

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE
« HOUARI BOUMEDIENNE »
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de MAGISTER

EN : BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VEGETALE

Spécialité : Eco-Biologie et Amélioration Végétale

Par : Mme CHERIFI HAYET

SUJET

***Comportement physiologique de plantules de petits pois
Pisum sativum L. sous l'effet d'un métal lourd, le
nitrate de plomb $Pb(NO_3)_2$***

Soutenu le 02/12/2008, devant le jury composé de :

<i>Mme N. BOUGUEDOURA</i>	<i>Professeur - FSB/USTHB</i>	<i>Président</i>
<i>Mme F. AÏD</i>	<i>Professeur - FSB/USTHB</i>	<i>Dteur de thèse</i>
<i>Mme A. BELKEBIR</i>	<i>Maitre de Conférences- FSB/USTHB</i>	<i>Examineur</i>
<i>Mme S.M OUAFI</i>	<i>Maitre de Conférences- FSB/USTHB</i>	<i>Examineur</i>

REMERCIEMENTS

Mon travail de thèse a été effectué au Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétale de la Faculté des Sciences Biologiques de l'USTHB. Je remercie tous les membres du laboratoire.

Je tiens avant tout à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse : M^{me} **Bougedoura**, M^{me} **Belkebir** et M^{me} **Ouafi**. Merci pour leurs remarques constructives. Je remercie également le Pr. **Aïd Fatiha**, Professeur à l'USTHB, qui a dirigé ma thèse de magister. Merci pour ses conseils et pour m'avoir entraînée avec dynamisme dans ses idées lumineuses et pour avoir incité les miennes.

J'exprime aussi toute ma gratitude à l'égard de Mr **Abedlia** et M^{me} **Benabed** pour leur précieuse contribution apportée lors du dosage des éléments métalliques par spectrométrie d'absorption atomique.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes amis et collègues en post-graduation.

Ma reconnaissance s'adresse également à ma famille qui a supporté mes écarts de rythme de vie et d'humeur et qui m'ont toujours soutenu et encouragé, même dans les périodes les plus difficiles.

Abréviations

μg	Micro gramme
ABA	Acide abscissique
ITCMI	Institut Technique des Cultures Maraichères et Industrielles
M	Molaire
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
mV	Millivolte
MVF	Matière végétale fraîche
MVS	Matière végétale sèche
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (forme réduite)
nm	Nanomètre
O_2^-	Anion superoxyde
OH^-	Radical hydroxyl
λ	Longueur d'onde

Liste des figures

Liste des figures

- Figure 1.** Origines du plomb et sa localisation dans le corps humain.
- Figure 2.** Effets du plomb sur la physiologie de l'homme.
- Figure 3.** Influence du pH sur la mobilité des ions métalliques dans le sol.
- Figure 4.** Transport symplastique et apoplastique entre les cellules.
- Figure 5.** Trichome d'un tabac exposé au cadmium.
- Figure 6.** Localisation du plomb au niveau cellulaire dans la racine.
- Figure 7.** Accumulation du plomb au niveau des cellules de racine de plantules de 13 jours de *Vigna unguiculata* en présence de 1.6µM de plomb.
- Figure 8.** Effets du plomb sur la physiologie du végétal.
- Figure 9.** Effet du plomb sur la racine.
- Figure 10.** Effet de compétition entre les ions de calcium et de plomb.
- Figure 11.** Réponse de la cellule végétale face au stress par le plomb.
- Figure 12.** Mécanismes cellulaires de détoxification et de tolérance des métaux chez les plantes supérieures.
- Figure 13.** Biosynthèse des phytochélatines chez les végétaux supérieurs.
- Figure 14.** Les différents systèmes de détoxification enzymatique.
- Figure 15.** Schéma représentant le principe de la phytoextraction des métaux à partir du sol.
- Figure 16.** Les mécanismes de la phytoremédiation des métaux lourds.
- Figure 17.** Réponse des plantes à la présence des métaux dans le sol.
- Figure 18.** Graines de *Pisum sativum* L. var Merveille de Kelvedon.
- Figure 19.** Courbe étalon de l'amidon.
- Figure 20.** Courbe étalon des protéines.
- Figure 21.** Courbe étalon de la proline.
- Figure 22.** Spectromètre d'absorption atomique à flamme type SOLAAR.

- Figure 23.** Principe de fonctionnement du spectromètre d'absorption atomique à flamme.
- Figure 24.** Principe de la spectrométrie d'absorption atomique.
- Figure 25.** Evolution du pourcentage moyen de germination des graines de *Pisum sativum* L. soumises à un stress par le nitrate de plomb en fonction du temps.
- Figure 26.** Evolution de la vitesse de germination des graines de *Pisum sativum* L. soumises à différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 27.** Evolution du pourcentage d'eau moyen absorbée par les graines de *Pisum sativum* L. en présence des différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 28.** Evolution de la teneur en plomb (μM) au niveau des graines germées de *Pisum sativum* L. en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 29.** Evolution de l'activité amylasique des graines de *Pisum sativum* L. soumises à un stress par le nitrate de plomb.
- Figure 30.** Effets des différentes concentrations de nitrate de plomb sur la morphologie de plantules de *Pisum sativum* L. stade sept jours.
- Figure 31.** Effets des différentes concentrations de nitrate de plomb sur la morphologie de plantules de *Pisum sativum* L. stade quatorze jours.
- Figure 32.** Evolution du poids frais (gramme) des plantules de petit pois sous l'effet des différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 33.** Evolution du poids sec (gramme) des plantules de petit pois sous l'effet des différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 34.** Evolution de la teneur en plomb (μM) au niveau des plantules de *Pisum sativum* L. en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 35.** Evolution du pourcentage de plomb accumulé au niveau des plantules de *Pisum sativum* L. en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 36.** Evolution de la teneur en plomb (μM) au niveau des plantules de *Pisum sativum* L. en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 37.** Evolution du pourcentage de plomb accumulé au niveau des plantules de *Pisum sativum* L. en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.

- Figure 38.** Stratégie de réponse des plantules de petit pois face à la présence du nitrate de plomb dans le milieu nutritif.
- Figure 39.** Evolution de la teneur en chlorophylle *a* de plantules de *Pisum sativum* L. stressées par différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 40.** Evolution de la teneur en chlorophylle *b* de plantules de *Pisum sativum* L. stressées par différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 41.** Evolution de la teneur en caroténoïdes de plantules de *Pisum sativum* L. stressées par différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 42.** Evolution de la relative en eau de plantules de petit pois en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.
- Figure 43.** Evolution de la teneur en proline de plantules de petit pois en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.

Liste des tableaux

- Tableau 1.** Composition normale des éléments traces dans la plante.
- Tableau 2.** Influence du plomb sur la composition en nutriments chez les végétaux.
- Tableau 3.** Exemples de plantes hyperaccumulatrices de métaux lourds.
-

Sommaire

1- Introduction	1
2- Synthèse bibliographique	2
2.1- Effets du plomb sur la santé	2
2.2- Les facteurs modifiant la mobilité des éléments métalliques dans le sol	4
• Le pH du sol	4
• Le potentiel redox du sol	5
• L'activité biologique	5
2.3- Le plomb et la plante	6
• L'absorption racinaire	6
• La translocation	7
• L'accumulation	8
2.4- Normes des métaux lourds dans les plantes	11
2.5- Toxicité	11
2.5.1- Effets ioniques du plomb	12
✓ Germination et croissance	12
✓ Activités enzymatiques	13
✓ La photosynthèse	14
✓ La respiration et ATP	14
2.5.2- Déficience en nutriments	15
2.5.3- Effet osmotique du plomb	16
2.5.4- Stress oxydatif	16
2.6- Le comportement des plantes vis-à-vis d'un stress métallique	17
2.6.1- Les mécanismes d'évitement et de tolérance	17
✓ Exsudats racinaires	17
✓ Les mycorrhizes	17
✓ La paroi cellulaire	17
✓ La membrane plasmique et le tonoplaste	17
✓ Les chélateurs intracellulaires	18
✓ Les acides organiques	20
✓ Les acides aminés libres	20

SOMMAIRE

✓ Les protéines de choc thermique	21
✓ La compartimentation des métaux	21
2.6.2- Le mécanisme de résistance	21
✓ La superoxyde-dismutase	22
✓ Les catalases	22
✓ Les peroxydases	22
2.7- L'utilisation des plantes pour la réhabilitation des sols pollués	25
2.7.1- La phytoextraction	25
2.7.2- La phytostimulation	26
2.7.3- La phytovolatilisation	26
2.7.4- La rhizofiltration	26
2.7.5- La phytostabilisation	27
3- Matériels et méthodes	29
3.1- Matériel végétal	29
3.2- Traitements	29
3.3- Méthodes utilisées	29
3.3.1- Etude de la faculté germinative	29
3.3.2- Etude de la cinétique d'imbibition	30
3.3.3- Etude de l'activité α -amylase in vivo	30
3.3.4- Statut hydrique des plantules	32
– Mesure de la teneur en eau	32
– Mesure du poids frais et du poids sec	32
3.3.5- Extraction et dosage des pigments foliaires	32
3.3.6- Extraction et dosage de la proline	33
3.3.7- Extraction et dosage du plomb	34
3.3.8- Méthode d'analyse statistique	36
4- Résultats et discussion	37
4.1- Effets du nitrate de plomb sur la germination	37
4.1.1- Faculté germinative	37
4.1.2- Vitesse de germination	38
4.1.3- Cinétique d'absorption	39

SOMMAIRE

4.1.4- Teneur en plomb	40
4.1.5- Activité alpha-amylasique in vivo	41
4.1.6- Discussion	41
4.2- Effets du nitrate de plomb sur la croissance	45
4.2.1- Effets du nitrate de plomb sur la morphologie des plantes	45
4.2.2- Effets du nitrate de plomb sur la croissance	47
• Poids frais	47
• Poids sec	48
4.2.3- Accumulation du plomb dans les plantes	48
• Après sept jours de traitement	48
• Après quatorze jours de traitement	50
4.2.4- Discussion	52
4.2.5- Effets du nitrate de plomb sur les pigments chlorophylliens	56
• Chlorophylle <i>a</i>	56
• Chlorophylle <i>b</i>	56
• Caroténoïdes	57
4.2.6- Discussion	58
4.2.7- Statut hydrique des plantules	59
• Effets du nitrate de plomb sur la teneur relative en eau	59
• Effets du nitrate de plomb sur la proline	60
4.2.8- Discussion	61
4- Conclusion générale et perspectives	63
5- Références bibliographiques	64
Listes des figures	
Liste des tableaux et des photographies	

Résumé

Résumé

Les plantules de *Pisum sativum* L. sont soumises à un stress par le nitrate de plomb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Le plomb étant un métal lourd non biodégradable par les organismes vivants.

Le nitrate de plomb provoque un ralentissement et une réduction du pourcentage de germination des graines de petit pois. Les ions de plomb s'accumulent dans les graines et provoquent un stress ionique causant ainsi une réduction de l'activité amylasique, enzyme clé de la germination. A une forte concentration de nitrate de plomb (50mM), la germination est complètement inhibée.

Les plantules de *Pisum sativum* L. sont aussi affectées par la présence de nitrate de plomb. Il réduit fortement la croissance des plantules en inhibant la formation des racines secondaires et en réduisant à certaines concentrations l'élongation de la partie aérienne et de la partie racinaire.

De plus, les ions de plomb s'accumulent dans les plantules traitées en particulier au niveau des racines et cause une réduction du poids frais et du poids sec. Ils entraînent une diminution de la teneur relative en eau des feuilles (TRE), qui a pour conséquence une augmentation de la teneur en proline. Ils induisent donc un stress hydrique physiologique. Une augmentation de pigments chlorophylliens est observée également.

Le stress par le nitrate de plomb provoque des symptômes de toxicité aussi bien au niveau de la germination qu'au niveau de la croissance des plantules.

Mots clés : Nitrate de plomb $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, *Pisum sativum* L. germination, croissance, TRE, stress hydrique physiologique.

Introduction

1- Introduction

Depuis la fin du XIX siècle, le secteur industriel s'est développé sans se préoccuper des rejets d'éléments toxiques dans les sols. De fait, le sol a été longtemps considéré comme une ressource renouvelable, voire même inépuisable à l'échelle des générations humaines, capable de recevoir, sans conséquence, les rejets de nos activités. Aujourd'hui ce patrimoine est menacé à la fois par le lourd héritage du passé et par l'extension des surfaces consacrées au développement industriel (Lecomte, 1998).

Parmi les principaux polluants générés par les activités industrielles, les métaux lourds (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{2+} , ...) posent un véritable problème. Ces éléments, non biodégradables, présentent une forte écotoxicité et pourraient être impliqués dans de nombreuses pathologies : atteinte du système nerveux central, du foie, des reins, mais aussi cancers et malformations embryonnaires (Abrahams, 2002 ; Adriano, 2001).

Les métaux lourds peuvent avoir deux provenances : l'une naturelle (fonds géochimiques, gisements miniers), l'autre anthropique liée à l'activité humaine (boues d'épuration, engrais, produits phytosanitaires divers, composts urbains, eaux résiduelles agro-industrielles, rejets atmosphériques et hydrocarbures comme le pétrole).

La majorité des sites pollués par les métaux lourds sont souillés par le plomb. Ce dernier affecte certains paramètres physiologiques. Il engendre un stress oxydatif néfaste pour leur développement pouvant induire une mort certaine à certaines concentrations.

Pour s'adapter au stress, la plante doit être capable de traduire la perception du stress en une réponse appropriée qui lui permettra de croître et de se reproduire malgré la présence des conditions défavorables.

Certaines plantes, dites métalphytes, sont capables de se développer normalement sur des sites fortement contaminés par divers métaux ; ces végétaux, qualifiés d'hyperaccumulateurs (Brooks, 1998), sont capables de stocker massivement les métaux dans leurs parties aériennes. Ainsi, les études concernant l'écophysiologie et le métabolisme des plantes supérieures en milieu contaminé ont connu un intérêt croissant ces dernières années (Mihoub et al., 2004; Samardakiewicz et al., 2005; Esteban, 2006; Kopittke et al., 2007).

Dans ce contexte, il nous a semblé intéressant d'étudier le comportement d'une légumineuse (le petit pois) sous l'effet d'un stress métallique (le nitrate de plomb).

Plusieurs travaux ont été réalisés sur l'impact du stress métallique (Cuivre, cadmium, plomb ... etc) sur le petit pois (*Pisum sativum* L.).

L'objet de notre travail est d'établir :

- Dans un premier temps, une relation entre la quantité de plomb absorbée par les graines et le pourcentage de germination et l'activité de l'alpha-amylase, enzyme clé de la germination.
- Dans un deuxième temps, étudier la relation entre la quantité de plomb absorbée par la plante et son statut hydrique, sa morphologie et sa teneur en pigments chlorophylliens.

Synthèse

Bibliographique

Le plomb est un polluant primaire persistant, sa durée de vie dans le sol est de 1 700 ans. Il peut être bioaccumulé dans la chaîne alimentaire et il est toxique pour l'homme. (GWRTAC, 1997). Le minerai le plus important est la galène dans laquelle le plomb existe sous forme de sulfure, PbS. C'est un métal bleu grisâtre, malléable et ductile dont le point de fusion est de 327°C et le point d'ébullition de 1525°C. Il résiste à l'acide sulfurique ; il est rapidement dissous par l'acide nitrique et il est solubilisé par les acides organiques (acide acétique, aliments acides...) et par l'eau contenant des nitrates et des sels d'ammonium.

Le plomb est rejeté dans l'environnement par les activités humaines en quantités 300 fois plus importantes que par les processus naturels (Jansen et al., 1997). Le volume total de plomb déversé dans l'environnement se situe entre 860 000 et 1 670 000 tonnes par an.

La pollution de l'environnement par le plomb est due principalement à son utilisation fréquente dans les processus industriels tels que les mines, les fonderies, la fabrication des pesticides et des engrais, le traitement des eaux usées municipales et la brûlure des combustibles fossiles qui contiennent un additif de plomb.

De nombreux produits commerciaux et de matériels peuvent aussi contenir du plomb : les peintures, les lustres en céramique, le verre de télévision, les munitions, les batteries, certains équipements médicaux tels que les boucliers de rayon X et les moniteurs foetaux, certains appareillages électriques, etc. (Environment Writer, 2000).

2.1- Effets du plomb sur la santé:

Le plomb n'a aucun rôle physiologique connu chez l'homme ; sa présence dans l'organisme témoigne donc toujours d'une contamination. A l'état normal, le milieu biologique de l'homme contient une quantité faible mais non négligeable de plomb. Cette présence provient des conditions d'environnement et de l'ubiquité de ce métal (Melquiot, 2003).

Le plomb pénètre dans l'organisme par voie cutanée, par voie digestive, (essentiellement via les aliments et l'eau de boisson) et par voie aérienne (inhalation des poussières atmosphériques contaminées). Cette dernière est la plus dangereuse car le plomb atteint directement la circulation sanguine et se diffuse rapidement dans les différents organes comme le cerveau et les tissus fortement calcifiés (dents et os). Si la demi-vie du plomb dans les tissus mous et dans le sang est d'environ 30 jours, sa demi vie dans l'os est très longue, de l'ordre de 1 an dans l'os trabéculaire et de 10 à 20 ans dans l'os compact (Melquiot, 2003). Les régions gastro-intestinales, les reins et le système nerveux central sont aussi affectés par la présence du plomb (Figure 1).

Le plomb est un puissant agent neurotoxique, en particulier pour les enfants dont le corps en pleine croissance y est fort sensible. L'exposition à des niveaux excessivement élevés de plomb dans l'air, l'eau, le sol et les aliments, est nuisible à la santé et au développement intellectuel de millions d'enfants et d'adultes dans presque toutes les régions du monde.

A faibles doses, l'intoxication par le plomb chez les enfants provoque une baisse du quotient intellectuel (QI) et de la concentration, des difficultés de lecture et d'apprentissage, une hyperactivité et des problèmes de comportement, des retards de croissance et des troubles visuels, auditifs et moteurs.

A fortes doses, l'intoxication par le plomb chez les enfants provoque l'anémie, des lésions au niveau du cerveau, du foie, des reins, des nerfs et de l'estomac, le coma, des convulsions, et la mort.

L'intoxication aiguë chez l'enfant peut entraîner des séquelles neurologiques : épilepsie, arriération mentale, troubles du comportement, paralysie, atrophie du nerf optique (US Agency for Toxic Substances and Disease Registry 1993) (Figure 2).

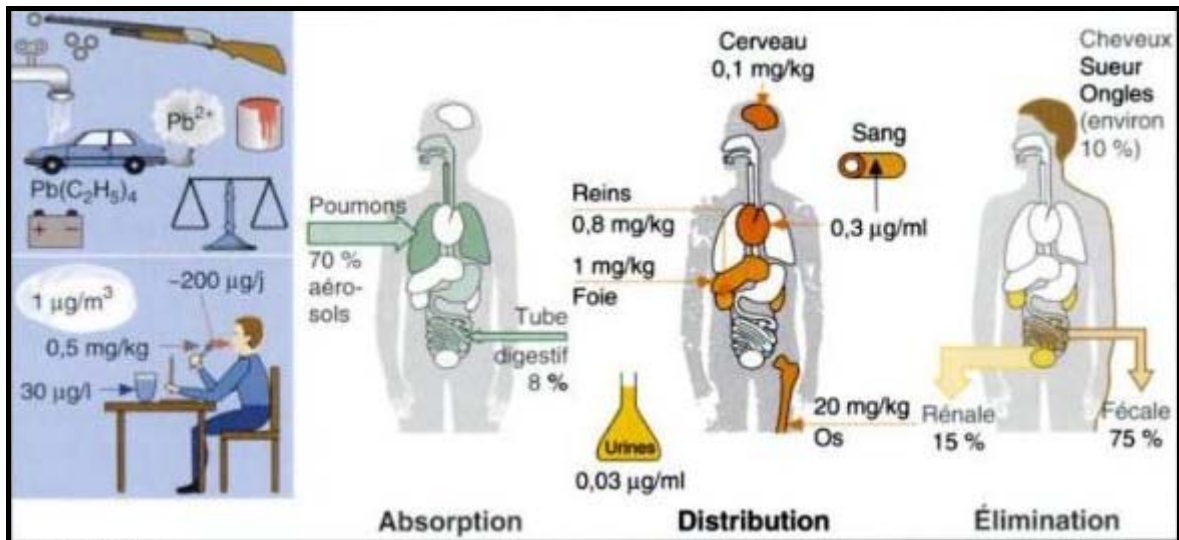


Figure 1 : Origines du plomb et sa localisation dans le corps humain (Reichl et al., 2004)

Autre fois, de grandes quantités de plomb ont été utilisées pour la construction de tuyauteries. Aujourd'hui, à peu près 40% du plomb sont consommés dans la fabrication des batteries, le restant servant à l'élaboration des pigments, des munitions, des poids destinés au pesage et au lest. Le plomb est utilisé aussi comme antidétonant dans les moteurs à essence et se retrouve dans les gaz d'échappement. Les composés du plomb sont surtout absorbés dans les poumons (jusqu'à 70% sous forme d'aérosols) et dans le tube digestif (8%). A la suite de son absorption, le plomb se fixe essentiellement à l'hémoglobine et est ainsi rapidement distribué dans le corps. L'élimination du plomb se fait par voie rénale (75%) et par les selles (15%). 10% de la dose de plomb peuvent être éliminés par l'intermédiaire de cheveux, des ongles et de la sueur.

La neurotoxicité du plomb se manifeste au niveau moléculaire par une compétition avec le calcium au niveau des récepteurs de la neurotransmission : les canaux calciques, les ATPases dépendantes du calcium et du sodium, diverses protéines fixatrices de calcium, ainsi que les ATPases dépendantes du sodium et du potassium sont perturbées par des concentrations inférieures à 1µM de plomb (Bounias, 1999).

Le plomb pourrait exercer une action directe sur le système vasculaire en inhibant la Na-K ATPase des muscles lisses des vaisseaux. Une fois inhalé, il peut interférer avec l'accumulation et l'activité des macrophages pulmonaires. Le plomb exerce une action toxique directe sur le tissu osseux dans lequel il s'accumule, notamment en inhibant la production d'ostéocalcine par les ostéoblastes et suite à son absorption sur l'hydroxyapatite par déplacement du calcium de ses sites de fixation sur l'ostéocalcine. L'ion Pb²⁺ peut potentialiser la destruction lipoperoxydative des membranes biologiques. Les conséquences de l'intoxication par le plomb chez les enfants se font sentir à long terme et sont potentiellement irréversibles ; elles sont intensifiées avec l'exposition répétée et l'accumulation du plomb dans l'organisme (US Agency for Toxic Substances and Disease Registry 1993).

Chez l'adulte, l'exposition au plomb provoque des encéphalopathies chroniques, des dysfonctionnements cognitifs et des altérations neuropsychologiques affectant la vie quotidienne des individus.

L'écotoxicologie du plomb se manifeste chez les animaux de manière massive, du fait, à la fois, de l'ingestion directe des grains provenant des déversements dûs aux plombs de

chasse et de pêche, et de l'ingestion de végétaux et de sédiments contaminés par ces mêmes sources ainsi que par les rejets de zones minières et de fonderies (Bounias, 1999).

Les plomb tétraalkyles, additifs des carburants, sont lipophiles et donc facilement absorbés par la peau, et par les alvéoles pulmonaires ; 30 à 40 % passent dans le sang ; ils seraient désalkylés dans le foie en composés trialkylés, dont la toxicité est liée à la perturbation des échanges ioniques au niveau du cerveau. Le plomb provoque aussi l'inhibition des biosynthèses enzymatiques permettant la formation de l'hémoglobine du sang (Deguobert, 1992).

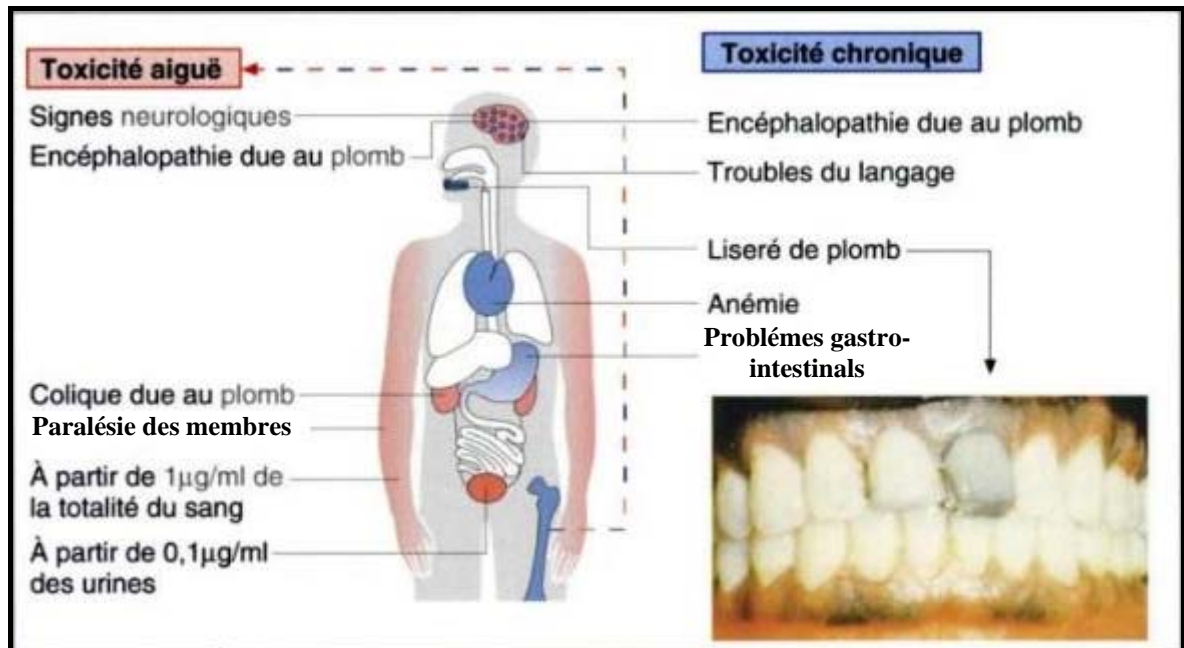


Figure 2: Effets du plomb sur la physiologie de l'homme (Reichl et al., 2004)

Lors d'une intoxication aiguë au plomb, les premiers symptômes cliniques se manifestent à partir d'une plombémie de 1µg/mL dans les urines. La toxicité due au plomb se caractérise par l'apparition de coliques saturniques importantes, de signes neurologiques, insomnie, apathie, agressivité, ralentissement de la conduction nerveuse etc. La toxicité chronique du plomb se caractérise par l'apparition d'une anémie, d'un ictère, d'un liseré dû au plomb au niveau des gencives, d'une anorexie, etc.

2.2- Les facteurs modifiants la mobilité des éléments métalliques dans le sol

La disponibilité du plomb pour la plante dépend des conditions du sol. Parmi ces facteurs citons le pH du sol, la taille des particules du sol, sa capacité d'échange des cations ainsi que des facteurs de la plante comme la surface racinaire, les exsudats racinaires, la mycorrhization et le taux de transpiration (Davies, 1995).

- **Le pH du sol**

Le pH du sol constitue un facteur dont le rôle est crucial pour la mobilité des ions métalliques, car il influence le nombre de charges négatives pouvant être mises en solution (McLaughlin, *et al.*, 2000). L'augmentation du pH entraîne la dissolution de la matière organique et la formation de complexes organo-métalliques plus solubles (Chaignon, 2001).

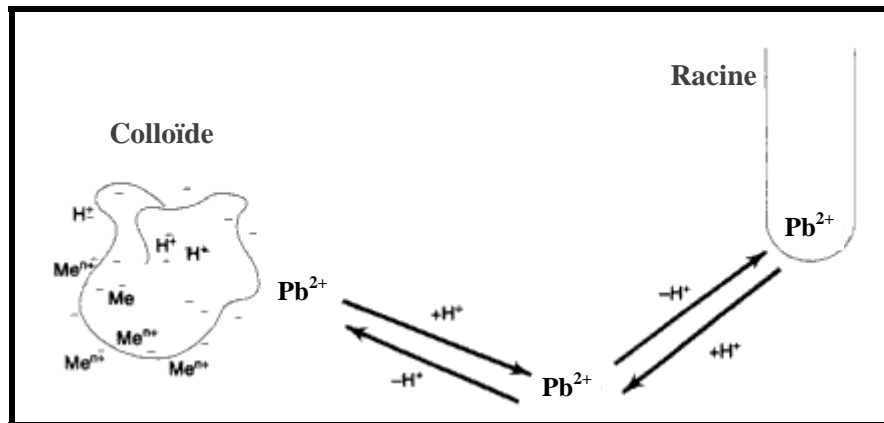


Figure 3 : Influence du pH sur la mobilité des ions métalliques dans le sol

L'adsorption de plomb dans le sol augmente avec l'augmentation du pH 3.0 à 8.5 (Lee et al., 1998). Cependant, dans un sol dont le pH est situé entre 5.5 et 7.5, la solubilité du plomb est contrôlée par la présence dans le sol de phosphates et de carbonates. En présence de phosphates et de carbonates, il est ainsi précipité et peu de plomb reste disponible à la plante même si elle a une capacité génétique à l'accumuler (Blaylock et al., 1997). Le plomb est un acide faible de Lewis, ce qui lui confère un caractère covalent important (énergie de liaison) et forme ainsi des liaisons ioniques dans le sol et dans la plante. Le plomb se trouve presque toujours étroitement lié à la matière organique et colloïdale ou sous sa forme précipitée, ce qui diminue son absorption par les racines des plantes (Figure 3).

- **Le potentiel redox du sol**

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

- **L'activité biologique**

Les microorganismes peuvent avoir un effet direct sur la solubilité des métaux lourds en altérant leurs propriétés chimiques. Les microorganismes ont développé plusieurs mécanismes qui permettent d'immobiliser, de mobiliser ou de transformer les métaux lourds. Ces processus impliquent la précipitation extracellulaire, l'accumulation intracellulaire, les réaction d'oxydo-réduction, la méthylation la déméthylation, et la complexation (Brierley, 1990).

La rhizosphère (partie du sol qui est en contact direct avec les racines de la plante) influence la disponibilité des métaux lourds par la réduction de l'activité des ions dans la solution du sol et la désorption (Phénomène qui consiste pour un solide à abandonner les gaz absorbés ou adsorbés) des contaminants de la surface. Le changement des propriétés chimiques de la solution du sol (pH, flux ionique, concentration en cations et macronutriments (comme le calcium)) affecte la sorption et l'excrétion de ligands organiques (exsudats racinaires). Ce changement permet d'augmenter ou de diminuer la concentration totale des ions toxiques dans la solution du sol et de stimuler l'activité microbienne dans la rizosphère.

Parmi les principaux phénomènes d'action des microorganismes et des plantes sur la mobilité des polluants métalliques, citons la solubilisation, qui provient de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, nitrique et sulfurique. Les champignons et les racines des plantes excrètent des acides afin d'augmenter leur absorption en nutriments, ou tout simplement comme déchets métaboliques (Foy *et al.*, 1978 ; Chaignon, 2001 ; Deneux-Mustin *et al.*, 2003). Cette acidification du milieu favorise la mobilité des autres éléments qui ne sont pas indispensables au métabolisme du végétal et qui peuvent être toxiques comme les métaux lourds.

2.3- Le plomb et la plante

Certains métaux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs du métabolisme cellulaire : la respiration et la photosynthèse (Kabata-Pendias et Pendias , 2001). Ils sont aussi impliqués au niveau des processus moléculaires tels que, le métabolisme des protéines, des acides nucléiques, des lipides, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires ainsi que le contrôle de l'expression des gènes; ils interviennent aussi dans les mécanismes de tolérance au stress (Rengel, 1999).

Malgré la grande diversité des besoins et des niveaux de tolérance aux métaux lourds chez les plantes, certains sont considérés comme des poisons cellulaires pour lesquels les doses admissibles sont très faibles. Parmi les métaux lourds les plus toxiques citons le mercure, le nickel, le plomb et le cadmium (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

- **L'absorption racinaire**

Les racines ont une capacité à absorber le plomb à des quantités significatives et peuvent simultanément restreindre sa translocation vers les parties aériennes de la plante (Lane and Martin, 1977). Cette notion a été controversée par Miller and Koeppe (1971) qui ont démontré que *Zea mays* L. résistante peut transporter et accumuler des quantités significatives de plomb au niveau des feuilles.

Au niveau de la surface racinaire, le plomb se lie aux groupements carboxyles des acides uroniques du mucilage. Les liaisons mucilage-métal limitent l'entrée du métal dans les racines et établissent une importante barrière protectrice. Certains métaux sont libérés quand le mucilage est biodégradé (Morel *et al.*, 1986). Les micro-organismes du sol peuvent affecter la disponibilité des métaux lourds par des processus de biosorption, bioaccumulation et de solubilisation. Il a été montré par Marschner *et al.*, (1996) que les éctomycorhizes peuvent influencer l'absorption, le transport et la toxicité du plomb chez des plantes de *Picea abies*.

La voie principale d'absorption des métaux se fait par simple diffusion au travers de l'apoplaste du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique). Le transport des éléments métalliques à travers la paroi cellulaire se fait passivement (non métabolique et donc dans le sens du gradient de concentration) par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines (Esteban, 2006). Cependant, une partie des ions peut être adsorbé par les charges négatives de surface de l'acide polygalacturonique des pectines, qui agissent comme des échangeurs d'ions (Briat et Lebrun, 1999).

Au niveau de l'endoderme, le transport peut devenir actif au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary (voie symplastique), autorisant cette fois un transfert contre le gradient de concentration. Cependant, les mécanismes exacts de l'absorption sont encore mal connus, en particulier pour certains éléments comme le cuivre

(Greger, 1999 ; Chaignon, 2001), et diffèrent selon le métal. On considère de nos jours que le plomb et le nickel sont absorbés passivement via certaines protéines de type porine, alors que le zinc et le cuivre sont absorbés activement par une protéine de transport sélective, nécessitant de l'énergie (Kabata-Pendias and Pendias, 2001).

Une des voies possibles du transport du plomb à travers la membrane plasmique des racines se fait par des canaux à cations, comme les canaux à calcium. L'inhibition des canaux à calcium par le plomb peut être due à une compétitivité du transport du plomb à travers les canaux à calcium.

Une partie des métaux apoplastiques peut donc rejoindre la voie symplastique puis le xylème par les plasmodesmes. Le transport des éléments toxiques par le phloème est moins évident du fait que les cellules qui le constituent sont vivantes et forment un piège supplémentaire (Greger, 1999). Toutefois, chez certaines plantes, un dérivé de la méthionine pourrait être responsable du transport des métaux, fer, cuivre, zinc et manganèse, dans la sève du phloème (Briat et Lebrun, 1999).

L'addition de chélateurs de synthèse, comme le H-EDTA ou EDTA, associé à un faible pH, empêche la rétention du plomb au niveau de la paroi cellulaire, et permet sa translocation vers les parties aériennes (Jarvis and Leung, 2002).

- **La translocation**

Le plomb se déplace dans l'apoplaste (Figure 4) des racines de façon radiale à travers le cortex et s'accumule près de l'endoderme. L'endoderme agit en partie comme barrière au déplacement du plomb entre la racine et la partie aérienne. Ceci peut en partie expliquer la grande accumulation du plomb au niveau des racines (Jones et al., 1973; Verma and Dubey, 2003).

Le transport du plomb des racines vers les autres organes est limité ; Cela est due à la barrière de l'endoderme de la racine. D'après Lane et Martin (1977), l'endoderme semble agir en tant que barrière partielle. Le plomb se déplace à travers les tissus vasculaires et se déversent dans les tissus environnants. Ceci met en évidence le déplacement du plomb dans le symplaste. Ce mouvement du plomb dans la racine se fait principalement via l'apoplaste (Broyer et al., 1972). La possibilité d'un transport symplastique du plomb a été démontré dans des racines d'oignons et des hypocotyles de cresson de fontaine *Nasturtium officinale* (Wierzbicka, 1987).

Les fortes concentrations de plomb causent des dommages cellulaires et affectent la fonction de barrière du plasmalemmes mais aussi sa perméabilité sélective ainsi que celle du tonoplaste. Seregin et collaborateurs (2004) ont démontré que le plomb est retenu en grande quantité à la surface du plasmalemmes.

Le transport des éléments toxiques par le phloème est moins évident du fait que les cellules qui le constituent sont vivantes et forment un piège supplémentaire (Greger, 1999).

Les éléments traces sont surtout transportés par voie apoplastique dans les tissus des plantes. Afin d'atteindre les vaisseaux du xylème des racines, les éléments traces doivent d'abord traverser l'endoderme et les bandes de Caspary subérimées, ce qui est difficile (Prasad and Hagemeyer, 1999). En conséquence, la majeure partie du prélèvement des métaux est effectuée par les parties les plus jeunes de la racine où les bandes de Caspary ne sont pas entièrement développées. (Prasad and Hagemeyer, 1999).

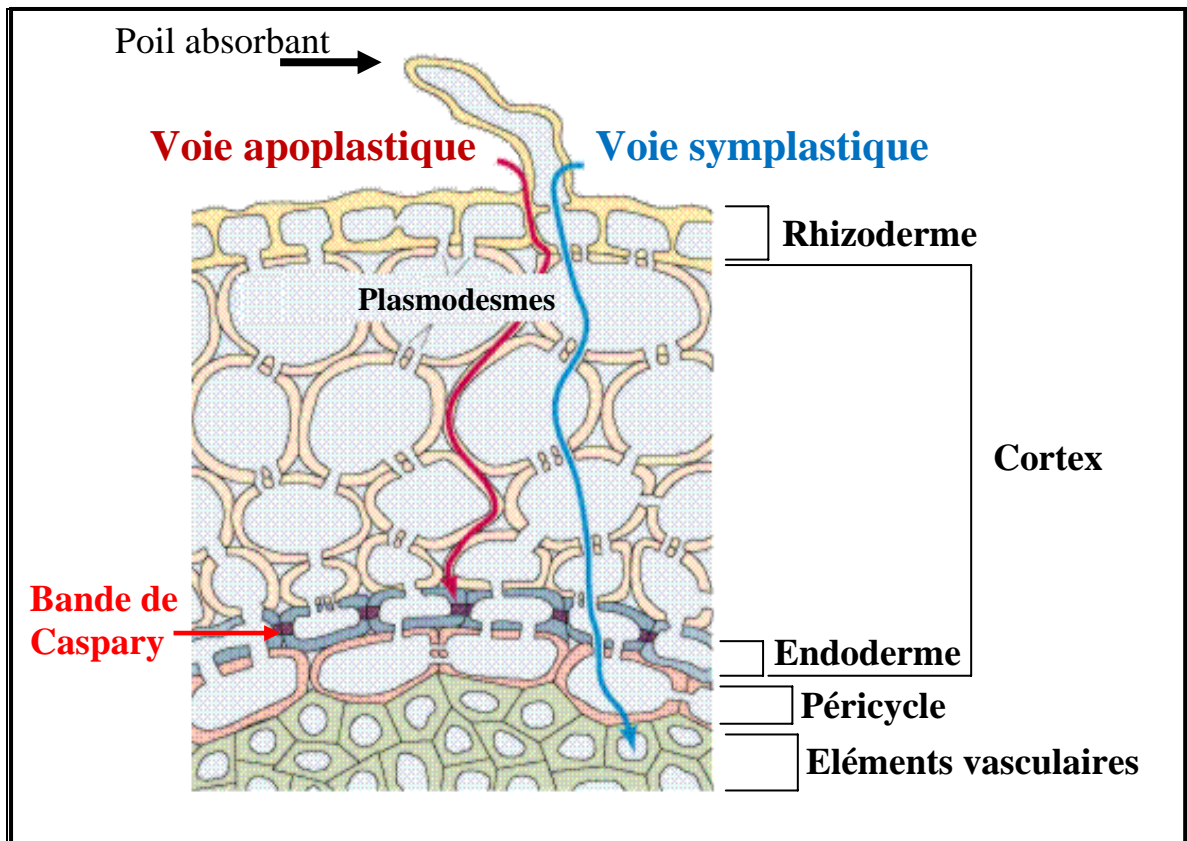


Figure 4 : Transport symplastique et apoplastique entre les cellules (Brett et al., 1996)

Les voies possibles suivies par l'eau du sol se déplaçant jusqu'aux éléments conducteurs de la racine, en passant par l'épiderme et le cycle cortical : le mouvement apoplastique passe par les parois cellulaires ; le mouvement symplastique passe de protoplasme en protoplasme par les plasmodesmes. Après avoir traversé l'endoderme garni par la bande de Caspary, l'eau est absorbée par les éléments vasculaires.

- **L'accumulation**

- ✓ **Au niveau des organes de la plante**

La quantité de plomb dans les différents organes de la plante tend à diminuer dans l'ordre suivant: racines, feuilles, tiges, inflorescences et graines

Cependant, cet ordre peut varier en fonction des espèces (Antosiewicz, 1992). Chez des plantules d'oignon (*Allium cepa*), le plomb absorbé est localisé à des concentrations très élevées dans les extrémités des racines, suivi par les parties à proximité de la racine, tandis que les plus basses concentrations se trouvent à la base de la racine (Michalak and Wierzbicka, 1998).

Le modèle de distribution du plomb dans les racines diffère considérablement selon la concentration (Seregin et al., 2004).

En général, la concentration en plomb de la partie aérienne de la plante diminue à mesure que les racines s'allongent ; celle-ci est due à la localisation du plomb dans la paroi cellulaire des racines en quantités supérieures à celles retrouvées dans les autres parties de la plante.

De plus, le plomb se dépose en plus grandes quantités dans les tissus lignifiés que dans les tissus non lignifiés. Suchodoller (1967) a montré que chez l'orge, la majeure partie du plomb appliquée est retenue dans l'épiderme de la racine tandis qu'une petite quantité est détectée dans les tissus vasculaires.

La capacité à accumuler le plomb au niveau des feuilles dépend de l'âge de la plante. Le plomb s'accumule en grandes quantités dans les feuilles sénescentes (trichomes) et en faibles quantités dans les feuilles jeunes (Godzik, 1993) (Figure 5).

Dans les graines, l'enveloppe empêche l'entrée du plomb dans les tissus interne jusqu'à sa rupture par le développement des radicules. Quand les téguments se rompent, le plomb est absorbé très rapidement à l'exception des régions méristématiques de la radicule et des hypocotyles (Lane and Martin, 1977). Dans les cotylédons, le plomb se déplace à travers les tissus vasculaires et tend à s'accumuler à des taux faibles dans les parties distales (Lane and Martin, 1977).

A de faibles concentrations, les ions Pb^{2+} s'écoulent principalement dans l'apoplaste; à de fortes concentrations, la fonction de barrière du plasmalemme est endommagée et une grande quantité de plomb entre dans la cellule.

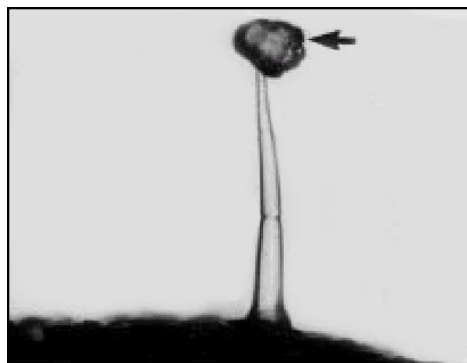


Figure 5 : Trichome d'un tabac exposé au cadmium (des grains riche en calcium et en cadmium sont produits à l'extrémité du poil (Choi et al., 2001)

✓ **Au niveau cellulaire**

Des études d'ultrastructure ont révélé que des quantités variables de plomb sont présentes principalement dans l'espace intracellulaire, la paroi cellulaire et les vacuoles, tandis qu'une petite quantité est observée dans le réticulum endoplasmique, les dictyosomes et les vésicules dérivés du dictyosome (Figure 6 et 7).

La paroi cellulaire et la vacuole comptent environ 96% du plomb absorbé (Wierzbicka and Antosiewicz, 1993). De grandes particules de plomb peuvent s'accumuler à proximité des plasmodesmes et occuper un grand volume de la paroi cellulaire. Dans les autres régions où la paroi cellulaire est épaisse et substantielle, les petites particules de plomb s'accumulent dans la paroi cellulaire vers sa périphérie. Le dépôt de ces petites particules de plomb se produit probablement à travers l'action des vésicules pinocytotiques (Ksiazek et al., 1984).

La paroi du xylème contient des groupes chargés négativement qui peuvent lier les ions positifs libres de la sève, comme les métaux, et freiner ainsi leur progression. (Cataldo et al., 1988).

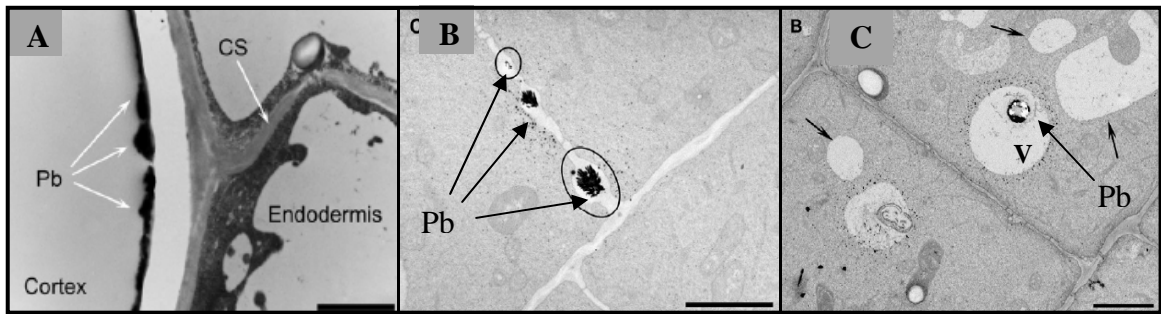


Figure 6: Localisation du plomb au niveau cellulaire dans la racine

(A) Exclusion du plomb par la barrière de Carpersky (B) Dépôts de plomb au niveau de la lamelle moyenne. (C) Accumulation du plomb dans la vacuole. CS : barrière de Carpersky, V : Vacuole (Meyers et al., 2008)

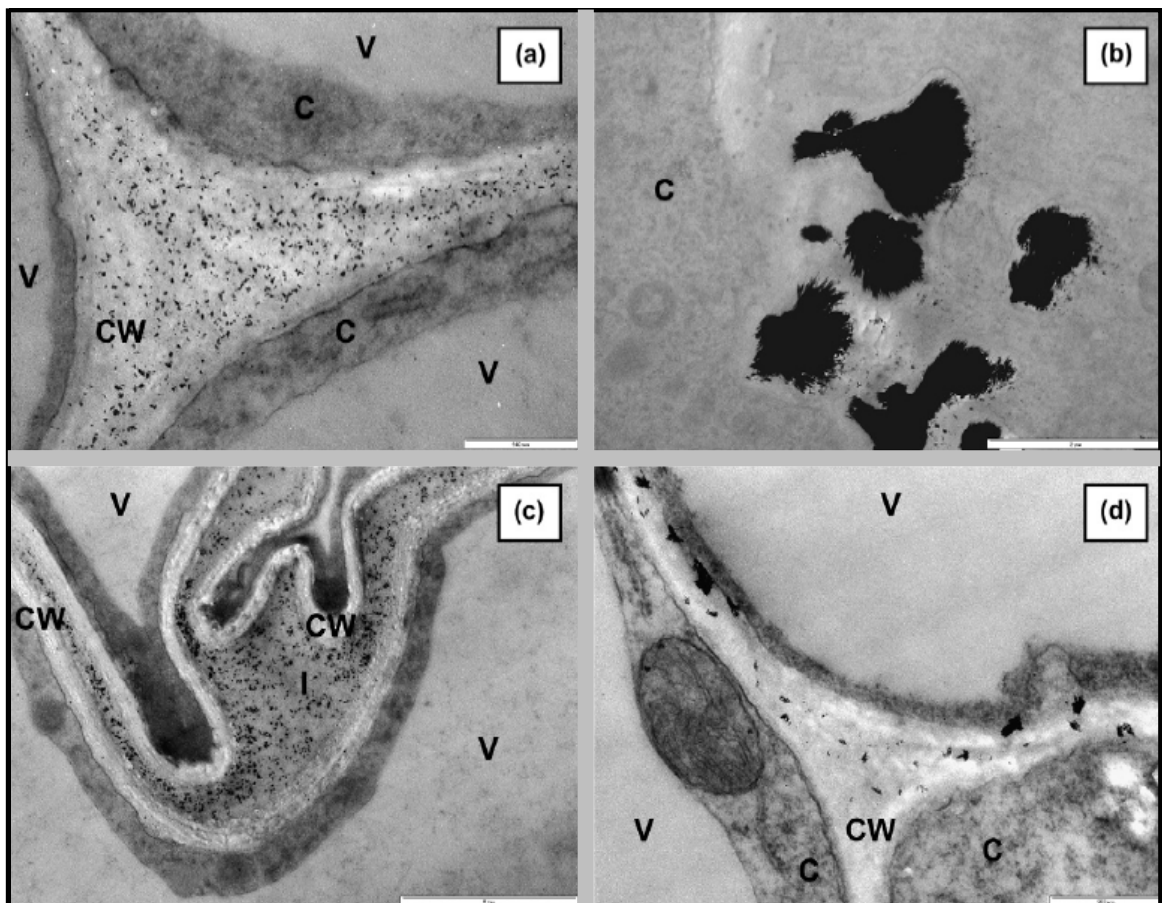


Figure 7: Accumulation du plomb au niveau des cellules de racines de plantules de 13 jours *Vicia unguiculata* croissant en présence de $1.6 \mu\text{M}$ de Pb^{2+} (Koppitke et al., 2007).

(a) Accumulation du Pb dans l'apoplaste du cortex (bar $\frac{1}{4}$ 0.5 mm), (b) Dépôts de cristaux de plomb dans le symplaste du cortex (bar $\frac{1}{4}$ 2mm), (c) Accumulation du plomb dans l'espace intercellulaire du cortex (bar $\frac{1}{4}$ 2 mm), et (d) Accumulation de plomb dans l'apoplaste de la stele (bar $\frac{1}{4}$ 0.5 mm) (C, cytoplasme; CW, paroi cellulaire; I, espace intercellulaire; V, vacuole).

La présence du plomb dans le réticulum endoplasmique et les dictyosomes est apparemment liée à la sécrétion du métal de la surface de la cellule vers la vacuole. Une petite quantité de plomb gagne le noyau, le chloroplaste, la mitochondrie et y exerce un effet toxique. Dans les cellules de feuilles de *Potamogeton* spp. le gradient du potentiel électrochimique entre la vacuole et la solution extérieure est de -150 à -240 mV (Denny

and Weeks, 1968), ce qui peut favoriser l'influx passif du plomb dans la vacuole. Chez *Stigeoclonium sp*, des vacuoles se forment de manière importante permettant la séquestration de l'excès des ions métalliques. Ces vacuoles peuvent protéger le contenu de la cellule de l'effet toxique du plomb (Silverberg, 1975).

La localisation du plomb entre les vacuoles et les parois cellulaires résulte probablement de la redistribution du plomb et cela reflète l'augmentation du transport apoplastique (Samardakiewicz and Wozny, 2000). La présence du plomb dans les petites vésicules chez *Lemna minor* suggère que l'endocytose joue un rôle important dans l'absorption du plomb dans cette plante.

2.4- Normes des métaux lourds dans les plantes

Il n'existe pas une réglementation algérienne en matière d'éléments traces. Le tableau 1 montre les teneurs normales des métaux lourds chez les plantes.

Tableau 1 : Composition normale des éléments traces dans la plante (Markert, 1994)

<i>Eléments traces</i>	<i>($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)</i>
Aluminium	80
Cadmium	0.05
Chromium	1.5
Cobalt	0.2
Cuivre	10
Plomb	1
Manganèse	200
Mercure	0.1
Nickel	1.5
Zinc	50

2.5- Toxicité

Le premier effet des métaux lourds observable chez les végétaux est une inhibition de la croissance. Celle-ci s'accompagne très souvent de nombreux autres indices de disfonctionnement tels que des chloroses foliaires, d'importantes lésions nécrotiques, un jaunissement progressif et un repliement ou dessèchement du feuillage (Esteban, 2006) (Figure 10).

Les sels de plomb causent un stress salin qui a plusieurs effets sur la plante : Un effet ionique, une déficience en nutriments, un effet osmotique et un stress oxydatif.

Les formes actives d'oxygène formées sous l'effet du stress par le plomb altèrent toute une série de substrats biologiques importants, avec comme conséquence la modification des domaines fonctionnels des biomolécules : inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme végétal (notamment la photosynthèse et la respiration), oxydation des protéines, altération des membranes cellulaires via l'induction de phénomènes de

péroxydation lipidique, apparition de cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire (Devi and Prasad, 1999 ; Dietz *et al.*, 1999 ; Cheng, 2003).

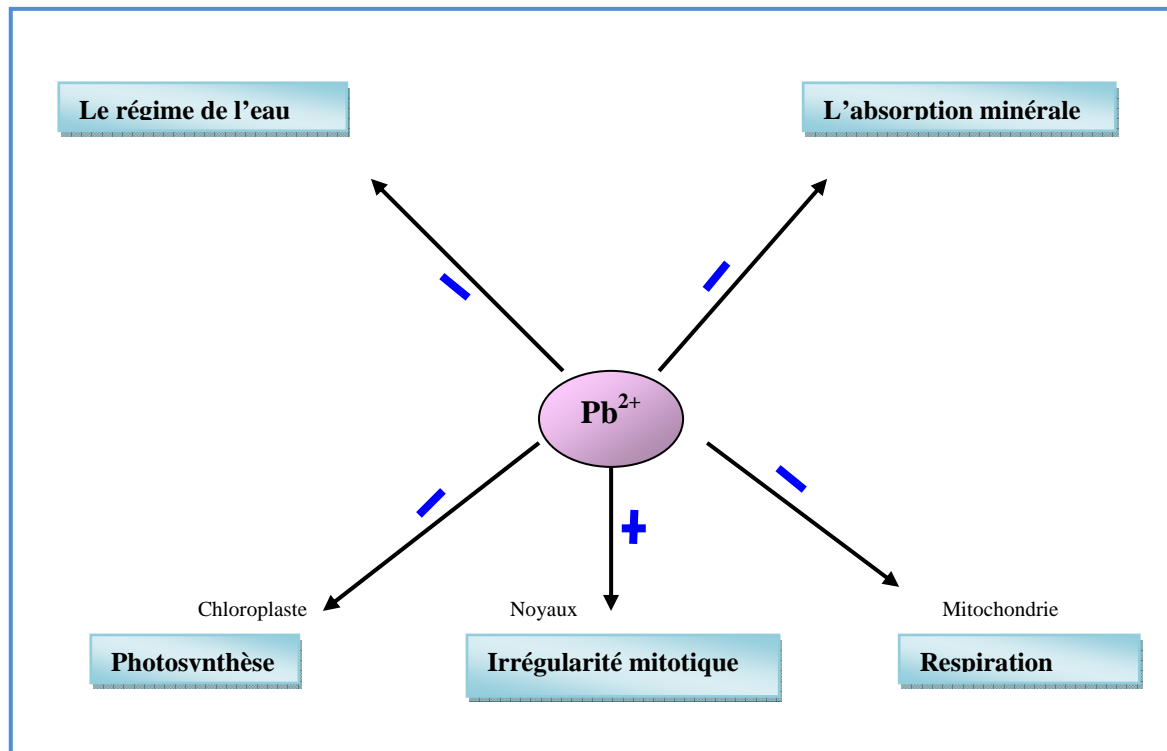


Figure 8 : Effets du plomb sur la physiologie du végétal. Les signes (+) et (-) représentent respectivement l'augmentation et la diminution de l'activité (Sharma et Dubey, 2005).

2.5.1- Effets ioniques du plomb

✓ Germination et croissance

Le traitement par le plomb cause un retard de la croissance avec une réduction de la surface foliaire, et des organes majeurs de transpiration (Iqbal and Moshtaq, 1987).

Le plomb inhibe la germination des graines et retarde la croissance des racines. Il diminue le pourcentage et l'indice de germination, le rapport longueur des racines/longueur des pousses, l'indice de tolérance et le poids sec des racines et des pousses (Mishra and Choudhari, 1998). Une forte concentration en plomb (1 mM) cause une diminution de la germination des graines de riz de 14 à 30 % et réduit la croissance des racines de plus de 13 à 45 % (Verma and Dubey, 2003).

La croissance des racines est inhibée par le plomb à des concentrations allant de 10^{-2} M à 10^{-6} M ou dans des sols contenant environ 10mg/kg de plomb (Breckle, 1991).



Figure 9 : Effet du plomb sur la racine (Koppitke et al., 2007)

L'inhibition de la croissance des racines sous l'effet du plomb est le résultat de l'inhibition de la division cellulaire induite par le plomb (Eun et al., 2000).

Le traitement par le plomb perturbe l'alignement des microtubules (Yang et al., 2000) et les détruit causant un blocage des cellules en pro-métaphase. Ce blocage n'est cependant pas permanent (Wierzbicka, 1994). Les microtubules des différentes régions du méristème racinaire et à différents stades du cycle cellulaire montre une sensibilité différentielle au plomb. Ces effets n'apparaissent pas être un phénomène commun aux métaux toxiques qui causent des dommages à la plante (Eun et al., 2000).

Chez des plantules traitées avec des concentrations allant de $10^{-4}M$ à $10^{-3}M$ de Pb, la croissance du mésocotyle et du coléoptyle est similairement affectée bien que la concentration du plomb soit 3 fois plus importante dans les tissus du mésocotyle. La réduction de la croissance des racines n'est pas la conséquence de la fuite de potassium ou de l'accumulation du plomb mais elle est due à un signal inconnu induit par les racines comme réponse à l'exposition au plomb ; ce signal est ensuite transmis vers les pousses (Malkowski et al., 2002).

Le plomb provoque une diminution du taux de protéines présent dans les tissus et cause une importante altération de la composition lipidique (Przymusinski et al., 1991; Stefanov et al., 1995). Chez *Phaseolus vulgaris* et *Zea mays* des changements substantiels sont observés dans le taux des glycolipides, en particulier les monogalactosyl diacylglycérol qui sont associés aux membranes des chloroplastes (Stefanov et al., 1993).

L'incubation en présence de sels de plomb induit de manière invariable la diminution du taux des acides gras saturés et une augmentation des acides gras polyinsaturés (18 :3) (Stefanov et al., 1995).

✓ Activités enzymatiques

Comme les autres métaux lourds, le traitement des plantes par le plomb influence l'activité des enzymes de différentes voies métaboliques. En général l'inhibition des activités enzymatiques exercée par le plomb résulte de l'interaction du plomb avec les groupements -SH des sites actifs des enzymes mais aussi avec les groupements -SH libres nécessaires à la stabilisation de la structure tertiaire des enzymes. Le blocage des groupements -COOH par les ions de Pb^{2+} apparaissent aussi jouer un rôle majeur dans l'inhibition de l'activité enzymatique (Levina, 1972).

L'inhibition des métalloenzymes sous l'effet du plomb apparaît être due au déplacement des métaux essentiels par le plomb (Sharma et Dubey, 2005). L'inhibition de l'activité

enzymatique par le plomb n'apparaît pas être spécifique au plomb, cela est possible avec d'autres cations ayant une affinité comparable pour les groupements protéiques fonctionnels (Sharma et Dubey, 2005).

L'augmentation de l'activité des enzymes hydrolytiques sous l'effet du plomb se fait en parallèle avec la sénescence des feuilles. L'augmentation de l'activité des enzymes qui hydrolysent le RNA ribonucléase et des protéases a été observée chez les plantules d'angiospermes aquatiques submergées qui poussent en présence d'acétates de plomb (Jana and Choudhari, 1982).

Comme le plomb favorise la formation des ROS dans la plante menant ainsi à un stress oxydatif, une augmentation de l'activité de certaines enzymes antioxydatives a été observée dans des plantes traitées avec du plomb. Ainsi, chez des plantes de riz, une augmentation de l'activité des enzymes antioxydatives, superoxyde dismutase, guaiacol peroxydase, ascorbate peroxydase et glutathion réductase au niveau des racines et des feuilles a été observée (Verma and Dubey, 2003).

✓ **La photosynthèse**

Les plantes exposées au plomb montrent une diminution de la photosynthèse qui résulte de la destruction de l'ultra structure du chloroplaste. Le plomb induit une augmentation de l'activité de la chlorophyllase et donc une diminution du taux de chlorophylles au niveau de la cellule (Drazkiewicz, 1994). La chlorophylle b est plus affectée que la chlorophylle a sous l'effet du plomb (Vodnik et al., 1999). Le plomb endommage l'appareil photosynthétique; cela est dû à son affinité pour les protéines ligands -N et -S (Ahmed and Tajmir-Riahi, 1993). Sous l'effet du nitrate de plomb, *Ceratophyllum demersum* montre un changement distinct au niveau de la structure fine du chloroplaste (Rebechini and Hanzely, 1974).

Les cellules de feuilles de quelques plantes montrent une réduction des saccules de grana accompagnée d'une réduction de la quantité du stroma en relation avec le système lamellaire ainsi qu'une absence de grains d'amidon (Stefanov et al., 1995).

D'après Kosobrukhov et collaborateurs (2004), l'activité photosynthétique des plantes est gouvernée par de nombreux facteurs incluant la taille des cellules des stomates, le nombre des stomates, la conductance des stomates, la surface foliaire etc. Le plomb diminue le taux de la photosynthèse en affectant l'assimilation du CO₂, en induisant la fermeture des stomates et en inhibant l'activité de l'enzyme clé de l'assimilation du CO₂, la ribulose biphosphate carboxylase (Van Assche and Clijsters, 1990).

✓ **La respiration et ATP**

Le plomb influence la respiration et ce, en fonction de sa concentration. A de basses concentrations, la stimulation de la respiration est observée au niveau de la plante (Lee et al., 1976), des feuilles (Lamoreaux and Chaney, 1978), des protoplastes isolés (Parys et al., 1998), et des mitochondries (Koepppe and Miller, 1970). Une exposition des feuilles de plantes en C₃ (petit pois, l'orge) et des plantes en C₄ (maïs) à 5mM de plomb pendant 24 heures cause une stimulation du taux respiratoire de 20 à 50% (Romanowska et al., 2002). Le plomb induit non seulement une augmentation de l'ATP mais aussi du rapport ATP/ADP au niveau des feuilles de petit pois et de maïs (Romanowska et al., 2002).

D'après Ernst (1980) la stimulation de la respiration sous l'effet du plomb serait due à une augmentation de la demande de la production d'ATP nécessaire au mécanisme de la photophosphorylation oxydative.

A fortes concentrations, le plomb exerce une diminution de la respiration (Reese and Roberts, 1985) en affectant le déplacement des électrons via le système de transport d'électrons (Miles et al., 1972; Bazzaz and Govindjee, 1974). L'effet inhibiteur du plomb à de fortes concentrations apparaît être dû à une inhibition de la phosphorylation oxydative (Miller et al., 1973).

2.5.2- Déficience en nutriments

Les fortes concentrations de plomb dans le sol causent un déséquilibre de la nutrition minérale chez les plantes. Des changements significatifs du rapport interne des nutriments se produisent dans la plante sous l'effet du plomb (Kabata-Pendias and Pendias, 1992).

Des interactions de compétitivité peuvent exister entre les nutriments essentiels et les métaux lourds (Tableau 2). Ces derniers considérés comme polluants, sont facilement absorbés par la plante et entrent en compétition avec les éléments nutritifs (Prasad et al., 2002).

Deux mécanismes expliquant la diminution des micro et macronutriments sous l'effet du plomb sont suggérés. Le premier, qui est un effet de compétition entre le plomb et les autres cations au niveau de la membrane racinaire est en relation avec la taille de l'ion métallique; tandis que le second, chimique, est lié au désordre induit par le métal sur le métabolisme cellulaire; il mène à des changements de l'activité des enzymes membranaires et de la structure membranaire.

Le plomb bloque physiquement l'accès de nombreux ions (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}) vers les sites d'absorption de la racine (Godbold and Kettner, 1991; Walker et al., 1977). 40% du calcium absorbé par les plantes en croissance est utilisé par les apex racinaires (Figure 10). L'inhibition de la croissance des racines après exposition au plomb serait due à une diminution du calcium, menant à une diminution de la division cellulaire et/ou de l'élongation cellulaire (Haussling et al., 1988).

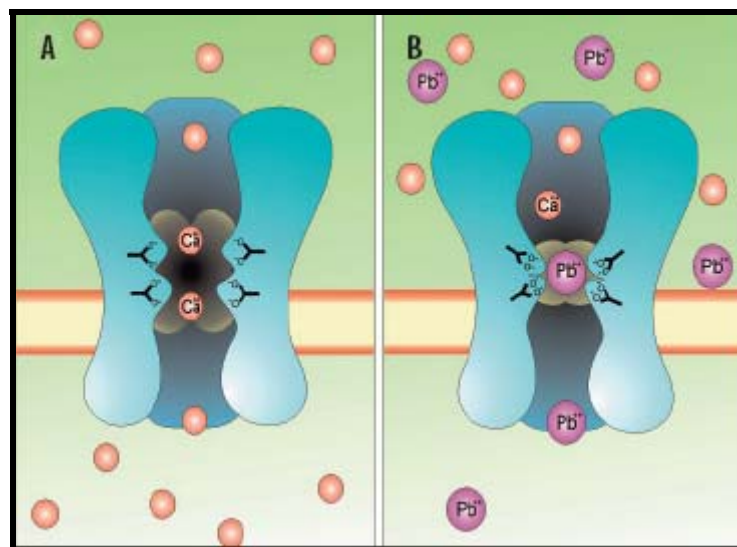


Figure 10 : Effet de compétition entre les ions de calcium et de plomb

- (A) Perméabilité du calcium au niveau d'un canal ionique. Les groupements carboxyliques du canal à calcium à potentiel dépendant (formé de 4 résidus glutathion) se trouvent au milieu du canal avec ses charges distribuées en jaune. Les deux ions calcium interagissent avec les charges des groupements.
- (B) Représentation du blocage causé par les ions du plomb. La forte affinité d'interaction entre le plomb et les groupements carboxyliques concentre les charges autour de l'ion plomb, cela empêche le calcium de se lier en bloquant le pore (Cloues et al., 2000).

Le plomb influence la distribution des éléments nutritifs dans les différents organes de la plante. Le rapport total de distribution du Mn^{2+} et du S^{-} change en faveur des racines sous l'effet du plomb, ce qui peut représenter une rétention de ces ions dans les racines. Le contenu en phosphore se trouve être corrélé négativement avec le plomb du sol (Paivoke, 2002).

Tableau 2: Influence du plomb sur la composition en nutriments chez les végétaux (Prassad et al., 2002)

Plantes	Organe	Minéraux nutritifs	
		Diminution	Augmentation
<i>Raphanus sativa</i>	Racine	Fer, Zinc, Cuivre	-
<i>Cucumis sativus</i>	Racine	Fer, Potassium, Calcium	Magnésium
<i>Cucumis sativus</i>	Cotylédons	Magnésium, Potassium, Calcium	Fer
<i>Raphanus sativa</i>	Pousses	Fer, Zinc, Cuivre	-

2.5.3- Effet osmotique du plomb

Sous l'effet du plomb, une diminution du taux de transpiration et de l'eau dans les tissus est observée dans la plante en croissance. Les cellules de garde sont généralement de petite taille chez les plantes traitées par le plomb. Le plomb réduit le taux de composés qui sont associés au maintien de la turgescence cellulaire, à l'élasticité de la paroi cellulaire, il diminue aussi le potentiel de l'eau dans la cellule. Les ions métalliques y compris le plomb augmentent la quantité d'ABA et induit la fermeture des stomates et donc une diminution de la transpiration (Bazzaz et al., 1974). Ainsi les fortes concentrations de plomb causent un stress hydrique physiologique.

2.5.4- Stress oxydatif

Le plomb induit la production des formes actives d'oxygène dans la plante et leur production dépend de l'intensité et des périodes répétées du stress, de l'espèce et de l'âge de la plante (Asada, 1994; Chaitnya and Naithani, 1994; Verma and Dubey, 2003).

Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation. En effet, les cations d'éléments comme fer, cuivre, chrome ou manganèse sont capables de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés.

La plus connue de ces réactions est la réaction de Fenton (1) qui se produit en présence de fer ferreux et qui conduit à la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en radical hydroxyl ($\cdot OH$) et en anion hydroxyl (\bar{OH}) :



D'autres réactions de ce type faisant intervenir des métaux réduits ont également été décrites, telle que la réaction d'Haber-Weiss (2) au cours de laquelle le peroxyde d'hydrogène réagit avec un radical superoxyde, comme l'anion superoxyde $\cdot\text{O}_2^-$, aboutissant, là encore, à la production du radical hydroxyle.

2.6- Le comportement des plantes vis-à-vis d'un stress métallique

Pour éviter les dommages causés par le plomb, des systèmes de stockage ou de détoxification des métaux accumulés sont mis en œuvre par certains végétaux. Berry (1986) suggère aussi 3 stratégies de base de la réponse: l'évitement, la tolérance et la résistance (Figure 11 et 12).

2.6.1- Les mécanismes d'évitement et de tolérance

✓ Exsudats racinaires

Les plantes et les microorganismes sécrètent des quantités significatives de composés organiques et inorganiques, qui sont capables de chélater ou de précipiter les métaux. Les plantes sécrètent une importante quantité de substances qui chélatent les métaux, comme les acides organiques, les sucres, les acides aminés, les péptides, les acides phénols, etc (Vancura et al., 1965 ; Rovira, 1969).

✓ Les mycorrhizes

Les mycorrhizes et particulièrement les ectomycorrhizes ont un rôle important dans la tolérance aux métaux chez de nombreux végétaux hôtes. Les mécanismes majeurs utilisés sont les processus d'exclusion en accumulant les métaux au niveau des racines des plantes hôtes (Jentshke and Godbold, 2000) et l'absorption des métaux par la gaine hyphale ce qui réduit l'accès vers l'apoplaste grâce à l'hydrophobicité de la gaine fongique, la chélation par les exsudats fongiques et l'adsorption des métaux au niveau du mycellium externe (Hall, 2001).

Des racines de Maïs colonisées par des mycorrhizes arbusculaires peuvent réduire la quantité de métaux lourds absorbée par la plante ou bien augmenter l'absorption des métaux à partir des sols pollués, en fonction des conditions de croissance du champignon et de la concentration du métal (Weissenhorn et al. 1995).

✓ La paroi cellulaire

Une fraction considérable de métaux qui se trouvent au niveau des racines de la plante, paraît être localisée dans l'espace intercellulaire, liés aux pectines et aux protéines de la paroi cellulaire (Peterson, 1969; Fargo et al., 1980). Les métaux seraient liés électrostatiquement sur un système de fixation de charge ou forment des liaisons stables, dépendant de leur coordination chimique. L'augmentation de la fixation de charge implique une plus grande résistance face à la diffusion des ions métalliques à travers la paroi cellulaire, ce qui réduit la quantité de métaux absorbée (Jonathan Shaw, 1991).

✓ La membrane plasmique et le tonoplaste

La membrane plasmique peut limiter l'accumulation des ions toxiques, soit en modifiant l'ensemble du flux ionique, soit en employant des systèmes ultra spécifiques autorisant un flux ionique qui ne transporterait pas les ions toxiques (Meharg, 1993). Cependant, si la membrane plasmique apparaît comme étant la première barrière face à l'entrée des éléments métalliques dans le cytosol, elle constitue également une cible importante pour la toxicité métallique (Esteban, 2006). Les protéines associées au plasmalemmes jouent un rôle essentiel dans le transport des métaux à travers la membrane plasmique.

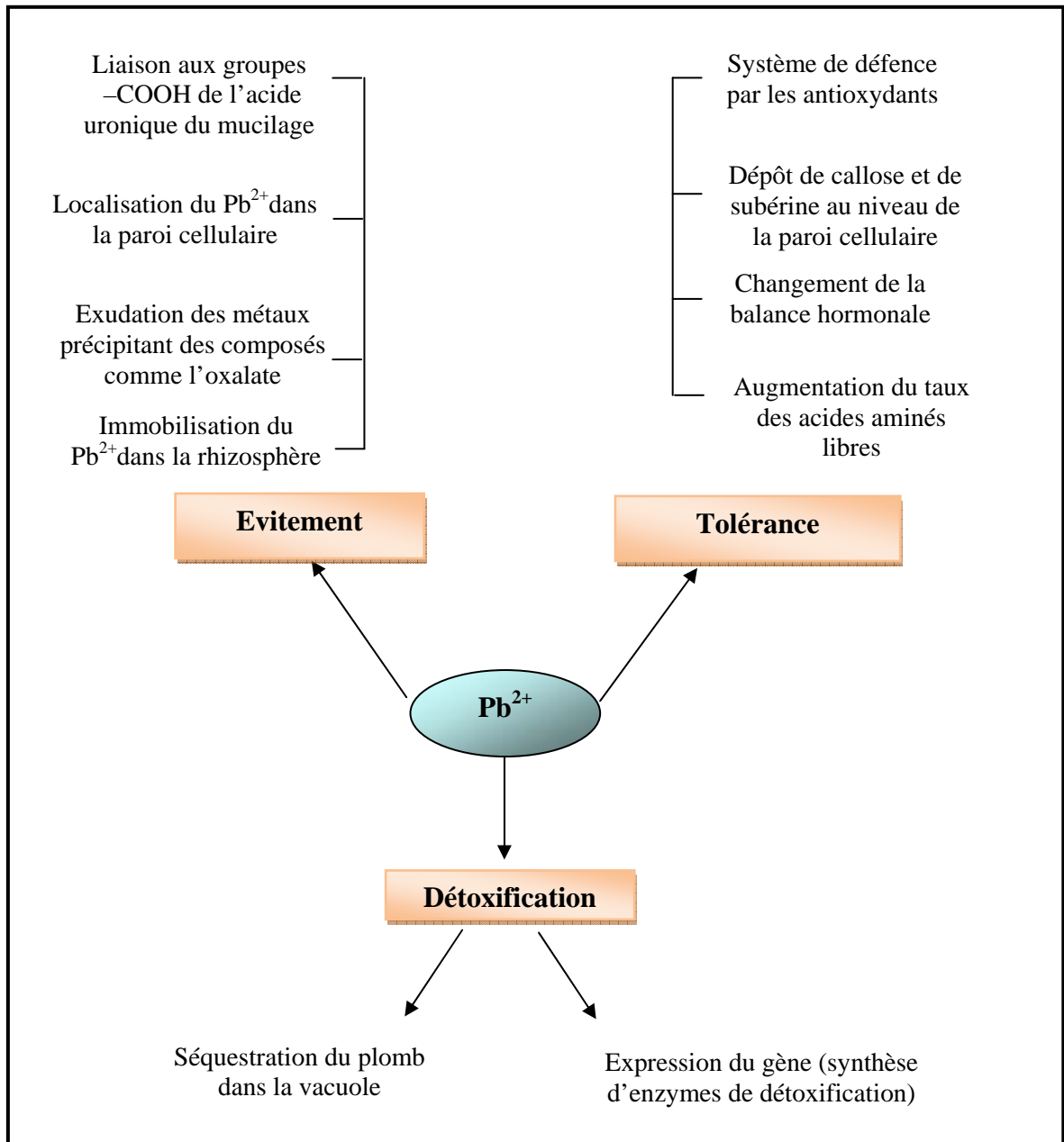


Figure 11 : Réponse de la cellule végétale face au stress par le plomb (Sharma and Dubey, 2005).

✓ Les chélateurs intracellulaires

Les végétaux supérieurs, comme les autres organismes, possèdent des chélateurs de métaux, qui servent à maintenir la disponibilité des métaux essentiels et non essentiels à une certaine concentration. Les plantes accumulent une variété de chélateurs métalliques importants comme les acides aminés, acide citrique, acide malique, les métallothionines et les phytochélatines (Jonathan Shaw, 1991).

Les métallothionéines

Ces protéines sont caractérisées par leur richesse en cations métalliques (essentiellement cuivre et/ou Zinc) et par leur forte proportion en résidus cystéines (environ 30 %). Elles se distinguent aussi par leur faible masse moléculaire (6 à 8 kDa et 60 à 75 acides aminés) et par l'absence de résidus aromatiques (Esteban R, 2006).

Bien que leurs séquences en acides aminés soient très variables d'un organisme à un autre, il semblerait que la structure tridimensionnelle soit bien conservée. La plupart des métallothionéines présentent deux domaines globulaires distincts, dépourvus de structure secondaire et reliés entre eux par une courte séquence de transition ; chaque domaine est responsable de la fixation de plusieurs cations métalliques divalents ou monovalents (Esteban R, 2006)

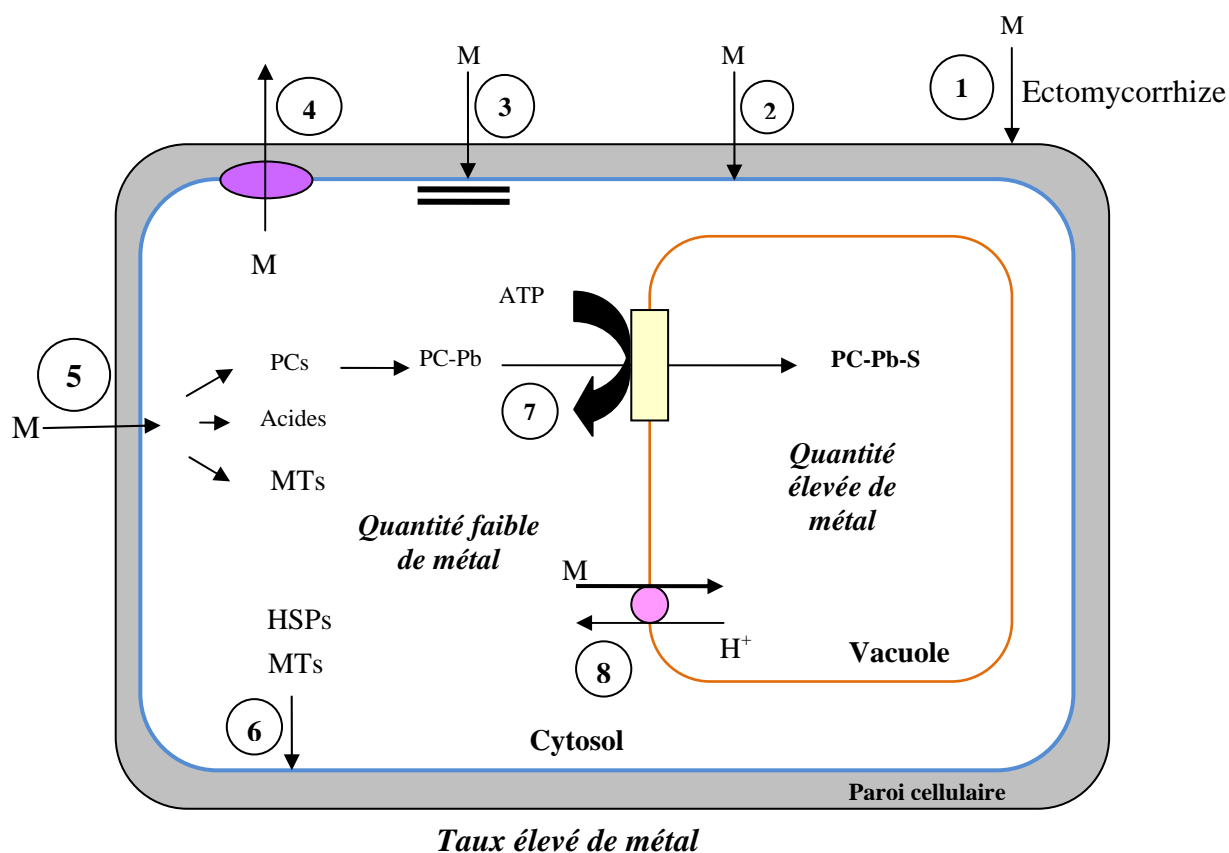


Figure 12 : Mécanismes cellulaires de détoxification et de tolérance des métaux chez les plantes supérieures. 1. Restriction du mouvement du métal vers la racine par les mycorrhizes. 2. Liaison à la paroi cellulaire et aux exsudats racinaires. 3. Influx réduit à travers la membrane plasmique. 4. Efflux actif dans l'apoplaste. 5. Chélation dans le cytosol par des ligands. 6. Réparation et protection de la membrane plasmique sous les conditions de stress. 7. Transport du complexe PC-Pb vers la vacuole. 8. Transport et accumulation des métaux dans la vacuole. (Modified after Marschner, 1995). M : métal ; MTs : métallothionéines ; PCs : Phytochélatines ; S : soufre ; HSPs : High Shoc Protein ; Pb : plomb

Le rôle précis des métallothionéines dans la réponse aux métaux lourds est encore débattu, mais elles pourraient être impliquées dans certains mécanismes de tolérance, notamment vis-à-vis du cadmium et du cuivre (Murphy and Taiz, 1995). La sur-expression des gènes MT (métallothionéines) dans des organismes aussi variés que des cyanobactéries, des levures, des cellules de mammifères ou des plantes (Misra and Gedamu, 1989), peut

s'accompagner d'une augmentation de la tolérance à certains métaux lourds (Cu, Zn et Cd).

Les phytochélatines

De nature peptidique, ces molécules sont classées dans une petite famille apparentée aux métallothionéines, avec lesquelles elles partagent d'assez nettes similarités de structure et de fonction : elles sont très riches en Cystéine [formule générale (Glu-Cys)_n-Gly (avec n = 2 à 11)] et leur synthèse est stimulée par la présence de métaux lourds (cadmium, cuivre, zinc, etc...). Une différence essentielle avec les autres métallothionéines réside dans l'origine biosynthétique des phytochélatines (Figure 13); elles ne sont pas directement codées par le génome mais sont synthétisées par une phytochélatine synthase, à partir d'un tripeptide précurseur, le glutathion (Glu-Cys-Gly). Bien que les phytochélatines soient clairement impliquées dans la liaison des métaux intracellulaires, l'activité phytochélatine synthase semble constitutive chez la plupart des plantes (De Knecht *et al.*, 1992).

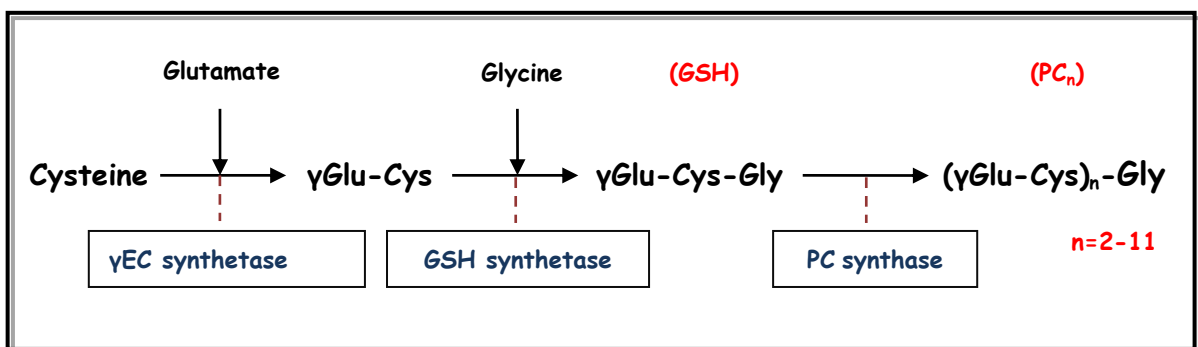


Figure 13: Biosynthèse des phytochélatines chez les végétaux supérieurs (E : Glutamate ; C : Cystéine ; GSH : ; PC : Phytochélatine) (Inouhe M, 2005)

✓ Les acides organiques

Sous cette dénomination, sont classées des molécules diverses tels que des acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou tricarboxyliques (comme l'acide citrique). Toutes ces petites molécules sont clairement impliquées dans les phénomènes d'accumulation. On observe souvent une stimulation de leur synthèse en présence de métaux lourds, ce qui laisse penser qu'elles assurent le transport xylémien des ions métalliques depuis les racines vers les parties aériennes de la plante (Esteban, 2006).

Les capacités d'hyperaccumulation et de résistance de certaines variétés de blé noir (*Fagopyrum esculentum*) vis-à-vis de l'aluminium sont directement dépendantes de la synthèse d'acide oxalique (Ma *et al.*, 1997). De même, une synthèse accrue de malate a été observée chez une population tolérante de *Festuca rubra* se développant sur des dépôts riches en cuivre et zinc, par rapport à une population sensible provenant d'une prairie (Harrington *et al.*, 1996). Ces deux exemples suggèrent donc que la tolérance aux métaux chez quelques métallophytes hyperaccumulatrices serait acquise par une synthèse spécifique de petites molécules organiques à fortes capacités de chélation.

✓ Les acides aminés libres

Les acides aminés libres comme la proline, l'histidine et la cystéine, s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être eux aussi impliqués dans la chélation de divers métaux lourds, notamment du zinc et du nickel (Briat et Lebrun, 1999 ; Bert, 2000).

C'est ainsi que l'accumulation et la tolérance au nickel dans le genre *Alyssum* semblent principalement dûes à une synthèse accrue d'histidine (Krämer *et al.*, 1996).

Il a été montré que la proline libre agit comme un osmoprotéctant (Paleg et al., 1984), un stabilisateur de protéine (Sharma and Dubey, 2004), un chélateur métallique (Farago and Mullen, 1979), un inhibiteur de la peroxydation des lipides (Mehta et al., 1979) et une substance qui permet l'élimination des radicaux libres (Alia et al., 2001), etc.

✓ **Les protéines de choc thermique (HSPs)**

Elles sont réputées pour leur implication dans le stress lié à un choc thermique. Elles seraient également responsables de la tolérance aux métaux toxiques. En effet, des stress très variés, ayant en commun de dénaturer les protéines (stress protéotoxique), sont capables d'induire cette réponse de type « choc thermique ».

L'induction des HSP par le stress protéotoxique, permet à la cellule de réparer les dommages protéiques ainsi occasionnés par resolubilisation des agrégats, renaturation des polypeptides ou, si cela est impossible, par l'engagement des protéines dénaturées vers les voies de dégradation. Ainsi, les résultats obtenus sur des cellules de tomate ont établi que l'action d'H₂O₂ induisait la synthèse de protéines de choc thermique (Banzet *et al.*, 1998). De la même façon, dans les cellules de *Lycopersicon peruvianum* exposées à 1 mM de cadmium, des quantités significatives d'hsp70 ont été relevées au niveau du plasmalemme, de la membrane mitochondriale et du réticulum endoplasmique, sièges de multiples dégâts du stress oxydant provoqué par les métaux lourds (Neumann *et al.*, 1994).

✓ **La compartimentation des métaux**

Certaines plantes sont capables de transloquer l'excès de métaux vers les feuilles âgées (trichomes), juste avant leur abscission, ce qui diminuerait leurs concentrations dans la plante (Ernst, 1974). En général, la concentration dans les feuilles augmente avec l'âge. Chez *Armeria maritima* subsp. *halleri*, dans les feuilles marrons (les plus âgées ou trichomes), les concentrations en cuivre, cadmium, zinc et plomb sont 3 à 8 fois plus importantes que 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.

Quelques auteurs affirment que la restriction du transport des métaux des racines vers les pousses représente un mécanisme de tolérance important (Antonovics et al., 1971 ; Baker, 1987).

Une des hypothèses les plus fréquentes pouvant expliquer le phénomène de tolérance serait attribuée à la compartimentation accrue des métaux lourds sous forme ionique dans la vacuole grâce à plusieurs familles de transporteurs protéiques. En effet, un transporteur tonoplastique appartenant à la famille des protéines GTP a été identifié chez un écotype de *Silene vulgaris* tolérant au zinc (Chardonens *et al.*, 1999). Chez *Rauvolfia serpentina*, le cadmium forme, avec les phytochélatines, des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight (LMW)), qui s'agrègent les uns aux autres par des ponts disulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée (High Molecular Weight (HMW)). Ces complexes HMW pourraient alors être transportés vers la vacuole. Le pH vacuolaire provoquerait alors la dissociation du complexe et les ions seraient pris en charge par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate (Sanita di Toppi and Gabbriella, 1999).

2.6.2- Le mécanisme de résistance

Trois activités enzymatiques clefs occupent une place centrale dans le mécanisme de résistance qui consiste en la détoxification des formes actives d'oxygène : il s'agit des

superoxyde-dismutases (SOD), des catalases (CAT) et des peroxydases (POX). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Figure 14).

✓ **La superoxyde-dismutase (SOD)**

Elle est responsable de la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), selon la réaction (Figure 14).

Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal divalent situé au coeur de l'enzyme. Selon la nature de ce métal, on distingue les superoxyde-dismutases à manganèse (Mn-SOD) localisées dans les mitochondries, les superoxyde-dismutases à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD), cytosoliques et enfin, les superoxydedismutases à fer ferreux (Fe-SOD), localisées dans le chloroplaste (Esteban, 2006).

L'augmentation de l'activité des enzymes qui catalysent les superoxydes a été reporté chez des plantes de *Lupenus luti* et *O. sativa* (Przymusinski et al., 1995; Verma and Dubey, 2003). L'augmentation de l'activité des superoxydes dismutases en réponse au plomb apparaît être due à une synthèse de novo des protéines enzymatiques (Lozano et al., 1996). Des plantules de riz stressées par le plomb ont aussi montré une augmentation de l'activité de l'ascorbate peroxydase et de la glutathion réductase (Verma and Dubey, 2003).

✓ **Les catalases**

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

Parmi les enzymes antioxydatives, la catalase décompose le H_2O_2 en eau et une molécule d'oxygène. Une diminution de l'activité de la catalase a été observée chez les plantes stressées par le plomb (Verma and Dubey, 2003). Une telle diminution apparaît être due à une réduction de la synthèse d'enzymes ou au changement de l'assemblage des sous unités des enzymes (Hertwig, 1992). Verma et Dubey (2003) ont observé une diminution de l'intensité de deux formes isoenzymes de la catalase au niveau des pousses de plantules stressées par le plomb, corrélée à une diminution de l'activité de l'enzyme sous l'effet du plomb. Ces isoformes sont sous le contrôle de différents gènes (Frugoli et al., 1996).

✓ **Les peroxydases**

Ils permettent comme les catalases la réduction de H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, à la différence des catalases, les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités. Deux types principaux de « molécules antioxydantes » sont utilisés comme substrat par les peroxydases : l'acide ascorbique (Asc) et le glutathion (GSH). Ces deux molécules participent au cycle « ascorbate/glutathion » (Noctor and Foyer, 1998 ; Foyer and Noctor, 2000), dont la première étape consiste en une réduction du peroxyde d'hydrogène en eau, couplée à une oxydation de l'ascorbate en monodéhydroascorbate (MDHA) ; cette étape est catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX).

Pour permettre la poursuite de cette réaction, l'ascorbate oxydé doit être à nouveau réduit. Pour cela, deux voies (directe et indirecte) de régénération de l'ascorbate coexistent : La réduction directe du MDHA par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR) via l'oxydation d'une molécule de NAD(P)H. Cependant, le MDHA est une molécule relativement instable qui a tendance à se dismuter spontanément en déhydroascorbate et ascorbate. La seconde voie de régénération de l'ascorbate consiste donc en une réduction

du déhydroascorbate par la déhydroascorbate réductase (DHAR), couplée à une oxydation du GSH. Enfin, le glutathion oxydé, produit au cours de cette dernière réaction, est régénéré en GSH grâce la glutathion réductase (Esteban, 2006).

Le plomb induit l'activité de la peroxydase chez le soja, les plantules de riz etc. (Lee et al., 1976; Verma and Dubey, 2003). Le rôle des peroxydases comme enzymes de stress (Gaspar, 1982) chez les plantes a été largement accepté (Subhashini and Reddy, 1990). L'augmentation de l'activité des peroxydases sous l'effet du plomb peut être corrélé à la libération des peroxydases localisées au niveau de la paroi cellulaire (Gaspar, 1982).

L'ascorbate peroxidase est considérée comme l'enzyme clé du mécanisme de défense antioxydative (Sharma and Dubey, 2004). Les deux enzymes superoxyde dismutase et glutathion réductase jouent un rôle central dans le combat contre les dommages causés par le plomb au niveau des plantes de riz (Verma and Dubey, 2003). L'augmentation de l'activité des glutathion réductases sous l'effet toxique du plomb aide le recyclage du glutathion oxydé en glutathion réduit pour maintenir le rapport glutathion oxydé/glutathion réduit (GSH/GSSG) et le pool total de glutathion (Foyer et al., 1997). L'augmentation de l'activité de la glutathion réductase sous l'effet du stress a été attribuée à la synthèse de novo des protéines enzymatiques (Baisak et al., 1994)

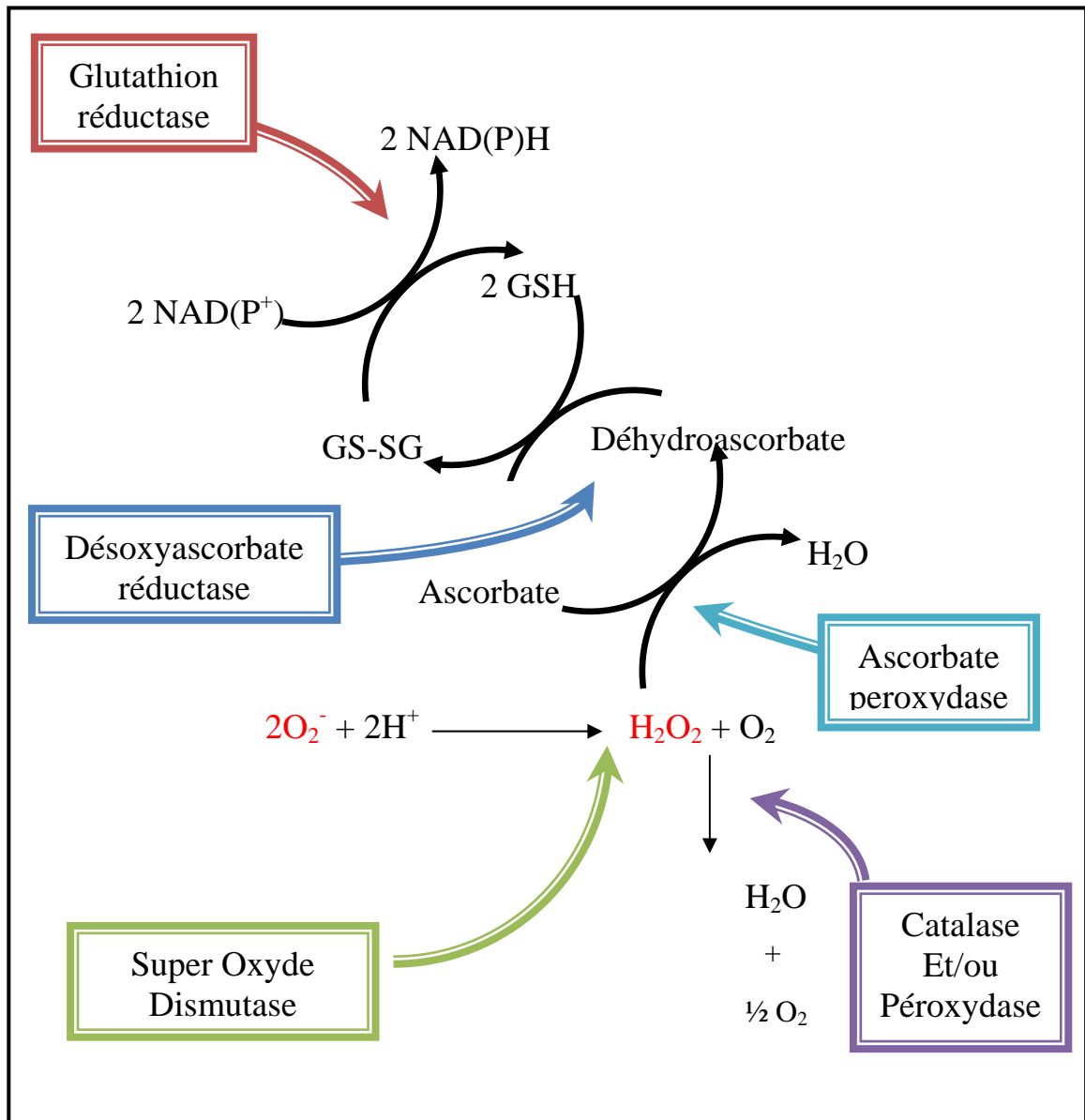


Figure 14: Les différents systèmes de détoxification enzymatique

2.7- L'utilisation des plantes pour la réhabilitation des sols pollués :

Les recherches s'orientent depuis quelques années vers l'utilisation de plantes supérieures. On sait en effet depuis longtemps que la présence d'un couvert végétal induit ou stimule la biodégradation d'une grande variété de contaminants organiques (Reilley *et al.*, 1996)

Par ailleurs, certaines plantes, dites métallophytes, sont capables de se développer normalement sur des sites fortement contaminés par divers métaux et certains de ces végétaux, qualifiés d'hyperaccumulateurs (Brooks, 1998), sont capables de stocker massivement les métaux dans leurs parties aériennes (Tableau 3). Ainsi, les études concernant l'écophysiologie et le métabolisme des plantes supérieures en milieu contaminé, ont progressivement permis d'insérer le concept de phytoremédiation à côté de celui de bio-remédiation des sites pollués.

Aujourd'hui, le terme de phytoremédiation est largement accepté et regroupe toutes les méthodes basées sur l'utilisation de végétaux supérieurs dans un but de dépollution.

Tableau 3 : Exemples de plantes hyperaccumulatrices de métaux lourds (Baker, 1997)

Métal	Limite inférieure (% en PS feuilles)	Nombre d'espèces	Nombre de familles	Genres
Cadmium	0.01	1	1	<i>Thlaspi</i>
Cobalt	0.1	28	11	<i>Acollentus</i> <i>Haumaniastrum</i> <i>Sopubia</i>
Cuivre	0.1	37	15	<i>Haumaniastrum</i> <i>Lindemia</i>
Plomb	0.1	14	6	<i>Thlaspi</i> <i>Armeria</i>
Manganèse	1	9	5	<i>Macadamia</i>
Nickel	0.1	317	37	<i>Alysum</i> <i>Thlaspi</i> <i>Phyllanthus</i> <i>Hybantus</i> <i>Sebertia</i>
Zinc	1	11	5	<i>Thlaspi</i> <i>Cardaminopsis</i>

2.7.1- La phytoextraction est basée sur l'utilisation de végétaux hyperaccumulateurs qui absorbent les métaux du sol et les accumulent dans des organes aériens faciles à récolter (McGrath, 1998). Cette méthode, qui se révèle efficace pour une grande variété de métaux

lourds (Pb, Cd, Ni, Zn, ...), est aujourd'hui proposée par de nombreuses sociétés américaines (Figure 15).

2.7.2- La phytostimulation exploite l'effet stimulant de la rhizosphère sur la dégradation microbiologique des composés organiques (Figure 16). Cette démarche est notamment utilisée depuis plusieurs années par l'armée américaine (Esteban R, 2006) dans le cadre de la dépollution de sites contaminés par des explosifs (TNT) ou par des herbicides.

2.7.3- La phytovolatilisation permet la transformation des métaux en produits volatils puis le relargage dans l'atmosphère d'éléments tels que le mercure ou le sélénium. Cette approche, encore au stade expérimental, fait actuellement l'objet de recherches très actives ; les résultats récents (Bizily *et al.*, 1999) dans ce domaine sont particulièrement encourageants. Par transgénèse, des gènes d'autres organismes, en particulier des microorganismes ont été transférés à des végétaux pour leur permettre de rendre volatils des contaminants (exemple : Peupliers transformés volatilisent le mercure de sites contaminés (Raskin et Burt, 2000)).

2.7.4- La rhizofiltration utilise les capacités élevées du système racinaire de certains végétaux pour fixer les polluants d'un milieu liquide. Cette méthode a notamment été testée en Ukraine dans le cadre de la dépollution du site de Tchernobyl en utilisant des racines de tournesol. (Negri and Hinchman, 2000).

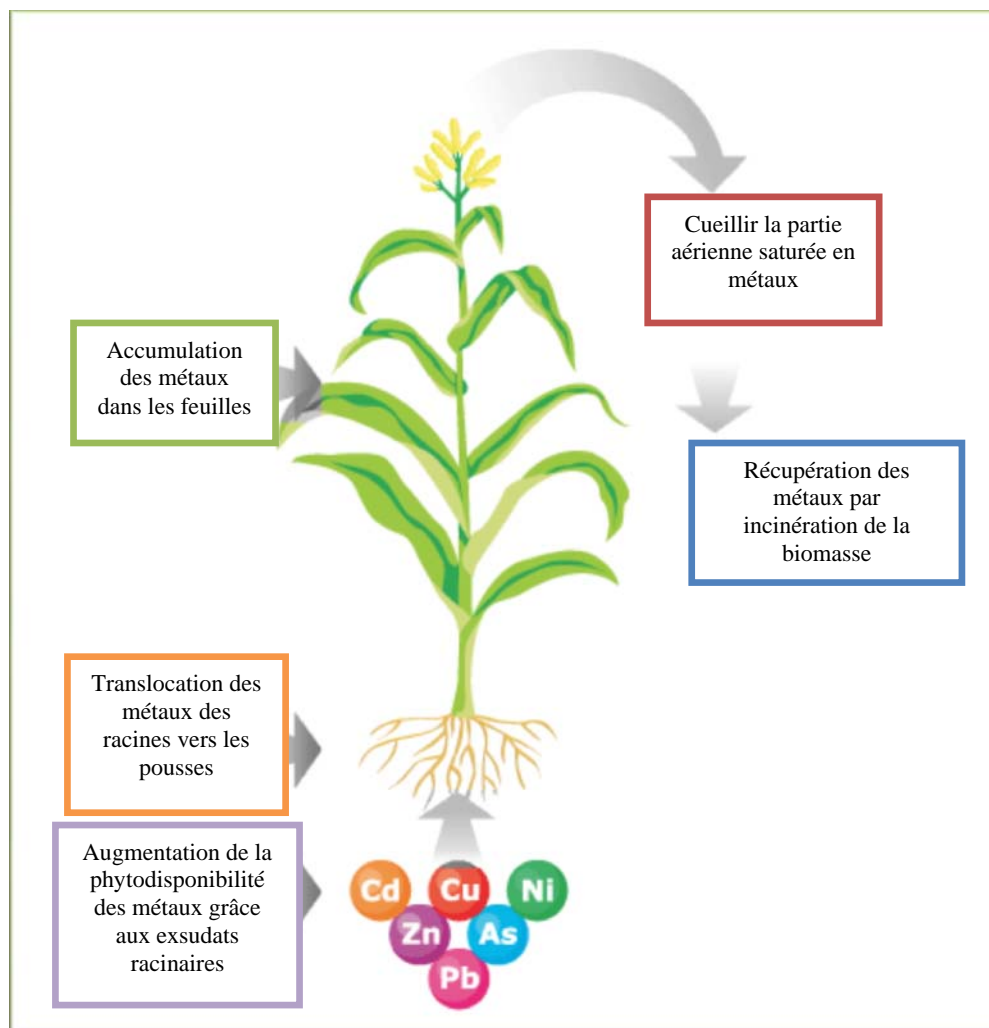


Figure 15 : Schéma représentant le principe de phytoextraction des métaux à partir du sol (Clístenes Williams Araújo do Nascimento, Baoshan X, 2006)

2.7.5- La phytostabilisation n'est pas une méthode de dépollution *sensu stricto*, mais elle permet de diminuer la mobilité des contaminants en limitant l'érosion et le lessivage du sol. Cette approche vise ainsi à limiter les risques de transfert de la pollution en dehors du sol contaminé et permet en même temps une meilleure intégration paysagère pour des sites présentant d'importants volumes polluants (Esteban, 2006).

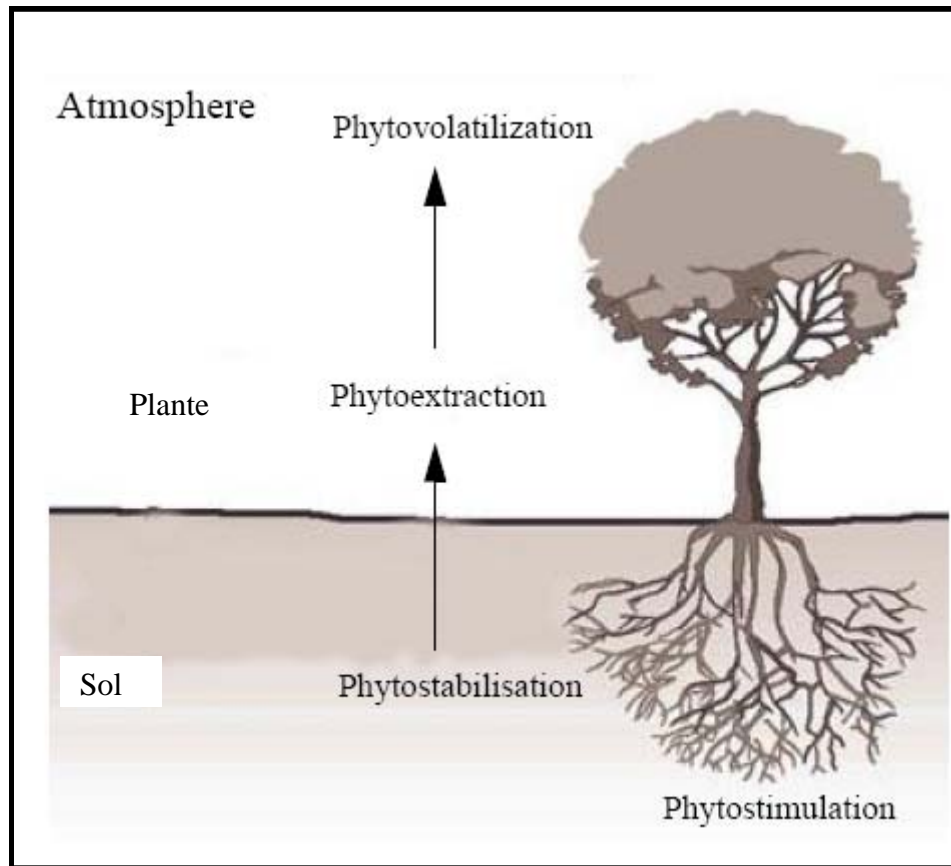


Figure 16 : Les mécanismes de la phytoremediation des métaux lourds (Gremion, 2003)

Le prélèvement des métaux diffère selon les plantes, cela dépend de la concentration externe du métal. Trois grandes stratégies existent :

Certaines plantes dites exclusives prélèvent très peu les métaux, même quand ils sont à des concentrations élevées dans le sol (Figure 17). Ces plantes possèdent des barrières empêchant le prélèvement, mais quand les concentrations en métaux sont trop élevées, ces barrières perdent de leur efficacité, probablement à cause de l'action toxique des métaux, et le prélèvement augmente alors massivement. Ces plantes sont sensibles sous l'effet de fortes concentrations de métaux.

D'autres, dites accumulatrices, prélèvent de fortes accumulations de métaux même à de très faibles concentrations de métaux dans le sol. Ces plantes présentent certains mécanismes de détoxification dans leurs tissus qui leur permettent d'accumuler. Toutefois, lorsque la concentration de métaux dans le sol augmente, ces plantes n'augmentent plus leur prélèvement, probablement à cause de compétitions entre ions métalliques pour les sites de prélèvement.

Les dernières, dites indicatrices, ont des concentrations de métaux dans leurs tissus qui reflètent la concentration du métal dans le sol et qui augmentent de façon linéaire avec elle. (Prasad and Hagemeyer, 1999)

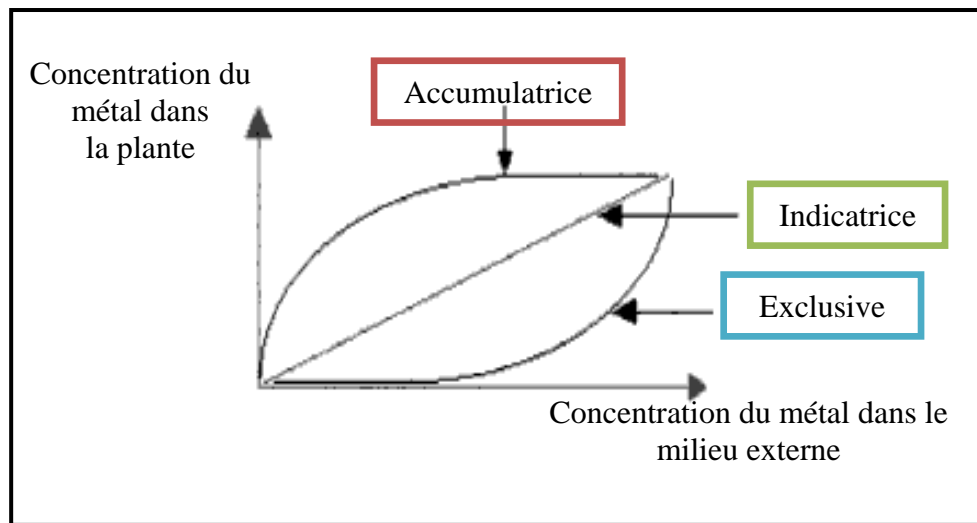


Figure 17 : Réponse des plantes à la présence des métaux dans le sol (Prasad and Hagemeyer, 1999)

*Matériels &
Méthodes*

3- Matériels & méthodes

3.1- Matériel végétal

Ce travail a été effectué sur des graines de petit pois déshydratées préalablement traitées avec un fongicide (Photos 1), *Pisum sativum* L., variété Merveille de Kelvedon, fournies par l'ITCMI. Les graines utilisées sont renouvelées chaque année.



Figure 18: Graines de *Pisum sativum* L. var Merveille de Kelvedon

Mise en culture

Les graines de petit pois sont désinfectées avec de l'eau de Javel pendant quelques minutes. Elles sont rincées et mises à imbiber dans de l'eau distillée pendant six heures. Les graines sont ensuite mises à germer dans des boîtes de pétri à raison de 25 graines par boîte. Dès que les radicules atteignent une longueur d'environ 2 cm, les plantules sont transférées dans des pots remplis de liquide nutritif de Knop [à raison de 20 plantules par pot], qui sont ensuite mis dans une chambre de culture avec une photopériode de 16/8, J/N et une thermopériode de 25°C le jour, 18°C la nuit.

3.2- Traitements

Le nitrate de plomb $Pb(NO_3)_2$ est un sel soluble dans l'eau. Il se présente sous forme de poudre blanche ; son poids moléculaire est de 331.2 g.

Pour la partie germination, les graines sont mises à imbiber dans différentes concentrations de nitrates de plomb (1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM et 50 mM) pendant six heures et arrosées avec les concentrations respectives de nitrates de plomb.

Pour la partie croissance, les plantules âgées de 4 jours sont stressées par différentes concentrations de plomb (500µM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM), puis arrosées régulièrement avec de l'eau distillée pendant 14 jours.

3.3- Méthodes utilisées

3.3.1- Etude de la faculté germinative

Les graines de petits pois sont mises à germer dans des boîtes de Petri recouvertes d'un papier absorbant après six heures d'imbibition dans les différentes concentrations de nitrates de plomb (1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM et 50mM). Les graines de petit pois stressées sont arrosées régulièrement avec différentes concentrations de nitrate

de plomb. La germination des graines est suivie pendant 7 jours. Pour chaque traitement, 50 graines ont été utilisées. Ainsi les pourcentages moyens ont été déterminés.

$$\text{Le pourcentage moyen de germination} = \frac{\sum \text{de graines germées} \times 100}{\text{Nombre de graines totales}}$$

L'expérience est répétée trois fois

3.3.2- Etude de la cinétique d'imbibition

50 graines sont imbibées dans différentes concentrations de nitrate de plomb (1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM et 50mM). Les graines sont pesées individuellement chaque heure pendant 72 heures. Le poids moyen de 50 graines, exprimé en mg, est déterminé pour chaque concentration de nitrate de plomb. L'expérience est répétée trois fois.

La quantité d'eau absorbée par les graines est obtenue selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'eau absorbée} = \frac{\text{PF} - \text{Po}}{\text{PF}} \times 100$$

Po : Poids initial des graines sèches

PF : Poids des graines à l'imbibition au temps t_n

3.3.3- Etude de l'activité α -amylase *in vivo*

L'activité alpha-amylasique est dosée selon la méthode de Shuster et Gifford, (1967). Le principe de cette méthode est basé sur la détermination de la quantité d'amidon trouvé dans le milieu réactionnel en tant que substrat non dégradé après une certaine période de réaction enzymatique.

1g de MVF est broyé à froid avec 10mL de tampon tris-citrate (pH= 5.6). La solution obtenue est centrifugée à 5000 tours/minute pendant 15 minutes. Le surnageant contenant l'extrait enzymatique est prêt à l'emploi.

A 1 mL d'une solution d'amidon à 1g.L^{-1} est ajoutée 1 mL d'extrait enzymatique.

Après 20 minutes d'incubation, 1 mL de réactif iodo-ioduré (la réaction enzymatique est arrêtée) et 4 mL d'eau distillée sont ajoutés.

Gamme étalon :

Des solutions de concentrations d'amidon croissantes à 0%, 0.01%, 0.02%,, 0.1% sont utilisées (Figure 19).

A 1mL de ces solutions sont ajoutés 1 mL du réactif iodo-ioduré et 5 mL d'eau distillée. La coloration se développe rapidement. La densité optique est lue à 620 nm.

La courbe étalon sert à déterminer la quantité d'amidon restée dans le milieu réactionnel.

L'activité alpha-amylasique est exprimée en mg d'amidon par minute par gramme de matière végétale fraîche.

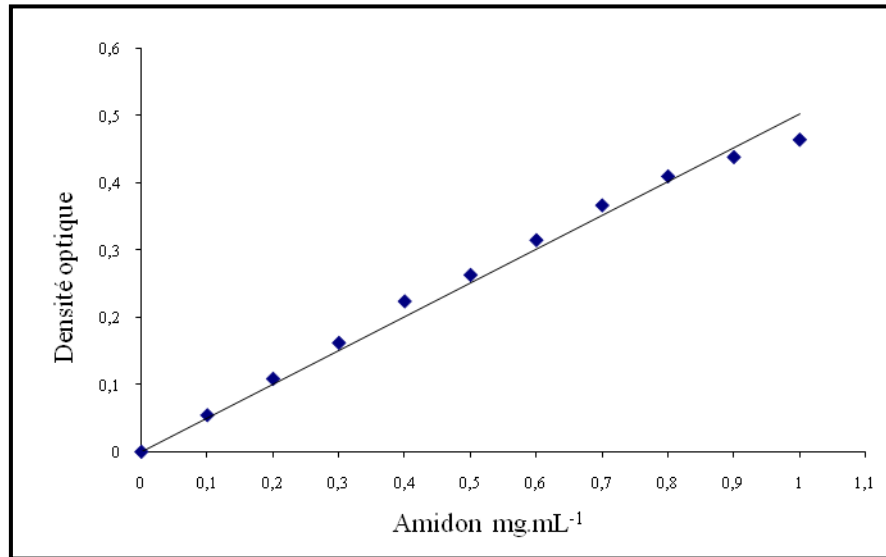


Figure 19: Courbe étalon de l'amidon (densité optique lue à $\lambda = 620$ nm)

Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de Bradford (1976). Cette méthode consiste à utiliser le bleu de Coomassie [G250] qui forme un complexe de coloration bleue avec les protéines. La coloration est proportionnelle à la quantité de protéines présentes. La coloration se développe rapidement et reste stable pendant une heure ; le maximum d'absorption du complexe protéine-bleu de Coomassie est à $\lambda = 595$ nm.

A 100 μ L d'extrait protéique sont ajoutés 3 mL de réactif de Biorad. L'ensemble est homogénéisé et laissé à incuber quelques minutes.

Gamme étalon :

Elle est réalisée à l'aide d'une solution de Bovine Sérum Albumine (BSA) à 1mg.mL⁻¹.

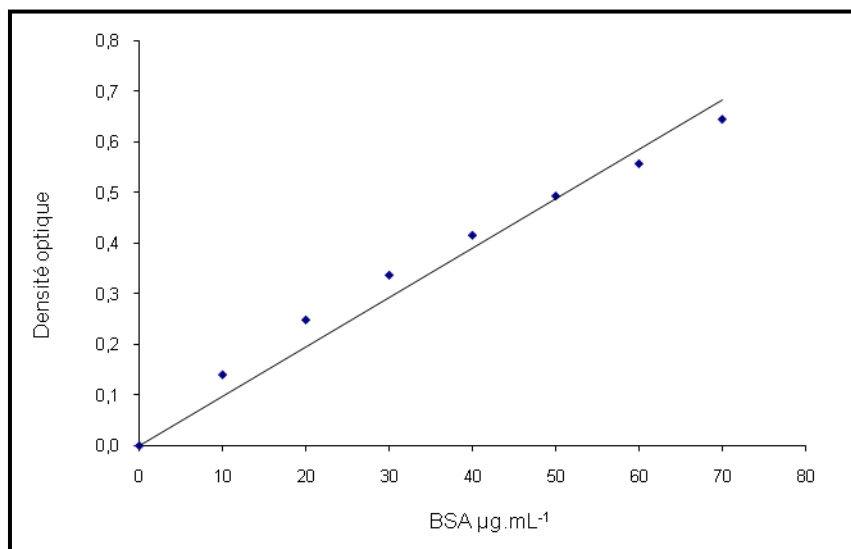


Figure 20: Courbe étalon des protéines (densité optique lue à $\lambda = 595$ nm).

Cette gamme étalon est faite avec des solutions de concentrations croissantes 0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Les quantités de protéines sont exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de MVF (Figure 20).

3.3.4- Statut hydrique des plantules

- Mesure de la teneur en eau (TRE)

La teneur relative en eau est mesurée selon la méthode de Clarke et Mc Caing (1982). La partie aérienne est pesée immédiatement. Le poids obtenu correspond au poids de la matière végétale fraîche (PF). Elle est ensuite placée pendant 24 heures dans des tubes à essai contenant de l'eau distillée puis pesée pour avoir le poids à la turgescence (PT). Pour la mesure du poids sec (PS), la partie aérienne est placée dans l'étuve à 60°C pendant 48 heures.

La teneur relative en eau de la partie aérienne est établie par Ladigues (1975), selon la formule :

$$\text{TRE} = \frac{\text{PF-PS} \times 100}{\text{PT-PS}}$$

La teneur relative en eau foliaire est la moyenne de 5 répétitions et est exprimée en pourcentage.

- Mesure du poids frais et du poids sec

La partie aérienne et partie racinaire sont pesées immédiatement. Le poids obtenu correspond au poids de la matière végétale fraîche (PF). Pour la mesure du poids sec, les différentes parties sont placées dans l'étuve à 60°C pendant 48 heures.

3.3.5- Extraction et dosage des pigments foliaires

0.1 g de feuilles sont broyées à sec puis dans 10 mL d'acétone à 80% à froid. Le broyat est centrifugé à 3000 trs.min^{-1} pendant 10 min ; le surnageant qui contient les pigments est récupéré. L'absorbance est lue aux longueurs d'ondes suivantes après étalonnage du spectrophotomètre grâce à un blanc préparé à partir de 10 mL d'acétone à 80%.

$\lambda_a = 647 \text{ nm}$ et $\lambda_b = 663 \text{ nm}$ pour les chlorophylles a et b.

$\lambda_c = 470 \text{ nm}$ pour les caroténoïdes.

Les teneurs en chlorophylles et en caroténoïdes sont déterminées selon les équations de Lichtenthaler [1987].

$$\text{Chlorophylle (a)} = 12.25 \text{ DO}_{663} - 2.79 \text{ DO}_{647} = \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$\text{Chlorophylle (b)} = 12.50 \text{ DO}_{647} - 5.10 \text{ DO}_{663} = \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$\text{Chlorophylle (a+b)} = 7.15 \text{ DO}_{663} - 5.10 \text{ DO}_{647} = \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$\text{Caroténoïdes totaux} = \frac{1000 \text{ DO}_{470} - 1.82 C_a - 85.02 C_b}{189} = \mu\text{g.mL}^{-1}$$

Les teneurs en pigments foliaires sont exprimées en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de MVF (Pour chaque point quatre extractions ont été réalisées sur quatre individus différents).

3.3.6- Extraction et dosage de la proline :

La proline est dosée selon la méthode adaptée par Troll et Lindsley (1955), simplifiée par Bates *et al.*, 1973.

La proline réagit avec la ninhydrine en milieu acide et à chaud en donnant un composé de couleur rouge orangé, soluble dans des solvants organiques (toluène, benzène). Le réactif est préparé à partir de : 1.25 g de ninhydrine, 30 mL d'acide acétique glacial, 7.5 mL d'acide orthophosphorique et 12.5 mL d'eau distillée.

50 mg de matière végétale sèche sont broyées à sec avec une tige en verre dans un tube à essai, puis dans 6 mL de méthanol.

Après agitation du mélange au vortex, l'ensemble est placé au bain marie à 60°C pendant 45mn. Pour éviter toute évaporation, les tubes contenant l'extrait sont fermés hermétiquement.

A 0.5 mL d'extrait (surnageant), sont rajoutés 1 mL d'acide acétique glacial et 1 mL de réactif. Après agitation du mélange au vortex, l'échantillon est porté pendant 15 minutes au bain marie à 100°C . Une coloration rose apparaît. Après refroidissement des tubes, 5 mL de toluène sont rajoutés ainsi qu'une pincée de NaSO_4 pour éliminer l'eau résiduelle. Le mélange est agité au vortex. Les tubes sont fermés hermétiquement.

Après 24 heures de décantation, deux phases apparaissent ; la phase supérieure (toluène) renferme la proline.

La teneur en proline est déterminée par spectrophotométrie, la densité optique est mesurée à $\lambda = 515 \text{ nm}$.

La courbe étalon est réalisée à partir de solutions de concentrations croissantes en proline préparées à partir d'une solution mère à 1mM (Figure 21).

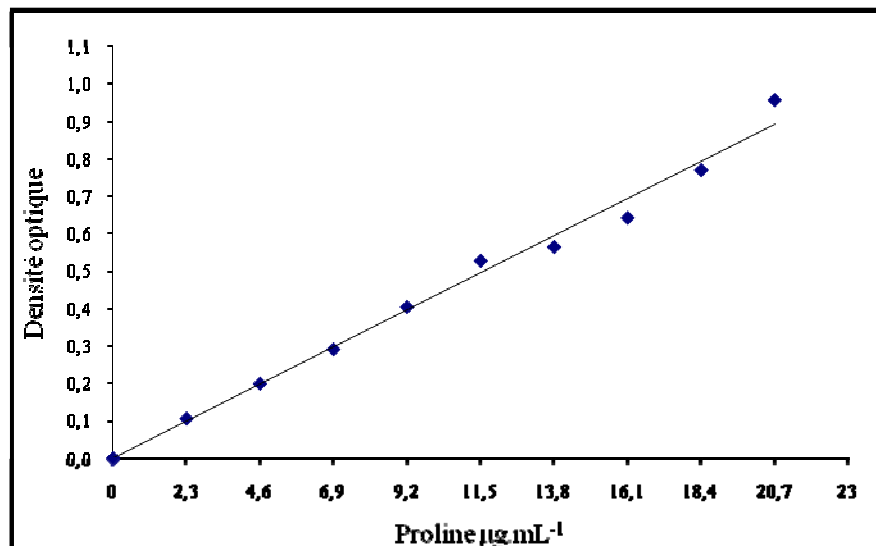


Figure 21: Courbe étalon de la proline (densité optique lue à $\lambda = 515\text{nm}$).

La quantité de proline moyenne de trois répétitions est exprimée en $\mu\text{g mg}^{-1}$ de matière végétale sèche.

3.3.7- Extraction et dosage du plomb

Le dosage du plomb dans la plante se fait par spectrophotométrie d'absorption atomique à flamme (Figure 22). Ce dosage est fondé sur la capacité que possèdent les atomes neutres d'un élément d'absorber les radiations qu'ils sont capables d'émettre.

Cette méthode permet de détecter des métaux à des teneurs faibles de l'ordre du ppm ou mg.L^{-1} . Ses principaux avantages sont sa spécificité, sa sélectivité ainsi que sa simplicité d'utilisation qui convient surtout pour des analyses de série.



Figure 22: Spectromètre d'absorption atomique à flamme type SOLAAR

- **Préparation de l'échantillon**

Un gramme d'échantillon préalablement séché à l'étuve pendant 48 heures, est déposé dans un creuset en porcelaine puis placé dans un four à moufle à 450°C pendant cinq heures. 5 mL d'HCl à 20% sont ajoutés aux cendres après leur refroidissement dans un dessiccateur ; la solution est ensuite chauffée jusqu'à ébullition sur une plaque chauffante, puis filtrée et récupérée dans une fiole jaugée de 50 mL. Le tout est complété jusqu'au trait de jauge avec de l'eau bidistillée.

- **Dosage proprement dit**

La solution contenant l'élément à doser à l'état brut est pulvérisée dans une flamme ou dans un four en graphite où elle est transformée en vapeurs atomiques. On envoie sur ces vapeurs une radiation caractéristique des atomes à doser (longueur d'onde de la raie de résonance le plus souvent) qui est produite par la source qui est généralement une lampe à

cathode creuse contenant l'élément à doser. La radiation est absorbée par les atomes non excités sur le trajet de la lumière (Figure 23 et 24).

Cette radiation émet une série de raies très fines dont la longueur d'onde est caractéristique de l'élément chimique, celles-ci ne sont en général absorbées que par un atome du même élément.

La vapeur atomique produite par la flamme absorbe une partie du flux énergétique généré par les radiations. Cette fraction d'énergie absorbée est proportionnelle à l'abondance de l'élément à doser selon la loi de Beer-Lambert.

$$A = \log I_0 / I = \xi \cdot c \cdot L$$

A : Abondance

I₀ : Intensité du flux émergent

ξ : Coefficient d'extinction spécifique ou molaire

c : Concentration des atomes dans la flamme à l'état fondamentale

L : Longueur du chemin parcouru par les radiations (entre la lampe et la flamme ou la vapeur atomique).

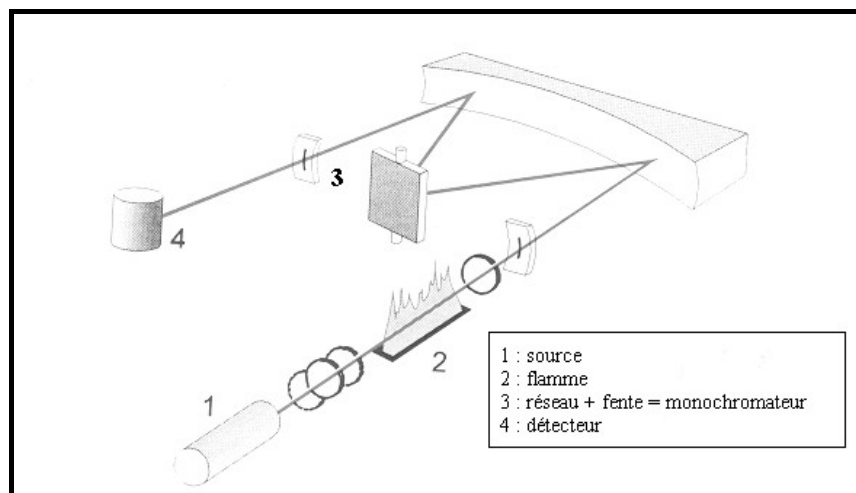


Figure 23: Principe de fonctionnement du spectromètre d'absorption atomique à flamme

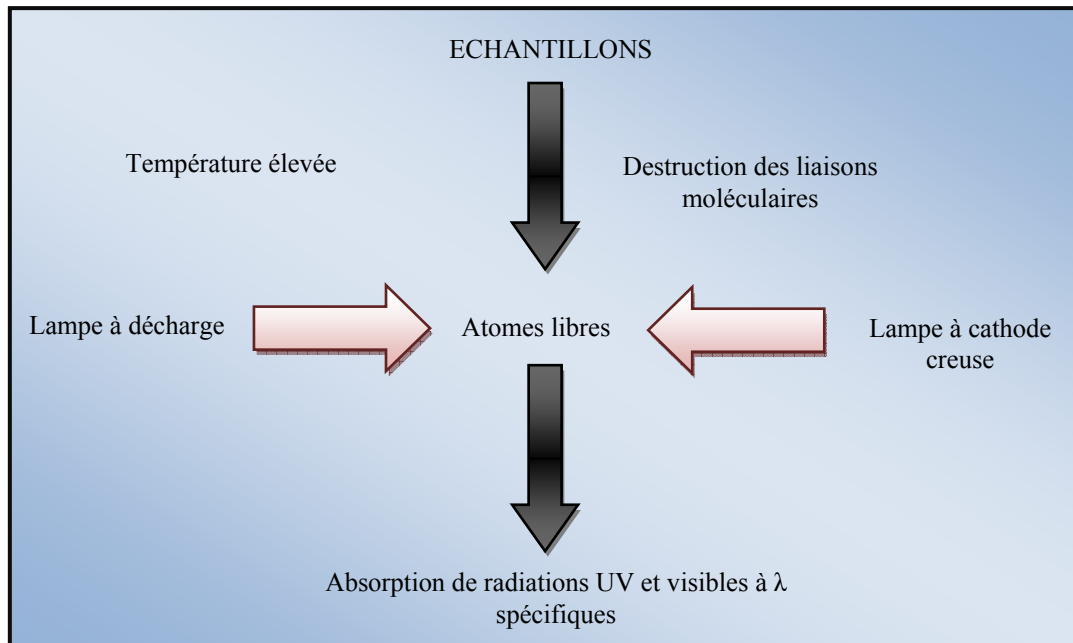


Figure 24: Principe de la spectrométrie d'absorption atomique

3.3.8- Méthode d'analyse statistique

Les différences entre les moyennes ont été déterminées sur chaque lot de résultats, grâce à l'analyse de la variance (comparaison de plusieurs moyennes) ; elle peut être simple ou multiple selon le nombre de facteur à tester.

L'analyse de la variance simple (ANOVA = Analysis of Variance) s'intéresse à l'effet d'un traitement sur une seule variable ou facteur.

Tous les tests sont calculés à partir de l'application STATISTICA 5.1 pour Windows.

*Résultats et
discussions*

4- Résultats & discussions

4.1- Effets du nitrate de plomb sur la germination

4.1.1- Faculté germinative

La figure 25 représente l'évolution du pourcentage moyen de germination des graines de *Pisum sativum* L. soumises à différentes concentrations (1mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM et 50mM) de nitrate de plomb.

La germination des graines témoins de *Pisum sativum* L., commence après un temps de latence d'environ 12 heures. Le pourcentage de germination augmente rapidement, il atteint un maximum de $92,00 \pm 0,81\%$ après 2 jours, puis il se stabilise. La germination des graines de *Pisum sativum* L. soumises à un stress faible (1mM, 5mM) est sensiblement identique au témoin soit, respectivement de $96,00 \pm 2,70\%$ et $94,00 \pm 1,41\%$.

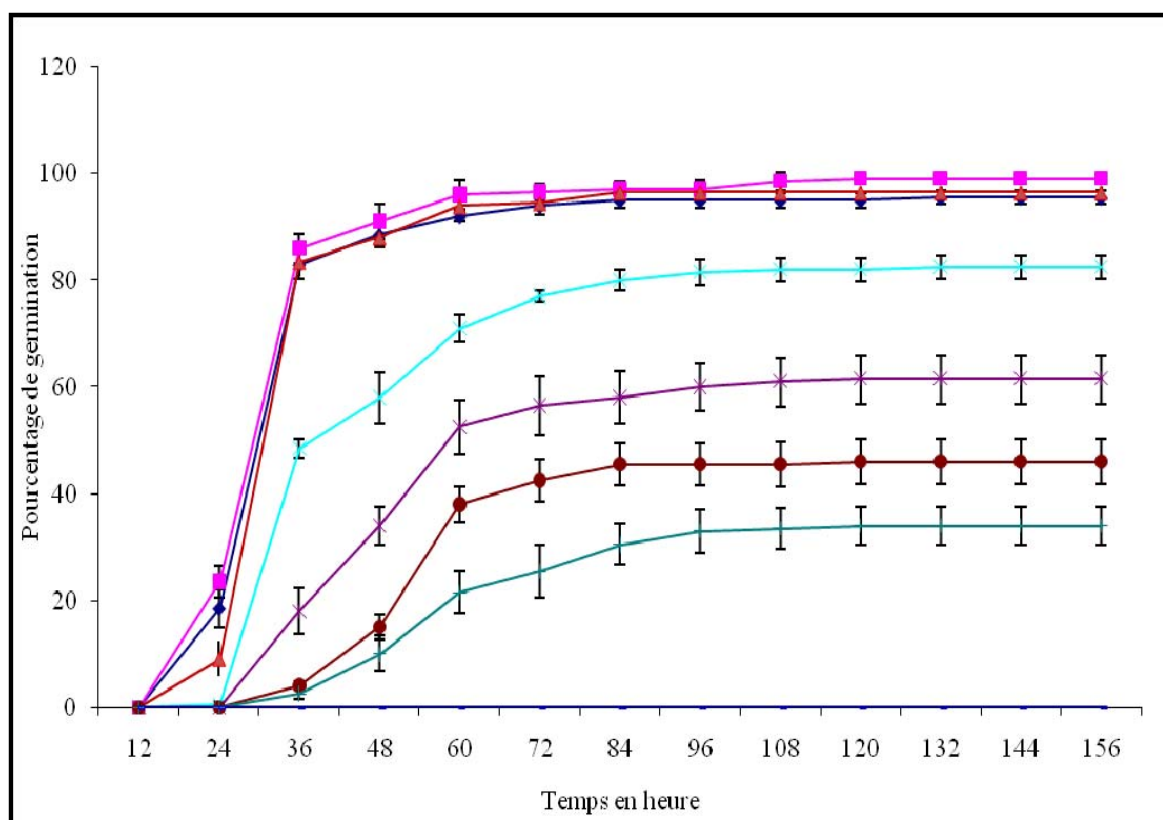


Figure 25: Evolution du pourcentage moyen de germination des graines de *Pisum sativum* L. soumises à un stress par le nitrate de plomb en fonction du temps.

[Témoin (◆), 1 mM (■), 5 mM (▲), 10 mM (×), 15 mM (+), 20 mM (●), 25 mM (⊕), 50 mM (−)]

Le taux de germination des graines soumises à un stress modéré (10mM, 15mM, 20mM, 25mM) atteint un maximum qui est respectivement de 81,50± 2,36%, 60,00± 4,50%, 45,50± 4,03%, 33,00 ± 4,04%, après 4 jours de germination, puis il se stabilise. Les graines de petit pois traitées germent après un temps de latence de 24 heures. (Figure 25)

La germination des graines ayant subi un stress sévère (50mM de nitrate de plomb), est complètement inhibée.

4.1.2- Vitesse de germination

La vitesse de germination est calculée selon la formule suivante :

$$\text{Vitesse de germination} = \frac{\sum \text{graines germées cumulée}}{\sum (\text{graines germées} \times J_i)}$$

J_i : Nombre de jours

La vitesse de germination des graines témoins de *Pisum sativum* L. est de 23,46 graines par jour (Figure 26). Elle diminue graduellement avec l'augmentation de la concentration de nitrate de plomb. En effet, la vitesse de germination diminue légèrement pour atteindre 20,84 graines par jour pour la concentration 25mM. La vitesse de germination des graines soumises à une concentration en nitrate de plomb de 50 mM est nulle.

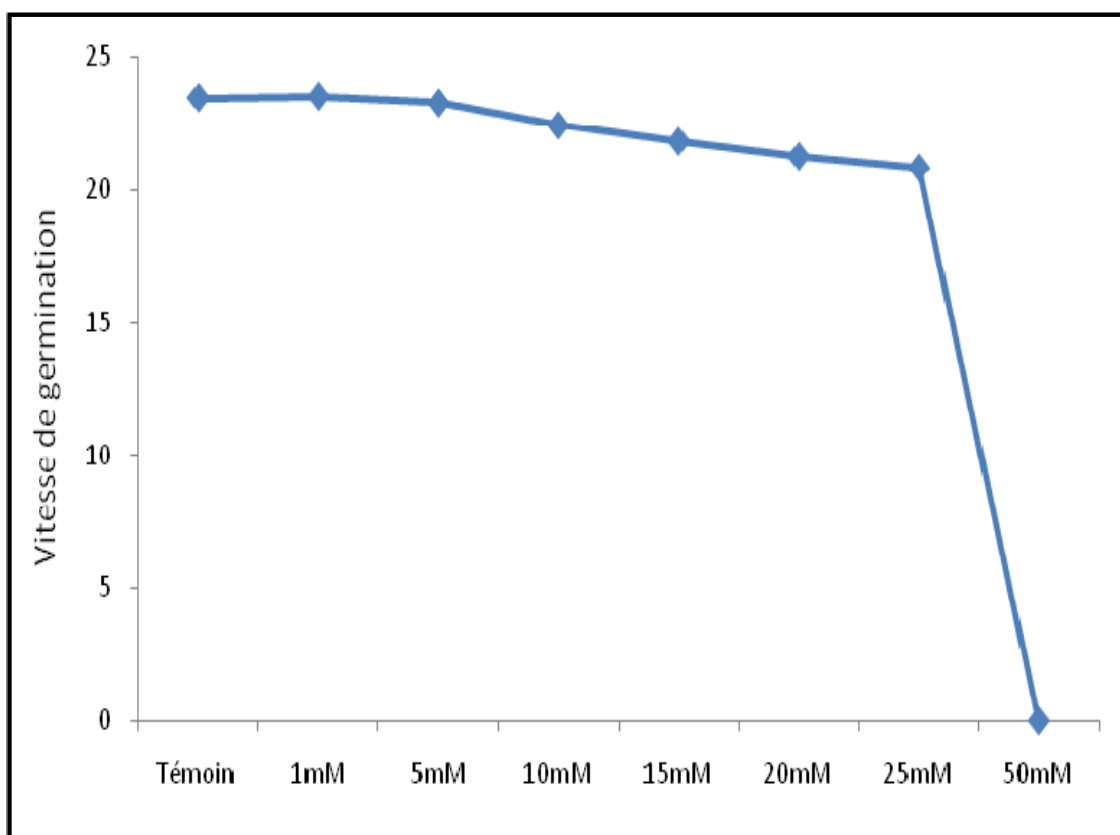


Figure 26: Evolution de la vitesse de germination des graines de *Pisum sativum* L. soumises à différentes concentrations de nitrate de plomb.

4.1.3- Cinétique d'absorption

Les courbes montrant l'évolution du pourcentage d'eau absorbée pendant l'imbibition par les graines de *Pisum sativum* L. témoins et stressées ont la même allure et présentent deux phases distinctes : Une première phase où l'absorption d'eau par les graines est rapide et dure 10 heures pour chaque traitement (Figure 27).

Pendant la deuxième phase, un ralentissement de l'absorption d'eau par les graines est constaté.

Pour chaque traitement (Témoins et Stressées), les maxima d'absorption d'eau sont atteints après 44 heures de traitement. Le pourcentage maximum d'eau absorbée par les graines de *Pisum sativum* L. imbibées dans de l'eau distillée est de 64,23%. Une diminution des pourcentages maximum d'eau absorbée par les graines imbibées dans les différentes concentrations de nitrates de plomb est constatée. En effet, les maxima obtenus sont respectivement de 63,86%, 61,27%, 61,34%, 60,98%, 60,44%, 59,78%, 59,12% pour les concentrations de 1mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM, 25mM et 50mM.

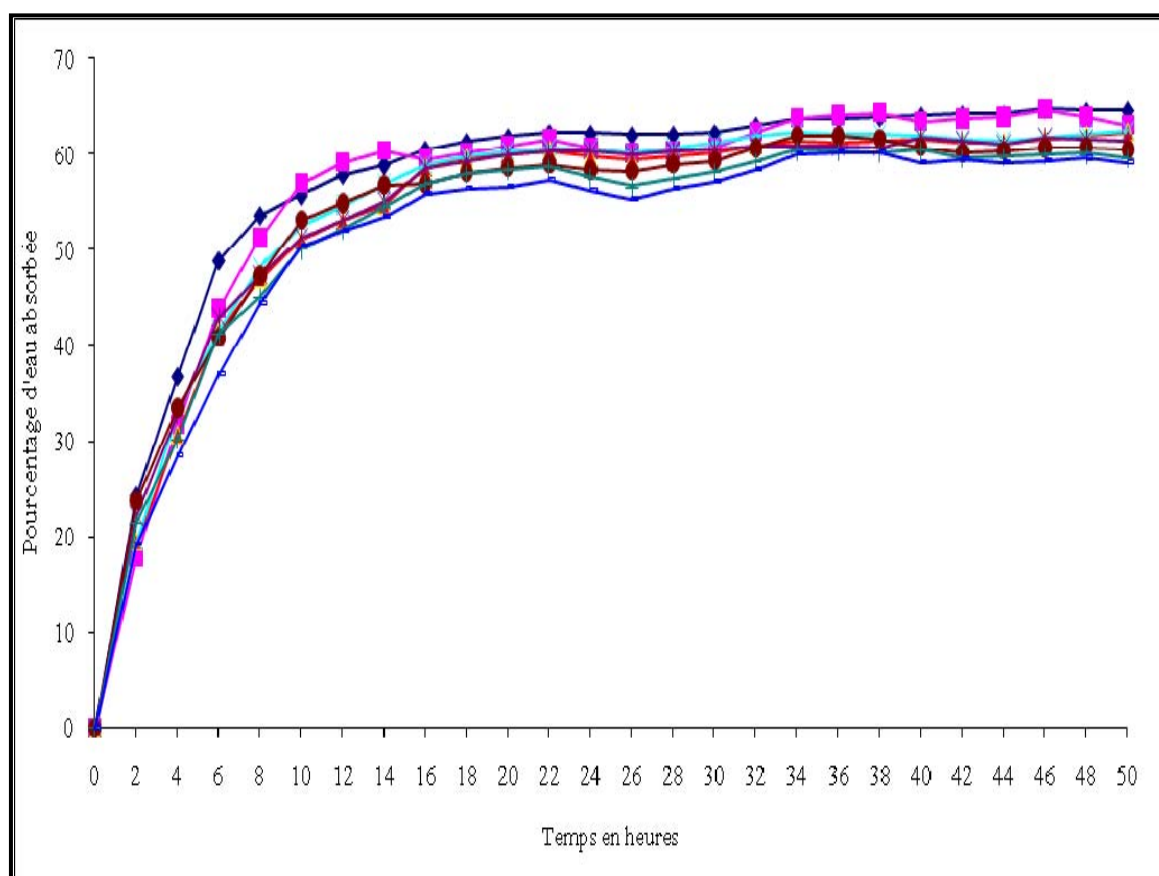


Figure 27 : Evolution du pourcentage d'eau moyen absorbée par les graines de *Pisum sativum* L. en présence des différentes concentrations de nitrate de plomb (chaque point représente la moyenne de 50 graines) [Témoin (◆), 1 mM (■), 5 mM (▲), 10 mM (×), 15 mM (⊕), 20 mM (●), 25 mM (⊕), 50 mM (−)]

Au delà de 44 heures d'imbibition, une stabilité des maxima d'eau absorbée par les graines témoins et les graines soumises à un stress métallique à été enregistrée.

4.1.4- Teneur en plomb

On observe une corrélation positive entre la teneur en plomb des graines et les différentes concentrations de nitrates de plomb étudiées (Figure 28). En effet, les graines de *Pisum sativum* L. traitées avec 1mM, 5mM accumulent des teneurs qui sont respectivement de $8,00 \pm 2,94 \mu\text{M}$; $24,00 \pm 2,28 \mu\text{M}$; ces teneurs ne diffèrent pas de manière significative comparativement aux témoins. Cette quantité est multipliée par deux pour les concentrations 10mM, 15mM, 20mM et 25mM ; elles sont respectivement de $44,00 \pm 5,00 \mu\text{M}$, $76,00 \pm 9,12 \mu\text{M}$, $84,00 \pm 17,81 \mu\text{M}$ et $87,00 \pm 7,73 \mu\text{M}$.

L'augmentation de la teneur en plomb dans les graines est significative ($p < 0.01$) par rapport au témoin à partir d'une concentration de 10mM de nitrate de plomb.

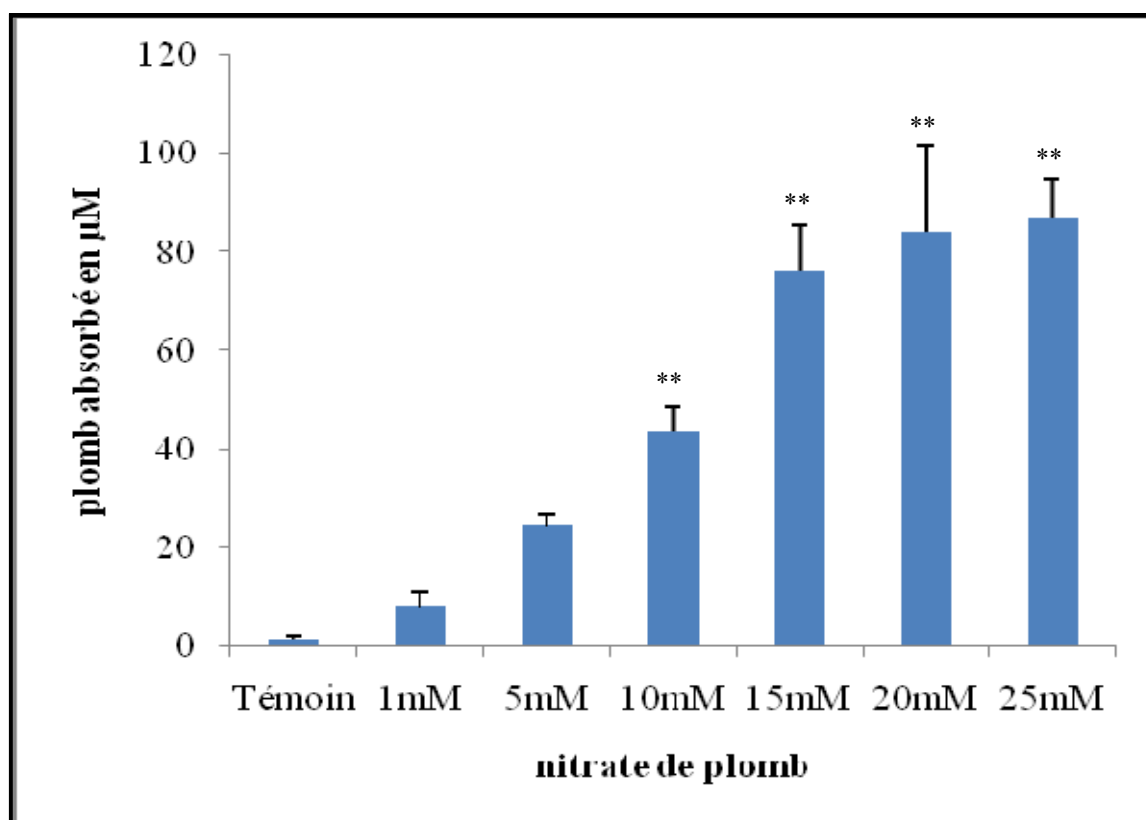


Figure 28: Evolution de la teneur en plomb (μM) au niveau des graines germées de *Pisum sativum* L. en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.

(chaque valeur est la moyenne de 3 répétitions, ** $P < 0.01$ représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités)

4.1.5- Activité alpha-amylasique *in vivo*

L'activité de l' α -amylase des graines témoins de *Pisum sativum* L. est de $6,60 \times 10^{-4} \pm 0,03$ mg d'amidon dégradée/ μ g de protéines/minute d'incubation. Chez les graines traitées avec 5mM de nitrate de plomb, l'activité est similaire à celle des graines témoin, elle est de $6,00 \times 10^{-4} \pm 1,00$ mg d'amidon dégradée/ μ g de protéines/minute d'incubation. Cette activité diminue progressivement et de manière significative en fonction des différentes concentrations de nitrates de plomb appliquées (Figure 29); ainsi pour les concentrations de nitrates de plomb modérées 10mM et 15mM, l'activité amylasique est respectivement de $4,70 \times 10^{-4} \pm 0,02$ mg d'amidon dégradée/ μ g de protéines/minute d'incubation et $4,20 \times 10^{-4} \pm 0,04$ mg d'amidon dégradée/ μ g de protéines/minute d'incubation. L'application de concentrations plus fortes de nitrate de plomb, 20mM et 25mM, diminue l'activité amylasique comparativement aux témoins, elle est respectivement de $2,40 \times 10^{-4} \pm 0,05$ mg d'amidon dégradée/ μ g de protéines/minute d'incubation et $2,30 \times 10^{-4} \pm 0,25$ mg d'amidon dégradée/ μ g de protéines/minute d'incubation.

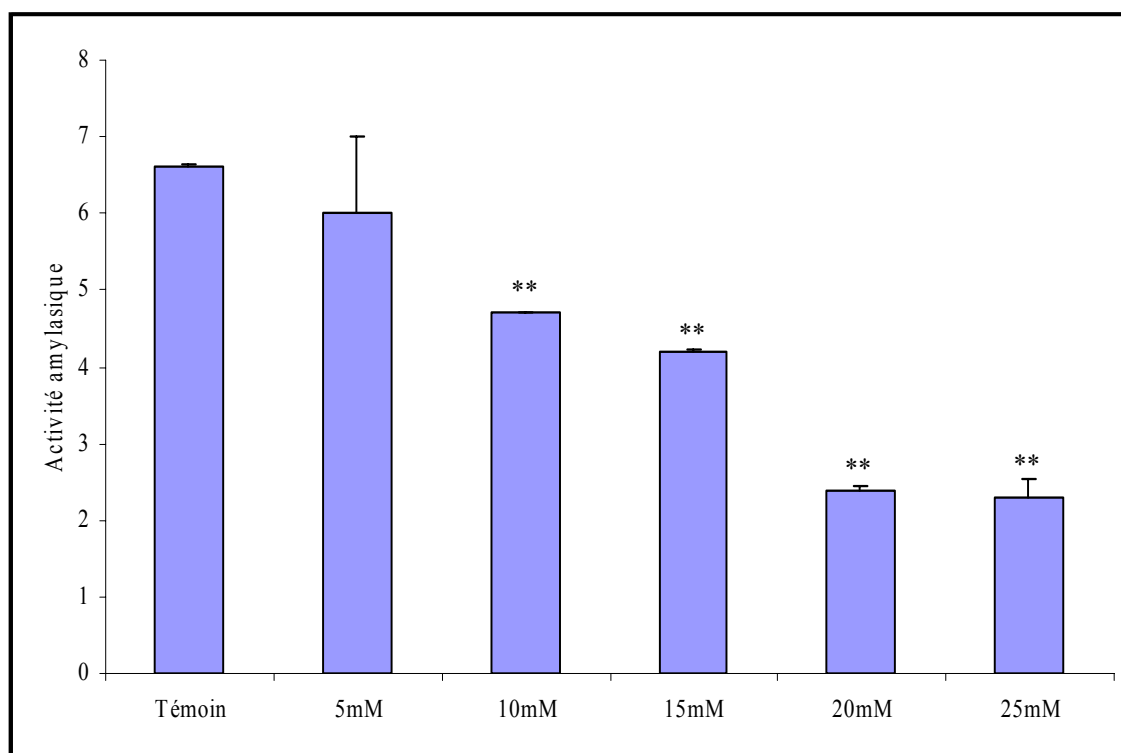


Figure 29 : Evolution de l'activité amylasique des graines de *Pisum sativum* L. soumises à un stress par le nitrate de plomb (mg.10⁻⁴ d'amidon dégradé par μ g de protéines par minutes d'incubation). (chaque valeur est la moyenne de 3 répétitions, **P< 0.01 représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités)

4.1.6- Discussion

De nombreuses contraintes environnementales, salinité, stresshydrique, humidité, températures inadéquates et métaux lourds, peuvent compromettre l'aptitude des graines à

germer. L'impact de ces stress sur la germination dépend du métal et de sa concentration, de la durée d'exposition des graines et de l'espèce végétale.

Le pourcentage de germination des graines témoins et celles traitées avec 1mM de nitrate de plomb est sensiblement identique. Un léger retard à la germination des graines traitées avec 5mM de nitrate de plomb est observé après 24 heures de germination. Les graines témoins ainsi que celles traitées avec 1mM et 5mM de nitrate de plomb présentent un pourcentage de germination qui évolue de la même manière et atteignent le maximum de germination après 72 heures.

La vitesse de germination des graines n'est pas affectée par le nitrate de plomb.

La quantité de plomb absorbée par les graines traitées avec 1mM et 5mM de nitrate de plomb ne varie pas de manière significative comparativement aux graines témoins.

La germination des graines est en relation directe avec les enzymes hydrolytiques qui permettent l'assimilation des nutriments. L'activité amylasique est l'enzyme clé de la germination, elle dégrade l'amidon (Hopkins et Edvard, 2006). Il nous a semblé intéressant d'étudier son comportement vis-à-vis du nitrate de plomb. La germination des graines de petit pois n'est nullement affectée par les faibles concentrations de nitrate de plomb ajoutées. Aucune répercussion physiologique sur l'activité amylasique n'est observée chez les germinations traitées, cela est dû à la faible teneur de plomb absorbée par les graines. Cette teneur de plomb ne diffère pas de manière significative comparativement à celle des germinations témoins.

A des concentrations modérées de nitrate de plomb 10mM, 15mM, 20mM et 25mM, nous constatons un ralentissement et une diminution de la germination qui est fonction de la concentration externe en plomb. Sous l'effet d'une concentration de 10mM de nitrate de plomb, on observe 81% de germination alors que sous l'effet d'une concentration de 25mM de nitrate de plomb, le pourcentage de germination n'est que de 33%.

En calculant la vitesse de germination, on observe une diminution progressive de celle-ci en fonction de l'augmentation de la concentration de nitrate de plomb.

Sous l'effet des concentrations modérées de nitrate de plomb, le pourcentage d'eau absorbée par les graines du petit pois n'est pas affecté. De ce fait, l'inhibition de la germination n'est pas liée à une limitation en eau au cours de l'imbibition.

On note cependant, une augmentation du taux de plomb dans les graines de petit pois. Cette augmentation est significative comparativement aux graines témoins. La présence de plomb aux niveaux des graines provoque une diminution significative de l'activité amylasique chez les graines traitées avec 15mM, 20mM et 25mM de nitrate de plomb est observée. Cette diminution est d'autant plus grande que les concentrations en nitrate de plomb internes augmentent. L'activité amylasique diminue jusqu'à 65% chez les graines traitées avec une concentration de 25mM de nitrate de plomb. Le plomb ne cause pas de déficit hydrique mais induit un stress ionique qui affecte l'activité de l'alpha amylase et par conséquent la germination.

A une forte concentration de nitrate de plomb (50mM), la germination est complètement inhibée. Aucune variation de la teneur en eau absorbée par les graines n'est observée chez ces graines.

On note une saturation du taux de plomb absorbé au niveau des graines traitées avec les fortes concentrations de nitrate de plomb.

Le nitrate de plomb a un effet inhibiteur sur la germination des graines de petit pois. L'inhibition de la germination des graines sous l'effet des métaux lourds a été déjà observée par de nombreux auteurs (Iqbal et al., 1991 ; Shankat et al., 1999 ; Mihoub et al., 2004).

La vulnérabilité de la germination est associée aux niveaux d'accumulation réels des polluants qui interfèrent avec les voies métaboliques dans les tissus de la graine (Mihoub et al., 2004). L'évolution des teneurs en plomb des graines en fonction des différentes concentrations de plomb montre que les charges endogènes en plomb augmentent graduellement de manière significative et se stabilisent pour les concentrations 15mM, 20mM et 25mM de nitrate de plomb. Ceci peut expliquer la diminution du pouvoir germinatif. Des résultats similaires ont été mis en évidence chez le petit pois sous l'effet du cuivre et du cadmium (Mihoub et al., 2004). Au-delà d'une concentration interne de plomb de 87 μ M, la germination des graines est inhibée.

D'après nos résultats, l'inhibition de la germination des graines n'est pas due à une limitation en eau, elle serait due à un stress ionique causé par les ions de plomb accumulés aux niveaux des graines traitées et qui induit par la suite une inhibition de l'activité de l'alpha amylase. Les résultats d'autres travaux ont montré aussi une inhibition des activités hydrolytiques au cours de la germination des graines exposées aux métaux lourds (Chugh et al., 1999 ; Bansal et al., 2001). L'inhibition de la germination des graines de petit pois par les métaux lourds serait due aussi à un désordre nutritionnel consécutif à une défaillance dans le processus de mobilisation des réserves à partir des cotylédons (Mihoub et al., 2004).

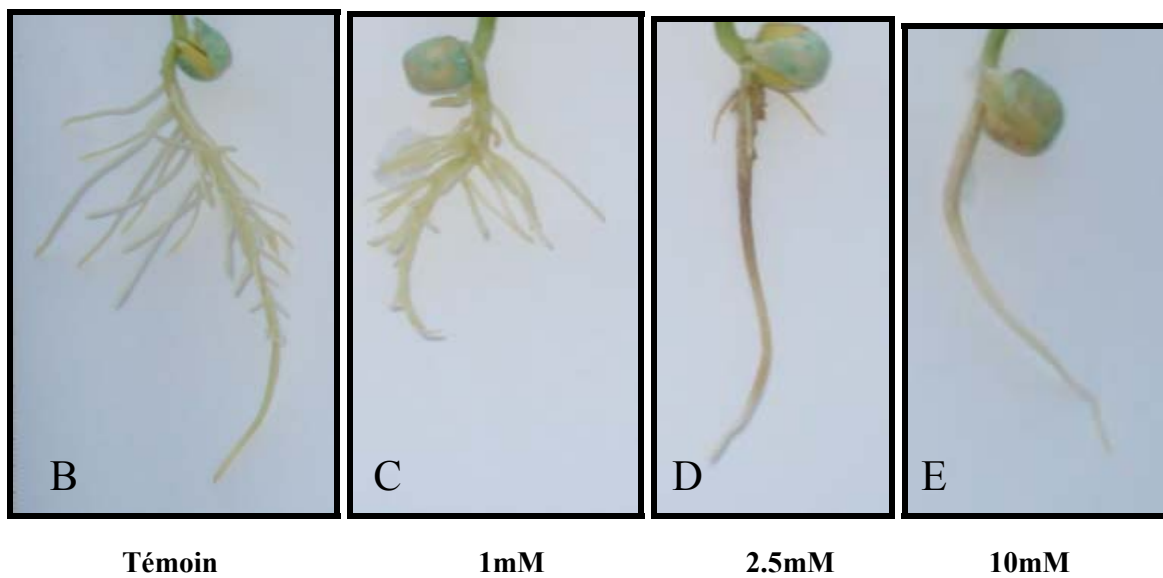


Figure 30 : Effets des différentes concentrations de nitrate de plomb sur la morphologie de plantules de *Pisum sativum* L. stade 7 jours.

4.2- Effets du nitrate de plomb sur la croissance :

Les plantules ayant une racine principale d'environ 2cm de longueur sont mises à croître pendant 4 jours dans un milieu nutritif avant l'application de différentes concentrations de nitrate de plomb.

4.2.1- Effets du nitrate de plomb sur la morphologie des plantes

Au 7^{ème} jour d'application du stress, les plantules témoins présentent un port bien développé. La longueur de la partie aérienne est d'environ 8,5cm. La tige supporte 3 feuilles trifoliées de couleur verte (Figure 30). Le système racinaire présente une longueur d'environ 7,5cm et de nombreuses racines secondaires (Figure 30B).

Les plantules traitées avec une concentration de 500µM de nitrate de plomb ne présentent pas de différences notables par rapport aux plantules témoins (Figure 30A).

A une concentration de 1mM de nitrate de plomb, une légère diminution de l'élongation du système racinaire est noté, la partie aérienne n'est pas affectée (Figure 30C).

Sous l'effet de 2,5mM de nitrate de plomb, les plantules stressées présentent un port moins développé que celui des plantules témoins. La partie aérienne présente 2 feuilles trifoliées de petite taille. La partie racinaire présente une racine principale nécrosée avec apparition de 2 à 3 racines secondaires courtes à sa base (Figure 30D). On note aussi à la base de la racine principale une déchirure au point d'apparition des quelques racines secondaires.

Les plantules stressées avec des fortes concentrations de nitrate de plomb de 5mM, 10mM et 15mM (Figure 30A) présentent un ralentissement dans leur croissance, marqué par une réduction de la taille des tiges et des racines. La partie aérienne est de taille réduite environ 4 et 3 cm respectivement et des feuilles embryonnaires écailleuses de couleur verte et légèrement déséchées. La racine principale est de couleur blanchâtre et ne présente pas de racines secondaires ; l'élongation des racines est complètement inhibée par le nitrate de plomb (Figure 30E).

Au 14^{ème} jours d'application du stress, les plantules témoins (Figure 31A1) sont vigoureuses et présentent 4 feuilles trifoliées de grande taille et de couleur verte (Figure 31). La partie aérienne a une longueur d'environ 10cm et la partie racinaire d'environ 9cm avec plusieurs racines secondaires à la base.

Comparées aux plantules témoins, les plantules traitées avec 500µM de nitrate de plomb ne présentent pas de différences morphologiques notables. On note l'apparition de petites racines secondaires dans la partie inférieure de la racine principale (Figure 31A1).

A une concentration de 1mM de nitrate de plomb, la racine principale présente une taille d'environ 3cm avec plusieurs racines secondaires bien développées. La partie aérienne n'est pas affectée par le stress, elle présente des feuilles trifoliées de grande taille et de couleur verte (Figure 31C1).

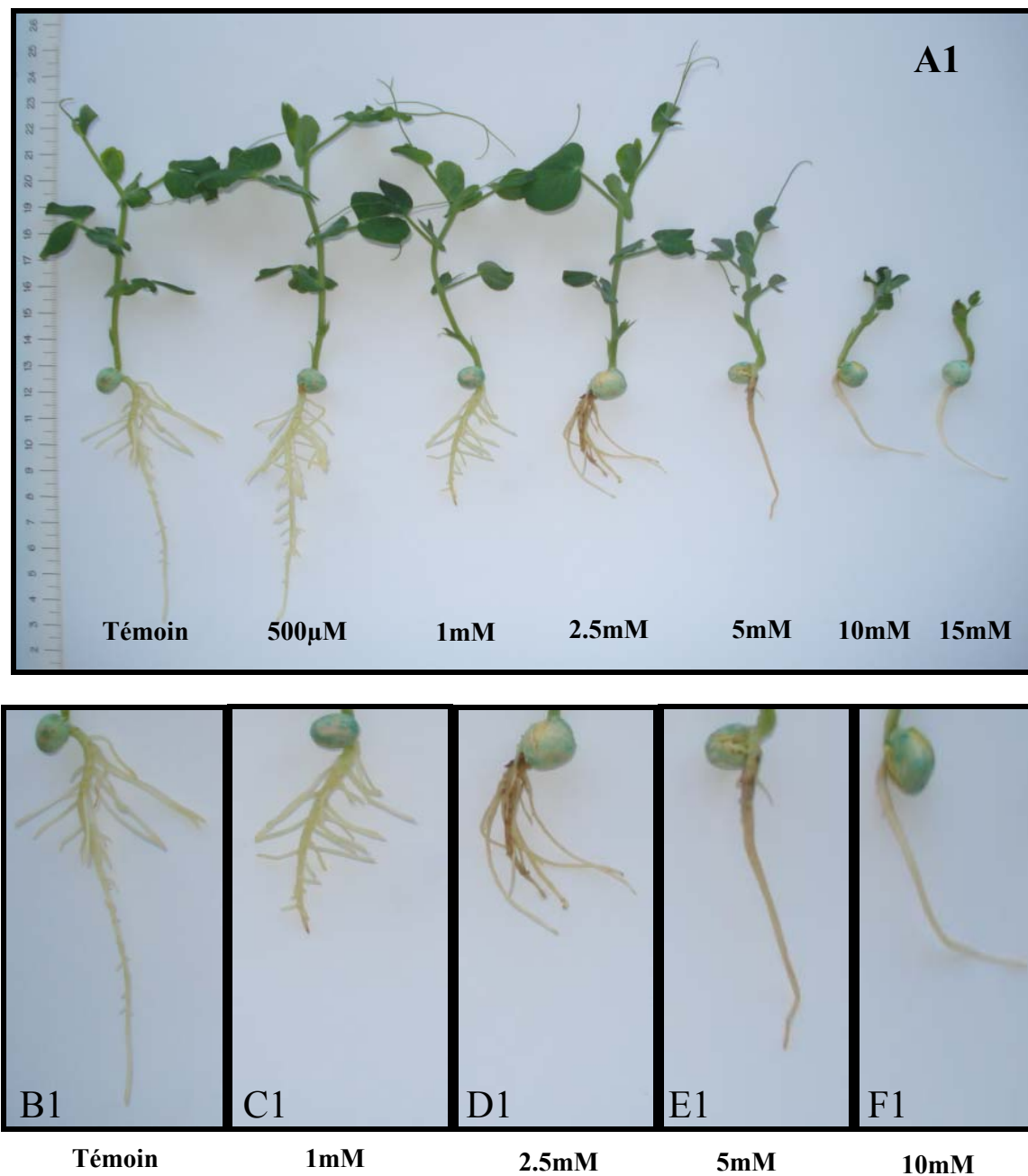


Figure 31 : Effets des différentes concentrations de nitrates de plomb sur la morphologie de plantules de *Pisum sativum* L. stade 14 jours

La partie aérienne des plantules traitées avec les faibles concentrations de nitrate de plomb présente une ramification abondante.

Les plantules traitées avec 2,5mM de nitrate de plomb présente une partie aérienne qui est sensiblement la même que celle des plantules témoins; le système racinaire semble être très affecté par le stress. En effet, l'élongation de la racine principale est stoppée et nécrosée et nous notons l'apparition de racines secondaires à sa base dont la longueur est presque égale à celle de la racine principale environ 2cm (Figure 31D1).

A une concentration de 5mM de nitrate de plomb, la croissance de la partie aérienne est visiblement atténuée puisqu'on observe une réduction du nombre de feuilles. La tige ne porte que 3 feuilles trifoliées avec un limbe réduit. L'élongation de la racine principale est inhibée, on note l'apparition d'une racine secondaire à la base de la racine principale (Figure 31E1).

A de fortes concentrations de nitrate de plomb, 10mM et 15mM, les plantules traitées présentent des feuilles écailleuses et une partie aérienne d'environ 2cm. Les feuilles sont complètement déséchées. La partie racinaire est caractérisée par l'apparition d'une couleur blanchâtre et l'absence de racines secondaires (Figure 31F1).

4.2.2- Effets du nitrate de plomb sur la croissance

- **Poids frais**

Au 7^{ème} jour d'application du stress, le poids frais de la partie aérienne et de la partie racinaire des plantules de petits pois traitées avec 500µM et 1mM de nitrate de plomb ne varie pas comparativement à celui des plantules témoins. Par contre, une diminution significative au seuil de 1% est observée chez les plantules stressées avec les plus fortes concentrations 2.5mM, 5mM, 10mM et 15mM de nitrate de plomb. (Figure 32A).

Au 14^{ème} jour d'application du stress, le poids frais de la partie aérienne et de la partie racinaire des plantules de petit pois traitées avec 500µM et 1mM de nitrate de plomb ne présentent pas de différences significatives comparativement aux plantules témoins.

A une concentration de 2.5mM de nitrate de plomb, le poids frais de la partie aérienne est de $0,64 \pm 0,07g$; il ne varie pas par rapport à celui des plantules témoins. Par contre le poids frais de la partie racinaire est de $0,24 \pm 0,02g$ et diffère au seuil de 1% par rapport à celui des plantules témoins. Les plantules stressées avec les fortes concentrations 5mM, 10mM et 15mM présentent aussi une différence significative au seuil de 1% comparativement aux plantules témoins (Figure 32B).

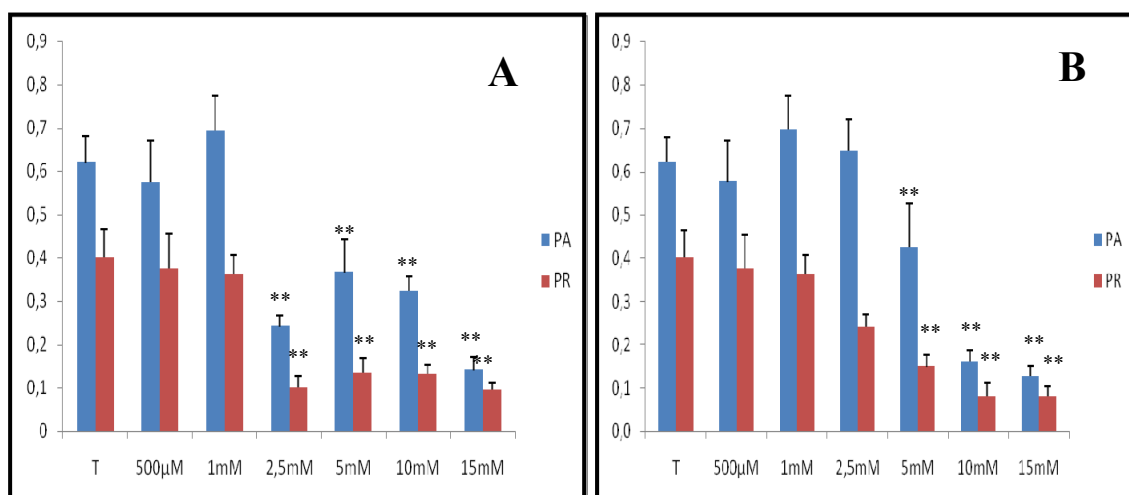


Figure 32 : Evolution du poids frais (gramme) de plantules de petit pois sous l'effet de différentes concentrations de nitrate de plomb (chaque valeur est la moyenne de 10 répétitions, **P< 0.01 représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités)
(A : 7 jours ; B : 14 jours)

• **Poids sec**

Au 7^{ème} jour d'application du stress, les plantules traitées avec 500µM et 1mM de nitrate de plomb présentent un poids sec qui ne varie pas par rapport aux plantules témoins; cependant, une réduction significative au seuil de 1% est observée du poids sec des plantules stressées avec des concentrations de nitrate de plomb de 2,5mM, 5mM, 10mM et 15mM (Figure 33A).

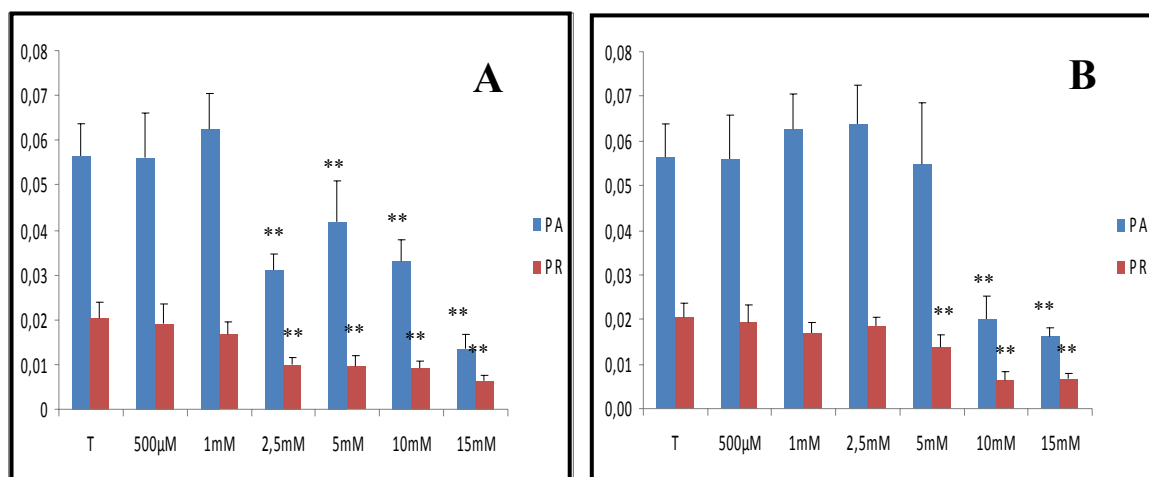


Figure 33 : Evolution du poids sec (gramme) de plantules de petit pois sous l'effet de concentrations de nitrate de plomb (chaque valeur est la moyenne de 10 répétitions, **P< 0.01 représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités)
(A : 7 jours ; B : 14 jours)

Au 14^{ème} jour d'application du stress, les plantules traitées avec 500µM, 1mM et 2.5mM de nitrate de plomb présentent un poids sec qui ne diffère pas par rapport à celui des plantules témoins; a une concentration de 5mM, le poids sec de la partie aérienne des plantules stressées ne varie pas de celui des plantules témoins, ceci dit, le poids sec de la partie racinaire est significativement réduit au seuil de 1% ; il est de $0,014 \pm 0,002g$, ainsi que pour les plantules stressées avec 10mM et 15mM de nitrate de plomb (Figure 33B).

4.2.3- Accumulation du plomb dans les plantes

- **Après sept jours de traitement**

Au niveau de la partie aérienne des plantules de petits pois, on constate que les plantules témoins présentent une teneur en plomb très faible, elle est de $4,8\mu M$ de plomb. Cette teneur ne varie pas chez les plantules exposées à une concentration de 500µM, 1mM et 5mM de nitrate de plomb. Sous l'effet de 10mM et 15mM de nitrate de plomb, la teneur en plomb des plantules de petits pois augmente de manière remarquable ; elle est respectivement de $185,05\mu M$ et $370,47\mu M$ de plomb.

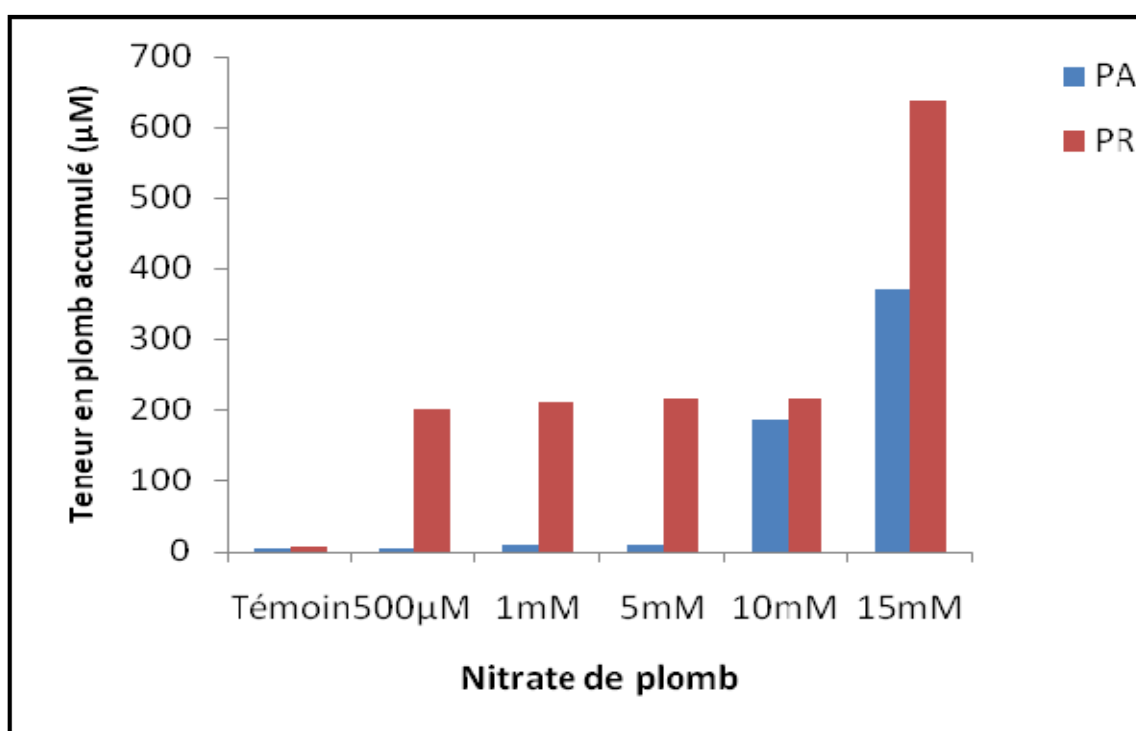


Figure 34: Evolution de la teneur en plomb (μM) au niveau des plantules de *Pisum sativum* L. en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.

Au niveau racinaire, la teneur en plomb est très faible chez les plantules de petits pois témoins ; elle est de $8,3\mu M$ de plomb. Cette teneur augmente sous l'effet d'une concentration de 500µM, 1mM, 5mM et 10mM de nitrate de plomb. Elle est 50 fois plus importante qu'au niveau de la partie aérienne. Elle est respectivement de $199,18\mu M$, $210,96\mu M$, $217,27\mu M$ et $217,72\mu M$ de plomb. Elle est multipliée par trois au niveau des

racines des plantules traitées avec 15mM de nitrate de plomb, elle atteint 636,9 μM de plomb. (Figure 34)

On note aussi que le pourcentage de plomb endogène accumulé au niveau de la partie aérienne par les plantules traitées avec une concentration de nitrate de plomb de 500 μM , 1mM et 5mM est de respectivement 1.12%, 0.91% et 0.19% du plomb appliqué dans le milieu hydroponique. Ce pourcentage est doublé chez les plantes stressées avec une concentration de 10mM et 15mM de nitrate de plomb, il est respectivement de 1.85% et 2.46%.

Le pourcentage de plomb accumulé au niveau de la partie racinaire des plantules traitées avec 500 μM et 1mM de nitrate de plomb est respectivement de 39% et 21% de plomb. Celui des plantules traitées avec 5mM, 10mM et 15mM de nitrate de plomb est nettement moins important, il est en effet de respectivement, 4%, 2% et 4% de plomb (Figure 35).

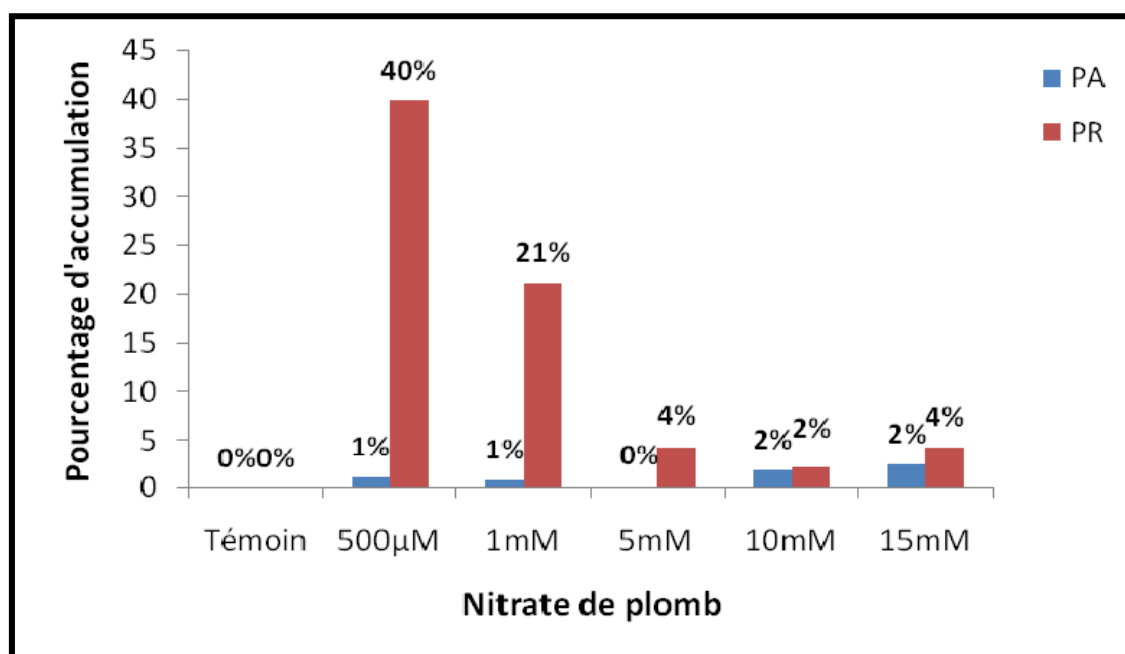


Figure 35: Evolution du pourcentage de plomb accumulé au niveau des plantules de *Pisum sativum* L. en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.

- **Après quatorze jours de traitement**

La teneur en plomb au niveau de la partie aérienne chez les plantules témoins est faible, elle est de 3,11 μM de plomb. Cette teneur ne varie pas chez les plantules traitées avec une concentration de 500 μM et 1mM de nitrate de plomb. Par contre, on observe une augmentation de la teneur en plomb chez les plantules stressées avec une concentration de 5mM, 10mM et 15mM de nitrate de plomb; cette teneur est respectivement de 37,95 μM , 221,20 μM et 289,10 μM de plomb. La teneur endogène en plomb reste toujours faible au niveau des racines des plantules témoins, elle est de 7,52 μM de plomb. On observe une augmentation de cette teneur chez les plantules traitées avec une concentration de 500 μM , 1mM et 5mM de nitrate de plomb ; elle est respectivement de 192,96 μM , 213,32 μM et

216,21 μ M de plomb. La teneur en plomb est doublée chez les plantules traitées avec 10mM de nitrate de plomb, elle est triplée chez les plantules traitées avec 15mM de nitrate de plomb. Elle est respectivement de 490,64 μ M et 675,57 μ M de plomb (Figure 36).

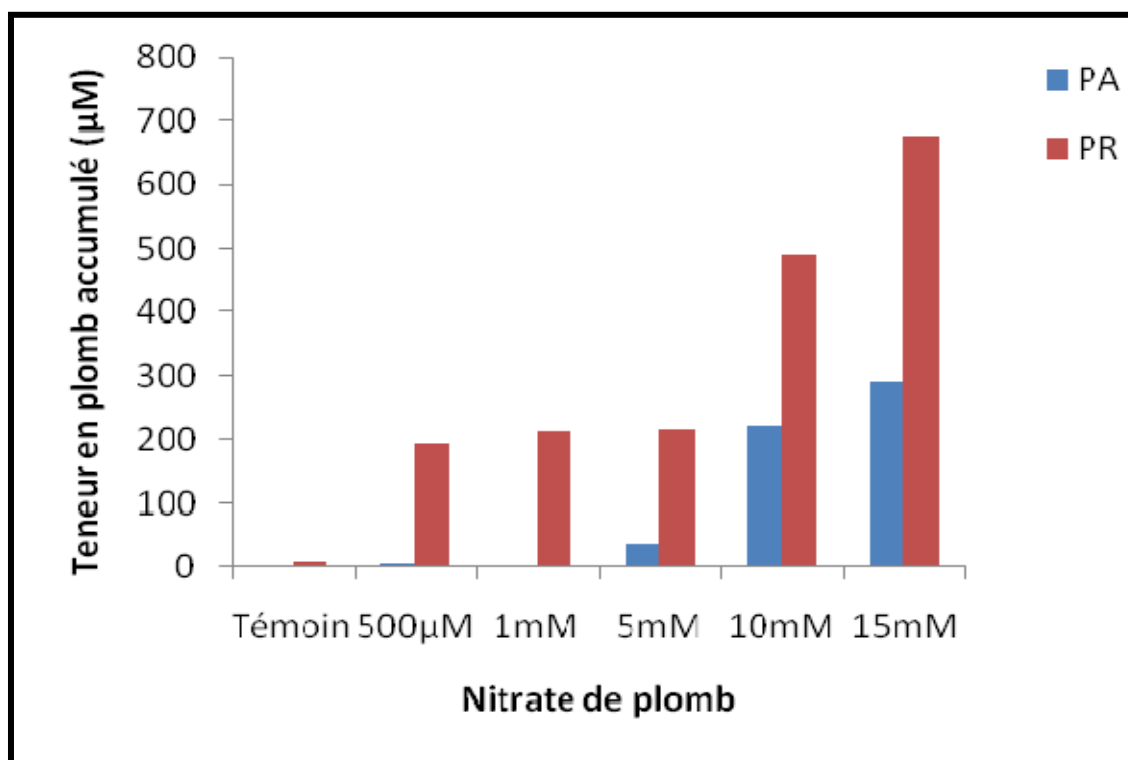


Figure 36 : Evolution de la teneur en plomb (μ M) au niveau des plantules de *Pisum sativum* L. en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.

Au niveau de la partie aérienne, le pourcentage en plomb accumulé comparativement au plomb appliqué est faible chez les plantules traitées avec 500 μ M, 1mM et 5mM de nitrate de plomb, il est respectivement de 1.3%, 0.4% et 0.75% de plomb. Chez les plantules traitées avec 10mM et 15mM de nitrate de plomb, le pourcentage de plomb accumulé augmente et est respectivement de 2.21% et 1.92%.

Au niveau de la partie racinaire, le pourcentage de plomb accumulé chez les plantules traitées avec 500 μ M et 1mM de nitrate de plomb est plus élevé. Il est respectivement de 38% et 21%. Ce pourcentage est plus faible chez les plantules traitées avec 5mM, 10mM et 15mM de nitrate de plomb, il est respectivement de 4.32%, 4.90% et 4.5% (Figure 37).

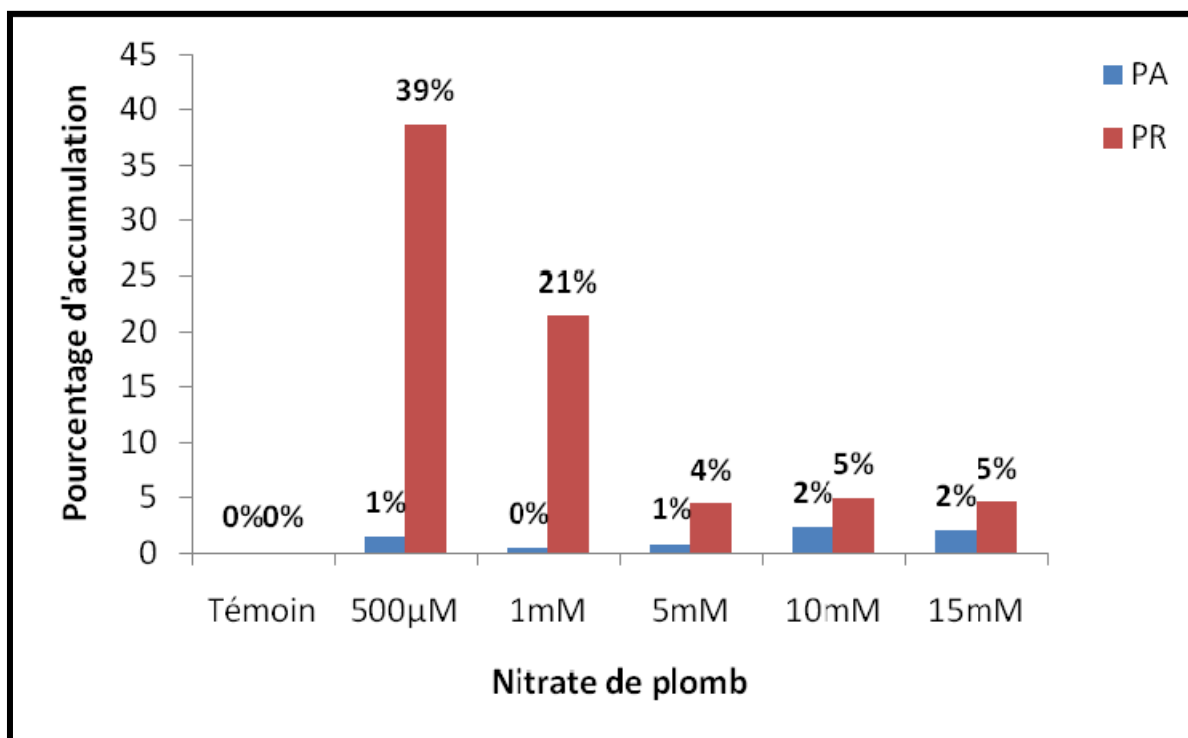


Figure 37 : Evolution du pourcentage de plomb accumulé niveau des plantules de *Pisum sativum* L. en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb.

4.2.4- Discussion

Dans notre étude, le nitrate de plomb agit en fonction du temps et en fonction de sa concentration sur la morphologie de la plante. Après sept jours de traitement, les plantules croissant en absence de nitrate de plomb (témoins) sont vigoureuses et présentent un système racinaire bien développé. Par contre, les plantules traitées avec le nitrate de plomb présentent une baisse de la croissance par rapport aux plantules témoins ; cette baisse est d'autant plus prononcée que la dose en nitrate de plomb est importante.

Après 14 jours de traitement, les plantules témoins présentent un port bien développé. A une concentration de 2,5mM de nitrate de plomb, les plantules présentent une diminution de l'élongation racinaire et une apparition des racines secondaires de longueur égale et légèrement nécrosées. A partir d'une concentration de 5mM de nitrate de plomb, aucune racine secondaire n'est observée ; une diminution de l'élongation de la partie aérienne est constatée. A une concentration de 10mM et 15mM de nitrate de plomb, on observe un dessèchement de la partie aérienne.

La partie aérienne des plantules est aussi affectée par le plomb avec une réduction visible de l'élongation en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb et en fonction du temps. Cette réduction de l'élongation de la partie aérienne est plus tardive comparée à celle de la partie racinaire.

L'inhibition de la croissance de la partie aérienne serait due à un déséquilibre de la nutrition minérale et de la balance de l'eau, à un changement du statut hormonal et à un dérèglement de la structure et de la perméabilité membranaire (Sharma and Dubey, 2005).

L'inhibition de la croissance des racines sous l'effet du plomb est le résultat de l'inhibition de la division cellulaire (Eun et al., 2000) ; en effet, sous l'effet du plomb, les cellules en interphase de la racine possèdent un micronuclei irrégulièrement formé de noyaux avec un matériel nucléaire décomposé (Wierzbicka, 1994). Ce phénomène est lié directement à une diminution du calcium au niveau de l'extrémité des racines, menant à une réduction de la division et de l'élongation cellulaire (Hausling et al., 1988 ; Eun et al., 2000). D'après Kim et al., 2002, le plomb entre en compétition avec les cations divalents au cours du transport vers les racines. L'inhibition des canaux à calcium par le plomb serait dûe soit à un blocage par le plomb ou bien à une compétitivité du transport du plomb (Huang and Cunningham, 1996). Tomsig et Suszkiw (1991) ont détecté une infiltration du plomb à travers les canaux à calcium.

Le plomb peut inhiber la division cellulaire autrement. Chez des plantules de *Lemna minor*, au début du traitement par le plomb, les mitoses sont inhibées après la prophase et une réduction significative du nombre de cellules en métaphase et anaphase est observée (Samardakiewicz et Wozny., 2005). Le plomb bloque la division cellulaire et désorganise le cytosquelette en se liant à la tubuline ce qui inhibe la polymérisation des principaux constituants des microtubules; il a un effet similaire à la colchicine. (Röderer, 1986 ; Wierzbicka, 1988; Eun et al., 2000).

Les nécroses qui apparaissent au niveau des racines indiquent que le plomb induit une oxydation des différents phénols au niveau des racines (Wissemeier et al., 1992 ; Fecht-Christoffers et al., 2003).

L'absence des symptômes de toxicité du plomb au niveau de la partie aérienne accompagnée d'une forte accumulation du plomb au niveau des racines (10-50 fois plus) et l'apparition de symptômes au niveau des racines sous l'effet d'une forte teneur de plomb suggèrent que le site primaire de toxicité du plomb est la racine (Kopittke et al., 2007).

Le poids frais et le poids sec des plantules traitées avec les faibles concentrations de nitrate de plomb (500µM et 1mM), ne varient pas en fonction du temps comparativement à celui des plantules témoins. Sous l'effet des fortes concentrations de nitrate de plomb (5mM, 10mM et 15mM), le poids frais et le poids sec des plantules traitées diminuent de manière significative par rapport aux plantules témoins.

Une diminution considérable de la matière sèche des parties de la plante est observée sous l'effet du plomb (Kosobrukhov et al., 2004). Le poids sec de la plante augmente dans certains cas, cela est dû à une augmentation de la synthèse de polysaccharides de la paroi cellulaire résultant de l'exposition au plomb (Wierzbicka, 1998). Antosiewicz et Wierzbicka (1999) ont localisé une forte teneur de plomb au niveau de la paroi cellulaire de racines d'*Allium cepa* grâce à une technique de microscopie électronique conventionnelle. Cela s'explique par le fait que le plomb se fixe grâce à des composés fonctionnels de la paroi cellulaire, comme, parmi d'autres, les polysaccharides (Seregin

and Ivanov, 2001). L'augmentation de la fixation des ions métalliques implique une plus grande résistance face à leur diffusion à travers la paroi cellulaire, ce qui réduit la quantité de métaux absorbée (Jonathan Shaw A, 1991).

A de faibles concentrations de nitrate de plomb (500 μ M, 1mM et 5mM), la teneur en plomb absorbée par les racines est 50 fois plus importante que celle absorbée par la partie aérienne. Par contre, chez les plantules traitées avec les fortes concentrations de nitrate de plomb (10mM et 15mM), la teneur en plomb absorbée par la partie racinaire est deux à trois fois plus importante que celle absorbée par la partie aérienne.

A partir de 10mM de nitrate de plomb, une grande partie du plomb des racines passe dans les tiges, en effet, après 7 jours de traitement, la teneur en plomb au niveau de la partie racinaire est de 217,72 μ M et au niveau de la partie aérienne de 185,05 μ M de plomb. Après 14 jours de traitement, la teneur endogène en plomb au niveau des racines est doublée, elle est de 490,64 μ M, elle reste stable au niveau de la partie aérienne puisqu'elle ne dépasse pas 221,20 μ M de plomb. La teneur endogène en plomb augmente chez les plantes stressées sous l'effet d'une concentration de 10mM et 15mM de nitrate de plomb de manière remarquable du fait de l'endommagement de l'endoderme et donc du passage passif des ions de plomb vers la partie aérienne.

Chez d'autres plantes (*Vigna unguiculata*), la concentration du plomb au niveau des racines est 10-50 fois plus élevée qu'au niveau de la partie aérienne (Kopittke et al., 2007). 15 fois plus chez le maïs (Malkowski et al., 2002) ; 4-20 fois plus chez le *Phaseolus vulgaris* (Hardiman et al., 1984) ; et 100-300 fois plus chez *Picea abies* (Godbold and Kettner, 1991). La cause de cette large différence de la concentration de plomb entre les racines et la partie aérienne n'est pas encore établie mais quelques travaux suggèrent que l'accumulation du plomb au niveau des racines apparaît parce que l'endoderme agit comme une barrière au transport radial du plomb au niveau des racines et ce, par une restriction de sa translocation vers la partie aérienne (Hardiman et al., 1984 ; Jentschke et al., 1991 ; Seregin and Ivanov, 1997). Le plomb peut être aussi immobilisé par les charges négatives de la pectine dans la paroi cellulaire et précipité comme un sel de plomb insoluble au niveau de la paroi cellulaire ou au niveau de l'espace intercellulaire ou encore passe à travers la membrane plasmique pour être séquestré dans la vacuole des cellules rhizodermiques ou corticales (Kopittke et al., 2007).

Les plantes mettent en place plusieurs stratégies face à la présence d'un métal dans le sol afin d'éviter les dommages causés par celui-ci. Selon le rapport de la concentration en métal dans le sol et dans la plante, les plantes sont classées en plantes résistantes, accumulatrices et indicatrices. Chez les plantules de petit pois traitées avec les différentes concentrations de nitrate de plomb, la concentration endogène de plomb et les concentrations en nitrate de plomb appliquées présentent une corrélation positive laissant apparaître une courbe croissante qui se rapproche de celle représentée chez les plantules de type résistantes (Figure38).

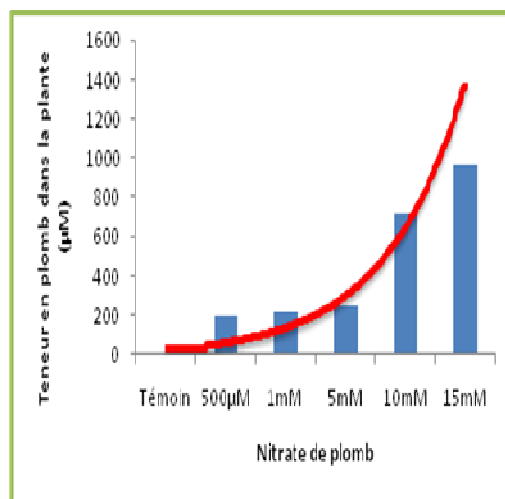
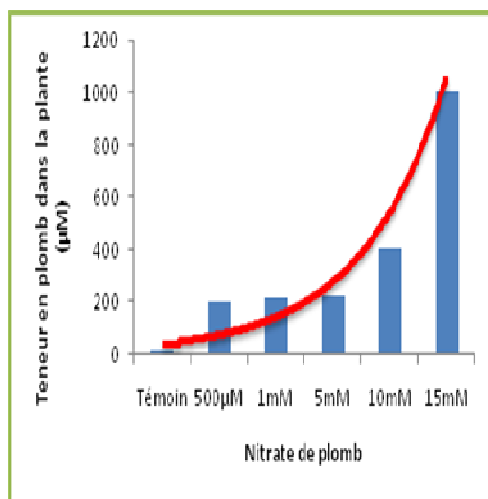
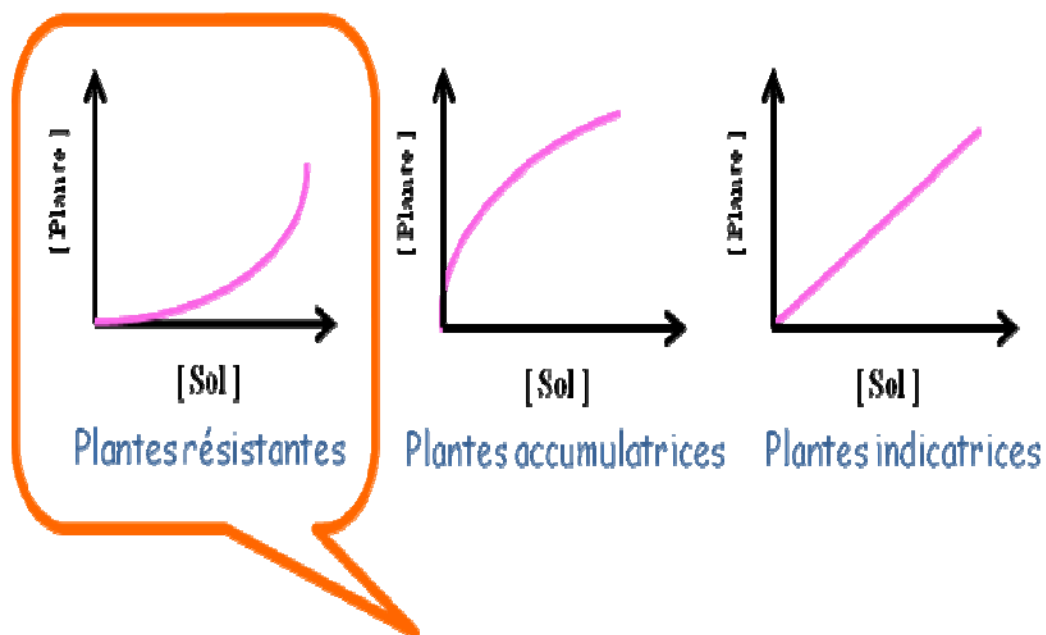


Figure 38: Stratégie de réponse des plantules de petit pois face à la présence du nitrate de plomb dans le milieu nutritif

4.2.5- Effets du nitrate de plomb sur les pigments chlorophylliens

- **Chlorophylle a**

Après 7 jours de croissance, la quantité de chlorophylle *a* des feuilles des plantules témoins et stressées avec 500 μM et 1mM de nitrate de plomb est similaire, elle est respectivement de $7.17 \pm 0.33 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $7.32 \pm 0,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $7,45 \pm 0,87 \mu\text{g.mL}^{-1}$. (Figure 39)

Concernant les plantules traitées avec 2,5mM et 5mM de nitrate de plomb, la teneur en chlorophylle *a* augmente de manière significative ($P < 0.01$) pour atteindre respectivement $8.87 \pm 0.68 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $9.24 \pm 0.63 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Après 14 jours de croissance, la teneur en chlorophylle *a* reste stable chez le témoin. Celle-ci ne varie pas pour les autres plantules traitées avec les différentes concentrations de nitrate de plomb.

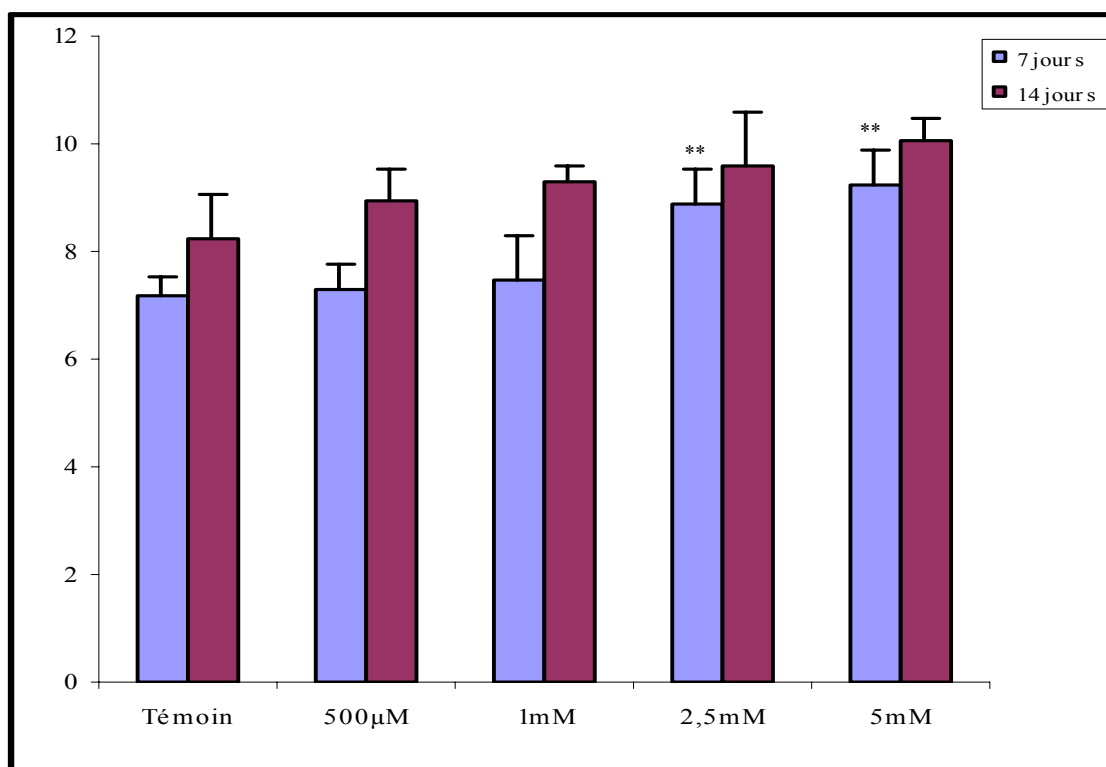


Figure 39: Evolution de la teneur en chlorophylle *a* de plantules de *Pisum sativum* L. stressées par différentes concentrations de nitrate de plomb ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions, ** $P < 0.01$ représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités)

- **Chlorophylle b**

Après 7 jours de traitement, le taux de chlorophylle *b* chez les plantules témoins est de $1,87 \pm 0,94 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Ce taux de chlorophylle ne varie pas de manière significative

comparativement aux plantules stressées avec les différentes concentrations de nitrate de plomb (Figure 40).

La teneur en chlorophylle *b* après 14 jours de traitement reste stable chez les plantules stressées de *Pisum sativum* L. avec les différentes concentrations de plomb et les plantules témoins. La teneur en chlorophylle *b* étant de $1,98 \pm 0,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

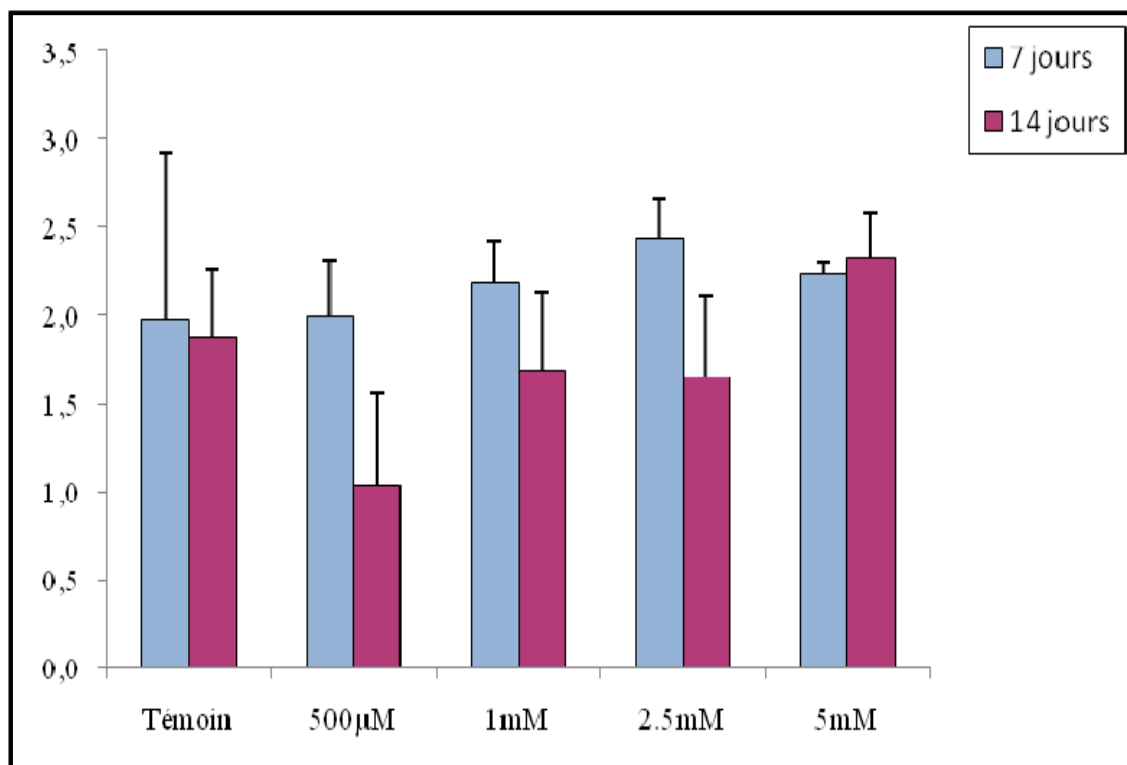


Figure 40: Evolution de la teneur en chlorophylle *b* de plantules de petits pois stressées par différentes concentrations de nitrate de plomb ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions, $**P < 0.01$ représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités)

- **Caroténoïdes**

Au septième jour, le taux de caroténoïdes ne varie pas chez les plantules stressées avec des concentrations modérées de nitrate de plomb 500μM et 1mM et les plantules témoins ; il est respectivement de $1,91 \pm 0,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1,94 \pm 0,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $2,03 \pm 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Par contre, une différence significative au seuil de 1% est observée chez les plantules traitées avec 2,5mM et 5mM de nitrate de plomb avec respectivement $2,65 \pm 0,29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et $2,81 \pm 0,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$.de caroténoïdes (Figure 41).

Au quatorzième jour, le taux de caroténoïdes des plantules témoins est de $3,48 \pm 0,34 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Les plantules stressées avec les différentes concentrations de nitrate de plomb ne présentent aucune différence significative par rapport aux plantules témoins.

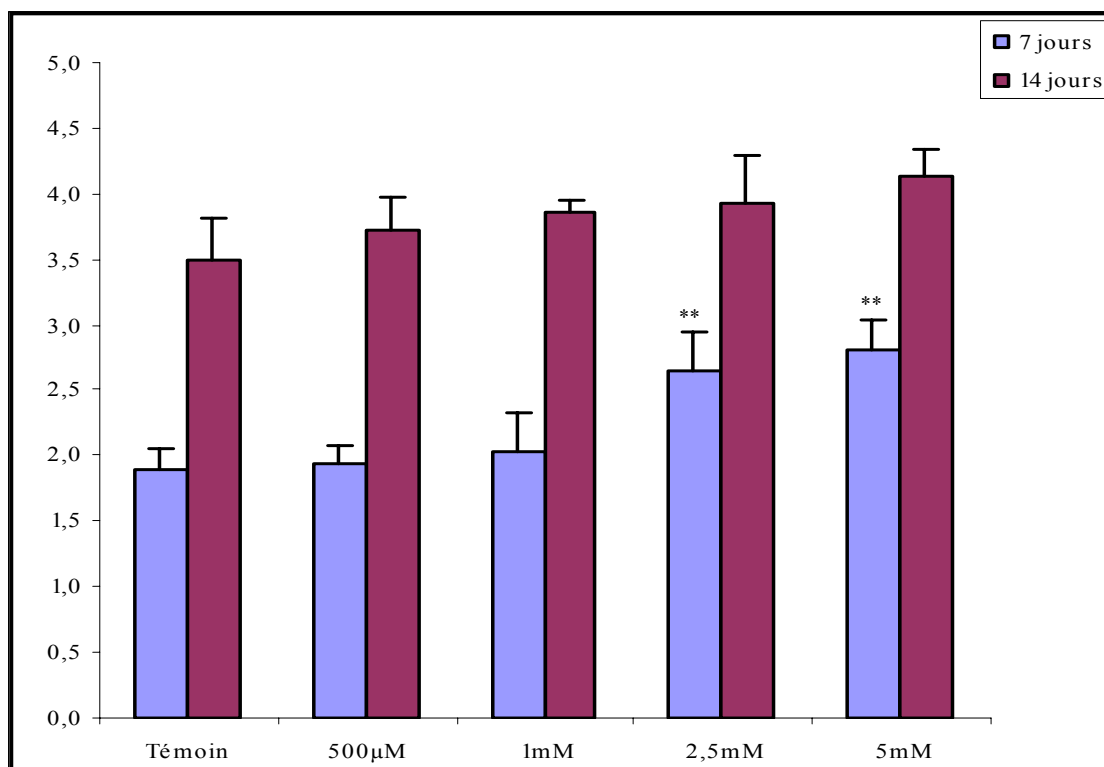


Figure 41: Evolution de la teneur en caroténoïdes de plantules de petits pois stressées par différentes concentrations de nitrate de plomb ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (chaque valeur est la moyenne de 4 répétitions, $***P < 0.01$ représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités)

4.2.6- Discussion

Après 7 jours de stress, le taux de chlorophylle *a* des plantules de petits pois ne varie pas sous l'effet des faibles concentrations de nitrate de plomb (500 μM et 1mM) comparativement au taux de chlorophylle des plantules témoins ; par contre, on observe une augmentation significative sous l'effet d'une concentration de 2,5mM et 5mM de nitrate de plomb. Après 14 jours de traitement, le taux de chlorophylle des plantules stressées avec les différentes concentrations de nitrate de plomb ne varie de manière significative comparativement à celui des plantules témoins.

Le taux de chlorophylle *b* ne varie chez les plantules stressées avec les différentes concentrations de nitrate de plomb que soit au 7^{ème} jour ou au 14^{ème} jour.

Après 7 jours de traitement, le taux de caroténoïdes chez les plantules traitées avec 500 μM et 1mM de nitrate de plomb ne varie pas comparativement à celui des plantules témoins. Ce taux augmente de manière significative chez les plantules stressées avec une concentration de 2,5mM et 5mM de nitrate de plomb. Après 14 jours de traitement, le taux de caroténoïdes des plantules stressées par les différentes concentrations de nitrate de plomb ne varie pas de manière significative comparativement à celui des plantules témoins.

D'autres travaux ont montré que le plomb réduit l'activité de la photosynthèse (Stiborova et al., 1986, 1987) en causant un dérèglement de l'ultrastructure du chloroplaste, l'inhibition de la synthèse des pigments photosynthétiques et des enzymes du cycle de Calvin (Mishra et al., 2006). Le plomb induirait une diminution de la synthèse de la chlorophylle qui serait due à l'inhibition de l'acide δ aminolevulinique dehydrogenase (ALAD) (Prasad and Prasad, 1987), mais aussi des dommages au niveau du chloroplaste impliquant les grana et le stroma (Rebechini and Hanzely, 1974), l'absorption des éléments essentiels (manganèse et fer) ou bien à la dégradation de la chlorophylle par l'augmentation de l'activité de la chlorophyllase (Sharma and Dubey, 2005). La réduction de la chlorophylle *a* et *b* ainsi que des caroténoïdes a été signalée par Mishra et al. (2006) chez le blé sous l'effet du cadmium (Öncel et al., 2000).

4.2.7- Statut hydrique des plantules

- **Effets du nitrate de plomb sur la teneur relative en eau**

Les plantules traitées avec les fortes concentrations de nitrate de plomb 10mM et 15mM, présentent des feuilles de très petites tailles, et il a été impossible de mesurer leur teneur relative en eau.

Au 7^{ème} jour d'application du stress, la teneur relative en eau des plantules témoins est de $92,80 \pm 1,41\%$. Nous remarquons que la teneur relative en eau des plantules stressées avec 500 μ M et 1mM de nitrate de plomb n'est pas différente de celle des plantules témoins. Chez les plantules traitées avec 2,5mM et 5mM de nitrate de plomb, la teneur relative en eau est respectivement de $86,50 \pm 2,82\%$ et $87,70 \pm 1,93\%$. Elles présentent une différence significative au seuil de 1% comparativement aux plantules témoins (Figure 42).

Au 14^{ème} jour d'application du stress, la teneur relative en eau des plantules témoins est de $93,30 \pm 5,68\%$, elle est sensiblement la même chez les plantules stressées avec 500 μ M et 1mM et 2.5mM de nitrate de plomb.

Par contre, les plantules stressées avec 5mM de nitrate de plomb présentent une teneur relative en eau de $81,50 \pm 2,82\%$ qui est différente significativement au seuil de 1% par rapport aux plantules témoins (Figure 42).

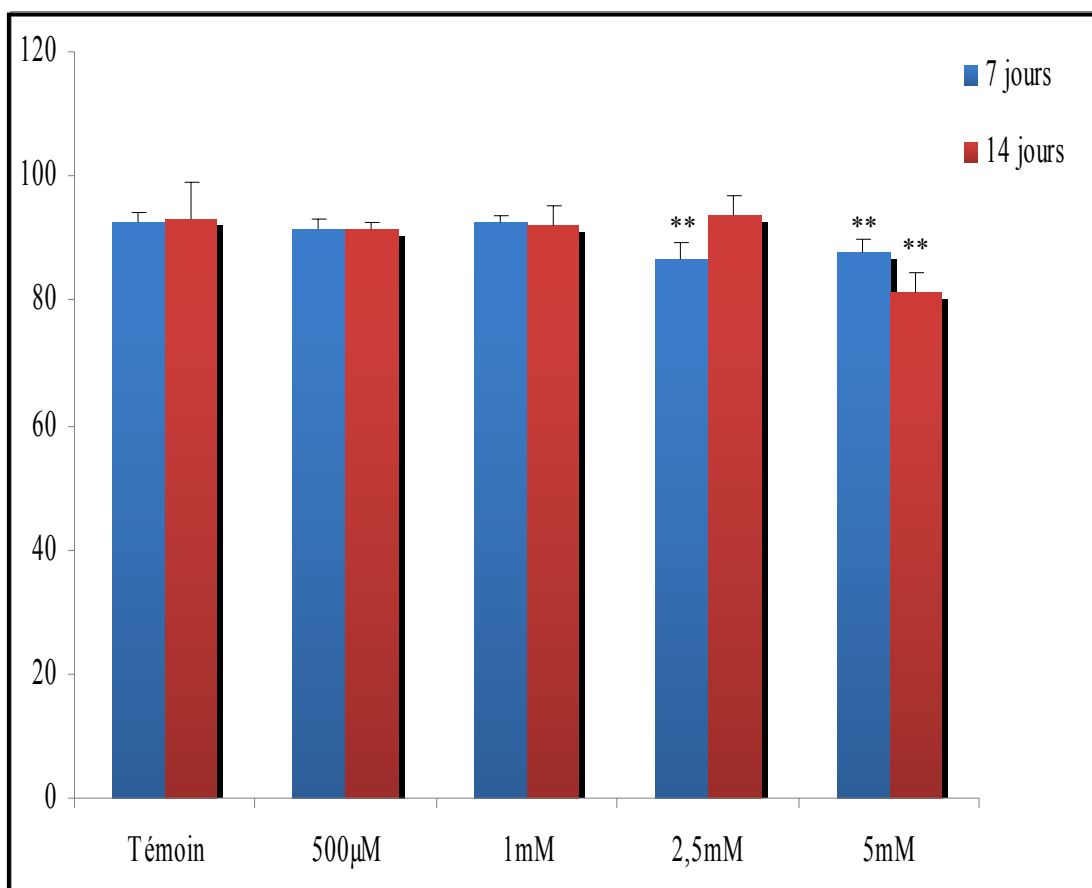


Figure 42: Evolution de la teneur relative en eau de plantules de petit pois en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb (chaque valeur est la moyenne de 10 répétitions, **P< 0.01 représente le niveau de significativité entre les témoins et les traités)

- **Effets du nitrate de plomb sur la proline**

Après sept jours de croissance, la teneur en proline des feuilles des plantules témoins de *Pisum sativum* L. est de $0,76 \pm 0,18$ mg.g⁻¹ de MVS. Une stabilité de la quantité de la proline des feuilles est observée chez les plantules stressées avec 500µM et 1mM de nitrate de plomb (Figure 43).

Les plantules stressées avec 2,5mM et 5mM de nitrate de plomb présentent une teneur en proline qui augmente significativement aux seuils respectifs de 5% et 1%. La teneur en proline est respectivement de $1,19 \pm 0,14$ mg.g⁻¹ de MVS et $1,57 \pm 0,38$ mg.g⁻¹ de MVS

14 jours après l'application du stress, la teneur en proline des plantules témoins de petits pois est de $0,77 \pm 0,04$ mg.g⁻¹ de MVS. Les plantules traitées avec une concentration de 500µM, 1mM et 2,5mM de nitrate de plomb présentent une teneur en proline qui reste stable et ne diffère pas par rapport aux plantules témoins ; elle est respectivement de $0,84 \pm 0,10$ mg.g⁻¹ de MVS, $0,82 \pm 0,09$ mg.g⁻¹ de MVS, $0,78 \pm 0,06$ mg.g⁻¹ de MVS. Pour les plantules traitées avec une concentration de 5mM de nitrate de plomb, la teneur en proline est de $1,52 \pm 0,34$ mg.g⁻¹ de MVS. Cette augmentation est significative au seuil de 1% comparativement aux plantules témoins.

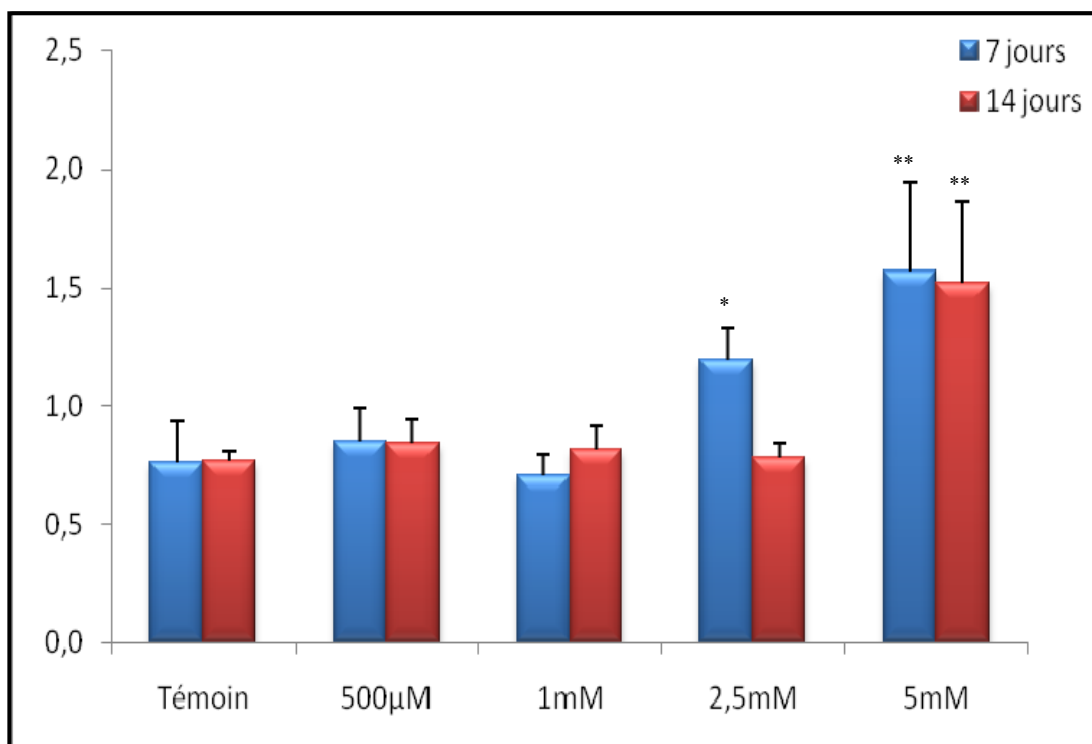


Figure 43: Evolution de la teneur en proline de plantules de petit pois en fonction des différentes concentrations de nitrate de plomb (mg.g^{-1} de MVS) (chaque valeur est la moyenne de 3 répétitions, ** $P < 0.01$ et * $P < 0.05$ représentent le niveau de significativité entre les témoins et les traités)

4.2.8- Discussion

Après 7 jours de traitement, la teneur relative en eau chez les témoins est d'environ 93%. Sous l'effet des faibles concentrations de nitrate de plomb, 500 μM et 1mM, la teneur relative en eau ne varie pas de manière significative comparativement aux plantules témoins. Cependant on observe une diminution significative de la teneur relative en eau des feuilles de petits pois sous l'effet de 2,5mM et 5mM de nitrate de plomb.

Après 14 jours de traitement, la teneur relative en eau des plantules stressées avec 500 μM , 1mM et 2.5mM de nitrate de plomb ne présentent pas de différence significative comparativement à la teneur relative en eau des plantules témoins ; par contre, une diminution significative de la teneur relative en eau des feuilles des plantules traitées avec 5mM de nitrate de plomb est notée.

Le dosage de la teneur en proline après 7 jours de traitement révèle que les plantules de *Pisum sativum* stressées avec 500 μM et 1mM présentent une teneur en proline qui ne varie pas comparativement à celle des plantules témoins. Une augmentation significative de cette teneur chez les plantules traitées avec une concentration de 2,5mM et 5mM de nitrate de plomb est observée. Après 14 jours d'application du stress, les plantules traitées avec 500 μM , 1mM et 2,5mM ne présentent pas de variation quand à la teneur en proline par rapport à celle des plantules témoins. Par contre, une augmentation significative est observée chez les plantules traitées avec une concentration de 5mM de nitrate de plomb.

Le coefficient de corrélation entre la teneur relative en eau et la teneur en proline des plantules traitées augmente notablement et est respectivement de 0,61 et 0,84 chez les plantules traitées pendant 14 jours avec 2,5mM et 5mM de nitrate de plomb. Celui des plantules traitées pendant sept jours avec 2,5mM de nitrate de plomb est de 0,25.

La proline, soluté compatible, est accumulée par les plantes sous l'effet d'un déficit hydrique (Aspinall and Paleg, 1981), de la salinité (Ashraf and Harris, 2004) et d'autres stress environnementaux. Dans notre étude, la teneur en proline augmente chez les plantules traitées avec 2.5mM et 5mM de nitrate de plomb. En effet, ces plantules présentent une teneur relative en eau réduite de manière significative comparativement aux plantules témoins. Cette diminution de la teneur relative en eau est le résultat d'un stress hydrique physiologique due probablement à l'effet du nitrate de plomb. La proline s'accumule alors de manière significative chez les plantes traitées avec 2.5mM et 5mM de nitrate de plomb. Ce résultat a été aussi observé par Chen et al., 2004. Cet acide aminé joue le rôle d'osmoprotectant (Nanjo et al., 1999), il est impliqué dans le maintien de la pression osmotique du cytosol et de la vacuole mais aussi dans la protection des membranes, des systèmes enzymatiques et dans la régulation du pH (Monneveux, 1997).

*Conclusion
générale et
perspectives*

5- Conclusions générales et perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette étude nous permettent d'aboutir aux conclusions suivantes :

Le nitrate de plomb a un effet négatif sur la germination des graines de petits pois. En effet, il ralentit et inhibe la germination à de fortes concentrations de nitrate de plomb. Cette réduction de la germination n'est pas due à une limitation en eau mais plutôt à la présence du plomb au niveau de la plante en quantités non négligeables. Le plomb réduit l'activité d'une enzyme clé de la germination « l'alpha-amylase ». Il a un effet ionique sur la germination. Le nitrate de plomb agit aussi sur la morphologie et la physiologie des plantules de *Pisum sativum* L. Il réduit l'élongation et le développement du système racinaire et de la partie aérienne. Cette réduction de la croissance est accompagnée par un brunissement des racines, l'inhibition de la formation des racines secondaires, un dessèchement de la partie aérienne sous l'effet de fortes concentrations de nitrate de plomb, mais aussi une réduction du poids frais et du poids sec des plantules traitées. Ces symptômes de toxicité sont dus à la présence de plomb en quantité non négligeable dans les plantules stressées.

La germination est inhibée sous l'effet de concentrations élevées de nitrate de plomb ; ces concentrations sont revues à la baisse quand à la sensibilité des plantules au cours de leur croissance.

Le plomb est absorbé en quantité plus importante au niveau de la racine qu'au niveau de la partie aérienne. Sous l'effet des fortes concentrations de nitrate de plomb, le plomb s'accumule en grande quantité au niveau de la partie aérienne car l'endoderme perd sa fonction de barrière de translocation des ions.

Le nitrate de plomb induit cependant une augmentation significative des pigments chlorophylliens en particulier la chlorophylle (a) et les caroténoïdes. La diminution de la teneur relative en eau chez les plantules traitées et l'augmentation du taux de proline nous mènent à dire que le nitrate de plomb induit un stress hydrique physiologique.

Les plantules de petit pois présentent une capacité de résistance à certaines concentrations de nitrate de plomb.

Néanmoins, pour une meilleure appréciation de l'impact du nitrate de plomb sur les plantules de petits pois, il serait intéressant de compléter et d'enrichir cette étude par :

- Une étude de l'effet de l'activité amylasique in vitro des plantules traitées par le nitrate de plomb.
- Une étude anatomique des plantules afin de localiser le plomb au niveau cellulaire.
- L'étude de l'effet des faibles concentrations de nitrate de plomb sur les plantules à plus long terme.
- L'étude du comportement des plantules stressées en présence de chélateurs synthétiques.
- L'étude des mécanismes de détoxification (SOD, catalase, peroxydase etc.)

*Références
bibliographiques*

6- Références bibliographiques

- Abrahams PW, 2002. Soils: their implications to human health. *The Science of the Total Environment* 291, 1-32.
- Adriano DC, 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg.
- Ahmed A, Tajmir-Riahi HA, 1993. Interaction of toxic metal ions Cd^{2+} , Hg^{2+} and Pb with light-harvesting proteins of chloroplast thylakoid membranes. An FTIR spectroscopic study. *J. Inorg. Biochem.* 50:235-243.
- Alia, Mohanty P, Matysik J, 2001. Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids* 21:195-200.
- Antonovics J, Bradshaw AD, Turner RG, 1971. Heavy metal tolerance in plants. *Adv. Ecol. Res.*, 7,1.
- Antosiewicz D, Wierzbicka MI, 1999. Localization Of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy. *J. Microscopy*, 195 : 139-146.
- Antosiewicz DM, 1992. Adaptation of plants to an environment polluted with heavy metals. *Acta Soc. Bot. Polon.* 61:281-299.
- Asada K, 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In : Foyer C, Mullineaux PM (Eds), *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, pp. 77-100. CRC Press, Boca Raton, London.
- Ashraf M, Harris PJC, 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166 : 3-16.
- Aspinall D, Paleg LG, 1981. Proline accumulation physiological aspects. In: Paleg LG, Aspinall D, eds. *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Australia: Academic Press, 205-240.
- Baisak R, Rana D, Acharya P, Kar M, 1994. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. *Plant Cell Physiol.* 35 : 489-495.
- Baker AJM, 1987. Metal tolerance. *New Phytologist* 106 : 93-111.
- Baker AJM, 1997. Possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. *Res. Conserv. Recycl.* 41-49.
- Bansal P, Sharma P, Dhindsa K, 2001. Impact of Pb^{2+} and Cd^{2+} on activities of hydrolytic enzymes in germinating pea seeds, *Ann. Agri-Bio. Res.* 6 : 113-122.
- Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazmaier M, Gagnon J, Triantaphylides C, 1998. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39, 205-207.
- Bazzaz MB, Govindjee, 1974. Effect of lead chloride on chloroplast reactions. *Environ. Lett.* 6:175-191.

- Berry WL**, 1986. Plant factors in influencing the use of plant analysis as a tool for biogeochemical prospecting. In : Carlisle D, Berry WL, Kaplan IR, Watterson JR, (Eds). Mineral Exploration : Biological Systems and Organic Matter. 13-32. Englewood Cliffs, USA.
- Bert V**, 2000. Tolérance aux métaux lourds et accumulation chez *Arabidopsis halleri* (*Brassicaceae*). Thèse : Université des Sciences et Technologies de Lille, UFR de Biologie.
- Bizily SP**, Rugh CL, Summers AO, Meagher RB, 1999. Phytoremediation of methylmercury pollution : *mer B* expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America. Vol 96 : 6808-6813.
- Blaylock M**, Salt D, Dushenkov S, Zakharova O, Gussman C, Kapulnik Y, Ensley B, askin I, 1997. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. Environ Sci Technol 31:860-865
- Bounias M**, 1999. Traité de toxicologie générale: Du niveau moléculaire à l'échelle planétaire Ed : SPRINGER.
- Bradford M** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 : 248-254.
- Breckle SW**, 1991. Growth under stress : Heavy metals. In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds), Plant Roots: The hidden Half, pp. 351-373. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Brett CT**, Waldron K, 1996. Physiology and biochemistry of plant cell walls edition : SHAPMAN & HALL
- Briat JF**, Lebrun M, 1999. Plant responses to metal toxicity. Plant Biology and Pathology 322,43-54.
- Brierley CL**, 1990. Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwaters. *Geomicrobiology Journal*, 8: 201-223.
- Brooks RR**, 1998. Geobotany and hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.). Plants that hyperaccumulate heavy metals. CABI Publishing, Wallingford, pp. 55-94.
- Broyer R**, Johnson CM, Paull RE, 1972. Some aspects of lead in plant nutrition. Plant Soil 36:301-313.
- Cataldo DA**, Mc Fadden KM, Garland TR, Wildung RE, 1988. Organic constituents and complexation of nickel (II), iron (III), cadmium (II), and plutonium (IV) in soybean xylem exudates. Plant Physiology. 86 : 734-739.
- Chaignon V**, 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse : Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille.
- Chaitanya KSK**, Naithani SB, 1994. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss in viability of seeds of *Shorea robusta* Gaertn. F. New Phytol. 126:623-627.

- Chardonnens AN, Koevoets PLM, Van Zanten A, Schat H, Verkleij J.A.C, 1999. Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiology* 120, 779-785.
- Cheng S, 2003. Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research* 10 (4): 256-264.
- Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H, 2001. Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* 213: 45-50
- Chugh LK, Sawhney SK 1999. Effect of cadmium on germination amylases and rate of respiration of germinating pea seeds, *Environ. Pollut.* 92 : 1-5.
- Clarke JM, Mc Caing TN. 1982. Evaluation of techniques for screening for drought resistance in wheat. *Crop Science*, 22, 503-506.
- Clístenes Williams Araújo do Nascimento, Baoshan Xing, 2006. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. *Braz. J. Plant Physiol.* Vol 63 (3): 299-311.
- Cloues RK, Cibulsky SM, Sather WA, 2000. Ion interactions in the high-affinity binding locus of a voltage-gated Ca²⁺ channel. *J Gen Physiol*, 116: 569-86.
- Dahmani-muller H, Van Oort F, Gelie B, Balabane M, 1999. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution* 109, 1-8.
- Davies BE, 1995. Lead and other heavy metals in urban areas and consequences for the health of their inhabitants. In: Majumdar SK, Miller EW, Brenner FJ (eds), *Environmental Contaminants, Ecosystems and Human Health*, pp.287-307. The Pennsylvania Academy of Science, Easton PA, USA.
- De Knecht JA, Koevoets PLM, Verkleij JAC, Ernst, WHO, 1992. Evidence against a role for phytochelatins in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene Vulgaris* (Moench) Garcke. *New Phytologist* 122, 681-688.
- Degobert P, 1992. *Automobile et pollution* Ed TECHNIP.
- Deneux-Mustin S, Roussel-Debet S, Mustin C, Henner P, Munier-Lamy C, Colle C, Berthelin J, Garnier-Laplace J, Leyval C, 2003. *Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol.* TEC & DOC, Paris.
- Denny and Weeks DC 1968, Electropotential gradients of ions in a aquatic angiosperm *Potamogeton schweinfurthii* (Benn). *New Phytol.* 67: 875-882.
- Devi SR, Prasad MNV, 1999. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad MNV & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems.* Springer-Verlag, Berlin, pp. 99-116.
- Dietz K J, Baier M, Kramer U, 1999. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In : Prasad MNV and Hagemayer J (Eds). *Heavy metal stress in plants : From molecules to ecosystems.* Springer-Verlag, Berlin 73-97.
- Drazkiewicz M, 1994. Chlorophyll-occurrence, functions, mechanism of action, effects of internal and external factors. *Photosynthetica* 30:321-331.

- Environment Writer: Lead (Pb) Chemical Backgrounder, 2000.
- Ernst WHO, 1974. Schwermetallvegetation der Erde, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart.
- Ernst WHO, 1980. Biochemical aspects of cadmium in plants. In: Nriagu JO (ed), Cadmium in the Environment, pp.639-653. J Wiley and Sons, New York, USA.
- Esteban R, 2006. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Thèse de doctorat.
- Eun SO, Youn HS, Lee Y, 2000. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiol. Plant.* 110 : 357-365.
- Farago ME, Mullen WA, 1979. Plants which accumulate metals. Part IV. A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*. *Inorg. Chim. Acta* 32:L93-L94.
- Farago ME, Mullen WA, Cole MM, Smith RF, 1980. A study of *Armeria maritima* (Mill) Widdelow growing in a copper-impregnated bog, *Environ. Ser. A*, 21, 225.
- Fecht-Christoffers MM, Braun HP, Lemaitre-Guillier C, Van Drosselaer A, Horst WJ, 2003. Effect of manganese toxicity on the proteome of the leaf apoplast in cowpea. *Plant Physiol.* 133 : 1935-1946.
- Foy CD, Chaney RL, White MC, 1978. The Physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 29, 511-566.
- Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM, 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress and tolerance and signaling. *Physiol Plant.* 100 : 241-254.
- Foyer CH, Noctor G, 2000. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist* 146, 359-388.
- Frugoli JA, Zhang HH, Nuccio ML, McCourt P, McPeak MA, Thomas TI, McClung CR, 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. *Plant Physiol.* 112:327-336.
- Gaspar T, Penel C, Thrope T, Greppin H, 1982. Peroxiases (1970-1980). A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants, pp. 324-330. University of Geneva Press, Centre de Botanique, Geneva, Switzerland.
- Godbold DL, Kettner C, 1991. Lead influences root growth and mineral nutrition of *Picea abies* seedlings. *J. Plant Physiol.* 139:95-99.
- Godzik B, 1993. Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area. *Pol. Bot. Stud.* 5:113-132.
- Greger M, 1999. Metal availability and bioconcentration in plants. In: Prasad MNV. & Hagemayer J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-27.
- Gremion F, 2003. Analysis of microbial community structures and functions in heavy metal contaminated soils using molecular methods. Thèse de doctorat.

Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC), 1997. *Remediation of Metal-Contaminated Soils and Groundwater*. GWRTAC E Series. TE-97-01.

Hall JL, 2001. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1-11.

Hardiman R, Jacoby B, Banin A, 1993. Studies on lead oxalate crystalline growth. *Journal of Colloids and Interface Science*. 155 : 265-270.

Harrington, CF, Roberts DJ, Nickless G, 1996. The effect of cadmium, zinc and copper on growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid, in two strains of the grass *Festuca rubra*. *Canadian Journal of Botany*, 74, 1742-1752.

Hausling M, Jorns CA, Lehmbecker G, Hercht-Bucholz C, Marschner H, 1988. Ion and water uptake in relation to root development of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst). *J. Plant Physiol*. 133 : 486-491.

Herwig B, Streb P, Feierabend J, 1992. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol*. 100 : 1547-1553.

Hopkins W G, Evrard C-M, 2006. *Physiologie végétale*. Publié par De Boeck Université

Huang JW, Cunnigham SD, 1996. Lead Phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol*. 134:75-84.

Inouhe M, 2005. Phytochelatins. *Toxic Metals in Plants*. *Braz. J. Plant Physiol*. vol.17 (1) :65-78.

Iqbal J, Mushtaq S, 1987. Effect of lead on germination, early seedling growth, soluble protein and acid phosphatase content in *Zea mays*. *Pak. J. Sci. Ind. Res*. 30:853-856.

Iqbal Z, Mahmood T, Ahmed F, 1991. Influence of cadmium toxicity on germination and growth of some common trees *Pak. J. Sci. Ind. Res*. 34(4): 140-142.

Jana S, Choudhari MA, 1982. Senescence in submerged aquatic angiosperms: effects of heavy metals. *New Phytol*. 90:477- 484

Jansen M et Aiko Bode du PNUE et Glasgow M et Jingjing Qian de l'UNICEF, 1997. L'intoxication des enfants par le plomb. Information visant à susciter le plaidoyer et l'action.

Jarvis MD, Leung DWM, 2002. Chelated lead transport in *Pinus radiata*: an ultrastructural study. *Environ. Exp. Bot*. 48:21-32.

Jentshke G, Fritz E, Godbold DL, 1991. Distribution of lead in mycorrhizal and non-mycorrhizal Norway spruce seedlings. *Physiologia Plantarum*. 81 : 417-422.

Jentshke G, Godbold DL, 2000. Metal toxicity and ectomycorrhizas. *Physiologia Plantarum* 109, 107-116.

Jonathan Shaw A, 1991. *Heavy metal tolerance in plants : Evolutionary aspects*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

Jones LHP, Clement CR, Hopper MJ, 1973. Lead uptake from solution by perennial ryegrass and its transport from roots to shoots. *Plant Soil* 38 : 403-414.

- Kabata-Pendias A, Pendias H, 1992.** Trace elements in soils and plants. 2nd Eds CRC, Boca Raton, London.
- Kabata-Pendias A, Pendias H, 2001.** Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C.
- Kim YY, YangnYY, Lee Y, 2002.** Pb and Cu uptake in rice roots. *Physiol. Plant.* 116 : 368-372.
- Koeppel DE, Miller RJ, 1970.** Lead effects on corn mitochondrial respiration. *Science* 167:1376-1377.
- Kopittke PM, Asher CJ, Kopittke RA, Menzies NW, 2007.** Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) *Environmental Pollution.* 150 : 280-287.
- Kosobrukhov A, Knyazeva I, Mudrik V, 2004.** *Plantago major* plants responses to increase content of lead in soil: growth and photosynthesis. *Plant Grow Regul.* 42:145-151.
- Kramer U, Cotter-Howells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC, 1996.** Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 373, 635-638.
- Ksiazek M, Wozny A, Mlodzianowski F, 1984.** Effect of Pb(NO₃)₂ on poplar tissue culture and the ultrastructural localization of lead in culture cells. *For. Ecol. Manag.* 8 : 95-105.
- Ladigues PV, 1975.** Some aspects of tissue water relations in three populations of *Eucalyptus viminalis* Labill. *New Phytology*, 69, 501-513.
- Lamoreaux RJ, Chaney WR, 1978.** The effect of cadmium on net photosynthesis, transpiration and dark respiration of excised silver maple leaves. *Physiol. Plant.* 43:231-236.
- Lane SD, Martin ES, 1977.** A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*. *New Phytol.* 79:281-286.
- Lecomte P, 1998.** Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines. TEC & DOC, Lavoisier, Paris.
- Lee KC, Cunningham BA, Poulsen GM, Liang JM, Moore RB, 1976.** Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. *Physiol. Plant.* 36:4-6.
- Lee S-Z, Chang L, Yang H-H, Chen C-M, Liu M-C, 1998.** Absorption characteristics of lead onto soils. *J. Haz. Mat.* 63:37-49.
- Levina EN, 1972.** Obshchaya tosikologiya metallov (General metal toxicology). Leningrad, Meditsyna.
- Lichtenthaler HK, 1987.** Chlorophyll and carotenoid pigments of photosynthetic biomembranes: *Methods in enzymology*, vol.148.
- Lozano R, Azcon R, Palma JM, 1996.** SOD and drought stress in *Lactuca sativa*. *New Phytol.* 136:329-331.
- Ma JF, Zheng SJ, Hiradate S, Matsumoto H, 1997.** Detoxifying aluminium with buckwheat. *Nature* 390, 569-570.
- Malkowski E, Kita A, Galas W, Karcz W, Kuperberg JM, 2002.** Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. *Plant Growth Regulation.* 37 : 69-76.

- Markert B, 1994. Plants as biomonitors – potential advantages and problems. In: Adriano DC, Chen ZS, Yang SS Ed Biogeochemistry of trace elements. Science and Technology Letters, Northwood, NY, pp 601-613.
- Marschner H, 1995. Mineral nutrition of higher plants, 2nd edn. London: Academic Press. In Hall JL, 2001 Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany 53, 1-11.
- Marschner P, Godbold DL, Jutschke G, 1996. Dynamics of lead accumulation in mycorrhizal and non-mycorrhizal Norway spruce (*Picea abies* (L.) karst.). Plant Soil 178:239-245.
- McGrath SP, 1998. Phytoextraction for Soil Remediation. In: Brooks, R.R. (Ed.). Plants that hyperaccumulate heavy metals. CABI Publishing, Wallingford, 261-287.
- McLaughlin MJ, Zarcinas BA, Stevens DP, Cook N, 2000. Soil testing for heavy metals. Communications in Soil Science and Plant Analysis 31 (11-14), 1661-1700.
- Meharg AA, 1993. The role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. Physiologia Plantarum 88, 191-198.
- Mehta SK, Gaur JP, 1999. Heavy metal induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. New Phytol. 143 : 253-259.
- Melquiot Pierre, 2003 : 1.001 Mots et abréviations de l'environnement et du développement durable Edition RECYCONSULT
- Meyers Donald ER, Graeme J, Auchterlonie Richard I, Webb, Barry wood, 2008. Uptake and localization of lead in the root system of *Brassica juncea*. Environmental Pollution. 153 : 323-332.
- Michalak E, Wierzbicka M, 1998. Differences in lead tolerance between *Allium cepa* plants developing from seeds and bulbs. Plant Soil 199:251-260.
- Mihoub A, Chaoui A, El Ferjani E 2004. Changements biochimiques induits par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois (*Pisum sativum* L.). C.R Biologies 328 : 33-41.
- Miles CD, Brandle JR, Daniel DJ, Chu-Der O, Schnare PD, Uhlik DJ, 1972. Inhibition of PS II in isolated chloroplasts by lead. Plant Physiol. 49:820-825.
- Miller RJ, Biuell JE, Koeppe DE, 1973. The effect of cadmium on electron and energy transfer reactions in corn mitochondria. Physiol. Plant. 28.166-171.
- Miller RJ, Koeppe DE, 1971. Accumulation and physiological effects of lead in corn. In: Proceedings of University of Missouri, Columbia 4, pp.186-193.
- Mishra A, Choudhari MA, 1998. Amelioration of lead and mercury effects on germination and rice seedling growth by antioxidants. Biol. Plant. 41:469-473.
- Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Kumar R, Seth CS, Gupta DK, 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. Chemosphere, 65: 1027-1039.
- Misra S, Gedamu L, 1989. Heavy metal tolerant transgenic *Brassica napus* and *Nicotiana tabacum* plants. Theoretical and Applied Genetics 78, 161-168.

- Monneveux D, 1997. La génétique face aux problèmes de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse : espoirs et difficultés. *Revue sécheresse*, 8, 29-37.
- Morel JL, Mench M, Guckert A, 1986. A measurement of Pb, Cu, Cd binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots. *Biol. Fertil. Soils* 2:29-34.
- Murphy A, Taiz L, 1995. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance. *Plant Physiology* 109, 945-954.
- Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Sanada Y, Wada K, Tsukaya H, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, 1999. Biological functions of proline in morphogenesis and osmotolerance revealed in antisense transgenic *Arabidopsis thaliana* L. *The Plant Journal*, 18, 185-193.
- Negri MC, Hinchman RR, 2000. The use of plants for the treatment of radionuclides. In *Phytoremediation of Toxic Metals*. I Raskin and B Ensley (Eds). John Wiley and Sons. New York, 107-132 (2000).
- Neumann D, Lichtenberger O, Gunther D, Tschiersch K, Nover L, 1994. Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta* 194, 360-367.
- Noctor G & Foyer, Ch H, 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- Öncel I, Kele Y, Üstün AS, 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings, *Environ. Pollut.* 107: 315-320.
- Paivoke AEA, 2002. Soil lead alters phytase activity and mineral nutrient balance of *Pisum sativum*. *Environ. Exp. Bot.* 48:61-73.
- Paleg LG, Stewart GR, Bradbeer JW, 1984. Proline and glycine betaine influence on protein solvation. *Plant Physiol.* 75:974-978.
- Parys E, Romanowaska E, Siedlecka M, Poskuta J, 1998. The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiol. Plant.* 20:313-322.
- Peterson PJ, 1969. The distribution of zinc-65 in *Agrostis tenuis* Sibth. and *A. stolonifera* L. tissues, *J. Exp. Bot.*, 20, 863.
- Prasad DDK, Prasad ARK, 1987. Altered δ -aminolevulinic acid metabolism by lead and mercury in germinating seedlings of Barjra (*Pennisetum typhoideum*). *J. Plant Physiol.* 127: 241-249.
- Prasad MNV, Hagemeyer J, 1999. Heavy metal stress in plants. From molecules to ecosystems. Springer. 401p.
- Prasad MNV, Strzatka K, 2002. Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance on plants. Kluwer Academic Publishers.
- Przymusinski R, Rucinska R, Gwozdz EA, 1995. The stress stimulated 16 Kda polypeptide from Lupin roots has properties of cytosolic Cu: Zn-superoxide dismutase. *Environ. Exp. Bot.* 35:485-495.
- Przymusinski R, Sychala M, Gwozdz EA, 1991. Inorganic lead changes growth polypeptide pattern of Lupin roots. *Biochem. Physiol. Pflanz.* 187:51-57.

- Raskin Iliia & Burt D Ensley, 2000. Phytoremediation of Toxic Metals : Using Plants to Clean Up the Environment.
- Rebechini HM, Hanzely L, 1974. Lead-induced ultrastructural changes in chloroplasts of the hydrophyte *Ceratophyllum demersum*. Z. Pflanzenphysiol. 73:377-386.
- Reese RN, Roberts LW, 1985. Effects of cadmium on whole cell and mitochondrial respiration in tobacco cell suspension cultures (*Nicotiana tabacum* L. var. xanthi). J. Plant Physiol.120:123-130.
- Reichl FX, Benecke J, Perraud R, Krahe E, 2004. Guide pratique de toxicology. Edition De Boeck.
- Reilley KA, Banks MK, and Schwab AP, 1996. Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. Journal of Environmental Quality, 25 : 212-219.
- Rengel Z, 1999. Heavy Metals as Essential Nutrients. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, pp. 231-251.
- Roderer G, 1986. On the toxic effects of tetraethyl lead and its derivatives on chrysophyte *Poterioochromonas malhamensis*. Environ. Res. 39 : 205-231.
- Romanovska E, Igamberdiev AU, Parys E, Gardeström P, 2002. Stimulation of respiration by Pb in detached leaves and mitochondria of C₃ and C₄ plants. Physiol. Plant.166:148-154.
- Rovira AD, 1969. Plant root exudates, *Bot. Rev.*, 35, 35.
- Samardakiewicz S, Wozny A, 2000. The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. Plant Soil 226:107-111.
- Samardakiewicz S, Wozny A, 2005. Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. Aquatic Botany. 83 : 289-295.
- Sanita Di Toppi L, Gabbrielli R, 1999. Response to cadmium in higher plants. Environmental and Experimental Botany 41, 105-130.
- Seregin IV, Ivanov VB, 1997. Histichimical investigation of cadmium and lead distribution in plants. Russian Journal of Plant Physiology. 44 : 791-796.
- Seregin IV, Ivanov VB, 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. Russ. J. Plant Physiol. 48:606-630.
- Seregin IV, Shpigun LK, Ivaniov VB, 2004. Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. Russ. J. Plant Physiol. 51:525-533.
- Shankat SS, Mushtaq M and Siddiki ZS, 1999. Effect of cadmium, chromium and lead on seed germination, early seedling growth and phenolic contents of *Perkinsonia aculata* L. and *Pennisetum americanum* L. Schumann Pak Journal of Biol Sci. 2 : 1307-1313.
- Sharma P, Dubey RS, 2004. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of chloroplasts. Photosynthetica 35:551-559.
- Sharma P, Dubey RS, 2005. Lead toxicity in plants Department of Biochemistry, Faculty of Science, Banaras Hindu University Varanasi-221005, India Braz. J. Plant Physiol. vol.17. 35-52.

- Shuster and Gifford, 1967. GAB en change synthesis and release of amylase and ribonuclease barley aleurone layers. *Plant physiol.*, 42, 398-406.
- Silverberg BA, 1975. Ultrastructural localization of lead in *Stigeoclonium tenue* (*Chlorophyceae Ulotrichales*) as demonstrated by cytochemical and X-ray microanalysis. *Phycologia* 14:265-274.
- Stefanov K, Popova I, Kamburova E, Pancheva T, Kimenov G, Kuleva L, Popov S, 1993. Lipid and sterol changes in *Zea mays* caused by lead ions. *Phytochemistry* 33:47-51.
- Stefanov K, Seizova K, Popova I, Petkov VL, Kimenov G, Popov S, 1995. Effects of lead ions on the phospholipid composition in leaves of *Zea mays* and *Phaseolus vulgaris*. *J. Plant Physiol.* 147:243-246.
- Stiborova M, Ditrichova M, Brezinova A, 1987. Effects of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley and maize seedlings. *Biol. Plant.*, 29: 453-467.
- Stiborova M, Doubravova M, Brezinova A, Friedrich A, 1986. Effects of heavy metal ions on growth and biochemical characteristics of photosynthesis of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Phytosynthetica*, 20: 418-425.
- Subhashini K, Reddy GM, 1990. Effect of salt stress on enzyme activities in callus cultures of tolerant and susceptible rice cultivars. *Ind J Exp Biol.* 28 : 277-279.
- Suchodoller A, 1967. Untersuchungen über den Bleigehalt von Pflanzen in der Nähe von Strassen und über die Aufnahme und Translokation von Blei durch Pflanzen. *Berichteder Schweizerischen Botanischen Gesellschaft* 77:266-308.
- Tomsig JL, Suszkiw JB, 1991. Permeation of Pb^{2+} through calcium channels : fura-2 measurements of voltage and dihydropyridine-sensitive Pb^{2+} entry in isolated bovine chromaffin cells. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1069 : 197-200.
- Troll W, Lindsley L. 1955. A photometric method for the determination of proline. *Journal of biology and Chemistry*, 215, 655-660.
- US Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1993 (1600 Clifton Rd., E-29, Atlanta, Georgia 30333, Etats-Unis d'Amérique).
- Van Assche F, Clijsters H, 1990. Effects of metal on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.* 13:195-206.
- Vancura V, Hovavadik A, 1965. Root exudates of plants II. Composition of root exudates of some vegetables, *Plant Soil*, 22, 21.
- Verma S, Dubey RS, 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.* 164:645-655.
- Vodnik D, Jentschke G, Fritz E, Gogala N, Godbold DL, 1999. Root-applied cytokinin reduces lead uptake and affects its distribution in Norway spruce seedlings. *Physiol. Plant.* 106:75-81.
- Walker WM, Miller JE, Hassett JJ, 1977. Effect of lead and cadmium upon the calcium, magnesium, potassium and phosphorus concentration in young corn plants. *Soil Sci.* 124 : 145-151.

- Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthlin J, 1995. Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy-metal uptake by maize (*Zea mays* L.) in pot culture with contaminated soil. *Mycorrhiza* 5, 245-251.
- Wierzbicka M, 1987. Lead accumulation and its translocation in roots of *Allium cepa* L. - autoradiographic and ultrastructural studies. *Plant Cell Environ.* 10:17-26.
- Wierzbicka M, 1994. Resumption of mitotic activity in *allium cepa* root tips during treatment with lead salts. *Environ. Exp. Bot.* 34:173-180.
- Wierzbicka M, Antosiewicz D, 1993. How lead can easily enter the food chain - a study of plant roots. *Sci. Total Environ. Suppl.* 1:423-429.
- Wierzbicka MS, Obidzinska J, 1998. The effect of lead on seed imbibitions and germination in different plant species. *Plant Science*, 137: 155-171(17).
- Wissemeier AH, Horst WJ, 1992. Effect of light intensity on manganese toxicity symptoms and callose formation in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Plant Soil.* 143 : 299-309.
- Yang Y-Y, Jung J-Y, Song W-Y, Suh HS, Lee Y, 2000. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant Physiol.* 124:1019-1026.

Annexes

ANNEXES

Réactifs et solutions utilisés :

1. Réactif iodo-ioduré : 6 gr d'iodure de potassium (KI) et 600 mg d'iode (I_2) sont dissous dans 100 mL d'eau distillée. A 1 mL de cette solution sont ajoutés 99 mL d'acide chloridrique à 0.05 N. Le réactif ainsi préparé est de couleur jaune.

2. Solution d'amidon : 1gr d'amidon est mis en suspension dans 20 mL d'eau distillée froide. Le phosphate de potassium (KH_2PO_4 , 600mg) et chlorure de calcium ($CaCl_2$, 2.94 mg) sont dissouts dans 80 mL d'eau distillée bouillante. La suspension d'amidon est versée goutte à goutte sur la solution bouillante en laissant bouillir quelques minutes. Après refroidissement la solution est prête à l'emploi. Lors de l'utilisation cette solution est diluée dix fois.

3. Solution tampon tris-citrate : 10mM d'acide citrique sont dilués dans 100 mL d'eau distillée et 10.65 mM de citrate de sodium dilué dans 100mL d'eau distillée. A 4.2 mL d'acide citrique, on ajoute 15.8mL de citrate de sodium ; 20 mL de tampon sont obtenus. Le pH est ajusté à 5.6.

Summary

Seedlings of *Pisum sativum* L. are subjected to a stress by lead nitrate ($Pb(NO_3)_2$). Lead is a heavy metal non-biodegradable by living organisms. The lead nitrate causes a deceleration and a reduction of the percentage of germination of pea seeds. The lead ion accumulates in seeds and causes an ionic stress thus causing a reduction of the amylase activity, key enzyme of germination. At a high concentration of lead nitrate (50mM), germination is completely inhibited.

Seedlings of *Pisum sativum* L. are also affected by the presence of lead nitrate. It strongly reduces the growth of the seedlings by inhibiting the formation of the secondary roots and by reducing to certain concentrations the elongation of the shoot and the root part.

In addition, lead ions accumulate in seedlings treated particularly at the roots and causes a reduction of fresh weight and dry weight. They lead to a decrease in water content of leaves (TRE), which has resulted in an increase of proline content. They thus induce a physiological hydrous stress. An increase in chlorophyllian pigments is also observed.

The stress by lead nitrate as well causes symptoms of toxicity on the level of germination as on the level of the growth of the seedlings.

Keys words: Lead nitrate $Pb(NO_3)_2$, *Pisum sativum* L. germination, growth, TRE, physiological hydrous stress.

الموجز

نباتات *Pisum sativum* L. تخضع لإجهاد ببنترات الرصاص. الرصاص معدن ثقيل غير قابل للتحلل الحيوي عن طريق الكائنات الحية.

يؤدي نترات الرصاص إلى تباطؤ و انخفاض في النسبة المئوية للإنبات لبذور البازلاء. أيونات الرصاص تتراكم في البذور ما يسبب الضغط الأيوني الذي يؤدي لانخفاض في نشاط amylase, الأنزيم الرئيسية للإنبات. تحت تأثير التركيزات العالية من نترات الرصاص (50mM) يحدث إعاقة تامة للإنبات.

نباتات *Pisum sativum* L. تتأثر أيضا بوجود نترات الرصاص. هذا الأخير يؤدي إلى انخفاض كثير لنمو الشتلات عن طريق إعاقة تكوين الجذور الثانوية و تخفيض إطالة الجزء الجوي و الجزء الجذري تحت تأثير بعض التركيزات.

بلاضافة إلى ذلك يؤدي تراكم الأيونات في الشتلات بالخصوص في الجذور إلى تخفيض الوزن الرطب و الوزن الجاف. يؤدي أيضا إلى انخفاض في كمية المياه للأوراق (TRE), مما يؤدي إلى زيادة في محتوى البرولين. هذا يسبب إذا ضغط جفاف فيزيولوجي. يلاحظ زيادة في صباغ الكلوروفيل.

الضغط ببنترات الرصاص يؤدي إلى أعراض سمية في كل من النمو و الإنبات للشتلات.

الكلمات الرئيسية : نترات الرصاص $Pb(NO_3)_2$, *Pisum sativum* L., الإنبات, النمو, (TRE), ضغط جفاف فيزيولوجي.