

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

ÉCOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE
ÉCOLE DOCTORALE INGÉNIERIE & ENVIRONNEMENT
OPTION : Biotechnologie et Environnement



Mémoire de Magister

Présenté par :

Mme KHERBANI Nawel

THÈME :

**Influence des métaux lourds sur la
croissance des plantes**

Jury :

Président	Mr. E.H. BENYOUSSEF	Professeur	ENP
Examineurs	Mr. M. BELLAL	Professeur	ENSA
	Mr. H. LOUNICI	Professeur	UMMTO
	Mme F. MOUHOUCHE	Professeur	ENSA
Rapporteur	Mme N. ABDI	Professeur	ENP

Février 2011

ملخص

إن تراكم المعادن ، ولا سيما المعادن الثقيلة في النباتات التي تشكل خطورة ومع ذلك ، ففي حالة قلة هذه المعادن في النباتات تصبح ضرورية للحياة ، كما يمكن ان تكون سامة إذا كانت في أعلى تركيزاتها ومن اجل التقليل من المخاطر ، لا بد من دراسة آثار هذه الملوثات على الكائنات الحية. ومن بين تقنيات إعادة تأهيل النباتات توجد تقنية استخراج النباتات التي أظهرت انه إذا قمنا بزراعة العشب الايطالي و الشعير في تربة ملوثة يشكل مصطنع بالزنك و الكاديوم لدراسة مدى تأثير وجود هذه المعادن على نمو الشعير أظهرت النتائج إن العشب الايطالي متعايش مع الزنك ولا يشكل وجوده اي علامات اجهاد بعد 04 اسابيع من زراعته في تربة ملوثة بهذا المعدن الزنك المتراكم توقف على مستوى الجذور ولم ينتقل إلى الأقسام الهوائية وعلى العكس من ذلك بالنسبة للشعير فقد سجل تراكم الكاديوم بنسبة اكبر مقارنة بالزنك

الكلمات الرئيسية.

المعادن ، العشب ، الشعير، نبات

Résumé

L'accumulation des métaux, en particulier des métaux dits lourds dans les plantes pose problème. Cependant, si à l'état de traces ces métaux sont indispensables à la vie, ils peuvent à plus fortes concentrations se révéler toxiques. Ainsi pour limiter les risques, on doit étudier les effets de ces polluants sur les organismes vivants. Parmi les techniques de phytorehabilitation, on retrouve la phytoextraction. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la la phytoextraction par le Ray Grass d'Italie (*Iolium multiflorum lamk*) et l'orge (*hordium vulgare*) d'un sol contaminé artificiellement par du zinc et du cadmium et l'influence de la présence de ces métaux sur la croissance de l'orge. Les résultats ont montré que le ray grass est tolérant au Zinc et ne présente aucun signe de stress après 4 semaines de culture dans des sols contaminés par ce métal. Le Zinc cumulé s'arrête au niveau des racines et il n'est pas transféré vers les parties aériennes. Par contre, l'orge cumule plus le cadmium par rapport au zinc

Mots clés : métaux, plantes, ray grass, orge

Abstract

The metals accumulation, in particular heavy metals in plants raises problem. However, if in the state of tracks, these metals are indispensable to the life, they can in stronger concentrations show toxic. So to limit the risks, we have to study the effects of these pollutants on the alive bodies. Among the techniques of phytorehabilitation, we find the phytoextraction. So, we were interested in the phytoextraction in the Ray Grass of Italy (*Iolium multiflorum lamk*) and the barley (*hordium vulgare*) of a soil contaminated artificially by some zinc and some cadmium and the influence of the presence of these metals on the growth of the barley. The results showed that the Ray Grass is tolerant in the Zinc and presents no sign of stress after 4 weeks of culture in soil contaminated by this metal. The accumulated Zinc arrests at the level of roots and it is not transferred towards the air parts. On the other hand, the barley accumulates more the cadmium

Keywords: metals, plants, ray grass, barley

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de BIOGEP de l'Ecole Nationale Polytechnique d'El Harrach sous la direction de Mr H. LOUNICI que je remercie vivement.

Je remercie Madame N.ABDI mon directeur de mémoire, Maître de Conférences à l'ENP pour m'avoir encadré.

Je tiens à remercier Monsieur E. BENYOUSEF Professeur à l'ENP d'avoir accepté de présider le jury.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Monsieur M. BELLAL, Professeur, à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et Monsieur Mr. H. LOUNICI, Professeur à l'Université Mouloud Mameri de Tizi Ouzou, trouvent ici l'expression de ma grande satisfaction pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de juger ce travail

J'exprime tous mes remerciements à Madame MOUHOUCHE Faiza, Maître de Conférences pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je souhaite adresser mes remerciements à Melle CHIKH Assira et Melle CHEMLAL Radia ainsi qu'à ALI Oumessad pour leurs aides et conseils tout au long de ce travail.

Un grand merci à toutes les personnes qui, de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
--------------------	---

Chapitre 1 : Les Métaux dans les sols

1.1 Origine des métaux dans les sols.....	3
1.1.1 Cadmium et zinc : généralités.....	4
1.1.2. Toxicité du cadmium et du zinc.....	5
1.1.2.1 Toxicité du cadmium	6
1.1.2.2 Toxicité du zinc.....	7
1.2 Phénomène de sorption des éléments métalliques dans les sols.....	7
1.2.1 La physisorption : une adsorption non spécifique.....	8
1.2.2 La chimisorption : une adsorption spécifique.....	8
1.3 Mobilité des éléments métalliques dans le sol	9
1.3.1 Constituants du sol et la mobilité des éléments métalliques.....	9
1.3.1.1 Les minéraux primaires.....	9
1.3.1.2 Les minéraux secondaires.....	10
1.3.1.3 La matière organique.....	12
1.3.2. Facteurs influençant la mobilité des éléments métalliques.....	13
1.3.2.1 Le pH.....	13
1.3.2.2 Le potentiel redox.....	13
1.3.2.3 L'activité biologique.....	14
1.3.2.4 La température.....	15
1.3.3 Transferts des métaux.....	16
1.3.3.1 Processus pédologiques de transferts.....	16
1.3.3.1.1 Transferts vers les milieux aquatiques.....	16
1.3.3.1.2 Transferts vers les plantes.....	17

1.4 Evaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des métaux dans les sols.....	17
1.4.1 Spéciation fonctionnelle : extraction simple.....	18
1.4.2 Spéciation opérationnelle : extractions séquentielles – fractionnement...	18
1.5 Tolérance aux métaux lourds chez les végétaux	20
1.5.1 . Les métaux lourds dans la plante.....	20
1.5.1.1 Absorption racinaire.....	21
1.5.1.2 . Translocation.....	22
1.5.1.3 Accumulation	22
1.5.2. Toxicité et tolérance.....	23
1.5.2.1 La membrane plasmique.....	23
1.5.2.2. Système anti-oxydant.....	25
1.5.2.3 .La chélation et la compartimentation cellulaires.....	27
1.5.2.4 Autres systèmes de défense au stress métallique.....	30
1.6. Les techniques de réhabilitation.....	31
1.7 La phytoréhabilitation.....	32
1.7.1 Définition.....	32
1.7.2 La phytoextraction.....	34
1.7.2.1 Utilisation de plantes hyper accumulatrices seules.....	37

Chapitre 2 : Matériels et protocoles expérimentaux

2. Matériels et protocoles expérimentaux.....	38
2.1 Echantillonnage.....	39
2.2 Analyses physico-chimiques.....	39
2.2.1 pH_{eau} et pH_{KCl}	39
2.2.2 Granulométrie.....	39
2.2.3 Capacité de rétention en eau.....	39
2.2.4 Capacité d'échange cationique (CEC).....	40
2.2.5 Teneur en carbone organique.....	40
2.2.6 Evaluation du calcaire total « CaCO_3 » (NF X 31-105).....	40
2.2.7 Teneur en azote total « NT » (NF X 31-111)	40
2.2.8 Dosage de l'azote minérale (NH_4^+ , NO_3^- et NO_2^-).....	41
2.2.9 Teneur en phosphore soluble « P_2O_5 » (NF X 31-116)	41

2.3 Analyses des métaux.....	41
2.3.1 Appareillages.....	41
2.3.2 Détermination des teneurs totales.....	42
2.4 Fertilisation.....	42
2.5 Contamination artificielle.....	43
2.6 Présentation de la culture.....	44
2.6.1 Lolium multiflorum lamk (le Ray grass d'Italie).....	44
2.6.2 L'Hordeum vulgare (orge)	45
2.7 Protocole de culture.....	46
2.7.1 Le ray gras	46
2.7.2 L'Hordeum vulgare (orge)	46
2.8 Détermination des teneurs en métaux.....	47
2.9 Détermination des paramètres de croissance.....	47
2.10 Détermination du coefficient de bioaccumulation.....	47
2.11 Détermination du facteur de translocation.....	47
2.12 Détermination de l'indice de tolérance.....	48

Chapitre 3 : Résultats et discussions

3.1. Caractérisation du sol.....	50
3.1.1 Propriétés physico-chimiques.....	50
3.1.2. Teneur en métaux dans le sol.....	51

Etude 1 : Effet du Zinc sur le Ray Grass

3.2. Suivi de la teneur du Zinc des racines et des feuilles du Ray gras en fonction du temps.....	51
3.3 Suivi de la teneur en zinc dans les racines et les feuilles de Ray gras en fonction de la teneur en zinc dans le sol.....	52
3.4 Teneur et accumulation du Zinc dans le Ray Gras.....	53

Etude 2 : Effet du Zinc et du Cadmium sur l'Orge

3.5 Effets des métaux sur la croissance de l'orge	54
3.5.1 Effets du zinc sur la croissance de l'orge.....	54

3 .5.2 Effets du cadmium sur la croissance de l'orge.....	57
3.6 Suivi de la teneur en zinc et cadmium dans l'orge.....	59
3.6.1 Teneur et accumulation du Zinc dans l'orge.....	59
3.6.2 Teneur et accumulation du Cadmium dans l'orge.....	61
CONCLUSION.....	63
REFERENCES.....	
ANNEXES.....	

LISTE DES FIGURES

	Page
Fig. 1.1 Processus de transfert des éléments métalliques dans les sols	4
Fig. 1.2 La Phytorhéhabilitation.....	33
Fig. 1.3 Rhéhabilitation par phytostabilisation.....	34
Fig. 1.4 Réhabilitation par réhabilitation par phytoextraction.....	35
Fig. 1.5 Comportement des plantes en fonction de la concentration en métal dans le sol.....	36
Fig.2.1 : Schémas représentatif de la contamination artificielle du sol par différentes concentrations du zinc	43
Fig.2.2 : Schémas représentatif de la contamination artificielle du sol par différentes concentrations de zinc et de cadmium.....	44
Fig. 2.3 Ray gras.....	45
Fig.2.4 Hordeum vulgare.....	45
Fig .3.1: Evolution de la teneur en Zinc dans les racines en fonction du temps.....	51
Fig. 3.2 Evolution de la teneur en Zinc dans les feuilles en fonction du temps.....	52
Fig. 3. 3: Evolution de la teneur en Zinc dans les feuilles du Ray Grass en fonction de la concentration du sol contaminé.....	52
Fig 3 4: Evolution de la longueur des racines en fonction de la concentration du Zinc.....	54
Fig. 3.5 Evolution de la longueur des feuilles en fonction de la concentration du Zinc.....	55
Fig. 3.6 Evolution du Poids sec en fonction de la concentration du Zinc.....	55
Fig. 3.7. : Evolution de la Biomasse totale en fonction de la concentration du Zinc.....	56
Fig. 3 8 Evolution de la longueur des racines en fonction de la concentration du Cadmium.....	57
Fig. 3.9 : Evolution de la longueur des feuilles en fonction de la concentration du Cadmium...	58
Fig. 3.10 : Contamination par le Cadmium en fonction du Poids sec	58
Fig. 3.11. : Evolution de la Biomasse totale en fonction de la concentration du Cadmium.....	59
Fig. 3.12 Evolution de la concentration du Zinc en fonction de la contamination du Zinc.....	60
Fig . 3.13. : Evolution du Zinc cumulé en fonction de la contamination du Zinc.....	60

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1.1 Teneur en éléments métalliques (mg /Kg) dans des sols (horizons divers de sols)	3
Tableau 1.2 Réactifs couramment utilisés au cours d'extractions séquentielles.....	19
Tableau 1.3 Les techniques de dépollution des sols.....	32
Tableau 1.4 Coût des méthodes de dépollution.....	35
Tableau 3.1 Propriétés physico-chimiques de l'échantillon du sol.....	50
Tableau 3.2 Facteur de Bioaccumulation et Facteur de translocation.....	53
Tableau 3.3 Effet de la contamination par <u>le zinc</u> sur la longueur et le poids sec des racines et des feuilles de l'orge.....	54
Tableau 3.4 Effet de la contamination par le cadmium sur la longueur et le poids sec des racines et des feuilles de l'orge	57
Tableau 3.5 Facteur de Bioaccumulation et Facteur de translocation de l'orge (Zinc).....	61
Tableau 3.6 Facteur de Bioaccumulation et Facteur de translocation de l'orge (Cadmium).....	61

INTRODUCTION

Depuis la fin du XIX^{ème} siècle, le secteur industriel s'est développé sans préoccupation des rejets d'éléments toxiques dans les sols. De fait, le sol a été longtemps considéré comme une ressource renouvelable, voire même inépuisable à l'échelle des générations humaines, capable de recevoir sans conséquence les rejets de nos activités. On sait maintenant que les sols sont caractérisés par un équilibre fragile et sont vulnérables. Aujourd'hui, ce patrimoine est menacé à la fois par le lourd héritage du passé et par l'extension des surfaces consacrées au développement industriel (Lecomte, 1998). Le terme de « contamination » qualifie un apport d'éléments, issus de l'extérieur du site ; la conséquence en est une élévation de leur teneur originelle, sans indication sur leurs conséquences sur le comportement des organismes vivants présents sur ou à proximité du site. Le terme de « pollution » par contre, doit être réservé à une contamination qui engendre une perturbation du milieu, ou de l'usage normal qui en est fait habituellement.

Depuis quelques années, les dangers potentiels des pollutions pour l'équilibre écologique et la santé publique sont considérés avec une inquiétude croissante. Parmi les principaux polluants générés par les activités industrielles, les métaux lourds (Cu, Zn, le Pb, le Cr, ...) posent effectivement des problèmes particulièrement préoccupants. Ces éléments, par nature non biodégradables, présentent une forte écotoxicité et pourraient être impliqués dans de nombreuses pathologies (atteintes du système nerveux central, du foie, des reins, mais aussi cancers et malformations embryonnaires, (Abrahams, 2002 ; Adriano, 2001).

Il est donc aujourd'hui indispensable non seulement de mieux connaître les effets de ces polluants sur les organismes vivants, mais aussi de mettre en œuvre des solutions durables, visant à limiter leurs risques. Malgré leur forte toxicité potentielle, la plupart des sites contaminés par des métaux lourds, présentent souvent une flore diversifiée tolérant apparemment bien de fortes teneurs en métaux. La phytoréhabilitation regroupe un ensemble de techniques, basées sur l'utilisation des plantes pour la réhabilitation des sites contaminés. Elle se définit comme étant l'utilisation de plantes pour éliminer ou rendre moins mobiles et moins toxiques les contaminants environnementaux. Ces techniques sont peu agressives pour l'environnement et relativement peu coûteuses. Elles peuvent être appliquées à des polluants organiques ou inorganiques.

Parmi ces techniques, la phytoextraction concerne principalement l'absorption des métaux du sol par les plantes. Les plantes peuvent accumuler les métaux nécessaires à leur bon

développement, mais sont également capables d'accumuler des métaux qui, eux, ne sont pas nécessaires au niveau physiologique. La plante idéale pour la phytoextraction doit être capable d'accumuler et de tolérer de fortes teneurs en métaux dans ses parties récoltables, tout en ayant une croissance rapide et une forte biomasse. Certaines plantes sont naturellement capables d'accumuler de fortes teneurs en métaux : ce sont des plantes dites accumulatrices ou hyper accumulatrices.

Ce travail a pour but d'étudier la phytoextraction par le Ray Grass d'Italie (*Lolium multiflorum* Lamk) et l'orge (*Hordium vulgare*) d'un sol contaminé artificiellement par du zinc et du cadmium et l'influence de la présence de ces métaux sur la croissance de l'orge.

1. LES METAUX DANS LES SOLS

1.1 Origine des métaux dans les sols

Les éléments métalliques dans les sols ont deux origines, une naturelle issue de l'altération de la roche- mère et une liée à l'activité humaine.

Un sol développé sur une roche riche en un élément donné sera obligatoirement riche en cet élément (**Figure 1.1**). Les métaux issus de cet **héritage** constituent le **fond pédogéochimique**, qui correspond aux teneurs en éléments, résultant de phénomènes géologiques, pédogénétiques, en l'absence de toutes contaminations liées à l'activité humaine (Baize, 1997). La gamme des valeurs couramment observées dans les sols non contaminés est présentée dans le **Tableau 1.1**.

Tableau 1.1 : Teneurs en éléments métalliques (mg.kg^{-1}) dans des sols (horizons divers de sols) (Baize, 1997).

	Sols "ordinaires" de toutes granulométries	Anomalies naturelles modérées	Fortes anomalies naturelles
Zn	10 - 100	100 - 250	250 - 3800
Pb	9 - 50	60 - 90	100 - 3000
Co	2 - 23	23 - 90	105 - 148
Cu	2 - 20	20 - 62	-
Cr	10 - 90	90 - 150	150 - 534
Ni	2 - 60	60 - 130	130 - 480

Les modes d'apport des métaux dans les sols liés à l'activité humaine peuvent être regroupés en 3 catégories (**Figure 1.1**) :

- les **pratiques agricoles** : il s'agit d'impuretés présentes dans les engrais, les amendements calcaires, les produits de traitement phytosanitaires (par exemple, sels de cuivre ou arséniate de plomb), ou les boues de station d'épuration ;
- la **diffusion aérienne** : il s'agit de poussières et aérosols provenant notamment des activités industrielles ;
- les apports **massifs localisés** : il s'agit d'apports accidentels ou résultants d'activités de longue durée sans protection contre la dispersion (fuites, lessivage, ...) dans l'environnement.

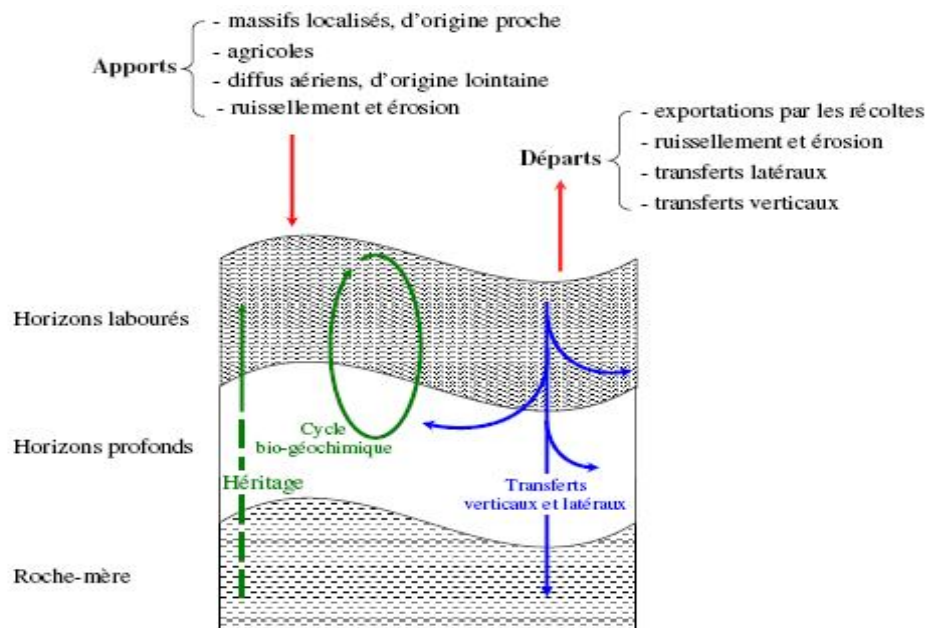


Figure I.1 : Processus de transferts des éléments métalliques dans les sols (d'après Baize, 1997)

1.1.1 Cadmium et zinc : généralités

Les éléments du tableau périodique de Mendeleïve sont classés en 3 groupes : non métaux, métalloïdes et métaux, ce dernier groupe comporte 84 éléments dont Zn et Cd [Mirghaffari, 1998].

Le Cd et le Zn sont des éléments du groupe IIb du tableau périodique [Boisset, 1996]. Leurs propriétés physico-chimiques sont très proches [Boisset and Narbonne, 1996], notamment au niveau de leurs comportements dans les sols et vis à vis des plantes [Keller *et al.*, 2003].

Par ailleurs, l'ion Cd^{2+} est un accepteur intermédiaire au sens de Pearson : il forme des complexes stables avec des atomes donneurs (type tétraédrique sp^3) et a une affinité particulière pour les donneurs plus "mous" (type octaédrique $d^2 sp^3$) comme le soufre, l'ordre d'affinité croit suivant la séquence O, N, S [Boisset and Narbonne, 1996]. Le Cd forme ainsi des liaisons avec les acides nucléiques via la formation de complexes avec $-\text{NH}_2$, $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$ d'une part et avec les résidus phosphates d'autre part. Les métaux à l'état ionique sont des acides de Lewis faibles ou intermédiaires [Boisset and Narbonne, 1996].

La production mondiale de Cd en 1980, consommée à 50 % en Europe, se répartissait comme suit : Europe 6 200 t, Japon 2 200 t et USA 1 900 t [Boisset, 1996]. En 2002, l'Europe a consommé 7 203 t de Cd des 19 745 t produites. La production de Cd est en baisse sur les 5 dernières années. Il est principalement consommé pour la fabrication de batteries (70 %).

la production mondiale de Zn a augmenté de 4 millions de tonnes à 4,9 millions entre 1999 et 2003. Les sources principales de Zn sont les usines de production de Fe et d'acier, la métallurgie non ferreuse, le transport routier et la combustion du charbon ; les émissions de Zn ont diminué de 69 % depuis 1970 au Royaume-Uni.

1.1.2 Toxicité du cadmium et du zinc

Le Zn est essentiel pour la nutrition des plantes supérieures [Edwards *et al.*, 1998], il diffère en cela de Cd qui n'est pas essentiel aux organismes vivants [Adriano *et al.*, 2004].

Dans l'environnement, la toxicité à long terme, prédomine [Chaudri *et al.*, 2000]. La toxicité à long terme désigne la perturbation du métabolisme des êtres vivants entraînant des troubles physiologiques pouvant être mortels suite à l'exposition permanente et prolongée à de faibles concentrations d'une substance [Ramade, 2002]. Des modifications directes de l'activité de biomolécules ou de cycles biochimiques constituent une étape majeure de la toxicité des métaux. Le passage de la membrane cellulaire met en jeu des canaux ioniques, des systèmes de transports actifs et l'endocytose. Des perturbations d'activités enzymatiques par complexation des thiolates d'enzyme ou de cofacteurs, ou par remplacement d'un métal essentiel (Zn par exemple) par un métal toxique sont également observées. Par exemple, la substitution de Zn par Cd au sein du site catalytique inhibe les carbopeptidases [Boisset and Narbonne, 1996]. La toxicité des métaux. est liée à la formation d'espèces oxygénées réactives comme des radicaux peroxydes, du peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroxyles qui endommagent des composés cellulaires (protéines, acides nucléiques) [Rucinska *et al.*, 1999]. Ces espèces oxygénées apparaissent aussi lors de stress environnementaux comme une déficience minérale, ou des changements de température. Ils perturbent le transport des électrons dans les mitochondries et les chloroplastes [Rucinska *et al.*, 1999].

Les métaux peuvent se lier aux parois cellulaires des champignons et bactéries. Les protozoaires et nématodes ingèrent ces organismes s'exposant ainsi à une seconde source de contamination autre que la solution du sol [Giller *et al.*, 1998].

1.1.2.1 Toxicité du cadmium

Pour Cd, la toxicité est principalement intracellulaire [Boisset and Narbonne, 1996]. Facilement transféré du sol aux végétaux, Cd s'accumule dans le foie et les reins des herbivores. Les apports via l'alimentation contribuent ainsi majoritairement à l'augmentation de la charge corporelle en Cd (le tabagisme constitue la seconde source car le tabac est un hyperaccumulateur de Cd) [Boisset, 1996].

La connaissance de la teneur totale en un élément ne permet pas à elle seule de préciser le risque pour la chaîne alimentaire et l'environnement [Baize, 2000]. La dose létale (DL 50) de Cd chez le rat par voie orale varie suivant la forme chimique de 30 mg.kg^{-1} pour des sels solubles à 5000 mg.kg^{-1} pour des sulfures. L'ingestion de Cd affecte les reins, le foie, les systèmes hématopoïétiques et cardio-vasculaires, et les défenses immunitaires [Narbonne and Boisset, 1996]. Les effets chroniques chez les animaux, concernent les reins, la reproduction (foetus moins viables, moins nombreux, moins lourds et croissance ralentie), le système cardio-vasculaire (hypertension) [Narbonne and Boisset, 1996]. Chez les rongeurs, le Cd est de plus un cancérigène par voie sous cutanée, intramusculaire, respiratoire et orale avec pour organes cibles: les poumons, les testicules, la prostate et les organes hématopoïétiques.

Les effets sur l'homme concernent principalement une possible insuffisance rénale et une perturbation du métabolisme du calcium dans les tissus osseux. Le syndrome d'Itaï-Itaï (observé au Japon dans les années cinquante) illustre ces effets. Des insuffisances rénales, des cas d'ostéoporose et d'ostéomalacie sont observés dans une population soumise à des apports élevés en Cd via l'alimentation pendant 30 ans [Boisset, 1996]. La néphrotoxicité du Cd est due à la formation d'un complexe Cd-métallothionéine (MT) qui s'accumule dans les lysosomes des cellules du tubule proximal du rein, les ions Cd^{2+} libérés par dégradation de ce complexe, inhibent l'activité protéolytique des lysosomes [Boisset and Narbonne, 1996]. Une accumulation préférentielle placentaire du Cd au détriment de Zn est également constatée. L'exposition au Cd par voie respiratoire entraîne des cancers des poumons et du nasopharynx, il y a aussi une suspicion concernant les cancers de la prostate [Boisset, 1996]. Le Cd entraîne l'apparition d'aberrations chromosomiques : il agit comme un poison du cytosquelette et empêche la séparation des chromosomes. Le Cd est enfin un agent mutagène direct et indirect. La dose tolérable de Cd chez l'homme est évaluée à $0,5 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$ [Narbonne and Boisset, 1996].

Au niveau de la phytotoxicité, une baisse de la production (matière sèche) lors de l'exposition à des quantités croissantes de Cd pour *Brassica juncea* est constatée après 12 semaines de culture [Bolan *et al.*, 2003]. Par ailleurs, des cultures de *Glycine max* L. en hydroponie avec différentes expositions en Cd démontrent une baisse induite des capacités fixatrices d'azote [Balestrasse *et al.*, 2004]. La croissance racinaire est inhibée lors d'une exposition à Cd pour *Tagetes erecta*, *Salvia splendens* et *Abelmoschus manihot* [Wang and Zhou, 2005]. La CE 50 pour la croissance de *Lolium perenne*, est de $1\ 000\ \text{mg.kg}^{-1}$ [Pestemer, 1989].

1.1.2.2.1 Toxicité du zinc

Pour l'homme, le Zn est considéré comme étant relativement peu toxique par voie orale [Fosmire, 1990]. Cependant, l'ingestion de fortes quantités de Zn entraîne des symptômes de toxicité (nausées, vomissements, douleurs épigastriques, léthargie, fatigues) [Fosmire, 1990]. Lors d'ingestions en plus faibles quantités mais supérieures tout de même aux doses recommandées ($100\text{-}300\ \text{mg Zn.jour}^{-1}$ pour une dose recommandée de $15\ \text{mg Zn.jour}^{-1}$), une déficience en Cu avec des symptômes d'anémie et de neutropénie (baisse du nombre de globules blancs) apparaît, avec aussi des effets négatifs sur les fonctions immunitaires et une hausse du taux de cholestérol [Fosmire, 1990]. Le Zn est également neurotoxique, il complexe les glutathions ce qui entraîne la mort des cellules neuronales [Chen and Liao, 2003].

1.2 Phénomène de sorption des éléments métalliques dans les sols

L'ensemble des constituants du sol forme le « complexe absorbant » (Blanchard, 2000). Ce complexe est capable de réaliser des échanges entre la phase liquide et la matrice solide du sol, qui dépendent des mécanismes de sorption. Deux types principaux d'interaction matrice solide-phase liquide sont impliqués dans la rétention des métaux lourds : la physisorption et la chimisorption.

1.2.1 La physisorption : une adsorption non spécifique

L'adsorption non spécifique résulte des forces électrostatiques entre atomes portant des charges de signe différent. L'énergie de liaison est alors relativement faible. Par conséquent, les éléments métalliques adsorbés sont facilement mobilisables en cas de changements physicochimiques du milieu.

La matrice du sol, globalement chargée négativement, attire les cations en solution. Ce sont les minéraux argileux et la matière organique, souvent réunis pour former le complexe argilo-humique, qui participent le plus à la charge négative du sol (Chaignon, 2001). La présence des charges de surface peut provenir soit de substitutions isomorphiques dans le réseau cristallin (remplacement d'un cation trivalent par un divalent), soit de réactions chimiques de surface dues aux variations de pH (Delmas-Gadras, 2000).

Pour l'adsorption non spécifique, les atomes de métal ne sont pas directement en contact avec la surface des particules du sol, mais ils sont présents au sein d'une sphère de molécules d'eau enrobant les particules du sol, appelées couche d'hydratation. On nomme ce type d'interaction « complexe de sphère externe ».

1.2.2 La chimisorption : une adsorption spécifique

Contrairement à l'adsorption non spécifique, l'adsorption spécifique fait intervenir une liaison chimique forte, sans molécule d'eau interposée entre le groupe fonctionnel et la surface de l'ion adsorbé. Les éléments métalliques ainsi chimisorbés seront ainsi beaucoup moins susceptibles d'être mobilisés. On parle dans ce cas de « complexe de sphère interne ». Trois types de liaison chimique sont à l'origine de la spécificité de la chimisorption entre l'ion et la matrice : les liaisons ionique, covalente et de coordination. Elles peuvent se produire entre un ion métallique et un ligand organique ou inorganique. On appelle ligand un groupe fonctionnel, un atome ou un ion lié à un groupe central d'atomes ou d'ions. On parle alors de complexation ou de chélation. Les complexes formés peuvent parfois précipiter (Blanchard, 2000). En outre, après avoir été adsorbés en surface, les éléments peuvent diffuser à l'intérieur des particules minérales ; c'est le phénomène d'absorption. Tous ces processus de sorption sont réversibles. La réversibilité est due aux conditions physicochimiques du sol, pH, potentiel redox... que nous allons maintenant aborder.

1.3 Mobilité des éléments métalliques dans le sol

De nombreuses recherches, dans le domaine de l'écotoxicité des métaux lourds, s'accordent sur le fait que le risque résulte non pas des concentrations totales relevées dans les sols pollués, mais de leur fraction biodisponible (Adriano, 2001; Mc Laughlin *et al.*, 2000). La mobilité des espèces chimiques métalliques peut être définie par leur aptitude à être

transférées vers des compartiments du sol où elles sont moins énergiquement retenues, le compartiment ultime étant la phase liquide représentée par la solution du sol. C'est cette dernière qui constitue le réservoir principal d'alimentation pour les plantes (Kabata-Pendias and Pendias, 2001 ; McLaughlin *et al.*, 2000). Les processus de transferts entre la phase solide et la phase liquide sont multiples ; ils dépendent fortement de la nature de la liaison entre les métaux et la phase solide, appelée également phase porteuse ou phase de rétention, ainsi que des conditions physico-chimiques régnant dans le sol. Il convient alors de traiter séparément ces aspects pour expliquer la mobilité des métaux lourds.

1.3.1 Constituants du sol et la mobilité des éléments métalliques

Les minéraux des sols sont hérités de la roche mère sous-jacente. On distingue les minéraux primaires, hérités sans modification de la roche mère, et les minéraux secondaires, issus de la pédogénèse par des phénomènes d'altération physico-chimiques, mais aussi biologiques. Aux constituants vient s'ajouter une fraction organique héritée de l'activité des organismes vivants.

L'ensemble de ces éléments forme la phase de rétention des métaux, en équilibre dynamique avec l'eau du sol.

1.3.1.1 Les minéraux primaires

Les minéraux primaires des sols sont hérités de la roche mère, d'une part grâce aux processus de désagrégation mécanique, souvent d'origine climatique comme par exemple la succession gel/dégel, d'autre part en raison de leur résistance aux processus d'altération chimique en vigueur dans les conditions environnantes. La structure de la plupart de ces minéraux et leur taille importante ne leur confèrent que de très faibles propriétés réactives vis-à-vis des métaux lourds (Kabata-Pendias and Pendias, 2001; Lespagnol, 2003). Lorsque les processus d'altération se poursuivent, ils peuvent être la source des minéraux secondaires (Duchaufour, 1995).

1.3.1.2 Les minéraux secondaires

Les minéraux créés durant la pédogénèse sont essentiellement des argiles, des hydroxydes de fer (Fe), d'aluminium (Al) et de manganèse (Mn), des carbonates, des sulfates et des phosphates. Issus directement ou indirectement des minéraux primaires de la roche mère, ils sont de très petite taille et considérés comme les principaux constituants minéralogiques des sols ayant un rôle dans la rétention des éléments métalliques.

- *Les argiles*

Les argiles présentent surtout deux caractéristiques essentielles qui en font des minéraux diversement réactifs :

D'une part, les argiles ont une structure formée d'une superposition de feuillets (phyllosilicate) qui leur confère une surface spécifique interne très variée (de 0 m².g⁻¹ pour la kaolinite à 750 m².g⁻¹ pour des vermiculites ou des smectites). Cette surface interne vient s'ajouter à une surface externe importante liée à leur très petite taille et à leur morphologie (de moins de 1 m².g⁻¹ pour les vermiculites à 50 m².g⁻¹ pour les smectites).

D'autre part, les argiles se caractérisent par une surface électrique non neutre, qui détermine leurs capacités d'échanges ioniques. Ces minéraux portent en fait deux types de charge.

La première, de signe négatif, est structurelle et non modifiable. Elle est liée aux substitutions Al³⁺- Si⁴⁺ ou Mg²⁺, Fe²⁺-Al³⁺ dans les feuillets de l'argile. La seconde, liée aux réactions chimiques qui se produisent à la surface des minéraux, est une charge de surface variable en fonction du pH du milieu. Pour un pH bas, les ions H⁺ majoritaires se lient à l'argile plus que les OH⁻. Il en résulte une charge globalement positive et l'argile se caractérise par une capacité d'échange anionique. Pour un pH élevé, les ions OH⁻ dominants conduisent au phénomène inverse, et l'argile développe une capacité d'échange cationique (CEC). A l'équilibre, point isoélectrique, la capacité d'échange de l'argile devient nulle. La capacité d'échange cationique (CEC) mesure la capacité d'une argile à échanger des cations. Elle varie de 10 meq/100g à 200 meq/100g respectivement pour les chlorites et les vermiculites (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Dans la grande majorité des cas, la charge globalement négative associée à une surface de contact importante confèrent aux argiles une forte réactivité vis-à-vis des métaux.

- *Les oxydes et hydroxydes*

Les hydroxydes de fer et d'aluminium, sous forme amorphe ou cristalline, sont des constituants communs dans les sols naturels. Les hydroxydes de fer sont les plus abondants (Fe_2O_3 : hématite et maghémite ; FeOOH : goethite et lepidocrocite et $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$: ferrihydrite).

Les hydroxydes d'aluminium ($\text{Al}(\text{OH})_3$: gibbsite ; AlOOH : boehmite) sont relativement moins

fréquents. Enfin, les hydroxydes de manganèse, relativement mal définis car de structure minérale complexe, sont généralement minoritaires dans les sols naturels.

Comme les argiles, la réactivité des hydroxydes de fer et d'aluminium provient de leur importante surface spécifique et de la charge de surface, variable avec le pH du milieu (Kabata- Pendias and Pendias, 2001). En effet, suivant les conditions physico-chimiques, ils présentent des

charges de surface variables permettant d'adsorber les anions et les cations par des liaisons de haut niveau d'énergie. Le point isoélectrique des hydroxydes de fer et d'aluminium se situe entre pH 7 et pH 9 selon les espèces. Les hydroxydes de manganèse possèdent des propriétés différentes des oxydes de fer et d'aluminium (Sigg *et al.*, 2000). Contrairement aux autres hydroxydes, leur point isoélectrique se situe entre pH 5 et pH 7, ce qui fait d'eux des fixateurs des métaux dans les sols naturels. Ils jouent en conséquence un rôle prépondérant dans la sorption des ions métalliques (Blanchard, 2000).

En outre, les hydroxydes peuvent précipiter en piégeant les métaux à l'intérieur des mailles cristallines, permettant ainsi la fixation de métaux en quantité supérieure à leur CEC. Cette cristallisation peut avoir lieu sous l'influence de microorganismes de genres différents tels que *Thiobacillum* ou encore *Metallogenium* (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

- *Les carbonates, phosphates, sulfates, sulfures et chlorures*

La forme prédominante des carbonates ($\text{R}^{2+}\text{CO}_3^{2-}$; R= Ca, Mg, Fe mais aussi beaucoup de métaux divalents présents dans les sols pollués tels que Pb, Zn, Cu, etc.) dans la plupart des sols est la calcite (CaCO_3). Assez soluble, cette espèce a une influence majeure sur le pH des sols, et par conséquent sur les phénomènes de sorption des métaux. En outre, les réactions de dissolution/précipitation des carbonates favorisent le piégeage des ions métalliques au sein de cristaux formés (Blanchard, 2000).

Les phosphates (groupement PO_4^{3-}) sont des minéraux peu abondants dans les sols, mais susceptibles, comme les carbonates, de substitution du calcium par des éléments métalliques

divalents (*e.g.* Pb, Zn, Cu), en particulier dans des sols à tendance basique (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Les sulfates (généralement de la forme $R^{2+}SO_4^{2-}$) et les arseniates (minéraux d'arsenic As^{5+} comprenant le groupement AsO_4^{3-}), les sulfures (souvent $R^{2+}S^{2-}$), les arseniures (minéraux d' As^{3+}) et les chlorures (principalement $R^{2+}Cl_2$) sont des espèces présentes en quantité généralement négligeable dans la plupart des sols, mais qui peuvent être abondantes en contexte industriel ou minier. Les couples sulfate-sulfure et arseniate-arseniure sont très sensibles aux conditions d'oxydoréduction du milieu, et les microorganismes peuvent jouer un rôle essentiel à cet égard. En condition anoxique, la réduction du sulfate en sulfure est fréquente, et inversement, l'oxydation de certains sulfures est rapide lorsque la saturation en oxygène est atteinte. Les solubilités des formes réduites et oxydées d'un élément chimique donné lorsqu'elles existent peuvent être très différentes, rendant les cations métalliques plus ou moins disponibles. Or ceux-ci sont facilement assimilables par les plantes, et ils représentent une voie privilégiée de contamination de la chaîne alimentaire.

La spéciation des éléments chimiques dans les phases solide et liquide du sol est donc un critère déterminant de leur disponibilité pour les plantes.

1.3.1.3 La matière organique

La matière organique désigne différents types de composés carbonés et azotés. Elle est principalement issue de l'activité biologique des végétaux et des animaux et de leurs produits de décomposition, mais peut également avoir une origine anthropique : composts, boues, pesticides, hydrocarbures. Elle se compose de deux fractions :

- **La fraction vivante** (micro-organismes, faune épilithique, rhizosphère des végétaux supérieurs, animaux fouisseurs). Son influence sur la fixation des éléments trace est importante, et elle participe largement aux modifications de certains facteurs pédologiques comme le potentiel redox ou le pH (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).
- **La fraction morte** (débris végétaux et animaux plus ou moins décomposés en humus, carbone rapporté) est représentée par diverses molécules plus complexes et moins bien définies, de masses moléculaires très différentes. Ainsi, on retrouve les cires, les lipides, les protéines, les peptides, les acides organiques, les acides aminés

ou encore les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)... (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Ces composés s'associent entre eux pour former les substances humiques (humine, acides humiques, acides fulviques) piégeant différents éléments. La matière organique est donc un facteur clef des échanges ioniques et des cycles géochimiques des éléments métalliques. Les réactions mises en oeuvre sont diverses et font appel à différents aspects physicochimiques que nous allons développer maintenant.

1.3.2 Facteurs influençant la mobilité des éléments métalliques

1.3.2.1 Le pH

Le pH constitue un facteur dont le rôle est crucial pour la mobilité des ions métalliques, car il influence le nombre de charges négatives pouvant être mises en solution (McLaughlin, *et al.*, 2000). Les protons proviennent majoritairement de la respiration végétale et microbienne, ainsi que de l'oxydation des sulfures. A l'inverse, ils sont consommés par l'hydrolyse des minéraux altérables. D'une façon générale, lorsque le pH augmente, les cations sont moins solubles et les anions sont plus solubles (Blanchard, 2000).

De plus, l'augmentation de pH induit souvent la formation d'espèces précipitées qui peuvent limiter la solubilité et la biodisponibilité de toutes les espèces ioniques (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Cependant, elle entraîne également la dissolution de matières organiques et la formation consécutive de complexes organo-métalliques plus solubles (Chaignon, 2001). Les variations de pH ont donc des conséquences complexes et parfois contraires sur la mobilité des métaux lourds, en particulier en présence de ligands organiques et inorganiques.

1.3.2.2 Le potentiel redox

Le potentiel redox (Eh) permet de caractériser les échanges d'électrons entre les espèces chimiques. Ainsi, les formes oxydées prédominent pour un potentiel redox élevé, alors que les faibles valeurs favorisent l'apparition d'espèces réduites. Les valeurs les plus courantes du potentiel redox dans les sols naturels sont comprises entre -200 et 400 mV, domaine de potentiel qui recouvre des degrés d'oxydation variés de nombreuses espèces en solution, influant ainsi directement ou indirectement sur la mobilité des métaux qui constituent ces

espèces minérales. Le Cr^{3+} peut ainsi subir une oxydation directe en Cr^{6+} , plus mobile et plus toxique.

De plus, la modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments se liant avec le métal influence indirectement la solubilité des métaux lourds. En conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfures qui piègent volontiers les éléments chalcophiles tels que Fe, Zn, Pb, Cd (Deneux-Mustin *et al.*, 2003). D'autre part, la dissolution des hydroxydes est favorisée entraînant de manière opposée la solubilisation des métaux associés (Chaignon, 2001).

Bien que l'influence des conditions oxydo-réductrices du sol semble très importante au regard de la mobilité des éléments métalliques, il n'en demeure pas moins que ce facteur apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. En effet, pour un sol donné l'Eh varie en fonction inverse du pH, il augmente quand le pH diminue (Deneux-Mustin *et al.*, 2003), en conséquence de quoi l'influence des conditions oxydoréductrices apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. De plus, il est relativement difficile d'interpréter les valeurs obtenues. En raison du nombre important des couples redox et de la cinétique des réactions (Lespagnol, 2003), l'influence du potentiel redox est souvent difficile à comprendre.

1.3.2.3 L'activité biologique

La compréhension globale des phénomènes biologiques jouant sur la solubilité des métaux lourds dans les sols est rendue difficile par la multiplicité des actions et interactions à tous les niveaux. Les végétaux supérieurs étant au centre de notre étude, et les microorganismes ayant une influence sur l'ensemble du milieu aux échelles de temps et d'espace considérées, nous nous attacherons à développer principalement l'action des microorganismes et des plantes.

Parmi les microorganismes on retrouve de nombreuses populations bactériennes et fongiques dont les activités métaboliques influencent la mobilité des métaux lourds. Cependant, beaucoup de ces phénomènes sont également communs aux plantes. Les principaux phénomènes d'action sur la mobilité des polluants métalliques sont la solubilisation, l'insolubilisation et la volatilisation :

- **La solubilisation** provient de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitrique et sulfurique. Certaines bactéries chimolithotrophes (*Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Galionella*) oxydent les formes réduites du

fer et du soufre contenues dans les sulfures et produisent de l'acide sulfurique, susceptible de dissoudre les silicates, les phosphates, les oxydes et les sulfures, libérant ainsi les métaux lourds contenus. Les champignons et les racines des plantes excrètent eux aussi des acides afin d'augmenter leur absorption de nutriments, ou tout simplement comme déchets métaboliques (Foy *et al.*, 1978 ; Chaignon, 2001 ; Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Cette acidification favorise aussi la mobilité des autres éléments qui ne sont pas indispensables pour le métabolisme végétal. D'autre part plusieurs autres molécules organiques, capables de complexer spécifiquement certains éléments en solution, peuvent être également libérées en cas de carence nutritive. Parmi ces agents complexants, les sidérophores, composés organiques de faible masse moléculaire, produits par les bactéries et les champignons mais aussi par les plantes. Ces molécules favorisent les déplacements d'éléments métalliques et un transfert diffusif jusqu'aux plantes dans lesquelles ils s'accumulent (Chaignon, 2001).

- **L'insolubilisation** constitue le phénomène opposé. Bien que le phénomène de détoxification extene des métaux lourds par des exudats racinaires n'ait jamais été démontré (Baker & Walker, 1990), certains acides organiques de faible masse moléculaire, comme les acides oxalique, citrique ou fumarique qui interviennent dans la complexation intracellulaire d'éléments nutritifs, peuvent être sécrétés dans le milieu extérieur. Ils limiteraient ainsi les transferts par des processus de complexation.

- **La volatilisation** repose sur l'action directe de certains microorganismes sur le degré d'oxydation de l'espèce métallique. C'est le cas du mercure, de l'arsenic et du sélénium (Se). La biométhylation permet le transfert de groupements méthyl directement aux atomes, Pb, Sn (étain), As, Sb (antimoine) et Se, permettant leur volatilisation dans l'atmosphère.

1.3.2.4 La température

La température du sol dépend en premier lieu de la météorologie, et donc du climat, mais elle est également liée à l'activité biologique et influence rétroactivement la formation de complexes avec des ligands inorganiques, en modifiant l'activité de l'élément en solution (Deneux- Mustin *et al.*, 2003). La température a un impact direct sur la mobilité des éléments

métalliques en déplaçant les équilibres des réactions de dissolution - précipitation et co-précipitation, et un impact indirect, en modifiant la teneur en eau du sol, le pH ou l'Eh.

1.3.3 Transferts des métaux

La mobilité et donc le transfert des métaux dans les sols est la résultante de plusieurs processus pédologiques, physico-chimiques et microbiologiques, et sont contrôlés par un vecteur principal : l'eau.

1.3.3.1 Processus pédologiques de transferts

L'ensemble des transferts possibles pour les éléments métalliques dans les sols est représenté sur la **Figure 1.1**.

Des **transferts verticaux** sont initiés par les eaux météoriques qui conduisent à un processus pédologique d'illuviation d'argile et de fer (entraînement des horizons de surface vers des horizons plus profonds par suspension dans l'eau du sol). Les éléments métalliques, associés aux particules d'argiles et de fer, peuvent alors migrer vers les horizons profonds. Les formes solubles ou colloïdales peuvent migrer plus profondément vers les nappes phréatiques.

Des **transferts latéraux** peuvent également modifier la mobilité des métaux et les redistribuer dans les sols. Les éléments métalliques sont associés à des particules argileuses et des (oxy)hydroxydes de fer. Des transferts latéraux à la surface du sol entraînent les éléments métalliques par **ruissellement ou érosion**.

1.3.3.1.1 Transferts vers les milieux aquatiques

Les eaux météoriques et l'irrigation sont les principales sources d'eau dans les sols. Une partie est évacuée par évaporation ou ruissellement de surface. L'autre partie pénètre dans le sol et est alors absorbée par les racines des plantes ou se dirige vers les horizons profonds et les nappes phréatiques. L'importance relative de ces transferts est très variable et dépend d'un ensemble de paramètres, parmi lesquels le type de sols (argileux, sableux, limoneux), l'emplacement sur le bassin versant (crête ou talweg), les propriétés chimiques (pH, Eh) et le métal (nature, forme chimique). Au cours de ces transports, l'eau se charge en éléments dissous.

Les transferts des éléments métalliques vers les milieux aquatiques posent surtout un problème de toxicité vis-à-vis de l'ensemble des écosystèmes aquatiques, d'autant plus qu'une fois dans les eaux, ces métaux peuvent avoir une mobilité accrue. Dans les eaux souterraines par exemple, les colloïdes jouent un rôle prépondérant dans le transport des éléments métalliques (Honeyman, 1999).

1.3.1.1.2 Transferts vers les plantes

L'absorption des éléments métalliques par les plantes est donc le transfert vers les plantes sont régis par différents facteurs liés au sol, à la plante elle-même, aux interactions entre les éléments ou encore au climat. Les principaux facteurs liés au sol sont le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, la CEC et la teneur en matière organique. La capacité d'accumulation des plantes varie d'une plante à une autre suivant son génotype.

Quand elles se développent sur des sols pollués, les plantes peuvent assimiler des éléments métalliques. Les plantes cultivées pour la consommation représentent un danger potentiel pour la santé publique du fait de l'accumulation possible de ces éléments dans leurs tissus. Les risques associés aux sols pollués (contamination de la chaîne alimentaire) sont en effet étroitement liés à la biodisponibilité des éléments métalliques. Une fois absorbés, ces éléments métalliques peuvent retourner dans le sol (cycle bio-géochimique), s'il n'y a pas d'exportations.

1.4 Evaluation de la mobilité et de la biodisponibilité des métaux dans les sols

L'évaluation des risques associés à la pollution des sols nécessite, non seulement une connaissance de la teneur totale en métal, mais aussi de la teneur en métal dans les différents compartiments constitutifs du sol. La teneur totale d'un élément métallique dans un sol comprend toutes les formes de l'élément y compris celles intégrées dans les réseaux cristallins des minéraux (argiles, silicates, carbonates, oxydes, etc.). Evaluer le stock total d'un élément constitue une bonne approche pour étudier le degré et l'ampleur de la contamination d'un sol par un élément métallique. Cependant, dans la majorité des cas, ce type d'analyse ne donne que peu d'informations sur la mobilité de cet élément ainsi que sur sa biodisponibilité (Li et Thornton, 2001). C'est en cela que la notion de **spéciation** est importante.

La spéciation définit les différentes espèces chimiques, les différentes formes sous lesquelles se trouvent un élément ou la phase à laquelle il est fixé. Elle est également définie comme étant le processus d'identification et de quantification des différentes espèces, formes ou phases dans lesquelles se trouvent un élément. La spéciation peut être évaluée à partir d'extractions réalisées en présence de réactifs sélectionnés ; elle sera alors définie de façon **fonctionnelle** ou **opérationnelle** (Ure et al, 1993).

1.4.1 Spéciation fonctionnelle : extraction simple

Dans ce cas, on utilise un réactif unique qui permet de déterminer les formes mobiles ou les cations échangeables, ou encore les espèces biodisponibles pour les plantes. Il existe de nombreux réactifs d'extraction : eau, acide acétique, chlorure de calcium, réactifs complexants, etc. Cependant, il existe peu d'études dans la littérature mettant en évidence l'efficacité d'un réactif par rapport aux autres pour représenter la part de métal réellement absorbé par les plantes (Menzies et al., 2007). Toutefois, les deux réactifs classiquement utilisés pour évaluer la disponibilité des métaux sont l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) et l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DTPA).

L'utilisation de ces deux réactifs a fait l'objet de norme : NF X 31-120 pour l'EDTA et ISO 14870 pour le DTPA. De plus, Echevarria et al. (2006) ont montré que le nickel isotopique absorbé par les plantes et que le nickel extrait par le DTPA provenaient du même "pool". Par conséquent, le DTPA est un bon outil pour l'estimation de la part de métal biodisponible pour les plantes.

Toutefois, ces réactifs solubilisent aussi d'autres éléments et chaque plante présente un comportement qui lui est propre. De ce fait, il reste difficile de simuler un ensemble de phénomènes biologiques par de simples réactions chimiques.

1.4.2 Spéciation opérationnelle : extractions séquentielles - fractionnement

Par une procédure d'extractions séquentielles, opérationnellement définies, on effectue une quantification des éléments dans les différentes phases du sol. Ainsi, on peut apprécier la répartition des métaux dans un sol et donc prévoir leur mobilité, en fonction des conditions imposées par des réactifs chimiques. L'un des premiers protocoles élaboré de façon systématique pour la détermination de la répartition des métaux dans les différentes phases d'un sédiment a été réalisé par Tessier et al. (1979).

Cette méthode a été adaptée et appliquée à divers sols au cours de nombreuses études (Kersten et Förstner, 1995) et de nombreux réactifs ont été testés (**Tableau 1.2**). Il est alors difficile de faire des comparaisons entre différentes études et d'en tirer des conclusions. De plus, la méthodologie a été largement critiquée du fait de la complexité et de la difficulté d'interprétation, de problèmes liés au manque de sélectivité des extractants et de la réadsorption des métaux durant l'extraction. Ces limites font que le métal extrait ne peut être attribué à une phase géochimique spécifique.

Cette méthode permet d'obtenir uniquement des informations sur la distribution des métaux dans des réservoirs donnés (Rapin et al., 1986 ; Martin et al., 1987 ; Nirel et Morel, 1990, Tessier et Campbell, 1991).

Par conséquent, la standardisation d'une procédure a été mise en place par le BCR (Bureau Communautaire de Référence, Community Bureau of Reference, maintenant Standards, Measurements and Testing Programme - SMTP) de la Commission Européenne (Ure et al., 1993 ; Rauret et al., 1998). L'intérêt d'un tel protocole réside dans le fait d'avoir une méthode standardisée dont la reproductibilité et la répétabilité ont été confirmées par de nombreuses études (entre autres : Whalley et Grant, 1994 ; Sahuquillo et al., 1998 ; Davidson et al., 2006).

Tableau 1.2 : Réactifs couramment utilisés au cours d'extractions séquentielles

Fractions opérationnellement définies	Réactifs
Echangeable	0,05 M CaCl ₂ 0,1 M NH ₄ NO ₃ 0,1 M Ca(NO ₃) ₂ 0,1 M NaNO ₃ 1 M MgCl ₂
Sensible à l'acidification	0,11 M CH ₃ COOH 1 M CH ₃ COONa
Réductible	0,1 NH ₂ OH.HCl 0,1 M (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ /H ₂ C ₂ O ₄
Oxydable	8,8 M H ₂ O ₂ + 1 M CH ₃ COONH ₄ 0,7 M NaClO 0,1 M K ₄ P ₂ O ₇ ou Na ₄ P ₂ O ₇
Résiduelle	HF HCl + HNO ₃

Les perturbations sont encore mal connues, mais on admet généralement qu'elles résultent d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « Réactive Oxygen Species » (ROS). Les ROS altèrent toute une série de substrats biologiques importants, avec comme conséquence la modification des domaines fonctionnels des biomolécules : inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme végétal (notamment la photosynthèse et la respiration), oxydation de protéines, altération des membranes cellulaires via l'induction de phénomènes de peroxydation lipidique, apparition de cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire (Cheng, 2003).

Pour éviter ces inconvénients, des systèmes de stockage ou de détoxification des métaux accumulés ont été sélectionnés chez certains végétaux. D'efficacité variée selon les espèces, il semble à l'heure actuelle que trois mécanismes, encore mal compris, soient largement prépondérants : la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule, le système anti-oxydant, qui limite les dégâts des espèces réactives de l'oxygène et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique.

1.5. Tolérance aux métaux lourds chez les végétaux

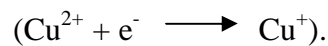
Certains éléments métalliques sont essentiels aux organismes vivants à de faibles concentrations. Mais, ils agissent à de fortes concentrations comme un facteur de stress qui entraîne une modification de la réaction physiologique. Le terme « sensibilité » décrit les effets du stress, qui peuvent aller jusqu'à la mort de la plante. Par opposition, le terme « tolérance » fait référence à la réaction de la plante qui lui permet de survivre face au stress métallique et d'assurer sa descendance (Levitt, 1980). Deux stratégies principales sont impliquées dans ce phénomène de résistance :

- **la stratégie d'évitement** par laquelle les plantes se protègent du stress métallique en limitant leur absorption ;
- **la stratégie de tolérance** qui fait référence aux réactions permettant de limiter les effets néfastes des métaux dans l'organisme.

Ces différents aspects sont abordés de façon à comprendre la physiologie de la plante vis-à-vis des métaux lourds.

1.5.1. Les métaux lourds dans la plante

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



Ils jouent ainsi un rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons, très important dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction (Chaignon, 2001). Pour autant, les métaux lourds n'ont pas tous une fonction connue à ce jour dans le métabolisme de la plante, et malgré la grande diversité des besoins et des niveaux de tolérance aux métaux lourds chez les plantes, certains restent considérés comme des poisons cellulaires pour lesquels les doses admissibles sont très faibles. On retrouve parmi les plus toxiques, Hg, Cr, Ni, Pb et Cd (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

1.5.1.1 .Absorption racinaire

La voie principale d'absorption des métaux se fait par simple diffusion au travers de l'apoplaste du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique). Le transport des éléments métalliques à travers la paroi cellulaire se fait passivement (non métabolique et donc dans le sens du gradient de concentration) par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines. Cependant, une partie des ions peut être adsorbés par les charges négatives de surface de l'acide polygalacturonique des pectines, qui agissent comme des échangeurs d'ions (Briat et Lebrun, 1999). Puis au niveau de l'endoderme, le transport peut devenir actif au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary (voie symplastique), autorisant cette fois un transfert contre le gradient de concentration. Cependant, les mécanismes exacts de l'absorption sont encore mal connus, en particulier pour certains éléments comme le Cu (Greger, 1999 ; Chaignon, 2001), et différent

selon l'espèce métallique. On considère de nos jours que le plomb et le nickel sont absorbés passivement via certaines protéines de type porine, alors que le zinc et le cuivre sont absorbés activement par une protéine de transport sélective, nécessitant de l'énergie (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Par ailleurs, bien que le transport actif soit en principe spécifique, certains cations toxiques (Cs (césium), Cd, Pb ou Cr) sont des compétiteurs potentiels vis-à-vis des cations essentiels. Par exemple, le cadmium semble être un compétiteur connu du calcium en empruntant les canaux calciques membranaires (Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999 ; Greger, 1999). 70% du Cd entrerait dans la racine par ce biais là (Greger, 1999).

Une partie des métaux apoplastiques peut donc rejoindre la voie symplastique puis le xylème par les plasmodesmes.

1.5.1.2 . *Translocation*

Après leur absorption, le transport des éléments dans le xylème de la plante vers les parties aériennes, appelé « translocation », peut nécessiter ou non la prise en charge des éléments par des agents complexants, tels que les acides organiques, les acides aminés et divers peptides : le fer est pris en charge par le citrate ; le zinc peut être transporté par un complexe anionique (Alloway, 1995) ; la majorité du cuivre et une partie du nickel sont chélatées par un acide polyaminopolycarboxylique ; le cadmium est transporté sous forme libre (Greger, 1999).

Chez certaines espèces la translocation d'éléments toxiques est plus importante que chez d'autres, pouvant conduire à une accumulation des métaux dans les feuilles et les autres parties aériennes, sans que l'on sache avec rigueur si elle est due à un transport plus actif ou une absence d'immobilisation dans les racines (Foy et al., 1978).

Le transport des éléments toxiques par le phloème est moins évident du fait que les cellules qui le constituent sont vivantes et forment un piège supplémentaire (Greger, 1999). Toutefois, chez certaines plantes, la nicotianamine, dérivée de la méthionine, pourrait être responsable du transport des métaux, Fe, Cu, Zn et Mn, dans la sève du phloème (Briat et Lebrun, 1999).

1.5.1.3 . *Accumulation*

Certaines plantes accumulent des quantités inhabituelles d'éléments métalliques ; 100 mg/kg de matière sèche pour le Cd, 1000 mg/kg pour le Ni, le Cu, le Co ainsi que 10 000 mg/kg pour le Zn et le Mn. Ces espèces sont alors qualifiées de plante « hyperaccumulatrice » (e.g.

Alyssum bertolonii, *Sebertia acuminata*, *Silene cobalticola*, *Thlaspi caerulescens*, *Brassica napus*, *Pteris vittata*) (Brooks, 1998). Ainsi, plus de 400 espèces hyperaccumulatrices sont recensées. A part une possible résistance à la sécheresse et aux herbivores (Boyd, 1998), il est encore impossible d'attribuer ce phénomène à un avantage sélectif quelconque. Dans la cellule, les métaux ayant pénétré dans le cytoplasme sont pris en charge par diverses molécules afin de les stocker ou d'éviter tout dommage cellulaire.

1.5.2. Toxicité et tolérance

Le premier effet des métaux lourds observable chez les végétaux est une inhibition de la croissance. Celle-ci s'accompagne très souvent de nombreux autres indices de dysfonctionnement : chlorose foliaire, importantes lésions nécrotiques, jaunissement progressif, repliement ou dessèchement du feuillage... A l'heure actuelle, les bases moléculaires de ces perturbations sont encore mal connues, mais on admet généralement qu'elles résultent d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « Réactive Oxygen Species » (ROS). Les ROS altèrent toute une série de substrats biologiques importants, avec comme conséquence la modification des domaines fonctionnels des biomolécules : inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme végétal (notamment la photosynthèse et la respiration), oxydation de protéines, altération des membranes cellulaires via l'induction de phénomènes de peroxydation lipidique, apparition de cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire (Devi and Prasad, 1999 ; Dietz et al., 1999 ; Cheng, 2003).

Pour éviter ces inconvénients, des systèmes de stockage ou de détoxification des métaux accumulés ont été sélectionnés chez certains végétaux. D'efficacité variée selon les espèces, il semble à l'heure actuelle que trois mécanismes, encore mal compris, soient largement prépondérants : la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule, le système anti-oxydant, qui limite les dégâts des espèces réactives de l'oxygène et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique.

1.5.2.1 La membrane plasmique

Le transport actif à travers la membrane plasmique des cellules racinaires est un processus important, car les ions ne peuvent pas diffuser librement à travers la double couche phospholipidique (Lasat, 2002), même passivement. Le rôle du plasmalemme dans la régulation du transport métallique est donc primordial.

La membrane plasmique peut limiter l'accumulation des ions toxiques, soit en modifiant l'ensemble du flux ionique, soit en employant des systèmes ultra spécifiques autorisant un flux ionique qui ne transporterait pas les ions toxiques (Meharg, 1993). Cependant, si la membrane plasmique apparaît comme étant la première barrière face à l'entrée des éléments métalliques dans le cytosol, elle constitue également une cible importante pour la toxicité métallique. En effet, il a été montré que le cuivre pouvait endommager la membrane par oxydation des protéines membranaires, peroxydation lipidique (Dietz et al., 1999) ou inhibition des ATPases (Meharg, 1993). Par conséquent, l'imperméabilité n'est plus assurée et l'entrée des métaux toxiques par diffusion est facilitée (Kabata-Pendias and Pendias, 2001). Dès lors, la tolérance pourrait être due en partie à un renforcement de la protection de l'intégrité membranaire.

Néanmoins, la fonction des protéines associées au plasmalemme joue un rôle essentiel dans le transport des métaux à travers la membrane plasmique. Récemment, le gène codant un transporteur du fer, *irt1*, a été cloné chez *Arabidopsis thaliana* à partir d'une levure (Eide et al., 1996). Il est représenté par un peptide de 339 acides aminés avec 8 domaines transmembranaires.

Chez *A. thaliana*, *IRT1* est exprimé dans les racines en réponse à une carence en fer. Les caractéristiques de ce transporteur et les données physiologiques indiquent que ce système n'est pas spécifique ; il pourrait également transporter d'autres ions divalents comme le zinc et le cadmium (Briart et Lebrun, 1999). Cette compétition entre différents ions entraînerait une déficience en fer responsable des signes visibles de chlorose. D'autres systèmes comparables ont été mis en évidence par expression fonctionnelle chez *A. thaliana*. Ainsi, *COPT1* est un transporteur connu du cuivre, retrouvé dans les fleurs, les tiges et les feuilles, mais pas dans les racines. Ceci suggère que son implication dans l'absorption racinaire est peu probable. Par opposition, *ZIP1* et *ZIP3*, exprimés lors d'une carence en zinc, sont exclusivement racinaires, et seraient par conséquent impliqués dans l'absorption racinaire. Enfin, *ZIP4*, localisé à la fois dans les parties racinaires et aériennes, jouerait un rôle dans la

translocation du zinc. La modulation de l'expression de ces gènes pourrait donc contribuer largement à la tolérance observée chez certaines espèces. Ainsi, le site principal de la toxicité au cuivre chez *Silene vulgaris* est la membrane plasmique racinaire qui est altérée par peroxydation lipidique. Dans une étude menée sur un couple écotype de contrôle-écotype tolérant, la perméabilité membranaire vis-à-vis du cuivre est mise en évidence par un efflux de potassium plus important chez le contrôle que chez l'écotype tolérant. Pourtant les deux écotypes répondent de la même façon à un stress oxydant donné. Par conséquent, la tolérance serait due à un mécanisme limitant l'entrée de cuivre au niveau de la membrane plasmique des cellules (DeVos et al., 1992).

En résumé, la tolérance pourrait être due à la protection de l'intégrité membranaire ou à la protection de la fonction des protéines associées au plasmalemmes, tels que les transporteurs, les canaux ioniques et les pompes à protons.

1.5.2.2. Système anti-oxydant

Le système anti-oxydant jouerait un rôle central dans la détoxification des métaux lourds ayant pénétrés dans la cellule. Il est donc important de bien comprendre d'une part les événements conduisant à un stress oxydant et d'autre part les mécanismes biochimiques impliqués dans la réponse à ce stress.

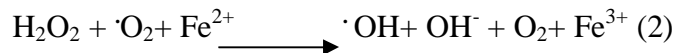
1.5.2.2.1 Les métaux lourds induisent l'accumulation de ROS

Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation. En effet, les cations d'éléments comme Fe, Cu, Cr ou Mn sont capables de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. La plus connue de ces réactions est la réaction de Fenton (1) qui se produit en présence de fer ferreux et qui conduit à la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en radical hydroxyl ($\cdot OH$) et en anion hydroxyl (OH^-) :



Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire qui, parce qu'il n'est pas apparié à un autre électron de spin opposé, confère à la molécule une très forte réactivité. Le radical hydroxyle $\cdot OH$, produit au cours de cette réaction, est un puissant agent oxydant. D'autres réactions de ce type faisant intervenir des métaux réduits ont également été décrites, telle que la réaction d'Haber-Weiss (2) au cours de laquelle le

peroxyde d'hydrogène réagit avec un radical superoxyde, comme l'anion superoxyde $\cdot\text{O}_2^-$, aboutissant, là encore, à la production du radical hydroxyle.



Par ailleurs, même des métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation, tels que le cadmium et le nickel par exemple, peuvent induire une accumulation de ROS pour trois raisons : une perturbation de certaines voies métaboliques, une inactivation et un « down régulation » des enzymes du système anti-oxydant ou un épuisement du stock de molécules de faible masse moléculaire comme l'ascorbate, le glutathion, la vitamine E ou les caroténoïdes, qui présentent des capacités anti-oxydantes (Sanita di Toppi and Gabbrielli, 1999).

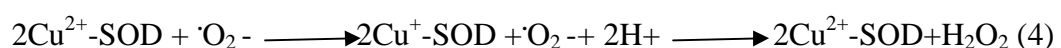
1.5.2.2.2. Le système anti -oxydant contrôle la production de ROS

Trois activités enzymatiques clefs occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxication des ROS : il s'agit des superoxyde-dismutases (SOD), des catalases (CAT) et des peroxydases (POX). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'anion superoxyde $\cdot\text{O}_2^-$ et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.

Les superoxyde-dismutases, SODs, sont responsables de la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), selon la réaction (3) :



Ces enzymes existent sous différentes isoformes, dont la structure d'ensemble est très bien conservée au cours de l'évolution : le repliement tridimensionnel forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal divalent situé au coeur de l'enzyme. Selon la nature de ce métal on distingue les superoxyde-dismutases à manganèse (Mn-SOD) localisées dans les mitochondries, les superoxyde-dismutases à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD), cytosoliques et enfin, les superoxydedismutases à fer ferreux (Fe-SOD), localisées dans le chloroplaste. L'équation (4) décrit la chaîne catalytique typique avec le cuivre :



Les catalases, CATs, sont contenues dans les peroxysomes et dans le cytosol. Elles agissent en synergie avec les SODs puisque leur rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :

+



Les peroxydases, POX, permettent, comme les catalases, la réduction de H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, à la différence des catalases, les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités. Deux types principaux de « molécules antioxydantes » sont utilisés comme substrat par les peroxydases : l'acide ascorbique (Asc) et le glutathion (GSH). Ces deux molécules participent au cycle « ascorbate/glutathion » (Noctor and Foyer, 1998 ; Foyer and Noctor, 2000), dont la première étape consiste en une réduction du peroxyde d'hydrogène en H_2O , couplée à une oxydation de l'ascorbate en monodéhydroascorbate (MDHA) ; cette étape est catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). Pour permettre la poursuite de cette réaction, l'ascorbate oxydé doit être à nouveau réduit. Pour cela, deux voies (directe et indirecte) de régénération de l'ascorbate coexistent : La réduction directe du MDHA par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) via l'oxydation d'une molécule de NAD(P)H.

Cependant, le MDHA est une molécule relativement instable qui a tendance à se dismuter spontanément en déhydroascorbate (DHA) et ascorbate. La seconde voie de régénération de l'ascorbate consiste donc en une réduction du DHA par la déhydroascorbate réductase (DHAR), couplée à une oxydation du GSH. Enfin, le glutathion oxydé, produit au cours de cette dernière réaction, est régénéré en GSH grâce la glutathion réductase (GR).

1.5.2.3 .La chélation et la compartimentation cellulaires

1.5.2.3.1. La chélation

La présence intracellulaire de ligands organiques, qui assurent une complexation et donc la détoxification de nombreux ions métalliques constitue à l'heure actuelle un aspect fondamental de la résistance aux métaux lourds. Chez les végétaux, quatre groupes principaux de ligands intracellulaires ont été caractérisés :

- Les métallothionéines (MT) sont des protéines largement distribuées dans le monde vivant. On les rencontre chez de nombreux procaryotes et chez la plupart des

eucaryotes. Ces protéines sont caractérisées par leur richesse en cations métalliques (essentiellement Cu et/ou Zn) et par leur forte proportion de résidus cystéines (environ 30 %). Elles se distinguent aussi par leur faible masse moléculaire (6 à 8 kDa et 60 à 75 acides aminés) et par l'absence de résidus aromatiques. Bien que leurs séquences en acides aminés soient très variables d'un organisme à un autre, il semblerait que la structure tridimensionnelle soit bien conservée. Selon les études actuellement disponibles, la plupart des MT présentent deux domaines globulaires distincts, dépourvus de structure secondaire et reliés entre eux par une courte séquence de transition ; chaque domaine est responsable de la fixation de plusieurs cations métalliques divalents ou monovalents. Le rôle précis des MT dans la réponse aux métaux lourds est encore débattu, mais de nombreuses observations ont montré qu'elles pourraient être impliquées dans certains mécanismes de tolérance, notamment vis-à-vis du cadmium et du cuivre. Chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, il a été démontré que la présence de cuivre stimule la biosynthèse de MT et que la variation écotypique de la tolérance à ce métal est corrélée au taux de transcription des gènes MT (Murphy and Taiz, 1995). En fait, il est aujourd'hui bien établi que la surexpression de gènes MT, dans des organismes aussi variés que des cyanobactéries, des levures, des cellules de mammifères ou des plantes (Misra and Genamu, 1989), peut s'accompagner d'une augmentation de la tolérance à certains métaux lourds (Cu, Zn et Cd). Des travaux d'ingénierie moléculaire, visant à modifier les capacités de chélation (affinité et spécificité) des MT, sont actuellement en cours. Cependant, il faut souligner que la synthèse de MT ne constitue probablement pas une réponse spécifique ; en effet, ces protéines s'accumulent également en réponse à d'autres stress (chocs thermiques par ex.) ou sous l'effet de facteurs telles que des hormones et des cytokines. Ainsi, la présence universelle des métallothionéines dans le monde vivant (chez les organismes sensibles comme chez les résistants) et leur synthèse dans des situations variées, suggèrent que ces protéines seraient plutôt impliquées dans le contrôle général de l'homéostasie cellulaire et non dans les réponses spécifiques aux métaux lourds. A ce propos, on peut remarquer que les hyperaccumulateurs étudiés jusqu'à présent ne semblent pas se distinguer par leur richesse en MT.

- Les phytochélatines (PC) représentent le deuxième groupe de chélateurs intracellulaires, uniquement rencontrés dans le règne végétal. De nature peptidique, ces molécules sont classées dans une petite famille apparentée aux MT, avec lesquelles elles partagent d'assez nettes similarités de structure et de fonction : elles

sont très riches en Cys [formule générale (Glu-Cys) n -Gly (avec $n = 2$ à 11)] et leur synthèse est stimulée par la présence de métaux lourds (Cd, Cu, Zn, etc...). Une différence essentielle avec les autres MT réside dans l'origine biosynthétique des PC ; elles ne sont pas directement codées par le génome mais sont synthétisées par une phytochélatine synthase, à partir d'un tripeptide précurseur, le glutathion (Glu-Cys-Gly). Bien que les PCs soient clairement impliquées dans la liaison des métaux intracellulaires, l'activité PC synthase semble constitutive chez la plupart des plantes. En effet, les écotypes tolérants ne présentent pas de concentrations accrues en PC (De Knecht et al., 1992) ; il est donc difficile d'attribuer la tolérance des phytoextracteurs naturels à la présence de phytochélatines. Néanmoins, Zhu et al. (1999) ont montré, à partir de clones transformés de *Brassica juncea*, que la surexpression des gènes intervenant dans la synthèse du glutathion conduit à une augmentation de la tolérance au cadmium via une augmentation du pool de phytochélatines. La stimulation des voies conduisant aux PC représente donc, comme pour les MT, une stratégie de transgénèse potentiellement efficace pour l'amélioration des phytoextracteurs.

- **Les acides organiques** représentent un autre groupe de chélateurs naturels. Sous cette dénomination sont classées des molécules diverses tels que des acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou des acides tricarboxyliques (comme l'acide citrique). Toutes ces petites molécules sont clairement impliquées dans les phénomènes d'accumulation. On observe souvent une stimulation de leur synthèse en présence de métaux lourds, ce qui laisse penser qu'elles assurent le transport xylémien des ions métalliques depuis les racines vers les parties aériennes de la plante. De plus, des observations récentes ont clairement montré que, au moins dans certains cas, des acides organiques pourraient être directement impliqués dans les mécanismes de tolérance. Ainsi, les capacités d'hyperaccumulation et de résistance de certaines variétés de blé noir (*Fagopyrum esculentum*) vis-à-vis de l'aluminium sont directement dépendantes de la synthèse d'acide oxalique (Ma et al., 1997). De même, une synthèse accrue de malate a été observée chez une population tolérante de *Festuca rubra* se développant sur des dépôts riches en Cu et Zn, par rapport à une population sensible provenant d'une prairie (Harrington et al., 1996). Ces deux exemples suggèrent donc que la tolérance aux métaux chez quelques métallobytophytes hyperaccumulatrices serait acquise par une synthèse spécifique de petites molécules organiques à fortes capacités de chélation. Néanmoins, les données dans ce domaine sont encore trop fragmentaires pour être généralisées à l'ensemble des métallobytophytes.

- **Les acides aminés libres**, comme la proline, l'histidine et la cystéine, s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être eux aussi impliqués dans la chélation de divers métaux lourds, notamment du zinc et du nickel (Briat et Lebrun, 1999 ; Bert, 2000). C'est ainsi que l'accumulation et la tolérance au nickel dans le genre *Alyssum* semblent principalement dues à une synthèse accrue d'histidine (Krämer et al., 1996).

1.5.2.3.2. La compartimentation

Une des hypothèses les plus fréquentes pouvant expliquer le phénomène de tolérance serait attribuée à la compartimentation accrue des métaux lourds sous forme ionique dans la vacuole, grâce à plusieurs familles de transporteurs protéiques. Par exemple, un transporteur tonoplastique appartenant à la famille des protéines GTP a été identifié chez un écotype de *Silene vulgaris* tolérant au zinc. Le transport de zinc sous forme ionique dans les vacuoles dépend de la présence de magnésium et de GTP et permet la détoxification du zinc plus rapidement que chez l'écotype sensible (Chardonnens et al., 1999).

Chez *Rauvolfia serpentina*, le cadmium forme, avec les phytochélatines, des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight (LMW)), qui s'agrègent les uns aux autres par des ponts sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée (High Molecular Weight (HMW)). Les HMW pourraient alors être transportés par un complexe protéique spécifique dans la vacuole. Le pH vacuolaire provoquerait alors la dissociation du complexe, et les ions seraient pris en charge par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate (Sanita di Toppi and Gabbriella, 1999).

1.5.2.4 Autres systèmes de défense au stress métallique

D'autres mécanismes agissant contre les effets néfastes des métaux lourds peuvent être mis en oeuvre chez les plantes :

- Des transporteurs membranaires, de type pompe ATPasique, spécifiques du cadmium seraient présents chez *A. thaliana* et réaliseraient un efflux actif des ions métalliques à l'extérieur des cellules (Briat et Lebrun, 1999).
- L'accumulation des métaux dans les feuilles âgées, juste avant leur abscission diminuerait ainsi les concentrations métalliques dans la plante. En général, la concentration dans les feuilles augmente avec l'âge. Chez *Armeria maritima* subsp. *halleri*, dans les feuilles marron (les plus âgées), les concentrations en Cu, Cd, Zn et

Pb sont 3 à 8 fois celles des jeunes feuilles (Dahmani-Muller, 1999). Cette observation suggère un transport interne depuis des feuilles vertes, encore actives d'un point de vue photosynthétique, vers les feuilles qui sont sur le point de tomber, préservant ainsi la photosynthèse tout en détoxiquant la plante. Une accumulation de Cd a été également observée dans les trichomes de plusieurs espèces (Salt et al., 1995).

- Les protéines de choc thermique (Hsp), déjà réputées pour leur implication dans le stress lié à un choc thermique, seraient également responsables de la tolérance aux métaux toxiques. En effet, des stress très variés, ayant en commun de dénaturer les protéines (stress protéotoxique), sont capables d'induire cette réponse de type « choc thermique ». L'induction des HSP par le stress protéotoxique permet à la cellule de réparer les dommages protéiques ainsi occasionnés par resolubilisation des agrégats, renaturation des polypeptides ou, si cela est impossible, par l'engagement des protéines dénaturées vers les voies de dégradation. Ainsi, les résultats obtenus sur des cellules de tomate ont établi que l'action d'H₂O₂ induisait la synthèse de protéines de choc thermique (Banzet et al., 1998). De la même façon, dans les cellules de *Lycopersicon peruvianum* exposées à 1 mM de cadmium, des quantités significatives d'hsp70 ont été relevées au niveau du plasmalemme, de la membrane mitochondriale et du réticulum endoplasmique, sièges de multiples dégâts du stress oxydant provoqué par les métaux lourds (Neumann et al., 1994).
- La biosynthèse d'éthylène dans les racines et les feuilles est provoquée par certains métaux, comme le cadmium. L'éthylène serait alors un messenger stimulant la lignification capable de limiter les flux de métaux dans les systèmes vasculaires et accélérant la réponse anti-oxydante par induction de l'activité ascorbate peroxydase, ainsi que la synthèse de métallothionéines (Sanita di Toppi and Gabrielli, 1999).

1.6. Les techniques de réhabilitation

Aujourd'hui, l'arrêt de toute activité devrait être suivi de la remise en l'état du site de manière à ce qu'il ne soit plus un danger pour la santé publique et l'environnement. Suite à l'évaluation des risques, les opérations de réhabilitation sont choisies en fonction de l'usage actuel ou futur. Les techniques de traitement (**Tableau 1.3**) des sols pollués varient selon les pollutions (organiques ou métalliques) rencontrées et sont classées en 4 grandes catégories :

- les procédés physico-chimiques,
- les procédés thermiques,

- les procédés biologiques,
- le confinement.

Les principes d'application des différentes méthodes se regroupent en 3 modes de fonctionnement :

- traitement "in situ", cette méthode permet de traiter les déchets et les matières polluées sans qu'il ne soit nécessaire d'effectuer une excavation,
- traitement hors site, les déchets et les matières polluées sont emmenés hors du site, transportés jusqu'à un centre spécialisé pour y être traités,
- traitement sur site ou "on site", dans ce cas une excavation est effectuée, mais le traitement se fait sur place.

Tableau 1.3 : Les techniques de dépollution des sols

Techniques de dépollution		Exemples de traitements pour des pollutions métalliques
méthodes physiques	extraire par voie physique la pollution du milieu où elle se trouve	excavation, tri, broyage
méthodes géochimiques	immobiliser physiquement sur place la pollution, soit en la confinant, soit en la stabilisant, afin d'empêcher qu'elle ne s'étende davantage	confinement par encapsulation, barrières actives
méthodes chimiques et électrochimiques	réaction d'un solvant, d'un acide, d'une base, électrolyse, ... pour enlever ou transformer la contamination	lessivage et extraction chimique, stabilisation/solidification, électromigration
méthodes thermiques	porter à haute température le matériau pour extraire ou au contraire immobiliser le polluant	désorption thermique (mercure), vitrification
méthodes biologiques	utiliser des organismes vivants pour réduire, voire éliminer la pollution	phytoextraction, phytostabilisation

1.7. La phytoréhabilitation

1.7.1 Définition

- La phytoréhabilitation est définie comme l'utilisation de plantes pour éliminer ou rendre moins mobiles et moins toxiques les contaminants environnementaux. Cette technique peut être appliquée à des polluants organiques ou inorganiques présents

dans le sol ou dans l'eau (Salt et al, 1995 ; Chaney et al, 1997 ; Raskin et al., 1997 ; Alkorta et al., 2004a, b ; Krämer, 2005).

La capacité à accumuler les polluants varie de manière significative d'une espèce à l'autre et varie en fonction du type de culture pour une espèce donnée.

La phytoréhabilitation inclut (**Figure I.3**) :

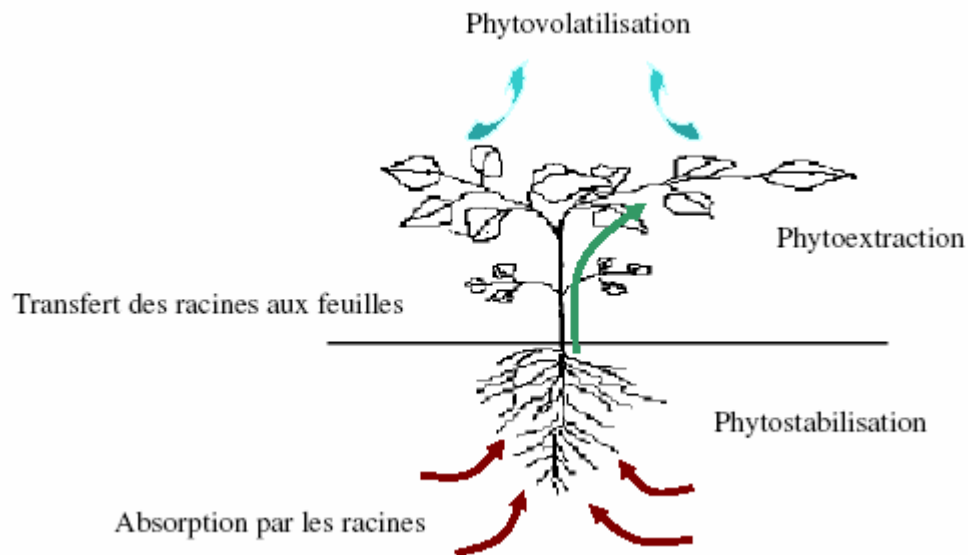


Figure 1.2 : La phytoréhabilitation

-la phytostabilisation :

C'est l'utilisation de plantes pour réduire la biodisponibilité des polluants de l'environnement. Les plantes stabilisent les polluants du sol les rendant ainsi moins dangereux. Les risques de dégradation de l'environnement par lessivage de ces polluants ou par l'envolée de poussière sont diminués. Pour une telle technique, le risque sur le long terme serait une remobilisation et un départ dans l'environnement des éléments polluants, suite à des modifications des conditions physico-chimiques du milieu.

REHABILITATION PAR PHYTOSTABILISATION

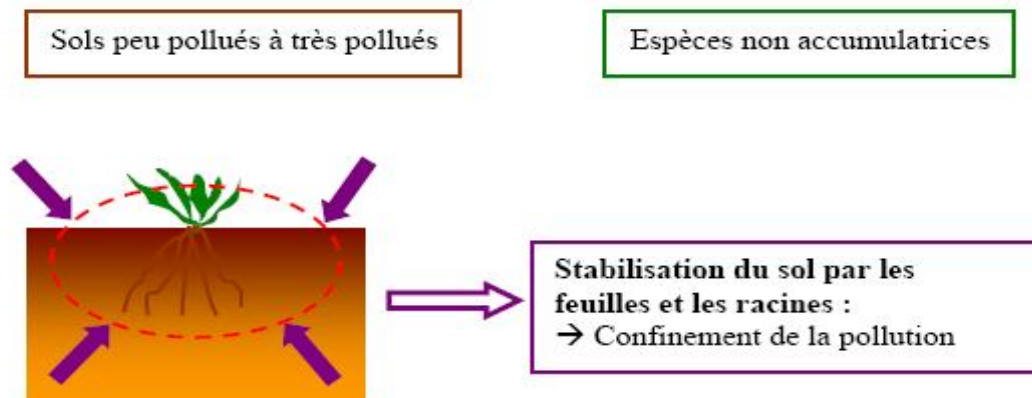


Figure 1.3 : Réhabilitation par phytostabilisation

□ la phytovolatilisation :

C'est l'utilisation de plantes pour volatiliser les polluants. Les plantes extraient des polluants volatils du sol et la volatilisation se fait au niveau du feuillage. Cette technique ne peut être mise en place que pour très peu d'éléments, par exemple le sélénium ou encore le mercure. Cependant, les composés extraits ne sont pas contenus mais dispersés dans l'atmosphère. Le devenir des polluants n'est alors plus maîtrisé.

1.7.2 La phytoextraction

La phytoextraction est une technique attractive car elle est peu agressive pour l'environnement et relativement peu coûteuse. En effet, les méthodes traditionnelles (**Tableau 1.4**), de par leurs mises en œuvre, perturbent les écosystèmes. De plus, elles présentent un coût de traitement beaucoup plus élevé que la phytoextraction.

REHABILITATION PAR PHYTOEXTRACTION

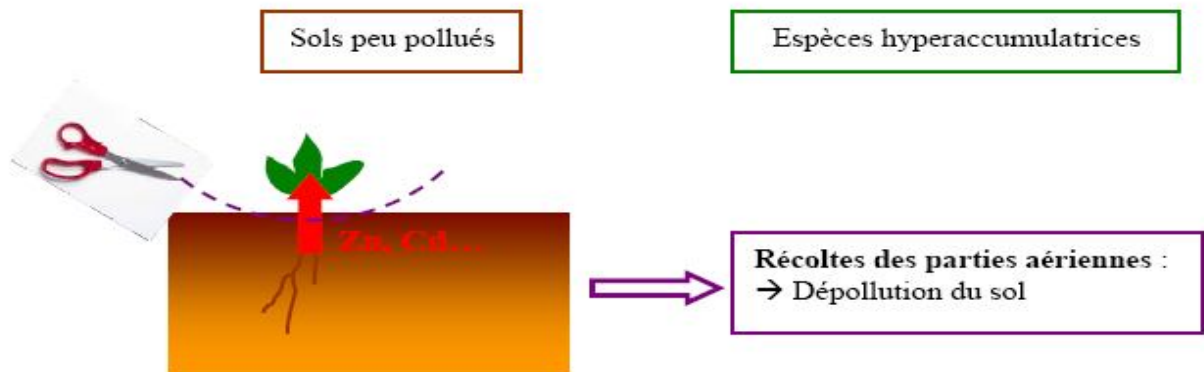


Figure 1.4 : Réhabilitation par réhabilitation par phytoextraction

Tableau 1.4 : Coût des méthodes de dépollution (d'après Lasat, 2000)

Traitement	Coût (\$/ tonne)
Vitrification	75 - 425
Méthodes mécaniques	100 - 500
Méthodes chimiques	100 - 500
Electromigration	20 - 200
<i>Phytoextraction</i>	<i>5 - 40</i>

Le terme de phytoextraction concerne principalement l'absorption des métaux du sol par les plantes. Les plantes peuvent accumuler les métaux, tels que : Fe, Mn, Zn, Cu, Mg, Mo, nécessaires à leur bon développement, mais sont également capables d'accumuler des métaux, tels que : Cd, Cr, Pb, Co, Ag, Se, Hg, qui, eux, ne sont pas nécessaires au niveau physiologique. La tolérance de ces plantes vient du fait qu'elles mettent en place un ensemble de mécanismes qui permettent l'absorption et l'accumulation des métaux. Cette tolérance et cette bioaccumulation sont rendues possibles par une adaptation de la plante, avec la mise en place au niveau cellulaire de capacités physiologiques nouvelles (Mejare et Bulow, 2001 ; Clemens et al., 2002) :

- rejet de molécules complexantes,
- fixation dans la paroi cellulaire,

- transport réduit à travers la membrane plasmique,
- activité enzymatique modifiée,
- complexation dans le cytoplasme et compartimentation dans des vacuoles.

La plante idéale pour la phytoextraction doit être capable d'accumuler et de tolérer de fortes teneurs en métaux dans ses parties récoltables, tout en ayant une croissance rapide et une forte biomasse (Chaney et al., 1997).

Certaines plantes sont naturellement capables d'accumuler de fortes teneurs en métaux (**Figure 1.2**) : ce sont des plantes **accumulatrices**, les teneurs accumulées sont supérieures à celles présentes dans le sol. Certaines sont dites **hyperaccumulatrices**, si elles sont capables d'accumuler plus de $10\,000\text{ mg.kg}^{-1}$ de Mn ou Zn, plus de 1000 mg.kg^{-1} de Cu, Co, Ni, Pb, Cr, ou plus de 50 mg.kg^{-1} de Cd dans leurs feuilles. Cependant, ces plantes sont généralement de petites tailles et ont une croissance lente.

Parallèlement d'autres plantes sont **tolérantes** aux métaux et présentent une biomasse plus importante (**Figure 1.5**) :

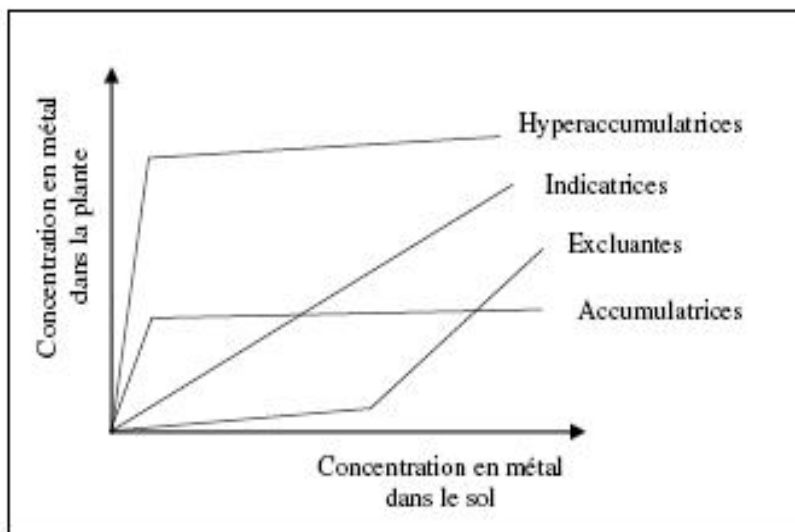


Figure 1.5 : Comportement des plantes en fonction de la concentration en métal dans le sol (d'après Baker, 1981)

- les plantes **excluantes** empêchent le transport des métaux vers les parties aériennes en sécrétant au niveau des racines des molécules complexantes. Ce comportement s'atténue quand la teneur en métal présent dans le sol devient trop importante.

Cependant, elles sont capables d'accumuler de fortes teneurs en métaux dans leurs racines.

- les plantes **indicatrices** accumulent les métaux dans leurs parties aériennes en fonction de la teneur en métal présent dans le sol.

Deux approches sont alors possibles pour la phytoextraction : soit **l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices seules**, soit **la phytoextraction couplée à l'utilisation de complexants** (utilisation de plantes tolérantes en présence de complexants).

1.7.2.1 Utilisation de plantes hyperaccumulatrices seules

Cette stratégie de phytoextraction dépend de la plante utilisée, c'est-à-dire de sa capacité d'extraction, d'accumulation, de translocation (transfert du polluant des racines vers les feuilles) ainsi que sa capacité à résister à de fortes teneurs en métaux. Les hyperaccumulatrices sont les plus appropriées pour répondre à ces différents points. La plupart des hyperaccumulatrices connues poussent sur des sols contenant de fortes teneurs en métaux. Ces plantes sont souvent issues de milieux endémiques.

Certaines études ont porté uniquement sur la phytoextraction sans ajout de complexants et sur l'utilisation de plantes hyperaccumulatrices. Ces études donnent des résultats prometteurs. Lombi et al., 2001 ont mis en évidence l'accumulation de $8,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ de Cd et 200 mg.kg^{-1} de Zn par *Thlaspi caerulescens*, cette plante s'étant développée sur un sol contenant 19 mg.kg^{-1} de Cd et 2920 mg.kg^{-1} de Zn.

Cependant, ces plantes ont une croissance lente et possèdent une faible biomasse. Par conséquent, un temps assez long serait nécessaire pour décontaminer un site. De plus, l'accumulation d'un métal peut être modifiée quand on est en présence d'un sol contenant une pollution polymétallique.

CHAPITRE 2 : PARTIE EXPÉRIMENTALE

Cette étude se compose de deux parties :

- Suivi de la concentration d'un métal (le zinc) en fonction du temps dans la plante (racines, feuilles) dénommée *loium perenne* (le ray gras) planté dans des sols contaminés artificiellement par des concentrations différentes en zinc.
- Détermination de la concentration de deux métaux (le zinc, le cadmium) dans la plante (racines, feuilles) dénommée *Hordeum vulgare* (orge) planté dans des sols contaminés artificiellement par des concentrations différentes en zinc et en cadmium.

Les plantes utilisées ont des caractéristiques spécifiques comme la tolérance et l'accumulation des polluants.

Dans cette étude on a évalué la tolérance de l'orge aux deux métaux lourds (zinc, cadmium) en l'estimant à travers différents paramètres, en utilisant des paramètres classiques de la croissance (biomasse et élongation racinaire).

2. Matériels et protocoles expérimentaux

Ce chapitre décrit, d'une part l'échantillon du sol étudié, son origine et les différents prétraitements qu'il a subit, et d'autre part, l'ensemble des techniques et des protocoles expérimentaux utilisés au cours de cette étude.

2.1 Echantillonnage

Le sol choisi comme modèle d'étude est un sol qui provient de l'Institut National d'Agronomie. Les échantillons de sol ont été prélevés à une profondeur de 5-10 cm. Le site de prélèvement se trouve dans une zone éloignée de toutes routes et de toutes activités industrielles ayant une activité agricole. L'échantillon du sol étudié a été traité selon la norme ISO 11 464. Il est séché à l'air libre ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), broyé et tamisé sur un tamis de maille de 2 mm, puis conservé dans un endroit sec.

2.2 Analyses physico-chimiques du sol

2.2.1 pH_{eau} et pH_{KCl}

Les mesures de pH_{eau} et pH_{KCl} sont effectuées selon la norme ISO 10390, 10 g de sol sont mis en suspension dans 25 mL d'eau distillée (ou de chlorure de potassium, KCl à 1 mol.L^{-1}), agités pendant 1h puis laissés au repos pendant 2h. Le pH est ensuite mesuré à l'aide d'un pH-mètre.

Le pH_{eau} mesure l'acidité réelle et prend en compte les ions H_3O^+ libres dans la solution du sol. Le pH_{KCl} mesure l'acidité potentielle qui prend en compte les ions H_3O^+ libres dans la solution du sol et ceux déplacés par le KCl.

2.2.2 Granulométrie

La granulométrie a été déterminée en suivant la norme NF X 31-107 (AFNOR, 2004) et au niveau du laboratoire d'analyses des sols de l'INRA. Cette norme permet une détermination de la distribution granulométrique en cinq fractions. Il s'agit :

- des argiles (0 à 2 μm),
- des limons fins (de 2 à 20 μm),
- des limons grossiers (de 20 à 50 μm),
- des sables fins (de 50 à 200 μm)
- des sables grossiers (de 200 à 2000 μm).

2.2.3 La capacité de rétention en eau

Elle représente la fraction d'eau emmagasinée dans les micropores, la capacité de rétention en eau est mesurée selon la méthode par pression dont le principe repose sur la détermination de

la quantité d'eau d'un échantillon de sol retenue sous une force de rétention n'excédant pas 1000 g/cm² (Aubert, 1978).

2.2.4 Capacité d'échange cationique (CEC)

La CEC représente la quantité totale de cations échangeables que le sol peut adsorber. La CEC a été déterminée par la méthode au chlorure de cobalthexammine ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$) selon la norme NF X 31-130 (AFNOR, 2004). Le principe de cette méthode repose sur le fait que les ions cobalthexammine ($\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$) s'adsorbent à la surface du sol et déplacent ainsi les cations retenus par le sol. Pour cela, 5 g de sol sont mis en suspension dans 25 mL d'une solution de $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ à 0,016 mol.L⁻¹, agités pendant 3 h, centrifugés (15 mn à 3000 g), puis filtrés (0,45 µm, filtre en nitrate de cellulose -Sartorius). Les ions $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ restés, en excès, dans la solution sont ensuite déterminés par colorimétrie à 470 nm, à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. La CEC est exprimée en méq/100 g de sol.

Le dosage des cations K^+ et Na^+ est fait par spectrophotométrie de flamme.

2.2.5 Teneur en carbone organique

La teneur en carbone organique a été déterminée selon la norme ISO 14235. Il s'agit d'une oxydation du carbone organique du sol par le bichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en excès, en milieu acide (H_2SO_4), et à chaud. Le chrome VI est réduit par le carbone organique en chrome III. Le Cr(VI) restant est ensuite dosé. Pour cela, 150 mg de sol sont mélangés à 5 mL d'une solution de bichromate de potassium à 0,27 mol.L⁻¹ et à 7,5 mL d'acide sulfurique concentré. Après centrifugation et filtration (0,45 µm), le Cr(VI) est dosé à 580 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Le dosage se fait grâce à une courbe d'étalonnage établie à partir de glucose, qui subit le même protocole que le sol.

2.2.6 Evaluation du calcaire total « CaCO_3 » (NF X 31-105):

Détermination volumétrique du dioxyde de carbone (CO_2) dégagé sous l'action d'un acide fort à température ambiante (du laboratoire) par l'échantillon de terre préparé pour essai (AFNOR, 1987).

2.2.7 Teneur en azote total « NT » (NF X 31-111) :

La teneur en azote total est déterminée par la méthode Kjeldahl, cette norme a pour principe de minéraliser l'azote organique par l'acide sulfurique en présence d'un activateur de minéralisation, distillation de l'azote ammoniacal formé et titrage dans une solution d'acide borique (AFNOR, 1987).

Le thiosulfate de sodium, d'un mélange catalytique ($K_2SO_4 + CuSO_4 \cdot 5H_2O + Se$). Le minéralisât est distillé, puis le distillat récupéré est titré avec de l'acide sulfurique.

2.2.8 Dosage de l'azote minérale (NH_4^+ , NO_3^- et NO_2^-):

Le dosage repose sur l'extraction de l'azote ammoniacal, l'azote nitrique et l'azote nitreux présent dans le sol par une solution de KCl (2N). L'azote ammoniacal et l'azote nitrique sont dosés successivement dans le filtrat par distillation au Büchi, en présence d'oxyde de magnésium (MgO) calciné et l'alliage de Dewarda (Boughedaoui et al, 1986; Aubert, 1978).

En revanche, l'azote nitreux est déterminé dans le filtrat selon la norme (NF T 90-013), cette présente norme a pour principe la diazotation de la sulfanilamide par les nitrites, en présence de dichlorure de N-(1-naphtyl) éthylène-diamine (AFNOR, 1979).

2.2.9 Teneur en phosphore soluble « P_2O_5 » (NF X 31-116) :

Le dosage du phosphore est déterminé selon la méthode Olsen dont le principe repose sur l'extraction des formes de phosphore solubles par une solution de bicarbonate de sodium (0,5N), dans des conditions déterminées (solution d'extraction à pH 8,5 et rapport prise d'essai/solution : 1/20 (m/v)) (AFNOR, 1987).

2.3 Analyses des métaux

2.3.1 Appareillages

La quantification des métaux en solution est réalisée par spectroscopie d'absorption atomique (SAA).

En SAA, les analyses sont effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre (correction du bruit de fond par lampe au Deutérium). La flamme produite est une flamme air / acétylène. Dans le cas de Cr, elle est réductrice et dans les autres cas, elle est oxydante.

2.3.2 Détermination des teneurs totales

La quantification de la teneur en métal "total" nécessite une mise en solution du sol. Nous avons donc choisi le protocole utilisant de l'eau régale, 0,5 g de sol sont introduits dans un réacteur en verre avec 9 mL HNO₃ (69 %) et 3 mL HCl (37 %). La minéralisation est réalisée à l'aide d'un digesteur. Les minéralisats sont ensuite amenés à un volume final de 50 mL, avec de l'eau distillée. Les métaux sont analysés par SAA.

2.4 Fertilisation

Etant donné que nous travaillons avec un sol ayant déjà servi à une activité agricole, ce sol est pauvre en azote, phosphore et potassium, nous avons donc procédé à une fertilisation. Les quantités sont évaluées sur la base des recommandations de l'I.T.G.C (Institut Technique des Grandes Cultures)

- N/P/K : 100/90/50 unité par hectare pour *lolium perenne*
- N/P/K : 70/50/50 unité par hectare pour *l'hordium vulgare*

Les produits utilisés sont :

- L'urée comme source d'azote ;
- KH₂PO₄ comme source de phosphore,
- K₂SO₄ comme source de potassium

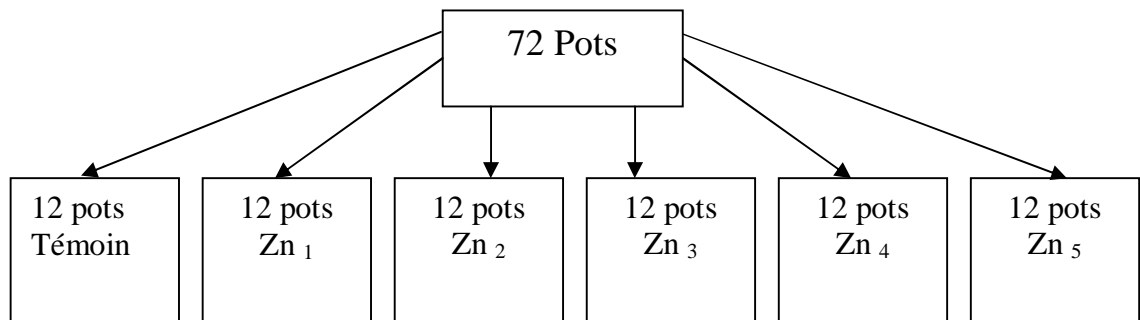
Les produits sont dissous dans de l'eau déminéralisée.

2.5 Contamination artificielle

ETUDE 1

Le sol est rempli dans 72 pots de 15 cm de diamètre et de 8 cm de hauteur à raison d'un kg par pot.

Afin de procéder à une contamination artificielle du sol par le zinc, des solutions de zinc ont été préparées à partir du sulfate de zinc et ont été rajoutées au sol de sorte que l'on ait théoriquement dans le sol après ajout des teneurs : 150, 300, 500, 750 et 1000 mg de zinc par kg de sol. La contamination a été réalisée en appliquant la solution de zinc qui correspond à 90 % de la saturation en eau à la surface du sol, ce dernier est ainsi maintenu, pendant 24 h à température ambiante, jusqu'à l'absorption complète de la solution. Chaque solution préparée a servi à contaminer 12 pots donc un total de 60 pots les 12 pots restants ne seront pas contaminés et nous serviront donc de témoins. Ces pots ont été randomisés (annexe 1) .



Trois pots sont prélevés pour chaque concentration chaque semaine donc un total de 18 pot par semaine .

Figure 2.1 : Schémas représentatif de la contamination artificielle du sol par différentes concentrations du zinc

ETUDE 2

Le sol est rempli dans 30 pots dont 15 pots sont contaminés par le Zinc. Pour cela, des solutions ont été préparées à partir du sulfate de zinc et ont été rajoutées au sol de sorte que l'on ait pratiquement dans le sol après ajout : 500, 1000, 2000, 3000 et 4000 mg de zinc par kg de sol (3 pots pour chaque concentration) en suivant le même protocole que celui du Ray Grass.

Les 12 autres pots sont contaminés par le cadmium. Pour cela, des solutions ont été préparées à partir du sulfate de cadmium et ont été rajoutées au sol de sorte que l'on ait dans le sol après ajout : 25, 50, 100 et 200 mg de cadmium par kg de sol (3 pots pour chaque concentration) en suivant le même protocole que celui du Ray Grass.

Les 3 pots restants ne sont pas contaminés et serviront donc de témoin. Ces pots ont été randomisés (annexe 2) .

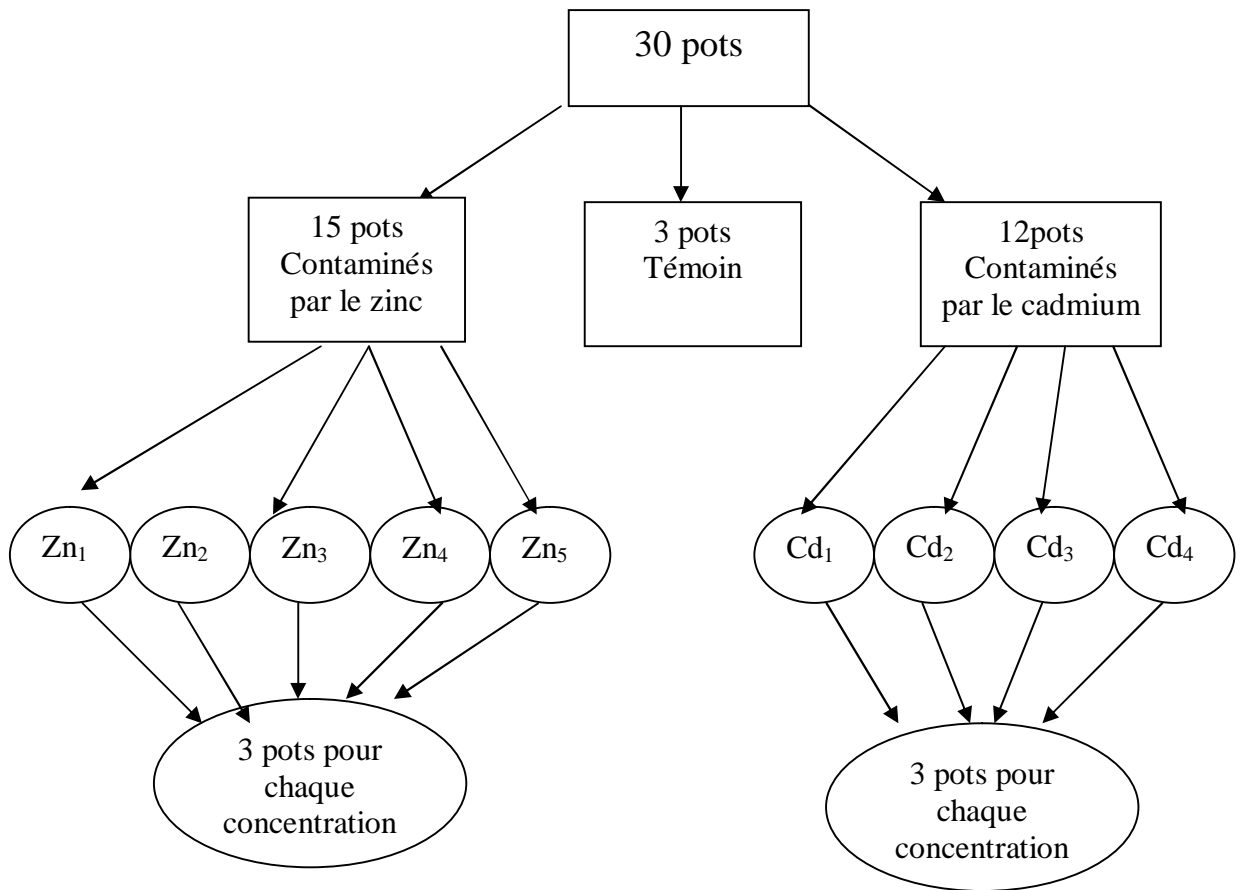


Figure 2.2 : Schémas représentatif de la contamination artificielle du sol par différentes concentrations de zinc et de cadmium

2.6 Présentation de la culture

2.6.1 *Lolium multiflorum lamk* (le Ray grass d'Italie)



Fig. 2.3 Ray gras

Le Ray Grass d'Italie (Fig. 2.1) est une graminée fourragère annuelle ou bisannuelle, selon les régions. Elle est spontanée en Algérie, ou elle se trouve dans les stations fraîches de basse altitude (moins de 600 m). Elle est plus ou moins gazonnante, d'une longueur variable de 60 à 120 cm. Les feuilles sont larges, longues et souples, de couleur vert- foncé leur surface intérieure est luisante en forme de V. La tige, à section cylindrique ou ovoïde est souvent teintée à la base en rouge claire. Les oreillettes sont petites et embarrassantes.

L'inflorescence est formée d'épis composés d'épillets aristés lancéolés et appliqués sur l'axe. Les épillets sont nombreux, plus ou moins espacés à la base, plus ou moins serrés au sommet.

Le Ray grass d'Italie a l'avantage de pousser très vite ; semé en automne, il donne une production au printemps suivant.

2.6.2 *Hordeum vulgare*(orge)



Fig.2.4 *Hordeum vulgare*

L'orge est une céréale d'hiver annuelle à épi barbu. Elle est cultivée pour son grain, utilisé principalement pour l'alimentation animale. Elle peut être aussi cultivée comme fourrage vert, pâturé ou ensilé. L'orge est peu exigeante et résiste bien aux climats rudes. Sa culture est donc relativement facile (Fig.2.2).

Deux types d'orge sont répandus ; l'orge à deux rangs et l'orge à six rangs, respectivement pour *Hordium disticum* et *Hordium hexasticum*. Ce sont les variétés à six rangs qui sont les plus cultivées en Algérie, à cause de leur valeur énergétique qui est plus élevée que celle des variétés à deux rangs.

2.7 Protocole de culture

2.7.1. *Le ray gras*

Il a été planté le 05 Mai 2009, sous lumière naturelle à une température ambiante comprise entre 18-24 °C., les graines utilisées proviennent de l'ITGC. Pendant cette phase de croissance, les plantes sont arrosées à 90 % de leur capacité de rétention afin de préserver les éléments nutritifs et surtout de maintenir les métaux dans le sol et éviter les fuites. Le volume d'eau ajouté est fonction de la capacité de rétention en eau du sol et du besoin en eau de la plante. Durant la période de culture toutes les plantes sont arrosées avec de l'eau. La quantité d'eau à ajouter est déterminée après pesée de l'ensemble pot + sol + plante.

Après une semaine de culture, on prélève trois pots pour chaque concentration de Zinc,

La partie racinaire est séparée de la partie aérienne en sectionnant la plante au niveau du bulbe

racinaire. La partie aérienne est séparée en feuilles. Le matériel végétal est séché à 40°C pendant 72 heures puis broyé au mortier (porcelaine).

On procède à la digestion afin de déterminer la teneur en métal dans la plante.

L'opération est répétée après 2-3- 4 semaines de culture.

2.7.2 *L'Hordeum vulgare (orge)*

Il a été planté le 19 Octobre 2009 et cultivé le 19 Novembre 2009 dans les mêmes conditions que le Ray Gras avec une température comprise entre 14-23 °C.

2.8. Détermination des teneurs en métaux

La teneur en métal dans les différentes parties de la plante (racine, feuille) est déterminée après digestion acide. On introduit dans les réacteurs en verre 1g de matériel végétal sec et 10 mL de HNO₃ à 69%. La mise en solution se fait en suivant un programme en température : 200°C pendant 30 mn. Les minéralisats sont ensuite ramenés à un volume final de 50 mL, avec de l'eau distillée. Les métaux sont analysés par SAA.

2.9 Détermination des paramètres de croissance

Après la culture de l'orge, nous avons procédé à la détermination des paramètres de croissance à savoir : la longueur des feuilles, la longueur des racines, le poids sec de la biomasse (racines et feuilles). Le poids sec est déterminé après séchage de la biomasse pendant 72 heures à 40 °C

2.10 Détermination du coefficient de bioaccumulation

Le mot « bioconcentration » désigne le phénomène qui pour une substance donnée (oligoélément, polluant, radionucléide...) va engendrer des concentrations dans les êtres vivants supérieures aux concentrations présentes dans le milieu. Ceci est dû à une absorption à partir du milieu supérieure à l'élimination.

Le « *Facteur de bioconcentration* » ou (FBC ou BCF en [anglais](#)) désigne le rapport entre concentration du composé chimique ([métal lourd](#) par exemple) dans l'organisme vivant et celle dans le milieu (eau/air/sol). Ce facteur permet d'établir la [bioaccumulation](#). Par exemple : les [moules](#) sont des espèces bioaccumulatrices qui peuvent bioconcentrer des molécules de l'environnement à des teneurs de plusieurs centaines de milliers de fois supérieures à celles qui sont mesurées dans l'eau. Les champignons font de même pour de nombreux métaux lourds dans le sol, et les lichens ou les mousses peuvent bioconcentrer des polluants de l'air (éléments traces métalliques tels que le mercure, le cadmium ou le plomb).

Le coefficient de bioaccumulation est décrit comme étant

$$CB = \frac{C_{MLP}}{C_{MLS}} \quad (1)$$

C_{MLP} : Concentration des métaux lourds dans la plante

C_{MLS} : Concentration des métaux lourds dans le sol

2.11 Détermination du facteur de translocation

La présence de métaux dans les différentes parties de la plante indique qu'il y a accumulation mais aussi translocation vers les parties aériennes, c'est-à-dire transport de ces éléments des racines vers les parties aériennes. L'accumulation et la translocation peuvent être évaluées par deux paramètres : le facteur de translocation et le facteur de bioaccumulation.

Le facteur de translocation (FT) est utilisé pour évaluer les capacités de phytoextraction des plantes, plus particulièrement il indique la capacité de la plante de transférer le métal de la racine vers la feuille, il est calculé comme suit :

$$FT = \frac{T_{PA}}{T_{PR}} \quad (2)$$

T_{PA} : teneur en métal dans les parties aériennes ($\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$)

T_{PR} : teneur en métal dans les parties racinaires ($\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$)

2.12 Détermination de l'indice de tolérance

L'indice de tolérance est exprimé à partir des paramètres de croissance en incluant la longueur des racines, la longueur des feuilles, le poids sec des racines, le poids sec des feuilles.

IT est calculé selon Wilkins (1978) :

$$IT = 100 \times \frac{LF_{SC}}{LF_{ST}} \quad (3)$$

LF_{SC} : longueur des feuilles dans le sol contaminé

LF_{ST} : longueur des feuilles dans le sol témoin

ou

$$IT = 100 \times \frac{LR_{SC}}{LR_{ST}} \quad (4)$$

LR_{SC} : longueur des racines dans le sol contaminé

LR_{ST} : longueur des racines dans le sol témoin

Ou

$$IT = 100 \times \frac{PSR_{SC}}{PSR_{ST}} \quad (5)$$

Ou

PSR_{SC} : poids sec des racines dans le sol contaminé

PSR_{ST} : poids sec des racines dans le sol témoin

$$IT = 100 \times \frac{PSF_{SC}}{PSF_{ST}} \quad (6)$$

PSF_{SC} : poids sec des feuilles dans le sol contaminé

PSF_{ST} : poids sec des feuilles dans le sol témoin

3. Résultats et Discussions

3.1. Caractérisation du sol

3.1.1 Propriétés physico-chimiques

La caractérisation physico- chimique du sol a été effectuée en suivant les protocoles normalisés. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 3 1.

Les résultats de granulométrie mettent en évidence que l'échantillon de sol est principalement composé de limon et d'argile. Si l'on se réfère à un diagramme de texture (Baize, 2000), il est classé limono-argileux.

Il présente un pH peu basique, une teneur faible en carbone organique.

Le tableau 1 décrit les propriétés physico-chimiques de l'échantillon du sol

Tableau 3 1 .Propriétés physico-chimiques de l'échantillon du sol

Paramètres	Unités	Sol
Argile (< 2 μm)	g. kg^{-1}	33,27
Limon fin (2/20 μm)		25,31
Limon grossier (20/50 μm)		18,62
Sable fin (50/200 μm)		15,56
Sable grossier (200/2000 μm)		7,79
pH _{eau}		8,12
pH _{KCl}		7,8
CEC	Méq / 100g	20,55
Carbone organique (CO)		1.25
N total		0,13
Ca ²⁺		15,6
Mg ²⁺		2,35
Na ⁺		0,18
K ⁺		1,2
CaCO ₃		5,25
P ₂ O ₅		21,06
Zn	mg. Kg^{-1}	72
Cd		0

3.1.2. Teneur en métaux dans le sol

Les teneurs du Zinc et Cadmium dans le sol ont été déterminées par la SAA. Les résultats sont les suivants :

$$\text{Cd} = 0 \text{ ppm}$$

$$\text{Zn} = 72 \text{ ppm}$$

Les teneurs en Zn et Cd se trouvent dans la gamme des valeurs couramment observées dans les sols non contaminés.

Nous vérifions ainsi que, conformément aux raisons du choix du site de prélèvement, cet échantillon de sol n'a pas été contaminé par des apports anthropiques.

Etude 1 : Effet du Zinc sur le Ray Grass

3.2. Suivi de la teneur en Zinc des racines et des feuilles du Ray Grass en fonction du temps

Le suivi de la concentration du Zinc dans les racines a été effectué en fonction du temps et représenté par la figure 3.1.

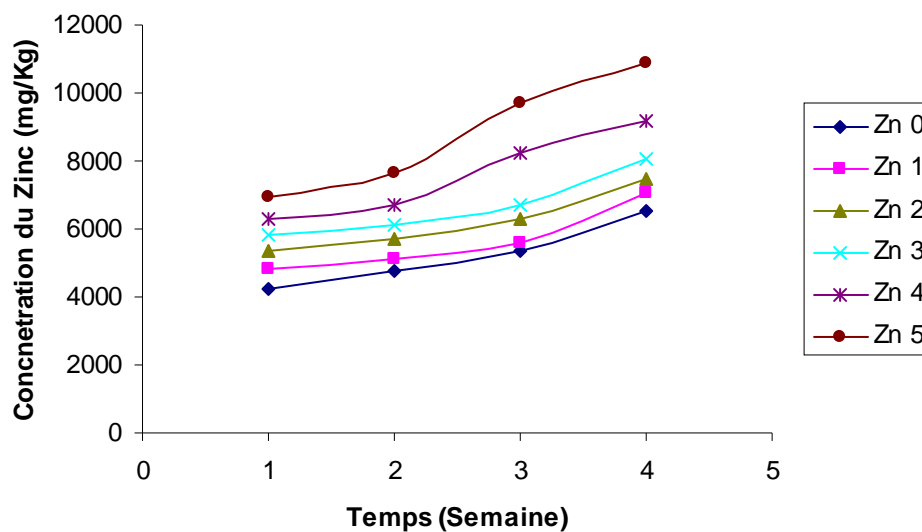


Fig .3.1: Evolution de la teneur en Zinc dans les racines en fonction du temps (Température ambiante)

Nous constatons que la teneur en zinc dans les racines et les feuilles du Ray Grass augmente en fonction du temps.

3.3 Suivi de la teneur en zinc dans les racines et les feuilles de Ray Grass en fonction de la teneur en zinc dans le sol

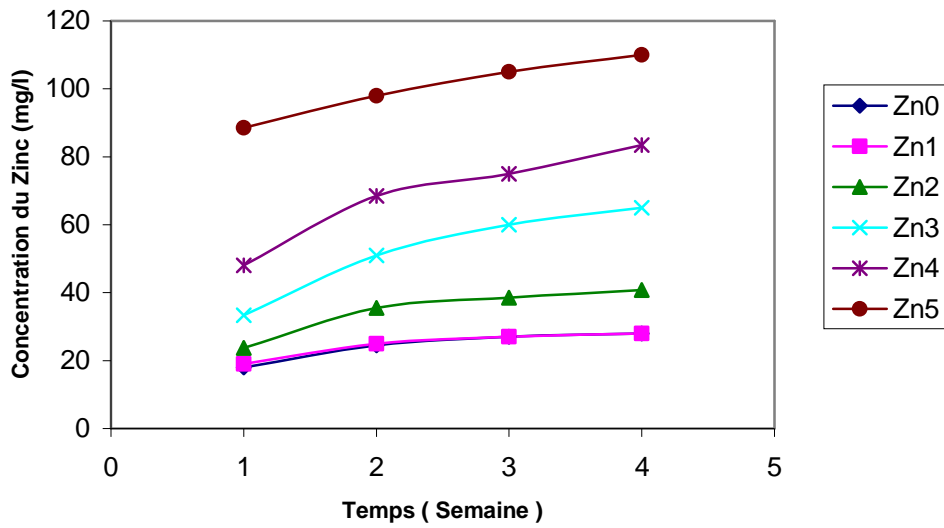


Fig. 3.2 Evolution de la teneur en Zinc dans les feuilles en fonction du temps

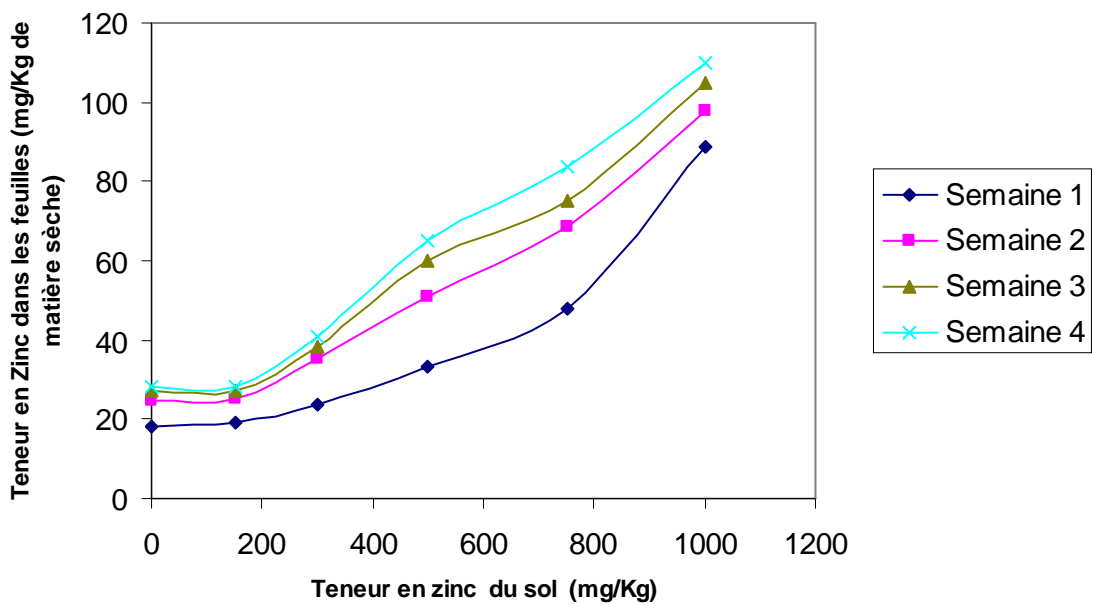


Fig. 3. 3: Evolution de la teneur en Zinc dans les feuilles du Ray Grass en fonction de la concentration du sol contaminé

Les figures 3.2 et 3.3 montrent que la teneur en zinc dans les racines et dans les feuilles du ray gras augmentent avec la teneur du zinc dans le sol dans lequel elle est cultivée.

On dira donc que le Ray Grass accumule le zinc dans les parties aériennes en fonction de la teneur du zinc dans le sol. Par conséquent et en se référant à la bibliographie, on classera le ray gras comme étant une espèce indicatrice.

Nous constatons également qu’après 4 semaines de culture, il n’y a pas de différence apparente de développement entre les plantes cultivées dans le sol témoin (non contaminé) et celles cultivées dans les sols contaminés par le zinc.

3.4 Teneur et accumulation du Zinc dans le Ray Gras

Le tableau 3.2 donne les valeurs des facteurs de bioaccumulation et de translocation.

Tableau 3.2 : Facteur de Bioaccumulation et Facteur de translocation

contamination par Zn en (mg/kg)	Zn cumulé (mg/kg)		FBC		FT x 100
	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	
0 (témoin)	6500	28			0,4308
150	7050	28	47,0000	0,1867	0,3972
300	7450	40,8	24,8333	0,1360	0,5477
500	8050	65	16,1000	0,1300	0,8075
750	9200	83,5	12,2667	0,1113	0,9076
1000	10875	110	10,8750	0,1100	1,0115

L’accumulation dans les racines est en moyenne 160 fois plus importante que celle dans les feuilles. Nos résultats sont en accord avec ceux de Vernail et al. qui ont étudié l’accumulation du chrome dans *loium perenne*.

Il y a une bonne accumulation du zinc au niveau des racines mais cette accumulation n’est pas suivie d’une bonne translocation vers les parties aérienne d’où le facteur de translocation est très faible. Les résultats du tableau 3.2 nous révèlent que le facteur de bioconcentration décroît avec la teneur en zinc dans le sol, ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par Ghosh et al. (2005).

Etude 2 : Effet du Zinc et du Cadmium sur l'Orge

3.5 Effets des métaux sur la croissance de l'orge

3.5.1 Effets du zinc sur la croissance de l'orge

Le tableau 3.3 présente les résultats relatifs à la longueur des racines et des feuilles ainsi qu'au poids sec des racines et des feuilles à la suite d'une contamination par le zinc.

Tableau 3. 3 : Effet de la contamination par le zinc sur la longueur et le poids sec des racines et des feuilles de l'orge

Contamination Par Zn (mg/kg de sol)	Longueur des racines (cm)	Longueur des feuilles (cm)	Poids sec des racines (g)	Poids sec des feuilles (g)	Biomasse Totale (g)
0 (témoin)	20,95 ± 1,52	21,25 ± 1,30	0,1444 ± 0,0015	0,5202 ± 0,0047	0,6646 ± 0,0031
500	20.40 ± 1,30	20,83 ± 1,40	0,1293 ± 0,0009	0,5234 ± 0,0038	0,7164 ± 0,0024
1000	19,98 ± 1,25	20,66 ± 1,52	0,1425 ± 0,0012	0,5497 ± 0,0042	0,6922 ± 0,0027
2000	19.60 ± 1,37	19,77 ± 1, 31	0,1618 ± 0,0018	0,6396 ± 0,0034	0,6679 ± 0,0026
3000	19,48 ± 1,38	19,73 ± 1,35	0,1445 ± 0,0026	0,5546 ± 0,0031	0,6689 ± 0,0029
4000	19,14 ± 1,40	19,65 ± 1,28	0,1295 ± 0,0023	0,4876 ± 0,0051	0,6171 ± 0,0037

La figure 3.4 représente la longueur des racines en fonction de la concentration du Zinc

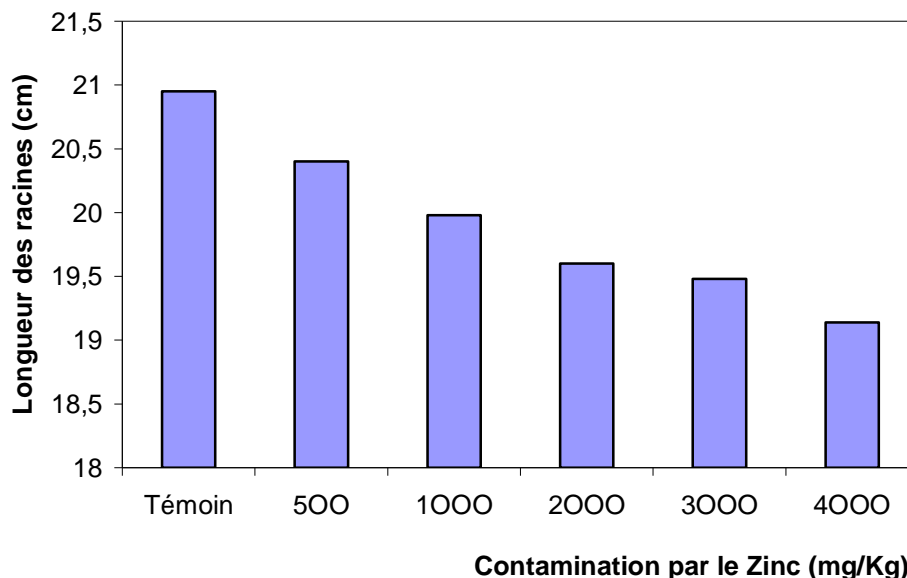


Fig. 3 4: Evolution de la longueur des racines en fonction de la concentration du Zinc

La longueur des racines diminue au fur et à mesure que la concentration du Zinc va augmenter

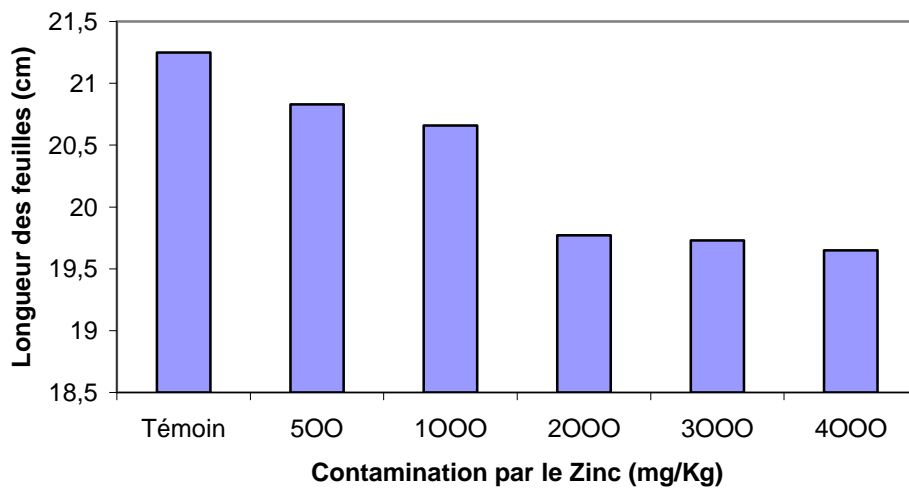


Fig. 3.5 Evolution de la longueur des feuilles en fonction de la concentration du Zinc

La longueur des feuilles augmente avec l'augmentation de la concentration du zinc puis diminue

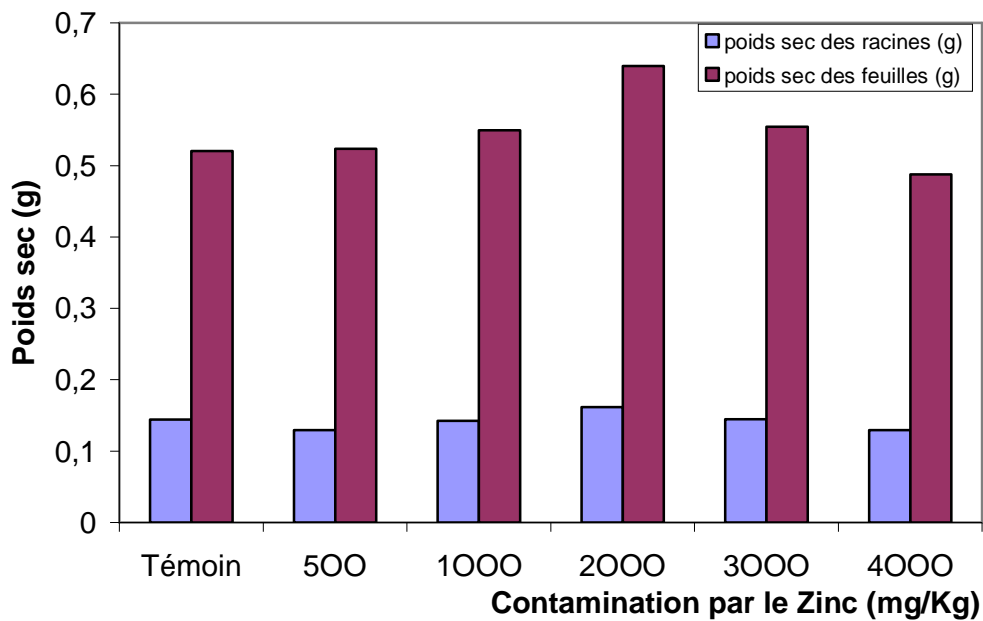


Fig. 3.6 Evolution du Poids sec en fonction de la concentration du Zinc

Même constat que pour le Ray gras après 4 semaines de culture où on observe qu'il n'y a pas de différence apparente de développement entre les plantes cultivées dans le sol

témoin (non contaminé) et celles cultivées dans les sols contaminés par la teneur en zinc malgré que dans présente cette étude, la contamination a atteint une valeur de 4000 mg/Kg.

Nous avons suivi l'évolution des paramètres de croissance, qui sont rapportés par le tableau 3.3, on observe qu'il n'y a pas de différence significative, l'orge se développe aussi bien dans le sol contaminé que dans le témoin, il ne présente aucun signe de stress. Par conséquent, le sol n'a pas d'effet négatif sur la croissance de l'orge cela montre que cette plante est tolérante au Zinc apporté au sol. Ces résultats se concordent avec les travaux de Jean et al.(2007).

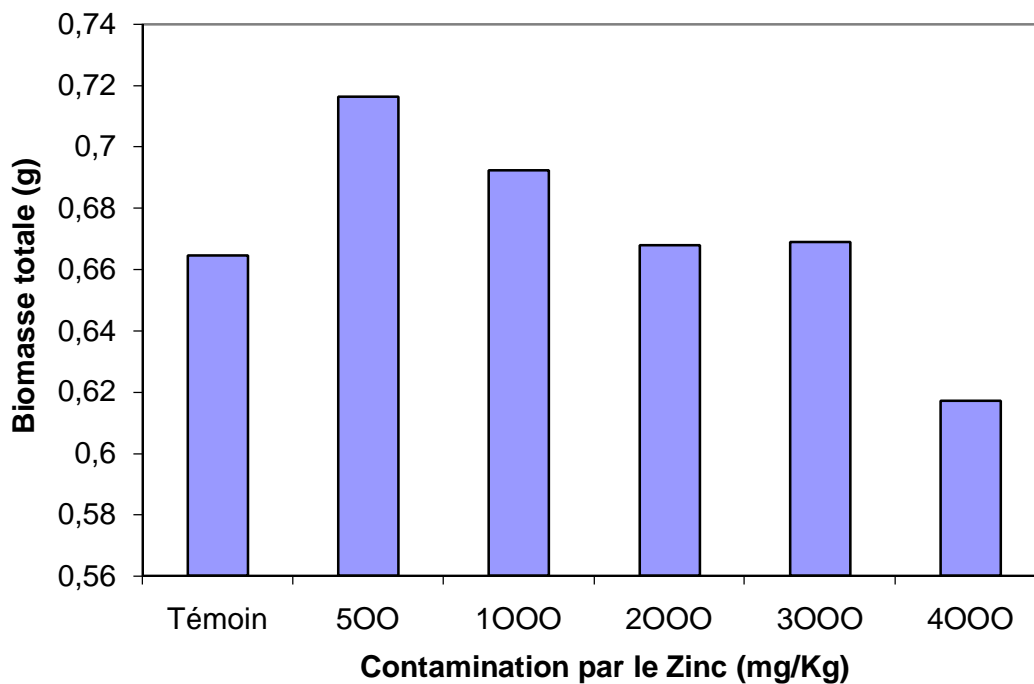


Fig. 3.7. : Evolution de la Biomasse totale en fonction de la concentration du Zinc

En observant la figure 3.7 représentant la biomasse totale récoltée en fonction de la teneur en Zinc du sol contaminé, nous remarquons que pour une concentration de 500 mg/kg la biomasse augmente puis elle diminue avec l'augmentation de la teneur en zinc dans le sol

3.5.2 Effets du cadmium sur la croissance de l'orge

A la suite d'une contamination par le cadmium, le tableau 3.4 nous indique la biomasse totale ainsi que la longueur des racines et des feuilles.

Tableau 3.4 : Effet de la contamination par le cadmium sur la longueur et le poids sec des racines et des feuilles de l'orge

Contamination par Cd (mg/kg de sol)	Longueur des racines (cm)	Longueur des feuilles (cm)	Poids sec des racines (g)	Poids sec des feuilles (g)	Biomasse Totale (g)
0 (témoin)	19,53 ± 1,30	22,00 ± 1,40	0,1234 ± 0,0021	0,4641 ± 0,0031	0,5875 ± 0,0026
25	18,50 ± 1,20	21,16 ± 1,30	0,1204 ± 0,0035	0,4488 ± 0,0028	0,5808 ± 0,0032
50	18,24 ± 1,50	20,67 ± 1,30	0,1320 ± 0,0028	0,4245 ± 0,0038	0,5715 ± 0,0033
100	17,45 ± 1,20	19,87 ± 1,35	0,1271 ± 0,0017	0,4443 ± 0,0042	0,5449 ± 0,0034
200	16,03 ± 1,30	19,18 ± 1,35	0,1163 ± 0,0019	0,4191 ± 0,0049	0,5354 ± 0,0034

L'évolution de la longueur des racines et des feuilles en fonction de la concentration du Cadmium sont respectivement représentées les figures 3.8 et 3.9.

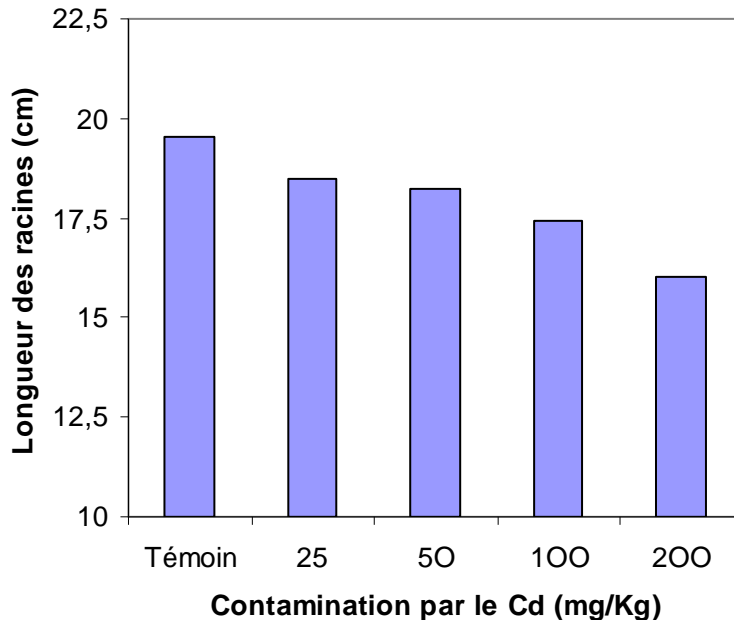


Fig. 3 8 Evolution de la longueur des racines en fonction de la concentration du Cadmium

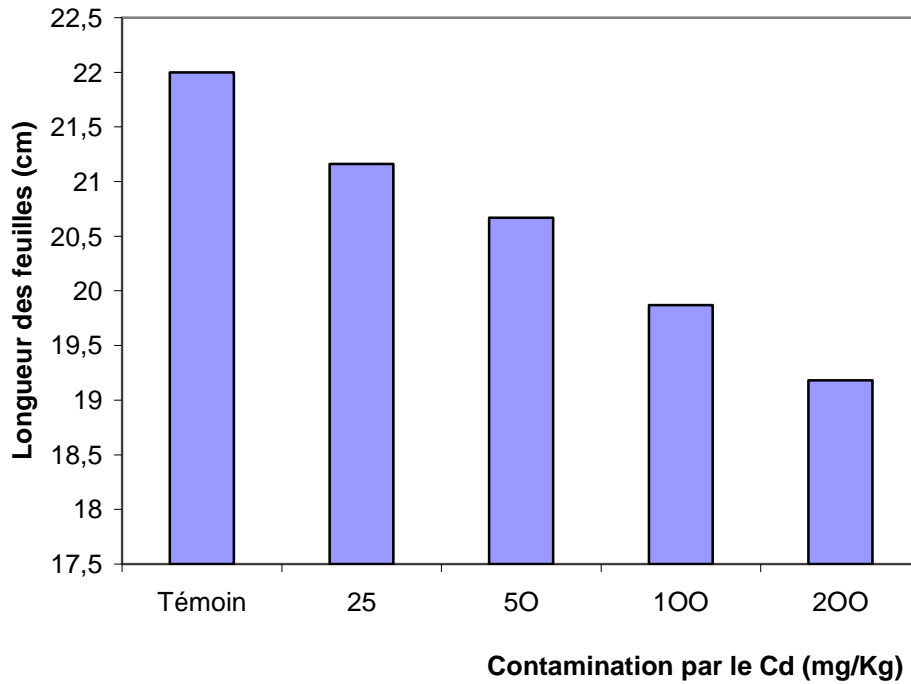


Fig. 3.9 : Evolution de la longueur des feuilles en fonction de la concentration du Cadmium

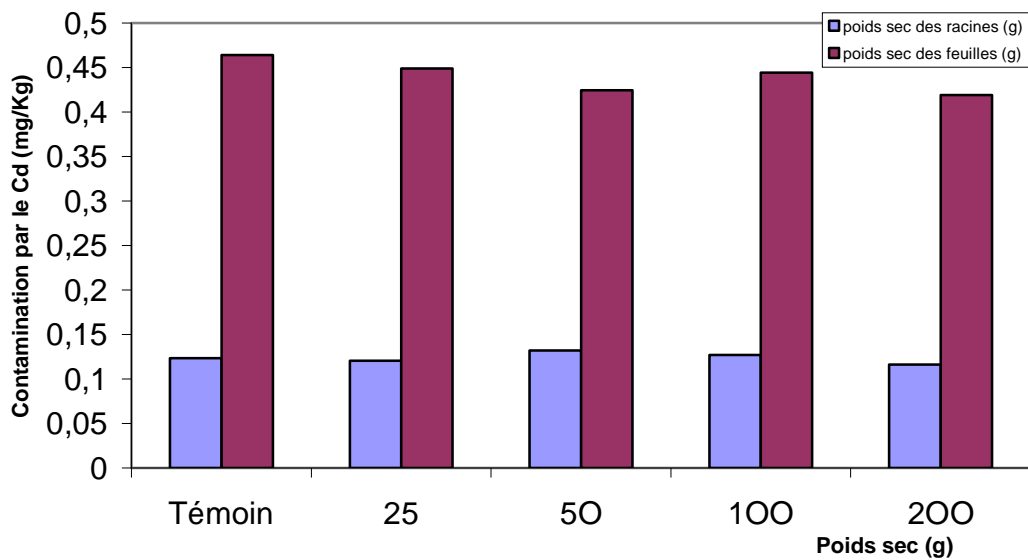


Fig. 3.10 : Contamination par le Cadmium en fonction du Poids sec

Même constatation que pour le Zinc, l'orge tolère le cadmium même jusqu'à 200 mg de cadmium par Kg de sol, il ne présente aucun signe de stress par contre on constate une légère baisse de la biomasse totale

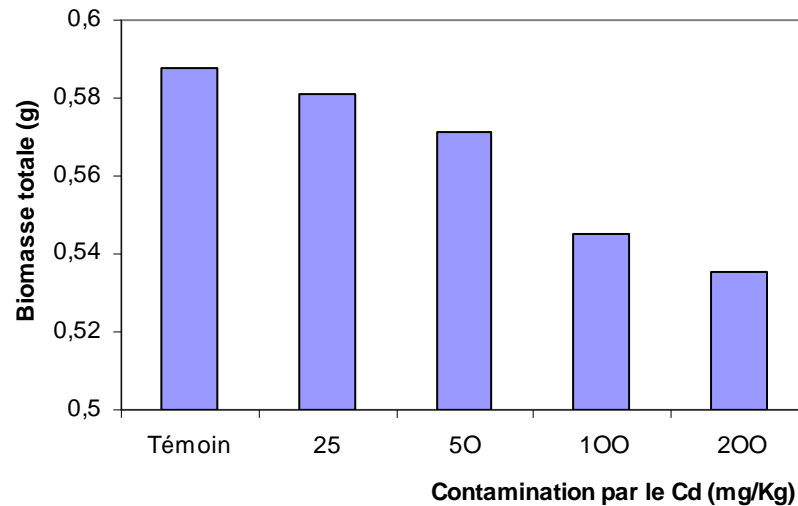


Fig. 3.11. : Evolution de la Biomasse totale en fonction de la concentration du Cadmium

Par contre, la figure 3.11 représentant la biomasse totale récoltée dans chaque pot, nous observons une décroissance de la biomasse totale en fonction de la teneur du sol

3.6 Suivi de la teneur du Zinc et du Cadmium dans l'orge

3.6.1 Teneur et accumulation du Zinc dans l'orge

Après la digestion des racines et des feuilles de l'orge en suivant le protocole cité précédemment, nous avons procédé à l'analyse du zinc dans les racines et les feuilles de la plante récoltée, les résultats sont représentés sur le tableau 3.5, ces résultats nous ont permis de déterminer les facteurs de bioconcentration et les facteurs de translocation pour chaque teneur en zinc du sol contaminé, les résultats sont également représentés dans le tableau 3.5.

Les figures 3.12 et 3.13

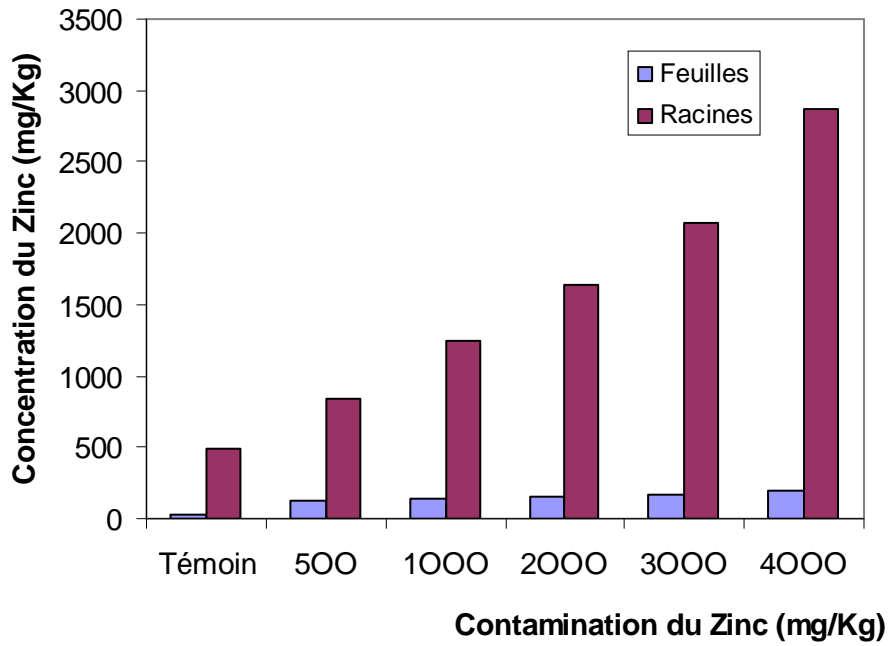


Fig. 3.12 Evolution de la concentration du Zinc en fonction de la contamination du Zinc

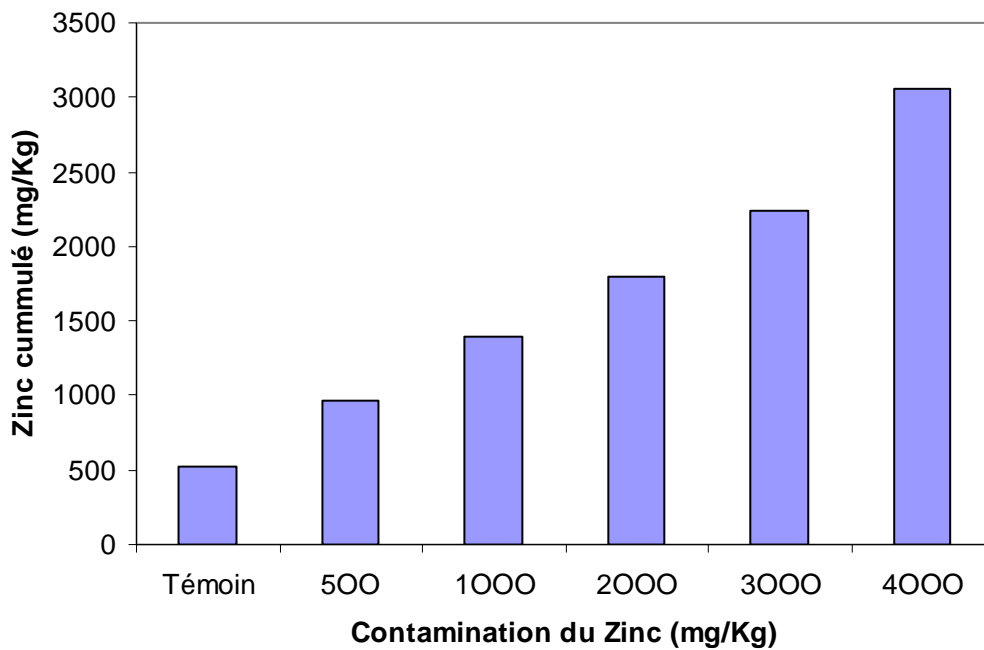


Fig. 3.13. Evolution du Zinc cumulé en fonction de la contamination du Zinc

Tableau 3.5 : Facteur de Bioaccumulation et Facteur de translocation de l'orge (Zinc)

Contamination par Zn en (mg/kg)	Zn cumulé (mg/kg)		FBC (%)		FT x 100
	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	
0(temoin)	490	60	-	-	12,25
500	845	120	1,6900	0,24	14,20
1000	1245	145	1,2450	0,14	11,65
2000	1640	155	0,8200	0,08	9,45
3000	2070	165	0,6900	0,06	7,97
4000	2870	190	0,7175	0,0475	6,62

Nous remarquons également que la teneur en Zinc dans les racines et les feuilles augmente avec la teneur du métal dans le sol. Nous constatons que le BCF décroît avec la contamination du sol.

3.6.2 Teneur et accumulation du Cadmium dans l'orge

Nous avons procédé de la même manière que pour le zinc, les résultats sont présentés dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Facteur de Bioaccumulation et Facteur de translocation de l'orge (Cadmium)

Contamination par Cd en (mg/kg)	Cd cumulé (mg/kg)		FBC (%)		FT x 100
	Racines	Feuilles	Racines	Feuilles	
0 (temoin)	0	0			
25	41,68	3,82	1,6672	0,15	9,17
50	80,9	6,83	1,6180	0,14	8,44
100	156,26	14,87	1,5626	0,15	9,52
200	280,7	28,55	1,4035	0,14	10,17

La Biomasse totale des racines et des feuilles ne change pas d'une manière significative, soit une moyenne de 6.26 % pour les feuilles et 10.33% pour les racines. Ceci est en accord avec les résultats de Vernail et al qui ont démontré que la biomasse des racines est plus sensible que celle des feuilles à la contamination par les métaux.

Wong et al. ont rapporté que les feuilles continuent à pousser alors que la poussée des racines est fortement inhibée.

Nos résultats se concordent avec ceux trouvés dans la littérature. En effet, Gleeson et al. ont trouvé dans leur étude de phytoextraction du plomb que la différence de biomasse entre la plante cultivée dans un sol pollué et la plante témoin devient significative à partir de 6000 mg/Kg, voir même des malformations des racines à 10 000 mg/Kg

Conclusion

La capacité d'accumulation des métaux varie d'une espèce à une autre selon certaines conditions. L'accumulation des métaux au niveau des racines est plus importante que celle des feuilles.

Des études antérieures ont révélé que les plantes peuvent souffrir d'effets toxiques si le sol atteint une teneur importante en métaux soit 8 mg/ kg dans le cas du cadmium

Certaines études se sont basées sur la détermination de la biomasse des racines et la biomasse des feuilles pour évaluer la toxicité du métal dans les plantes. Certains auteurs ont rapporté que la poussée des racines est plus sensible à celle des feuilles et se basent donc sur la longueur des racines pour étudier la toxicité, dans notre cas les résultats ont montré que la biomasse est un meilleur indicateur de la toxicité que la longueur des racines.

Les résultats de cette étude montrent que l'orge est tolérant au stress du cadmium et il a résisté même à une teneur de 200 mg/Kg de sol.

Nous notons également qu'il est tolérant au zinc, nous n'avons observé aucun signe de stress apparent même à 4000 mg/Kg de sol. Le ray gras est tolérant au Zinc et ne présente aucun signe de stress après 4 semaines de culture dans des sols contaminés par ce métal.

Le facteur de bioaccumulation est un excellent indicateur de la capacité d'accumulation des métaux par les plantes car il tient compte de la teneur en métal dans le sol. Une bonne plante accumulatrice doit avoir un FBC > 1000.

Dans notre cas, le FBC racines maximum que nous avons obtenu est de 166.72 % pour une teneur de 25 mg/ Kg pour le cadmium et de 169 % pour une teneur de 500 mg/Kg de zinc dans le cas de l'orge. Et pour le ray gras, le FBC racines est de 4700 % pour une teneur de 150 mg/Kg de zinc mais le FBC dans les feuilles est de 18.67 % étant donné que le facteur de translocation est trop faible donc le métal reste au niveau des racines il n'est pas transféré aux parties récoltables qui sont les plus intéressantes pour la phytoextraction.

Nous ne pouvons donc qualifier nos deux espèces de plantes accumulatrices.

Nous concluons par cette étude que même un sol qui présente une flore diversifiée peut être un sol contaminé par les métaux lourds et que les espèces qui poussent sur ce sol sont tout simplement des espèces tolérantes aux fortes teneurs aux métaux, il faut donc s'intéresser encore plus à la pollution du sol surtout qu'elle n'est pas apparente et veiller à ce que les sites contaminés ne soient pas cultivés qu'après décontamination afin de préserver la santé humaine.

- [1] Baize, D., Teneurs en éléments traces métalliques dans les sols (France) 1997, INRA Editions Paris, 408 p.
- [2] Mirghaffari, N., Décontamination des Solutions Contenant des Métaux Lourds par des Déchets Forestiers ou Agricoles. Géoscience et Environnement 1998. Nancy: Institut National Polytechnique de Lorraine, 119 p.
- [3] Boisset, M.C. . *Effets toxiques majeurs du cadmium chez l'animal et l'homme*. In: CSHPF. Plomb, Cadmium et Mercure dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. 1996 Tec et Doc. Paris: Lavoisier, pp 236.
- [4] Boisset, M.C. and Narbonne J. F., *Effets subcellulaires et systèmes sensibles*. In: CSHPF. Plomb, Cadmium et Mercure dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. 1996 Tec et Doc. Paris: Lavoisier, pp. 236.
- [5] Keller, C., Hammer D., Kayser A., Richner W., Brodbeck M. and Sennhauser M., .Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. 2003, *Plant and Soil*, 249, pp 67-81.
- [6] Edwards, S. C., Macleod C. L. and Lester J. N. , The bioavailability of copper and mercury to the common nettle (*Urtica dioica*) and the earthworm *Eisenia fetida* from contaminated dredged soil, 1998, *Water, Air and Soil Pollution*, 102, pp 75-90.
- [7] Adriano D. C., Wenzel W. W., Vangronsveld J. and Bolan N. S., Role of assisted natural remediation in environmental cleanup 2004, *Geoderma*, 122, 2-4, pp121-142.
- [8] Chaudri A. M., Lawlor K., Preston S., Paton G. I., Killham K. and Mcgrath S. P. , .Response of a *Rhizobium*-based luminescence biosensor to Zn and Cu in soil solutions from sewage sludge treated soils, 2000 *Soil Biology and Biochemistry*, 32, pp 383-388.

- [9] Ramade, F., *Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement*. 2002 Paris: Dunod, , 1075 p.
- [10] Rucinska, R., Waplak S. and Gwozdz E. A., Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead, 1999. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37, 3, pp 187-194.
- [11] Giller, K. E., Witter E. and Mcgrath S. P. ., Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review, 1998 *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 10/11 pp 1389-1414.
- [12] Bolan, N. S., Adriano, D. C., Duraisamy, P., Mani, A. and Arulmozhiselvan, K., Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. I. Effect of phosphate addition. 2003 *Plant and Soil*, 250 pp 83-94.
- [13] Balestrasse, K. B., Gallego, S. M. and Tomara M. L., Cadmium-induced senescence in nodules of soybean (*Glycine max* L.) plants 2004, *Plant and soil*, 262 pp 373-381.
- [14] Wang, X. F. and Zhou Q.-X., Ecotoxicological effects of cadmium on three ornamental plants, 2005, *Chemosphere*, , 60 pp 16-21.
- [15] Fosmire, G. J., Zinc toxicity, 1990. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51, 2 pp 225-227.
- [16] Chen, C.-J. and Liao, S.-L., Zinc toxicity on neonatal cortical neurons: involvement of glutathione chelation, 2003. *Journal of Neurochemistry*, 85, 2 pp 443-453.
- [17] Blanchard, C., Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués, Thèse : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon. 2000
- [18] Chaignon, V., Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides, 2001. Thèse : Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille.

- [19] Delmas-Gadras, C., Influence des conditions physico-chimiques sur la mobilité du plomb et du zinc dans un sol et un sédiment en domaine routier, 2000. Thèse : Université de Pau et des pays de l'Adour, U.F.R. Sciences.
- [20] Adriano D. C., Wenzel W. W., Vangronsveld J. and Bolan N. S., Role of assisted natural remediation in environmental cleanup, 2004. *Geoderma*, 122, 2-4, pp121-142.
- [21] Janssen, P.H., Yates, P.S., Grinton, B.E., Taylor, P.M. and Sait, , Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia , 2002. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: pp 2391-2396.
- [22] McLaughlin, M.J., Zarcinas, B.A., Stevens, D.P., Cook, N., Soil testing for heavy metals, 2000. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31 (11-14), pp 1661-1700.
- [23] Kabata-Pendias, A. and Pendias, H. ,2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press, London.
- [24] Lespagnol, G., Lixiviation du Chrome, du Cuivre et de l'Arsenic (CCA) à partir de sols contaminés sur des sites de traitement du bois, 2003. Thèse : Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Université Jean Monnet.
- [25] Duchaufour P. *Introduction à la science du sol*. Paris: Dunod, 2001, 331 p.
- [26] Sigg L., Behra P., Stumm W.,. Chimie des milieux aquatiques - Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement, 2000, 3^{ème} Edition, Dunod, Paris, 592 p.
- [27] Deneux-Mustin, S., Roussel-Debet, S., Mustin, C., Henner, P., Munier-Lamy, C., Colle, C., Berthelin, J., Garnier-Laplace, J., Leyval, C.,. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol 2003. TEC & DOC, Paris.
- [28] Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C.,. The Physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1978, 29, pp 511-566.

- [29] Baker, A.J.M., Walker, P.L.,...Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. In: Shaw, J. (Ed.). Heavy Metal Tolerance in plants: Evolutionary aspects. 1990CRC Press, Boca Raton, Florida, , pp 155-178.
- [30] Li X., Thornton I.,...Chemical partitioning of trace and major elements in soils contaminated by mining and smelting activities, 2001*Applied Geochemistry* 16, pp1693-1706.
- [31] Ure, A.M., Quevauviller, PH., Muntau, H., Griepink, B., , Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the commission of the European communities, International Journal of Environmental 1993.*Analytical Chemistry* 51, pp 135-151.
- [32] Menzies N.W., Donn M.J., Kopittke P.M., ,Evaluation of extractants for estimation of phytoavailable trace metals in soils, 2007.*Environmental Pollution*,145, pp121-130.
- [33] Echevarria G., Massoura S.T., Sterckeman T., Becquer T., Schwartz C., Morel J.-L., ,Assessment and control of the bioavailability of nickel in soils, 2006.*Environmental Toxicology and Chemistry* 25 pp 643-651.
- [34] Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. 1979*Analytical Chemistry*, 51 (7) pp 844-851.
- [35] Kersten M., Förstner U., , Speciation of trace elements in sediments and combustion wastes. In: Ure A.M., Davidson C.M. (Eds). 1995,*Chemical speciation in the environment*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, UK pp 234-275.
- [36] Rapin F., Tessier A., Campbell P.G.C., Carignan R., , Potential artifacts in the determination of metal partitioning in sediments by a sequential extraction procedure, 1986, *Environmental Science and Technology* 20 ,pp 836-40.
- [37] Martin J.M., Nirel P., Thomas A.J. Sequential extraction techniques: promises and problems 1987, *Marine Chemistry* 22, pp 313-341.

- [38] Nirel, P.M.V., Morel, F.M.M., Pitfalls of sequential extractions, 1990, *Water Research* 24, pp 1055-1056.
- [39] Tessier A., Campbell P.G.C., Comment on "Pitfalls of sequential extractions" 1991 par Nirel et Morel, *Water Research* 25, pp115-117.
- [40] Rauret G., Lopez-Sanchez J.F., Sahuquillo A., Rubio R., Davidson C., Ure A., Quevauviller P., Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials, 1998, *Journal of Environmental Monitoring* 1, pp 57-61.
- [41] Whalley C., Grant A. Assessment of the phase selectivity of the European Community Bureau of Reference (BCR) sequential extraction procedure for metals in sediment, 1994, *Analytica Chimica Acta* 291, pp 287-295.
- [42] Sahuquillo A., Lopez-Sanchez J.F., Rubio R., Rauret G., Thomas R.P., Davidson C.M., Ure A.M., Use of a certified material trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure, 1998. *Analytica Chimica Acta*, 382, pp317-327.
- [43] Davidson C.M., Urquhart G.J., Ajmone-Marsan F., Biasioli M., da Costa Duarte A., Díaz-Barrientos E., Grcman H., Hossack I., Hursthouse A.S., Madrid L., Rodrigues S., Zupan M., Fractionation of potentially toxic elements in urban soils from five European cities by means of a harmonised sequential extraction procedure, 2006, *Analytica Chimica Acta* 565 pp 63-72.
- [44] Chen Y.X., Lin Q., Luo Y.M., He Y.F., Zhen S.J., Yu Y.L., Tian G.M., Wong M.H., The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil, 2003, *Chemosphere* 50 pp 807-811.
- [45] Levitt, J., Responses of plants to environmental stresses, 1980. Volume II: Water, radiation, salt, and other stresses. Academic Press, New York.

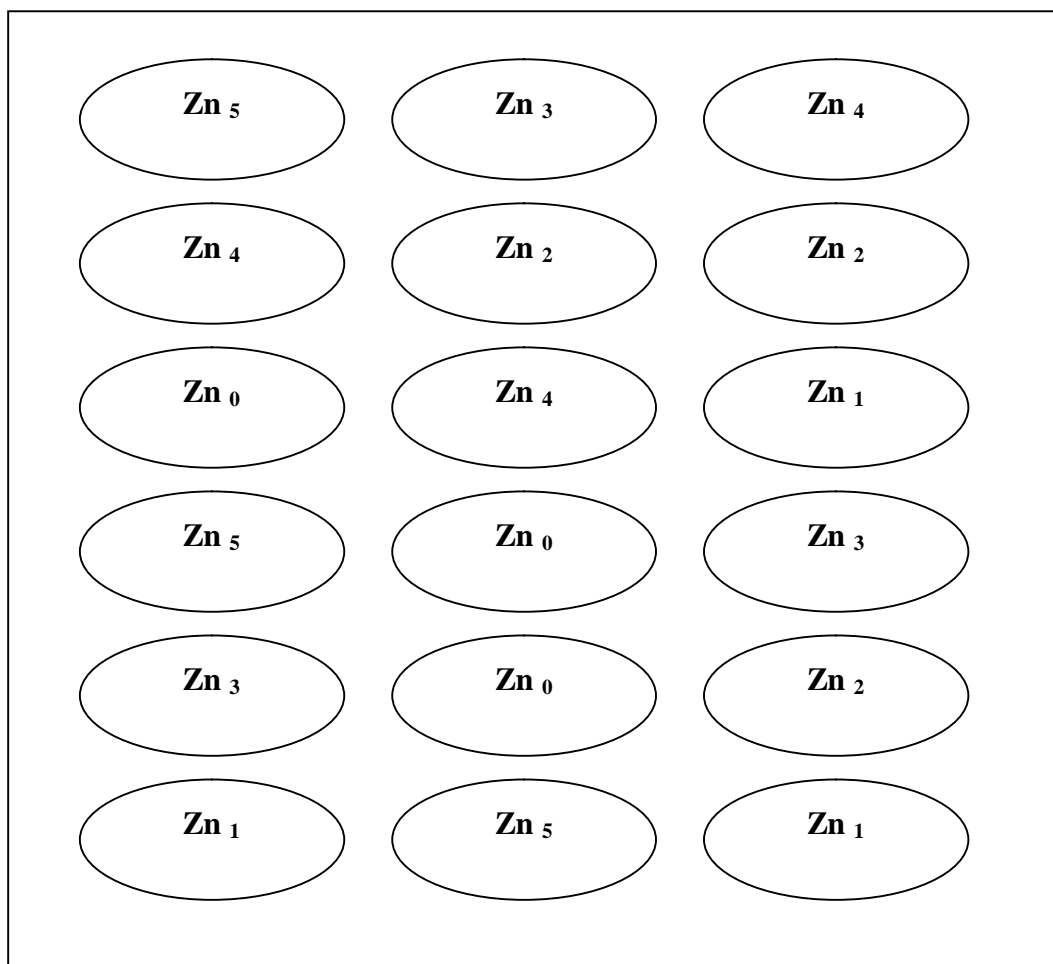
- [46] Rengel, Z., Heavy Metals as Essential Nutrients,. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, 1999,pp. 231-251.
- [47] Briat, J.F., Lebrun, M.,. Plant responses to metal toxicity. Plant Biology and Pathology, 1999, 322, pp 43-54.
- [48] Greger, M.,. Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, 1999, pp. 1-27.
- [49] Sanita Di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. Environmental and Experimental Botany 41, pp105-130.
- [50] Alloway, B.J., Soil processes and the behaviour of heavy metals. In: Alloway, B.J. (Ed.). 1995. Heavy metals in soils. Chapman & Hall, London, pp. 11-35.
- [51] Foy, C.D., Chaney, R.L., White, M.C.,. The Physiology of metal toxicity in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 1978,29, pp511-566.
- [52] Brooks, R.R.,. Biogeochemistry and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.). Plants that hyperaccumulate heavy metals. CABI Publishing, Wallingford,1998, pp. 95-118.
- [53] Boyd, R.S.,. Hyperaccumulation as a plant defensive strategy. In: Brooks, R.R. (Ed.). Plants that hyperaccumulate heavy metals. CABI Publishing, Wallingford, 1998,pp. 181-200.
- [54] Devi, S.R., Prasad, M.N.V., Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. 1999 In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, pp. 99-116.
- [55]Dietz, K.J., Baier, M., Kramer, U.,. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants 1999. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, ,pp. 73-97.

- [56] Cheng, S., Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. 2003, Environmental Science and Pollution Research, 10 (4), pp 256-264.
- [57] Lasat, M.M., Phytoextraction of toxic metals: A Review of Biological Mechanisms. Journal of Environmental Quality 2002, 31, pp 109-120.
- [58] Meharg, A.A., The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. Physiologia Plantarum 1993, 88, pp 191-198.
- [59] Eide, D., Broderius, M., Fett, J., Guerinot, M.L., A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences 1996 USA 93, pp 5624-5628.
- [60] De Vos, C.H.R., Vonk, M.J., Vooijs, R., Schat, H., Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus* 1992. Plant Physiology, 98, pp 853-858.
- [61] Noctor, G., Foyer, C.H., Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology 1998, 49, pp 249-279.
- [62] Foyer, C.H., Noctor, G., Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. New Phytologist 2000, 146, pp 359-388.
- [63] Murphy, A., Taiz, L., Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. Plant Physiology 1995, 109, pp 945-954.
- [64] Misra, S., Gedamu, L., Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum* plants. Theoretical and Applied Genetics 1989, 78, pp 161-168.
- [65] De Knecht, J.A., Koevoets, P.L.M., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., Evidence against a role for phytochelatin in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene Vulgaris* (Moench) Garcke. New Phytologist 1992, 122, pp 681-688.

- [66] Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Tarun, A.S., Weber, S.U., Jouanin, L., Terry N., Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing - glutamylcysteine synthetase 1999. *Plant Physiology* 121, pp1169-1177.
- [67] Ma, J.F., Zheng, S.J., Hiradate, S., Matsumoto, H., Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 1997,390, pp 569-570.
- [68] Harrington, C.F., Roberts, D.J., Nickless, G., The effect of cadmium, zinc and copper on growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid, in two strains of the grass *Festuca rubra*. *Canadian Journal of Botany* 1996, 74, pp1742-1752.
- [69] Bert, V., Tolérance aux métaux lourds et accumulation chez *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). 2000. Thèse : Université des Sciences et Technologies de Lille, UFR de Biologie
- [70] Kramer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C., Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. 1996. *Nature* 373, pp 635-638.
- [71] Chardonens, A.N., Koevoets, P.L.M., Van Zanten, A., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiology* 1999,120, pp 779-785.
- [72] Dahmani-muller, H., Van Oort, F., Gelie, B., Balabane, M., Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* 1999,109, pp1-8.
- [73] Salt, D.E., Blaylock M., Kumar P.B.A.N., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet L., Raskin L., Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants, 1995. *Biotechnology* 13, pp 468-474.
- [74] Banzet, N., Richaud, C., Deveaux, Y., Kazmaier, M., Gagnon, J., Triantaphylides, C., Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptative response in tomato cells. 1998. *Plant Journal* 13, 519-527.

- [75] Chaney R.L., Malikz M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., Baker A.J.M., Phytoremediation of soil metals, *Current Opinion in Biotechnology* 1997,8 pp 279-284.
- [76] Raskin I., Smith, R. D. and Salt, D. E. , Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment 1997, *Current Opinion in Biotechnology*, 8, pp 221-226.
- [77] Alkorta I., Hernández-Allica J., Becerril J.M., Amezaga I., Albizu I., Onaindia M., Garbisu C., Chelate-enhanced phytoremediation of soils polluted with heavy metals,2004 b. *Reviews in Environmental Sciences and Bio/Technology* 3 pp55-70.
- [78] Krämer U., Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils, 2005, *Current Opinion in Biotechnology* 16 pp133-141.
- [79] Lasat M.M., Phytoextraction of metal from contaminated soil: a review of plants / soil / metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues, 2000 .*Journal of Hazardous Substance Research* 2 pp1-25.
- [80] Mejare M., Bulow L., Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals, 2001. *Trends in Biotechnology* 19, pp 67-73.
- [81] Clemens S., Palmgren M.G., Krämer U., A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation, 2002.*Trends in Plant Science* 7 pp 309-314.
- [82] Chaney R.L., Malikz M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., Baker A.J.M., 1997. Phytoremediation of soil metals, *Current Opinion in Biotechnology* 8 pp 279-284.
- [83] Baker, A.J.M., Accumulators and excluders: strategies in the response of plants to heavy metals, 1981, *Journal of Plant Nutrition* 3 pp 643-654.
- [84] Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P.. Phytoremediation of heavy metalcontaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction, 2001, *Journal of Environmental Quality* 30 pp 1919-1926.

[85] Mattina M.J.I., Lanucci-Berger W., Musante C., White J.C., Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil, 2003 *Environ Poll* 124 pp375-378.

Annexe 1 : Dispositif de Randomisation (Etude 1)

Zn₀: Control

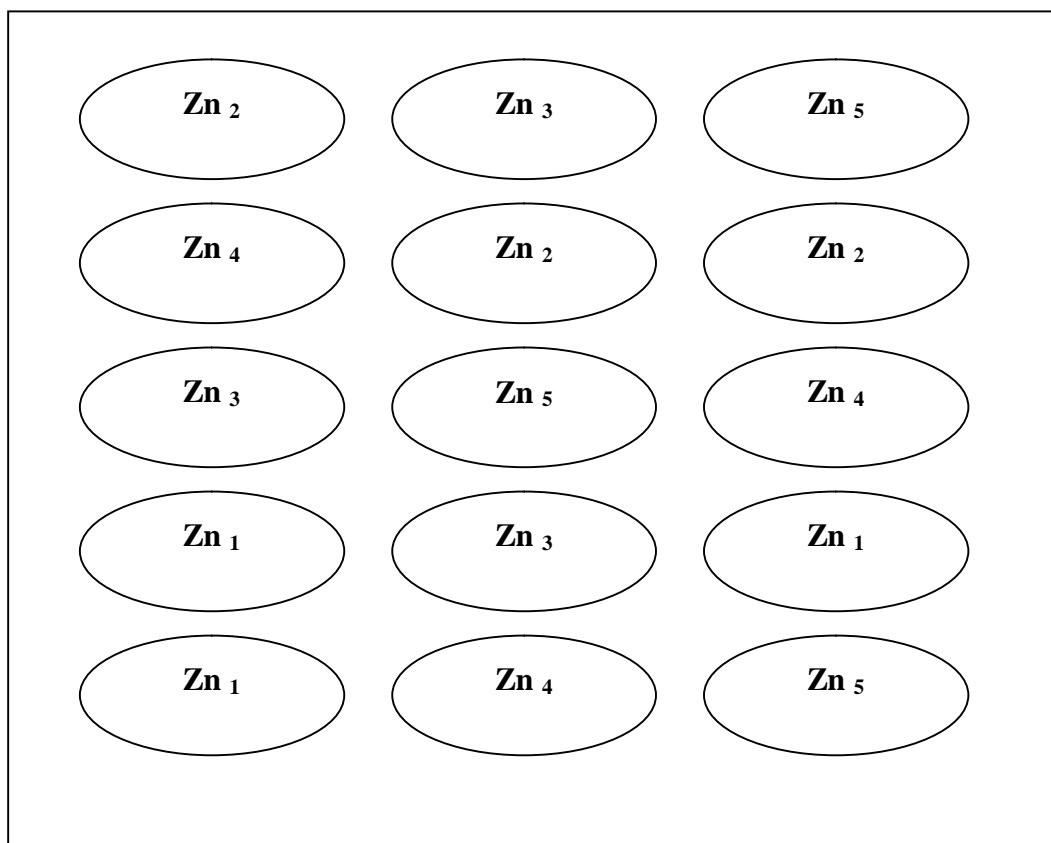
Zn₁: 150 mg/ Kg

Zn₂: 300 mg/ Kg

Zn₃: 500 mg/ Kg

Zn₄: 750 mg/ Kg

Zn₅: 1000 mg/ Kg

Annexe 2 : Dispositif de Randomisation (Etude 2)

Zn₀: Control

Zn₁: 500 mg/ Kg

Zn₂: 1000 mg/ Kg

Zn₃: 2000 mg/ Kg

Zn₄: 3000 mg/ Kg

Zn₅: 4000 mg/ Kg