et *gsh2* responsables de la synthèse du glutathion, précurseurs des phytochélatines (Rausser, 1990; Seregin et al., 2001). Les travaux de Gisbert et al (2003) montrent que des plantes transgéniques qui surexpriment ces gènes précurseurs du glutathion présentent une plus grande tolérance aux métaux que les plantes sauvages. Cette tolérance ne s'accompagne pas d'une baisse de prélèvement du plomb, ni d'une baisse de la translocation. Ceci confirmerait le rôle d'inactivation joué par les phytochélatines. Ce sont des composés pourvus d'un groupement $-SH$ et d'un groupement $-COOH$ qui sont capables de complexer les métaux présents, puis de les transférer dans les vacuoles, puits très importants pour la séquestration des éléments toxiques dans les cellules racinaires, ou bien transportés vers les parties aériennes. Des travaux de Grill et al. (1987) sur des cultures cellulaires de *Rauwolfia serpentina* ont essayé d'évaluer les niveaux de métaux provoquant une induction de la synthèse de ces phytochélatines. Ils ont montré qu'elle avait lieu pour 1mM de Pb^{2+} et Zn^{2+} ; $100\mu\text{M}$ de Cd^{2+} , Ni^{2+} ou Sn^{2+} ; $50\mu\text{M}$ de Ag^{2+} et Cu^{2+} ; $20\mu\text{M}$ de AsO_4^{3-} et enfin $10\mu\text{M}$ de Sb^{3+} .

Des acides organiques sont également des ligands potentiels pour la chélation du plomb, grâce à la capacité du plomb à réagir avec N, S et O. Il a été montré que le citrate, le malate et l'oxalate étaient impliqués dans différents processus métaboliques, pouvant inclure la tolérance aux métaux, le transport dans le xylème ou la séquestration dans les vacuoles (Rausser, 1995 ; Shah et Nongkynrih, 2007).

Il a été également mis en évidence l'implication du calcium dans la tolérance au plomb. Dès 1981, Karataglis montrait que de fortes teneurs en calcium dans un sol diminuaient la toxicité de certains métaux et notamment du plomb. Le plomb étant un élément non essentiel, il ne doit pas posséder de canaux spécifiques sur les membranes, et des études ont montré qu'il pourrait emprunter les canaux calciques (Huang et Cunningham, 1996). Clemens et al. (1998) ont montré que le blocage des canaux calciques entraînait également un blocage du prélèvement du plomb. Pourrut et al. (2008) montrent une inhibition du stress oxydatif provoqué par le plomb grâce à des applications simultanées de plomb et de calcium dans le milieu extracellulaire, suggérant une compétition entre ces deux types d'ions au niveau de l'entrée dans les cellules. Ces observations permettent de conclure que le plomb aurait une forte affinité pour les sites de fixation du calcium (Antosiewicz, 2005). Globalement l'effet de toxicité du plomb sur le

métabolisme cellulaire des plantes dépend de la concentration en Pb^{2+} . Cette concentration quant à elle, dépend à la fois de la concentration externe en métal et de l'efficacité des systèmes de protection de la plante. Quand les systèmes de protections sont dépassés les mécanismes du stress oxydatif sont déclenchés.

Les plantes sont la voie d'entrée de la majeure partie des métaux lourds dans les organismes (Satarug *et al.* 2003). Certaines plantes ont même acquis la capacité d'accumuler ces métaux démontrés toxiques pour les autres espèces dans des proportions telles que l'on parle d'espèces hyperaccumulatrices. En 1865, *Thlaspi caerulescens* est la première espèce hyperaccumulatrice étudiée (Sachs 1865) bien que le mot hyper accumulation soit défini seulement en 1976 par Jaffre *et al.* Il est intéressant de noter que, le plus souvent, cette hyper accumulation est spécifique à un métal.

Le transfert des métaux depuis les racines vers les parties aériennes est différent selon les espèces, ce qui aura un effet sur le niveau de phytotoxicité.

Chronologiquement, le premier effet sur les plantes d'une contamination du sol par des métaux lourds est indirect ; elle cause une réduction de la population microbienne du sol, ce qui a un impact sur la biodisponibilité des minéraux pour les plantes (McGrath *et al.* 1995; Moreno *et al.* 1999).

III.1. Phytotoxicité des métaux lourds

La composition minérale du sol est l'un des paramètres environnementaux envers lesquels les plantes sont capables d'ajustement. Cette composition minérale est sujette à des modifications rapides, notamment dans les régions à forte activité humaine. La toxicité des métaux lourds, même essentiels, lorsqu'ils sont présents en excès, a été clairement démontrée.

Au cours de l'évolution, les organismes ont développé des fonctions biochimiques en exploitant les propriétés d'éléments présents dans leur environnement. Le premier critère, celui de la réactivité chimique des éléments, s'est nécessairement conjugué à celui de l'abondance relative et de la disponibilité de ces éléments (Frausto da Silva et Williams 2001).

Cela a pour conséquence l'actuelle spécificité entre certaines biomolécules et des éléments dits '*essentiels*'. En corollaire, des éléments présentant des caractéristiques proches des éléments essentiels, mais plus rares dans l'environnement, sont susceptibles de réagir avec les biomolécules et d'altérer leur fonctionnement.

III.2. Effet du stress métallique sur les plantes

III.2.1. Effet du stress métallique sur l'activité enzymatique

Le stress métallique implique une large gamme de réponses que l'on rencontre également lors d'autres types de stress.

On a rapporté l'induction par les métaux lourds de Pathogenesis Related Proteins (PR proteins) (Didierjean *et al.* 1996; Kieffer *et al.* 2009b), généralement associées aux stress biotiques ou à la réponse

aux basses températures (Moffatt *et al.* 2006; Renaut *et al.* 2008b). Les metallothioneines (MT) font également partie de la gamme de réponse au stress métallique. Les MT sont fortement induites par des teneurs toxiques en métaux lourds (Hassinen *et al.* 2009).

Cependant les MT sont aussi observées en réponse à des contraintes lumineuses, au froid, à la sécheresse, à une infection virale ou lors de la sénescence (Kohler *et al.* 2004; Wisniewski *et al.* 2008; Berta *et al.* 2009).

D'une manière identique. Le stress métallique affecte l'expression et l'activité d'enzymes de détoxification impliquées dans la majorité des stress étudiés. On notera toutefois que le caractère stimulant ou inhibant du stress sur ces enzymes est loin d'être consensuel dans la littérature

Les phytochélatines (PC) sont des polypeptides qui possèdent une structure assez proche des MT qui leur permet de se lier à plusieurs ions métalliques. Toutefois, si les MT sont génétiquement encodées, les PC sont le résultat d'une polymérisation de glutathion réalisée par une PC synthase (Cobbett et Goldsbrough 2002). Les PC présentent une forte spécificité envers le stress métallique (Grill *et al.* 1985; Clemens 2006) même si une étude tend à montrer leur implication dans le stress initié par une exposition aux UV (Bhargava *et al.* 2005).

Les phytochélatines jouent sans doute un rôle transitoire dans la détoxification, puisque les complexes PC-métal disparaissent des tissus racinaires quelques jours après l'exposition au métal, sans pour autant que les ions métalliques soient libérés dans les tissus (Leopold *et al.* 1999).

III.2.2. Accumulation des acides aminés

L'accumulation des acides aminés suite au stress métallique peut être expliquée par la dégradation de certaines protéines sensibles au stress soit par la synthèse de nouveaux acides aminés (Berlett et Stadtman, 1997 ; Siedlecka et Krupa, 2002 ; Hsu et Kao, 2003 ; Pena *et al.*, 2006 ; Sharma et Dietz, 2006).

Parmi les acides aminés la proline, bien que ne constituant que moins de 5 % des acides aminés libres (Matysik *et al.*, 2002 ; Lei *et al.*, 2007), est probablement l'un des métabolites de stress les plus répandus. Sa teneur, qui constituait 4,40 % des acides aminés totaux, est significativement augmentée dans les feuilles suite au traitement par le cadmium mais s'avère non affectée par la seule application foliaire de Put ou de Spd. En revanche

Une augmentation de la proline sous l'effet du cadmium a été rapportée pour des plantes variées telles que le lupin (Costa et Spitz, 1997), le riz (Shah et Dubey 1998a, b), le radis (Chen *et al.*, 2003) et le soja (Balestrasse *et al.*, 2005). Une telle augmentation de la proline a également été observée sous l'effet d'autres métaux tels que le Mn (Lei *et al.*, 2007), le Zn, Pb, Co, Cu (Alia *et al.*, 1995 ; Schat *et al.*, 1997 ; Sharmila et Pardha Saradhi, 2002 ; Sharma et Dietz, 2006) mais aussi sous l'action d'autres types de

stress : salin (Demiral et Türkan, 2005), hydrique (Taulavuori *et al.*, 2005), radiations UV (Pardha Saradhi *et al.*, 1995), thermique (Taulavuori *et al.*, 2005). La proline est considérée comme faisant partie d'un syndrome adaptatif général aux conditions environnementales défavorables. Différentes fonctions sont attribuées à l'accumulation de ce soluté compatible : osmorégulation, chélation et détoxification des métaux, protection des enzymes, régulation de l'acidité cytosolique, stabilisation de la machinerie de la synthèse protéique et piégeage des espèces réactives de l'oxygène (radicaux hydroxyles, oxygène singulet) (Sharmila et Pardha Saradhi, 2002).

III.2.3. Accumulation de glucides solubles

Outre les changements de teneur en acides aminés, une accumulation de glucides solubles a été rapportée en réponse à différents stress environnementaux et particulièrement des métaux (Samarakoon et Rauser, 1979 ; Moya *et al.*, 1993 ; Costa et Spitz, 1997 ; Dubey et Singh, 1999).

Une accumulation de glucides sous l'effet du Cd pourrait, à l'exemple de ce qui a été rapporté pour l'arsenic par Jha et Dubey (2004), résulter d'une altération des activités enzymatiques notamment l'invertase acide, la saccharose synthase et l'amidon phosphorylase. Costa et Spitz (1997) observent également une perturbation de la teneur en glucides solubles sous l'effet du Cd qui résulterait de l'action des radicaux libres produits. Une augmentation de la photosynthèse paraît en effet peu vraisemblable pour rendre compte de l'augmentation des sucres solubles observée, le Cd produisant un abaissement de 15 % de la teneur en pigments.

III.3. Tolérance aux métaux lourds

La tolérance aux métaux lourds est un phénomène dans lequel la plante interagit avec la concentration externe en métaux tout en régulant la concentration interne" (Macnair 2007). Les divers mécanismes de contrôle sont :

- ✓ l'exsudation d'agents complexant dans le sol
- ✓ la liaison des métaux aux parois cellulaires,
- ✓ l'efflux actif des métaux depuis le symplaste,
- ✓ la limitation du transport des métaux dans les parties aériennes (translocation),
- ✓ la complexation a divers ligands dans le symplaste (phytochélatines, acides organiques, acides amines, ferritine, métallothioneines), puis le transport de ces complexes dans la vacuole
- ✓ l'induction d'antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques
- ✓ la formation d'enzymes résistantes aux métaux qui limitent les dommages (Hall 2002; McGrath et Zhao 2003; Benavides *et al.* 2005).

Ces mécanismes de tolérance aux métaux, dépendants de l'expression de gènes de réponse au stress, peuvent s'activer séparément ou concomitamment, *via* notamment la production d'acides aminés spécifiques dans les racines et exsudats racinaires qui jouent potentiellement le rôle de signal de stress (Costa *et al.* 1997).

III.4. Accumulation et compartimentation des métaux lourds

L'accumulation des métaux lourds dans la plante est l'aboutissement d'un processus complexe qui commence avant l'absorption racinaire, par la solubilisation du métal dans le sol. En effet de nombreux métaux biologiquement indispensables sont présents dans le sol sous une forme insoluble, et les plantes doivent sécréter des acides organiques et des ligands afin de les rendre biodisponible (Cieslinski *et al.* 1998; Peer *et al.* 2005).

La détermination de la part de métal biodisponible est en soi problématique. Si des extractions en séquences permettent de connaître l'état d'association entre le métal et le sol, elles sont en revanche insuffisantes pour conclure en termes de biodisponibilité (Degryse *et al.* 2004).

On peut considérer 5 fractions du sol auxquels les métaux sont susceptibles d'être liés :

- 1- dans la solution du sol sous forme libre ou de complexe soluble,
- 2- adsorbés sur les constituants inorganiques du sol,
- 3- liés à la matière organique,
- 4- sous forme de précipités (oxydes, hydroxydes et carbonates)
- 5- ancrés dans les structures des minéraux silicates (Lasat 2000).

Seules les fractions 1 et 2 sont directement biodisponible pour la plante. La biodisponibilité des métaux peut varier, notamment, en fonction de la teneur en matière organique et du pH (Sarkar et Wynjones 1982). En lien avec le pH et l'activité microbologique, les acides humiques peuvent augmenter l'absorption de métaux lourds par la plante et améliorer leur translocation dans les parties aériennes (Halim *et al.* 2003; Evangelou *et al.* 2004; Sterckeman *et al.* 2005). La mycorrhizosphère peut jouer un rôle de première importance pour faciliter (Citterio *et al.* 2005) ou au contraire réduire (Huang et Xu 2008) la biodisponibilité des métaux.

La plante, elle-même, en sécrétant des chélateurs dans ses exsudats racinaires peut limiter la mobilité et la disponibilité des métaux toxiques (Patra *et al.* 2004). On a par exemple montré une corrélation entre la présence de malate dans les exsudats d'apex racinaires et la tolérance à l'aluminium chez le blé (Delhaize et Ryan 1995).

La translocation du métal dans la plante est le passage depuis la racine vers les parties aériennes. Elle implique que l'ion métallique a atteint les tissus conducteurs de la racine (figure x). La distribution

des métaux dans les organes de la plante est très variable d'une espèce à une autre. La vascularisation des métaux dans la racine est l'un des premiers facteurs qui réduisent la translocation (Xing *et al.* 2008). On a reporté une suberisation plus importante des racines chez plusieurs espèces dont le maïs en présence de métaux lourds (Schreiber *et al.* 1999). Cette suberisation limite les flux d'eau et l'absorption de nutriments et de métal (Cosio 2006).

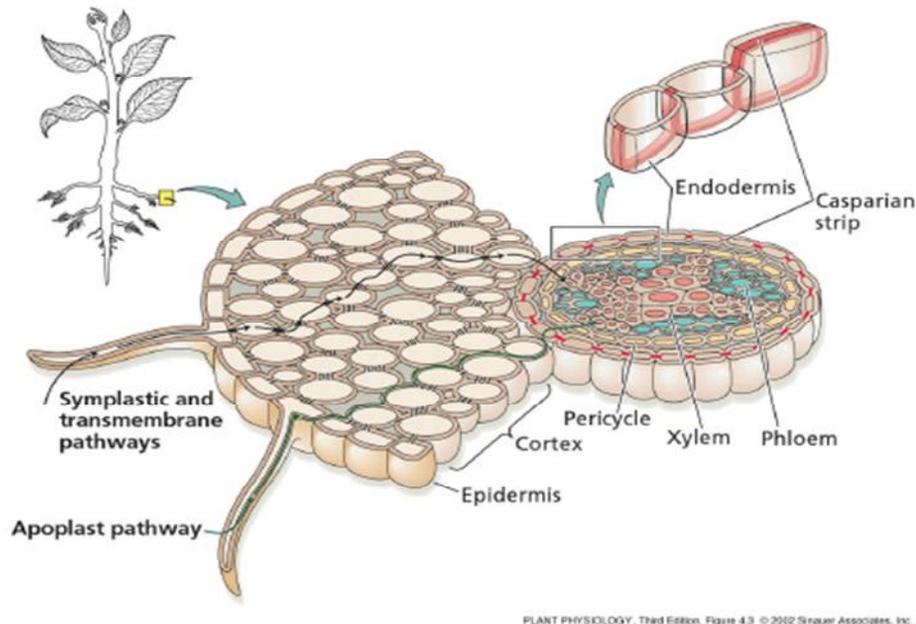


Figure 14 : Voies de passage des racines de l'eau et des minéraux depuis le sol vers le système vasculaire : symplaste et apoplaste

(Thomas DURAN, 2008)

III.5. Stratégies d'adaptation des plantes au stress métallique

En règle générale, lors d'un stress abiotique, le maintien de la croissance est associé à deux modalités : la *tolérance* et l'*évitement*. Dans le cas du stress métallique, ces modalités peuvent être mises en relation avec trois grandes stratégies qui sont l'exclusion, l'absorption non régulée des métaux (réponse type 'indicateur'), et l'hyper-accumulation (Figure 15).

Ces trois stratégies sont le reflet de mécanismes moléculaires contrastés. Les plantes qui ne régulent pas l'entrée des métaux lourds présentent une sensibilité plus importante que celles des deux autres catégories (Callahan *et al.* 2006).

Toutes les plantes peuvent extraire les métaux du sol de manière régulée afin de combler leurs besoins métaboliques. Certaines, toutefois, les accumulent bien au-delà de ces besoins.

L'exemple le plus marquant est l'hyperaccumulateur appelé "Sève bleue" (*Sebertia acuminata*). Le latex de cet arbre endémique de Nouvelle Calédonie peut contenir jusqu'à 25 % de nickel (Jaffre *et al.* 1976). Le phénomène est rare ; seule 0,2 % des angiospermes sont considérées comme hyperaccumulatrices (Baker *et al.* 2000), elles sont en revanche très dispersées d'un point de vue taxonomique. La raison de l'évolution vers l'hyper-accumulation fait encore débat. On a évoqué pour expliquer son apparition :

- la tolérance envers les métaux,
- une absorption 'accidentelle',
- l'allelopathie,
- la résistance à la sécheresse et
- la protection contre les phytophages (Sagner *et al.* 1997) et les phytopathogènes (Boyd et Martens 1992).

Whiting *et al.* (2003) ont toutefois montré que l'accumulation de Ni ou de Zn était sans effet sur la résistance à la sécheresse de *Alyssum murale* et de *Thlaspi caerulescens*. Par ailleurs, l'entrée des métaux lourds dans les tissus végétaux est souvent "accidentelle", relevant d'un manque de sélectivité des transporteurs et des pores membranaires.

On note à cet égard qu'une forte concentration en cations divalents, comme Zn^{2+} par exemple, réduit l'entrée de Cd^{2+} chez de nombreuses espèces (Lombi *et al.* 2002). Il apparaît que le coût métabolique d'un mécanisme plus sélectif dépasserait celui de posséder un système d'efflux inductible (Silver 1996). L'hypothèse liée à la défense contre les herbivores et pathogènes semble à l'heure actuelle relativement bien étayée (Jiang *et al.* 2005) dans la mesure où tolérance métallique et accumulation sont deux caractères qui ségrégent généralement de façon indépendante (Macnair *et al.* 1999; Zha *et al.* 2004; Macnair 2007). Cette hypothèse est confortée par le fait que les hyper-accumulateurs ont des concentrations de métal plus élevées dans les feuilles, les organes les plus sensibles aux pathogènes et herbivores.

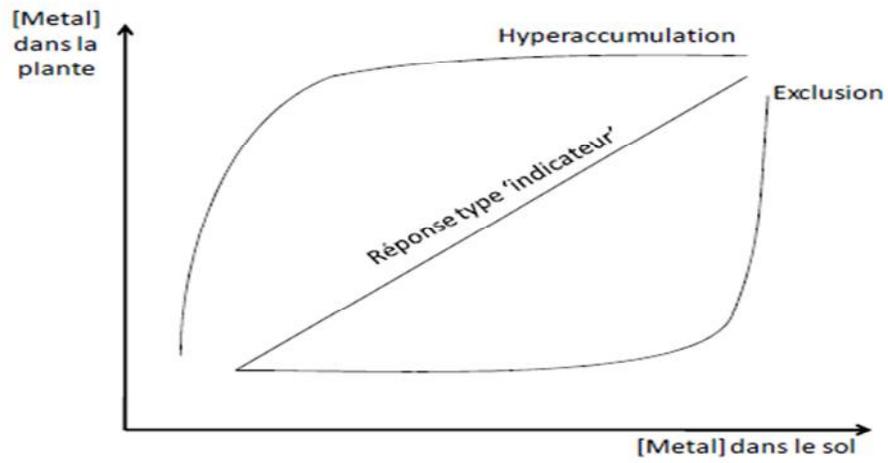


Figure 15 : Trois stratégies de réponse à la présence de métaux lourds dans l'environnement (Callahan, 2006).

1. Présentation de la zone d'étude

Dans notre étude, afin de mettre en évidence la capacité de phytoextraction du colza, nous avons réalisé une expérimentation sous serre en utilisant le sol de l'institut de technologie moyen agricole (ITMAS) sis à Boukhalfa à environ 5 km au nord-ouest de la ville de Tizi-Ouzou.



Figure 16 : Site d'expérimentation (ITMAS) (Photo Google Earth , 2015)

2. Matériel utilisé

2.1. Matériel biologique

Dans notre expérimentation, nous avons opté pour l'utilisation du colza (*Brassica napus*, variété Fantasio), appartenant à la famille des *Brassicacées*.

Cette plante présente d'intéressantes caractéristiques qui correspondent parfaitement à notre objectif, en effet, le colza est connu par son aptitude à extraire et à accumuler les métaux lourds (Marichiol *et al.* 2004), de plus elle présente une biomasse assez élevée suffisante pour accumuler de grandes quantités de métaux lourds.



Figure 17. Plante de *Brassica napus*
(Photo originelle, 2014)



Figure 18. Graines de *Brassica napus*
(Photo originelle, 2014)

2.1.1. Classification botanique phylogénétique du colza (Mounnah, 2008).

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dilleniidae</i>
Ordre	<i>Capparales</i>
Famille	<i>Brassicaceae</i>
Genre	<i>Brassica</i>
Espèce	<i>Brassica napus</i>

2.1.2. Morphologie de la plante

Le colza est une plante herbacée pouvant mesurer jusqu'à 2 mètres de hauteur selon les variétés (Renard et *al.*, 1992).

2.1.2.1. Système racinaire

D'après Renard et *al.* (1992) le système racinaire du colza est composé d'une racine pivotante (site d'accumulation des réserves glucidiques) et d'un réseau dense de racines secondaires.

2.1.2.2. Système aérien

Il forme une rosette de feuilles pétiolées, au limbe découpé et sans stipule. A la montaison, une tige droite se développe avec de nombreuses ramifications. Les feuilles de la partie supérieure sont alternes et lancéolées avec un limbe entier (Renard et *al*, 1992).

2.1.2.3. Inflorescence

Des ramifications apparaissent une inflorescence en grappe simple à croissance indéfinie. Les boutons floraux, pédoncules s'épanouissent de bas en haut. La couleur varie du jaune vif foncé au blanc crème. La fleur est hermaphrodite, le colza est auto-fertile. En moyenne, on observe 70% d'autofécondation et 30% de fécondation croisée (Bensid, 1984).

La fleur est caractérisée par :

- Un calice à 4 sépales, libres et de couleur verte.
- Une corolle est composée de 4 pétales libres dont la couleur varie du jaune clair à l'orange.
- des organes de reproduction qui comprennent 6 étamines dont 4 longs avec des anthères situées au-dessus du stigmate, ce qui favorise l'autopollinisation.
- Au centre de la fleur, se trouve un pistil à 2 ovaires contiennent chacun 2 carpelles soudés à placentation axile.

Donc la formule florale est comme suit :



2.1.3. Caractéristiques du colza

- ✓ Plante oléagineuse (40 à 42% d'huile dans la graine).
- ✓ Famille des crucifères.
- ✓ Culture adaptée aux zones plutôt fraîches (jusqu'à 800 m d'altitude environ).
- ✓ Bonne couverture du sol en hiver.
- ✓ Racines pivotantes à implantation profonde.
- ✓ Allège les rotations chargées en céréales.
- ✓ Prélève de l'azote en automne.
- ✓ Valorise bien les engrais de ferme (Anonyme, 2007).

2.2. Matériel physique

2.2.1. Sol

Notre expérimentation s'est réalisée sur un sol provenant de l'ITMAS, prélevé sur le profil culturel superficiel.

Des analyses physico-chimiques ont été effectuées sur un échantillon de sol afin de déterminer ses caractéristiques physico-chimique.

2.2.2. Métal

Pour la contamination du sol, nous avons utilisé le plomb pur sous sa forme natif (Pb) en poudre. Nous avons utilisé dans notre expérimentation quatre doses de plomb comme suite :

- Dose P1 (400 ppm) = 2.4 g
- Dose P2 (800 ppm) = 4.8 g
- Dose P3 (1200 ppm) = 7.2 g
- Dose P4 (1600 ppm) = 9.6 g

2.2.3. L'E.D.T.A

Nous avons utilisé l'EDTA ; Ethyle Diamine Tetracétique, acide de formule chimique $C_{10}H_{16}N_2O_8$, comme agent chélateur à différentes doses dans le but de varier le pH (Tableau 4) et de stimuler l'absorption et l'accumulation du plomb dans la partie racinaire, en effet, l'EDTA ou l'H-EDTA multiplie par 5 ou 6 le pouvoir d'absorption du plomb (JARVIS et LEUNG, 2002).

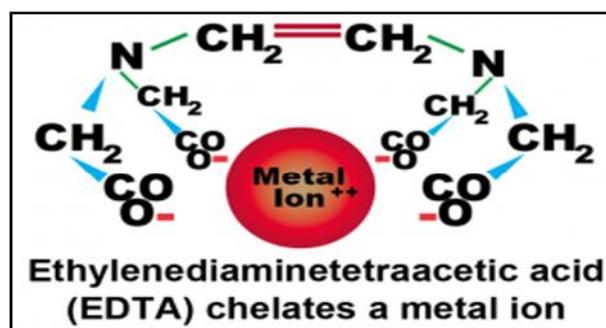


Figure 19 : Structure chimique de l'EDTA

Lors de l'ajout de chélateur dans le site contaminé par le plomb, celui-ci est absorbé et migre vers la partie aérienne où il s'accumule sous la forme de complexe Pb-EDTA (Salt et *al*, 1998 ; Huang et Cunningham, 1996). Ce phénomène a pu être décrit chez *Zea Mays L* ; l'ajout de l'EDTA

ou d'EDDS permet une augmentation de l'accumulation de plomb dans la partie racinaire (Luo et al, 2006).

Tableau 4 : Les différentes doses d'EDTA utilisées et les pH résultants.

Dose d'EDTA(g)	Le pH obtenu
0 g	7.54
6.16 g	6.36
68.6 g	5
107.1 g	4.63

- L'expérimentation a été menée sous serre dans des pots en plastique de diamètre 30 cm, contenant 6 kg de sol chacun. Le pot étant considéré comme unité expérimentale (Figure 19)
- Pour permettre l'identification de chaque pot, nous avons procédé à un étiquetage, ainsi chaque pot est identifié grâce à une étiquette portant la dose de plomb (p), la dose d'EDTA (E), et le numéro du bloc (B).



Figure 20 : Pots (unités expérimentales) Photo originelle, 2014

3. Méthodes

3.1. Préparation du sol

Le sol prélevé a été homogénéisé, étalé et séché à l'air libre durant 3 jours. A l'aide d'une balance, des lots de 6 kg de sol ont été pesés et mis dans des pots étiquetés.

Selon l'étiquetage, chaque pot a subi une contamination au plomb qui s'est faite d'une façon homogène après le mélange du sol et du plomb. Notons aussi que des pots témoins n'ont pas subi de contamination.

Dans cette démarche, nous avons réussi à préparer le sol pour l'expérimentation selon les quatre niveaux de contamination au plomb.

- Sol contaminé à 2.4 g/kg de sol
- Sol contaminé à 4.8 g/kg de sol
- Sol contaminé à 7.2 g/kg de sol
- Sol contaminé à 9.6 g/kg de sol

3.2. Dispositif expérimental

Notre expérimentation a été réalisée sous serres au niveau de l'institut ITMAS, dans des conditions édaphoclimatiques homogènes, nous avons adopté un dispositif expérimental en bloc aléatoire complet (BAC) à deux facteurs de classification (le plomb et l'EDTA).

Le dispositif expérimental est constitué de quatre (04) blocs disposés perpendiculairement à la largeur de la serre. Chaque bloc est considéré donc comme répétition des objets de l'expérimentation.

Il faut rappeler que l'expérimentation a concerné 04 doses de plomb associées à 04 doses d'EDTA, ce qui se traduit en 16 objets plus un témoin pour chaque bloc (pot non contaminé par le plomb et sans ajout d'EDTA). Autrement dit, chaque bloc compte 17 pots disposés d'une manière aléatoire. (Figure 20 et x21)



Figure 21. Présentation du dispositif expérimental en bloc aléatoire complet (Photo originelle, 2014).

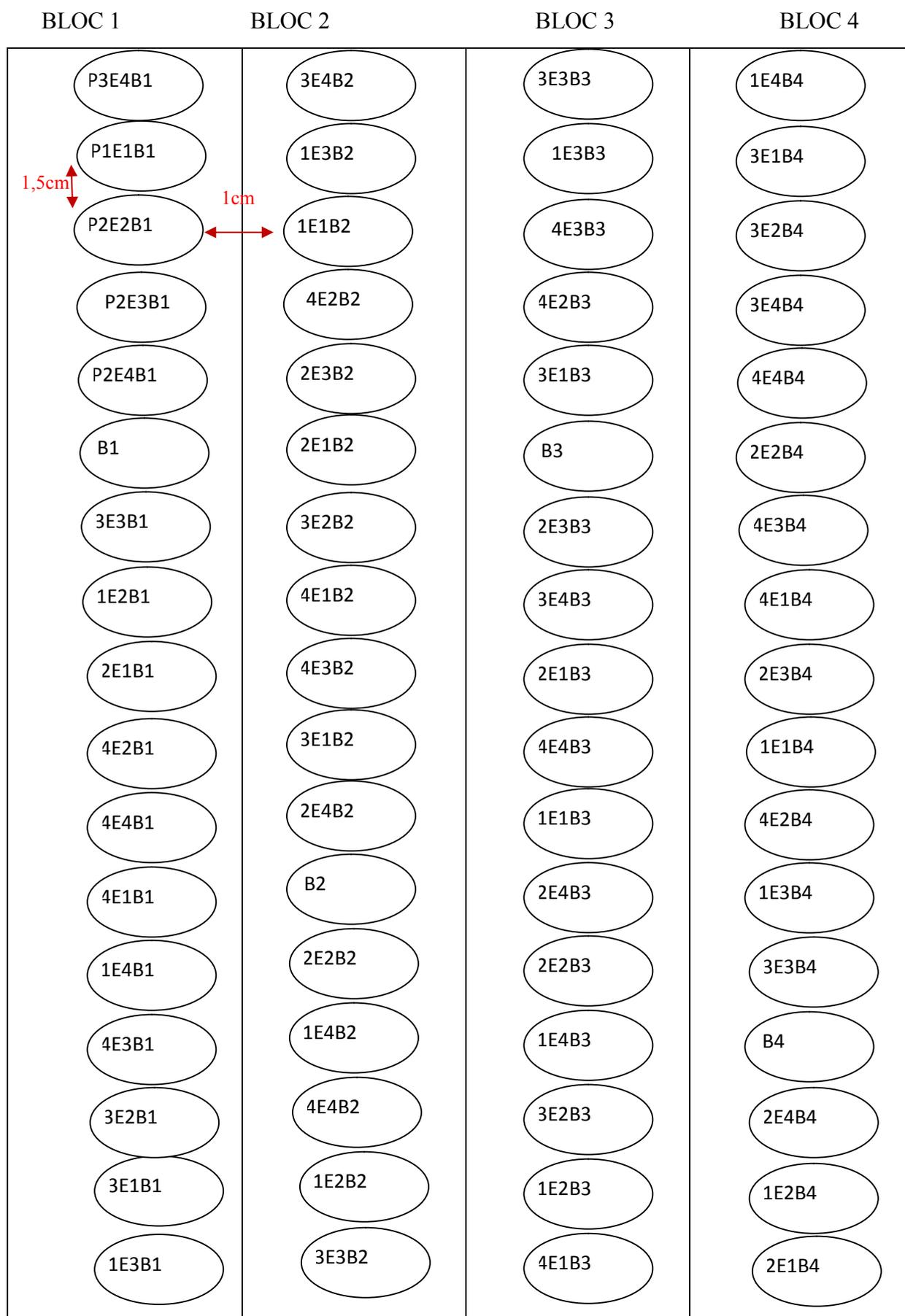


Figure 22. Dispositif expérimental (P : la dose de plomb, E : la dose d'EDTA, B : le bloc)

3.3. Chronologie de l'expérimentation

3.3.1. Test de germination

Afin de vérifier le pouvoir germinatif des graines de colza et d'augmenter le pourcentage de réussite de l'expérimentation, un test de germination a été effectué dans (10) boîtes de pétri, chacune d'elles contenant du coton imbibé et (10) graines de colza.

Le test a duré (15) jours à température ambiante, le taux de germination a été calculé par la formule suivante :

$$\text{Pourcentage (\%)} \text{ de germination} = \left(\frac{\text{Nombre de graines germées}}{\text{Nombre total de graine}} \right) \times 1000$$

3.3.2. Semi

Après le test de germination qui a été concluant à 90%, le semi a été effectué sur le site de l'expérimentation le 25/01/2014. Chaque pot a reçu 6 graines de colza (*Brassica napus*) et un arrosage immédiat pour permettre une bonne adhésion des graines et évacuer l'air compris entre les particules de sol.

3.3.3. Suivi de la culture

Durant toute la durée de l'expérimentation qui été de (12) semaines, un suivi régulier de la culture a été entrepris, comprenant principalement :

- ✓ un arrosage avec fréquence régulière et au besoin de la culture.
- ✓ désherbage des pots et des alentours de l'expérimentation pour permettre uniquement au colza de se développer et absorber le plomb et éviter toutes concurrences.

3.3.4. Ajout d'EDTA

Nous avons ajouté L'EDTA le 01/05/2014, soit 12 jours de la récolte. Sur le site de l'expérimentation, nous avons dilué chaque dose d'EDTA dans l'eau de robinet et ajouté aux pots d'une manière discontinue pour faciliter la pénétration dans le sol. Ainsi chaque pot a reçu la dose d'EDTA qui lui est associée

3.3.5. Récolte

Le 13/05/2014, après 16 semaines de développement, nous avons récolté les plantes de colza au stade de fin de croissance (Figure 22). Les plantes dégagées du sol ont été mises dans des sacs en plastique en suivant leurs étiquetages respectifs et transportées au laboratoire

Par la suite, les racines des plantes ont subi un lavage excessif à l'eau de robinet (Figure 23) afin de les débarrasser de toutes traces de plomb qui se serait attaché. Les parties aériennes sont ensuite séparées des parties racinaires et un premier séchage à l'air libre a été effectué durant une semaine.



Figure 23. Récolte du colza
(Photo originelle, 2014)



Figure 24. Rinçage des racines de colza (Photo originelle, 2014)

Le deuxième séchage a été effectué à l'étuve (figure 25) à une température de 80°C pendant 3 jours, la matière sèche obtenue a été broyée à l'aide d'un moulin à café donnant des poudres fines (figure 26) conservées dans des petites boîtes hermétiquement fermées.



Figure 25. Séchage à l'étuve
(Photo originelle, 2014)



figure 26. Matériel végétal broyé
(Photo originelle, 2014)

3.4.Méthodes d'analyse

3.4.1. Analyses physico-chimiques du sol

Ces analyses ont été réalisées sur un échantillon de sol préalablement séché et tamisé à 2 mm, au niveau de l'institut national des recherches Agronomiques (INRA) à Alger.

3.4.1.1.Détermination du pH : méthode électro-métrique au pH-mètre sur une suspension sol /terre

Le pH (potentiel hydrique) est le logarithme de l'inverse la concentration des ions H⁺ dans une solution :

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] = \log 1/ [\text{H}^+]$$

Dans un bécher, nous avons pesé 20g de sol tamisé, auquel 50ml d'eau distillée ont été rajouté. La solution est laissée au repos pendant 30 mn. La valeur du pH est déterminée par une simple lecture sur le pH mètre.

3.4.1.2.Conductivité électrique au conductimètre sur une suspension terre/liquide de 1/5

Une solution a été préparée contenant 10g de sol, 50ml d'eau distillée et 2 à 3 gouttes de KCl 1/5 celle-ci est mis au repos pendant 30mn. La valeur de la conductivité est directement lue sur le conductimètre préalablement étalonné avec une solution de KCl 1/5.

3.4.1.3.Analyse granulométrique

L'analyse granulométrique d'un sol consiste à déterminer la proportion des diverses classes de grosseurs des particules. Pour cela, 50ml d'eau oxygénée sont ajoutés à une prise d'essai de 10g de sol préalablement séché et tamisé à 2mm afin de détruire la matière organique. On rajoute 1ml de NH₄, la solution est laissée au repos pendant une nuit pour permettre la sédimentation des particules du sol.

Les fractions fines, limon et argile, sont séparées par sédimentation. Le prélèvement de ces dernières se base sur la relation, liant le temps de sédimentation et le diamètre des particules, donnée par la loi de STOCKS.

3.4.1.4. Détermination de l'humidité du sol

10g de sol sont introduit dans un bécher sec, ce poids est noté P1. Le bécher est mis à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. P2 est le poids du sol pris après le séchage. L'humidité est donnée en pourcentage selon la formule suivante :

$$\text{Humidité \%} = \frac{p1-p2}{p1} \times 100$$

3.4.1.5. Le carbone organique : méthode de Walkey-Black (attaque au froid)

Dans une fiole, nous avons mis 0.5g de sol avec 10ml de bichromate de potassium et 20ml de H2SO4, la solution est agitée pendant 1mn à l'aide d'un agitateur magnétique, puis elle est laissée au repos durant 3 heures. Après repos, l'eau distillée est ajoutée à la solution jusqu'au trait de jauge de la fiole. La solution est mise au repos pendant une nuit. Une gamme d'étalons (5 étalons) dont les concentrations respectives en carbone sont :

0mg/l ; 3mg/l ; 6mg/l ; 12mg/l ; et 24mg/l a été mise dans le colorimètre, la lecture correspondante à chacune de ces concentration et à celle de l'échantillon de sol est directement prélevée du colorimètre.

Le carbone organique est déterminé en pourcentage par la formule suivante :

$$C\% = \frac{\text{la lecture de l'échantillon} \times \text{coefficient}}{10}$$

$$\text{Coefficient} = \frac{\text{Concentrations d'étalons}}{\text{Lectures d'étalons}}$$

3.4.1.6. Matière organique

La matière organique est déterminée par la multiplication de la valeur du carbone organique exprimé en pourcentage par 1.724

3.4.1.7. Dosage de l'azote par la méthode de Kjeldhal

Le principe de la méthode Kjeldhal consiste en attaque des matières organiques par l'acide sulfurique (H2SO4) concentré qui se comporte comme un oxydant en présence d'un catalyseur.

L'ammoniac formé est déplacé par la soude distillée, retenu dans l'acide borique et titré par H₂SO₄ 0.1N.

3.4.1.8.Rapport C/N

Le rapport C/N donne une idée sur la vie biologique des substrats. Il est déterminé à partir du carbone organique et de l'azote total

3.4.1.9.Dosage du calcaire total

Le calcaire total est déterminé par la méthode volumétrique ou calcimètre de BERNARD décrite par DUCHAUFOR (1965), elle consiste à doser le CO₂ provenant de la réaction de calcaire avec l'acide chlorhydrique. $\text{CaCO}_3 + 2\text{HCl} \rightarrow \text{CaCl}_2 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

Le volume de CO₂ est proportionnel à la quantité de carbonates, est donc du calcaire présent. La quantité de carbonate est déduite de la courbe d'étalonnage effectuée avec une série de quantité connue de carbonate de calcium.

3.4.2. Analyse du matériel végétal

3.4.2.1.Extraction et Dosage des sucres solubles

La technique utilisée pour la détermination des sucres solubles a été inspirée de la méthode décrite par Mc CREADY et al : (1950). Elle repose sur la transformation des oses en dérivés furfuriques en milieu acide et chaud.

L'acide sulfurique qui est l'un des constituants du réactif à l'antrone, transforme à ébullition les glucides en furfurals et dérivés furfuriques (CERNING-BEROAD, 1975 in KHEDDACHE, 2005). Ces dérivés se condensent avec la forme tautomérique de l'antrone (l'antronal) pour donner des complexes dont la coloration est vert-bleu pour les hexoses.

3.4.2.2.Extraction des sucres solubles

La méthode utilisée est celle de Mc CREADY et al (1950) pour l'extraction des sucres solubles. 1 g de matière végétale sèche (poudre de feuilles et de racines de colza) est mélangé avec 10 ml d'éthanol à 80%. Après agitation au vortex, le mélange est centrifugé à 5 000 trs/mn pendant 20 minutes, ensuite le surnageant est récupéré dans une fiole de 50 ml.

L'extraction est réalisée à deux reprises avec 5 ml d'éthanol à 80% suivie d'une centrifugation pendant 15 mn à 3 000 trs/mn. Les trois surnageants sont mélangés dans la même fiole et ajustés jusqu'à 50 ml en ajoutant de l'eau distillée.

3.4.2.3. Dosage des sucres solubles

Pour le dosage des sucres solubles, la méthode adoptée est celle de Cerning Berrorad (1975). Dans des tubes à essai, 0.5 ml de l'extrait glucidique précédent est mélangé à 0.5 ml d'eau distillée et 2 ml de réactif à l'antrone. Après agitation au vortex, les tubes sont mis au bain-marie à 100°C pendant 7 minutes pour permettre le développement de la coloration.

Après refroidissement des tubes, les densités optiques sont lues à 630 nm au spectrophotomètre UV 9200 (figure 26), ainsi les concentrations en sucres sont déterminées à l'aide d'une courbe étalon. Le blanc est préparé à partir de 1 ml d'eau distillée auquel on a ajouté 2ml de réactif à l'antrone.



Figure 27. Spectrophotomètre UV 9200 (Photo originelle, 2015).

3.4.2.4. Préparation de la courbe étalon

A partir d'une solution mère de glucose à 120 $\mu\text{g/ml}$, nous avons préparé une gamme de dilutions à concentrations croissantes en glucose (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 et 110 $\mu\text{g/ml}$). Pour 1 ml de chaque dilution, 2 ml de réactif à l'antrone et 0.5 ml d'eau distillée sont ajoutées.

Après passage des tubes au bain-marie pendant 7 mn et refroidissement, les densités optiques sont alors lues au spectrophotomètre à 630 nm. Ainsi nous avons tracé la courbe des densités optiques en fonction des concentrations (figure 27).

Cette courbe nous a permis par la suite de déterminer les teneurs en glucide présentent dans nos échantillons.

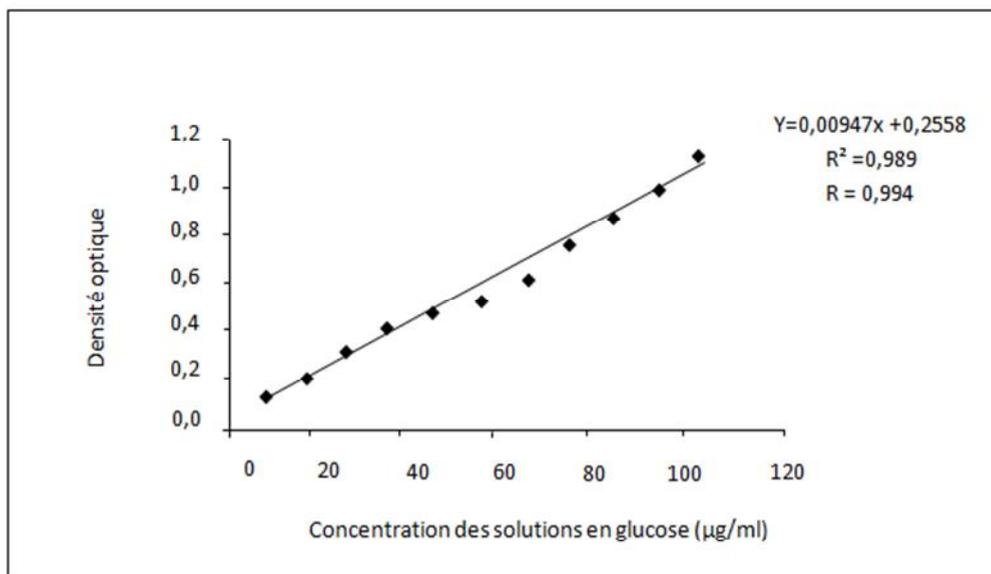


Figure 28. Courbe étalon du glucose

3.4.3. Extraction et dosage de la proline

La technique utilisée pour la détermination de la proline a été tirée de la méthode décrite par Troll et Lindsley (1955) modifiée par BATES et *al.* (1973). La proline réagit en milieu acide et a chaud avec le ninhydrine pour donner un composé de couleur rose (figure 28), soluble dans le benzène.



Figure 29. Tube à essai contenant la fraction de proline de couleur rose

(Photo originelle, 2015)

3.4.4. Mode opératoire

Nous avons mis 0.2 g de MVS dans des tubes à essai avec 10 ml de méthanol à 96%. Les tubes à essai hermétiquement fermés, sont incubés dans un bain-marie à 80°C pendant 1 heure. Après refroidissement des tubes, nous avons prélevé 1 ml d'extrait auquel, 1 ml d'acide acétique et 1 ml de réactif à la ninhydrine sont ajoutés dans des nouveaux tubes à essai.

Ces derniers sont placés dans un bain-marie à 80°C pendant 30 mn, après refroidissement, 5 ml de benzène sont additionnés à ces solutions. Après agitation au vortex, une pincée de Na₂SO₄ est ajoutée à chaque tube.

Deux phases sont alors visibles :

- Une phase supérieure benzénique contenant la proline.
- Une phase inférieure aqueuse sans proline, à éliminer.

La phase supérieure est récupérée et les densités optiques sont lues au spectrophotomètre à 515 nm, les teneur en proline sont alors déterminées à partir d'une courbe étalon.

3.4.5. Préparation de la courbe étalon

La courbe étalon est établie à partir d'une série de dilutions (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 et 110 µg/ml) qui sont préparées à partir d'une solution mère de proline à 120µg/ml.

Pour 1 ml de chaque concentration, 1 ml d'acide acétique et 1 ml de réactif à la ninhydrine sont additionnés dans des tubes à essai. Puis, l'ensemble est placé au bain-marie à 80°C pendant 30 m. Après refroidissement, 5 ml de benzène et une pincée de Na₂SO₄ sont ajoutés.

La courbe des densités optiques obtenues à 515 nm en fonction des concentrations en proline est ensuite tracée (figure 29). Elle nous a permis par la suite de déterminer les teneurs en proline dans nos échantillons.

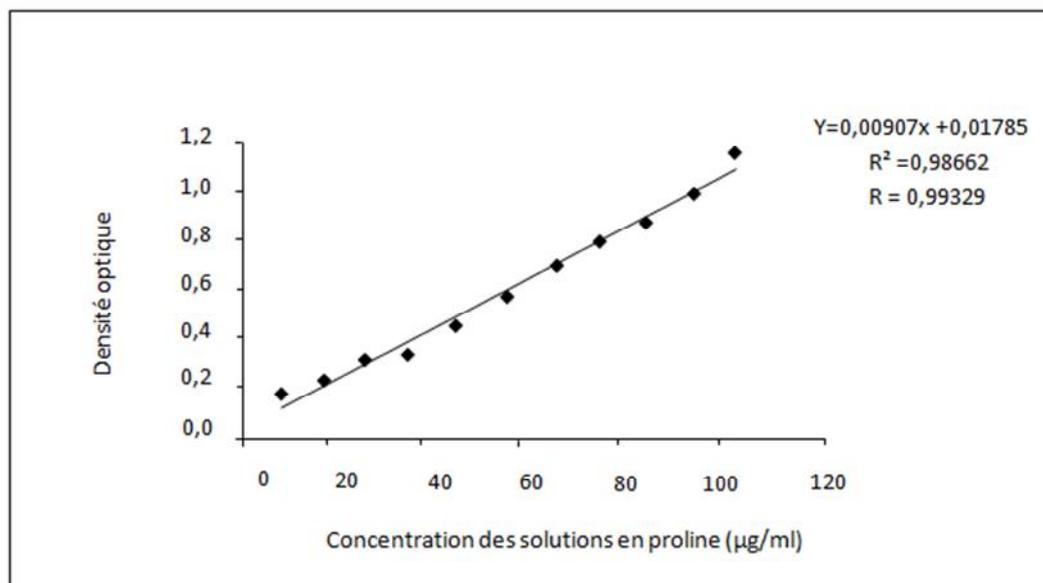


Figure 30. Courbe étalon de la proline

3.5. Minéralisation et dosage du plomb

3.5.1. Minéralisation

Le principe de cette méthode est la destruction de la matière organique par deux attaques : l'une à froid, l'autre à chaud en utilisant l'acide nitrique HNO_3 concentré et l'acide perchlorique HClO_4 à 60%.

La méthode utilisée est celle proposée par MILLER, il s'agit de la minéralisation par voie humide après nettoyage, séchage et broyage des parties du végétal. Cette technique permet une meilleure extraction des éléments minéraux à partir de la matière végétale. Pour cela on fait réagir 0.5g de matière végétale avec 6ml d'acide nitrique HNO_3 dans un matras pendant une nuit puis le mélange est chauffé à une température de 150°C durant 60mn.

2ml d'acide perchlorique HClO_4 à 60% sont ajoutés à ce mélange, l'attaque est poursuivie à une température de 250°C jusqu'à évaporation complète de l'acide (40mn environ). (Figure 30).



Figure 31. Minéralisation sous la hotte
(Photo originelle, 2014)

A ce moment-là le matras est rincé avec 10ml d'eau distillée qui sont ensuite filtré et centrifugé si nécessaire afin d'éliminer toute les particules en suspension. Le rinçage est poursuivi par l'eau distillée qui est récupéré à chaque fois dans une fiole jaugée de 25ml. (Figure 31)



Figure 32 : Récupération de la matière minérale
(Photo originelle, 2014)

Le volume est ajusté jusqu'au traits de jauge, la solution est ensuite analysée par spectrophotomètre d'absorption atomique.

3.5.2. Dosage du plomb

Le dosage du plomb s'est effectué au centre de recherche et développement (CRD) de l'université de Boumerdès par spectrophotomètre d'absorption atomique. (Fera objet d'une autre étude)

V.1. Caractéristiques physico-chimiques du sol

Les caractéristiques physico-chimiques d'un sol (Humidité, Ph, matière organique) sont des facteurs dominants sur la biodisponibilité du Plomb, et donc ont un effet direct sur l'efficacité de la phytoextraction. Le rôle de certains paramètres tels que le pH, le potentiel redox, la composition minéralogique du sol ou du sédiment et la présence de ligands ou de colloïdes dans la phase va être déterminant. Le plomb étant en général considéré comme un élément peu mobile dans les milieux naturels, il a donc tendance à s'accumuler dans les horizons superficiels des sols (Cecchi, 2008).

L'analyse de notre échantillon de sol provenant de l'ITMAS a été réalisée à l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) au département de phytotechnie de Baraki. (Tableau 5).

Tableau 5 : Résultats d'analyse du sol.

Résultats		
Analyse granulométrique %	A	33.50
	LF	17.06
	LG	36.98
	SF	2.99
	SG	9.54
Texture (USDA)		LG
Humidité	1.75	
pH	7.54	
Calcaire total %	1.92	
Conductivité Electrique (ds/cm)	2	
CEC meq/100g terre	17.6	
Azote total %	0.52	
Carbone totale %	2.16	
Rapport C/N	41.53	
Matiere organique %	3.77	
Plomb (ppm)	17	

V.1.1 La granulométrie

La texture du sol est limono-argileuse. Sachant que l'argile retient le plomb ; nous pouvons dire que la disponibilité de ce dernier pour le colza sera limitée.

V.1.2 Le pH

Le pH est l'un des facteurs qui influence le plus la mobilité et la biodisponibilité du plomb. Plus le pH est faible, plus le degré de désorption dans la solution du sol est fort, (DENEUX-MUSTIN *et al* 2003).

Le pH de notre sol est légèrement alcalin avec une valeur de 7.54, ce qui signifie probablement que le plomb sera plus au moins disponible pour le végétal.

V.1.3 Calcaire total

Dans un sol calcaire, les carbonates de calcium sont les constituants majeurs qui interviennent dans la fixation des éléments traces, (PERRENO, 1999) Notre sol est faiblement calcaire à cet effet, le plomb aurait tendance à être mobile et biodisponible pour le végétal.

V.1.4 La CEC

Notre sol présente une CEC élevée donc il a une grande capacité à retenir les cations, dans ce cas, le plomb serait faiblement disponible pour nos plants

V.1.5 La matière organique

La matière organique représente une phase d'absorption dominante du plomb, (PERRONO, 1999). Notre sol est bien pourvu en matière organique, ce qui laisse penser que le plomb aurait tendance à être immobile.

V.2. Analyse des données statistiques

Pour mettre en évidence l'impact du Plomb sur la synthèse des deux métabolites « Sucres Solubles » et « Proline » chez colza, nous avons réalisé une analyse de variances (ANOVA) afin de comparer les différents résultats obtenus pour les deux indicateurs biochimiques « Sucres solubles » et « Proline ».

Nous présenterons d'abord une analyse de variance à deux facteurs « Plomb (P) » et « EDTA (E) » pour chacune des variables étudiées, ensuite nous terminerons par une analyse de variance globale à deux facteurs.

Les analyses de variance ont été réalisées distinctement pour la partie aérienne et racinaire de la plante.

V.2.1. Analyse des données statistiques de la variable « sucres solubles »

V.2.1.1. Facteur « Plomb (Pb) »

L'absorption du plomb par le colza est accompagnée d'une augmentation des concentrations en sucres solubles dans les parties aériennes et racinaires de la plante en fonction des différentes doses de Plomb.

Pour réaliser ces analyses nous avons varié les quatre doses de plomb pour chacune des doses d'EDTA utilisées.

V.2.1.1.1 Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E1) d'EDTA

Les résultats montrent une différence de la concentration en sucres solubles entre la dose (P1), (P2), (P3), et la dose (P4) de plomb.

Nous remarquons aussi que les concentrations en sucres solubles sont plus importantes dans la partie aérienne de la plante que dans la partie racinaire, allant respectivement de 1.63 mg/g de MVS à 2.28 pour la partie aérienne et de 1.07 mg/g MVS à 2.09 pour la partie racinaire. (Figure 33)

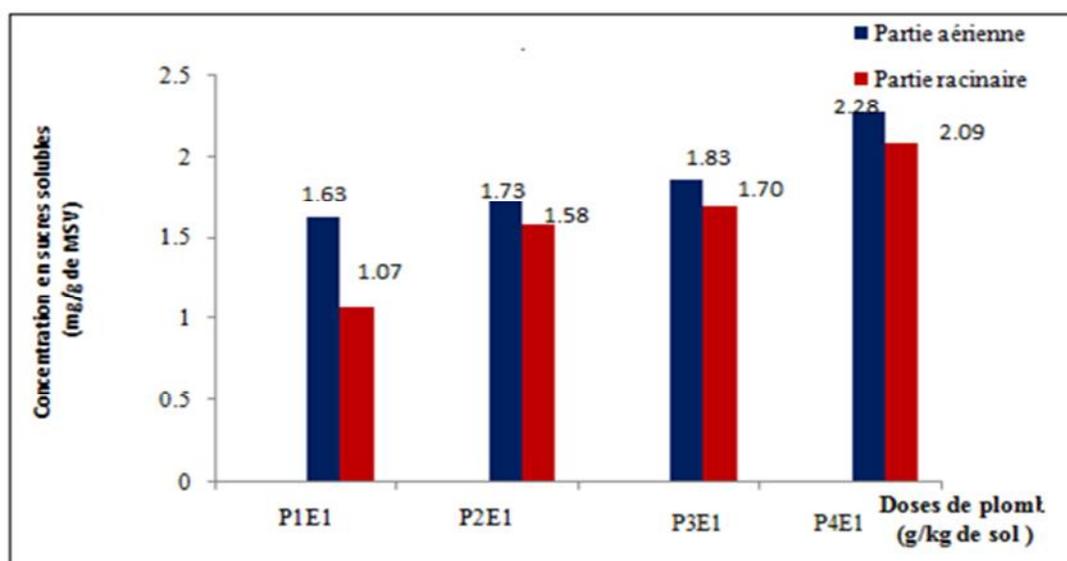


Figure 33 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(1).

V.2.1.1.2. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E2) d'EDTA

Les résultats obtenus mettent en évidence une différence de la concentration en sucres solubles entre la dose (P1), (P2), (P3), et la dose (P4) de plomb ainsi qu'une différence entre la concentration au niveau de la partie aérienne et la partie racinaire de la plante et cela pour la même dose d'EDTA (E2), allant respectivement de 1.51 mg/g de MVS à 2.23 pour la partie aérienne et de 1.09 mg/g MVS à 2.07 pour la partie racinaire. (Figure 34)

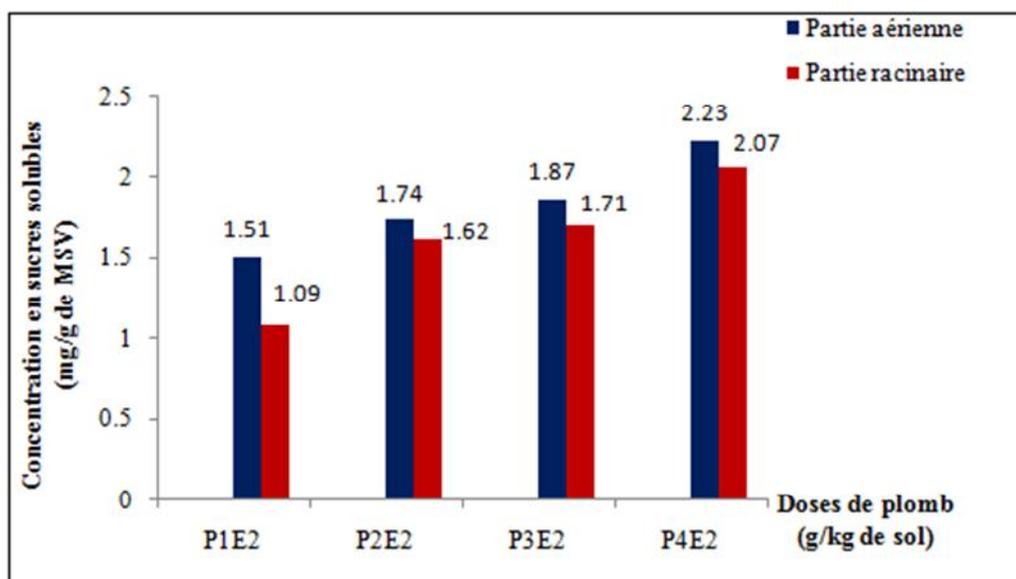


Figure 34 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(2)

V.2.1.1.3. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E3) d'EDTA

Les résultats font apparaitre une différence de la concentration en sucres solubles entre la dose (P1), (P2), (P3), et la dose (P4) de plomb, et une différence entre la concentration au niveau de la partie aérienne et la partie racinaire de la plante et cela pour la même dose d'EDTA (E2), allant respectivement de 1.52 mg/g de MVS à 2.07 pour la partie aérienne et de 1.08 mg/g MVS à 1.98 pour la partie racinaire. (Figure 35)

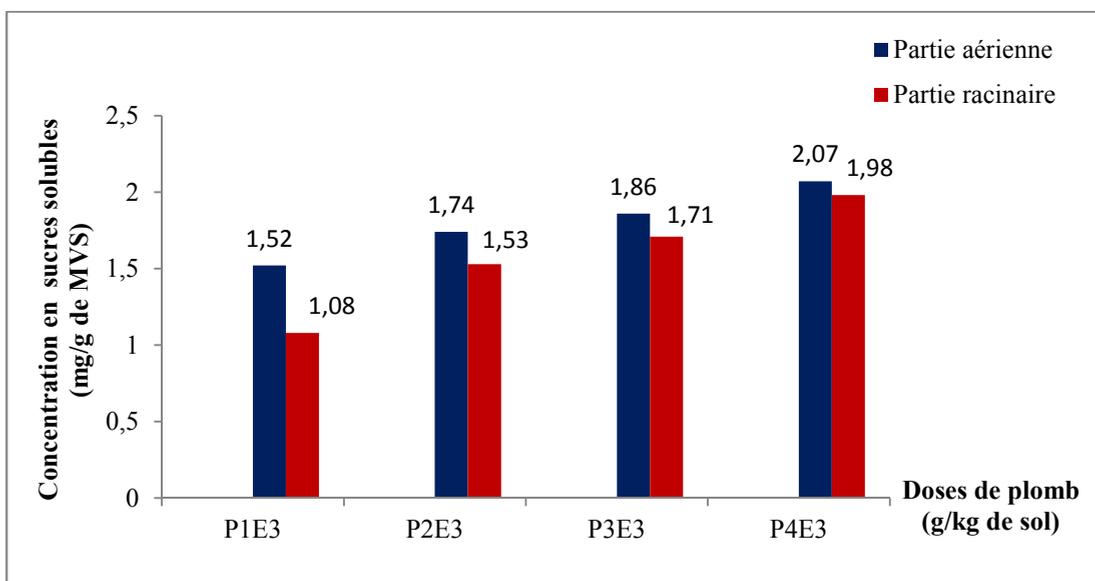


Figure 35 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d’EDTA E(3)

V.2.1.1.4. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E4) d’EDTA

Ces résultats montrent une différence de la concentration en sucres solubles entre la dose (P1), (P2), (P3), et la dose (P4) de plomb, et une différence entre la concentration au niveau de la partie aérienne et la partie racinaire de la plante et cela pour la même dose d’EDTA (E2), allant respectivement de 1.63 mg/g de MVS à 2.77 pour la partie aérienne et de 1.08 mg/g MVS à 2.12 pour la partie racinaire. (Figure 36)

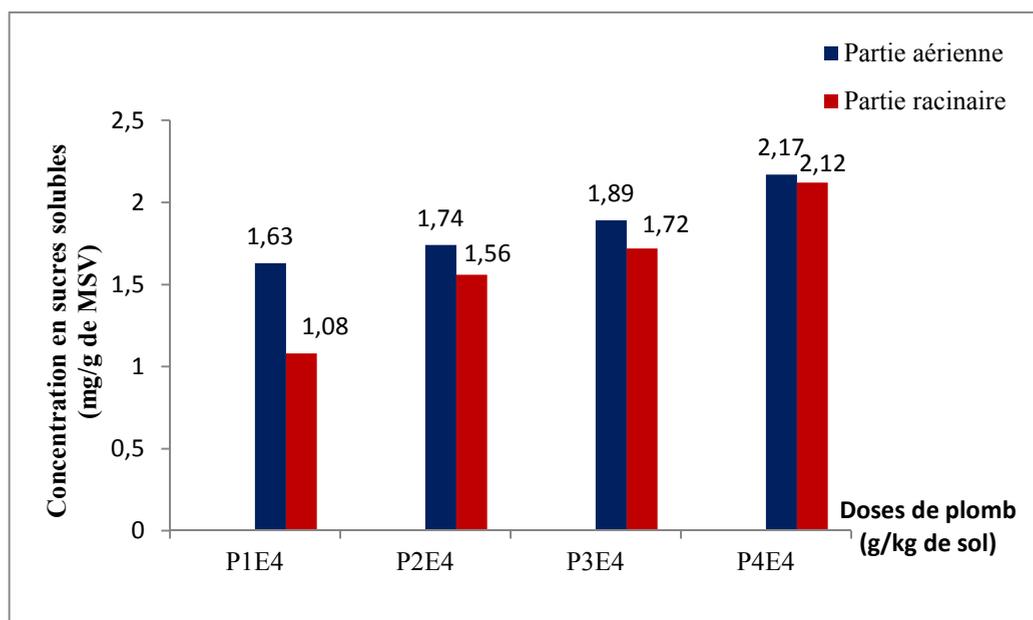


Figure 36 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d’EDTA E(4)

V.2.1.2. Facteur « EDTA (E) »

Afin de réaliser nos analyses statistiques, nous avons procédé par la variation des quatre doses d'EDTA pour chacune des doses de Pb afin de mettre en évidence l'influence de l'EDTA sur les concentrations en sucres solubles.

V.2.1.2.1. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P1) de Plomb

Les résultats de la figure 37 illustrent la variation des sucres solubles en fonction des différentes doses d'EDTA, ces résultats ne montrent que de légères fluctuations des concentrations en sucres solubles entre les doses E(1), E(2), E(3) et E(4) d'EDTA, mais présentent une différence assez nette entre les concentrations au niveau aérien et celles au niveau racinaire.

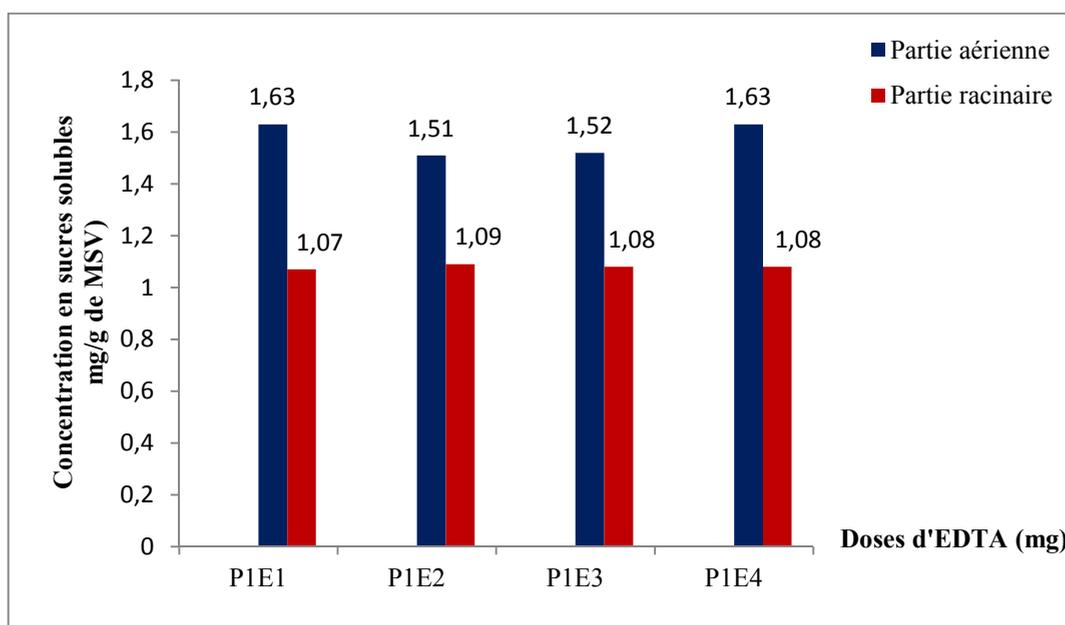


Figure 37 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(1)

V.2.1.2.2. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P2) de Plomb

Les résultats ne montrent pas de différence en sucres solubles entre les différentes dose d'EDTA, cependant, ils mettent en évidence une différence en sucres solubles entre les concentrations au niveau de la partie aérienne et celles du niveau de la partie racinaire, et cela pour les mêmes doses d'EDTA. (Figure 38)

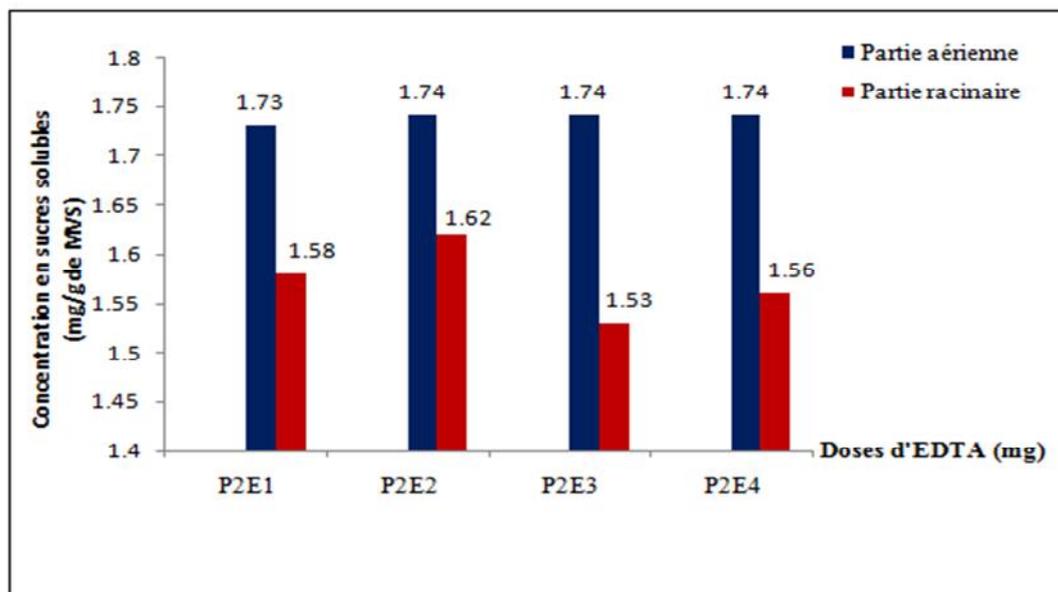


Figure 38 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(2)

V.2.1.2.3. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P3) de Plomb

Les résultats de la figure 39 montrent qu'il y a une égalité des concentrations en sucres solubles entre les différentes doses d'EDTA, la concentration reste stable autour d'une valeur de 1.86 mg/g de MSV, la différence subsiste les concentrations au niveau de la partie aérienne et les concentrations au niveau de la partie racinaire, et cela pour les mêmes doses de Plomb.

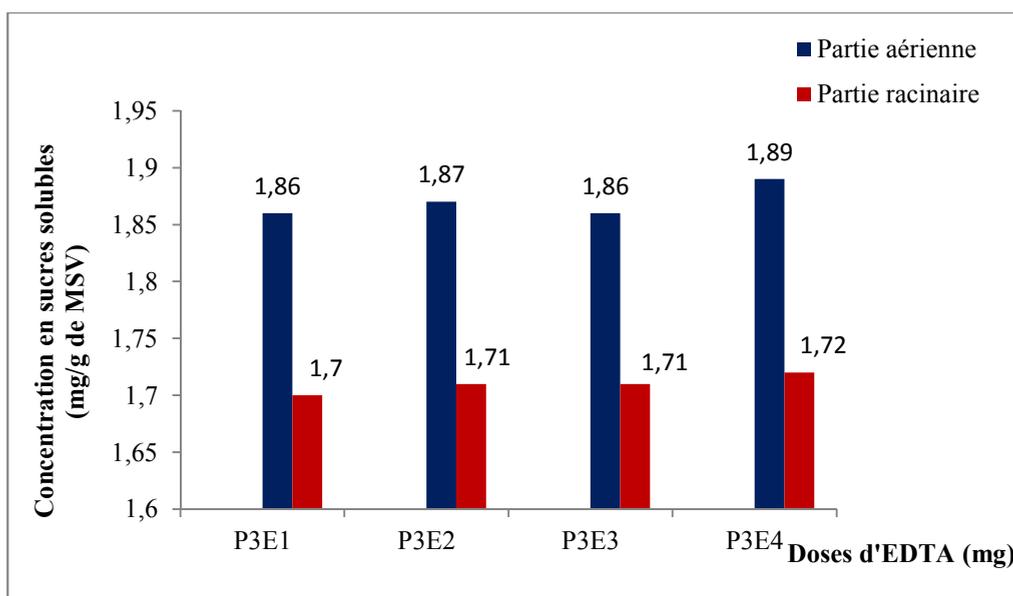


Figure 39 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(3)

V.2.1.2.4. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P4) de Plomb

Les résultats montrent des fluctuations aléatoires des concentrations en sucres solubles entre les différentes doses d'EDTA, et une différence entre les concentrations au niveau de la partie aérienne et celle au niveau de la partie racinaire. (Figure 40)

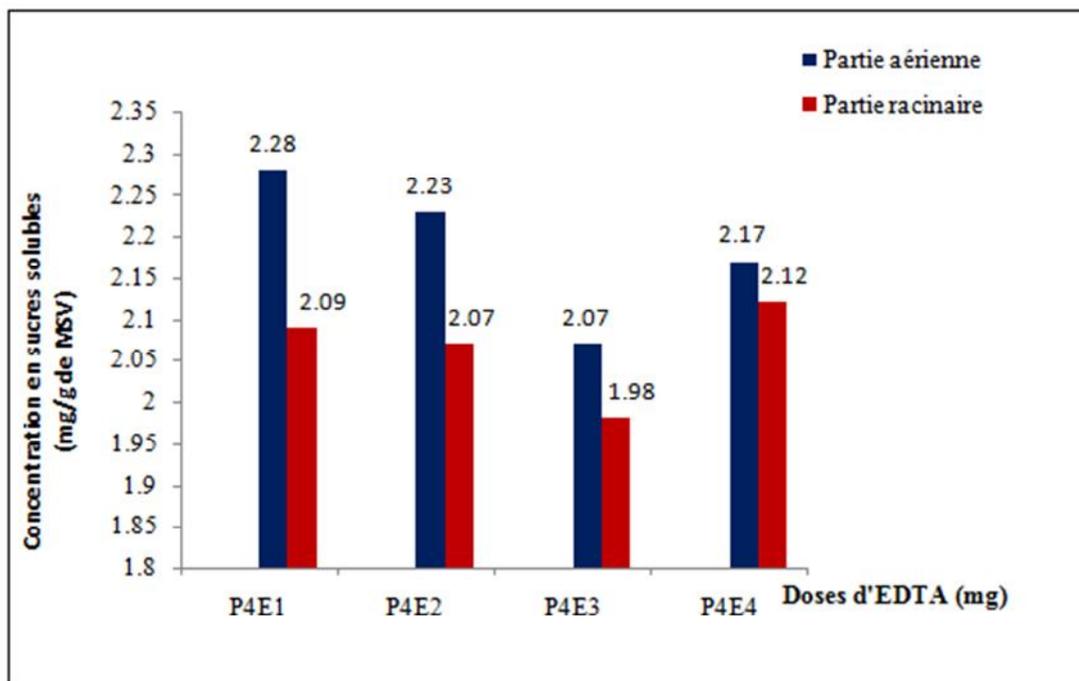


Figure 40 : Distribution des concentrations en sucres solubles en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(4)

V.2.1.3. Analyse de variance pour la variable « sucres soluble » de la partie aérienne à deux facteurs « Plomb » et « EDTA »

Cette analyse met en évidence une différence très hautement significative de la concentration des sucres solubles de la partie aérienne de la plante entre les différentes doses de plomb utilisées P(1), P(2), P(3), P(4) avec $P=0$ au seuil de risque $\alpha = 0.05$, et elle nous démontre qu'il n'existe pas de différence significative des concentrations en sucres solubles entre les doses d'EDTA : E(1), E(2), E(3), et E(4) avec $P=0.98$ au seuil de risque d'erreur $\alpha=0.05$. Ainsi qu'il n'existe pas de différence significative pour le facteur « blocs » ce qui démontre bien l'homogénéité des répétitions. (Tableau 6)

Tableau 6 : Résultats de l'analyse de variance des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne pour les deux facteurs « plomb » et « EDTA »

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VAR.TOTALE	241.722	63	3.837		
VAR.FACTEUR 1	11.28	3	3.76	0	0
VAR.FACTEUR 2	11.335	3	3.778	0.985	0.40983
VAR.INTER F1*2	34.896	9	3.877	1.011	0.44632
VAR.BLOCS	11.55	3	3.85	1.003	0.4013
VAR.RESIDUEL LE	172.659	45	3.837		

V.2.1.3.1. Test de NEWMAN et KEULS de la variable « sucres soluble » de la partie aérienne pour les différentes doses de Plomb

L'analyse de la plus petite différence significative par le test de NEWMAN et KEULS montre quatre groupes homogènes conformément aux quatre doses de plomb. (Tableau7)

le Groupe A étant celui qui enregistre la plus grande concentration en sucres solubles, qui est associé à la plus importante dose de Plomb P(4), le Groupe B est associé à la dose P(3), le Groupe C est associé à la dose P(2), et le Groupe D étant le groupe qui enregistre la plus inférieure moyenne des concentrations en sucres solubles est associé à la plus inférieure dose de plomb P(1).

Tableau 7 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS de la variable « sucres solubles » de la partie aérienne pour les différentes doses de Plomb

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES			
P4	2.19	A			
P3	1.873		B		
P2	1.674			C	
P1	1.277				D

V.2.1.3.2. Etude de la relation entre les concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et le facteur «plomb »

Les résultats de l'analyse de variance nous montrent que les concentrations en sucres solubles de la partie aérienne sont proportionnelles aux doses de Plomb utilisées. En d'autres termes, les concentrations en sucres solubles augmentent au fur et à mesure que la dose de plomb utilisée est plus importante.

Cette relation est parfaitement illustrée par une corrélation entre les concentrations en sucres solubles et les doses de plomb. (Figure 41)

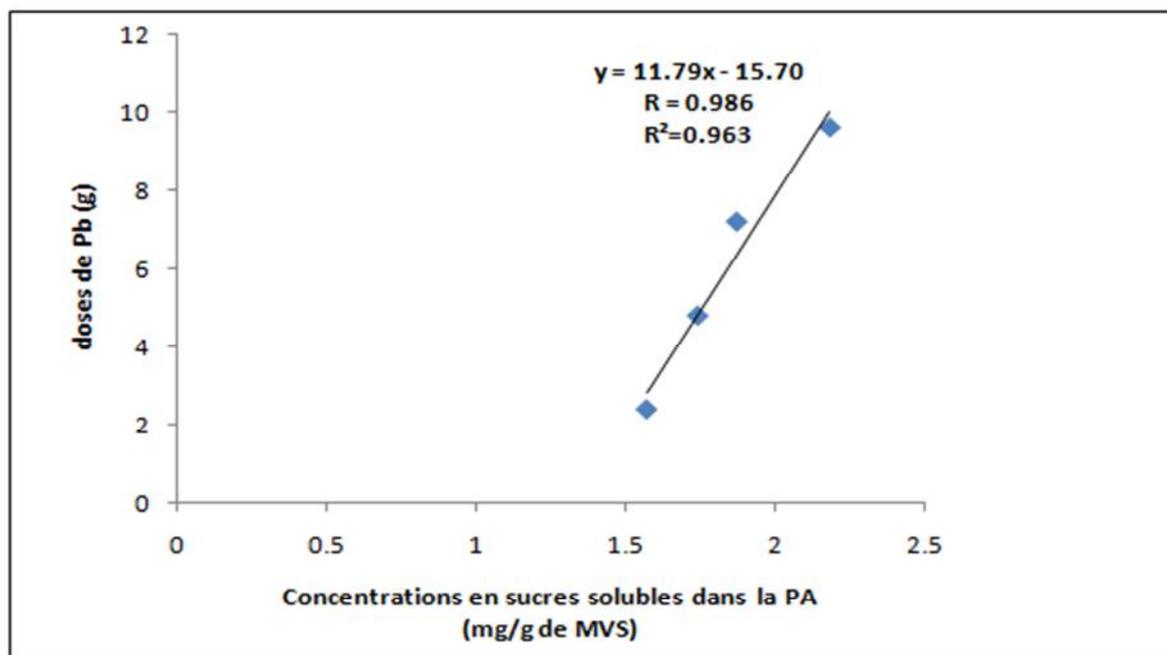


Figure 41 : Corrélation entre les concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et les doses de plomb

Nous observons une parfaite corrélation entre les concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et les doses de plomb qui suivent une régression linéaire avec un coefficient de corrélation de 0.986.

V.2.1.4. Analyse de variance pour la variable « sucres soluble » de la partie racinaire à deux facteurs « Plomb » et « EDTA »

Cette analyse met en évidence une différence très hautement significative de la concentration des sucres solubles de la partie aérienne de la plante entre les différentes doses de plomb utilisées P(1), P(2), P(3), P(4) avec $P=0$ au seuil de risque $\alpha = 0.05$, et elle nous démontre qu'il n'existe pas de différence significative des concentrations en sucres solubles entre les doses d'EDTA : E(1), E(2), E(3), et E(4) avec $P=0.42$ au seuil de risque d'erreur $\alpha=0.05$. Ainsi qu'il

n'existe pas de différence significative pour le facteur « blocs » $P= 0.26$, ce qui démontre bien l'homogénéité des répétitions. (Tableau 8)

Tableau 8 : Résultats de l'analyse de variance des concentrations en sucres solubles de la partie racinaire pour les deux facteurs « plomb » et « EDTA »

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VAR.TOTALE	8.524	63	0.135		
VAR.FACTEUR 1	8.081	3	2.694	348.386	0
VAR.FACTEUR 2	0.022	3	0.007	0.95	0.42619
VAR.INTER F1*2	0.041	9	0.005	0.589	0.79995
VAR.BLOCS	0.032	3	0.011	1.375	0.26193
VAR.RESIDUE LLE 1	0.348	45	0.008		

V.2.1.4.1. Test de NEWMAN et KEULS de la variable « sucres soluble » de la partie racinaire pour les différentes doses de Plomb

La comparaison des moyennes réalisée par le biais du test de NEWMAN et KEULS nous donne quatre groupes homogènes. (Tableau 9).

le Groupe A étant celui qui enregistre la plus grande concentration en sucres solubles qui est associé à la plus importante dose de Plomb P(4), le Groupe B est associé à la dose P(3), le Groupe C est associé à la dose P(2), et le Groupe D étant le groupe qui enregistre la plus inférieure moyenne des concentrations en sucres solubles est associé à la plus inférieure dose de plomb P(1)

Tableau 9 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS de la variable « sucres solubles » de la partie racinaire pour les différentes doses de Plomb.

LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES			
P4	2.07	A			
P3	1.711		B		
P2	1.574			C	
P1	1.077				D

V.2.1.4.2. Etude de la relation entre les concentrations en sucres solubles de la partie racinaire et le facteur «plomb

Les résultats de l'analyse de variance nous montrent que les concentrations en sucres solubles de la partie racinaire augmentent proportionnellement avec les doses de Plomb utilisées.

Cette relation est parfaitement illustrée par une corrélation entre les concentrations en sucres solubles et les doses de plomb. (Figure 42)

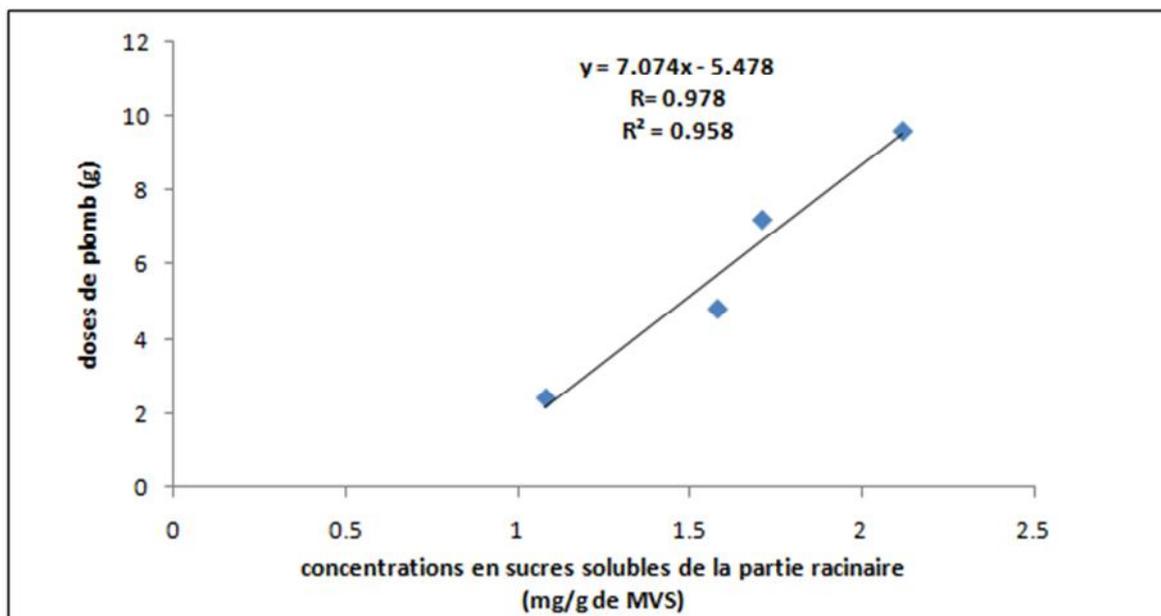


Figure 42 : Corrélation entre les concentrations en sucres solubles de la partie racinaire et les doses de plomb.

Nous observons une parfaite corrélation entre les concentrations en sucres solubles et les doses de plomb, qui suivent une régression linéaire avec un coefficient de corrélation de 0.978. Ce qui confirme que plus la dose de plomb augmente, la concentration en sucres solubles augmente aussi.

V.2.2. Analyse statistique de la variable « Proline »

V.2.2.1. Facteur « Plomb (Pb) »

L'absorption du plomb par le colza est accompagnée d'une augmentation des concentrations en proline dans les parties aériennes et racinaires de la plante et varie en fonction des différentes doses de Plomb.

Pour réaliser ces analyses nous avons varié les quatre doses de plomb pour chacune des doses d'EDTA utilisées

V.2.2.1.1. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E1) d'EDTA

Nous remarquons une différence de la concentration en proline entre les différentes doses de plomb, mais aussi une différence des concentration en proline entre la partie aérienne et la partie racinaire, allant de 0.83 mg/g de MVS pour la dose P(1) de plomb à 1.61 mg/g de MVS pour la dose P(4) dans la partie aérienne, et de 0.56mg/g de MVS pour la dose P(1) à 1.31 mg/g de MVS pour la dose P(4) au niveau de la partie racinaire. (Figure 43)

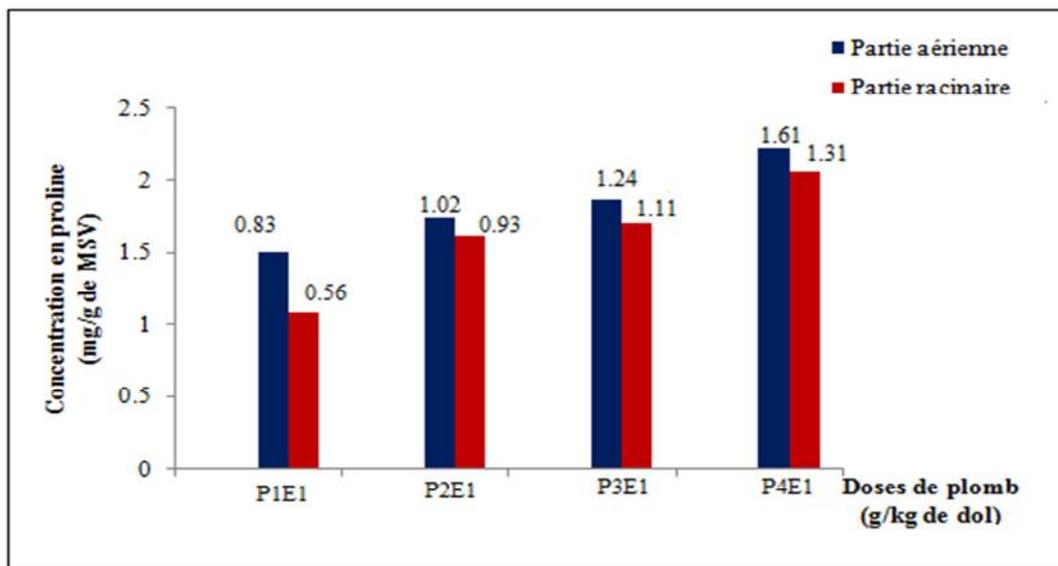


Figure 43 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(1)

V.2.2.1.2. Distribution des concentrations en sucres solubles de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E2) d'EDTA

Les résultats montrent une différence de la concentration en proline entre les différentes doses de plomb, mais aussi une différence des concentration en proline entre la partie aérienne et la partie racinaire, allant de 0.84 mg/g de MVS pour la dose P(1) de plomb à 1.57 mg/g de MVS pour la dose P(4) dans la partie aérienne, et de 0.56mg/g de MVS pour la dose P(1) à 1.41 mg/g de MVS pour la dose P(4) au niveau de la partie racinaire. (Figure 44)

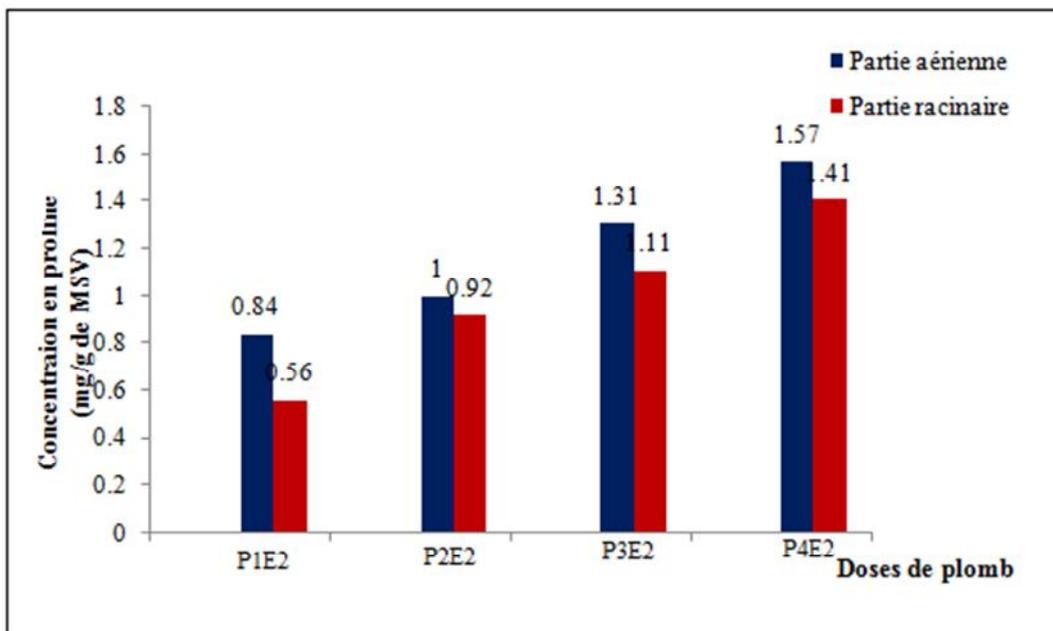


Figure 44 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d’EDTA E(2)

V.2.2.1.3. Distribution des concentrations en Proline de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E3) d’EDTA

Les résultats montrent une différence de la concentration en proline entre les différentes doses de plomb, mais aussi une différence de concentration en proline entre la partie aérienne et la partie racinaire, allant de 0.73 mg/g de MVS pour la dose P(1) de plomb à 1.62 mg/g de MVS pour la dose P(4) dans la partie aérienne, et de 0.53mg/g de MVS pour la dose P(1) à 0.93 mg/g de MVS pour la dose P(4) au niveau de la partie racinaire. (Figure 45)

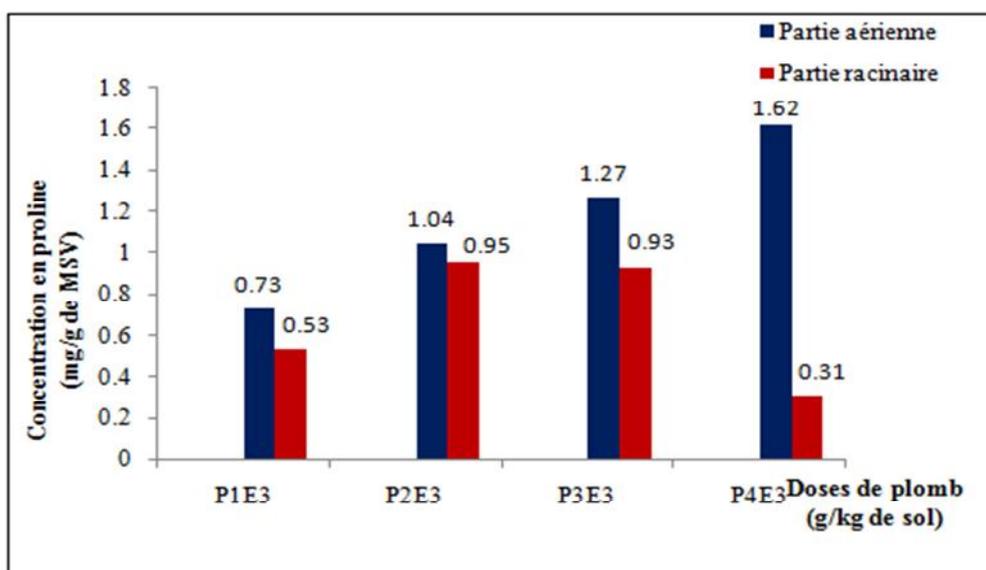


Figure 45 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d’EDTA E(3)

V.2.2.1.4. Distribution des concentrations en Proline de la partie aérienne et racinaire en fonction des doses de Plomb pour la dose (E4) d'EDTA

Nous remarquons une nette différence de la concentration en proline entre les différentes doses de plomb, mais aussi une différence des concentrations en proline entre la partie aérienne et la partie racinaire, allant de 0.85 mg/g de MVS pour la dose P(1) de plomb à 1.47 mg/g de MVS pour la dose P(4) dans la partie aérienne, et de 0.57 mg/g de MVS pour la dose P(1) à 1.33 mg/g de MVS pour la dose P(4) au niveau de la partie racinaire. (Figure 46)

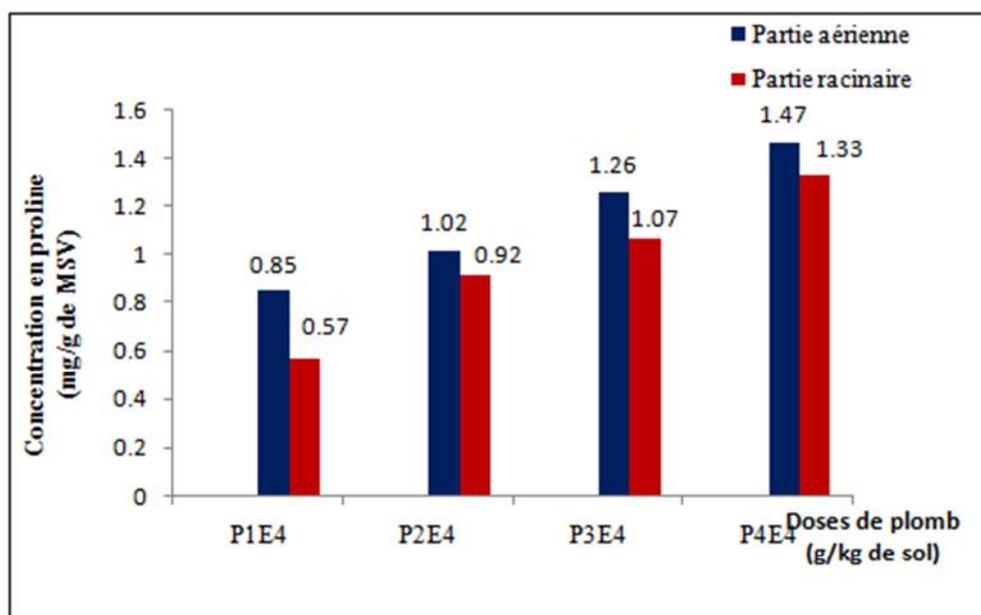


Figure 46 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4) pour la même dose d'EDTA E(4)

V.2.2.2. Facteur « EDTA »

V.2.2.2.1. Distribution des concentrations en Proline de la partie racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P1) de Plomb

Les résultats ne démontrent que des légères fluctuations non significatives des concentrations en proline entre les doses E(1), E(2), E(3) et E(4) d'EDTA, cependant ils mettent en évidence une différence entre les concentrations au niveau de la partie aérienne et celles au niveau de la partie racinaire. (Figure 47)

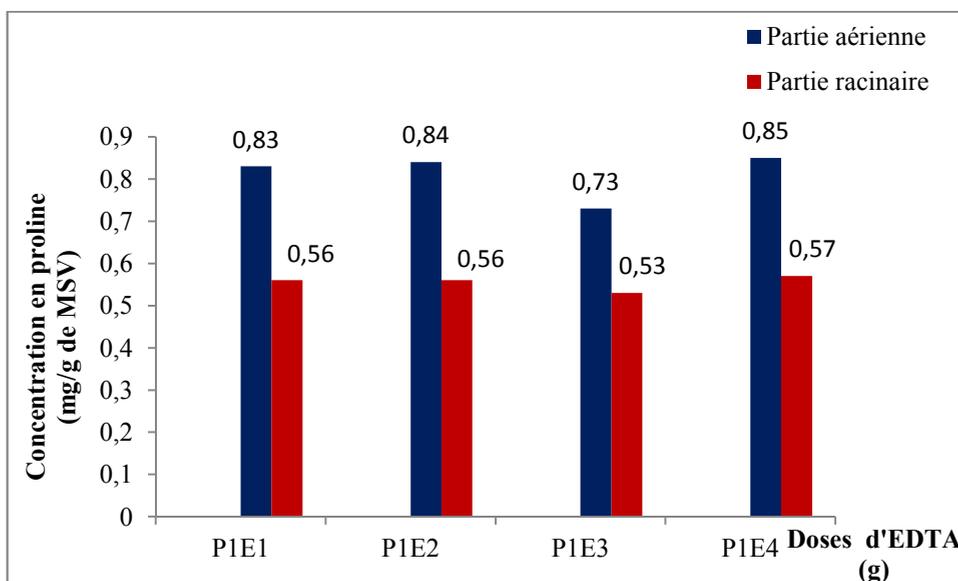


Figure 47 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses d’EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(1)

V.2.2.2.2. Distribution des concentrations en Proline de la partie racinaire en fonction des doses d’EDTA pour la dose (P2) de Plomb

Les résultats ne démontrent que des légères fluctuations non significatives des concentrations en proline entre les doses E(1), E(2), E(3) et E(4) d’EDTA, cependant ils mettent en évidence une différence entre les concentrations au niveau de la partie aérienne et celles au niveau de la partie racinaire. (Figure 48)

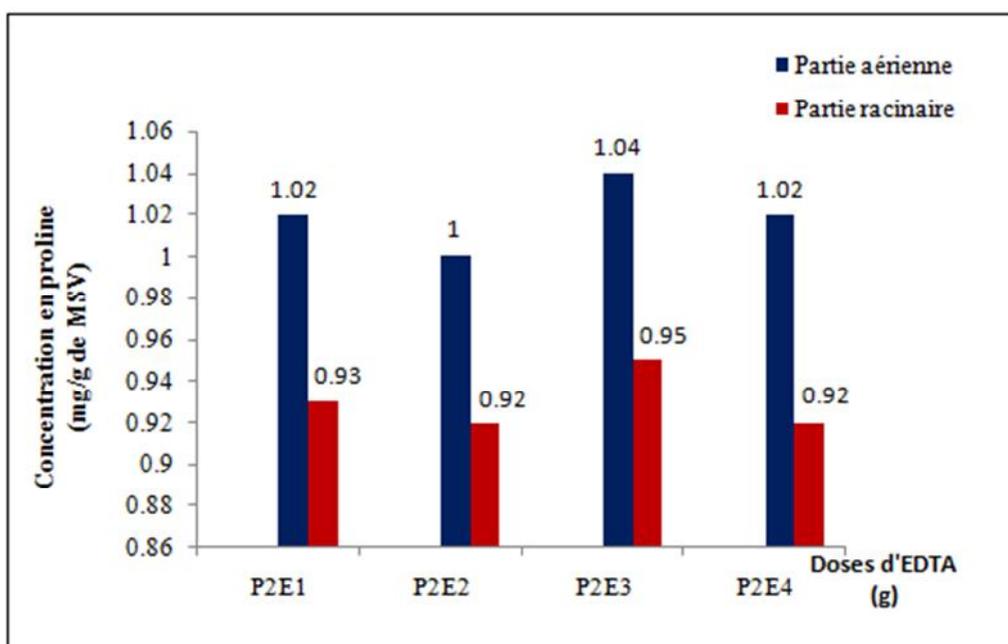


Figure 48 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses d’EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(2)

V.2.2.2.3. Distribution des concentrations en Proline de la partie racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P3) de Plomb

Les résultats ne démontrent que des légères fluctuations non significatives des concentrations en proline entre les doses E(1), E(2), E(3) et E(4) d'EDTA, cependant ils mettent en évidence une différence entre les concentrations au niveau de la partie aérienne et celles au niveau de la partie racinaire. (Figure 49)

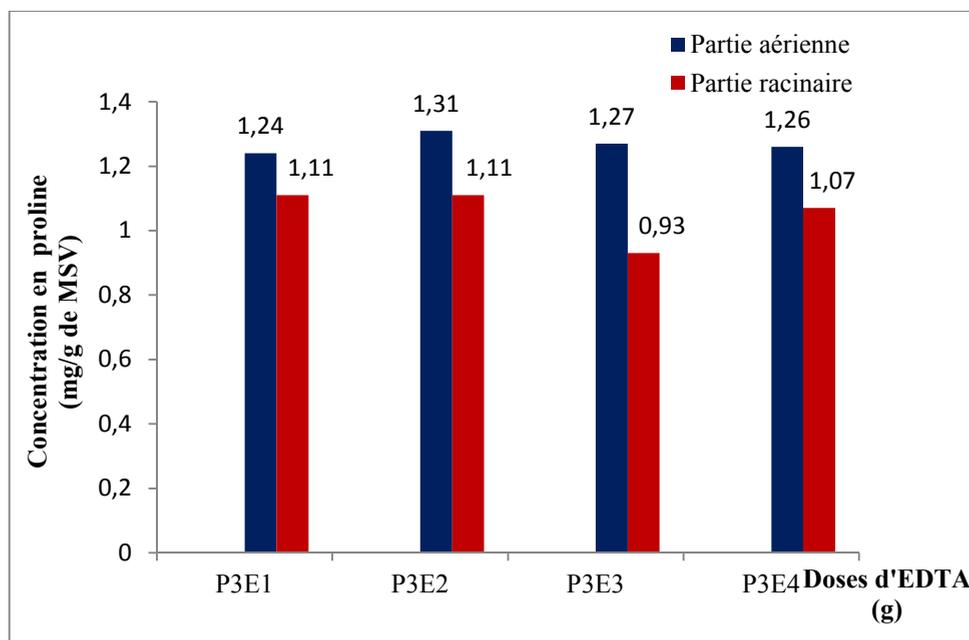


Figure 49 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(3)

V.2.2.2.4. Distribution des concentrations en Proline de la partie racinaire en fonction des doses d'EDTA pour la dose (P4) de Plomb

Les résultats ne démontrent que des légères fluctuations non significatives des concentrations en proline entre les doses E(1), E(2), E(3) et E(4) d'EDTA, cependant ils mettent en évidence une différence entre les concentrations au niveau de la partie aérienne et celles au niveau de la partie racinaire. (Figure 50)

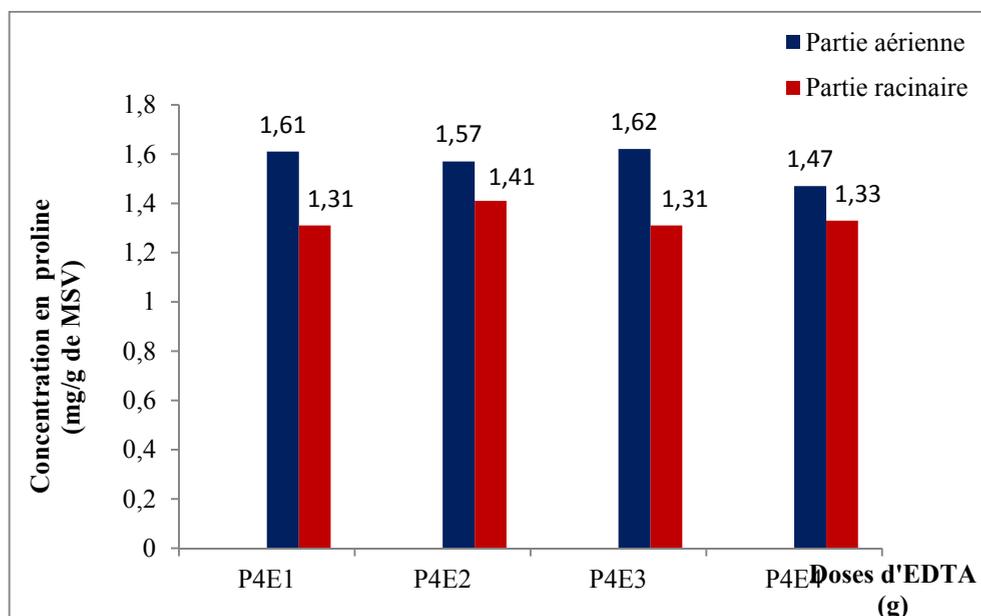


Figure 50 : Distribution des concentrations en proline en fonction des doses d'EDTA (E1, E2, E3, E4) pour la même dose de Plomb P(4)

V.2.2.3. Analyse de variance pour la variable « proline » de la partie aérienne à deux facteurs « Plomb » et « EDTA »

Cette analyse met en évidence une différence très hautement significative de la concentration des proline de la partie aérienne de la plante entre les différentes doses de plomb utilisées P(1), P'2), P(3), P(4) avec $P=0$ au seuil de risque $\alpha = 0.05$.

Elle nous démontre aussi qu'il n'existe pas de différence significative des concentrations en proline entre les doses d'EDTA : E(1), E(2), E(3), et E(4) avec $P=0.90$ au seuil de risque d'erreur $\alpha=0.05$. Ainsi qu'il n'existe pas de différence significative pour le facteur « blocs » $P=0.65$ ce qui démontre bien l'homogénéité des répétitions (Tableau 10)

Tableau 10 : Résultats de l'analyse de variance des concentrations en proline de la partie aérienne pour les deux facteurs « Plomb » et « EDTA »

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VAR.TOTALE	5.935	63	0.094		
VAR.FACTEUR 1	5.056	3	1.685	101.079	0
VAR.FACTEUR 2	0.01	3	0.003	0.191	0.9019
VAR.INTER F1*2	0.091	9	0.01	0.605	0.78666
VAR.BLOCS	0.027	3	0.009	0.548	0.65573
VAR.RESIDUEL LE 1	0.75	45	0.017		

V.2.2.3.1. Teste de NEWMAN et KEULS de la variable proline de la partie aérienne pour les différentes doses de Plomb

La comparaison des moyennes réalisée par le biais du test de NEWMAN et KEULS nous donne quatre groupes homogènes (Tableau 11).

le Groupe A étant celui qui enregistre la plus grande concentration en proline qui est associé à la plus importante dose de Plomb P(4), le Groupe B est associé à la dose P(3), le Groupe C est associé à la dose P(2), et le Groupe D étant le groupe qui enregistre la plus inférieure moyenne des concentrations en proline est associé à la plus inférieure dose de plomb P(1)

Tableau 11 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS de la variable proline de la partie aérienne pour les différentes doses de Plomb

F1	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES			
4.0	p4	1.569	A			
3.0	p3	1.273		B		
2.0	p2	1.024			C	
1.0	p1	0.816				D

V.2.2.3.2. Etude de la relation entre les concentrations en proline de la partie aérienne et les différentes doses de Plomb

La corrélation entre les concentrations en proline de la partie aérienne et les différentes doses de Plomb révèle une relation de type linéaire avec un coefficient de corrélation de 0.997.

L'accroissement en proline dans la partie aérienne est fortement lié aux doses de Plomb, autrement dit, plus la dose de plomb est importante et plus la concentration en proline l'est aussi. (Figure 51)

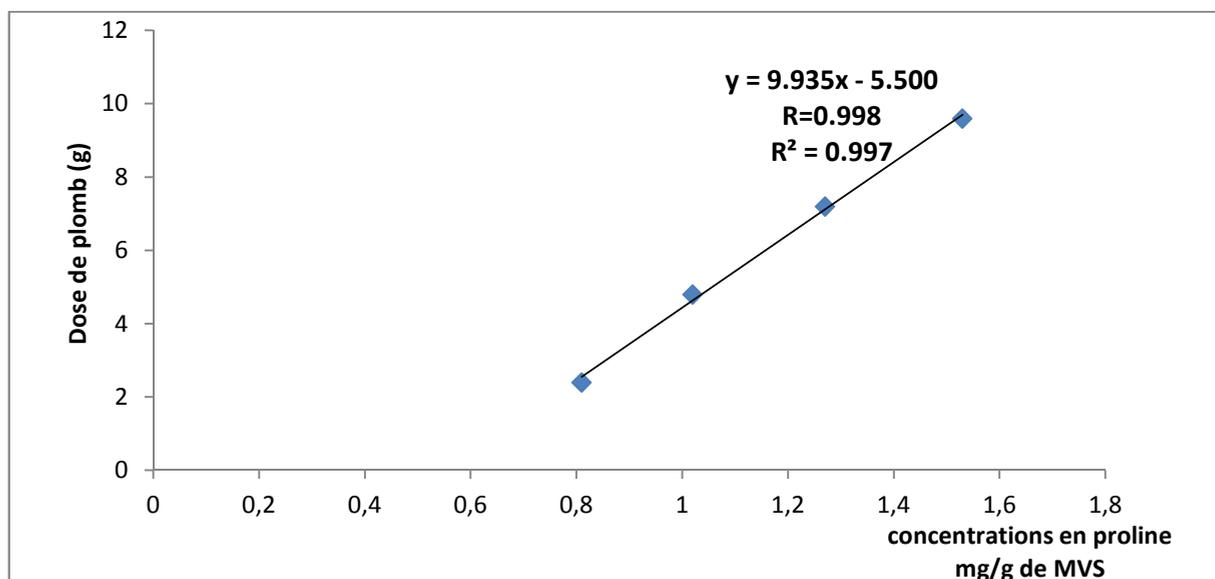


Figure 51 : Corrélation entre les concentrations en proline de la partie aérienne et les doses de Plomb.

V.2.2.4. Analyse de variance pour la variable « proline » de la partie racinaire à deux facteurs « Plomb » et « EDTA »

Cette analyse met en évidence une différence hautement significative de la concentration en proline de la partie racinaire de la plante entre les différentes doses de plomb utilisées P(1), P'2), P(3), P(4) avec $P=0.00$ au seuil de risque $\alpha = 0.05$.

Elle nous démontre aussi qu'il n'existe pas de différence significative des concentrations en proline entre les doses d'EDTA : E(1), E(2), E(3), et E(4) avec $P=0.092$ au seuil de risque d'erreur $\alpha=0.05$. Ainsi qu'il n'existe pas de différence significative pour le facteur « blocs » $P=0.15$ ce qui démontre bien l'homogénéité des répétitions. (Tableau 12)

Tableau 12 : Résultats de l'analyse de variance des concentrations en proline de la partie racinaire pour les deux facteurs « Plomb » et « EDTA »

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA
VAR.TOTALE	5.511	63	0.087		
VAR.FACTEUR 1	5.098	3	1.699	292.073	0
VAR.FACTEUR 2	0.04	3	0.013	2.267	0.09233
VAR.INTER F1*2	0.08	9	0.009	1.528	0.167
VAR.BLOCS	0.032	3	0.011	1.81	0.1574
VAR.RESIDUE LLE 1	0.262	45	0.006		

V.2.2.4.1. Teste de NEWMAN et KEULS de la variable proline de la partie racinaire pour les différentes doses de Plomb

La comparaison des moyennes réalisée par le biais du test de NEWMAN et KEULS nous donne quatre groupes homogènes (Tableau 13)

le Groupe A étant celui qui enregistre la plus grande concentration en proline qui est associé à la plus importante dose de Plomb P(4), le Groupe B est associé à la dose P(3), le Groupe C est associé à la dose P(2), et le Groupe D étant le groupe qui enregistre la plus inférieure moyenne des concentrations en proline est associé à la plus inférieure dose de plomb P(1)

Tableau 13 : Résultats du test de NEWMAN et KEULS de la variable « proline » de la partie racinaire pour les différentes doses de Plomb

F1	LIBELLES	MOYENNES	GROUPES HOMOGENES			
4.0	p4	1.344	A			
3.0	p3	1.059		B		
2.0	p2	0.933			C	
1.0	p1	0.559				D

V.2.2.4.2. Etude de la relation entre les concentrations en proline de la partie racinaire et les différentes doses de Plomb

La corrélation entre les concentrations en proline de la partie racinaire et les différentes doses de Plomb révèle une relation de type linéaire avec un coefficient de corrélation de 0.912

L'accroissement en proline dans la partie aérienne est fortement lié aux doses de Plomb, ainsi dire que plus la dose de plomb est importante et plus la concentration en proline l'est aussi. (Figure 52)

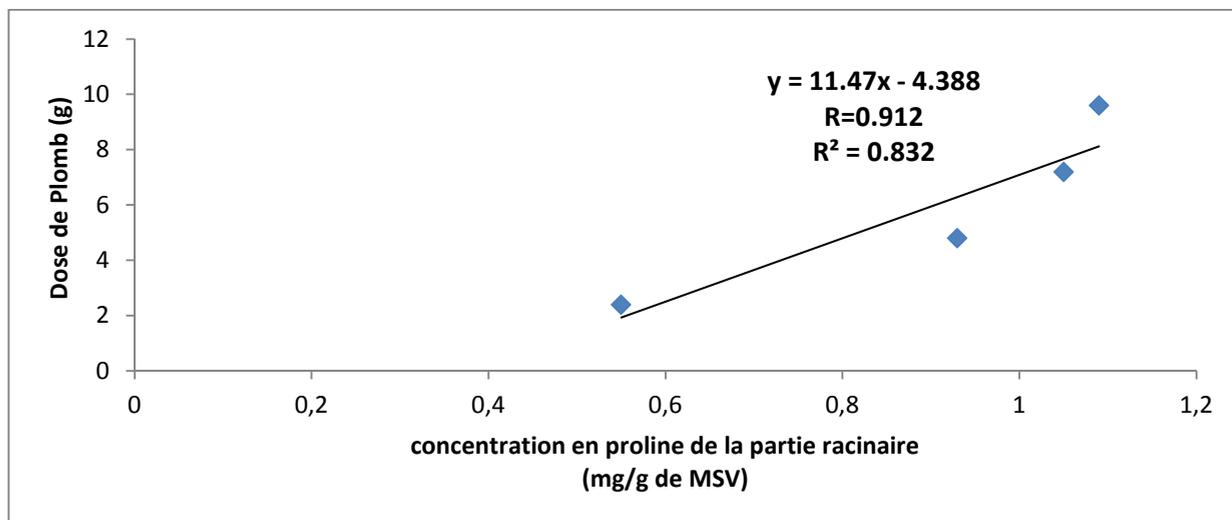


Figure 52 : Corrélation entre les concentrations en proline de la partie racinaire et les doses de Plomb

V.2.3.. Etude du transfert du stress métallique (partie Aérienne/partie Racinaire)

La figure 53 nous renseigne sur la dynamique du stress métallique au niveau de la partie aérienne et racinaire de la plante à travers les résultats obtenus sur le rapport des concentrations en sucres soluble (Aérienne / Racinaire) en fonction des doses de Plomb (P1, P2, P3, P4).

Les résultats montrent que la plante accumule les sucres solubles au niveau de la partie aérienne à la dose de Plomb P1 = 2.4 g/kg de sol, cependant ils mettent en évidence une diminution brusque du rapport de transfert à partir de la dose P2 = 4.8 g/kg de sol, qui s’en suit par une légère augmentation à la dose P3 = 7.2 g/ kg de sol mais qui diminue jusqu’à la dose de plomb P4 = 9.2 g / kg de sol

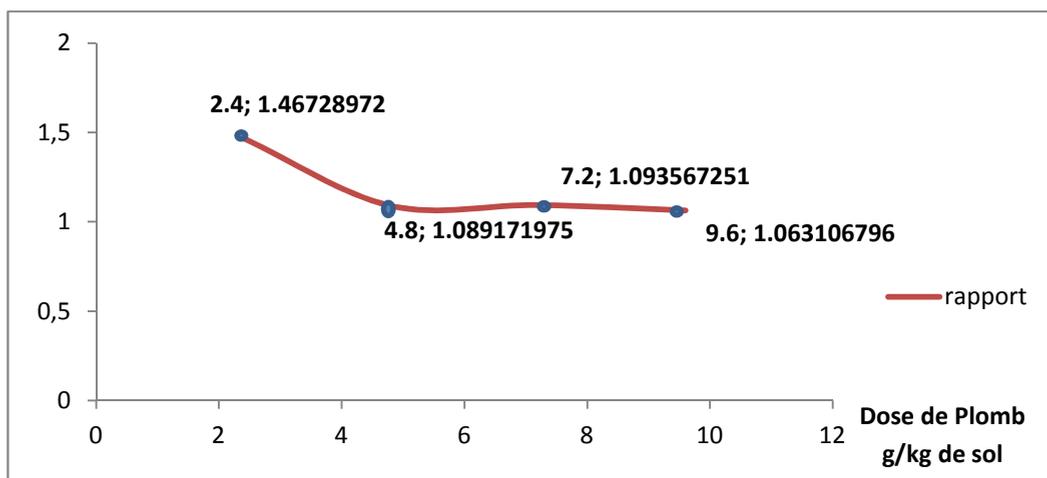


Figure 53 : Rapport de transfert des sucres solubles (Aérienne/Racinaire) en fonction des doses de Plomb.

On a observé la même stratégie de transfert pour la proline, qui s'accumule à la dose P1 au niveau de la partie aérienne mais qui est transférée au niveau de la partie racinaire à partir de la dose P2. (Figure 54).

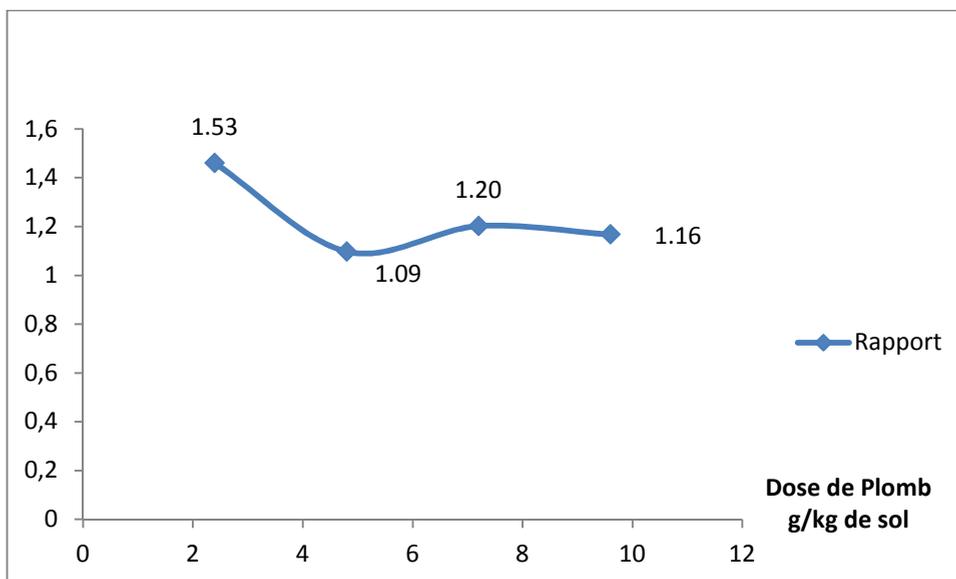


Figure 54 : Rapport de transfert de la proline (Aérienne / Racinaire) en fonction des doses de plomb

Cette stratégie de transfert des sucres solubles et de la proline entre la partie aérienne et la partie racinaire du colza met en évidence la dynamique de transfert du stress métallique que subit la plante, en effet, on note que le stress se localise au niveau de la partie aérienne en présence de petites doses de Plomb, mais celui-ci est transféré au niveau de la partie racinaire dès que les concentrations en plomb augmentent dans le sol.

Discussion des résultats :

Les résultats obtenus montrent que la présence du plomb dans le sol affecte directement le colza en se traduisant par une augmentation de la synthèse des sucres solubles et de la proline.

Les analyses effectuées pour ces deux métabolites dans le but de mettre en évidence l'impact du plomb sur le colza, montrent que celle-ci accumule ces deux composés biochimiques avec des concentrations qui évoluent simultanément en fonction de la disponibilité du plomb dans le sol. Cette relation est consolidée par l'existence d'une corrélation linéaire positive entre les teneurs en plomb et les concentrations des sucres solubles et la proline tant au niveau aérien et au niveau racinaire de la plante.

Ces résultats permettraient de mettre les sucres solubles et la proline comme majeure partie des solutés accumulés par le colza en présence d'un stress métallique, Selon **(Deraissac, 1992)**, le processus de concentrations des sucres solubles et /ou de la proline dans les tissus foliaires des végétaux stressés est reconnu comme une caractéristique d'adaptation. Cela permet de mieux crédibiliser nos résultats.

Les sucres solubles agissent non seulement en tant que métabolites, mais aussi en tant que signaux capables d'activer des voies de signalisation aboutissant à des modifications d'expression génétique **(Ramel ,2009)**. La proline est un acide aminé soluble dans l'eau et l'alcool et facilement oxydable par la ninhydrine, elle s'accumule dans la plante lorsque l'équilibre métabolique de celle-ci perturbé par les conditions défavorables du milieu et peut varier d'une plante à une autre et la teneur de proline augmente en fonction du temps de l'exposition et de la concentration des polluants **(Levitt, 1980)**.

Notre analyse de variance a montré qu'il existe une différence significative des concentrations en sucres solubles et proline en fonction des doses de plomb, ainsi dire, le colza accumule ces deux métabolites en concomitance et d'une manière proportionnelle avec les teneurs en plomb présentes dans le sol, cela nous permet de mettre l'accent sur la cohérence de nos résultats avec les études citées.

La proline permettrait d'éliminer ou de réduire la production d'espèces toxiques de l'oxygène telles que l'oxygène singulet (1O_2) et le radical hydroxyle (OH.), assurant ainsi une protection des constituants cellulaires (Sharmila et Pardha Saradhi, 2002). Une des stratégies mise en œuvre par les plantes pour contrecarrer les effets toxiques des métaux lourds, est constituée par une accumulation d'acides aminés et plus particulièrement de la proline. Une augmentation de ce soluté

compatible a été observée sous l'effet du cadmium chez le tournesol, la silène, le haricot et le soja (Kastori et al., 1992 ; Schat et al., 1997 ; Zhang et al., 2000 ; Balestrasse et al., 2005).

L'exposition aux métaux lourds se traduit souvent par une synthèse de métabolites divers qui s'accumulent à des concentrations de l'ordre des millimoles, parmi lesquels figurent certains acides aminés (Costa et Spitz, 1997 ; Sharma et Dietz, 2006 ; Lei et al., 2007), particulièrement la proline, des glucides (Samarakoon et Rauser, 1979 ; Jha et Dubey, 2004) et des polyamines (Taulavuori et al., 2005 ; Sharma et Dietz, 2006 ; Groppa et al., 2007a, b ; Groppa et Benavides, 2008).

Les résultats de l'analyse du rapport des sucres soluble et de la proline de la partie aérienne et racinaire en fonction des concentrations en plomb dans le sol, nous ont révélé que le colza subit un stress plus important au niveau des racines qu'au niveau de la partie aérienne en présence du plomb.

Conclusion générale

Les résultats de notre expérimentation ont permis de confirmer l'effet stressant du plomb sur le colza, tout en mettant en relief la stratégie d'adaptation de cette plante face à différentes concentrations de plomb dans le sol.

La réponse biochimique, évaluée à travers le processus d'accumulation de proline et des sucres solubles du Colza (*Brassica napus*), a mis en évidence le caractère adaptatif de cette espèce qui exprime sa capacité à synthétiser et accumuler de la proline et des sucres solubles. L'accumulation de ces composés organiques au niveau des organes est un phénomène lié au stress métallique.

A travers cette réponse biochimique, nous avons mis en évidence la dynamique du stress métallique dans le colza, et avons démontré que ce stress se ressent davantage dans la partie racinaire.

Ce travail vient consolider les résultats obtenus par HAMROUN et HAMITOUCHE, 2011 ; OUADJER, 2010, faisant office de suite logique.

A

ADEME (2006). "Bilan du recyclage 1996-2005 Partie 1 Synthèse générale et analyse par filière Rapport final."

ADEME. (2011). Sites pollués et sols, phytoextraction

<http://www2.ademe.fr/servlet/KBaseShow?sort=-1&cid=96&m=3&catid=16481> (page consultée le 29 mars 2014).

Alia, Prasad K.V.S.K., Pardha Saradi P., 1995 : Effect of Zinc on free-radicals and proline in Brassica juncea and Cajanus cajan. *Phytochem.* 39 : 45-47.

Alloway b. J. (1995). *Heavy metals in soils*, London, Blackie academic & professional. *In* : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity

B

Baize D (1997). "Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). " INRA Editions, Paris, 408 pp.

Baker, A.J.M., and Brooks, R.R. (1989). Terrestrial higher plants which hyper accumulate metallic elements – Review of their distribution, ecology, and photochemistry. *Biorecovery* 1, 81-126.

Balestrasse K.B., Gallego S.M., Benavides M.P. et Tomaro M.L., 2005 : Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant and Soil* 270 : 343-353.

Balestrasse K.B., Gallego S.M., Benavides M.P. et Tomaro M.L., 2005 : Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant and Soil* 270 : 343-353.

Berlett B.S. et Stadtman E.R., 1997: Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *Am. Soc. Biochem. Biol. Mol.* 272: 20313-20316.

Berta, M., Giovannelli, A., Potenza, E., Traversi, M. L., and Racchi, M. L. (2009) Type 3 metallothioneins respond to water deficit in leaf and in the cambial zone of white poplar (*Populus alba*). *Journal of Plant Physiology* 166, 521-530.

Bhargava, P., Srivastava, A. K., Urmil, S., and Rai, L. C. (2005) Phytochelatin plays a role in UVB tolerance in N₂-fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum*. *Journal of Plant Physiology* 162, 1220-1225.

Bourelle P and J Berthelin (1998). "Contamination des sols par les éléments traces : les risques et leur gestion." Rapport de l'Académie des sciences Ed. Lavoisier, Paris. 42 pp

BRGM (2004). "Guide méthodologique du plomb appliqué à la gestion des sites et des sols pollués. Rapport final, BRGM/RP-52881-FR."

Brooks, R.R., Lee, J. Reeves, R.D. and Jaffré, T. (1997). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. *Journal of Geochemical Exploration* 7, 49-57.

C

- Cecchi M (2008).** "Devenir du plomb dans le système Sol-Plante: Cas d'un sol contaminé par une usine de recyclage du plomb et de deux plantes potagères (Fève et Tomate)." Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Chen Y.X., He Y.F., Luo Y.M., Yu Y.L., Lin Q. et Wong M.H., 2003 :** Physiological mechanism of plant roots exposed to cadmium. *Chemosphere* 50 : 789-793.
- CITEPA (2007).** "Inventaire des émissions de polluants en France au titre de la convention sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance et de la directive européenne relative aux plafonds d'émissions nationaux (NEC).
- Clemens, S. (2006)** Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707-1719.
- Cobbett, C. and Goldsbrough, P. B. (2002)** Phytochelatins and metallothioneins : roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53, 159-182.
- Costa G. et Spitz E., 1997 :** Influence of cadmium on soluble carbohydrate, free amino acids, protein content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*. *Plant Sci.* 128 : 131-140.
- Costa G. et Spitz E., 1997 :** Influence of cadmium on soluble carbohydrate, free amino acids, protein content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*. *Plant Sci.* 128 : 131-140.
- Costa G. et Spitz E., 1997 :** Influence of cadmium on soluble carbohydrate, free amino acids, protein content of *in vitro* cultured *Lupinus albus*. *Plant Sci.* 128 : 131-140.

D

- DABOUINEAU, L. LAMY, Y. COLLAS, P. (2005).** Les dossiers de ViivArrmorr, Ces plantes qui dépolluent Phytoremédiation et phytorestauration ou L'utilisation des plantes pour la dépollution et l'épuration des eaux usées 8, 3-4
- Dabouineau, L. Lamy, y, et Collas, P. (2005).** Phytoremédiation et phytorestauration ou l'utilisation des plantes. Pour La Dépollution Et l'épuration Des Eaux usées *Le Rôle d'eau*, vol. 124, P-8-15.
- Darrah PR., 1993.** The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil* 155: 1-20
- Demiral T. et Türkan I., 2005 :** Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. *Environ. Exp. Bot.* 53 : 247-257.
- Deraissac M. (1992).** Mécanismes d'adaptation à la sécheresse et maintien de la productivité des plantes cultivées. *Agr. Tropi.* 46.
- Didierjean, L., Frendo, P., Nasser, W., Genot, G., Mariver, J., and Burkard, G. (1996)** Heavy metal- responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress. *Planta* 199, 1-8.
- Dubey R.S. et Singh A.K., 1999 :** Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolizing enzymes in rice plants. *Biol. Plant.* 42 : 233-239.

Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S., Benedetti, M.F., 2006. A study of the trace metal ion influence on the turn-over of soil organic matter in various cultivated contaminated soils. *Environmental Pollution*, 142: 521-529.

E

EPA. *Technology Innovation and Field Services Division* <http://---cluOin.org/techfocus/> (Page consultée le 29 mars 2014).

F

Frausto da Silva, J. J. R. and Williams, R.J.P. (2001) *The biological chemistry of the elements*. 561p., Clarendon Press , Oxford, UK.

G

Gerritse RG and W van Driel (1984). "The Relationship Between Adsorption of Trace Metals, Organic Matter, and pH in Temperate Soils." *Journal of Environmental Quality* 13(2): 197-204.

Ghosh, M. and S.P, Singh. (2005). A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Applied ecology and environmental research*, vol. 3, n°1, p-1018.

Grill, E., Winnacker, E.-L., and Zenk, M. H. (1985) Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230, 674-676.

Groppa M.D. et Benavides M.P., 2008 : Polyamines and abiotic stress : recent advances.

Groppa M.D., Ianuzzo M.P., Tomaro M.L. et Benavides M.P., 2007a : Polyamine metabolism growth and nutrient compositions in wheat. *J. Plant. Nutr.* 23 : 1337-1350.

H

Hassinen, V., Vallinkoski, V. M., Issakainen, S., Tervahauta, A., Karenlampi, S., and Servomaa, K. (2009) Correlation of foliar MT2b expression with Cd and Zn concentrations in hybrid aspen (*Populus tremula x tremuloides*) grown in contaminated soil. *Environmental Pollution* 157, 922-930.

Hinsinger P (2001). Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. *Trace Elements in the Rhizosphere*. G. G.R., W. W.W. and Lombi. Boca Raton, Florida, USA CRC Press LCC: 25-41.

Hinsinger P., 1998. How do plant roots acquire mineral nutrients? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 24: 225-265.

Hinsinger P., 2001. Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In *Trace Elements in the Rhizosphere* (G.R. Gobran, W.W. Wenzel and Lombi Eds.), CRC Press LCC, Boca Raton, Florida, USA, pp 25-41.

Hsu Y.T. et Kao C.H., 2003 : Changes in protein and amino acid contents in two cultivars of rice seedlings with different apparent tolerance to cadmium. *Plant Growth Regul.* 40 : 147- 155.

in a metal tolerant and a non tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.* 101 : 477-482. in sunflower plants under long-term cadmium or copper stress. *Amino Acids* 32 : 265-275.

I

Interstate Technology & Regulatory Cooperation work Group (ITRC) (2009). *Phytotechnology Technical and Regulatory Guidance and Decision Trees, Revised*. Washington, D.C., ITRC and Phytotechnologies Teams 187 p. PHYTO-3.

J

Jaffre, T., Brooks, R. R., Lee, J., and Reeves, R. D. (1976) *Sebertia acuminata*: A hyperaccumulator of nickel from New Caledonia. *Science* 193, 579-580.

Jarvis, M.D. and Leung, D.W.M. (2002). Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environmental and Experimental Botany* 48, 21-32

Jha A.B. et Dubey R.S., 2004 : Carbohydrate metabolism in growing rice seedlings under arsenic toxicity. *Plant Physiol.* 123 : 1029-1036.

Jorgensen SE. (1993). Removal of heavy metals from compost and soil by ecotechnological methods. *Ecol. Eng.*, Vol 2, PP:89-90.

K

Kabata-Pendias A and H Pendias (1992). "Trace elements in soils and plants." CRC Press, Boca Raton, Florida, 2nd Edition, 209 p.

Kärenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J., Verkleij, J.A.C, Van der Lelie, D., Mergeay, M., and Tervahauta, A.I. (2000). Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environ. Poll.* 107, 225-231.

Kastori R., Petrovic M. et Petrovic N., 1992 : Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc
Kieffer, P., Schroder, P., Dommès, J., Hoffmann, L., Renaut, J., and Hausman, J.-F. (2009b) Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. *Journal of Proteomics* 72, 379-396.

Köhler, A., Blaudez, D., Chalot, M., and Martin, F. (2004) Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytologist* 164, 83-93.

Kraemer SM, S-F Cheah, R Zapf, J Xu, KN Raymond and G Sposito (1999). "Effect of hydroxamate siderophores on Fe release and Pb(II) adsorption by goethite." *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63(19-20): 3003-3008.

L

Laperche v., Dictor M.C, Clozel-Leloup B. et Baranger Ph.(2004) : Guide méthodologique du plomb, appliqué à la gestion des sites et sols pollués. BROGM/RP 52881.FR, 136p.

Lasat MM (2002). "Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms." *Journal of Environmental Quality* 31(1): 109-120.

Lebeau T, A Braud and K Jezequel (2008) "Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review." *Environmental Pollution* In Press, Corrected Proof.

Lei Y.B., Korpelainen H., Li C.Y., 2007 : Physiological and biochemical responses to high Mn concentrations in two contrasting *Populus cathayana* populations. *Chemosphere* 68 : 686- 694.

Leopold, I., Gunther, D., Schmidt, J., and Neumann, D. (1999) Phytochelatins and heavy metal tolerance. *Phytochemistry* 50, 1323-1328.

Levitt J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. Volume II: Water, radiation, salt, and other stresses . Academic Press, New York.

Luo, C.L., Shen, Z.G., Li, X.D., Baker, A.J.M. (2006). Enhanced phytoextraction of Pb and the other metals from artificially contaminated soils through the combined application of EDTA and EDDS. *Chemosphere*, 63, 1773-1784.

M

MacLaughlin M.J., Smolders E., Merckx R., 1998. Soil-root interface: physicochemical processes. In *Soil Chemistry and Ecosystem Health*. Special publication n°52 pp233-277. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.

Matysik J., Alia, Bhalu B. et Mohanty P., 2002 : Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current science* 82 : 525-532.

McBride M, S Sauve and W Hendershot (1997). "Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils." *European Journal of Soil Science* 48(2): 337-346.

McGrath, S. P., Chaudri, A. M., and Giller, K. E. (1995) Long-term effects of metals in sewage sludge on soils, microorganisms and plants. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 14, 94-104.

Miquel G (2001), rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé, 346p.

Moffatt, B., Ewart, V., and Eastman, A. (2006) Cold comfort: plant antifreeze proteins. *Physiologia Plantarum* 126, 5-16.

Moreno, J. L., Hernandez, T., and Garcia, C. (1999) Effects of a cadmium-contaminated sewage sludge compost on dynamics of organic matter and microbial activity in an arid soil. *Biology and Fertility of Soils* 28, 230-237.

Moya J.L., Ros R. et Picazo I., 1993 : Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. *Photosynth. Res.* 36 : 75-80.

N

Nriagu J (1990). "Global Metal Pollution: Poisoning the Biosphere." *Environment ENVTAR* 32(7): 7- 11;28-33.

P

Pais I and J Benton Jones (2000). "The handbook of Trace Elements". Boca Raton, FL, St. Lucie Press 223 p.

Pardha Saradhi P., Alia-Arora S. et Prasad K.V.S.K., 1995 : Proline accumulate in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209 : 1-5.

Peer, w.A., Baxter, I.R., Richards. E.L., Freeman, J.L., and Murphy, A.S. (2006). Phytoremediation and hyperaccumulator plants. *Topics in Current Genetics*, vol. 14, p. 299-340.

Pena L.B., Pasquini L.A., Tomaro M.L. et Gallego S.M., 2006 : Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Sci.* 171 : 531-537.

Philippe Cambier. Christian Schwartz. Folkert van Oort. (2009) – Contaminations métalliques des agrosystèmes et écosystèmes péri-industriels, Editions Quae, 240p.

Plants. Prasad M.N.V. et Strzalka K. (Eds), pp. 179-199.

Prasad, M.N.V. (2011). *Bioremediation, its Applications to Contaminated Sites in India.* New Delhi, Ministry of Environment & Forest-Government of India, 63 p.

proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant and Soil*
Pulford ID, AJ Kimber and HJ Duncan (1982). "Influence of pH and manganese oxides on the extraction and adsorption of trace metals in colliery spoil from the Central Scotland Coalfield." *Reclamation and Revegetation Research* 1: 19-31.

R

Ramel F. (2009) . Implication des sucres solubles dans les réponses aux stress xénobiotique et oxydatif chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse de Doctorat de l'Université de Rennes I : 231

Renaut, J., Hausman, J. F., Bassett, C., Artlip, T., Cauchie, H. M., Witters, E., and Wisniewski, M. (2008b) Quantitative proteomic analysis of short photoperiod and lowtemperature responses in bark tissues of peach (*Prunus persica* L. Batsch). *Tree Genetics & Genomes* 4, 589-600.

Ross SM (1994). "Retention, transformation and mobility of toxic metals in soils. " In: Toxic metals in soil-plant systems. S. M. R. editor: 63-152.

S

Sachs, J. (1865) Handbuch der Experimental-Physiologie der Pflanzen, In: Hofmeister W, ed. Handbuch der Physiologischen Botanik, pp153-154. Leipzig, Germany.

Salt, D.E. Smith, R.D. and Raskin, I. (1998). Phytoremediation *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, vol. 49, p. 643-668.

Samarakoon A.B. et Rauser W.E., 1979 : Carbohydrate levels and phosphoassimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc. *Plant Physiol.* 63: 1165-1169.

- Satarug, S., Baker, J. R., Urbenjapol, S., Haswell-Elkins, M., Reilly, P. E. B., Williams, D. J., and Moore, M. R.** (2003) A global perspective on cadmium pollution and toxicity in nonoccupationally exposed population. *Toxicology Letters* 137, 65-83.
- Schat H., Sharma S.S. et Vooijs R.**, 1997 : Heavy metal induced accumulation of free proline in a metal tolerant and a non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.* 101 : 477- 482.
- Schat H., Sharma S.S. et Vooijs R.**, 1997 : Heavy metal induced accumulation of free proline
- Shah K. et Dubey R.S.**, 1998a : Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings : role of proline as a possible enzyme protectant. *Biol. Plant.* 40 : 121-130.
- Sharma S.S. et Dietz K.J.**, 2006 : The significance of amino acids and amino-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 57 : 711-726.
- Sharma S.S. et Dietz K.J.**, 2006 : The significance of amino acids and amino-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J. Exp. Bot.* 57 : 711-726.
- Sharmila P. et Pardha Saradhi P.**, 2002 : Proline accumulation in heavy metal stressed plants : An adaptative strategy. *In : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants.* Prasad M.N.V. et Strzalka K. (Eds), pp. 179-199..
- Siedlecka A. et Krupa Z.**, 2002 : Functions of enzymes in heavy metal treated plants. *In : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants.* Prasad M.N.V. et Strzalka K. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 303-324.
- Sposito G, LJ Lund and AC Chang (1982).** "Trace Metal Chemistry in Arid-zone Field Soils Amended with Sewage Sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in Solid Phases." *Soil Science Society American Journal* 46(2): 260-264.

T

- Taulavuori K., Prasad M.N.V., Taulavuori E. et Laine K.**, 2005 : Metal stress consequences on frost hardiness of plants at northern high latitudes : A review and hypothesis. *Environ Pollut.* 135 : 209-220.

U

- United Nations Environment Program (UNEP).** (2002). Phytoremediation : An Environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation *In* UNEP *UNEP* <http://---.unep.or.jp/ietc/Publications/Fresh-ater/FMS2/1.asp> (Page consultée le 29 mars 2014).

W

- Wisniewski, M., Bassett, C., Norelli, J., Macarisin, D., Artlip, T., Gasic, K., and Korban, S.** (2008) Response of apple (*Malus x domestica*) to low temperature and water deficit: an expressed-sequence tag (EST) analysis. *International Symposium on Plant Cold Hardiness* .
- Wu Z, Z Gu, X Wang, L Evans and H Guo (2003).** "Effects of organic acids on adsorption of lead onto montmorillonite, goethite and humic acid." *Environmental Pollution* 121(3): 469-475.

Z

Zhang G., Fukami M. et Sekimoto H., 2000 : Genotypic differences in effects of cadmium on growth and nutrient compositions in wheat. *J. Plant. Nutr.* 23 : 1337-1350.