



*Faculté des sciences
Département de biologie*

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de

*Master en Biologie
Spécialité: Biotechnologie Végétal*

Intitulé :

*Essais Atténuation du stress métallique par une
phytoextraction assisté par un chélateur (Acide
phytique) sur un modèle végétal: l'orge variété Saida*

Présenté par :

- ❖ *M^{elle} Morsli Kheira*
- ❖ *M^{elle} Chadli Fatima*

Soutenue le 30-09-2018 devant le jury composé de :

<i>Mr HACHEM kadda</i>	<i>MCB</i>	<i>Université de Saida</i>	<i>Président</i>
<i>M^{me} HACHEM Yasmina</i>	<i>MCB</i>	<i>Université de Saida</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M^{elle} CHIKHI Amira.</i>	<i>MCB</i>	<i>Université de Saida</i>	<i>Encadreur</i>

Année universitaire 2018-2019

Remerciement :

*Nous tenons tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et
miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce
modeste.*

En second lieu, nous tenons à remercier notre encadreur :

*M^{elle} CHIKHI AMIRA pour son précieux conseil et son aide durant Toute le
période de travaille.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membre de jury pour l'intérêt
qu'ils ont porté a notre recherche en acceptant d'examiner notre travaille et
de l'enrichir par leur proposition*

*Et aussi les ingénieures de laboratoire végétale et laboratoire de chimie a
université de SAIDA- Dr MOLAY TAHER*

*En fin, nous tenons également à remercier toute les personnes qui ont
participé de prés ou de loin à la réalisation de ce travail.*

Kika

DEDICACE :

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde dans son vaste paradis.....à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheurmaman que j'adore.

Aux personnes dont j'ai bien aimé la présence dans ce jour, qui me suivent, me guide, me protège et encouragé, mon bras droit : TOUFIK.B

A tous mes frères et mes sœurs, et mes chères amies

Je dédie ce travail dont le grand plaisir leurs revient en premier lieu pour leurs conseils, aides, et encouragements.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, mes aimables amis, collègues d'étude, et sœur s de cœur

Kika

DÉDICACE

Pour chaque début il y a une fin, et ce qui est beau dans toute fin c'est la réussite et l'atteinte des objectifs

Je dédie ce modeste travail, fruit de très longues années de labeur: A la seule femme de ma vie qui à énormément souffert pour faire de moi ce que je suis et qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui n'a jamais cessé de prier pour moi ,Ma très chère Mère

A mon très cher père, pour ses encouragements, son soutien, surtout pour son amour et son sacrifice afin que rien n'entrave le déroulement de mes études

Je remercie également mon frère jumeau Mohamed, qui se tenait à côté de moi tout au long de mon école de carrière Je remercie ma sœur Khadouj et ma chère amie Rabia

Remerciements	
Dédicace	
SOMMAIRE :	
Résumé	
Abstract	
المخلص	
Liste des abréviations	
Listes des figures	
Liste des tableaux	
Introduction générale.....	01
Chapitre I : synthèse bibliographiques.	
I. Les céréales	04
I.1. Biochimie des céréales.....	04
I.2. Molécules issues du métabolisme primaire	04
I.3. Molécules issues du métabolisme secondaire	04
I.4. Aspect botanique: Historique, Origine, Et la Classification (l'orge). . .	04
I.4.1. morphologie.....	05
I.4.2. Système racinaire.....	05
I.4.3. La tige.....	06
I.4.4. Les feuilles.....	06
I.4.5. L'inflorescence.....	06
I.4.6. Le grain.....	06
I.5. Le cycle de développement.....	06
I.5.1. La période végétative.....	06
I.5.2. La période reproductive :.....	06
II. Les métaux lourds	07
II.1. Le plomb.....	07
II.1.1. Généralités sur le plomb	07
II.1.2. Histoire de l'utilisation du plomb	07
II.1.3. Origines de la pollution par le plomb	08
II.2. Problématique du plomb dans l'environnement	08
II.2.1. Propriétés physico-chimiques du plomb	08
II.2.2. Impact du plomb sur les végétaux	09
II.2.2.1. Absorption du plomb par la plante	09
II.2.2.1.1. Cas de l'absorption foliaire	09
II.2.2.1.2. Mécanismes d'absorption racinaire	10
II.2.2.2 Effets généraux du plomb sur les plantes	10
II.2.2.2.1. Effet sur la germination et la croissance	10
II.2.2.2.2. Effet sur la nutrition minérale	11
II.2.2.2.3. Effets sur les protéines	11
II.2.2.2.4. Effet sur la Photosynthèse	12
II.2.2.2.5. Action sur les activités enzymatiques.....	12
II.2.3 Différentes utilisations du plomb	12

III. stress oxydatif.....	14
III.1. Le stress oxydatif chez les plantes.....	14
III.2. Origine du stress oxydatif	14
III.3. Stratégies développées par les végétaux pour la défense au stress métallique.....	14
III.3. 1. Détoxification des espèces réactives d'oxygène (ERO)	14
III.4. .Mécanismes de tolérance au stress métallique	15
III.4.1. Détoxification et chélation du plomb.....	15
III.4.2. Stratégie d'évitement et de séquestration	15
III.4.3. Chélation et transport du plomb.....	16
III.4.4. Autres systèmes de défense au stress métallique	16
IV. La phytoremédiation.....	17
IV.1. Définition et techniques de phytoremédiation.....	17
IV.2. Nécessité de la dépollution	18
IV.3. Concept de La phytoremédiation	18
V. La Phytoextraction	18
V.1. Avantages et limites de la technique de phytoremédiation	18
VI. L'acide phytique	19
VI.1. Structure chimique et localisation	19
VI.2. Aspects physico-chimiques.....	19
VI.2. Métabolisme.....	20
VI.3. Facteur antinutritionnel et problèmes environnementaux.....	20
VI.4. La teneur AP dans divers aliments.....	20

Chapitre II : matériels et méthodes

II. Matériel et méthodes.....	23
II.1. Le matériel végétal et condition de culture	23
II.1.1. Matériel végétal	23
II.1.2. Condition de l'essai et traitement	23
II.2. Récolte et préparations des plantes pour les analyses ultérieures :	25
II.3. Paramètres étudiés	25
II.3.1. Paramètres morphologiques	25
II.3.1.1. Pourcentage de germination	25
II.3.1.2. Vitesse de germination	25
II.3.2. Paramètres biochimiques.....	26
II.3.2.1. Détermination des concentrations des pigments photosynthétique	26
II.3.2.2. Détermination des concentrations des sucres solubles totaux.....	27
II.3.2.3. Dosage des protéines.....	28
II.3.2.4. Evaluation de la peroxydation lipidique (Dosage du MDA).....	29
II.3.2.5 Détermination des concentrations de la prolines.....	31

Chapitre III : Résultat et Discussion

I. Evaluation des paramètres morphologiques	34
I.1. Taux de germination	34
I.2. Vitesse de germination	34

I.3. Nombre moyen des feuilles	35
I.4. Nombre moyen des racines	36
II. Evaluation des paramètres biochimiques	37
II.1. Influence de l'acide phytique sur la synthèse de pigments	
Photosynthétique	37
II.2. Effet de l'acide phytique sur la teneur en Malondialdéhyde (MDA).....	38
II.3 .Effet de plomb sur la teneur en proline	39
II.4. Effet de l'acide phytique sur l'accumulation de la proline	39
II.5.Effet de plomb sur la teneur en protéine	40
II.6.Effet de l'acide phytique sur la teneur en sucres	41
Référence bibliographique	
Annexe	

Résumé

Les cultures céréalières sont importantes, se concentrent principalement dans les zones arides et semi arides mais la présence des métaux lourds dans le sol sont limitées La productivité des céréales

Le plomb (Pb) est l'un des métaux lourd qui est très hautement toxiques pour les plantes et la santé animale et humaine.

Notre travail a pour objectifs D'évaluer un moyen de lutte et atténuation de stress métallique causé par la présence de plomb chez les plantes de l'orge; nous avons suivi le développement de graines d'orge soumises à un stress métallique et ce à travers une majorité de paramètres, morphologiques, physiologiques et biochimiques ; afin d'élucider l'action de différentes concentrations de traitement sur l'orge.

Les résultats obtenus montrent un effet stressant sur la plante de l'orge, nous avons remarqué des valeurs variables dans quelque paramètres biochimiques et physiologiques mesurés ; ont également mis en évidence une forte augmentation dans les concentrations du sucre et MDA et proline et diminution de protéine

Mots clé : l'orge, plombe, acide phytique, stress

المخلص

الهدف من دراستنا هو تقييم الاجهاد المعدني المسبب من طرف مادة الرصاص باستعمال الخالب الطبيعي حمض الفيتيك عند نبات الشعير (نوعية سعيدة)

قمنا بتتبع تطور حبوب الشعير المعرضة لتجربة التالية

_ عينة من شاهد

_ عينة من حمض الفيتيك

_ عينة من معدن الرصاص + عينة من حمض الفيتيك

بعد 20 يوم من المتابعة قمنا بدراسة المقاييس المتحولة الفيزيائية و الكيمياء الحية فلاحظنا بعض التغير فيها و استخلصنا انه لا يوجد

اي تغير يخص السرعة- التبرعم- قيمة النمو عند الشعير و لكن قيمة MDA ارتفعت بوجود معدن الرصاص في حين ان نسبة

البروتينات و السكريات لم تشهد اي تغير في مختلف العينات

نسنتج ان الشعير لديه القدرة على مقاومة الاجهاد المعدني عن طريق خاصية تثبيت المعدن لديه

abstract

The objective of our study is to evaluate the mineral stress caused by lead by using the natural alkali fittic acid in the barley plant (happy quality)

We followed the development of barley subjected to the following experiment

_A sample of viewers

_A sample of phytic acid

_Sample of lead metal+ A sample of phytic acid

After 20 days of follow-up, we studied the metamorphic and biochemical parameters. We observed some change in them and concluded that there was none

Increased with the presence of lead metal, while the ratio of MDA to the value of any change is related to speed - budding - the value of growth in barley

Proteins and sugars have not seen any change in the various samples

We conclude that barley has the ability to resist mineral stress by its metal fixation property

Liste des abréviations

Pb : plomb

AP : acide pythique

MF : matière fraîche

Ch : chlorophylle

TBA: thiobarbuturique

MDA: Malondialdéhyde

ERO: espèce réactive d'oxygène

PCs : phytochelatin

NRAMP : natural resistance associated macrophage proteins

IP6 : l'inositol hexaphosphate

Liste des figures

n° de figure	titre de figure	page de figure
1	Les principales techniques de phytoremédiation (Pilon-Smits, 2005).	14
2	Structure chimique de l'acide phytique : myo-inositol Hexakisphosphate (InsP6)	16
3	Structure de l'acide phytique représentant les six phosphates avec les différentes possibilités D'interagir tant avec des cations métalliques qu'avec des résidus des protéines (Parra, 2001)	17
4	La teneur AP dans les divers éléments	18
5	la germination dans les boites de pétris	21
6	mélange de 2 /3 tereau et 1/3 sable	21
7	La courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines	25
8	Principe du dosage du Malondialdéhyde.	25
9	taux de croissance des graines d'orge en fonction des concentrations déférents après les jours d'exposition	30
10	vitesse de germination des graines d'orge en fonction de concentrations déférentes	31
11	Effet des concentrations (Pb 2mM ; A, PH 1% ; A, PH 2% ; A, PH 2% + PB 2mM sur l'évolution de nombre des feuilles	32
12	effet des concentrations utilise sur l'évolution des racines en fonction du temps.	33

Liste des tableaux

n° de tableau	titre de tableau	page
1	la classification de <u>ENGLER DIELS</u> en 1936 (Mossab, 1991) l'orge	2
2	Principales propriétés physico-chimiques du plomb	6
3	les caractéristiques agronomiques de la variété de l'orge Saida.	20
4	la gamme étalon réalisé avec le bleu brillant de Coomassie G250 comme réactif et le sérum d'albumine bovine (BSA) comme standard	24
5	taux de germination des graines d'orges en fonction des concentrations déférents	30
6	vitesse de germination des graines d'orge en fonction de concentrations déférentes	31
7	: Effet des concentrations (Pb 2mM ; A, PH 1% ; A, PH 2% ; A, PH 2% +PB 2mM sur l'évolution de nombre des feuilles	31
8	effet des concentrations utilise sur l'évolution des racines en fonction du temps.	32

Introduction

La présence de certains éléments traces (ET) dans les sols agricoles, en particulier métalliques tel que le plomb, peut poser un problème de santé publique en raison du risque de transfert vers la plante, l'animal, voire l'homme (Grelle, 1998).

L'augmentation du taux des métaux non essentiels dans les plantes exerce une toxicité (Prasad, 1990), affectant plusieurs étapes de développement, de la germination à la formation des feuilles. D'une manière générale, la plupart des métaux peuvent inhiber la germination et la croissance racinaire lors des premiers stades de développement (Dazy, 2008). Le plomb est connu pour ralentir la croissance des plantes cultivées, en particulier les céréales. La bioaccumulation du plomb dans les tissus des plantes a tendance à perturber les activités enzymatiques nécessaires à la biosynthèse de la chlorophylle.

Pour remédier à ces conditions de stress, ainsi que de limiter et réduire les effets nocifs des métaux lourds sur les végétaux, différents moyens ont été évalués. L'acide phytique figure parmi les moyens de lutte contre ce stress. Il a été trouvé que l'acide phytique peut servir comme un élément chélateur naturel bénéfique pour atténuer le stress métallique.

Au cours de ce travail, nous avons choisi, dans un premier temps, l'effet du plomb sur la plante de l'orge, variété de Saida. Ainsi, notre premier objectif était de mieux comprendre les réponses de la plante d'orge aux stress causés par la présence du plomb, pour cela plusieurs points ont été analysés :

- L'impact du plomb sur la germination et la croissance des plantes.
- L'effet du plomb sur les paramètres physiologiques et biochimiques.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à un cas particulier et peu étudié qui est l'atténuation du stress métallique. De ce fait, nous avons testé d'appliquer aux cultures soumises au stress métallique, l'acide phytique, comme un moyen de phytoextraction et de lutte contre le stress engendré par le plomb. Ainsi, notre objectif a été d'évaluer l'effet de l'acide phytique sur l'amélioration des paramètres physiologique et biochimiques de l'orge exposée au stress.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

I. Les céréales :

Les céréales sont un groupe de plantes cultivées appartient à la famille botanique des poacées appelées «graminées» Il existe trois grands groupes de céréales (**Guignard et Dupont., 2004**):

- Un premier grand groupe formé par le blé, l'orge, le seigle et l'avoine ;
- Un deuxième grand groupe formé par le maïs.
- Un troisième grand groupe ordonné autour du riz (**Alais et al., 2003**) :

I.1.Biochimie des céréales :

On a deux phases de métabolisme au niveau des céréales: le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire à l'issue desquels résultent des groupes moléculaires différents (**Kumar, 2011**)

I.2. Molécules issues du métabolisme primaire :

Il s'agit des: glucides, lipides et protides, (Jeant et et *al.*, 2007). Les glucides se présentent sous la forme de quelques sources simples, mais surtout de Composés plus ou moins complexes de ce même sucre simple tel que le glucose et le pentose .Le plus important est l'amidon qui est la substance énergétique par excellence, facilement digestible, et la cellulose qui est un glucide complexe.

Les protides et les protéines Ce sont des composés azotés que l'on rencontre sous forme simple (acide aminés) et sous forme plus complexe (protéines). La teneur en protéines des céréales varie suivant les espèces, 12% pour le blé ,11%pour l'orge et seulement 10%pour maïs. Certains de ces acides aminés, telle que la lysine, sont indispensables pour l'alimentation humaine et animale (substance nécessaire à la croissance)

Les lipides, Ce sont les matières grasses, dans les céréales elles sont fortement concentrées dans le germe.

I.3.Molécules issues du métabolisme secondaire :

Il s'agit des composés phénoliques qui correspondent à un vaste ensemble de molécules ayant en commun un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ces molécules sont spécifiques des végétaux et notamment des angiospermes. Les composés phénoliques interviennent dans différents aspects de la vie de la plante .Ils sont impliqués dans la physiologie de la plante (lignification, interactions symbiotiques.....), et dans ses mécanismes de défense (interactions biotiques et abiotiques).

Ils sont particulièrement intéressants par leur propriété antioxydant (**Macheix et al., 2005**)

I.4. Aspect botanique: Historique, Origine, Et la Classification (l'orge) :

L'orge est une plante annuelle de la classe des monocotylédones, qui appartient à la famille des graminées et au genre *Hordeum* qui comprend 31 espèces, mais seule *vulgare* est couramment cultivée, *Hordeum vulgare* est une espèce diploïde ($2n=14$).Elle a été l'une des premières cultures domestiquées, il y a 10 000 ans dans le croissant fertile du moyen –orient (**Baik,B.-k& Ulrich,S.E**).

Chapitre I : synthèse bibliographique.

L'orge est classée selon deux types printemps ou hiver (sensible au gel ou au contraire résistant au froid environ jusqu'à -15°C), sa classification est basée sur la fertilité des épillets latéraux, la densité de l'épi et la présence ou l'absence des barbes (Rasmusson., 1992).

On y distingue deux types selon la forme de leur épi

1. L'orge à 2 rangs ou l'orge distique: a un épi aplati, composé de 2 rangées d'épillets fertiles, un sur chaque axe du rachis, entouré de 4 épillets stériles. Dans ce type existent surtout des variétés de printemps.
2. L'orge à 6 rangs ou orge hexastique: encore appelé exourgeon, à une section rectangulaire, sur

Chaque axe du rachis les 3 épillets sont fertiles. Dans ce type n'existent pratiquement que des variétés d'hivers (Soltner., 2005)

Selon la nomenclature établie par Zutin et al, 1980 à partir de la classification de **ENGLER DIELS** en 1936 (Mossab, 1991) l'orge appartient à:

Règne	Végétale
Embranchement	Spermaphytes
Sous/Embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédone
ordre	Glumales
famille	Graminées.
Sous/Famille	Poacées
tribu	Hordées.
genre	Hordeum.
espèce	Hordeum VulgareL

Tableau(01) : la classification de **ENGLER DIELS** en 1936 (Mossab, 1991) l'orge

I.4.1. morphologie :

L'orge se présente comme une plante herbacée annuelle à multiplication sexuée (BENAITE, 1989) à feuilles étroites de couleur vert clair, un épi de 6 rangs et d'un tallage herbacé important supérieur à celui du blé. Elle présente un chaume plus gros mais faible et versant plus facilement par rapport au blé ; le système racinaire fasciculé est plus superficiel que celui du blé (CLEMENT-GRANDCOURT et PRAT, 1966)

I.4.2. Système racinaire :

L'orge a un système racinaire fasciculé dont la racine principale ressemble aux racines secondaires (BENAITE, 1989), ce système est plus superficiel que celui du blé et ne peut aller au delà d'un mètre vingt de profondeur.

On estime que 61% du poids des racines se trouve dans les vingt cinq premiers centimètres du sol (Clement et Part, 1966).

1.4.3 La tige:

La tige n'a rien de très remarquable et on peut observer à son sujet les mêmes modalités de développement que pour celle du blé; c'est un chaume creux entrecoupé de cinq à six nœuds (SIMON, 1972). La hauteur varie en fonction des variétés et peut atteindre deux mètres.

1.4.4. Les feuille :

Les feuilles sont alternes, distiques non pétiolées à couleur vert clair (Mossab, 1991). Elles sont assez étroites dont la forme peut être caractérisée par le détail suivant: à l'endroit où le limbe se détache de la tige au sommet de la partie engainante de la feuille, on trouve deux stipules largement développés qui se croisent devant la tige en formant une sorte de collier familièrement appelé plat à barbe en raison de sa forme et une courte ligule dentée appliquée contre la tige (Clement-Grancourt et Part, 1966).

1.4.5. L'inflorescence:

C'est un épi blanc et barbu, le rachis porte sur chaque article trois épillets uniflores : un médian et deux latéraux. La fertilité de ces épillets permet de distinguer le type d'orge. Chez les orges à deux rangs, l'épi est aplati et les épillets s'opposent les uns aux autres alternativement dans le sens perpendiculaire à l'aplatissement de telle sorte que les arêtes barbues des glumelles inférieures sont réparties à l'extérieur de l'épi ; chaque épillet fertile sur chaque axe du rachis entouré de deux épillets stériles (Slim, 1982).

Dans les orges à six rangs on les appelle aussi **Es cour geons**, la section de l'épi est nettement hexagonale ; tous les épillets sont fertiles (Soltner, 1988).

1.4.6 Le grain :

Les grains sont de formes différents ; en effet ceux qui sont placés à l'extérieur de chaque coté du rachis sont légèrement dissymétriques alors que le grain central est symétrique. Ce caractère permet de reconnaître assez facilement une orge à six rangs d'une orge à deux rangs

1.5. Le cycle de développement

1.5.1. La période végétative

- a. **La germination:** Correspond à l'entrée de la semence en vie active et au tout début de Croissance de l'embryon.
- b. **La levée:** cette période est caractérisée par le nombre de feuilles de la jeune plante et leur stade de développement (**Giban et al., 2003**).
- c. **Le tallage:** le début du tallage est marqué par l'apparition de l'extrémité de la 1ère feuille de la talle latérale puis d'autres talles naissent successivement, formant un plateau du tallage situé juste au niveau du sol. Le fin tallage est celle de la fin de la période végétative, elle marque le début de la phase reproductive (**Hadria, 2006**)

1.5.2. La période reproductive :

- a. **La montaison:** ce stade est repérable une fois l'ébauche de l'épi du brin maître, atteint 1cm de hauteur. Cette phase s'achève une fois l'épi prend sa forme définitive à l'intérieur de la gaine de la feuille étandard qui gonfle (stade gonflement) (**Giban et al. 2003**).

- b. **L'épiaison**: est la période allant de l'apparition des premiers épis jusqu'à la sortie complète de tous les épis hors de la gaine de la dernière feuille (**Giban et al., 2003**).
- c. **La floraison**: est la sortie des premières étamines hors des épillets au milieu de l'épi sur 50% des épis la formation du grain se fait quand les grains du tiers moyen de l'épi parviennent à la moitié de leur développement. Ils se développent en deux stades:
 - Le stade laiteux où le grain vert clair, d'un contenu laiteux atteint cette dimension définitive; (le grain contient encore 50% d'humidité et le stockage des protéines touche à sa fin)
 - Le stade pâteux où le grain, d'un vert jaune, s'écrase facilement. (le grain a perdu son humidité et l'amidon a été constitué).
- a. **La maturité complète**: la teneur en humidité atteint environ 20%; le grain est mûr et prêt à être récolté, c'est alors la période des moissons.

II. Les métaux lourds :

Actuellement, dans l'environnement une importante gamme de contaminants existe, tels que les métaux lourds, les substances combustibles, les déchets dangereux, les explosifs et les produits pétroliers. Ils se divisent en deux catégories : les composés organiques et inorganiques (**Brunet, 2008**)

Les contaminants inorganiques majeurs sont les métaux lourds. Ils représentent un problème différent des contaminants organiques : contrairement à ces derniers, ils ne peuvent pas être dégradés par les microorganismes, ils doivent être « immobilisés » ou extraits. Il existe plusieurs définitions du terme « métal lourd », ou élément trace métallique (ETM) : il s'agit en général d'éléments métalliques naturels, caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 g/cm³ (**Morlot, 1996**). Quarante et un métaux correspondent à cette définition générale. D'autres définitions existent, les métaux lourds peuvent concerner les éléments métalliques compris entre le cuivre et le plomb dans la classification périodique des éléments (excluant alors le fer, le chrome) ; il peut aussi s'agir de tous les éléments métalliques à partir de la quatrième période de la classification des éléments. les métaux lourds les plus fréquents sont le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le plomb (Pb), l'arsenic (As), le nickel (Ni) et le zinc (Zn). Ils contaminent de nombreux sites à travers le monde. Ils proviennent de la combustion des charbons, pétroles, ordures ménagères, de l'épandage de boues sur les sols agricoles et de certains procédés industriels (métallurgie des métaux non ferreux notamment (**Chaney et al., 1997**))

II.1. Le plomb

II.1.1. Généralités sur le plomb :

II.1.2. Histoire de l'utilisation du plomb :

Le plomb a été l'un des premiers métaux utilisés par l'homme dès l'âge du bronze, il y a plus de 7 000 ans. Du fait de sa relative disponibilité et de ses propriétés physico-chimiques (malléabilité, ductilité, bas point de fusion, propriété anticorrosion), le plomb a été largement utilisé par les Grecs et les Romains comme pigments (oxyde de plomb) ou pour réaliser des canalisations, de la vaisselle, des pièces de monnaie, des toitures...(**Pourrut, 2008**).

L'utilisation du plomb a ensuite explosé au cours de la Révolution industrielle. Pendant la première moitié du XX^{ème} siècle, le plomb a été utilisé dans l'industrie, l'imprimerie et les peintures. Dans la seconde moitié du siècle, l'utilisation dominante était

liée aux carburants automobiles (le plomb était ajouté dans l'essence comme antidétonant) puis aux accumulateurs de voitures et industriels. Depuis les années 1970, le développement de nouvelles technologies, la prise en compte des problèmes environnementaux et de santé publique, ont conduit à la diminution ou à l'arrêt de certaines utilisations du plomb (canalisations, soudure, peinture, pesticides, antidétonante dans l'essence...). Dans les pays industrialisés, la production secondaire (à partir de la valorisation des déchets) ne cesse de progresser par rapport à la production primaire (à partir de minerai). (**Ademe,2006**)

II.1.3. Origines de la pollution par le plomb :

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

Le plomb est naturellement présent en moyenne à 0,002% dans la croûte terrestre (36^{ème} élément de la croûte terrestre), généralement sous forme peu soluble. Des dérivés inorganiques sont présents dans les eaux, les sédiments, les sols, l'atmosphère et éventuellement en micro-traces chez les organismes vivants. Les sols non contaminés contiendraient de 10 à 30 mg.kg-1(**Nriagu, 1978 ; Baize, 2002**).

A l'état naturel, le Pb se retrouve dans l'environnement sous forme de galène (sulfure de Pb), de cérusite (carbonate de Pb), et d'anglésite (sulfate de Pb). La forme la plus abondante est la galène, la cérusite et l'anglésite apparaissent lors de l'oxydation de la galène (**Brunet, 2008**).

Dans l'air, les émissions de plomb provenant de poussières volcaniques véhiculées par le vent sont reconnues d'importance mineure (**Pichard, 2003**), la majorité du plomb contenue dans l'air ambiant provient de la combustion de l'essence plombée, en milieu urbain environ 90% du plomb est émis dans l'atmosphère par le gaz d'échappement mais la pollution de l'air par le Pb a considérablement diminué depuis l'arrêt des essences plombées, (Source CITEPA traitement OPECST).

A ce jour, les principales sources de contaminations en Pb sont les rejets anthropiques. Ils proviennent principalement des industries qui extraient et purifient le Pb naturel et qui recyclent les composants contenant du Pb comme les batteries et leurs retombées atmosphériques contaminent les sols. A ceci s'ajoute les déchets industriels et la détérioration des peintures extérieures à base de Pb. Des rejets provenant des industries sidérurgiques ainsi que les réseaux de canalisations de distribution d'eau anciennes, contenant du Pb, contaminent les eaux (**Viraraghavan et al., 1999**).

II.2. Problématique du plomb dans l'environnement :

II.2.1. Propriétés physico-chimiques du plomb :

Le plomb, du latin plumbum, est un métal mou, gris, sans goût ni odeur caractéristique, se trouvant habituellement en petite quantité dans la croûte terrestre. Il appartient au groupe IV b de la classification périodique des éléments. Ses principales propriétés physico-chimiques sont présentées dans le Tableau 0. De configuration électronique : [Xe] 4f145106s26p2, il possède deux électrons non appariés sur sa couche électronique externe. Cette configuration électronique autorise les degrés d'oxydation (+2) et (+4), en plus de la forme métal (**0** 2008). Sept isotopes du Pb (202Pb, 204Pb, 205Pb, 206Pb, 207Pb, 208Pb, 210Pb). existent mais

seulement quatre se retrouvent à l'état naturel: ^{204}Pb (1,4%), ^{206}Pb (26,1%), ^{207}Pb (22,1%), ^{208}Pb (52,4%) (Brunet, 2008) Le cation Pb^{2+} est un acide au sens de Lewis, c'est-à-dire qu'il est susceptible d'accepter un doublet d'électrons venant d'une base, pour former une liaison covalente. C'est également une espèce chargée, susceptible d'interactions électrostatiques avec des ions de signes contraires pour former une liaison ionique Le plomb est un métal difficile à détruire, et non dégradable (Morlot, 1996).

Tableau(02) : Principales propriétés physico-chimiques du plomb

Symbole	Pb
Numéro Atomique	82
Masse atomique	207,2 g.mol ⁻¹
Point de fusion	327 °C
Point d'ébullition	1740 °C
Densité	11,35
Configuration électronique	[Xe] 4f145d106s26p2
Valence	0, +2, +4
Rayons ioniques	0,94 à 1,49 Å
Pb^{2+}	0,78 à 0,94 Å
Pb^{4+}	

II.2.2. Impact du plomb sur les végétaux

II.2.2.1. Absorption du plomb par la plante

II.2.2.1.1. Cas de l'absorption foliaire

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

quantité de métal absorbée par les parties aériennes peut atteindre jusqu'à 95 % de la quantité totale absorbée (Dalenberg et Van Driel, 1990)

II.2.2.1.2. Mécanismes d'absorption racinaire :

Depuis plus de trente ans, du fait des risques de contamination de la chaîne alimentaire par le plomb, l'absorption racinaire a fait l'objet de nombreuses recherches sur diverses espèces végétales. De ce fait, ces études ont porté essentiellement sur les céréales, comme l'orge et le blé (Tanton and Crowdy, 1971), le maïs (Tung and Temple, 1996b), ou les légumes, comme la laitue (Glater and Hernandez, 1972), le radis (Lane and Martin, 1977) et l'oignon (Wierzbicka, 1987). Ces travaux ont révélé que le plomb, après s'être fixé au rhizoderme, pénétrait dans le système racinaire de façon passive et suivait le système de Conduction de l'eau. Cette absorption n'est pas uniforme le long de la racine, puisqu'il existe un gradient de concentration en plomb dans les tissus à partir de l'apex, qui est la zone la plus concentrée (Tung and Temple, 1996b; Sereginet al., 2004). Les tissus jeunes, et en particulier la zone apicale (en dehors de la coiffe) où les cellules possèdent des parois encore fines, sont les zones absorbant le plus de plomb (Wierzbicka, 1987; Tung and Temple, 1996b; Sereginet al., 2004). Cette région apicale correspond également à la zone où le pH rhizosphérique est le plus bas. Ce pH bas favorise la solubilité du métal et conduit à une élévation locale de la concentration en plomb dans la solution du sol. Au niveau moléculaire, le mécanisme de pénétration du plomb dans les cellules du rhizoderme n'est toujours pas encore connu. Il semblerait que le plomb puisse rentrer par plusieurs voies d'accès, notamment des canaux ioniques et/ou des transporteurs ioniques. Le plomb profiterait de la non-spécificité de certains de ces canaux/transporteurs et de la très forte différence de potentiel membranaire, pouvant dépasser -200 mV dans les cellules du rhizoderme (Hirschet al., 1998), pour diffuser à l'intérieur de la racine. L'absorption du plomb est donc une absorption passive, mais nécessite une dépense énergétique de la cellule pour maintenir ce potentiel très négatif. Le maintien de ce potentiel s'effectue notamment par l'excrétion de protons dans le milieu extérieur, via des pompes H⁺/ATPase. Dans des blés traités au plomb, l'utilisation de vanadate, un inhibiteur de ces pompes, a permis de limiter fortement l'absorption de ce métal (Wanget al., 2007b). L'inhibition de l'absorption racinaire du plomb par le calcium est un phénomène connu depuis longtemps (Garland and Wilkins, 1981) et qui semble commun à toutes les espèces végétales. Huang and Cunningham (1996) ont, les premiers, évoqué le passage potentiel du plomb via des canaux calciques. De façon plus générale, l'ajout d'ions Ca²⁺, Mg²⁺ ou K⁺, dans le milieu extérieur, inhibe significativement la pénétration de plomb dans les racines de riz (Kim et al., 2002).

❖ Le plomb dans la racine et sa translocation vers les parties aériennes :

Une fois pénétrée dans le système racinaire, la très grande majorité du plomb va y rester (Huang and Cunningham, 1996; Huanget al., 1997). Bien qu'il existe quelques espèces capables de transférer de grandes quantités de ce métal vers les parties aériennes, la racine agit comme une barrière très efficace contre les mouvements du plomb à l'intérieur de la plante. Ce phénomène de barrière n'est pas commun à tous les ETM, et son intensité est très spécifique au plomb

II.2.2.2 Effets généraux du plomb sur les plantes :

II.2.2.2.1 .Effets sur la germination et la croissance :

A l'échelle macroscopique, le plomb entraîne des effets néfastes sur les plantes. En premier lieu, la germination est fortement inhibée par les ions Pb^{2+} à de très faibles concentrations (Mishra et al., 1998; Tomulescu et al., 2004). De plus fortes doses conduisent à une inhibition totale de la germination chez les espèces végétales, comme le haricot (Wierzbicka et al. 1998). Le plomb réduit également fortement le développement de la plantule et des racelles (Mishra et Choudhuri, 1998). Un traitement à de faibles concentrations en plomb inhibe la croissance des racines et des parties aériennes (Makowski et al., 2002; An, 2006). Cette inhibition est plus importante pour la racine, ce qui peut être corrélé à la plus forte teneur en plomb de cette dernière. (Obroucheva et al, 1998). L'accroissement de biomasse végétale est diminué par de fortes doses de plomb (Xiong et al., 2006). Sur de longues durées, les traitements au plomb, même à des doses non -létales, peuvent conduire à l'apparition de nécroses au niveau des apex racinaires et des feuilles, ainsi que des chloroses foliaires (Liu et al., 2000). L'ensemble des perturbations macroscopiques observées est la résultante :

- ✓ De l'interaction du plomb avec les différents composants cellulaires et les macromolécules (protéines, ADN...).
- ✓ De la perturbation de nombreux processus physiologiques comme la régulation du statut hydrique, la nutrition minérale, la respiration ou la photosynthèse.

II.2.2.2 Effet sur la nutrition minérale :

Le plomb affecte également la nutrition minérale, en perturbant le prélèvement et le transport des nutriments par la plante, tels que Ca, Fe, Mg, Mn, P et Zn en bloquant leur entrée ou en se liant à eux, les rendant indisponibles pour les plantes (Xiong, 1997). Burzynski (1987) a montré que la présence de plomb entraînait une diminution du contenu en potassium dans tous les tissus du concombre, ainsi qu'une diminution du calcium dans les cotylédons et l'hypocotyle, mais aussi du fer dans les racines. Le plomb affecte aussi le métabolisme azoté en diminuant le prélèvement de nitrate et en perturbant le fonctionnement du nitrate réductase (Seregin et Ivanov, 2001).

La présence de plomb dans le milieu extérieur induit une compétition avec les ions minéraux au niveau des transporteurs cellulaires altérant la perméabilité membranaire et induisant une carence en éléments nutritifs dans les plantes (Haussling et al., 1988; Marschner, 1995).

II.2.2.3 Effets sur les protéines :

L'action du plomb sur la concentration totale en protéine n'est pas claire, bien que de fortes concentrations puissent diminuer le pool protéique (Saxena et al, 2003; Mishra et al, 2006). Cette diminution quantitative de la teneur en protéines totales apparaît comme la résultante de plusieurs conséquences de l'action du plomb Modification de l'expression génique (Kovalchuk et al., 2005) et augmentation de l'activité ribonucléasique (Jana et al., 1982; Gopal et al., 2008).

- Stimulation de l'activité protéasique (Jana et al, 1982).
- Diminution de la teneur en acides aminés libres (Xiong et al., 2006). Particulièrement sensibles à l'action des ERO, Les protéines les plus touchées sont celles comportant un groupement sulphydryle (-SH), comme c'est le cas pour de nombreuses enzymes et protéines de transport (Stadtman et Levine, 2000)

II.2.2.2.4 Effet sur la Photosynthèse :

Chez les plantes, l'exposition au Pb conduit à une forte inhibition de la photosynthèse, du rendement photosynthétique, et à une limitation du taux d'assimilation de CO₂. Le rendement photosynthétique, très sensible, peut chuter de plus de 50 % (Bazzaz et al., 1975; Poskuta et al., 1987). Cette inhibition s'explique par la diminution des teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes généralement constatée (Chen et al 2007; Gopal et al 2008). La chlorophylle b semble plus sensible que la chlorophylle a (Wozny et al 1995; Vodnik et al 1999). Toutefois, ces effets varient en fonction des espèces végétales.

Les mécanismes de réduction de la teneur pigmentaire sont, en partie, élucidés. Le plomb induit l'activité chlorophyllase dans les feuilles (Drazkiewicz, 1994), mais le mécanisme principal semble être l'inactivation de la synthèse de ces pigments. Le plomb interagit à ce niveau de deux façons : (i) d'une façon directe, en se substituant aux ions divalents liés aux métallo-enzymes. C'est notamment le cas avec l' δ -aminolevulinate déshydratase ou ALAD qui est à la base de la synthèse des chlorophylles et dont l'ion Zn²⁺ est remplacé par Pb²⁺; (ii) d'une façon indirecte, en induisant une carence en ces ions divalents. Il est, par exemple, admis que les chloroses foliaires sont généralement le signe d'une carence en fer indispensable à la synthèse des chlorophylles (Foy et al 1978). Le plomb induit des déformations dans les structures des chloroplastes, plus sensibles que les mitochondries (Weryszko Chmielewska et al 2005; Islam et al 2007) Il provoque également un changement dans la composition des lipides de la membrane chloroplastique (Stefanov et al 1995), Le plomb, en induisant une fermeture des stomates, limite considérablement les flux gazeux entre les feuilles et le milieu extérieur. Cette limitation du flux de CO₂ entrant est considérée comme la cause principale de la forte réduction de la fixation du CO₂ observée (Bazzaz et al 1975; Parys et al 1998).

II.2.2.2. 5 Action sur les activités enzymatiques :

Le plomb peut inhiber l'action de certaines enzymes, notamment celles qui possèdent un groupement -SH, ce dernier présentant une forte affinité pour le plomb. Dans la plupart des cas, l'inhibition se fait par interaction du plomb avec ce groupement qui est indispensable pour l'activité et le bon fonctionnement des enzymes, ou en remplaçant un autre élément comme le Fe dans leur site actif mais aussi en modifiant leur structure (Hall 2002). Le plomb affecte donc la conformation de nombreuses enzymes et les empêchant de fonctionner convenablement (Seregin et Ivanov, 2001).

Parmi les enzymes fondamentales qui peuvent être inhibées par le plomb, se trouvent des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la chlorophylle ou bien la RUBISCO qui permet la fixation du CO₂ (Seregin et Ivanov, 2001 ; Patra et al 2004). L'inhibition de ce type d'enzyme entraîne une forte perturbation de la photosynthèse

II.2.3 Différentes utilisations du plomb :

La présence généralisée du plomb dans l'environnement est essentiellement due aux activités humaines. Cette origine anthropique est multiple car les utilisations passées ou présentes du plomb sont très nombreuses.

❖ Activités métallurgiques

: Elles comprennent la métallurgie de première fusion lors de laquelle le minerai de plomb subit différents traitements afin d'extraire le plomb et les autres métaux. Il

existe aussi la métallurgie de 2ème fusion ou recyclage, qui consiste à obtenir du métal par la récupération de déchets contenant du plomb.

❖ Production d'essence au plomb

.Le tétra-éthyle de plomb ($Pb(C_2H_5)_4$) était le principal constituant des agents antidétonants ajoutés à l'essence, pour augmenter le taux d'octanes. Cette utilisation est interdite depuis le 1er janvier 1996. Avant son interdiction, le plomb utilisé dans l'essence représentait la majeure partie du plomb disséminé, à cause des émissions de fumées.

❖ Protection contre les radiations

. Du fait de sa densité importante, le plomb est utilisé pour la protection contre le rayonnement γ .

❖ Accumulateurs.

Les batteries au plomb sont constituées de 2 électrodes, une positive ($PbO_2/PbSO_4$) et une négative ($Pb/PbSO_4$) immergées dans une solution d'acide sulfurique (H_2SO_4). Une batterie contient environ 8,6 kg de plomb. Les batteries restent la principale utilisation du plomb actuellement.

❖ **Munitions** (cartouches et grenailles de plomb) et lest de pêche. Des études (Baron, 2001) ont montré que cette utilisation était responsable du saturnisme des oiseaux. De plus, cela entraîne la dispersion d'environ 8000 t.an-1, dont les $\frac{3}{4}$ sont dus à la chasse (BRGM, 2004).

❖ Peintures, pigments, apprêts.

La cérusite ou blanc de plomb ont été utilisés dans les peintures pendant près de 2000 ans. Le plomb a également été utilisé comme composante de nombreux pigments en peinture. Le minium Pb_3O_4 est appliqué sous forme d'une couche anti-rouille sur de l'acier (interdit désormais comme peinture pour la coque des navires : submarine).

Le stéarate de plomb ($Pb(C_{17}H_{35}COO)_2$) et l'acétate de plomb ($Pb(CH_3CO-O)_2$) sont ajoutés à la peinture ou aux vernis comme dessiccateurs. L'utilisation dans les peintures est arrêtée depuis 2002.

❖ Verre et cristal.

Le plomb est utilisé pour abaisser la température de fusion et pour assurer une meilleure transparence. Une fois que le plomb est relâché dans l'atmosphère, il peut traverser des milliers de kilomètres, surtout si les particules sont submicroniques ou s'il est sous forme de composés organiques volatils.

❖ L'alimentation;

le plomb provient des procédés de stockage et de fabrication (conserverie) et des boissons. et les canalisations d'eau potable. (Czernichow, 2006).

Le plomb trouvé dans les sols urbains vient des habitats anciens (peintures, chauffage au fuel...) ainsi que des émissions de fumées automobiles. Celui trouvé dans les sols ruraux vient plutôt des activités industrielles (production de batteries,...), des munitions pour la chasse, des manufactures et des min

III. stress oxydatif

III.1. Le stress oxydatif chez les plantes

❖ Définition :

Le stress oxydatif a été défini par Sies (1997) comme une perturbation de la balance entre les prooxydants et les antioxydants, en faveur des premiers, conduisant à des dommages potentiels. Le stress oxydatif est la conséquence de :

- la diminution du niveau des antioxydants et/ou
 - l'augmentation de la production d'ERO
- Le plomb et les plantes

Le stress oxydatif chez les plantes fait l'objet de très nombreuses revues bibliographiques (Bartosz, 1997; Bolwell and Wojtaszek, 1997; Van Breusegem et al., 2001; Potters et al., 2002; Schützendübel and Polle, 2002; Blokhina et al., 2003; Apel and Hirt, 2004; Foyer and Noctor, 2005a; Pitzschke et al., 2006; Wormuth et al., 2007) et de plusieurs livres (Inze and Montagu, 2001; Smirnoff et al., 2005). Ainsi,

III.2. Origine du stress oxydatif :

Le stress oxydatif peut avoir diverses origines, telles que la surproduction endogène d'agents prooxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en antioxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs prooxydants (Tabac, alcool, médicaments, rayons ultraviolets, pesticides, ozone, amiante, métaux toxiques) (Magder, 2006)

III.3. Stratégies développées par les végétaux pour la défense au stress métallique

III.3. 1. Détoxification des espèces réactives d'oxygène (ERO) :

La lutte contre les effets délétères des ERO est assurée par des systèmes de défense variés, chargés de les capter et de les neutraliser, mais aussi d'éliminer et remplacer les molécules endommagées. Ces systèmes de défense sont présents dans le cytosol, mais également dans les différents organites, tels que les chloroplastes (Asada, 2006), les mitochondries (Moller et al 2007) et les peroxysomes (Del Rio et al, 2006).

- a) Système antioxydant** Les antioxydants ralentissent ou inhibent l'oxydation d'un substrat, tout en étant présents à faible concentration par rapport à ce substrat oxydable. Même si ces stratégies antioxydantes sont essentielles à la survie de l'organisme, elles sont néanmoins coûteuses en énergie, le potentiel antioxydant global peut être enzymatique ou non enzymatiques.
- b) Antioxydants enzymatiques** Trois activités enzymatiques clefs occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxification des ERO : il s'agit des catalases (CAT), des peroxydases (POD) et des superoxyde dismutases (SOD). 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 H_2O_2 conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.
- c) Les catalases (CAT)** sont contenues dans les peroxysomes et dans le cytosol. Elles agissent en synergie avec les SOD puisque leur rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante (Noctor et Foyer 1998) $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$
- d) Les peroxydases (POD)** : 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 :

- e) **Les caroténoïdes** : Les caroténoïdes sont des pigments végétaux lipophiles, ils jouent le rôle de pigments accessoires de l'antenne collectrice des photosystèmes. En dehors de cette implication dans le processus photosynthétique, les caroténoïdes participent à la protection de l'appareil photosynthétique contre les ERO (Asada, 1994; Miller et al., 1996).

En effet, ces pigments possèdent la capacité de capter l'énergie de la chlorophylle triplet ou de l'oxygène singulet (Telfer et al., 1994; Mozzo et al., 2008).

La capacité de transfert d'énergie des caroténoïdes vers le dioxygène étant faible, ces pigments retrouvent leurs états initiaux en perdant leurs énergies sous forme de chaleur. Le mécanisme captage d'énergie/perte d'énergie par chaleur peut également directement s'effectuer à partir de la chlorophylle singulet (Demmig-Adams et Adams, 1996)

III.4. Mécanismes de tolérance au stress métallique

III.4.1. Détoxification et chélation du plomb

Seules les plantes qui ont développé des mécanismes de tolérance peuvent survivre à un environnement contaminé. Elles développent en général deux grands types de stratégies, le mécanisme le plus répandu est l'évitement du stress métallique par exclusion, qui se fait par fixation du métal sur la paroi cellulaire et la séquestration ou bien par sécrétion de chélates.

Ceci a pour but de limiter au maximum le prélèvement par les racines, mais également de limiter un éventuel transport des racines vers les parties aériennes.

De nombreux auteurs suggèrent que cette restriction a lieu grâce à l'endoderme, qui fonctionne comme une barrière au transport radial du plomb dans la racine, et de ce fait restreint son mouvement vers les organes supérieurs (Seregin et Ivanov, 2001). Pour (Kopittke et al., 2007). Une deuxième stratégie est donc mise en place par les plantes, qui consiste à détoxifier le plomb qui a pénétré dans le symplast.

La tolérance au stress métallique dépendra donc de l'efficacité des mécanismes internes qu'elles mettent en place. Ces mécanismes peuvent être (Patra et al., 2004 ; Do Nascimento et Xing, 2006):

- la séquestration des métaux grâce à des composés organiques spécialement synthétisés
- la compartimentation dans certains compartiments cellulaires (tels que les vacuoles)
- la détoxification grâce à aux systèmes antioxydants et la sécrétion des chélates

III.4.2. Stratégie d'évitement et de séquestration :

Afin de contrer les effets délétères induits par la présence de plomb dans leur milieu de culture les plantes ont mis en place deux types de stratégie. La première est l'évitement qui consiste : 1) à accumuler le plomb dans l'apoplasme et/ou 2) à le séquestrer rapidement dans les vacuoles. (Yang et al., 2005; Clemens, 2006).

Dans la deuxième stratégie, les structures intracellulaires sont exposées au polluant mais sont peu affectées du fait de caractéristiques particulières qui leur permettent de tolérer des teneurs élevées en Pb. Ces mécanismes peuvent correspondre à une tolérance constitutive (Brunet, 2008). A la surface des racines, les ions Pb^{2+} se lient aux groupements carboxyles des acides uroniques du mucilage sécrété par les cellules racinaires. Ainsi, celui-ci forme une barrière protectrice du système racinaire (Morel et al., 1986).

Dans les parois cellulaires, le Pb peut se lier aux groupements carboxyles tels que l'acide galacturonique et l'acide glucuronique. Ces différentes liaisons immobilisent efficacement le Pb dans l'apoplaste. Si les sites apoplastiques de fixation du Pb ne sont pas suffisamment nombreux, l'élément peut intégrer le symplasme. Les cellules des tissus concernés le séquestrent dans des vacuoles (Antosiewicz et Wierzbicka, 1999) et le rendre ainsi inactif.

Le plomb entrant dans les cellules sous forme ionique est rapidement lié à des chélateurs internes tels que le glutathion ou les phytochélatines. Du Pb est retrouvé sous forme de dépôts et d'agrégats dans les vacuoles (Wierzbicka et Antosiewicz, 1993; Meyers et al., 2008).

La vacuole est en effet considérée comme le lieu principal de stockage du plomb (Tong et al., 2004). Selon Wierzbicka et Antosiewicz (1993), ces vacuoles peuvent en effet contenir plus de 96% du métal. Ceci permet de diminuer considérablement la quantité de métal dans le cytoplasme, compartiment cellulaire à forte activité métabolique.

III.4.3. Chélation et transport du plomb

Des ligands spécialement synthétisés en cas de stress métalliques sont capables de se lier au plomb une fois dans le cytoplasme, pour former des complexes stables, qui peuvent ensuite être séquestrés dans les vacuoles. Les plus connus sont des protéines telles que les métallothionéines ou les phytochélatines, ainsi que des acides organiques de faible poids moléculaires. (Yang et al., 2005)

Il existe de nombreux transporteurs intervenant dans le déplacement des éléments métalliques dans les cellules végétales. Certains permettent aux ions métalliques de traverser la membrane plasmique, tels que les CNGC, ZIP, NRAMP et les pompes ATPases de type P. Une fois entrés dans la cellule, ces éléments peuvent être chélatés ou non à des molécules comme le GSH ou les **PCs** et sont pris en charge dans le symplasme ou stockés dans des vacuoles grâce à d'autres transporteurs, tels que des CDF, des antiports cation/H⁺ et des transporteurs ABC (Cecchi, 2008).

Certains éléments métalliques pourront ressortir des vacuoles grâce aux transporteurs **NRAMP** et ainsi être remis en circulation dans le symplasme ou bien être exportés à l'extérieur de la cellule via certains transporteurs ABC et CDF. La localisation des ions métalliques est dépendante de leur nature, spécifique de l'espèce végétale et varie donc suivant la teneur en chacun des transporteurs dans les cellules. Ceci se traduit par différents mécanismes de tolérance mis en place par les plantes (Cecchi, 2008)

III.4.4. Autres systèmes de défense au stress métallique :

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

- Des transporteurs membranaires, de type pompe ATPasique, spécifiques sont présents pour 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 *Arméria maritima*, dans les feuilles marron (les plus âgées), les concentrations en Cu, Cd, Zn et Pb sont 3 à 8 fois plus de 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. (Salt et al., 1995).

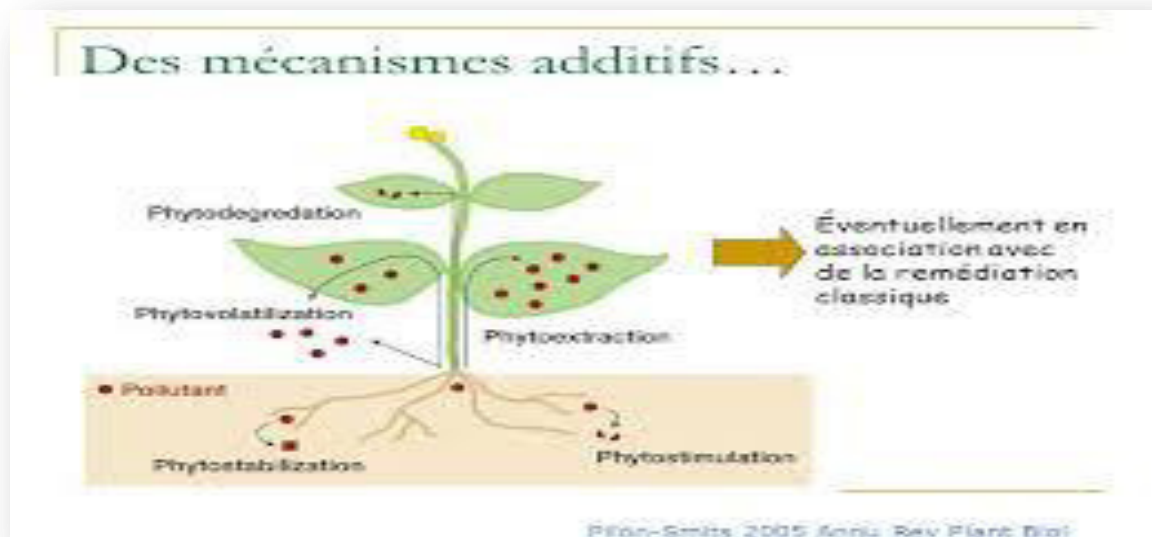
- Les protéines de choc thermique (Hsp), déjà réputées pour leur implication dans le stress lié à un choc thermique, seraient également responsables de la tolérance aux métaux toxiques. En effet, des stress très variés, ayant en commun de dénaturer les protéines (stress protéotoxique), sont capables 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).

- 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 des métallothionéines (Sanita di Toppi et Gabrielli, 1999).

IV. La phytoremédiation

IV.1. Définition et techniques de phytoremédiation

Connue sous le nom de phytoremédiation « phyto » = plante et « remedium » = rétablissement de l'équilibre, remédiation, la phytoremédiation est définie comme l'utilisation de plantes pour extraire ou transformer les polluants organiques et aussi inorganiques (plus particulièrement les métaux lourds) (Salt et al., 1998)



Figure(01) : Les principales techniques de phytoremédiation (Pilon-Smits, 2005).

IV.2. Nécessité de la dépollution

Les risques écotoxicologiques de la contamination par les métaux lourds dans les sols, les ruisseaux et les eaux souterraines sont un grand problème de l'environnement et la santé humaine (Martin, 1998). Recourir à des techniques industrielles peut être utilisé efficacement pour nettoyer des sols contaminés mais la plupart de ces techniques exigent une technologie performante et sont par conséquent seulement chères et convenables pour des petites régions pollués (Moffat, 1995). Ces dernières années, le développement de techniques efficaces pour décontaminer les sites pollués est devenu indispensable. L'une d'elles la phytoremédiation, exploite les propriétés de certaines plantes à accumuler de grandes quantités de métaux lourds (Prabha et al., 2007).

IV.3. Concept de La phytoremédiation :

La phytoremédiation est une technique de réhabilitation environnementale qui utilise les capacités des plantes pour éliminer, contenir, ou rendre moins toxiques les polluants. L'idée d'utiliser les plantes pour la réhabilitation environnementale est ancienne, puisqu'il y a 300 ans les hommes utilisaient déjà les plantes pour le traitement de l'eau. Cependant, ce n'est que récemment que l'utilisation des plantes pour la réhabilitation des sols a pris son essor (Baker et Brooks, 1989; Salt et al., 1995).

La plante est en effet un système biologique de pompage et de filtration, actionné par le soleil, qui a des capacités inhérentes de chargement, dégradation et engorgement. Les racines peuvent trouver, altérer et « transloquer » ou déplacer des éléments et des composés contre des gradients chimiques importants. Les surfaces des racines supportent des bio-films bactériens actifs et des extensions fongiques qui augmentent significativement la surface de contact avec le sol et les capacités métaboliques de la plante. Au cours de l'évolution, les plantes ont développé des mécanismes pour s'adapter et se multiplier dans des conditions hostiles (Kirpichtchikova, 2009).

Certaines plantes ont adopté des mécanismes racinaires qui permettent d'immobiliser les métaux au niveau des racines et de diminuer leur transfert vers les feuilles où les métaux seraient toxiques. D'autres plantes ont développé des mécanismes complexes pour tolérer, absorber et accumuler dans leurs tissus des quantités significatives de métaux. Les techniques de phytoremédiation apparaissent alors comme des méthodes alternatives ou des méthodes complémentaires aux méthodes conventionnelles, moins coûteuses, plus extensives et plus respectueuses de l'environnement. (Kirpichtchikova, 2009).

V. La Phytoextraction

C'est l'utilisation de végétaux (hyper)accumulateurs qui vont absorber les métaux ou métalloïdes du sol par les racines et les accumuler dans les organes récoltables (feuilles, tiges et racines) (McGrath, 1998). Les métaux lourds vont se complexer avec des acides organiques ou des acides aminés synthétisés par la plante. Les métaux lourds sont ensuite récupérés en incinérant ou compostant la biomasse de plante (Remon, 2006).

V.1. Avantages et limites de la technique de phytoremédiation :

La technique de phytoextraction présente de nombreux intérêts, d'ordre environnemental et économique. En effet, l'activité biologique et la structure des sols sont maintenues après le traitement. En plus, le coût de la technique est bien moindre que celui de procédés traditionnels in situ et ex situ et varie selon les contaminants. D'autre part, les plantes permettent de conserver un paysage agréable (reverdissement et

floraison), et aussi d'installer une communauté de microflore et de microfaune métallo-résistantes pouvant agir en synergie avec ces plantes afin d'accélérer le processus de décontamination.

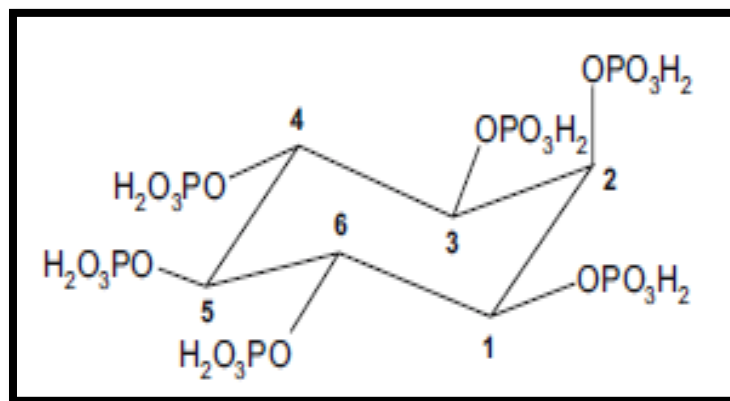
Les plantes peuvent être facilement surveillées et récoltées à des fins de traitement et la biomasse végétale réutilisée (Kumar et al., 1995; Blaylock et Huang, 2000; Garbisu et Alkorta, 2001).

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

VI. L'acide phytique

VI.1. Structure chimique et localisation

L'AP est un constituant des plantes qui représente 1 à 5 % du poids sec des grains de céréales, de plantes oléagineuses et des légumineuses. C'est une forme organique de phosphore dont la Nomenclature chimique est le myo-inositol 1, 2,3, 4, 5,6-Hexakisphosphate (InsP6) et de formule brute $C_6H_{18}O_{24}P_6$



Figure(02) : Structure chimique de l'acide phytique .Acide phytique: myo-inositol Hexakisphosphate (InsP6)

VI.2. Aspects physico-chimiques

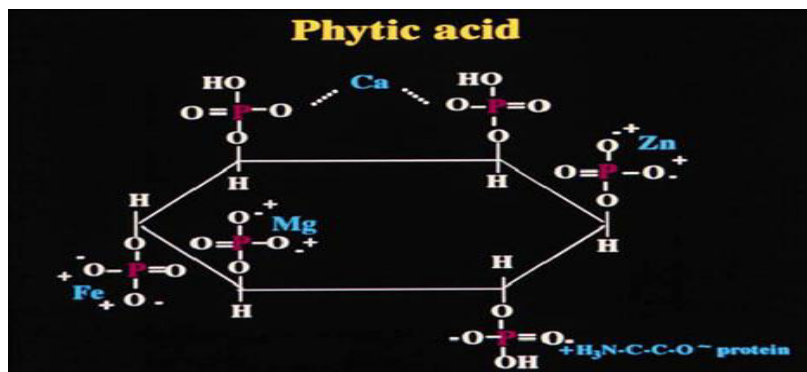
L'acide phytique ou acide myoinositol hexa-phosphorique (IP6) est un composé d'un radical inositol estérifié par 6 radicaux phosphate eux-mêmes impliqués dans des liaisons avec les cations. C'est un composant essentiel des graines (céréales et légumineuses), généralement classé avec les fibres pour les implications nutritionnelles. Toutefois, il est clairement démontré que ce sont les phytates, plus que les fibres (celluloses, hémicelluloses, pectines, etc.) qui sont responsables des problèmes de disponibilité minéraux, notamment Ca, Mg, Zn, Fe, Cu (revue de Pointillart et Guéguen 1992). Chez le porc, la maladie du son (ostéofibrose avec atrophie du groin) ainsi que le para kératose (carence en zinc pouvant être liée à une consommation excessive d'issues de céréales) (Oberleas et al 1962) constituent des exemples historiques des effets d'un excès de P phytique alimentaire Sur l'indisponibilité des minéraux d'intérêt nutritionnel. La molécule présente une teneur élevée en P (28,2%) et ses 6 radicaux acides phosphoriques ont une affinité variable pour les divers cations. [Ref](#)

VI.3. Métabolisme

L'acide phytique représente à la fois une réserve de phosphore et de glucide qui seront utilisés par la plantule lors de la germination. Dans ce cas, l'acide phytique doit être hydrolysé pour libérer les ortho phosphates et l'inositol, l'enzyme (ou les enzymes suivant les espèces végétales) responsable étant une acide phosphatase particulière, la phytase, (EC 3138). La déphosphorylation de l'acide phytique (IP6) aboutit à de l'inositol-5 phosphates (IP5), -4 phosphates (IP4), -3 (IP3), -2, (IP2), -1 phosphate (IP1), les 3 derniers produits étant susceptibles de passer la barrière intestinale (l'inositol-3-phosphates, IP3, est un médiateur biochimique cellulaire connu). Dans les graines, la quasi totalité de l'acide phytique est constituée d'inositol-6 phosphates mais la trituration, le broyage, l'humidification, peuvent amorcer l'hydrolyse, au moins chez les graines à forte activité phytasique, et parfois des proportions significatives d'inositol phosphates (ref)

VI.4. Facteur antinutritionnel et problèmes environnementaux:

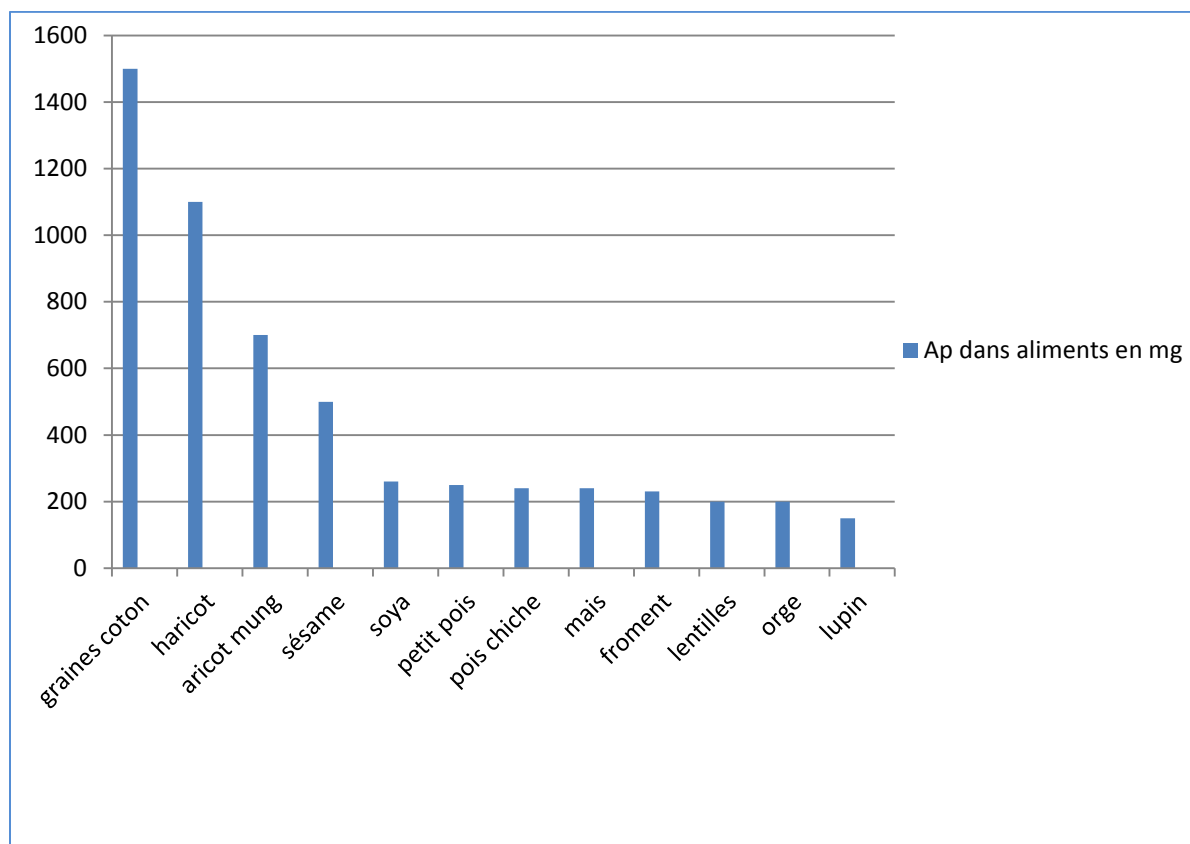
Le phytate représente la forme majeure de stockage du P dans les plantes et principalement dans les grains de céréales qui sont aussi les principaux ingrédients utilisés en alimentation animale. Cependant, l'AP possède de nombreuses propriétés anti-nutritionnelles pour les animaux monogastriques comme pour les humains. D'une part, l'AP a un effet chélateur puissant à différents cations tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} qui entrave leur disponibilité et contribue à des carences minérales (Maga et al., 1982; Raboy, 2009; Veum et al., 2009). Aussi, des interactions entre l'AP et les protéines, lui confèrent des propriétés d'inhibition enzymatique, (Harland et Morris, 1995) spécialement l' α -amylase, ce qui empêche la digestion de l'amidon



Fig(03) : Structure de l'acide phytique représentant les six phosphates avec les différentes possibilités d'interagir tant avec des cations métalliques qu'avec des résidus des protéines (Parra, 2001)

VI.5. La teneur AP dans divers aliments :

D'après un article de la revue Getreid Mehl and Brot DES Années 1990



Figure(04) : La teneur AP dans divers aliments

D'après un article de la revue Getreid Mehl and Brot DES Années 1990

Chapitre II.
Matériels et méthodes

I. Matériel et méthodes :

Le chapitre Matériel et méthodes décrivant les procédures expérimentales mises en œuvre pour l'évaluation de l'effet du plomb et acide sur la plante de l'orge, ainsi que l'effet d'atténuation de la toxicité des métaux lourds par l'acide phytique.

I.1. Le matériel végétal et condition de culture :

I.1.1. Matériel végétal :

La variété de l'orge (*Hordeum vulgare* cv. Saida) constitue la base de l'alimentation algérienne d'où leur grande consommation. Les graines sont fournies par ITGC de Saida. Le choix de cette plante revient à leur haut rendement et sa résistance à divers contraintes. Les paramètres phénologiques, les paramètres morphologiques et le degré de tolérance aux stress abiotiques sont dans le tableau ci-dessous :

Variété	Origine	Caractéristiques agronomiques et culturales	Caractéristiques technologiques	Résistance aux maladies et aux différentes conditions climatiques
SAIDA	Variété d'orge locale	Rendement élevé (elle occupe 72% du sol semencier de l'orge) (INRAA, 2006)	- PMG : élevé - Mitadinage : résistante	- Rouilles : moyennement sensible - Oïdium : très sensible - Résistante à la sécheresse et au froid

Tab.03 : les caractéristiques agronomiques de la variété de l'orge Saida.

I.1.2. Condition de l'essai et traitement :

L'essai a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie végétale de département de biologie et le laboratoire de chimie de la faculté des sciences (l'université de Saida).

Les graines sont sélectionnées et désinfectées par l'hypochlorite de sodium à 2% pendant 5 min pour éliminer toute contamination fongique puis rincée rigoureusement et abondamment à l'eau distillée 3 à 4 fois pendant 5 minutes puis séchés avant la mise en germination Figure (1). Elles sont ensuite, mises à germés dans des boites de pétri sur des papiers filtre (10 graines par boite), pendant 5 jours dans l'étuve a température 20c°. Après, les plantules (stade de la première feuille apparue) ont été transplantés dans des pots en plastique remplis avec la même quantité de substrat (2/3 terreau et 1/3 sable). Ces plantes sont

traitées par un métal lourd (plomb) et l'acide phytique et arrosé par solution nutritif, à raison de quatre concentrations différentes :

Lot 1 : 1% d'acide phytique

Lot 2 : 2% d'acide phytique

Lot 3 : 2 % d'acide phytique + 2Mm du plomb

Lot 4 : 2mM du plomb

Lot5 : lot témoin (eau distillée)



Figure (05) : la germination dans les boîtes de petri

a. le substrat :

Le substrat utilisé est constitué du mélange du sable et de terreau industriel à des proportions respectives de 1 volume de sable avec deux volumes de sol. Avant d'utiliser le sable, il doit subir plusieurs opérations de préparation, en premier lieu il a été tamisé avant d'éliminer les débris végétaux et animaux pour obtenir du sable fin, puis rincé abondamment à l'eau de robinet, ensuite trempé dans une solution de HCl diluée dans l'eau distillée de 1/5 pour éliminer les sels (chlorures, les carbonates), le sable est ensuite rincé plusieurs fois par l'eau distillée, et séché à l'air libre (**Figure.06**).



Figure(06) : préparation de substrat
(Mélange de 2 /3 terreau et 1/3 sable)

II.2. Récolte et préparations des plantes pour les analyses ultérieures :

Les plantes sont récoltées après 20 jours de traitements. Une fois débarrassées de leur substrat, les racines sont rincées dans l'eau distillée, puis séchées sur du papier filtre. Pour chaque plante, la partie aérienne (les feuilles et les tiges) et la partie souterraine (les racines) sont séparés pour doser chacun à part.

II.3. Paramètres étudiés :

Les paramètres morphologiques des plantes (nombres des feuilles et racines, hauteur de partie aérienne et racinaire, longueur des feuilles) ont été réalisés chaque semaine de l'exposition de plomb et l'étude des paramètres physiologiques ont été réalisés à la fin de l'expérimentation.

II.3.1. Paramètres morphologiques :

II.3.1.1. Pourcentage de germination :

C'est le pourcentage maximal de grains germés sur le nombre total de grains mis à germer, elle s'exprime en pourcentage (%) selon la formule suivante. Rappelons que la germination des grains est considérée positive quant les radicules atteignent 5mm de longueur (**Kaur et Duffus ; 1989**).

$$\text{Taux de germination \%} = \frac{NG}{NGG} \times 100$$

NG: nombre de graines germées.

NGG: nombre de graines mises à germer.

II.3.1.2. Vitesse de germination :

La vitesse de germination est déterminée par la formule suivante (**Haddad, 2001**) :

$$VG : (ngg_1^{1^{er}} \text{ jour})/1 + (ngg_2^{2^{ème}} \text{ jour})/2 + \dots + (ngg_n^{n^{ème}} \text{ jour})/n$$

VG : vitesse de germination.

Ngg : nombre de graines germées.

Mesure des paramètres de croissance :

- **Nombre moyen des feuilles :**

Le nombre de feuilles de chaque plant a été déterminé à partir de la deuxième semaine durant l'expérimentation.

- **Nombre moyen des racines :**

Chaque graine qui a germé est retirée de la boîte de Pétri puis le nombre de racines est déterminé. Le nombre moyen de racines est établi pour chaque graine, pour chaque condition de traitement et pour le temps de germination.

II.3.2. Paramètres biochimiques:

II.3.2.1. Détermination des concentrations des pigments photosynthétique :

Les concentrations des chlorophylles a, b ont été évaluées en adoptant la méthode donnée par **Arnon (1949)**. Les mesures optiques ont été mesurées à des longueurs d'onde de 663 et 645 nm.

Les concentrations de ces pigments a été calculé selon les fiches de Lichtenthaler et Wellburn (1985)

- 0,5 g des feuilles coupés dans un mortier maintenu à la glace + une pincée de sable stérilisé et une pincée de carbonate de calcium (CaCO₃) pour neutralisée l'acidité du milieu
- L'ensemble est broyé avec 4ml d'acétone à 95 %
- Le broyat est centrifugé à 2500 t /5min
- 1ml de surnageant est prélevé + 4ml d'acétone à 95% (En agitant bien le mélange).
- La densité optique (Do) des extraits pigmentaires est lue respectivement à 645 et 663 nm

Les concentrations en mg /l de solutés des chlorophylles sont données par les formules suivantes (**Taffouo et al, 2008**)

$$Ch a = 12,7 - 2,69 x \quad \text{Où :}$$

$Ch\ b = 22,99\ x - 4,68\ y$ x : est l'absorbance de chlorophylle à 645 nm .

$Ch\ (a+b)=20,21\ x +8,02\ y$ y : est l'absorbance de chlorophylle à 663 nm .

II.3.2.2. Détermination des concentrations des sucres solubles totaux :

Les sucres solubles sont dosés selon **Dubois et al, 1956**. L'absorbance est mesurée à 485nm

- 100 mg de racines ou feuilles mise dans des tubes à essai.
- L'extraction des sucres solubles se fait après macération du végétal dans de l'éthanol à 80 % (2ml) pendant 48 heures à l'obscurité.
- Au moment du dosage, les tubes sont placés dans l'étuve à 80°C pour faire évaporer l'alcool.
- Dans chaque tube, on ajoute 20 ml d'E .D à l'extrait (C'est la solution à analyser).
- Dans des tubes à essai propres, on introduit 1ml de phénol à 5%.
- Les tubes sont soigneusement agités.
- Ajouter à l'aide d'une pipette 5ml d'acide sulfurique concentré 96%.
- Vortex, les tubes sont maintenus à 100°C pendant 5 min.
- Refroidir les tubes dans un bain glacé.
- Placer les tubes à l'obscurité pendant 30 min.

Les mesures d'absorbance sont effectuées à une longueur d'onde de 492 nm ou 480 nm.

La courbe d'étalonnage est réalisée selon l'équation suivant : $Y=39,94\ X$

II.3.2.3. Dosage des protéines :

Les protéines sont dosées selon la méthode de **Bradford(1976)**, par comparaison avec une gamme étalon réalisé avec le bleu brillant de Coomassie G250 comme réactif et le sérum d'albumine bovine (BSA) comme standard.

Les absorbance sont lues à une longueur d'onde de 595nm

Le dosage s'effectue en 3 étapes:

1.Préparation de l'échantillon: (0.1g) de l'échantillon de chaque concentration est broyé dans un mortier avec 5ml d'eau distillée, puis filtré et versé dans des tubes avec 5 autres contenant de l'eau distillée.

2. Préparation de réactif de Bradford: Pour préparer ce réactif, il faut prendre 0.1g de BBC (Bleu brillant de Coomassie), lui ajouter 50ml d'éthanol à 95% puis le placer sur un agitateur pendant 2 heures. Rajouter ensuite 100ml d'acide ortho phosphorique à 85% et compléter à l'eau distillée jusqu'à 1 litre.

3. Préparation de la solution mère :

Solution mère de BSA (Albumine Sérum de Bœuf) à 1mg / ml dans de l'eau distillée.

- BSA = 1mg
- Eau distillée = 1 ml

Réalisation de la gamme détalonnage :

Tube à essai	1	2	3	4	5	6
BSA (µl)	0	20	40	60	80	100
H2O distillée (µl)	100	80	60	40	20	0
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4
BSA (µg)	0	20	40	60	80	100

- Agiter les tubes par vortex.

- Lecture des absorbance à une longueur d'onde de 595 nm \implies Coloration bleue.

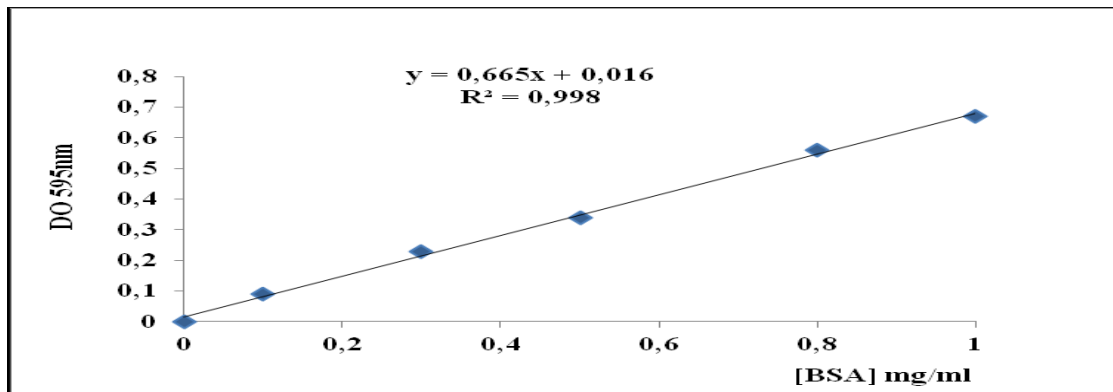


Figure (7) : La courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.

Dosage des échantillons :

- 100 μ l du surnageant + 4 ml de BBC.
- Agiter les tubes par vortex.
- Lecture des absorbance à 595 nm
- Contre un blanc avec 100 μ l d'eau + 4 ml de BBC

II.3.2.4. Evaluation de la peroxydation lipidique (Dosage du MDA):

Le principe de ce dosage est basé sur la condensation de MDA en milieu acide et à chaud avec l'acide thiobarbuturique. La réaction entraîne la formation d'un complexe de couleur rose entre deux molécules d'acide thiobarbuturique qui peut être donc mesuré par spectrophotométrie d'absorption à 530 nm.

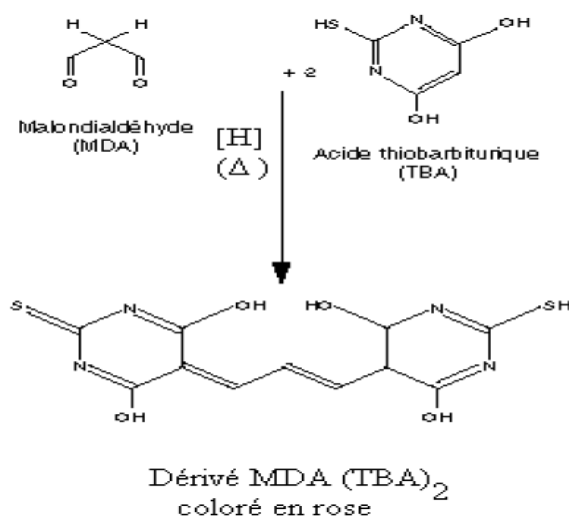


Fig.07 : Principe du dosage du Malondialdéhéhyde.

Extraction :

- 1g de MF homogénéisé dans 5ml de TCA 0,1 % dans un mortier maintenu à la glace
- Le broyat est centrifugé à 12000T /min
- Le surnageant est récupéré pour le dosage du MDA et H₂O₂.

Détermination de la concentration des Malondialdéhéhyde (MDA) :

- 1ml de surnageant +1ml de TBA 0,5 % dans TCA 20%
- Le mélange est incubé à 95° pendant 30 min
- Refroidissement dans un bain glacé
- Centrifugation à 12000T /min pendant 20 min

Mesurer l'absorbance par spectrophotomètre à 532 nm.

Calcul de la concentration

On calcule la concentration de MDA exprimé en nanomoles par milligramme de protéines (nmol/mg prot) selon la formule suivante :

$$C = \frac{DO \cdot 10^6}{\epsilon \cdot \chi \cdot L \cdot Fd}$$

- C : Concentration de MDA en nmoles/mg de protéines;
- DO : Densité optique lue à 530 nm ;
- ϵ : Coefficient d'extinction molaire du MDA, $\epsilon_{MDA} = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;
- L : Longueur du trajet optique = 1 cm ;
- χ : Concentration du surnagent en protéines (mg/ml) ;
- Fd : Facteur de dilution, Fd

II.3.2.5 Détermination des concentrations de la prolines

La prolines a été dosée par la méthode de (troll et lindsley 1955, modifiée par monneveux et Nemmar 1986).

Pour chaque échantillon. 100 mg de MF coupé en petites morceaux, introduit dans un tube à essai + 2ml de méthanol à 40% l'ensemble a chauffé au bain marie à 85°C pendant 60min

Les tubes sont fermés pour éviter la volatilisation de l'alcool.

après refroidissement, on prélève 1 ml d'extrait auquel est ajouté 1ml d'acide acétique (CH_3COOH), 1ml d'un mélange contenant (12ml d'eau distillée, 30ml d'acide acétique, 80ml d'acide orthophosphorique (H_3PO_4 , densité 1.7)) et 25 mg de ninhydrine.

La solution est portée à ébullition pendant 30 min elle vire progressivement au rouge

Après refroidissement on ajoute 5ml de toluène à la solution, après agitation 2 phases se forment

- ✓ La phase inférieure sans proline
- ✓ La phase supérieure qui contient la proline est récupérée et déshydratée par l'adjonction de Na_2SO_4 anhydre.

La densité optique est déterminée par un spectromètre à la longueur d'onde 528nm

En fin les valeurs obtenues sont ensuite reportées sur la courbe d'étalonnage.

La gamme étalon se fait par un mélange (acide acétique, eau distillée, acide orthophosphorique et ninhydrine).

L'équation permettant l'obtention de la courbe d'étalonnage est **$Y=0.027X$**

Résultat et Discussion

Résultats : Atténuation du stress métallique par l'acide phytique :

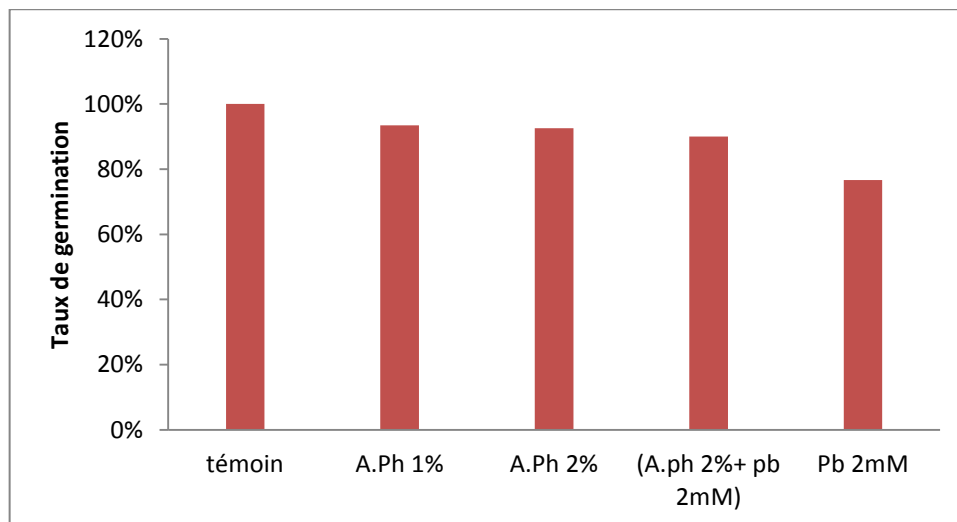
I. Evaluation des paramètres morphologiques :

I.1. Taux de germination :

On a testé quatre concentrations de : (2mM Pb, 1%AP, 2% AP, 2mM Pb +2% AP) et un témoin (eau distillée), la germination se fait dans des boites de pétri pendant 7 jours :

Tableau(5) : Influence de plomb et d'acide phytique sur le taux de germination des graines d'orges.

	témoin	AP 1%	AP 2%	(AP 2%+ Pb 2mM)	Pb
taux de croissance	100%	93,40%	92,52%	90,03%	76,66%



Figure(09) : Influence de plomb et d'acide phytique sur le taux de germination des graines d'orges.

Le plomb à concentration élevée (2mM) provoque une légère diminution du taux de germination. Tandis que le lot acide phytique plus le plomb, on remarque une amélioration dans le pourcentage de germination et de croissance de l'orge.

I.2. Vitesse de germination :

La vitesse de germination est déterminée par la formule suivante (Haddad, 2001) :

$$VG : (ngg\ 1^{er}\ jour)/1 + (ngg\ 2^{ème}\ jour)/2 + \dots + (ngg\ n^{ème}\ jour)/n$$

VG : vitesse de germination.

Ngg : nombre de graines germées.

L'observation du graphe montre qu'il n'y a pas de différence remarquable dans la vitesse de germination dans tous les lots testés. La valeur la plus élevée est enregistrée chez les plantes témoin par rapport aux plantes traitées.

Tableau (06) : vitesse de germination des graines d'orge en fonction de concentrations testées.

	Témoin	AP1%	AP 2%	AP 2%+ Pb 2mM	Pb 2Mm
V.G	23,49	20,66	18,77	19,38	20,66

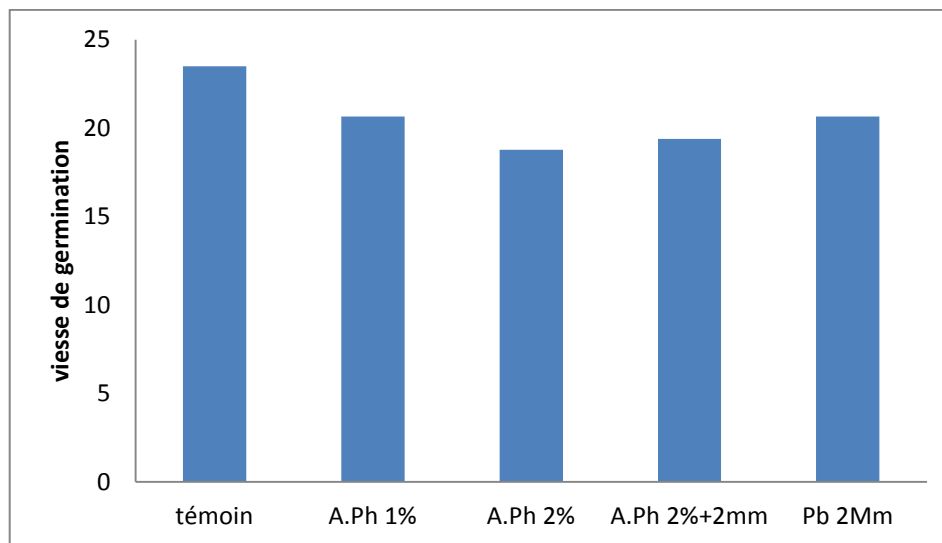


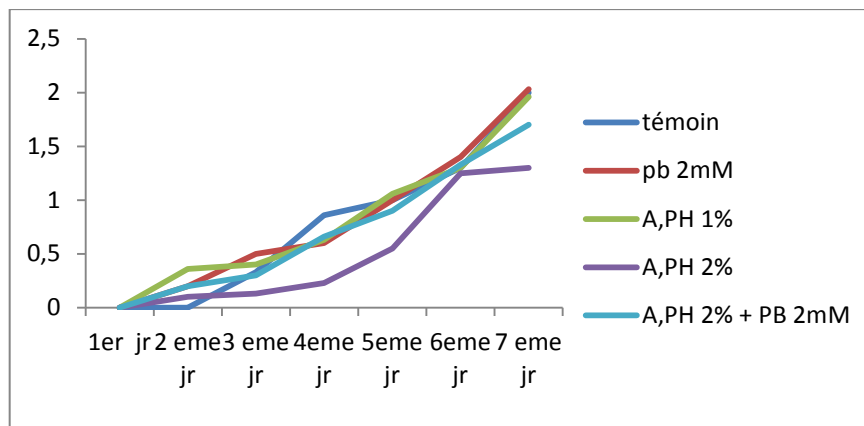
Figure. 10 : Vitesse de germination des graines d'orge en fonction des concentrations utilisées.

1.3. Nombre moyen des feuilles :

Durant l'essai, on remarque une petite diminution de l'espaces foliaire au niveau des plantes traité par AP 2%, mais concernant les autres lots testés et mêmes les témoins ont une croissance presque similaire.

Tableau (07) : Effet des différentes concentrations sur l'évolution de nombre des feuilles.

	J1	J2	J4	J4	J5	J6	J7
témoin	0	0	0,33	0,86	1	1,3	2
pb 2mM	0	0,2	0,5	0,6	1	1,4	2,03
A,PH 1%	0	0,36	0,4	0,63	1,06	1,3	1,96
A,PH 2%	0	0,1	0,13	0,23	0,55	1,25	1,3
A,PH 2% + PB 2mM	0	0,2	0,3	0,66	0,9	1,33	1,7



Figure(11) : Effet des concentrations sur l'évolution de nombre moyen des feuilles.

I.4. Nombre moyen des racines :

Le tableau 08 montre que le nombre moyen des racines chez les différents lots testés, les racines ont un développement similaire alors on a conclu que le plomb n'a pas d'effet sur le développement des racines. L'effet d'acide phytique plus le plomb n'a pas affecté la croissance foliaire.

Tableau (08): Effet des différentes concentrations utilisées sur l'évolution des racines en fonction du temps.

	1er jr	2 eme jr	3eme jr	4eme jr	5eme jr
Témoin	0,7	1,25	2,39	3,34	4,75
AP 1%	0	1	3,96	4,3	4,72
AP 2%	0	0,9	2,51	3,72	4,09
AP2%+ Pb 2mM	0,23	1,39	2,78	3,51	4,24
Pb 2Mm	0	0,81	2,5	3	4,3

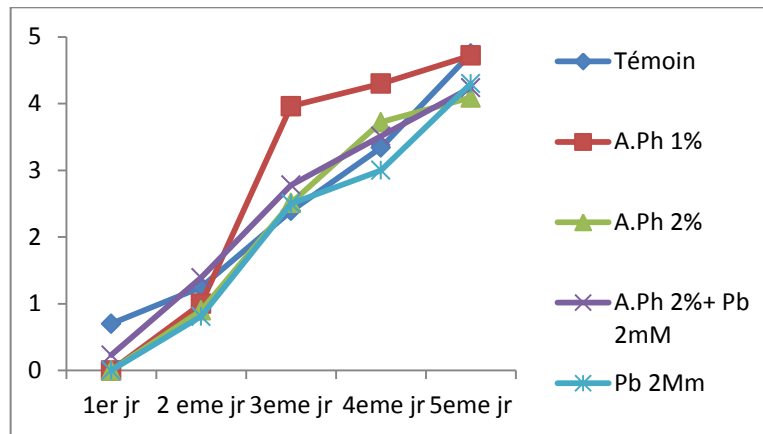
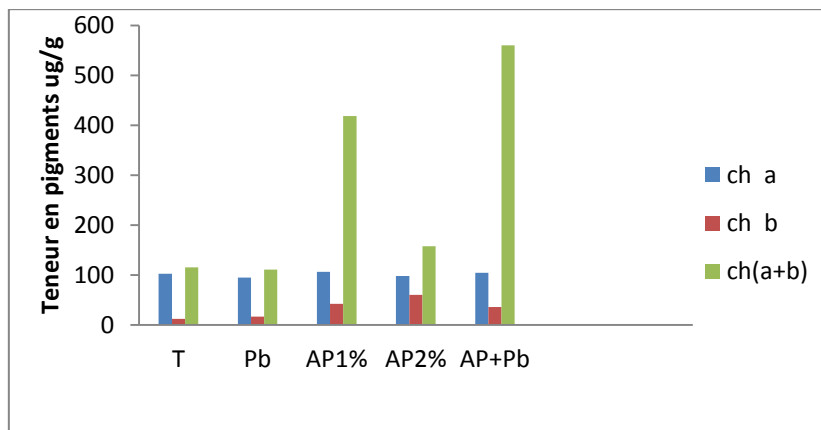


Figure (12) : Effet des différentes concentrations utilisées sur l'évolution des racines en fonction du temps.

II. Evaluation des paramètres biochimiques :

II.1. Influence de l'acide phytique sur la synthèse de pigments photosynthétique :



Figure(13): Effet du Pb sur le contenu en pigments: chlorophylle (a), chlorophylle (b), chlorophylle (a+b).

Les teneurs en chlorophylle a et b et a+b les plus faibles sont enregistrées au niveau du traitement Pb (94.6 g/ ug pour la chl a et 16.4 pour la chl b et 110.8 pour la chl(a+b).) et ceci après 20 jours de croissance. On note aussi une augmentation de la teneur en chl a et en chl b dans les traitements AP+Pb et AP1% comparativement au AP2%. Bur--3-4zyinski, 1984 a

souligné l'effet inhibiteur de certaines concentrations de plomb sur la biosynthèse de l'acide γ aminolévulinique, le précurseur de la biosynthèse de la chlorophylle. Selon certains auteurs (Balsberg Pahlsson, 1989; Kumar et al., 199; Fargasova, 1994; Xiong, 1997; Bazzaz et Rolfe, 1975) le plomb inhibe la photosynthèse et perturbe le transport des électrons à travers la chaîne photosynthétique. Il est à signaler que la croissance des jeunes plantules exposées aux concentrations en nitrate de plomb est arrêtée, l'arrêt de la croissance peut être expliqué par l'inhibition exercée par ce métal sur les enzymes et le métabolisme générale de la plante. Plusieurs auteurs ont souligné l'effet accélérateur du Pb sur l'oxydation cellulaire et l'apparition des radicaux -OH libres et les peroxydes d'hydrogènes.

D'après cette expérience nous constatons que l'ajout de l'acide phytique a inhibé la toxicité du plomb par chélation de ce dernier. Des travaux de recherche ont mentionnée le pouvoir chélateur puissant de l'acide phytique des métaux lourds que ce soit sur le modèle végétal ou animal.

II.2. Effet de l'acide phytique sur la teneur en Malondialdéhyde (MDA) :

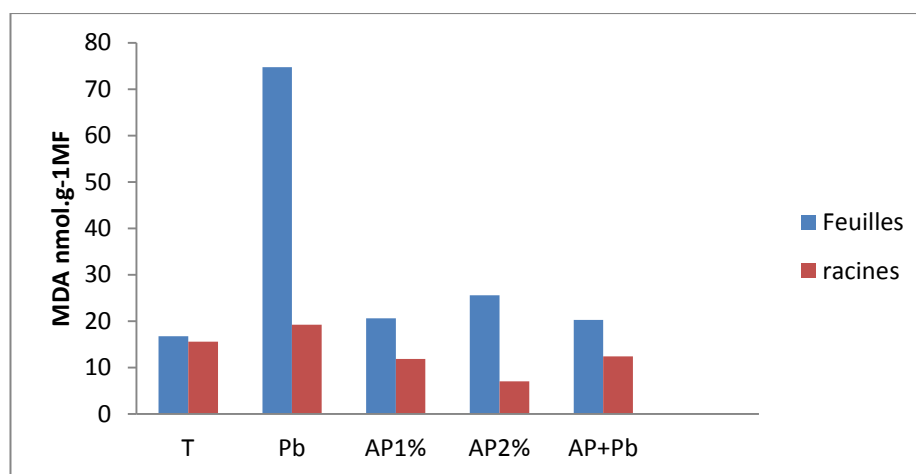


Figure 14: Effet de Pb et acide pythique sur la teneur en MDA au niveau des feuilles et des racines.

Nos résultats montrent que les concentrations du MDA augmentent dans les feuilles et les racines des plantes de l'orge traitées avec du plomb à concentration de 2Mm par rapport à celles du témoin. Cependant, l'addition de concentrations d'acide phytique a réduit la synthèse du MDA chez les lots traités par le plomb au niveau des feuilles et des racines. L'effet positif d'acide phytique a été plus prononcé au niveau des racines des plantes de

l'orge traitées par le Pb. En effet, Alayat et al., 2015 ont estimé que la diminution des concentrations du MDA dans les racines des plantes traitées au cadmium et au chrome en présence du silicium.

II.3 .Effet de plomb sur la teneur en proline :

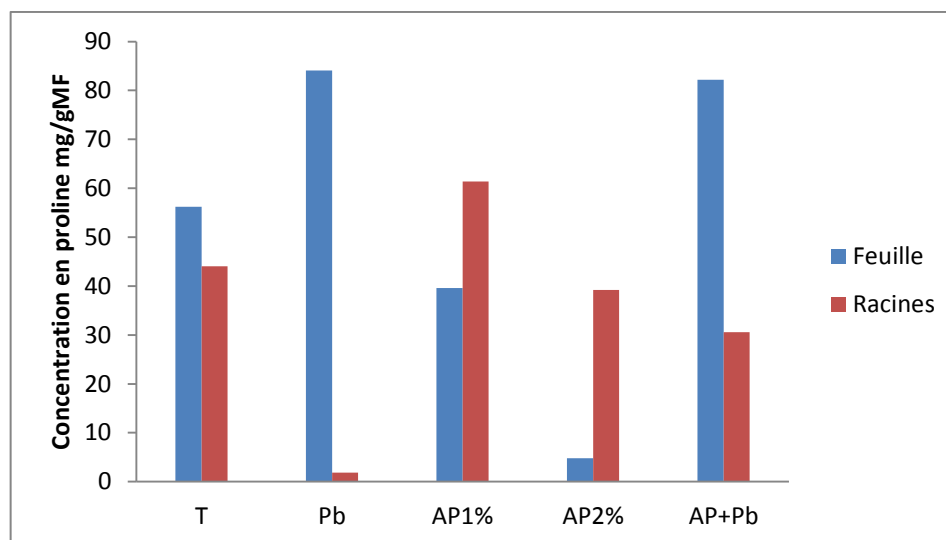


Figure 15: Effet de Pb et acide phytique sur la teneur en proline au niveau des feuilles et des racines.

II.4. Effet de l'acide phytique sur l'accumulation de la proline :

Nos résultats montrent après 20 jours de la croissance la teneur la plus faible en proline a été enregistrée dans le traitement Pb chez les racines et Ap2% chez les feuilles. La quantité de proline tend à augmenter en fonction de l'augmentation de la dose en nitrate. La valeur la plus élevée en proline a été signalée dans le traitement Pb; Ap+Pb feuilles. La proline participe aux maintien de la balance de la force osmotique (Bouzoubaa et al., 2001). Elle participe à la préservation de l'intégrité membranaire (Derbyshire, 1974). Elle semble intervenir dans la stabilisation des structures cytoplasmiques soumises au stress. La présence de la proline diminue les peroxydations lipidiques en conditions de stress (Alia et al., 1991). On observe une concentration moyenne en proline marquer dans le traitement témoin et Ap1% car la proline fonctionne de façon normale et une diminution de la teneur en proline dans le traitement Ap2%. L'accumulation de la proline est l'une des manifestations les plus remarquables chez les plantes pour limiter les effets du stress métallique afin de réaliser l'ajustement du potentiel osmotique dans le cytoplasme (Sannada et al, 1995 ; Belkhodja et Benkabilia, 2000). Ces

données trouvent leur confirmation par (Aspinal et Paleg ;1981) qui a signalé que la proline est l'acide aminé le plus caractérisé des plantes soumises au stress métallique, l'importance de la proline comme indicateur de toxicité de Plomb semble jouer un rôle protecteur des membranes et des systèmes enzymatiques.

En fonction des conditions du milieu, les plantes peuvent absorber une partie du plomb présent dans le sol. Les ions Pb^{2+} diffusent dans la racine, mais sont bloqués par la barrière physique que représente l'endoderme, ce qui limite fortement leur translocation vers les parties aériennes. Bien que les plantes possèdent de nombreux systèmes de détoxification pour limiter l'interaction de ces ions avec les molécules biologiques, c'est pour cela, on observe une différence ou une disproportion de la concentration entre les feuilles et les racines.

II.5.Effet de plomb sur la teneur en protéine :

Nos résultats montrent l'effet de l'acétate de plomb sur la teneur en protéines des feuilles et des racines de la plante de l'orge (*Hordeum Vulgare L.*).

1. Teneur foliaire en Protéines:

Les résultats affichés sur la figure (16) représentent la variation de la teneur en protéines dans les feuilles de l'orge (*Hordeum Vulgare L.*) en fonction des traitements de concentrations de Pb et Ap pendant 20 jours de croissance. Au vu de cette représentation graphique nous constatons qu'il n'y a pas de différence dans l'augmentation de la teneur protéique foliaire par rapport au témoin. Nous observons une légère diminution du taux de protéines chez les feuilles traitées par le plomb.

2. Teneur des racines en protéines

La variation de la teneur protéique des racines sous l'effet de Pb et AP chez *Hordeum Vulgare L.* est représentée par la figure (16). L'effet de l'acide phytique sur la teneur protéique racinaire est similaire que les feuilles. Alayat et al., 2015 ont trouvé que l'application de silicium a réduit la teneur des protéines dans les feuilles et racines

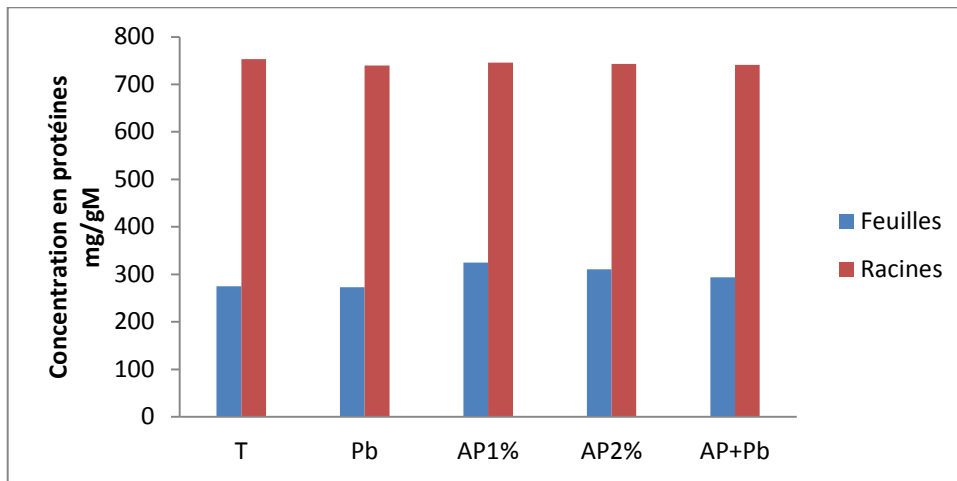


Figure16 : Effet de Pb et acide phytique sur la teneur en protéine

II.6.Effet de l'acide phytique sur la teneur en sucres :

Les résultats moyens de taux des sucres dans les feuilles et les tiges de l'*Hordeum Vulgare* L. montrent que le taux des sucres dans les parties aériennes augmente dans le lot qui reçoit que du plomb (2mM). Pour la même concentration de plomb, la présence de chélateur n'a pas affecté le taux de sucre dans les feuilles et racines.

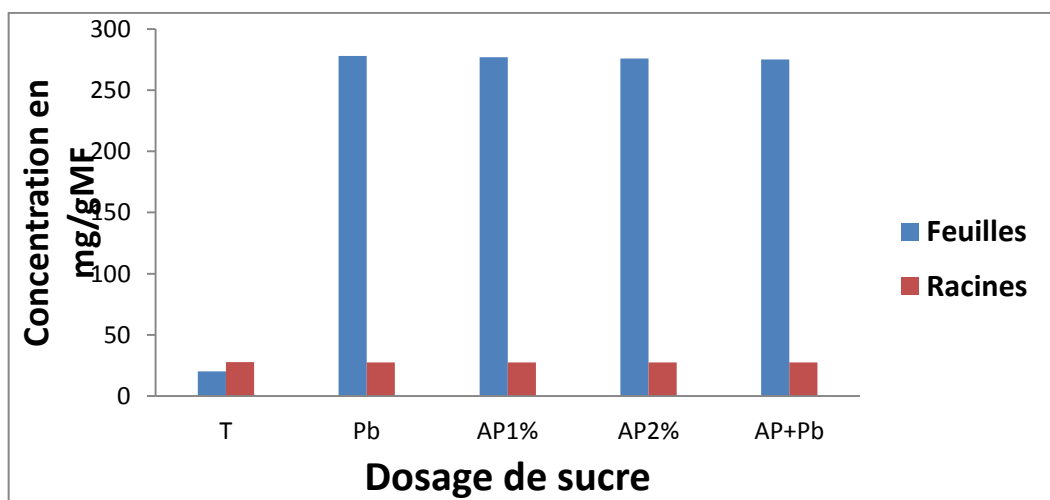


Figure17: Effet de Pb et acide phytique sur la teneur en sucres.

On peut conclure que le taux des sucres au niveau des parties aériennes est plus important qu'au niveau racinaire dans tous les lots testés. On constate que les sucres solubles totaux contribuent fortement à l'ajustement osmotique chez les plantes en conditions de stress (Ben Hassine A. et Bouzid S., 2008). Ils compromettent indirectement la croissance puisque les glucides ne sont pas directement métabolisables et, d'autre part, parce qu'il est aujourd'hui clairement établi que l'accumulation des sucres solubles totaux peut modifier certains paramètres de la photosynthèse en inhibant l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'assimilation du CO₂ (Koch, 1996).

Sous l'action de plomb, les plantes de *Hordeum Vulgare* L. synthétisent et accumulent des quantités plus importantes des sucres dans les parties aériennes. De plus, notre étude a montré que la présence de chélateur (AP) influe d'une façon remarquable sur les teneurs en sucres solubles des parties aériennes des plantes de l'orge. Le pouvoir phytoaccumulateur en plomb de *Hordeum Vulgare* L. a été investigué à travers cette étude dont on a appliqué une concentration élevée de plomb pour mettre en évidence les potentialités accumulatrices de cette espèce.

Conclusion et respectivement

Conclusion et respectivement

Conclusion

Concernant les métaux lourds, leurs effets sur les écosystèmes locaux et les mécanismes de leurs transferts, du sol aux organismes vivants (notamment les plantes), sont encore mal compris. Il est donc très difficile de prévoir leurs effets à long terme, de modéliser le devenir des polluants d'un site contaminé, d'en évaluer les risques et donc de choisir une stratégie de remédiation. L'utilisation de l'acide phytique comme outil d'atténuation des effets délétères des métaux lourds chez les plantes s'avère être une approche prometteuse afin de limiter et réduire les dommages oxydatifs causés par le stress métallique. En effet, l'acide phytique élément minéral est connu pour ses effets bénéfiques pour la croissance des plantes et le rendement de différentes cultures.

Un des objectifs de ce travail a été donc d'étudier les effets de métaux lourds (plomb) sur l'Orge, céréales très consommées en Algérie. Pour répondre à cet objectif, la démarche adoptée dans le cadre de ce travail, a donc consisté à rechercher chez nos modèles biologiques les réponses (morphologiques, physiologiques, métaboliques et antioxydantes) et les mécanismes de résistance et de tolérance aux métaux lourds. Chez les végétaux, l'effet le plus visible des métaux lourds est une inhibition de croissance qui s'accompagne très souvent de chloroses et d'importantes lésions nécrotiques. 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 qui conduit finalement à l'inhibition de certaines activités physiologiques comme la photosynthèse et la respiration.

Ainsi d'après nos résultats, les stress causés par le plomb, engendrent des désordres dans la croissance des plantes étudiées (*Hordeum vulgare*). Ces altérations se manifestent, à l'échelle de la plante entière, par une réduction de l'élongation racinaire. Ces altérations sont plus importantes dans les racines comparées aux feuilles des plantes des céréales traitées par les différentes concentrations. Le système racinaire semble être plus affecté par le stress métallique. Ceci pourrait être expliqué par l'accumulation et la répartition du métal au sein de la plante. Les racines semblent jouer le rôle d'organe piège pour le métal afin de limiter les effets destructeurs du métal dans les feuilles.

Les excès du plomb ont provoqué une réduction des concentrations des pigments photosynthétiques, une perturbation de la biosynthèse des protéines totales et une synthèse importante de deux osmolytes : la proline et les sucres solubles en raison de leurs rôles d'indicateurs potentiels de tolérance au stress.

Conclusion et respectivement

A la lumière de l'ensemble des résultats que nous avons présenté, il semble que les réponses des plantes de l'orge étudiées aux stress causés par le plomb sont très complexes.

Les mécanismes de défense des plantes des l'orge n'ont pas pu réguler les concentrations des ROS produits par les stress métalliques appliqués. Ceci indique que parfois les enzymes antioxydantes ne sont pas un système de défense suffisant contre la production drastique des ROS.

Dans cette optique, le second objectif de notre travail s'est développé qui a été d'évaluer l'effet du acide phythique comme un moyen d'atténuation des dommages oxydatifs engendrés par les stress métalliques étudiés chez l'orge. Pour réaliser cet objectif, nous nous sommes consacrés à l'étude de l'effet du acide phythique sur quelques marqueurs du stress oxydant, sur les réponses enzymatiques, ainsi que sur la croissance des plantes des

Lorge soumises aux stress métalliques (plomb).

Les résultats acquis ont confirmé les effets bénéfiques de l'acide phythique sur la croissance des plantes étudiées et sur l'atténuation des dommages oxydatifs subis par les traitements des deux métaux lourds. Selon nos résultats, il apparait que l'application du l'acide phythique améliore la croissance et le développement des plantes de l'rge soumises ou non au stress métallique. Le prétraitement des plantes avec l'acide phythique favorise l'accroissement foliaire et racinaire des lots exposés aux fortes concentrations du plomb. Ceci indique que l'acide phythique a un effet positif sur la croissance des plantes en améliorant leur tolérance au stress métallique, en limitant les pertes d'eau et en optimisant la nutrition hydrominérale des plantes, ainsi qu'en réduisant l'absorption et la translocation de ces métaux lourds (Shi *et al.*, 2005; Nwugo *et al.*, 2008; Kaya *et al.*, 2009 ; Bouzoubaa *et al.*, 2009 ; Ahsan Farooq *et al.*, 2013).

D'autre part, le prétraitement des plantes des céréales par le acide phythique pourrait nettement améliorer la capacité de défense contre les dommages oxydatifs induits par la toxicité du plomb

En conclusion, nos résultats montrent que l'acide phythique peut atténuer les perturbations induites par le stress métallique et devenir une solution pratique afin de protéger

Conclusion et respectivement

les plantes contre les dommages oxydatifs, conduisant à une meilleure tolérance aux métaux lourds.

REFERANCE

(A)

Asada K (2006). "Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions." *Plant Physiology* 141: 391-396.

Asada K (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants. C. H. Foyer and P. M. Mullineaux. Boca Raton, CRC Press: 77-104

Alloway, B.J. et Ayres, D.C., 1997. Chemical Principles of Environmental Pollution. Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall, London, 394 pp.

Arazi T, R Sunkar, B Kaplan and H Fromm (1999). "A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants." *The Plant Journal* 20: 171-182

Apel K and H Hirt (2004). "Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction." *Annual Review of Plant Biology* 55(1): 373-399.

Alais, C., Linden, G., Micho. 2003. *Biochimie Alimentaire*. 5^{ème} ed Dunod. Pp 131.

(B)

Baron M(2001). "Suppression De l'utilisation de la grenaille de plomb de chasse dans les zones humides exposant les oiseaux d'eau au saturnisme". Rapport MEDD, 20p.

Burzynski M (1987). "The Influence of Lead and Cadmium on the Absorption and Distribution of Potassium, Calcium, Magnesium and Iron in Cucumber Seedlings." *Acta Physiologiae Plantarum* 9: 229-238

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

Bouchereau, J.M., 1992. Estimation des émissions atmosphériques de métaux lourds en France pour le Cr, le Cu, le Ni, le Pb et le Zn, Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA), Paris.

Bartosz G (1997). "Oxidative stress in plants." *Acta Physiologiae Plantarum* 19(1): 47-64.

Bolwell GP and P Wojtaszek (1997). "Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in *plant defence - a broad perspective*." *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51(6): 347-366

Brunet J, Reppelin A, Varrault G, Terryn N et Zuily-Fodil Y (2008). "Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.)". *C.R. Biologies* 331: 859-86

Blokhina O, E Virolainen and KV Fagerstedt (2003). "Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review." *Annals of Botany* 91(2): 179-194

(C)

Czernichow P (2006). Item 108. Santé et environnement-Maladies transmissibles. Elsevier Masson S.A.S. PARIS.

Cecchi M(2008)."Devenir duplombdanslesystèmeSol-Plante: Cas d'un sol contaminé par une usine de Recyclage du plomb et de deux plantes potagères(FèveetTomate)."Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse.226.

Chen J, ZhuC, LiLP, Sun ZY et Pan XB(2007)."Effects of exogenous salicylic acid on growth and H₂O₂-metabolizing enzymes in rice seedlings under lead stress." Journal of Environmental Sciences 19: 44-4

ChaneyRL, Malik M,LiYM, BrownSL ,BrewerEP,AngleJS et BakerAJM(1997). Phytoremediation of soil metals. Current Opinion in Biotechnology8: 279-284.

Callender, E., 2003. Heavy Metals in the Environment-Historical Trends. In: B.S. Lollar (Ed.), Environmental Geochemistry. Treatise on Geochemistry. Elsevier-Pergamon, Oxford, pp. 67-105

Candelone, J.-P., Hong, S., Pellone, C. et Boutron, C.F., 1995. Post-Industrial Revolution changes in large-scale atmospheric pollution of the northern hemisphere by heavy metals as documented in central Greenland snow and ice. Journal of Geophysical Research, 100(8): 605-616.

Cotran, R.S., Kumar, V. et Robbins, S.L., 1990. Patologia ambiental, Patologia Estructural y Funcional. Interamericana-Mc Graw-Hill, Madrid, pp. 499-546.

Colangelo EP and ML Guerinot (2006). "Put the metalto the petal: metal uptake and transport throughout plants." Current Opinion in Plant Biology 9(3): 322-330.

CLEMENT-G.C et PRATS J; 1971: Les céréales condition d'enseignement agricole. pp 9-23

(D)

DatJ, Vandenaabeele S, Vranová E, Van Montagu M,InzéDetVan BreusegemF (2000)."Dual action of the active oxygen species during plant stress responses." Cellular and Molecular Life Sciences(CMLS) 57: 779-795.

Demmig-Adams B et AdamsWW (1996). "The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis." Trends in Plant Science1: 21-26

Dalenberg JW and W Van Driel (1990). "Contribution of atmospheric deposition to heavy-metal concentrations in field crops." Netherlands journalof agricultural science 38: 369-379

(F)

Freyssinet, P., Piantone, P., Azaroual, M., Itard, Y., Clozel-Leloup, B., Guyonnet, D. et Baubron, J.C., 2002. Chemical changes and leachate mass balance of municipal solid waste bottom ash submitted to weathering. *Waste Management*, 22(2): 159-172.

Fergusson, J.E., 1990. The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects, 1. Pergamon Press, Oxford, 614 pp.

(G)

Gavilán García, I., Gavilán García, A. et Castro Díaz, J., 2004. Organometales. In: A. Fernandez Bremauntz, M. Yarto Ramirez et J. Castro Díaz (Eds.), *Las sustancias tóxicas persistentes*. Instituto Nacional de Ecología, México, pp. 1-64.

Goyer, R.A. et Clarkson, T.W., 2001. Toxic effects of metals. In: D.C. Klassen (Ed.), *Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, New York, pp. 811-868.

Goyer, R.A., 1990. Transplacental transport of lead. *Environmental Health Perspectives*, 89: Pages: 101-105. Hurlbut Jr., C.S. et Klein, C., 1982. *Manual de Mineralogía de Dana*. Editorial Reverté, Barcelona, 564 pp

Godzik B (1993). "Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area." *Polish Botanical Studies* 5: 113-132

Glater RAB and L Hernandez, Jr. (1972). "Lead detection in living plant tissue using a new histochemical method." *J. Air Pollut. Control Assoc.* ; Vol/Issue: 22:6: Pages: 463-467

Garland C and D Wilkins (1981). "Effect of Calcium on the Uptake and Toxicity of Lead in *Hordeum vulgare* L. and *Festuca ovina* L." *New Phytologist* 87(3): 581-593

Guignard, J.L; Dupont, F .2004. *Botanique Systématique moléculaire*. 13 Ed révisée Masson Paris. Pp 116-117

Giban, M., Minier, B., Malvosi, R. 2003. Stades du blé ITCF. ARVALIS. Institut du végétale. Pp

(H)

Hem, J.D., 1976. Geochemical controls on lead concentrations in stream water and sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40(6): 599-609.

Hong, S., Candelone, J.-P., Patterson, C.C. et Boutron, C.F., 1994. Greenland ice evidence of

Hemispheric Lead Pollution two millennia ago by Greek and Roman civilizations. *Science*, 265(September): 1841-1843.

Hall JL and LE Williams (2003). "Transition metal transporters in plants." *Journal of Experimental Botany* 54(393): 2601-2613.

Huang JW and SD Cunningham (1996). "Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation." *New Phytologist* 134(1): 75-84

Hirsch RE, BD Lewis, EP Spalding and MR Sussman (1998). "A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition." *Science* 280(5365): 918-921

Huang JW, J Chen, WR Berti and SD Cunningham (1997). "Phytoremediation of Lead Contaminated Soils: Role of Synthetic Chelates in Lead Phytoextraction." *Environmental Science and Technology* 31(3): 800-805

Harland BF, et Morris, E.R. (1995). Phytate: A good or bad food component. *Nutr Res*,15:733-754.

Hadria, R. 2006. Adaptation et spatialisation des modèles strics pour la gestion d'un périmètre céréalierrirriguée en milieu semi aride. Thèse de doctorat. univ Cadi AYYAD Samlalia Marrakech

(I)

Ingersoll, C.G., MacDonald, D.D., Wang, N., Crane, J.L., Field, L.J., Haverland, P.S., Kemble, N.E., Lindskoog, R.A., Severn, C. et Smorong, D.E., 2000. Prediction of sediment toxicity using consensus-based freshwater sediment quality guidelines, U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), Chicago.

Inze D and MV Montagu (2001). *Oxidative Stress in Plants*, CRC

(J)

Jeantet, R., Croguennce, T., PSchuck, P and Gerard Brulé.2007: Science des aliments: Biochimie Microbiologie, procédés produits Pp138-159

(K)

Kohler C, T Merkle and G Neuhaus (1999). "Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* 18(1): 97-104

Kim YY, YY Yang and Y Lee (2002). "Pb and Cd uptakein rice roots." *Physiologia Plantarum* 116: 368-372

(L)

Larocque, A.C.L. et Rasmussen, P.E., 1998. An overview of trace metals in the environment, from mobilization to remediation. *Environmental Geology*, 33(2-3): 85-91.

Leng Q, RW Mercier, W Yao and GA Berkowitz (1999). "Cloning and First Functional

Characterization of a Plant Cyclic Nucleotide-Gated Cation Channel." *Plant Physiology* 121(3): 753-761

Lane SD and ES Martin (1977). "A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*." *New Phytologist* 79(2): 281-28

Leblanc, M., Morales, J.A., Borrego, J. et Elbaz-Poulichet, F., 2000. 4,500 Years-old mining pollution in the Southwestern Spain, Long-term implications for modern mining pollution. *Economic Geology*, 95(3): 655-662.

(M)

Mahan, B.H., 1987. Química. Curso Universitario. Fondo Educativo Interamericano S. A.

Maga JA. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30:1- 9.

Mossab; 1991: Culture à double fin avec la filière blé. OAIC, pp213-220.

Macheix J.J., Fleuriet A., Jay-Allemand C. (2005). Les composés phénoliques des végétaux (un exemple de métabolites secondaires d'importance économiques). Edition techniques et documentation, Lavoisier

Magder, S. (2006). Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? *Critical Care Med Journal*, Vol 10, pp. 208-216. • LSOD

(N)

Nriagu, J.O., 1996. A History of Global metal Pollution. *Science*, 272(april): 223-224.

O.-P.-S., 1987. Guías para la Calidad del Agua Potable. Criterios relativos a la salud y otra información de base. Publicación científica 506. Organización Panamericana de la Salud, Washington, 350 pp.

Nriagu, J.O., 1991. Human influence on the global cycling of trace metals. In: J.D. Farmer (Ed.), *Heavy Metals in the Environment*. CEP Consultants, Edinburgh, pp. 1-5

Nriagu, J.O., 1978. The biogeochemistry of lead in the environment. Elsevier, Amsterdam, 1011 pp.

Nriagu, J.O., 1979. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. *Nature*, 279: 404-411.

Nriagu, J.O., 1974. Lead orthophosphates--IV Formation and stability in the environment. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 38(6): 887-898.

Nriagu, J.O., 1991. Human influence on the global cycling of trace metals. In: J.D. Farmer (Ed.), *Heavy Metals in the Environment*. CEP Consultants, Edinburgh, pp. 1-5.

(O)

Oberleas D., Muhrer M.E., O'Dell B.L., 1962. Effects of phytic acid on zinc availability and parakeratosis in swine. *J. Anim. Sci.*, 21, 57-

Ointillart A., Guéguen L., 1992. Influence des fibres alimentaires sur la biodisponibilité des minéraux. *Cahiers ENSBANA*, 18, 157-1

(P)

Plumlee, G.S. et Ziegler, T.L., 2003. The medical geochemistry of dust, soils and other earth materials. In: B.S. Lollar (Ed.), *Environmental Geochemistry. Treatise on Geochemistry*. Elsevier- Pergamon, Oxford, pp. 264-310

Potters G, L De Gara, H Asard and N Horemans (2002). "Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?" *Plant Physiology and Biochemistry* 40(6-8): 537-548.

Pitzschke A, C Forzani and H Hirt (2006). "Reactive oxygen species signaling in plants." *Antioxidant Redox Signal* 8(9-10): 1757-64.

Parra MAM. 2001. Les phytases : structure, caractérisation et applications. 123 bio.net. Biologie et Recherche Université de Genève- Faculté des Sciences- Département de Chimie Organique- Genève-Suisse.

(R)

Runnels, D.D., Sheperd, T.A. et Angino, E.E., 1992. Metals in water, determining natural background concentrations in mineralized areas. *Environmental Science and Technology*, 26(12): 2316-2323.

Raboy V. 2009. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Sci.* 177:281-296.

(S)

Sukandar, S., Yasuda, K., Tanaka, M. et Aoyama, I., 2006. Metals leachability from medical waste incinerator fly ash: A case study on particle size comparison. *Environmental Pollution*, 144(3): 726-735.

Sposito G, LJ Lund and AC Chang (1982). "Trace Metal Chemistry in Arid-zone Field Soils Amended with Sewage Sludge: I. Fractionation of Ni, Cu, Zn, Cd, and Pb in Solid Phases." *Soil Science Society American Journal* 46(2): 260-264.

Schutzendubel A and A Polle (2002). "Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization." *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1351-1365

Sies H (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Experimental Physiology* 82(2): 291-295.

Seregin IV, LK Shpigun and VB Ivanov (2004). "Distribution and Toxic Effects of Cadmium and Lead on Maize Roots." Russian Journal of Plant Physiology 51(4): 525-533

Smirnoff N, C Foyer, K Dietz, R Mittler, J Feierabend, S Grace, R Desikan, M Jones, R Vreeburg, B Logan and P Jaspers (2005). Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, Blackwell publishing.

Schuurink RC, SF Shartzler, A Fath and RL Jones (1998). "Characterization of a calmodulin-binding transporter from the plasma membrane of barley aleurone." Proceedings of the National Academy of Sciences 95(4): 1944-1949.

Soltner, D.2005. les grandes productions végétales.20ème.Ed.CCTA .Pp20-140

Soltner; 1988: Les bases de production végétal, les collections sciences techniques agricole 16èmeédition,464p

SLIM; 1982: Etude de comportement de l'orge (HORDEUM VULGARE L)en double exploitation fourragere à grain Mémoire .Ing.Agro.I.N.A.Tunis 124p

SIMON; 1972: Identification et classification des variétés d'orge cultivées en France Ed . SEL. Verseille.p200

(T)

Tung G and PJ Temple (1996b). "Uptake and localization of lead in corn (Zea maysL.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy." Science of The Total Environment 188(2-3): 71-85.

Tanton TW and SH Crowdy (1971). "The distribution of lead chelate in the transpiration stream of higher plants." Pesticide Science 2(5): 211-213.

Tung G and PJ Temple (1996b). "Uptake and localization of lead in corn (Zea maysL.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy." Science of The Total Environment 188(2-3): 71-85

(V)

Van Breusegem F, E Vranova, JF Dat and D Inze (2001). "The role of active oxygen species in plant signal transduction." Plant Science 161(3): 405-414

Veum TL, Ledoux DR, Shannon MC, Raboy V. 2009.Effect of graded levels of iron, zinc, and copper supplementation in diets with low-phytate or normal barley on growth performance, bone characteristics ,hematocrit volume, and zinc and copper balance of young swine1. J. Ani. Sci.87:26252634

(W)

Wang C, X Wang, Y Tian, H Yu, X Gu, W Du and H Zhou(2007a). "Oxidative stress, defence response and early biomarkers for lead-contaminated soil in Vicia faba seedlings." Environmental Toxicology and Chemistry: 1

Wormuth D, I Heiber, J Shaikali, A Kandlbinder, M Baier and K-J Dietz (2007). "Redox regulation and antioxidative defence in Arabidopsis leaves viewed from a systems biology perspective." *Journal of Biotechnology* 129(2): 229-248

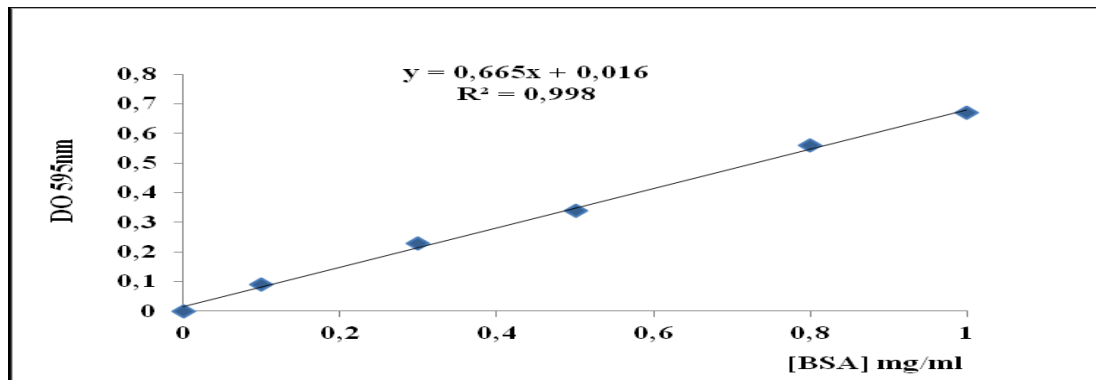
Wierzbicka M (1987). "Lead translocation and localization in *Allium cepa* roots." *Canadian Journal of Botany* 65(9): 1851-1860.

Wang H, X Shan, T Liu, Y Xie, B Wen, S Zhang, F Han and M Genuchten (2007b). "Organic acids enhance the uptake of lead by wheat roots." *Planta* 225: 1483-1494

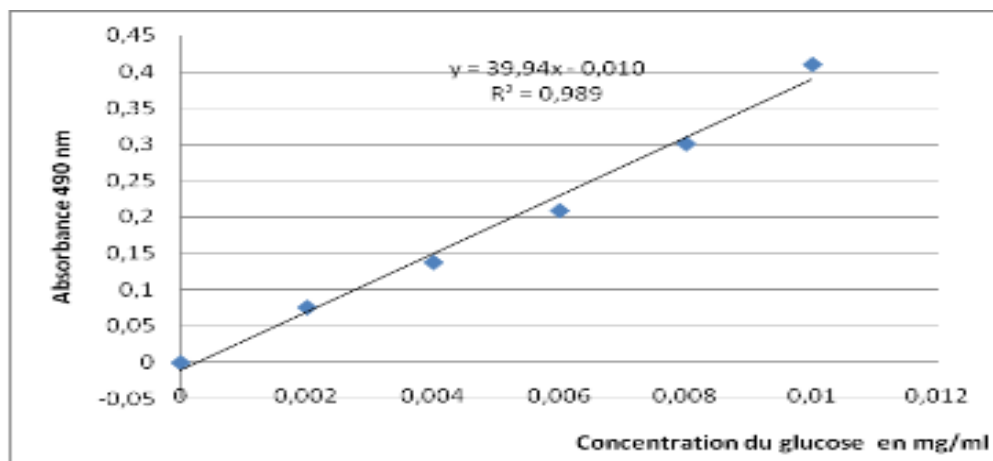
Wojas S, A Ruszczyńska, E Bulska, M Wojciechowski and DM Antosiewicz (2007). "Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by LCT1." *Environmental Pollution* 147(3): 584-592.



Le spectrophotomètre



La courbe d'étalonnage utilisée (BSA 1mg/ml) pour le dosage des protéines.



Courbe d'étalonnage des sucres totaux