

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

THESE DE DOCTORAT

En sciences Agronomiques

Laboratoire des biotechnologies

**ETUDE DE LA VARIABILITE GENETIQUE DE LA TOLERANCE
DE L'*ATRIPLEX HALIMUS* L. AUX METAUX PLOMB, ZINC ET
CADMIUM, ET SELECTION *IN VITRO* DE SOUCHES PHYTO-
ACCUMULATRICES POUR LA PHYTOREMEDIATION**

Par

Lalia FATARNA

Devant le jury composé de :

BEN MOUSSA Mebrouk	Professeur, U. de Blida	Président
BOUTEKRABT Ammar	Professeur, U. de Blida	Directeur de thèse
EL HADI Djamel	Professeur, U. de Blida	Examineur
NOURI L'hadi	Professeur, U. de Boumerdès	Examineur
ABDELKRIM Hassen	Professeur, ENSA, Alger	Examineur
MEFTI	Maitre de conférences, ENSA, Alger	Examineur

Blida, 2019



Toutes les usines du monde sont nuisibles
par leurs bruits...
Les végétaux sont de véritables usines ;
surement plus nombreuses, et souvent plus
durables, mais œuvrant en silence
Imaginant si les plantes chuchotent...
Quel bruit !? Quel ennui !?

.....

Fatouma L.

ملخص

النمو الديموغرافي، الحضارة والتلوث عوامل في تزايد مستمر. التلوث بالمعادن الثقيلة هو الأكثر إشكالية بسبب نطاقه الواسع وعواقبه الخطيرة على التربة والمياه والغلاف الجوي ولاسيما سميتها الحيوية التي تؤثر على جميع الكائنات الحية؛ خاصة النباتات و الحيوانات و الإنسان. من منظور التنمية المستدامة، أصبحت المعالجة النباتية ضرورة مطلقة كتكنولوجيا خضراء للمعالجة وبالإضافة إلى ذلك، لمزيد من الفعالية والديمومة لهذه التكنولوجيا، هناك حاجة دائمة لاكتشاف نباتات مخزنة للمعادن بل نباتات نموذجية من الممكن استكشاف ودراستها ابتداء من النمط الظاهري إلى النمط الوراثي لفك رموز التأقلم وتخزين المعادن. القطف نباتا ينمو في المناطق الجافة المالحة وهو يتكيف بشكل جيد مع ظروف الجفاف. ويعد هذا النوع خيارا جيدا لإعادة تأهيل الأراضي الهامشية والمتدهورة. يهدف هذا البحث أساسا إلى دراسة إمكانات القطف في المعالجة النباتية للمعادن الكاديوم، الزنك والرصاص. الهدف الثاني هو شرح بعض آليات التحمل النباتي للتلوث المعدني أثناء الإنبات والنمو. يتضمن البحث اختبار تأثير المعادن على الإنبات والنمو، تقييم تخزين المعادن ومعدلات النقل الداخلي وأخيرا، لتحليل استراتيجيات التحمل، ولاسيما تنظيم الأوسموزي، أظهرت النتائج أن المعادن تقلل من معدلات إنبات البذور وفقا لتركيزاتها (تصل إلى 19% عند 10000 جزء من المليون)، وأن نمو الجذور أكثر حساسية للمعادن من الإنبات. تأثير الكاديوم المثبط للإنبات يظهر ميكرا مقارنة مع تأثير الزنك والرصاص. دراسة درجة الترابط بين نسبة الإنبات وتطاول الجذور وكذا الخلايا بينت بأن تثبيط الإنبات بوجود المعادن يحتمل أن يرجع إلى الحد من نمو الجنين وهكذا فإن الكاديوم والزنك يحدان من تطاول الخلايا البرانشيمية أما فيما يخص الرصاص فإنه يحد النمو عن طريق تأثيره على وتيرة الانقسام الخلوي للجذور. النتائج الناجمة عن الزراعة المائية بينت أن التراكيز العالية للمعادن تسبب قصور عام في نمو النبات دون أن يؤدي إلى هلاك النبات. ترتيب نسب تخزين المعادن كالتالي: (رصاص معدل: 11194.82 مغ.كغ⁻¹، زنك: 3984.29 مغ.كغ⁻¹، كاديوم: 3300.99 مغ.كغ⁻¹، رصاص: 313.39 مغ.كغ⁻¹). المعدلات النسبية للنقل الداخلي للمعادن: (رصاص معدل: 81.49 %، زنك: 51.51 %، كاديوم: 49.42 %، رصاص: 02.51 %). يمكن اعتبار نبات القطف كمخزن جيد للمعادن: الكاديوم والرصاص بعد التعديل. يمكن اعتبار طول الساق، الوزن الطازج للجزء الهوائي وتشكل العقد كشواهد عن تخزين المعادن الثلاث النظام الجذري للنبات. الزراعة في التربة المسقية ب 500 و 1000 و 1500 جزء بالمليون من المعادن لا تغير مستويات ترطيب الأنسجة الورقية ولا مستويات الكلوروفيل، ومع ذلك، ناقليهاثغور وانخفاض القدرة الأوسموزية بشكل ملحوظ. من خلال تراكم البرولين في جميع المعالجات المعدنية، ظهر الكالسيوم والبوتاسيوم بصورة مواد منظمة للقدرة الأوسموزي في المعالجات بالرصاص، وفي وجود الزنك، Ca^{+2} تراكمت أكثر في الجذور، ومعدن الكاديوم يؤدي إلى انخفاض كبير في امتصاص K^{+} و تراكم Ca^{+2} في الأوراق. ويظهر نبات القطف فعال في تثبيط الكاديوم والزنك على المستوى الجذري و تراكم الرصاص في الأوراق بواسطة معدل كيميائي. يتمتع هذا النوع النباتي بتوفر نظام إضافي لتراكم الرصاص على مستوى السيقان بمعدل 1894.9 ملغ. كغ⁻¹ في النمط البيئي مستغانم و 3295، 5 ملغ. كغ⁻¹ مس في النمط غليزان.

الكلمات المفتاحية: المعادن الثقيلة، المعالجة بالنباتات، نبات القطف، الإنبات، التحمل.

RESUME

Population, civilisation et pollution sont en croissance non cessante. La pollution par les métaux lourds est la plus problématique vue son large étendue et ses graves conséquences sur les compartiments sol, eau et atmosphère, et surtout sa bio toxicité affectant l'ensemble des êtres vivants ; faune, flore et humains. Dans une optique de développement durable, la phytoremédiation est devenue une urgence absolue comme technologie verte de dépollution. En outre, pour plus d'efficacité et de durabilité de cette technologie, il y'a toujours besoin de découvrir des plantes hyper accumulatrices, voire, des plantes modèles pouvant être explorées du phénotype au génotype pour déchiffrer les codes de la tolérance et de l'accumulation des métaux. *Atriplex halimus* est une xérohalophyte qui s'adapte bien aux conditions d'aridité, l'espèce constitue un matériel de choix pour la réhabilitation des terres marginales et dégradées. Cette recherche vise essentiellement l'étude des potentialités de l'*A. halimus* en phytoremédiation des métaux cadmium, zinc et plomb. Le second objectif est d'expliquer une part de la phyto-tolérance au stress métallique au cours de la germination et de la croissance végétative. La recherche consiste à tester l'impact des métaux sur la germination et la croissance, évaluer les taux d'accumulation et de translocation des métaux et en dernier, d'analyser les stratégies de tolérance notamment la physiologie et l'osmorégulation. Les résultats montrent que les métaux diminuent les taux de germination des graines et ce proportionnellement à leurs concentrations (jusqu'à 19 % à 10 000 ppm), et que la croissance racinaire est plus sensible aux métaux que la germination. L'effet inhibiteur du Cd sur la croissance est plus précoce comparé à ceux du Zn et du Pb. L'étude des corrélations entre les taux de germination et l'allongement des racines et des cellules racinaires a montré que l'inhibition de la germination suite aux traitements métalliques pourrait être due à une restriction de la croissance de l'axe embryonnaire, ainsi, le Cd et le Zn limiteraient la croissance en longueur des cellules parenchymateuses, tandis que le Pb diminuerait l'activité mitotique des cellules des racines. Les résultats issus de la culture hydroponique montrent que les fortes concentrations induisent une réduction générale de la croissance sans compromettre la vitalité des plants. L'ordre d'accumulation des métaux dans les pousses est comme suit : 11194,82 mg.Kg⁻¹ (Pb-C : plomb avec chélateur), 3984,29 mg.Kg⁻¹ (Zn), 3300,99 mg.Kg⁻¹ (Cd), 313,39 mg.Kg⁻¹ (Pb). Les taux moyens de translocation sont de l'ordre de : 81,49% (Pb-C), 51,51% (Zn), 49,42% (Cd) et 2,51% (Pb). *A. halimus* est avéré hyper accumulateur de cadmium et de plomb après chélation. Les

paramètres : hauteur des tiges, poids frais aérien, néoformation des nœuds pourront être utilisés comme marqueurs d'accumulation des trois métaux dans les compartiments aériens et souterrains des plants. La culture en pots à 500, 1000 et 1500 ppm de métaux n'altère pas les niveaux d'hydratation des tissus foliaires, ni les teneurs en pigments chlorophylliens, cependant la conductance stomatique et le potentiel osmotique baissent significativement. L'osmorégulation par accumulation de la proline est commune chez l'ensemble des traitements métalliques, le calcium et le potassium se comportent comme osmolytes minéraux dans les traitements plombiques, en présence du zinc, le Ca^{2+} est accumulé davantage dans les racines, et le cadmium induit une diminution significative de l'assimilation du K^+ et une accumulation du Ca^{2+} au niveau des feuilles. Dans ces conditions, l'*A. halimus* se montre efficace dans la rhizostabilisation du cadmium et du zinc et l'hyperaccumulation du plomb par chélation. Les tiges chez cette espèce fournissent un organe supplémentaire d'accumulation du plomb en enregistrant des taux moyens de 1894,9 mg. Kg^{-1} MS chez l'écotype MOS et de 3295,5 mg. Kg^{-1} MS chez REL.

Mots clés : Métaux lourds, Phytoremédiation, *Atriplex halimus*, Germination, tolérance.

ABSTRACT

Population, civilization and pollution are growing non-stop. Pollution by heavy metals is the most problematic because of its large extent and its serious consequences on compartments soil, water and atmosphere, and especially its bio toxicity affecting all living beings; in this case the fauna, the flora and the humans. From a sustainable development perspective, phytoremediation has become an absolute necessity as a green remediation technology. In addition, for more efficiency and durability of this technology, there is always a need to discover hyper accumulator plants, even; model plants can be explored from phenotype to genotype to decipher the codes of tolerance and accumulation of metals. *Atriplex halimus* is a xero-halophyte that adapts well to aridity conditions. The species is a material of choice for the rehabilitation of marginal and degraded lands. This research aims essentially at studying the potentialities of *A. halimus* in phytoremediation of cadmium, zinc and lead metals. The second objective is to explain some of the phyto-tolerance to metallic stress during germination and growth. The research consists of testing the impact of metals on germination and growth, evaluating the accumulation and translocation rates of metals and, lastly, analyzing tolerance strategies, in particular osmo regulation. The results show that metals decrease seed germination rates in proportion to their concentrations (up to 19% at 10,000 ppm), and that root growth is more sensitive to metals than germination. The inhibitory effect of Cd on growth is earlier compared to those of Zn and Pb. Correlations studying between germination rates and the lengthening of roots and root cells has shown that the inhibition of germination following metal treatments could be due to a restriction of the embryonic axis growth, thus, Cd and Zn would limit the length growth of parenchymal cells, whereas Pb would reduce the mitotic activity of root cells. Results from the hydroponic culture show that high metal concentrations induce a general reduction of the growth without compromising the vitality of the plants. The accumulation order of metals in the shoots is as follows: 11194.82 mg.Kg⁻¹ (Pb-C: lead with chelator), 3984.29 mg.Kg⁻¹ (Zn), 3300.99 mg.Kg⁻¹ (Cd), 313.39 mg.Kg⁻¹ (Pb). The average translocation levels are of the order of: 81.49% (Pb-C), 51.51% (Zn), 49.42% (Cd), and 2.51% (Pb). *A. halimus* proved to be a hyper accumulator of cadmium and lead following chelation. The parameters: stems height, aerial weight, nodes neoformation can be used as markers of accumulation of the three metals in the aerial and underground compartments of the plants. Potted culture at 500, 1000, and 1500 ppm metals does not alter leaf tissue hydration levels or chlorophyll pigment levels, however, stomatal conductance and

osmotic potential decrease significantly. Osmoregulation by proline accumulation is common in all metal treatments, calcium and potassium behave as mineral osmolytes in lead treatments, in the presence of zinc, Ca^{2+} is accumulated further in the roots, and cadmium induces a significant decrease in K^+ uptake and Ca^{2+} accumulation at the leaf level. Under these conditions, the *A. halimus* is effective in the rhizostabilization of cadmium and zinc and the hyperaccumulation of lead by chelation. Stems in this species provide an additional organ of lead accumulation with mean rates of 1894.9 mg. Kg^{-1} MS in MOS and 3295.5 mg. Kg^{-1} MS in REL ecotype.

Key words: Heavy metals, Phytoremediation, *Atriplex halimus*, Germination, Tolerance.



REMERCIEMENTS

Avant tout, je remercie **ALLAH** ; le bon dieu le tout puissant, de m'avoir mis sur les rails du savoir, et de m'avoir accordé volonté, courage et patience pour mener à terme cette thèse.

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans la collaboration de plusieurs personnes qui trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance :

J'exprime ma gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur BOUTEKRABT Ammar ; professeur à l'université de Blida, pour l'intérêt qu'il a accordé à mon travail, pour ses précieux conseils, et son encadrement efficace tout au long de ces années de recherche.

Je remercie très chaleureusement les membres du jury d'avoir accepté d'examiner mon travail, et de l'enrichir par leurs évaluations :

Monsieur BEN MOUSSA Mebrouk; professeur à l'université de Blida, pour l'honneur qu'il m'a fait d'avoir accepté la présidence du jury. Qu'il soit assuré de ma respectueuse considération.

Monsieur EL HADI Djamel ; professeur à l'université de Blida, Monsieur NOURI L'hadi ; professeur à l'université de Boumerdès, Monsieur ABDELKRIM Hassen ; professeur à l'ENSA EL-Harrach et Monsieur MEFTI Mohamed ; Maître de conférence (A) à l'ENSA EL-Harrach, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en contribuant à l'examen de mon travail. Qu'ils soient assurés de mes sincères salutations.

Je ne sais combien et comment remercier Monsieur ADDA Ahmed ; professeur à l'université de Tiaret, pour sa générosité scientifique ; de m'avoir accueilli dans son laboratoire (LABNSA), pour sa rigueur scientifique, nos échanges au cours de cette thèse, mais aussi pour l'hommage qu'il m'a fait en participant à la correction de notre article.

Un grand merci à CHAOUIA Cherifa, Maître de conférences à l'université de Blida, pour son efficacité et ses qualités humaines et professionnelles. J'ai apprécié son enthousiasme et sa sympathie.

.....
Merci



Je profite de cette opportunité pour remercier le personnel du laboratoire (LABNSA) pour la disponibilité et l'aide. De même, je voudrais remercier le personnel du laboratoire écologie à l'université de Tiaret pour la réalisation des dosages du plomb et du zinc.

Mes remerciements s'adressent également au professeur AOUABED et Monsieur AZZI H. pour la réalisation du dosage du cadmium à l'université de Blida, et au professeur BELKHODJA M. pour la réalisation des mesures de potentiels osmotiques dans son laboratoire d'écophysiologie végétale à l'université Senia d'Oran.

J'exprime ma gratitude au Professeur BELABID L. ; doyen de la faculté SNV de l'université de Mascara, pour ses arrangements et orientations, et d'avoir cru en moi et mettre sous ma disposition tous les moyens techniques.

J'adresse toute ma gratitude au professeur HAMIMED A. ; directeur du laboratoire LRSBG à l'université de Mascara, pour son aide morale et matérielle, et pour ses encouragements constants.

Je voudrais remercier mes collègues : Madame FETATI A. et Monsieur ABBACHE A. pour la réalisation de la carte géographique, ainsi que Monsieur KADOUS M. pour ses aides et orientations, qu'ils trouvent ici toute ma gratitude.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Madame BOUABDALLAH L. ; professeur à l'université Sania d'Oran, pour l'intérêt qu'elle a porté à mes recherches, et pour ses fructueux débats et conseils.

Je voudrais remercier très chaleureusement tous les membres de ma famille et qui m'ont toujours soutenu et encouragé pour atteindre mes ambitions. Mes remerciements s'adressent également à mes amies et mes collègues, qui trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

Enfin je réserve ma gratitude et ma sympathie à ceux qui m'ont accordé du temps et m'ont témoigné un soutien durant ce long parcours.

Fatarna L.

Merci

TABLE DES MATIERES

RESUME	01
REMERCIEMENTS	06
TABLE DES MATIERES	08
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	10
INTRODUCTION	16
PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	22
I. 1. CONTEXTE GENERAL ET PROBLEMATIQUE DE LA THESE	23
I. 1. 1. Contexte général	24
I. 1. 2. Problématique	25
I. 1. 3. Pollution métallique et toxicologie	26
I. 1. 4. Présentation de l'espèce <i>Atriplex halimus</i>	28
I. 2. LA PHYTOREMEDIATION : STRATEGIES ET PERSPECTIVES	38
I. 2.1. La biodépollution	39
I. 2. 2. Notions de phytoremédiation	40
I. 3. PHYTOTOXICITE, HOMEOSTASIE ET TOLERANCE AUX METAUX	50
I. 3. 1. Phytodisponibilité des métaux lourds	51
I. 3. 2. Homéostasie des métaux lourds: Entrée, dynamique et spéciation	55
I. 3. 3. Phytotoxicité des éléments métalliques	59
I. 3. 4. Tolérance aux métaux	64
I. 3. 4. 1. Tolérance au cours de la germination	64
I. 3. 4. 2. Tolérance au cours de la croissance	65
PARTIE II : APPROCHE EXPERIMENTALE	71
II. A. Matériel végétal	72
II. B. Protocoles expérimentaux	74
II. 1. Impact du cadmium, du zinc et du plomb sur la germination des graines <i>d'Atriplex halimus</i> L.	75
II. 2. La longueur cellulaire de la radicule peut-elle expliquer le taux de germination sous stress métallique ? « <i>Effets du cadmium, du zinc et du plomb sur la germination des graines et la croissance des radicules d'Atriplex halimus</i> L. »	90
II. 3. Impact de l'accumulation des métaux cadmium, zinc et plomb sur la croissance de l' <i>Atriplex halimus</i> L. (Amaranthaceae), en conduite hydroponique.	105

II. 4. Tolérance de l' <i>Atriplex halimus</i> aux métaux lourds : réponses physiologiques et osmorégulation.	121
DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	151
CONCLUSION GENERALE	159
REFERNCES	162
APPENDICE	198

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure I. 1.1. Nappes d' <i>Atriplex halimus</i> poussant au littoral	30
Figure I. 1. 2. Plants d' <i>Atriplex halimus</i> poussant sous serre	30
Figure I. 1. 3. Branches d' <i>Atriplex halimus</i>	30
Figure I. 1. 4. Schéma des principales structures florales d' <i>Atriplex halimus</i>	33
Figure I. 1. 5. Bractéoles des fleurs femelles d' <i>Atriplex halimus</i>	33
Figure I. 1. 6. Rameau florifère d' <i>Atriplex halimus</i>	33
Figure I. 1. 7. Tristylie et polymorphisme pollinique au sein d'un même individu d' <i>A. halimus</i> observé au MEB	34
Figure I. 1. 8. Morphologies florales chez <i>Atriplex halimus</i>	34
Figure I. 2. 1. Principe et stratégies de la phytoremédiation	45
Figure I. 3. 1. Absorption foliaire des métaux lourds	56
Figure I. 3. 2. Schématisation de la balance entre les ROS et les antioxydants	68
Figure II. Situation géographique des zones de prélèvement des graines d' <i>A. halimus</i> L.	73
Figure II. 1. 1. Dispositif expérimental du test de germination N°1.	78
Figure II. 1. 2. Cinétique d'absorption d'eau par les graines d' <i>A. halimus</i> au cours de leur germination en présence des métaux Cd, Zn et Pb.	81
Figure II. 1. 3. Effets des métaux Cd, Zn et Pb sur la cinétique d'imbibition des graines de deux écotypes d' <i>A. halimus</i> au cours de leur germination.	82
Figure II. 1. 4. Effets des concentrations des métaux Cd, Zn et Pb sur le taux de germination des graines de deux écotypes d' <i>A. halimus</i> .	83
Figure II. 1. 5. Effets des traitements métalliques sur le taux de germination des graines de deux écotypes d' <i>A. halimus</i> .	83
Figure II. 1. 6. Effets des métaux Cd, Zn et Pb sur la cinétique d'élongation des racines de deux écotypes d' <i>A. halimus</i> .	84
Figure II. 2. 1. Effets des métaux lourds sur l'indice de vigueur des plantules. Le SVI est mesuré sur deux écotypes d' <i>A. halimus</i> L. MOS et REL.	97
Figure II. 2. 2. Effets des fortes concentrations de métaux lourds sur le pourcentage de germination.	97

- Figure II. 2. 3. Effets des métaux lourds sur la longueur de la radicule. 97
- Figure II. 2. 4. Effets des faibles concentrations de métaux lourds sur le pourcentage de germination. 97
- Figure II. 3. 1. Dispositif expérimental de l'essai sous serre (culture hydroponique). 109
- Figure II. 3. 2. Effets des traitements métalliques Cd, Zn, Pb et Pb-C sur les variations relatives de la croissance des parties aériennes et souterraines de deux écotypes d'*A. halimus* L (MOS et REL) cultivés en hydroponie. 112
- Figure II. 3. 3. Taux de translocation des métaux Cd, Zn et Pb chez *A. halimus*. L cultivée en hydroponie (Pb-C: Pb avec chélateur). 114
- Figure II. 4. 1. Dispositif expérimental de l'essai sous serre (culture en pots). 125
- Figure II. 4. 2. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur relative en eau de deux écotypes d'*A. halimus* (MOS et REL). Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon l'interaction 'Métal-Concentration'. 130
- Figure II. 4. 3. Effets des traitements métalliques sur les variations du potentiel osmotique de deux écotypes d'*A. halimus* (MOS et REL). Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon l'interaction 'Métal-Concentration' et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. 130
- Figure II. 4. 4. Effets des traitements métalliques sur les variations de la conductance stomatique de deux écotypes d'*A. halimus* (MOS et REL). Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur 'Concentration' et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. 130
- Figure II. 4. 5. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur en chlorophylle des feuilles de deux écotypes d'*A. halimus* (MOS et REL). Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls (au seuil 0,05) selon le facteur 'Ecotype'. 130
- Figure II. 4. 6. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur en proline de deux écotypes d'*A. halimus* (MOS et REL). Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls (au seuil 0,05) selon le facteur 'Concentration'. 131
- Figure II. 4. 7. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur en sucres solubles de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur '. 131
- Figure II. 4. 8. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des feuilles, tiges et racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls (au seuil 0,05) selon le facteur 'Concentration'. 134
- Figure II. 4. 9. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des feuilles de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le

- test de Newman-Keuls (au seuil 0,05) selon l'interaction 'Métal-Concentration'. 134
- Figure II. 4. 10. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des tiges de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur 'Métal-Concentration'. 134
- Figure II. 4. 11. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur 'Métal-Concentration'. 134
- Figure II. 4. 12. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur potassium des feuilles, tiges et racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls (au seuil 0,05) selon le facteur 'Concentration'. 136
- Figure II. 4. 13. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keulselon le facteur 'Métal-Concentration'. 136
- Figure II. 4. 14. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur 'Ecotype-Concentration'. 136
- Figure II. 4. 15. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur 'Métal-Concentration'. 136
- Figure II. 4. 16. Teneurs en cadmium des feuilles de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration ». 138
- Figure II. 4. 17. Teneurs en cadmium des racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur 'Ecotype-Concentration'. 138
- Figure II. 4. 18. Teneurs en zinc des feuilles de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur 'Ecotype-Concentration'. 139
- Figure II. 4. 19. Teneurs en zinc des racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration ». 139
- Figure II. 4. 20. Teneurs en plomb des feuilles de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration ». 139
- Figure II. 4. 21. Teneurs en plomb des racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration ». 139

Figure II. 2. Schéma des procédures de développement <i>in vitro</i> de plants résistants aux ETM	158
---	-----

TABLEAUX

Tableau I. 1. 1. Caractéristiques conférant l'adaptation ou la tolérance à l'A. <i>halimus</i> dans les environnements extrêmes	32
Tableau I. 2. 1. Avantages et limites de la phytoremédiation	48
Tableau I. 3. 1. Localisation et mobilité des métaux dans le sol	54
Tableau II. 1. 1. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des taux d'imbibition et taux de germination de deux écotypes d'A. <i>halimus</i> .	80
Tableau II. 1. 2. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des longueurs radiculaires de deux écotypes d'A. <i>halimus</i> L.	80
Tableau II. 2. 1. Effets des variables 'Ecotype', 'Métal', 'Concentration' et leurs interactions sur les variations des indices de vigueur des plantules (SVI), des pourcentages de germination (G%), et des longueurs des racines d'A. <i>halimus</i> L. Les variations sont étudiées chez deux écotypes MOS et REL à fortes concentrations (Jusqu'à 20 000 ppm) de métaux.	95
Tableau II. 2. 2. Effets des variables 'Ecotype', 'Métal', 'Concentration' et leurs interactions sur les variations des pourcentages de germination (G%), et des longueurs des cellules radiculaires d'A. <i>halimus</i> L. Les variations sont étudiées chez deux écotypes MOS et REL à faibles concentrations (0, 500 et 1000 ppm) de métaux.	96
Tableau II. 2. 3. Effets des métaux lourds sur les longueurs des cellules parenchymateuses des racines de deux écotypes d'A. <i>halimus</i> MOS et REL.	96
Tableau II. 3. 1. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des taux relatifs de croissance.	110
Tableau II. 3. 2. Effets des variables 'écotype', 'métal', 'concentration' et leurs interactions sur les variations des taux d'accumulation.	113
Tableau II. 3. 3. Accumulation des éléments traces métalliques (Cd, Zn et Pb) dans les parties aériennes et souterraines de deux écotypes d'A. <i>halimus</i> L. (MOS et REL) cultivés en hydroponie.	114
Tableau II. 3. 4. Coefficients de corrélation (r) entre les paramètres morphométriques et les taux d'éléments traces métalliques Cd, Zn et Pb	

accumulés dans les compartiments aériens et souterrains de deux écotypes d' <i>A. halimus</i> (MOS et REL) Cultivés en hydroponie.	120
Tableau II. 4. 1. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des paramètres physiologiques et biochimiques de l' <i>A. halimus</i> L.	128
Tableau II. 4. 2. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des teneurs en cations calcium et potassium de l' <i>A. halimus</i> L.	132
Tableau II. 4. 3. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des taux d'accumulation des métaux cadmium, zinc et plomb dans les compartiments feuilles, tiges et racine de l' <i>A. halimus</i> L.	137



Introduction

INTRODUCTION

Population, technologies et pollutions sont conjointement en continuelle croissance, les diverses productions, souvent intensives, les matériaux et procédés mis en œuvre ont contribué à l'imprégnation des sols et des eaux avec de grandes quantités de métaux lourds.

La contamination des sols par les métaux lourds résulte principalement d'activités anthropogéniques et de sources naturelles tels que les matériaux d'origine issus de l'effritement des roches mères et l'éruption volcanique, etc. [1]. Les activités anthropogéniques polluantes par les métaux [2];[3] sont principalement liées aux procédés miniers et métallurgiques ; combustion de combustibles fossiles, extraction et fusion de minerais métallifères [4], et des matériaux tels les batteries d'accumulateurs, les conduites d'eau en plastique, les circuits imprimés, la galvanoplastie, la peinture [5], les déchets municipaux [6];[4], et en fin les mauvaises pratiques agricoles comme l'irrigation par des eaux usées, les pesticides et les engrais, etc. [7].

Parmi les 22 métaux lourds disponibles, les cations tri- et tétravalents, comme l'étain, le cérium, le gallium, le zirconium et le thorium n'ont pas d'influence biologique en raison de leur faible solubilité. A l'inverse, le fer, le molybdène et le manganèse sont des éléments traces essentiels, à faible toxicité. Le zinc, le nickel, le cuivre, le vanadium, le cobalt, le tungstène et le chrome sont des éléments toxiques souvent impliqués dans les processus biologiques. Enfin, l'arsenic, l'argent, l'antimoine, le cadmium, le mercure, le plomb et l'uranium ont des rôles très limités et sont considérés comme toxiques [8] ; [9] ; [10].

La pollution par ces métaux est un problème sérieux en raison de leur nature non dégradable et persistante. Ils ont de graves conséquences sur l'environnement. Ils diminuent la croissance des plantes, mais causent également une menace sérieuse pour la santé humaine via la chaîne alimentaire [11] ; [12]. Certains métaux lourds sont toxiques et létaux à l'état de traces et peuvent être des perturbateurs tératogènes, mutagènes et endocriniens, tandis que d'autres peuvent provoquer des troubles comportementaux et neurologiques chez les nourrissons et les enfants [13].

Parmi les métaux lourds, le plomb (Pb) est très toxique pour les humains, les plantes et les animaux à des concentrations relativement faibles, et il peut affecter presque

tous les organes et systèmes du corps [5]. Ce métal-poison endommage le foie, les reins et réduit la formation d'hémoglobine, provoque l'arriération mentale, l'infertilité et les anomalies chez les femmes enceintes, les maux de tête, les frissons, la diarrhée, les difficultés d'apprentissage, les vomissements, les crampes et l'hypertension [14]; [15]; [16].

Le cadmium (Cd) ayant une demi-vie et une solubilité plus élevées, reste persistant dans les sols et s'accumule dans les parties comestibles des plantes [17]; [11]. Chez l'homme, sa toxicité se traduit par un dysfonctionnement rénal, des affections des poumons, des anomalies osseuses (ostéomalacie et ostéoporose), une augmentation de la pression artérielle, des lésions rénales, des bronchites, des troubles gastro-intestinaux, et le cancer. Les fumées de zinc (Zn) ont un effet corrosif sur la peau, et endommagent la membrane nerveuse [18].

Les trop fortes teneurs en métaux lourds diminuent la densité, la biodiversité et l'activité de la microflore et de la microfaune du sol. L'aération du sol est moins bonne, la minéralisation de la matière organique est plus lente. A long terme, le fonctionnement de l'écosystème sol est réduit ainsi que sa fertilité. La nutrition et le métabolisme des plantes sont perturbés. Certaines espèces végétales, non tolérantes, disparaissent ce qui entraîne des changements dans la composition des communautés végétales [19].

Les effets visibles de la toxicité des métaux varient selon les espèces, mais les symptômes les plus communs sont l'apparition des points chlorotiques ou bruns sur les feuilles, les racines brunes abimées, la nécrose et la diminution significative des rendements des récoltes. L'excès de cadmium perturbe les principaux processus physiologiques ; la photosynthèse, l'absorption hydrominérale, la respiration et l'évapotranspiration. Le cadmium inhibe les systèmes de réparation de l'ADN [20]. Le zinc influence les enzymes impliquées dans le métabolisme des glucides, les activités de diverses enzymes, la stabilisation des compartiments ribosomiques, la synthèse du cytochrome, le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires et la synthèse des protéines et des auxines [21]. Le zinc affecte la régulation et le maintien de l'expression génique nécessaire à la tolérance aux stress environnementaux [22].

Des études ont montré que l'appareil photosynthétique et les pigments sont la principale cible de la toxicité des métaux lourds dans les plantes [11]; [12]; [13]. De plus, les métaux lourds provoquent un stress oxydatif chez les plantes en produisant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui entraînent des troubles physiologiques et conduisent à la

mort des plantes [4] ; [11]. A l'échelle racinaire, la toxicité des métaux s'exprime par la restriction de l'élongation racinaire et de la densité de poils absorbants, le changement de la morphologie et l'épaississement des méristèmes [23].

La contamination des sols par les métaux lourds est une préoccupation sérieuse dans la plupart des pays. La réhabilitation écologique de ces sols contaminés dans les territoires industriels, agricoles et urbains est un grand défi au cours des dernières décennies [24]. En fait, la restauration des sols pourrait être la seule option efficace pour réduire les effets négatifs des pollutions métalliques sur la santé de l'écosystème [13].

La situation environnementale en Algérie devient de plus en plus inquiétante, vue l'extension démographique et industrielle, et des exigences de la vie moderne (parc automobile, installations et infrastructures diverses, commerce et échanges internationaux souvent difficiles à maîtriser...).

La contamination par les métaux lourds des principaux ports Algériens est une réalité affligeante. La calamité de la pollution n'épargne aucun espace habitable ou vierge de la terre algérienne ; air, terre et mer aucun environnement n'y échappe [25].

La prise en conscience de la crise environnementale dominée par la pollution ; un accompagnement automatique du développement socio-économique souhaité, a mené la politique algérienne à adopter de nouveaux décrets et législations appliquant des taxes supplémentaires sur les activités polluantes et dangereuses pour l'environnement, et encourageant les procédés de dépollution sur toutes les échelles (expertises préalables à la réhabilitation des sites, programmes de recherche, projets de dépollution, reconversions d'installations....). (Journal officiel : Décret exécutif n° 17-170 du 22 mai 2017).

Au cours des deux dernières décennies, des efforts ont été déployés pour réduire les sources de pollution et remédier les sols et les ressources hydriques pollués [26]. Pour restaurer les sols contaminés, différentes pratiques ont été utilisées, telle l'immobilisation des métaux dans le sol, ainsi que le lavage des sols [27]. Les implications techniques et financières ont fait de l'assainissement du sol une tâche difficile [28]. Au cours des 20 dernières années, plusieurs approches ; biologiques, physiques et chimiques ont été utilisées pour atteindre cet objectif [29]. En général, ces approches ont des limites, à savoir une main-d'œuvre intensive, un coût élevé, une perturbation de la microflore indigène du sol, et des changements irréversibles des propriétés physico-chimiques du sol [13].

Parmi les différentes stratégies de restauration *in situ* des sols contaminés par les métaux lourds, une attention particulière est portée aux technologies de phytoremédiation (technologies vertes) [13]. Ce sont des approches rentables de restauration basées sur la capacité des plantes à concentrer des éléments et composés de l'environnement et à métaboliser diverses molécules dans leurs tissus [4].

Récemment, l'utilisation de plantes halophytes pour la phytoremédiation des sols contaminés par les métaux est une nouvelle tendance mondiale [30]. Les halophytes sont naturellement présents dans les régions arides et ont la capacité de résister aux stress hydrique et salin, et d'accumuler et / ou de tolérer les ions toxiques, y compris les métaux lourds [30] ; [31].

En outre, l'utilisation des plantes indigènes est considérée comme l'une des meilleures stratégies pour réussir la remédiation [32] ;[33]. Cette stratégie rentable, à application étendue est significative parce que ces plantes pourraient survivre et s'adapter dans les conditions environnementales locales de la région mieux que les autres espèces végétales [4].

Le genre *Atriplex* (Chenopodiaceae), comporte des espèces xerohalophyles dominantes dans de nombreuses régions arides et semi-arides dans le monde, en particulier dans les sols secs et salins, ces arbustes sont utilisés pour la réhabilitation des terres dégradées [34] ; [35]. *Atriplex halimus* L. (Amaranthaceae) est l'une des halophytes pérennes les plus abondantes dans les steppes salées algériennes [36]. Les études ont montré la tolérance et des potentialités prometteuses d'accumulation de l'*A. halimus* des métaux : cadmium [34] ; [37] ; [38] ; [39] ;[40], plomb [35], zinc [34], arsenic [41] et cuivre [42].

Malgré l'étendue de son spectre en tant que domaine de recherche scientifique, et projets effectifs de dépollution *in situ* à travers le monde, la phytoremédiation en Algérie est encore en phase embryonnaire et beaucoup reste à faire; en l'occurrence la découverte et la sélection de plantes tolérantes et à larges spectres d'accumulation de métaux, la caractérisation morphologique, biochimique et moléculaire des ressources phytogénétiques et enfin, la maîtrise des techniques et des stratégies de production végétale et de gestion des projets de dépollution à moyens et à longs termes.

La phytoremédiation en tant qu'axe de recherche est pluridisciplinaire, elle a permis l'explication de plusieurs aspects des stratégies de tolérance et d'accumulation des métaux. Cependant, la compréhension de la machinerie végétale exige l'exploration des différents stades de développement des plantes ; germination, périodes végétative et reproductrice.

Les graines constituent les maillons clefs des cycles biologiques des espèces végétales, elles portent les informations génétiques et les équipements constitutionnels et biochimiques nécessaires pour assurer la perpétuité de l'espèce. La tolérance au cours de la germination est l'une des stratégies adaptatives essentielles permettant la préservation de l'espèce, notamment dans les environnements extrêmes et changeants.

A. halimus produit une grande quantité de graines capables d'un semis spontané (self sowing). Les stratégies de tolérance aux métaux, au cours de la germination des graines de cette espèce, sont méconnues, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les phénomènes de tolérance et d'accumulation est d'un intérêt significatif. En outre, parmi les exigences des recherches actuelles en phytoremédiation, l'obtention de plantes modèles tolérantes et hyper-accumulatrices est primordiale menant ainsi, à délivrer des marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires permettront des applications diverses en biotechnologies.

Ce travail de thèse rentre dans la thématique de sélection de plantes indigènes prometteuses en phytoremédiation. L'étude des mécanismes de tolérance aux métaux au cours de la germination et de la croissance, permettrait une meilleure connaissance des potentialités phytoremédiantes des plantes et leur fonctionnement dans les environnements extrêmes. Ainsi, l'analyse des corrélations entre les concentrations en métaux polluants et les pouvoirs germinatifs conséquents, ainsi que les niveaux d'accumulation en métaux et les variations morphométriques, physiologiques et biochimiques des plants d'*A. halimus*, permettrait d'expliquer certaines des stratégies mises en œuvre par cette halophile candidate afin de surmonter le stress métallique, voire d'utiliser cette plante comme modèle pour les études de la phytotolérance au stress métallique.

L'étude de la germination vise essentiellement l'estimation des impacts des métaux : Cd, Zn et Pb sur les trois phases de la germination : imbibition, germination *sensu stricto* et croissance des racines. L'étude de la croissance en longueur des cellules racinaires en fonction des traitements métalliques, permettrait d'élucider par quelles actions, les différents métaux affectent la germination et la croissance post-germinative.

Les résultats expliqueront ainsi une part des stratégies de tolérance des graines d'*A. halimus* aux métaux au cours de leur germination.

Au cours de la croissance végétative, l'évaluation de la croissance et des taux d'accumulation et de translocation des métaux permettront de se prononcer sur les potentialités phytoremédiantes de cette espèce. L'étude des marqueurs morphologiques, physiologiques et biochimiques en réponse aux différentes situations de stress par les métaux permettrait de déterminer les traits de tolérance aux contraintes métalliques.

Pour répondre à ces objectifs, deux approches ont été suivies ; une première théorique, comportant une revue bibliographique sur la pollution par les métaux, la plante candidate, les stratégies de phytoremédiation et les mécanismes de la phytotolérance.

La deuxième approche ; expérimentale, comporte quatre chapitres répondant chacun à une problématique partielle.

Le premier chapitre vise l'étude des impacts des métaux sur la germination des graines.

Le deuxième est consacré à expliquer à quel niveau et par quelle action, les métaux affectent la germination et la croissance post-germinative.

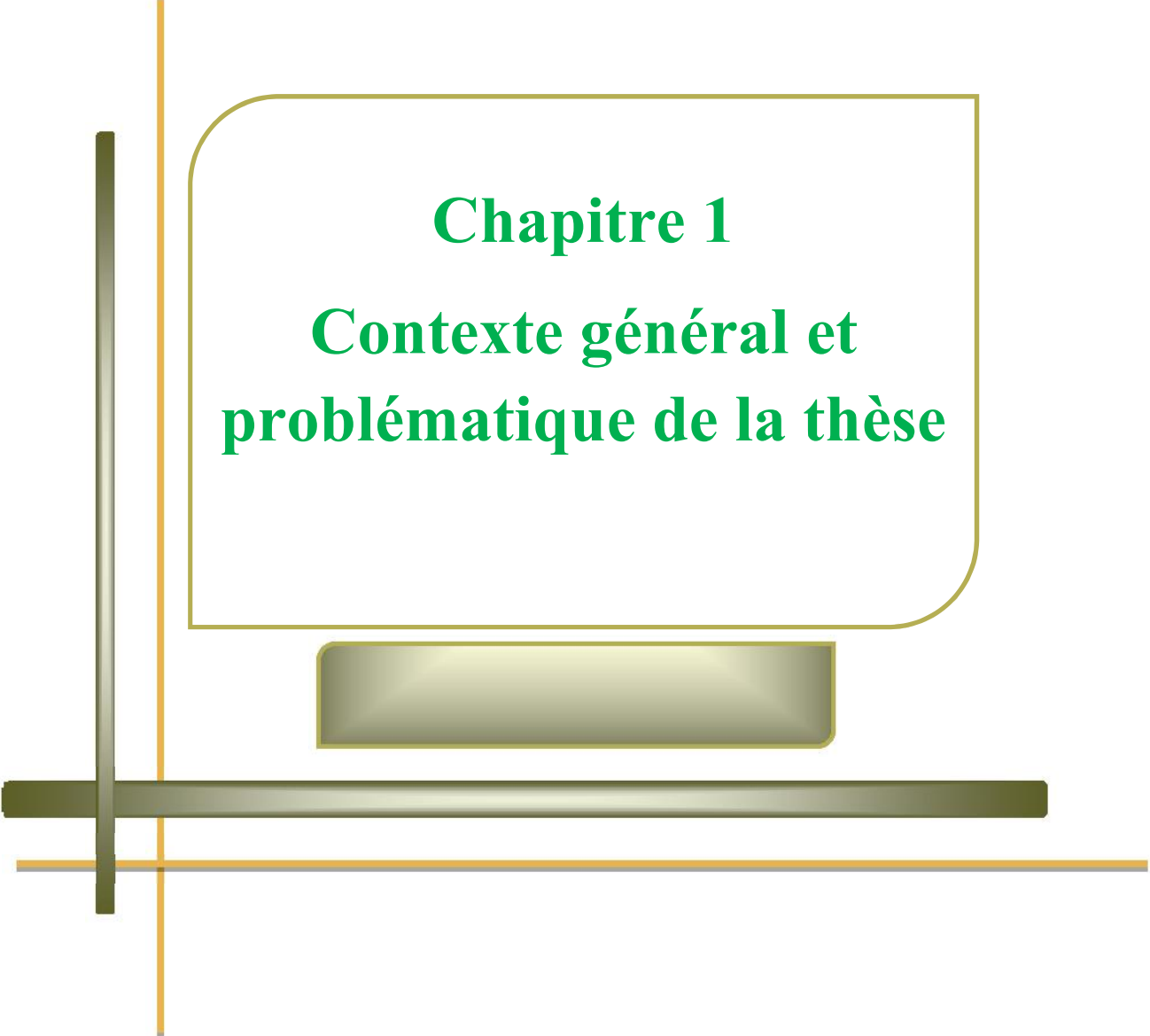
Le troisième chapitre est prévu pour tester les potentialités phytoremédiantes de *A. halimus* des métaux Cd, Zn et Pb, et pour délivrer des marqueurs morphologiques de l'accumulation des métaux.

En dernier, un chapitre est réservé à l'étude des stratégies physiologiques de la tolérance et l'importance de l'osmorégulation en situation de stress métallique.

Pour conclure, une discussion générale et des perspectives sont rédigées à la fin de cette thèse.



Partie I
Revue
bibliographique



Chapitre 1
Contexte général et
problématique de la thèse

CHAPITRE 1

CONTEXTE GENERAL ET PROBLEMATIQUE DE LA THESE

I. 1. 1. Contexte général

Pollution et population vont actuellement en parallèle, et le développement des technologies de dépollution acceptables écologiquement et économiquement est devenu une urgence absolue. Certes, en en Algérie le problème de la pollution par les métaux lourds n'est pas aussi inquiétant comme dans plusieurs pays, où ce genre de polluants constitue une véritable crise environnementale, cependant, la recherche fondamentale a toujours ses justificatifs, notamment avec la mondialisation du savoir et la nécessité de répondre aux préoccupations universelles de sauvegarder notre planète, ceci pourrait être fait en favorisant les cyclismes naturels et en éliminant le maximum des résidus néfastes de la civilisation humaine.

La phytoremédiation ; ou dépollution par les plantes vivantes, est à la fois une activité socio-économique, et un axe de recherche visant l'exploitation des connaissances acquises à diverses échelles, pour la récupération des terres affectées par les polluants métalliques et leur exploitation, tout en respectant l'environnement et en dépensant moins. Cette technologie rentre dans une optique d'agro-écologie faisant partie intégrante des objectifs du développement durable.

De multiples recherches se sont conduites en phytoremédiation ; études de la biodisponibilité des éléments métalliques pour la plante, des mécanismes d'absorption des ions métalliques, des conditions d'optimisation de l'absorption (action des chélateurs), la compartimentation des métaux après absorption, la caractérisation des actions des micro-organismes de la rhizosphère et enfin diverses manipulations génétiques visant l'amélioration des niveaux d'accumulation des métaux.

La durabilité de ces technologies de dépollution repose, en moins, sur l'exploration de plantes tolérantes hyper-accumulatrices prometteuses et bien adaptées aux conditions locales. De telles plantes constitueront de même un matériel de choix pour l'étude des mécanismes d'adaptation aux excès de métaux et les stratégies mises en œuvre par les plantes pour surmonter ce type de stress, et de même hyper-accumuler les métaux.

Parmi les technologies de phytoremédiation, la phytoextraction des métaux et métalloïdes revêt une importance particulière. Ce procédé se fonde sur la capacité de

certaines plantes d'hyper-accumuler les métaux, les transférant ainsi du compartiment sol aux feuilles récoltables, après leur incinération, une récupération massive des polluants métalliques aura lieu.

Ce travail propose *Atriplex halimus* comme candidate pour la phytoextraction des métaux cadmium, zinc et plomb. Dans ce chapitre, un aperçu sur la toxicité des métaux est fourni, ainsi qu'une présentation de l'espèce candidate.

I. 1. 2. Problématique

Atriplex halimus est un xéro-halophile bien adapté aux environnements extrêmes, en l'occurrence, ceux arides et salins, des recherches ont montré sa tolérance aux excès d'éléments traces métalliques. Néanmoins, les stratégies et les seuils de tolérance de cette espèce sont encore méconnus, notamment avec son grand polymorphisme exhibé à tous les niveaux. L'étude de la variabilité génétique de la tolérance, à travers l'investigation de différents génotypes, serait d'un apport significatif. Cette recherche est aussi une contribution à l'estimation des potentialités phytoremédiantes de l'*A. halimus* en métaux Cd, Zn et Pb et à l'explication des impacts des métaux sur la germination des graines et la croissance des jeunes plants. L'étude des traits morphologiques, physiologiques et biochimiques de la tolérance aux métaux ainsi que la détermination des marqueurs morphologiques de l'accumulation en relation avec les métaux en question sont prévues dans cette recherche. Ce travail de thèse tente de répondre aux questions suivantes :

Quels sont les seuils de tolérance des graines d'*A. halimus* aux métaux Cd, Zn et Pb au cours de leurs germinations ?

Quels sont les impacts des métaux sur le processus de germination et par quelles actions affectent les taux finaux de germination ?

Quelles sont les potentialités de l'*A. halimus* en phytoremédiation ? Par quelles stratégies pour chaque métal ?

Quel marqueur morphométrique peut-il témoigner l'accumulation des métaux ?

Quelle est la part de l'osmorégulation comme stratégie de tolérance aux différents métaux ?

I. 1. 3. Pollution métallique et toxicologie

Actuellement, une importante gamme de contaminants existe dans l'environnement, tels que les métaux lourds, les substances combustibles, les déchets dangereux, les explosifs et les produits pétroliers. Ces contaminants se divisent en deux catégories : les composés organiques et inorganiques. Les contaminants inorganiques majeurs sont les métaux lourds [43]. Ces derniers sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique [44].

Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux sont la pollution atmosphérique, la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle [45]. Les engrais chimiques, en particulier les fertilisants phosphatés sont des produits non purifiés et en contiennent des quantités considérables [46]. Les boues résiduaire d'origine urbaine constituent une autre source de contamination des zones agricoles par les métaux lourds [47]. Ces types de pollution sont dus également aux rejets physiques liés aux activités métallurgiques et minières et aux rejets de produits en fin de vie tels que les piles et batteries.

Les émissions atmosphériques constituent également une source importante de pollution par les métaux lourds [48]. La pollution atmosphérique résulte des activités industrielles et urbaines. Les apports diffus sont classés en poussières et aérosols provenant des chauffages ainsi que des moteurs d'automobiles. Les apports massifs localisés résultent d'apports anthropiques accidentels liés aux activités industrielles sans protection efficace contre la dispersion dans l'environnement [45] ; [49]. La pollution minérale des eaux résulte dans la libération dans ces dernières de divers composés tels les nitrates, les sulfates et les autres sels utilisés en agriculture, divers résidus rejetés par la métallurgie et d'autres activités [50].

Il existe plusieurs définitions du terme « métal lourd », ou élément trace métallique (ETM) : il s'agit en général d'éléments métalliques naturels, caractérisés par une masse volumique élevée, supérieure à 5 g/cm³. Quarante et un métaux correspondent à cette définition générale. Les métaux lourds peuvent concerner les éléments métalliques compris entre le cuivre et le plomb dans la classification périodique des éléments (excluant alors le fer, le chrome) ; il peut aussi s'agir de tous les éléments métalliques à partir de la quatrième période de la classification des éléments [43].

Selon HUYNH [45], d'un point de vue purement chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux. D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g.cm³. D'un autre point de vue biologique, on en distingue deux types, en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques.

Contrairement aux contaminants organiques qui peuvent subir une biodégradation, les métaux lourds restent dans l'environnement et leur spéciation et biodisponibilité pourra changer à travers le temps [51]. L'exposition excessive aux métaux lourds peut conduire à des effets très néfastes sur la santé humaine. Or les produits végétaux sont à la base de la chaîne alimentaire, donc ils contribuent à l'imprégnation de l'homme par ces métaux [49]. Ces polluants majeurs de l'environnement sont considérés d'être cytotoxiques, mutagéniques et cancérigènes [52]; [53].

Chez les végétaux, certains métaux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (Cu, Zn, Ni, Fe, Co) [37]. Certains de ces métaux sont aussi impliqués dans les processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes, la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires, le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress [54]. En outre, certains éléments métalliques peuvent se présenter sous différents états d'oxydation, ils jouent ainsi un rôle d'accepteurs ou de donneur d'électrons, très importants dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction [55]. Pour autant, les métaux lourds n'ont pas tous une fonction connue à ce jour dans le métabolisme de la plante et certains sont considérés comme des éléments toxiques (Hg, Cr, Ni, Pb et Cd) [37].

La contamination sévère par le plomb peut causer une variété de problèmes environnementaux incluant la perte de la végétation [56]. Au voisinage des routes fréquentées, il arrive que la végétation en contienne jusqu'à 500 ppm (en poids) et devienne de ce fait inutilisable comme aliments de bétail ou des humains [57].

Le zinc (Zn), à la concentration de l'ordre milli-molaire, est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénases, protéinases, peptidases) et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides [37]. A certains seuils, ce métal provoque la destruction de certaines plantes en bouchant et en se concentrant dans leurs stomates [58].

L'amplification biologique des concentrations des métaux dans les chaînes alimentaires est un problème aggravant la très haute toxicité des métaux [59]. L'exposition à des concentrations relativement faibles de cadmium entraîne une toxicité grave [60]. En raison de sa grande mobilité dans l'interface sol-plante, le Cd peut être fortement accumulé dans les tissus végétaux ; ainsi, son transfert dans la chaîne alimentaire constitue une menace sérieuse et est devenu une préoccupation publique majeure [61] ; [62]. Le Cd induit des modifications complexes des plantes aux niveaux génétique, biochimique et physiologique, conduisant à une phyto-toxicité dont les symptômes les plus évidents sont la réduction de la croissance des tissus et des organes [39] ; [63] ; [64].

I. 1. 4. Présentation de l'espèce *Atriplex halimus*

Atriplex halimus (noms usuels : *Guettaf*, arroche, pourpier de mer) est un arbuste fourrager autochtone, cette espèce est spontanée dans les étages bioclimatiques semi-arides et arides [65] ; [66] ; [67]. C'est la plante la plus représentée sur le pourtour méditerranéen et des pays du Moyen-Orient, depuis les Canaries jusqu'à l'Iran (Algérie, Maroc, Libye, Tunisie, Syrie, Jordanie, Egypte, Arabie Saoudite, Palestine, France, Espagne, Portugal, Italie, Grèce, Albanie, Malte, Chypre et Israël). Vers le sud, l'espèce atteint le massif d'Ahaggar. En Algérie, son aire d'extension se trouve entre les isohyètes 100 et 400 mm/an [68].

L'intérêt fourrager de cette espèce s'explique par sa rusticité, sa bonne valeur fourragère due à sa richesse en matière azotée, son adaptation aux conditions d'aridité ; sécheresse et salinité, le maintien de son feuillage vert durant toute l'année, et par sa tolérance au pâturage [69]. Dans la région de Djelfa (Algérie), les peuplements naturels d'*A. halimus* produisent de 2 à 3 tonnes de matière sèche par hectare soit 1000 à 1500 UF/ha, sous une pluviométrie de 250 à 300 mm/an [68].

A. halimus est classé parmi les plantes les plus utilisées par la population steppique pour soigner l'hyperglycémie [70]. Le chrome tissulaire de cette plante régulerait la

glycémie en activant l'effet de l'insuline [71]. Cette plante est aussi utilisée comme draineur cutané et rénal, diurétique et dépuratif pouvant accompagner tout régime nécessitant un drainage des tissus et la désincrustation des déchets et toxines [72], [73]. La berbérine présente dans l'arroche est connue par son activité antimicrobienne et anti-inflammatoire [70] ; [73].

L'importance de l'*A. halimus* dans le fonctionnement des écosystèmes se reflète dans la promotion de la fraction biologique du sol, elle sert également d'aliment pour les arthropodes [74].

De nouvelles utilisations de l'*A. halimus* ; la production de biomasse en vue de valoriser les terres agricoles abandonnées, la phytoremédiation des sols contaminés par les métaux, ou l'isolement des gènes contrôlant les traits de tolérance à la salinité pour les transférer aux cultures stratégiques [74].

Atriplex halimus est un arbrisseau à la couleur grise argenté parfois loque, dont les rameaux et feuilles sont recouverts d'une infinité d'écailles pulvérulentes à aspect velouté et blanchâtre, très caractéristique de l'espèce qui peut atteindre 1 à 3 m de haut, et forme des touffes pouvant atteindre 1 à 3 m de diamètre [75]. Son système racinaire pivotant présente un fort développement, pouvant atteindre 10 m de profondeur [65]. Les feuilles présentent un polymorphisme selon l'état physiologique de la plante et la position des feuilles sur l'axe. Elles sont alternes, pétiolées, plus au moins charnues, couvertes de poils vésiculeux blanchâtres (trichomes), ovales, assez grandes et font 2 à 5 cm de longueur et 0,5 à 1 cm de largeur. L'inflorescence est en panicule d'épis, terminale et nue, avec des fleurs mâles au sommet et des fleurs femelles à la base [76], La valve fructifère est cornée à la base. La graine est d'une teinte roussâtre [77] ; [78] ; [79].

L'espèce *A. halimus* présente deux sous-espèces distinctes qui diffèrent par leur niche écologique et morphologie (densité de feuillage et longueurs des rameaux florifères) :

La première *A. halimus* subsp *halimus* est diploïde ($2n = 2x = 18$), se rencontre en région littorale semi-aride à humide : c'est un arbuste généralement plus feuillu, au port érigé, très ramifié, pouvant atteindre trois mètres de haut [74] ; [80].

La seconde *A. halimus schweinfurthii*, est tétraploïde ($2n = 4x = 36$), très répandue dans les zones arides et désertiques, présente un port broussailleux enchevêtré, avec des branches fructifères nues au sommet, fortement lignifiées et pointues [65]; [70].



Figure I. 1. 1. Nappes d'*Atriplex halimus* poussant au littoral (Photo originale).



Figure I. 1. 2. Plants d'*Atriplex halimus* poussant sous serre (Photo originale).

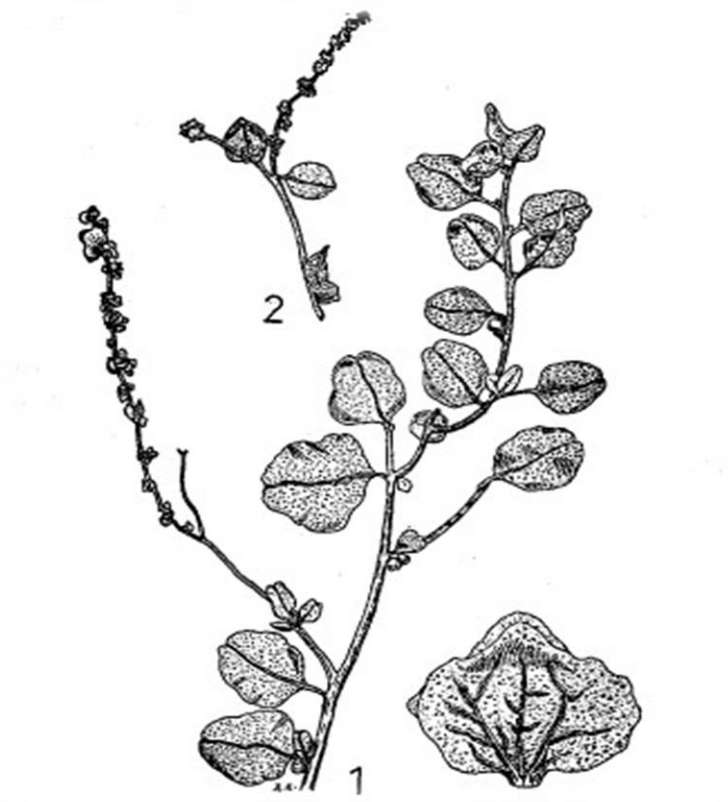


Figure I. 1. 3. Branches d'*Atriplex halimus* (AHARONSON et al., 1969) [71]

1. Branche végétative ; 2. Branche fructifère.

I. 1. 4. 1. Ecophysiologie de l'espèce

A. halimus possède la voie photosynthétique C4 [81], dans laquelle le CO₂ est incorporé dans le phospho-énolpyruvate (PEP) pour former l'oxaloacétate sous l'action de la PEP carboxylase. En conséquence, ses feuilles ont l'anatomie "Kranz" avec une couche de cellules entourant chaque faisceau vasculaire et des cellules palissadiques disposées radialement, bien que la gaine de faisceau soit ouverte [82]. Ce type d'espèces est généralement efficace dans son utilisation de l'eau et donc adapté aux climats secs [65].

Une caractéristique anatomique importante de l'*A. halimus* (et d'autres *Atriplex* spp.), particulièrement en ce qui concerne la tolérance au stress, est la présence des poils vésiculeux [83] ou trichomes vésiculaires au niveau de la surface foliaire. Ces cellules vivantes sont constituées de poils en forme de ballon ou de cellules vésicales [84] de 80-200 µm de diamètre et avec un revêtement de surface d'un matériau cireux.

Cette espèce est capable de résister à une forte intensité lumineuse (rayonnement photosynthétiquement actif > 2000 µmol m⁻² s⁻¹) due à l'ombrage des feuilles et à la réflexion de la lumière par les cristaux de sel déposés sur les surfaces foliaires après effondrement des poils vésiculaires de couleur gris verdâtre [85], et comme il possède la voie de carboxylation C4, la température optimale pour la photosynthèse est relativement élevée, autour de 35 °C [65] ; [81] ; [82].

L'efficacité d'utilisation de l'eau contribue à un meilleur maintien de la croissance des populations des sites les plus arides dans les conditions de sécheresse. Les écotypes tolérants au stress hydrique (en termes de croissance) accumulent plus de proline, ont des valeurs plus négatives de Ψ_w et Ψ_s ; et donc plus de turgescence, un taux plus élevé d'assimilation du CO₂, et une conductivité stomatique plus faible [68] ; [86]. *A. halimus* est un euhalophyte, capable de supporter des niveaux de salinité de sol équivalents à 25 à 30 dS m⁻¹ (CE en pâte saturées) [65]. Elle accumule les principaux composants de la salinité en Na⁺, [87] et Cl⁻ et d'autres anions dans ses tissus [73] ; [79], les stockant dans la vacuole. Les vésicules foliaires agissent également comme des puits de sel [74].

La tolérance de l'*A. halimus* à des températures inférieures à zéro dans le champ (-18 C°) s'est trouvée positivement corrélée à l'accumulation dans les feuilles du Na⁺ et du

K^+ , des acides aminés, des composés d'ammonium quaternaires et des sucres solubles, dans un comportement analogue à celui de de l'adaptation à la salinité et à la sécheresse [74].

En termes de croissance, *A. halimus* est tolérant à des concentrations élevées en Cd, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn dans le milieu de croissance [34] ; [38] ; [35] ; [88].

Tableau I. 1. 1. Caractéristiques conférant l'adaptation ou la tolérance à l'*A. halimus* dans les environnements extrêmes (WALKER ET LUTTS, 2014) [89].

Caractéristiques	Environnement extrême
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Système racinaire profond ▪ Ombrage mutuel des feuilles ▪ Photosynthèse C4 ▪ Grande efficacité de l'utilisation de l'eau ▪ Accumulation de sel ▪ Ajustement osmotique ▪ Accumulation d'osmolytes organiques ▪ Dépôt d'ions en excès dans les poils vésiculaires ▪ Sel libéré par les poils vésiculaires ▪ accumulation d'oxalate par les poils vésiculaires 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sécheresse ▪ Haute intensité lumineuse ▪ Haute température, sécheresse ▪ Sécheresse ▪ Salinité, sécheresse, froid ▪ Salinité, froid, sécheresse ▪ Sécheresse, froid, Salinité ▪ Salinité, Eléments traces ▪ Haute intensité lumineuse ▪ Eléments traces

I. 1. 4. 2. Biologie florale et multiplication de l'espèce

Chez *A. halimus* un seul individu peut porter à la fois des fleurs unisexuées mâles, unisexuées femelles, et bisexuées : *A. halimus* se révèle donc polygame, plus particulièrement trimonoïque [90]. L'observation des inflorescences montre une structure basée sur l'épi et la cyme bipare. Selon TALAMALI et AL. [91], l'ontogenèse florale montre que les différentes combinaisons entre les pièces florales peuvent se résumer à cinq types de fleurs :

Des fleurs à cinq tépales : soit mâles, possédant éventuellement des ébauches plus ou moins développées de gynécée ; soit femelles, puisque présentant des ébauches avortées d'étamines et un gynécée normalement constitué, dans un nombre réduit de cas ; soit hermaphrodites.

Des fleurs à deux pré-feuilles : la plupart femelles avec uniquement un gynécée normalement constitué ; d'autres, exceptionnellement, sont hermaphrodites.

La fleur femelle est sans périanthe, elle possède deux bractéoles, un ovaire, et un style, d'après la taille, la forme et le degré de soudure des bractéoles des fleurs femelles, on distingue, chez chaque individu des populations tunisiennes étudiées par TALAMALI et

al. [93], trois morphotypes floraux, la tristylie est observée au niveau intra-individuel et non interindividuel, comme d'habitude ; chaque pied porte donc neuf types floraux résultant de la combinaison des trois types de styles et de bractéoles.

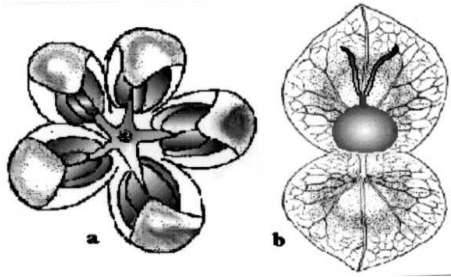


Figure I. 1. 4. Schéma des principales structures florales d'*A. halimus* (TALAMALI, 2001) [90].

- a. Fleur mâle à cinq tépales.
- b. Fleur femelle à deux préfeuilles dont l'antérieure a été rabattue vers le bas.

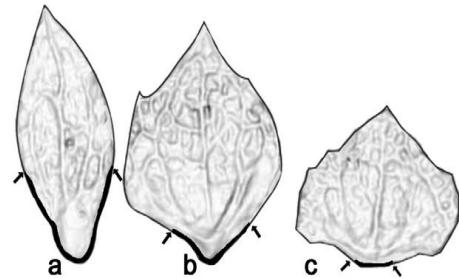


Figure I. 1. 5. Bractéoles des fleurs femelles d'*A. halimus* (TALAMALI, 2007) [92].

Pour chacun des morphotypes a, b, c, d'un même individu, les zones de soudure sont représentées en noir, les flèches indiquent leurs limites distales.

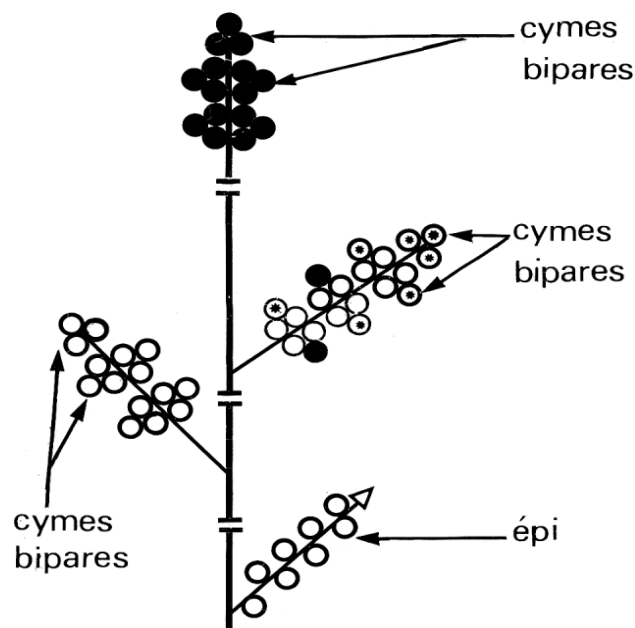


Figure I. 1. 6. Rameau florifère d'*Atriplex halimus* (TALAMALI, 2001) [90].

- fleurs hermaphrodites à cinq tépales ; ● fleurs mâles à cinq tépales ;
 - fleurs femelles à deux préfeuilles ; Δ sommet végétatif.
- Pour simplifier, les bractées n'ont pas été figurées, ainsi que les fleurs femelles à cinq tépales et les fleurs hermaphrodites à deux pré-feuilles car beaucoup moins nombreuses que les autres

Les ovules des différentes fleurs d'une même plante sont soit amphitropes, soit campylotropes. L'étude anatomique et histologique des ovules fécondés montre des variations de l'embryogenèse corrélées aux types d'ovules ; un suspenseur constitué de deux rangées cellulaires et d'autre part l'absence de stade torpille, ainsi que des anomalies du développement embryonnaire et l'existence d'une polyembryonie chez les ovules amphitropes [91]. La floraison - fructification se déroule de mai à décembre. La fleur mâle produit trois catégories de pollen.

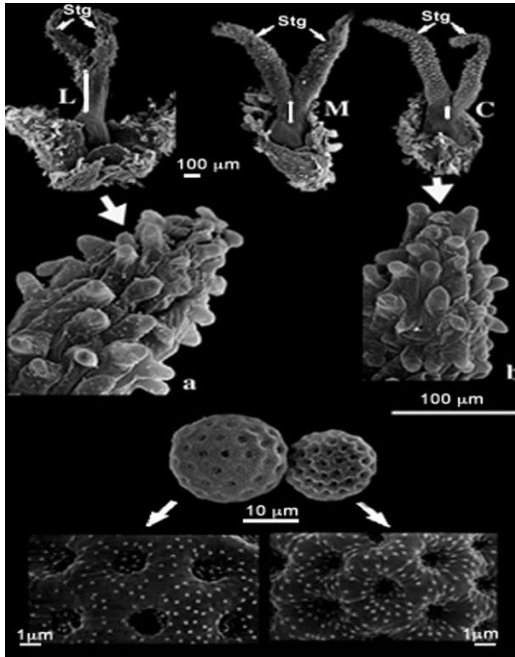


Figure I. 1. 7. Tristylye et polymorphisme pollinique au sein d'un même individu d'*A. halimus* observé au MEB (TALAMALI, 2007) [92].

De haut en bas, styles, papilles stigmatiques et pollen. Style long (L), style moyen (M), style court (C) et cellules papillaires stigmatiques d'un style long (a) et d'un style court (b). Gros et petit grains de pollen et détail de leur exine (stg : stigmates).

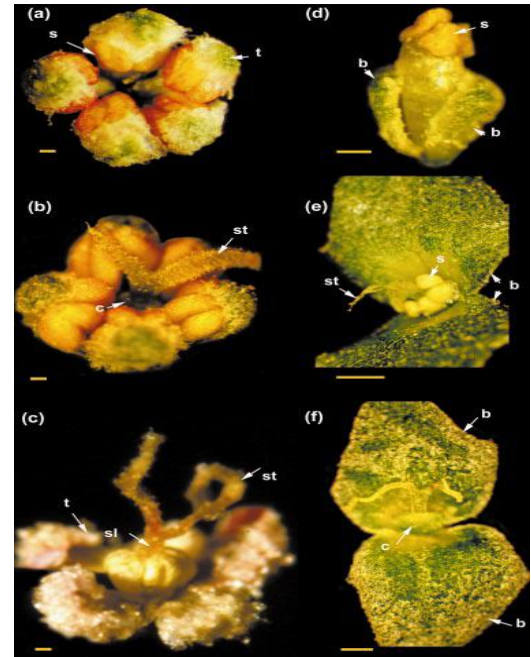


Figure I. 1. 8. Morphologies florales chez *A. halimus* (TALAMALI et al. 2007)[91].

(a) Fleur mâle fonctionnelle avec cinq tépales (phénotype habituel). Barre, 120 µm; (b) fleur hermaphrodite fonctionnelle avec cinq tépales. Barre, 120 µm; (c) fleur femelle fonctionnelle à cinq tépales. Barre, 120 µm; (d) bractéates fonctionnelles fleurs mâles. Deux étamines sont visibles, mais ce nombre est variable. Barre, 300 µm; (e) fleur bractée fonctionnelle hermaphrodite. Barre, 600 µm; (f) fleur femelle bractée fonctionnelle (phénotype habituel). Barre, 590 µm. b = bractée; c = carpelle; s = étamine; sl = style; st = stigmate; t = tépale

Les *Atriplex* se multiplient par semis, bouturage en automne [93] ou par éclats de souches. Pour les semis pratiqués en pépinière, les plants issus du semis du printemps peuvent être transplantés en automne et ceux d'automne peuvent l'être au printemps [94].

La propagation d'*Atriplex halimus* par la voie sexuée donne une descendance très hétérogène. La maîtrise de différentes techniques de multiplication végétative s'impose-t-elle pour pallier ces difficultés [95]. L'enracinement de boutures fournit de bons moyens à bons prix de propagation d'un matériel de plantation amélioré, les boutures de 5 mm de diamètre prises en pleine croissance au printemps ou en automne peuvent être enracinées dans des chambres plastiques en une période de moins de deux mois [96]. Les meilleures boutures sont celles prélevées sur des plants âgés de moins d'un an obtenu sur des plants anciens et recépés [97].

La micropropagation d'*Atriplex halimus* L. permet d'obtenir un nombre élevé de clones conformes aux pieds-mère adultes sélectionnés ; théoriquement environ 18000 plants par an sont obtenus en tenant compte de tous types de plant non conforme éliminés [95]. La propension à bourgeonner peut-être expliquée par une croissance continue chez cette espèce arbustive, ainsi que la présence de plusieurs bourgeons au niveau d'une aisselle foliaire [98]. C'est ce qui expliquerait la disposition de ses rameaux imbriqués et l'aspect de son port. En présence de BAP, ce comportement morphogénétique est amplifié. Les vitro-pousses présentent souvent des feuilles opposées qui rappellent la morphologie juvénile de la plante. Ceci dénote une certaine réjuvenisation qui peut avoir des conséquences positives sur les expériences ultérieures. Cependant, *A. halimus* fait partie des espèces qui présentent un phénomène de vitrification des pousses feuillées [99], qu'il faut réduire en utilisant une solution diluée et de faibles concentrations hormonales.

Des études ont montré une induction de la callogénèse sur des plantes intactes cultivées sur des milieux de culture sans substances de croissance, le milieu MS dilué à ½ et le milieu Gamborg (G) dilué à 10 montrent de bons effets de callogénèse [100].

Un système efficace de multiplication clonale et d'organogenèse des pousses d'*A. halimusa* été développé à partir d'explants excisés de plantes adultes cultivées ; bourgeons caulinaires, explants nodaux et bourgeons axillaires. Un taux de multiplication de 7,2 a été atteint à chaque quatre semaines sur milieu MS additionné de 4,4 µM BA, 0,49 µM IBA et 0,58 µM GA3. L'enracinement a été réalisé avec une efficacité de 73% en 2 à 4 semaines sur un milieu de base MS gélosé exempt de régulateurs de croissance. Cette méthode de micro propagation peut être utilisée pour une multiplication à grande échelle de cette espèce [101].




Figure I. 1. 9. Micropropagation de l'*Atriplex halimus* selon ALDAHAK ET AL. (2010) [101].

- A.** Initiation de la culture ; **B.** Effet d'une combinaison hormonale sur la prolifération ; **C.** Enracinement ;
D. Acclimatation sous serre d'un plant propagé *in vitro* (2 à 3 mois) ; **E.** Plant en champ issu d'une propagation *in vitro* (1 an).

I. 1. 4. 3. Polymorphisme

A. halimus présente un polymorphisme plus important que celui des autres espèces du même genre [78]. Les populations des deux sous espèces présentent un grand polymorphisme lié à leur diversité d'habitats [65]. Les variations intra-individuelles de l'appareil végétatif comme de l'appareil reproducteur se manifestent au plan morphologique strict, mais peuvent aussi porter sur des aspects anatomiques, phytodermologiques, palynologiques, physiologiques, cytologiques, chromosomiques, biochimiques et physiologiques [100]. La forme des feuilles peut correspondre à celles d'autres espèces du même genre, elle varie également avec la provenance de l'individu, et sur un même pied elle est différente selon l'état physiologique de la plante ou la position de la feuille sur un axe [102].

TALAMALI et al. [91] ont mis en évidence un polymorphisme inter- et intra-individuel pour plusieurs caractères morphologiques floraux concernant le style, les types d'ovules et l'orientation de la radicule. Selon ces auteurs, chez l'*A. halimus*, l'individu se comporte comme une population à lui seul ; la variation entre populations ou entre individus d'une même population se retrouvant, ici, au niveau d'une seule plante. En outre, les variations de la longueur du style sont maintenues quelles que soient les conditions de l'environnement, ce qui conduit à rechercher des causes qui ne soient pas d'ordre physiologique. Il s'avère ainsi qu'*A. halimus* est une espèce originale, car elle révèle un mélange de particularités de l'appareil reproducteur à l'échelle de la plante [103]; [104], dont l'importance relativise la notion d'individu.



Chapitre 2
La phytoremédiation :
Stratégies et perspectives

CHAPITRE 2

LA PHYTOREMEDIATION : STRATEGIES ET PERSPECTIVES

I. 2.1. La bio dépollution

Les nombreux cas de pollution par les métaux lourds génèrent autant de sites contaminés qu'il faut réhabiliter. Les méthodes physico-chimiques de dépollution de ces sites pratiquées *in situ* et *ex situ* présentent l'inconvénient d'être coûteuses et lourdes à mettre en œuvre [105] ; [106]. De plus, elles perturbent fortement l'activité biologique des sols et altèrent leur structure physique [45].

Le besoin de nouvelles techniques économiquement compétitives et pouvant préserver les caractéristiques du sol c'est devenu urgent, et l'utilisation des biotechnologies s'est avérée être une alternative intéressante [45].

La création et la mise en place des stratégies de remédiation sont basées sur l'observation des scientifiques qui ont montré que certaines plantes et microorganismes pouvaient se développer spontanément dans des milieux fortement pollués [107]. L'utilisation pour la remédiation d'organismes vivants se développe de plus en plus, et les termes de phyto-remédiation, bio-remédiation et éco-remédiation, sont devenus des mots d'usage sinon courants du moins intuitivement assez bien compris [108] ; [109].

Les bactéries par exemple, qui sont naturellement capables de résister à des toxiques comme l'oxyde d'uranium ou le sélénium, peuvent jouer un rôle efficace dans la dépollution des sols et des eaux [110].

Certaines plantes, dites métalloytes, sont capables de se développer normalement sur des sites fortement contaminés par divers métaux et certains de ces végétaux ; qualifiés d'hyperaccumulateurs [111], sont capables de stocker massivement les métaux dans leurs parties aériennes. 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 bioremédiation des sites pollués. Aujourd'hui, le terme « phytoremédiation » est largement accepté et regroupe toutes les méthodes basées sur l'utilisation de végétaux supérieurs dans un but de dépollution [112].

I. 2. 2. Notions de phytoremédiation

Connue sous le nom de phytoremédiation « phyto » = plante et « remedium » = rétablissement de l'équilibre, la phytoremédiation est définie comme l'utilisation de plantes pour extraire ou transformer les polluants organiques et aussi inorganiques (plus particulièrement les métaux lourds) [113]. La phytoremédiation utilise des plantes et des microorganismes associés pour décontaminer l'environnement et/ou minimiser les risques dans les relations sources - exposition- récepteurs [114].

L'idée est née au 19^{ème} siècle, lorsque BAUMANN [115] a identifié pour la première fois, deux espèces végétales, *Thlaspi caerulescens* et *Viola calaminaria*, comme étant capables d'accumuler de fortes quantités de Zn dans leurs feuilles [43]. Cette technologie peut être utilisée pour des substrats solides, liquides et gazeux et est mise en œuvre pour des sols pollués, des eaux polluées (grâce aux plantes aquatiques) ou pour filtrer l'air à l'aide de plantes fixatrices [114].

I. 2. 2. 1. Intérêts

La phytoremédiation est une « technologie verte » qui est aussi bien écologique qu'esthétique, lorsqu'elle est convenablement implantée. Elle est de plus bien acceptée par le public. Sa mise en œuvre ne requiert pas d'équipements coûteux ou de personnel hautement spécialisé, elle est relativement simple à mettre en œuvre. Son avantage majeur reste son faible coût par rapport aux méthodes classiques de décontamination des sols [116]. Cette technologie est également avantageuse pour les sites qui ne requièrent pas une restauration à court ou à moyen terme, et pour des sols moyennement à faiblement contaminés pour lesquels le coût d'une dépollution par voie physico-chimique est souvent prohibitif [117].

La technique de phytoextraction présente de nombreux intérêts d'ordres environnemental et économique. En effet, l'activité biologique et la structure des sols sont maintenues après traitement par phytoextraction. D'autre part, les plantes permettent de conserver un paysage agréable (reverdissement et floraison), et aussi d'installer une communauté de microflore et de microfaune métallo-résistantes pouvant agir en synergie avec ces plantes afin d'accélérer le processus de décontamination. Les plantes peuvent être facilement surveillées et récoltées à des fins de traitement, et la biomasse végétale est réutilisée [27] ; [118]. D'autre part, les métaux lourds peuvent aussi être récupérés et

recyclés. Lors des procédés de phytoextraction, les processus de combustion et de gazéification impliquent d'importantes sources d'énergie thermique et électrique [113].

I. 2. 2. 2. Principe

La phytoremédiation est basée sur les fonctions des plantes et de leurs microorganismes qui permettent de dégrader ou séquestrer des polluants organiques et inorganiques [111]. Les végétaux adaptés à la vie terrestre font l'interface entre un substrat hydraté, le complexe argilo-humique et l'atmosphère dans laquelle se développent les parties aériennes des végétaux. Les plantes supérieures représentent de véritables pompes à eau dont le flux hydrique traverse la plante depuis les racines jusqu'aux feuilles, et dont le moteur est la transpiration foliaire. Les polluants peuvent être ainsi, extraits des matrices contaminées, stockés, transférés et/ou détoxiqués par différents mécanismes. Les processus de métabolisation peuvent intervenir de façons espacées dans le temps ou conjointement, aboutissant à un système complexe d'interactions physiologiques et biochimiques au sein de la plante et des organismes associés [120].

Le rapport entre la teneur en métaux dans les organes aériens et celle dans les racines, donne-t-il une indication sur le mécanisme physiologique adopté par l'espèce végétale. Certaines plantes sont hyperaccumulatrices, et peuvent contenir plus de 1 g/kg d'un élément trace dans les parties aériennes [121]. Ces plantes développent une réponse physiologique spécifique, qui permet l'hyperaccumulation et la prévention de la toxicité des métaux [122]. L'efficacité de cette phytoremédiation dépend des propriétés physico-chimiques des polluants, de leur mode d'action, de leur biodisponibilité (type de sol, teneur en matières organiques, ...), des facteurs climatiques et des espèces végétales [119].

I. 2. 2. 3. Stratégies

Chez les plantes, il existe une variété de réponses à un environnement contaminé ; elles correspondent à une tolérance ou non, et sont liées ou non à une capacité d'accumulation du métal [125]. Différentes technologies de décontamination basées chacune sur une réponse particulière ont pu être développées.

Les polluants peuvent être extraits des matrices contaminées, stockés, transférés et/ou détoxiqués par différents mécanismes. Les processus de métabolisation peuvent intervenir de façons espacées dans le temps ou conjointement, aboutissant à un système

complexe d'interactions physiologiques et biochimiques au sein de la plante et des organismes associés [120].

Ces stratégies sont regroupées sous le nom de phytoremédiation et sont classées en cinq catégories : la phytoextraction, la phytostabilisation, la phytodégradation, la phytovolatilisation et la rhizofiltration. Toutes ces technologies sont non exclusives ; donc complémentaires [124].

- *La phytoextraction (ou phytoaccumulation)*

La phytoextraction est l'utilisation de végétaux (hyper)accumulateurs qui vont absorber, concentrer et stocker les métaux ou métalloïdes du sol dans les organes faciles à récolter (tiges, feuilles, etc.) [112] ; [125] ; [126]. Une décontamination par phytoextraction nécessite une répétition de cycles des cultures tout en récoltant la biomasse à la fin de chaque cycle. Ces cycles se succèdent jusqu'à ce que la concentration du métal dans le sol atteigne une valeur acceptable, ce qui conduit à l'accumulation de biomasses végétales potentiellement dangereuses. Celles-ci doivent être stockées de manière à ne présenter aucun risque de contamination pour l'environnement [127]. La phytoextraction se révèle efficace pour une grande variété de métaux lourds (Pb, Cd, Ni, Zn, ...) [112]. Ces polluants vont se complexer avec des acides organiques ou des acides aminés synthétisés par la plante [128].

Cette technique peut utiliser des plantes ayant un intérêt économique tels des arbres, qui vont fournir du bois de chauffage, il est impératif de recycler les biomasses végétales pour récupérer les contaminants qu'elles contiennent [117]. La biomasse peut être traitée par compostage, par compaction, par combustion, par gazéification ou par pyrolyse [27] ; [129] ; [130]. La phytoextraction, paraît-elle la meilleure approche pour éliminer les contaminants et les isoler sans détruire la structure et la fertilité du sol [116]. Il existe deux stratégies de phytoextraction : la phytoextraction assistée (induite) et la phytoextraction continue [131].

La phytoextraction induite est basée sur l'utilisation des amendements au sol pour rendre les contaminants plus solubles et donc plus disponibles pour les plantes, ce sont des agents chélateurs ou acidifiants [132] ; [133]. Contrairement à l'absorption induite par des chélateurs, la phytoextraction continue est basée sur les capacités génétiques et physiologiques des plantes spécialisées dans l'absorption, la translocation et la tolérance des métaux lourds ; on parle de « plantes hyperaccumulatrices » [45].

- *La phytostabilisation*

La phytostabilisation n'est pas une méthode de dépollution *sensu stricto* [112], mais une stratégie basée sur l'utilisation des plantes pour réduire la biodisponibilité des polluants par écoulements (latéraux ou en profondeur), ou immobiliser les composés polluants en les liants chimiquement par précipitation, stabilisation, absorption ou piégeage de ceux-ci par la plante [134]. Ce procédé tire avantage de la capacité qu'ont les plantes, au niveau des racines, à modifier les conditions environnementales du sol, tels que le pH et la teneur en humidité. En jouant sur les caractéristiques physico-chimiques de la rhizosphère et sur la structure des communautés microbiennes, les plantes peuvent influencer le piégeage et la biodégradation des polluants [120].

Cette approche tente aussi, de limiter les risques de transfert des pollutions en dehors du sol contaminé, et permet, en même temps, une meilleure intégration paysagère pour des sites présentant d'importants volumes impossible à stocker en décharge de classe I [112]. La phytostabilisation permet d'éviter la dispersion des polluants dans les eaux de surface et souterraines [134], ce qui mène à limiter l'érosion et le lessivage du sol [112].

- *La phytotransformation*

La phytotransformation ou phytodégradation: Un contaminant peut être détoxiqué (voire complètement minéralisé) par les systèmes enzymatiques des plantes capables de catalyser leur dégradation [135]. Les enzymes les plus fréquentes sont des déhalogénases, oxygénases, peroxydases, peroxygénases, laccases, carboxylesterases, nitrilases, phosphatases et nitroréductases. La dégradation peut avoir lieu dans les parties aériennes et les racines : par exemple pour le PCB (biphényle polychloré), les HAP (Hydrocarbures polycycliques aromatiques), d'autres hydrocarbures, les herbicides, le TNT (trinitrotoluène), le TCE (trichloréthylène) et le MTBE (méthyle tertiaire butyle éther) [126] ; [130].

La phytotransformation peut s'agir d'une rhizodégradation lorsque la métabolisation du polluant est assurée par les microorganismes associés de la rhizosphère [129] : la rhizosphère est une zone de croissance microbienne, et une surface d'échanges entre le sol, les microorganismes et la plante [136]. La phytotransformation peut également s'agir d'une phytostimulation ; lorsqu'on exploite l'effet stimulant de la

rhizosphère sur la dégradation microbiologique des composés organiques [109]. En fait, Les plantes sécrètent des exsudats racinaires qui peuvent être utilisés par les communautés microbiennes et promouvoir leur développement et leurs activités. Cette stimulation microbienne dans la rhizosphère modifie la bioaccumulation, oxydation/réduction biologique et biométhylation des métaux lourds [128].

- *La phytovolatilisation*

La phytovolatilisation est un mécanisme particulier, par lequel, les plantes phytoextractrices, peuvent libérer les polluants dans l'atmosphère *via* les zones foliaires d'échanges gazeux, que sont les stomates [137]. Cette technique permet la transformation des contaminants par les plantes en formes plus volatiles, puis leur relargage dans l'atmosphère pour les composés organiques volatils, le TCE, le MTBE, et des inorganiques comme Se ou Hg [126].

- *La rhizofiltration*

La rhizofiltration est l'utilisation de plantes terrestres ou aquatiques qui absorbent, concentrent et stockent les contaminants des eaux polluées [114] ; [116]. Elle est basée sur la capacité des systèmes racinaires à prélever et/ou dégrader les polluants dans un milieu liquide. Cette méthode s'applique dans les zones humides, construites ou naturelles, et pour des plantes dont les racines supportent la vie en milieu aquatique et en anaérobie [138] ; [139].

La rhizofiltration, est utilisée pour le traitement des rejets industriels et des effluents agricoles. Elle est particulièrement efficace pour l'élimination du Pb, Cd, Cu, Ni, Zn et Cr ; éléments retenus dans les racines [140]. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir être appliquée *in-situ* ou *ex-situ* avec des espèces végétales pas nécessairement hyperaccumulatrices, telles que le tournesol, la moutarde indienne, le tabac, le seigle, les épinards et le maïs [141].

La phytoremédiation

PRINCIPE

Technologie utilisant le métabolisme des plantes pour accumuler, transformer, dégrader, concentrer, stabiliser ou volatiliser des polluants (molécules organiques et inorganiques, métaux et radioéléments) contenus dans des sols ou des eaux contaminés. Présentation des différentes stratégies de phytoremédiation.

Phytovolatilisation

Transformation et dégradation de certains types de polluants en éléments volatils moins toxiques, qui sont ensuite libérés dans l'atmosphère par transpiration de la plante.
Polluants concernés : quelques composés organiques et métaux (sélénium, mercure)



Phytostabilisation

Absorption et séquestration (ou immobilisation dans le cas de la rhizofiltration) des polluants au niveau des racines (rhizosphère). Objectif : réduire leur dispersion par le vent ou leur lessivage par les eaux de pluies, et limiter, par conséquent, leur migration et leur entrée dans la chaîne alimentaire ou les nappes phréatiques.
Polluants concernés : radioéléments comme l'uranium.



À SAVOIR

Pour optimiser les différentes stratégies de phytoremédiation, il est possible d'avoir recours à la bioaugmentation. Celle-ci permet de stimuler et accélérer, au moyen d'ajoutants chimiques ou biochimiques, l'activité des micro-organismes présents dans le sol qui dégradent et transforment les propriétés physico-chimiques des polluants. Les polluants sont alors mieux tolérés et plus facilement absorbés par les plantes.
Polluants concernés : tous les produits biodegradables.

Phytodégradation

Absorption et décomposition des contaminants par la libération d'enzymes et par des processus d'oxydation et de réduction. Les polluants dégradés, donc moins toxiques, sont ensuite incorporés dans la plante ou libérés de nouveau dans le sol.

Polluants concernés : composés organiques (hydrocarbures, pesticides, explosifs...)



Phytoextraction

Extraction, transport, accumulation des polluants dans les tiges et les feuilles. Les plantes sont dites accumulatrices. Les feuilles, ou la plante entière, sont alors récoltées par des techniques agricoles, puis brûlées dans des usines. Les polluants sont concentrés dans les cendres et les filtres qui sont ensuite traités, comme des déchets de haute activité dans le cas d'une pollution nucléaire.

Polluants concernés : métaux (cuivre, or...) et radioéléments (césium, strontium...)



Avantages

- Faibles coûts de traitement (10 à 100 fois inférieurs aux technologies classiques) ;
- Adaptation aux grandes superficies contaminées (rizannes d'huîtres) ;
- Récupération des polluants ;
- Conversion possible de la biomasse en énergie ;
- Technologie visuellement attractive ;
- Faible perturbation du milieu contaminé ;
- Technologie verte ayant une bonne image auprès du public.

Limites

- Limitation aux surfaces colonisables par les racines ;
- Temps de traitement très long (minimum 3 ans) ;
- Dépendance de la nature du sol, de la météorologie, des attaques d'insectes, des micro-organismes... ;
- Besoin de grandes superficies et d'une pollution peu profonde (de 50 cm à 3 m) ;
- Application pour des contaminations modérées pour que la plante survive.

Figure I. 2. 1. Principe et stratégies de la phytoremédiation (LOREC et al., 2016) [125].

I. 2. 2. 4. Plantes performantes à la phytoremédiation

La dépollution de matrices contaminées semble être envisageable par phytoremédiation, encore faut-il trouver les espèces végétales capables d'être tolérantes à la pression chimique et de présenter un rendement d'extraction quantitativement important et rapide. Il faut veiller à choisir des espèces végétales ne favorisant pas la phytovolatilisation. Le piégeage physique du xénobiotique dans les matrices végétales permet de gérer la pollution en tant que 'déchet' grâce à une transformation de cette biomasse par la mise en place de filières appropriées [119].

Les plantes les plus indiquées doivent être tolérantes à la contamination et aux conditions environnementales du site, avoir une production de biomasse suffisante par rapport aux objectifs, et une forte accumulation dans les parties aériennes ou les racines [138].

Il est essentiel pour la bioremédiation, que les plantations des sols contaminés par les métaux lourds augmentent l'activité biologique des microorganismes du sol, spécialement pour les sols minéraux avec de faibles teneurs en matière organique [143] ; [144].

Les plantes pour la phytoextraction doivent produire beaucoup de biomasse aérienne rapidement, et accumuler de fortes quantités dans les parties récoltables [145]; [146], mais aussi être compétitives, tolérantes à la contamination et à des conditions de vie sévères [122]. Certains métaux tel que le cuivre, sont à l'origine de dégâts causés à la membrane plasmique, par conséquent, les plantes hyperaccumulatrices doivent avoir comme propriété parallèle : soit un système de réparation de la membrane, soit un système de résistance de la membrane à l'attaque des métaux [113].

Toute implantation d'espèces entraîne des modifications de l'écosystème, et est susceptible de modifier ou perturber son fonctionnement, de modifier les interactions biotiques et abiotiques, mais dans quelle mesure ? Un suivi à long terme est alors indispensable. L'utilisation potentielle des arbres comme couvert végétal convenable pour les terres contaminées par les métaux lourds a reçu une attention croissante à travers ces derniers ans [146] ; [147].

I. 2. 2. 5. Limites et perspectives

Avant de remédier, il faut évaluer la contamination initiale, déterminer les objectifs de remédiation, dont le niveau de contamination à atteindre, le type et l'usage du sol à remédier, sa surface et sa profondeur, le temps et l'argent alloués à la remédiation, et la (bio)surveillance [151]. Par ailleurs, les industriels hésitent parfois à l'emploi de cette méthode car juridiquement, tout traitement de dépollution d'une durée de plus de six mois entraîne le passage d'une installation classée légère à une installation classée lourde, ce qui entraîne un surcoût et des contraintes juridiques [117].

Le choix de l'espèce est essentiel, elle doit tolérer la contamination mais aussi les autres stress qui l'accompagnent. Il est souhaitable de privilégier des espèces natives pour éviter d'introduire des espèces invasives, pouvant affecter l'écosystème à long terme [114] ; [117]. L'efficacité de cette technique est limitée par le climat ; un climat défavorable limite la croissance des plantes, la production de biomasse, et donc l'efficacité du système. De plus, la phytoremédiation fait intervenir des processus lents : plusieurs années sont nécessaires pour dépolluer un site de déchets dangereux, et la contamination peut ne pas être totalement éliminée [117].

Pour la dépollution par phytoextraction, il faut utiliser des plantes hyperaccumulatrices [148]. Cependant, l'utilisation de ces plantes peut créer une nouvelle source d'exposition via l'entrée des contaminants dans la chaîne alimentaire, et un retour au sol suite à la chute des feuilles et la formation de la litière [149]. En plus, la majorité des plantes hyperaccumulatrices présentent une faible production de biomasse et une vitesse de croissance lente demandant un investissement en temps assez important, et/ou en argent avec l'adjonction de chélateurs ou autres substances « starter ». La concentration et le type de métaux lourds influencent la phytotoxicité, et dans certains cas, la croissance des plantes peut être réduite [150] ; [151]. Pour des polluants volatiles, la phytovolatilisation est un mécanisme négatif en termes de phytoremédiation puisque la pollution se trouve déplacée d'un compartiment à un autre sans diminution quantitative de la charge polluante et parfois sans diminution du pouvoir toxique de ces polluants [120] ; [152].

A l'heure actuelle, le principal obstacle au développement de la phytoremédiation réside dans le faible nombre d'espèces potentiellement utilisables à l'échelle industrielle.

En effet la plupart des métallophytes connues sont caractérisées par un enracinement peu profond, une croissance assez lente, et une faible production de biomasse, autant de critères limitant considérablement les taux prévisibles d'extraction. Par ailleurs, un rendement optimal nécessite que les conditions de culture (climatiques et édaphiques) sur les sites pollués correspondent aux exigences naturelles des végétaux utilisés ; ce paramètre est par essence très difficile à contrôler et représente une limitation supplémentaire de la méthode [115].

Tableau I. 2. 1. Avantages et limites de la phytoremédiation (SINGH et al., 2003)[112].

Avantages	Limites
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Pompe solaire ▪ In situ ▪ Acceptation publique ▪ Coûte 10-20% des traitements mécaniques ▪ Le transfert est plus rapide que l'atténuation naturelle ▪ Moins de déchets secondaires ▪ Moins d'émissions d'air et d'eau ▪ Les sols restent en place et sont utilisables après le traitement 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Limites de transfert de masse associées à d'autres biotraitements ▪ Limité aux sols peu profonds, aux cours d'eau et aux eaux souterraines ▪ L'hyperaccumulation de contaminants dangereux pourrait être toxique pour les plantes ▪ La biodisponibilité et la toxicité des produits de dégradation ne sont pas connues ▪ Plus lent que les traitements mécaniques ▪ Potentiel d'entrée des contaminants dans la chaîne alimentaire par la consommation animale ▪ Les contaminants peuvent être mobilisés dans les eaux souterraines ▪ Peu familier à de nombreux régulateurs

Pour pallier ces inconvénients et développer avec succès une phytoextraction, la plupart des études ont pour objectif de découvrir des plantes hyperaccumulatrices ayant une forte production de biomasse. La transformation par génie génétique des plantes sensibles à forte production de biomasse en plantes hyperaccumulatrices, pourrait également être envisagée. Pour cela, il est nécessaire de comprendre les mécanismes biochimiques et moléculaires intervenant dans la réponse de la plante survenant lors d'un stress aux métaux lourds [153].

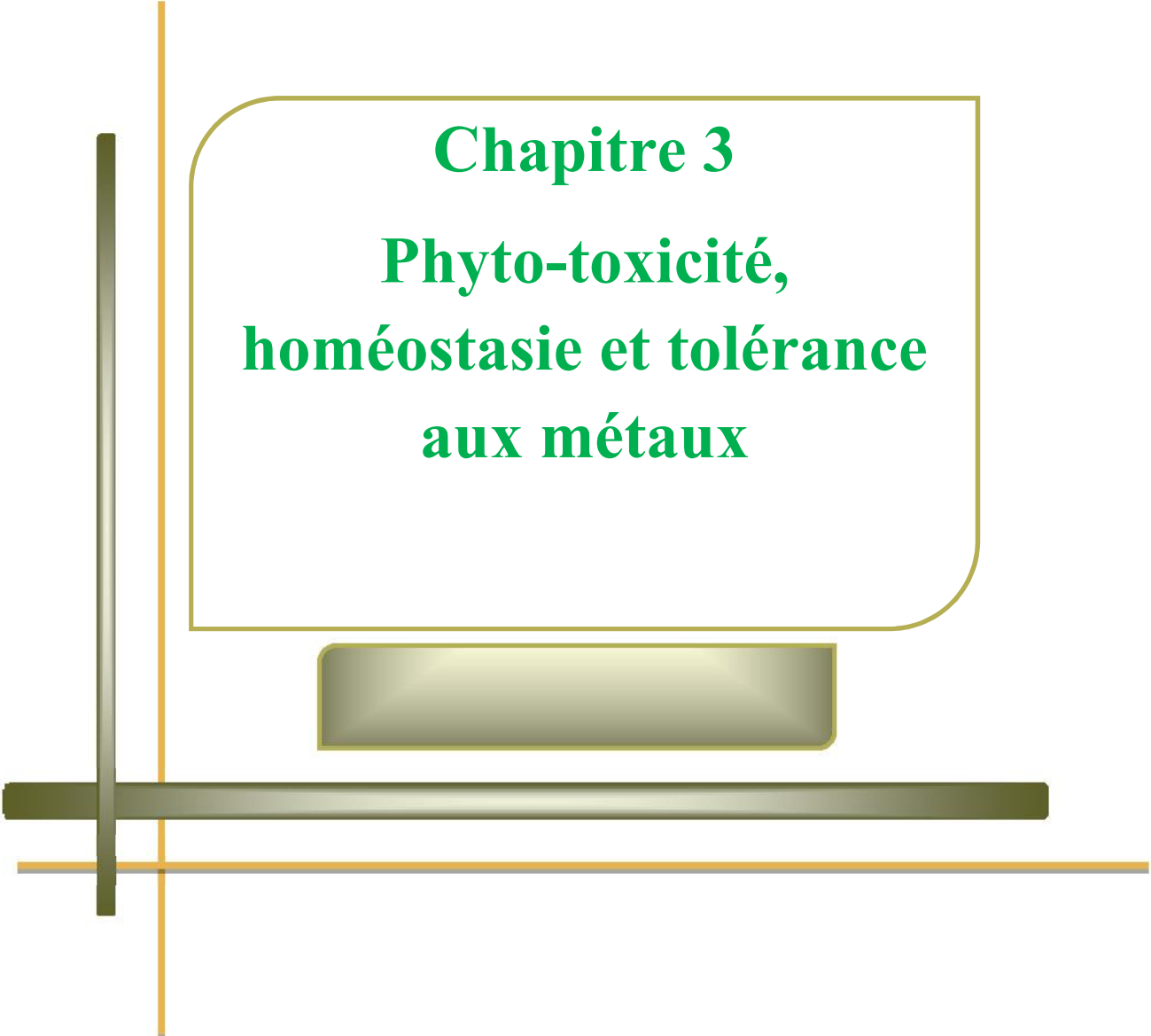
Dans l'attente d'une meilleure compréhension des mécanismes biologiques de la phytoremédiation, différentes stratégies sont d'ores envisageables pour tenter d'optimiser les capacités des plantes à accumuler des métaux et radionucléides [154].

Il y'a besoin de : soit modifier les facteurs affectant l'absorption et la translocation des métaux lourds, soit de développer de nouvelles plantes avec des propriétés de phytoextraction améliorées [155] ; [156].

La sélection et le croisement traditionnel des plantes semble être la meilleure approche pour une phytoremédiation améliorée, les plantes qui sont capables de survivre

sur une nutrition pauvre, dans des milieux d'enracinement acides et contaminés par les métaux lourds possèdent des traits génétiques héréditaires pour la tolérance à ces conditions [157]. Le clonage moléculaire et l'expression de gènes impliqués dans l'hyperaccumulation des métaux lourds, et des gènes codant pour des enzymes dégradant les xénobiotiques, aboutissent à une amélioration des niveaux de remédiation.

WILLIAMS et al. [158] ont montré qu'un certain nombre de gènes et familles de gènes ayant un rôle putatif dans la compartimentation intracellulaire, par exemple dans la vacuole ou le tonoplaste, ou dans l'efflux cellulaire d'oligo-éléments ont été identifiés, y compris les ATPases de type CPx. LI-CHAN et al. [159] ont identifié un transporteur d'efflux de détoxification, AtDX1, dans la membrane plasmique d'*A. thaliana* qui pourrait effluer le cadmium en plus d'autres composés toxiques. Plusieurs gènes d'ATPase de type P dans le génome d'*Arabidopsis* codent pour des pompes de spécificité inconnue, qui ressemblent aux pompes bactériennes transportant des métaux lourds tels que Ag, Zn, Co, Cd et Pb, suggérant un rôle similaire pour ces protéines dans le transport des métaux [63] ; [150]; [160].



Chapitre 3
**Phyto-toxicité,
homéostasie et tolérance
aux métaux**

CHAPITRE 3

PHYTOTOXICITE, HOMEOSTASIE ET TOLERANCE AUX METAUX

I. 3. 1. Phytodisponibilité des métaux lourds

La notion de phytodisponibilité découle directement de la notion de biodisponibilité, définie comme « l'aptitude d'un élément à être transféré d'un compartiment du sol vers un organisme vivant (bactérie, végétal, animal, homme) » [56] ; [161]. Ainsi, est biodisponible pour une plante (phytodisponible), la fraction d'un élément susceptible d'être absorbée par les racines [162]. La phytodisponibilité des ETM est fortement corrélée à la concentration d'espèces ioniques dans la solution du sol. Elle est également largement dépendante des propriétés du sol, de l'espèce végétale considérée et de l'élément en question [163].

Dans le sol, les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules du sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est biodisponible [45]. La mobilité des espèces chimiques métalliques peut être également définie par leur aptitude à être transférées vers des compartiments du sol où elles sont moins énergiquement retenues, le compartiment ultime étant la phase liquide représentée par la solution du sol. C'est cette dernière qui constitue le réservoir principal d'alimentation pour les plantes [37] ; [164]. La répartition des différentes formes chimiques d'un métal dans le sol, qui réunies donnent sa concentration totale, est nommée spéciation [165]. Cette spéciation contribue à définir la mobilité et la biodisponibilité des ETM, et permet d'établir des perspectives de comportement et d'évolution des ETM en fonction des conditions du milieu et de leur modification [44].

La matrice du sol, globalement chargée négativement, attire les cations en solution. Ce sont les minéraux argileux et la matière organique, souvent réunis pour former le complexe argilo-humique, qui participent le plus à la charge négative du sol [165]. La présence des charges de surface peut provenir soit de substitutions isomorphiques dans le réseau cristallin (remplacement d'un cation trivalent par un divalent), soit de réactions chimiques de surface dues aux variations de pH [166]. L'équilibre entre les formes libres et fixées de l'ion va dépendre de sa biodisponibilité, directement liée à sa toxicité [45].

Les métaux lourds peuvent être absorbés et immobilisés par les minéraux argileux ou également être complexés par la matière organique du sol en formant alors un complexe organométallique [167] ; [168]. Ces phénomènes sont gouvernés par un ensemble de paramètres physico-chimiques tels que le pH, le potentiel d'oxydo-réduction et la quantité de ligands disponibles [169] ; [170].

- *Le pH*

Le pH constitue un facteur dont le rôle est crucial pour la mobilité des ions métalliques, car il influence le nombre de charges négatives pouvant être mises en solution [163]. Les protons proviennent majoritairement de la respiration végétale et microbienne, ainsi que de l'oxydation des sulfures. A l'inverse, ils sont consommés par l'hydrolyse des minéraux altérables [171].

L'augmentation du pH favorise la précipitation des ions métalliques ou leur co-précipitation, principalement sous forme d'hydroxydes, de carbonates et de sulfures [171] ; [172] ; [173]. En conditions neutres/alcalines, la plupart des ETM (*i.e.* Fe, Zn, Cd, Al, Cr, Cu, Ni) présentent donc une mobilité basse à très basse. A pH élevé, la spéciation des ETM conduit à une re-solubilisation des oxydes et hydroxydes, et la plupart des ETM sont sous forme anionique. De plus, un pH trop élevé (> 12) peut favoriser la dissolution des acides humiques et augmenter la concentration dissoute en ETM [174]. Quand le pH diminue d'une unité, la concentration des cations métalliques libres augmente d'environ un facteur 2 dans la solution du sol, et par conséquent améliore la phytoextraction [175] ; [176]. D'une façon générale, lorsque le pH augmente, les cations sont moins solubles et les anions sont plus solubles [171].

- *Le potentiel redox (Eh)*

Le potentiel redox (Eh) permet de caractériser les échanges d'électrons entre les espèces chimiques [45]. En outre, l'oxydo-réduction exerce une influence sur la répartition des ETM entre les phases liquide et solide. Le potentiel d'oxydo-réduction (Eh), est fortement influencé par la présence ou l'absence d'oxygène moléculaire [177]. Les faibles valeurs d'Eh favorisent la dissolution des hydroxydes et entraînent une augmentation de la concentration des métaux associés avec des composants [165]. Par exemple, en conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfure, qui piège volontiers les éléments métalliques tels que Pb, Cd, Zn [178]. Les (hydr)oxydes peuvent précipiter en piégeant les

métaux à l'intérieur des mailles cristallines, permettant ainsi la fixation des métaux en quantités supérieures à leurs CEC. Cette cristallisation peut avoir lieu sous l'influence des microorganismes de genres différents tels que *Thiobacillum* ou encore *Metallogenium* [37].

D'une façon générale, les fortes valeurs d'Eh favorisent les espèces oxydées (accepteurs d'électrons), alors que les faibles valeurs d'Eh favorisent les espèces réduites (donneurs d'électrons) [179]. Pour un sol donné, l'Eh varie en fonction inverse du pH, il augmente quand le pH diminue [178]. En raison du nombre important des couples redox et de la cinétique des réactions, l'influence du potentiel redox est souvent difficile à comprendre [180].

- *Activité biologique et ligands disponibles*

D'après HUYNH [45], les principaux modes d'action de l'environnement biologique sur la mobilité des polluants métalliques sont la solubilisation, l'insolubilisation ou complexation, et la volatilisation.

La solubilisation provient de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitriques et sulfuriques. Certaines bactéries chimolithotrophes (*Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Galionella*) oxydent les formes réduites du fer et du soufre contenues dans les sulfures et produisent de l'acide sulfurique susceptible de dissoudre les silicates, les phosphates, les oxydes et les sulfures, libérant ainsi les métaux lourds. Les champignons et les racines des plantes excrètent, eux aussi, des acides afin d'augmenter leur absorption de nutriments, ou tout simplement comme déchets métaboliques [165] ; [178] ; [181]. Selon sa nature, le métal est associé à la matière organique sous forme de carbonates, de sulfures ou sous une forme correspondant à des états chimiques très stables [182].

L'insolubilisation peut résulter d'une association des ions métalliques avec des ligands inorganiques (anions majeurs tels que les carbonates, chlorures et hydroxydes) ou organiques [177]. Des acides organiques de faible masse moléculaire, comme les acides oxalique, citrique ou fumarique qui interviennent dans la complexation intracellulaire d'éléments nutritifs, peuvent être sécrétés dans le milieu extérieur, ils limiteraient de ce fait, les transferts par des processus de complexation [45]. Les exsudats racinaires tels que les phénols ou les acides aminés (phytosidérophores) ont la capacité de former des complexes solubles avec les ETM tels que Fe, Mn, Cu, Zn ou Pb, accroissant ainsi leur

mobilité dans la rhizosphère [183] ; [170]. De plus, l'exsudation d'acides organiques dans la rhizosphère peut influencer les processus d'adsorption/désorption des ETM par compétition de ces composés chargés négativement avec les anions métalliques [184]. Les exo-polysaccharides des bactéries peuvent insolubiliser les métaux, et entraîner une réduction de leur teneur dans les plantes [185]. Les organismes et les microorganismes eux-mêmes peuvent influencer la disponibilité des métaux lourds dans leur environnement proche, par acidification locale lors d'une réaction métabolique, ou par la production de composés complexant les métaux lourds [186]. La complexation organique a tendance à accroître la solubilité des ETM, et à favoriser leur maintien en solution.

La volatilisation repose sur l'action directe de certains microorganismes sur le degré d'oxydation de l'espèce métallique. C'est le cas du mercure, de l'arsenic et du sélénium (Se). La biométhylation permet le transfert de groupements méthyl directement aux atomes Pb, Sn (étain), As, Sb (antimoine) et Se, permettant leur volatilisation dans l'atmosphère [45].

La température du sol agit sur les réactions physico-chimiques, et donc sur la mobilité des éléments. L'augmentation de la température du sol conduit généralement à une absorption plus importante de composés métalliques par la plante [187]; [188].

Tableau I. 3. 1. Localisation et mobilité des métaux dans le sol (MAHAR et al., 2015) [189].

<i>Localisation</i>	<i>Mobilité</i>		
	<i>Immobilisé</i>	<i>Peu mobile</i>	<i>Très mobile</i>
<i>Solution</i>			Dissous
<i>Minéraux argileux</i>		Adsorbés (complexes à sphère interne)	Adsorbés (complexes à sphère externe)
<i>Oxydes et hydroxydes de Fe, Al, Mn</i>	Métaux à l'intérieur des cristaux cristallins	Adsorbés (complexes à sphère interne)	Adsorbés (complexes à sphère externe) réseaux
<i>Carbonates</i>	Métaux à l'intérieur des réseaux cristallins	Métaux à la surface des réseaux cristallins	
<i>Substances humiques</i>	Adsorbés (complexes à sphère interne)	Adsorbés (complexes à sphère externe)	Adsorbés (complexes à sphère externe)

Les complexes à sphère externe désignent les ions qui conservent leur entourage de molécules d'eau (sphère d'hydratation) lors du processus d'adsorption. Ces ions sont moins fortement liés, donc plus mobiles, que ceux qui forment des complexes à sphère interne, c'est-à-dire qui ne conservent pas leur sphère d'hydratation lors de l'adsorption (DONG et al., 2015) [190].

I. 3. 2. Homéostasie des métaux lourds : Entrée, dynamique et spéciation

Les cellules ont développé des systèmes très efficaces de contrôle de la concentration en métaux permettant un apport suffisant et une élimination efficace de l'excès pour maintenir l'intégrité cellulaire. L'homéostasie correspond à un subtil équilibre gouverné par cette dualité des métaux, à la fois essentiels à l'état de traces, et toxiques lorsqu'ils sont présents en quantités excessives [191]. Les plantes sont exposées aux métaux de deux façons : par les parties aériennes ; à partir de particules en suspension dans l'air ou de composés dissous dans l'eau, et par les racines [192].

I. 3. 2. 1. Entrée

Les métaux lourds, sous forme de poussière ou de gaz, peuvent entrer directement par les stomates des feuilles. Une partie des retombées atmosphériques, solubilisée par l'eau de pluie ou d'irrigation, peut traverser la cuticule des feuilles et des fruits. La perméabilité de la cuticule est plus élevée au niveau des cellules stomatiques [193]. Par exemple, pour le plomb, la majorité de ce métal est lessivée, mais une partie va s'adsorber aux lipides épicuticulaires, et être absorbée par les feuilles [194]. La capacité des plantes à absorber le plomb disponible via leurs feuilles dépend à la fois de l'âge de celles-ci, mais également de leurs morphologies. Les feuilles pubescentes ont, en particulier, la capacité de fixer et d'absorber ce plomb [195]. Dans le cas de « légume-feuilles », comme l'épinard, ou de céréales, comme le blé, exposés à de fortes retombées atmosphériques, la quantité de métal absorbée par les parties aériennes peut atteindre jusqu'à 95 % de la quantité totale absorbée [196]. Une étude a tenté d'estimer la proportion de cadmium retenue par les feuilles par rapport à celle absorbée par les racines en utilisant un traçage isotopique par du ^{109}Cd , dans un contexte de sols agricoles non contaminés soumis à des retombées atmosphériques diffuses, 20% (pour le grain de blé) à 60 % (pour le chou) du cadmium total du végétal non lavé provenait des retombées aériennes [197].

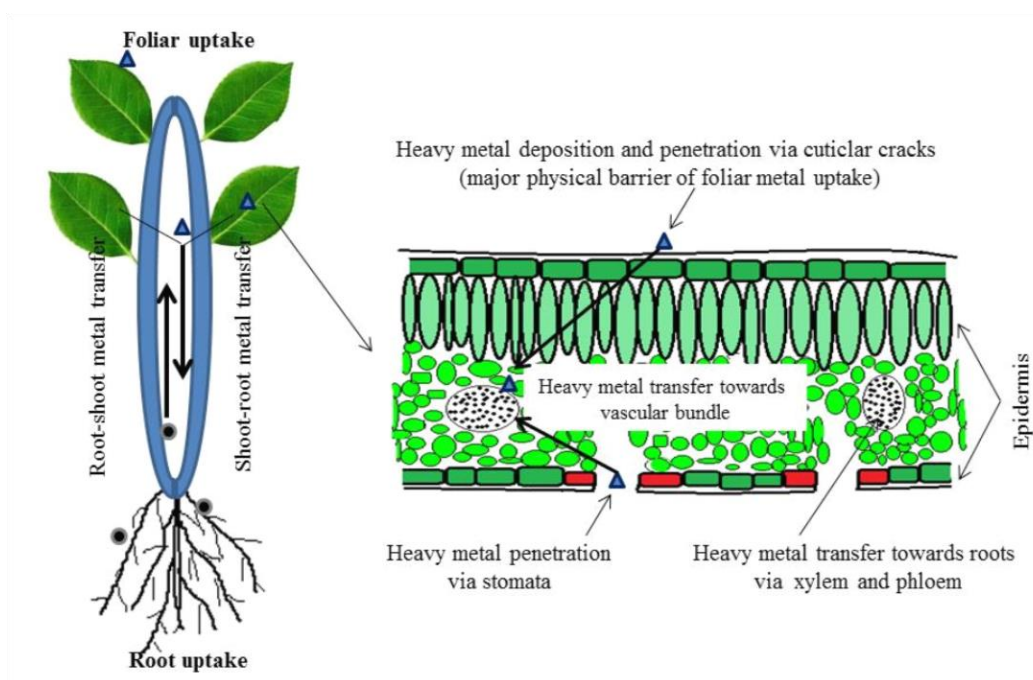


Figure I. 3. 1. Absorption foliaire des métaux lourds (SHAHID et al., 2016) [198].

La racine est le principal organe responsable de l'admission des éléments dans la plante [199]. Les racines captent des substances métalliques par diffusion créant alors, autour d'elles, un gradient de concentrations [200]. Deux mécanismes expliquent la pénétration des ions dans les racines : l'absorption passive et l'absorption active. Le transport d'un ion est dit actif lorsque le potentiel électrochimique de l'ion, dans le sol, est plus faible que celui de la plante. Inversement, le déplacement de l'ion contre ce gradient de potentiel électrochimique est un processus passif [201].

Il est nécessaire que l'élément passe en solution pour être absorbé par la racine. On estime que pour la majorité des métaux et métalloïdes, le prélèvement se fait sous des formes ioniques : cationiques (Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}) ou anioniques ($H_2SO_4^{2-}$) [202]. Dans des cas particuliers, des complexes inorganiques et/ou organiques semblent jouer un rôle dans le prélèvement des métaux. Par exemple, une augmentation du prélèvement de Cd est observée en présence de chlorures, suggérant que : soit les complexes $CdCl^+$ et $CdCl_2$ sont directement absorbés, soit ils pourraient participer à la diffusion vers les racines [203]. Le plomb, pénètre dans le système racinaire de façon passive et suivait le système de conduction de l'eau. Cette absorption n'est pas uniforme le long de la racine, puisqu'il existe un gradient de concentrations en plomb dans les tissus à partir de l'apex, qui est la zone la plus concentrée [204] ; [205]. Les tissus jeunes, et en particulier la zone apicale (en dehors de la coiffe) où les cellules possèdent des parois encore fines, sont les zones

absorbant le plus de plomb [204] ; [205] ; [206]. Cette région apicale correspond également à la zone où le pH rhizosphérique est le plus bas. Ce pH bas favorise la solubilité du métal et conduit à une élévation locale de la concentration en plomb dans la solution du sol [207] ; [208].

A l'intérieur de l'endoderme, les ETM se déplacent de cellules en cellules par l'intermédiaire des plasmodesmes [192]. Après l'entrée symplastique dans le xylème, les métaux lourds sont ensuite, transportés vers les parties aériennes par le courant transpiratoire [209].

3. 2. 2. Dynamique des métaux dans la plante : De l'exclusion à l'hyperaccumulation

Selon BAKER ET WALKER [210], les plantes peuvent être classées en quatre groupes en fonction du facteur de translocation des éléments métalliques : les excluantes, les indicatrices, les accumulatrices et les hyperaccumulatrices.

Dans le cas de l'exclusion « rejector », la concentration des métaux dans les feuilles est maintenue à un niveau faible et constant jusqu'à ce qu'une concentration critique dans le sol soit atteinte. Au-delà de cette concentration critique, le métal est massivement transporté dans les parties aériennes de la plante, et provoque des dégâts liés à sa toxicité. La stratégie d'exclusion, adoptée par les espèces *tolérantes*, consiste à réduire l'absorption des métaux par les racines et leur transfert vers les parties aériennes, en les immobilisant à l'extérieur ou à l'intérieur des racines, dans ce cas, le métabolisme de la plante n'est pas modifié [122]. La formation de plaques d'oxydes et d'hydroxydes de fer à la surface racinaire est assez courante. Du fait de leur capacité d'adsorber de grandes quantités de métaux, ces plaques limitent la pénétration des métaux dans la racine [211]. Cependant, dans le cas du plomb, ces plaques semblent jouer un rôle de barrière physique moins important que pour d'autres métaux [212]. Les mycorhizes peuvent également modifier l'adsorption des métaux à la surface des racines [213]. En effet, les métaux se lient aux parois des hyphes fongiques qui constituent une barrière supplémentaire protégeant le système racinaire du plomb [207].

Dans le cas de l'indication « indicator », le prélèvement des métaux et leur transport jusqu'aux feuilles se fait de manière passive. Les concentrations internes reflètent exactement les concentrations externes [210].

Dans le cas de l'accumulation « accumulator », les métaux sont activement concentrés à l'intérieur des tissus de la plante. La stratégie d'accumulation consiste à transférer des métaux absorbés vers les organes aériens. Ainsi, le rapport entre la teneur en métaux dans les organes aériens, et celle dans les racines, donne-t-il une indication sur le mécanisme physiologique adopté par l'espèce végétale [121] ; [122].

Les plantes « *hyperaccumulatrices* » peuvent contenir plus de 1 g/kg d'un élément trace dans les parties aériennes [121]. Ces plantes développent une réponse physiologique spécifique qui permet l'hyperaccumulation et la prévention de la toxicité des métaux [122].

I. 3. 2. 3. Spéciation

Les plantes modifient les propriétés physico-chimiques et la composition biologique de la rhizosphère à travers un ensemble de mécanismes susceptibles de modifier la spéciation des éléments métalliques. Les principales modifications exercées par les racines : l'acidification de la rhizosphère, l'exsudation de composés organiques, et la formation de plaques ferriques.

Afin de maintenir l'homéostasie des métaux, la plupart des organismes utilisent une combinaison des deux systèmes. L'import d'un ion peut être régulé soit par inhibition de la machinerie d'import, soit en rendant le métal indisponible à l'absorption. Des systèmes d'efflux permettent de réduire l'accumulation intracellulaire de métaux lourds [191].

Les métaux peuvent être évacués de la vacuole vers le cytoplasme, ou du cytoplasme vers l'apoplaste, et à partir de là, leur relâchage est possible vers le milieu environnant. Ce relâchage est probablement non métabolique (passif). Les métaux relâchés dans la rhizosphère le sont sous forme complexée ou libre. Les métaux sous forme gazeuse comme le mercure peuvent également fuir à travers les stomates des feuilles dans l'air, lorsque celles-ci sont ouvertes [194].

L'accumulation des métaux dans les feuilles âgées, juste avant leur abscission diminuerait les concentrations métalliques dans la plante. En général, la concentration dans les feuilles augmente avec l'âge. Chez *Armeria maritima* subsp. *halleri*, dans les feuilles marron (les plus âgées), les concentrations en Cu, Cd, Zn et Pb sont 3 à 8 fois plus élevées que celles des jeunes feuilles [214]. Une accumulation de Cd a été également observée dans les trichomes de plusieurs espèces [106].

I. 3. 3. Phytotoxicité des éléments métalliques

I. 3. 3. 1. Au cours de la germination

Les métaux se trouvent normalement aux concentrations les plus élevées dans les racines et aux plus faibles concentrations dans les tissus reproducteurs [215] ; [216], du fait qu'ils sont séquestrés dans les vacuoles des tissus des racines et des pousses, et leur disponibilité subséquente dans le symplaste peut être faible. On pense que le transport minéral vers les graines se fait uniquement par le phloème, car le mouvement de la sève du xylème est entraîné par la transpiration, qui est limitée par l'imperméabilité du tégument [217] ; [218].

L'afflux de métaux dans les graines intactes et matures à travers le tégument est limité, ce qui confirme que les graines représentent une partie hautement protégée du cycle de vie de la plante, et qu'elles fournissent une protection importante contre le stress abiotique [219].

Bien que le tégument procure une certaine protection contre le stress métallique avant la germination, il finira par se fissurer ou devenir plus perméable lors de la germination. La littérature actuelle suggère que la germination des graines est affectée par les métaux de deux façons : premièrement, par leur toxicité générale, et d'autre part, par leur inhibition de l'absorption d'eau. La plupart des recherches montrent que chez de nombreuses espèces, la pollution par les métaux entraîne une réduction de la germination positivement corrélée à l'augmentation des concentrations [220] ; [221].

Certains métaux tels le Cd et le Cu interfèrent avec l'absorption d'eau, alors pour qu'une graine puisse germer, le potentiel hydrique de l'embryon doit passer un seuil critique. Le potentiel hydrique des graines s'est montré étroitement lié aux changements de la vitesse et du pourcentage de germination, et affecte également la vitesse de levée de dormance [222] ; [223]. Par exemple, chez *Dorycnium pentaphyllum*, il a été montré que le Cd inhibe l'imbibition des graines, et ensuite, réduit la teneur en eau des jeunes pousses [38]. Une absorption réduite d'eau a également été rapportée pour les graines de sorgho [224], et pois [225] exposées au Cd, et à la germination des graines de riz après traitement au Cu [226].

Selon LI et al. [220], les effets inhibiteurs des métaux sur la germination sont réversibles dans certains traitements métalliques et irréversibles dans certains d'autres, En

fait, les effets toxiques du Cu sur la germination des graines d'*Arabidopsis* étaient réversibles après rinçage des graines.

En étudiant les effets des métaux essentiels (Cu et Zn) et non essentiels (Hg, Pb et Cd) sur la germination des graines et la croissance des plantules chez *Arabidopsis*, LI et al. [220], ont montré que les concentrations d'ordre milli-molaire réduisent les taux de germination, la croissance des pousses est généralement plus sensible à la toxicité des métaux que la germination des graines, sauf pour le Cd, qui inhibait les deux à la même concentration. En outre, la croissance des racines et de l'hypocotyle a été sévèrement atteinte et complètement inhibée par des concentrations relativement faibles, et qui ont eu peu d'effet sur la germination.

Il existe des variations inter et intra-spécifiques de la germination des graines et de la réponse des plantules au stress métallique. Cependant, les données limitées disponibles suggèrent qu'il existe une tendance selon laquelle les graines de plantes tolérantes aux métaux peuvent généralement germer à des concentrations de métaux plus élevées, et que les micronutriments essentiels causent des dommages uniquement à des concentrations relativement élevées, comme indiqué pour le Zn et le Ni [227] ; [221].

Les graines contiennent des enzymes et des protéines liées à la membrane, mais de nombreux types de graines accumulent également des protéines en tant que réserves de stockage importantes. Les protéines peuvent subir une modification oxydative par réaction directe avec les ROS (Reactive oxygen Species), et aussi par interaction avec les produits aldéhydiques de la peroxydation lipidique. Les aldéhydes produits par peroxydation lipidique peuvent initier des réactions de Maillard (brunissement), par condensation non enzymatique avec des groupes amino libres de protéines, ou d'acides nucléiques [221]. Certaines enzymes telles la glutathion réductase (GR), la catalase (CAT) et l'ascorbate peroxydase (APX) semblent être très sensibles aux produits Maillard, ce qui réduit la capacité de réparer les dommages oxydatifs pendant la germination [228].

Beaucoup des effets toxiques des métaux résultent des dommages oxydatifs découlant de la génération de ROS [229] ; [230]. Les ROS peuvent réagir avec les acides nucléiques, affectant ainsi le code génétique de l'embryon, et peuvent réagir avec les réserves des graines telles que les protéines et les lipides. Par conséquent, les ROS peuvent compromettre la germination et l'établissement des jeunes plants avec des effets potentiellement mutagènes sur la génération suivante de plantes [221].

L'exposition aux métaux induit l'inhibition des protéases neutres, acides et alcalines au cours des premiers stades de germination des graines chez certaines céréales et légumineuses, ce qui correspondait à l'accumulation d'inhibiteurs de la trypsine [231].

La phytotoxicité des concentrations excessives de métaux est, en partie, due aux dommages causés aux acides nucléiques dans les graines en développement ou en germination. En fait, en plus des modifications des bases, la liaison du métal au noyau cellulaire provoque d'autres dommages pro-mutagènes, y compris la réticulation inter et intramoléculaire de l'ADN et des protéines, les ruptures des brins d'ADN, les réarrangements et la dépurination [156].

I. 3. 3. 2. Au cours de la croissance

Plusieurs métaux se retrouvent en même temps dans les sols pollués. Cette coexistence peut jouer un rôle dans l'intensité de leur phytotoxicité. Le danger des métaux réside non seulement dans les dommages cellulaires qu'ils peuvent occasionner, mais également dans les déséquilibres nutritionnels [232] ; [233] engendrés en entrant en compétition avec d'autres éléments essentiels [234]. Le cuivre, le nickel et le cadmium peuvent provoquer des carences en d'autres cations (Ca, Mg, Mn, Fe, Zn) en interagissant avec ces derniers au niveau des rhizosphères [235]. La grande affinité du mercure pour les groupements thiols provoque un déplacement des métaux essentiels de leurs sites de liaison [236]. Ceci peut provoquer un arrêt partiel ou complet du métabolisme cellulaire (arrêt de certaines activités enzymatiques, déstructuration des protéines ou de l'ADN, perturbation de l'équilibre osmotique ou création d'espèces activées de l'oxygène...) [191].

CSEH [237], montre qu'aucun transporteur spécifique de métaux lourds n'a pour encore été identifié, et en raison de la similarité chimique (même taille) existant avec d'autres cations, il est probable qu'ils peuvent utiliser les mêmes systèmes de transport de ces cations.

L'effet le plus habituel et le moins spécifique des métaux lourds consiste en une réduction de la croissance des différentes parties de la plante [209]. La phytotoxicité des métaux lourds peut être occasionnée directement ou indirectement sur tous les processus physiologiques végétaux [238] ; [239]. Les effets toxiques préliminaires sur les plantes sont : la catalyse des enzymes [240] ; [241], la dégradation de la membrane cellulaire [242], et l'inhibition de la croissance des racines [243], [244]. Ces changements causent de

nombreux effets secondaires comme l'inhibition de la photosynthèse [245] ; [246], le déséquilibre hormonal [247], et certaines déformations structurales des plantes [248]. Selon l'importance du stress, les feuilles peuvent présenter une chlorose due à la fois à une perte de chlorophylle, à une relative augmentation des taux de caroténoïdes, et à une déficience en fer [246]. Dans les cas les plus sévères, une apparition de tâches nécrotiques est observée [249]. La diminution de la conductivité hydraulique racinaire induite par les métaux est souvent associée à la fermeture des stomates ; entraînant ainsi une réduction de la transpiration [250] ; [251] ; [252]. Les métaux induisent également un abaissement de la photosynthèse qui résulte soit d'un effet direct sur le transport des électrons et les enzymes du cycle de Calvin (en particulier de la Rubisco), soit d'un effet indirect, en raison d'une diminution de la teneur en chlorophylle [253] ; [254] ; [255], et modification de la structure des chloroplastes [256] ; [257].

Le cadmium est un métal de transition purement toxique pour la cellule. Sa solubilité élevée fait de lui l'un des métaux lourds les plus dangereux après le mercure [258]. Chez les plantes, le cadmium n'a aucune fonction biologique connue [259], et il est toxique à de faibles concentrations [260]. Le cadmium et le zinc partagent des propriétés physiques et chimiques et sont souvent associés dans les minerais. Des interactions, tantôt antagonistes tantôt synergiques, sont fréquentes entre ces deux métaux. Plusieurs études, ont montré, par exemple, que le zinc pouvait diminuer l'absorption du cadmium par la plante [261].

Le ralentissement de la croissance racinaire par le Pb, et les métaux lourds en général [262], peut résulter d'une inhibition de la division cellulaire [263] ; [264] ; [265]. D'autre part, la présence de Pb induit indirectement une contrainte oxydative et par conséquent, la production d'espèces activées de l'oxygène (ROS) [266].

- *Induction des espèces réactives de l'oxygène*

Les ions métalliques peuvent être très toxiques en activant les formes réduites de l'oxygène aboutissant à la formation accrue des espèces réactives de l'oxygène ou ROS [265] ; [266] ; [267] ; [268]. Ces dernières réagissent avec les macromolécules telles que les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Les ROS altèrent la composition lipidique des membranes plasmiques ce qui est à l'origine d'une peroxydation membranaire. Ils sont à l'origine d'une activation ou une désactivation de plusieurs enzymes tels que les enzymes intervenant dans le métabolisme oxydant. Au niveau du noyau, les ROS entraînent des

dommages au niveau de l'ADN d'où une stimulation de la synthèse des poly (ADP-ribose) et une modification de l'expression de gènes. Il peut en résulter une altération des fonctions vitales de la cellule, conduisant parfois à sa mort [156] ; [192]. Lorsque la quantité de ROS générée dépasse les capacités antioxydantes de l'organisme, la toxicité des ROS s'exprime par de nombreux aspects, et en particulier, par la perturbation de nombreux processus physiologiques comme la photosynthèse [269] ; [270]. Cette toxicité s'explique par la réactivité des ROS, en particulier celle de l' OH^\cdot , envers les macromolécules biologiques.

Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation. En effet, les cations d'éléments comme Fe, Cu, Cr ou Mn sont capables de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. Les radicaux libres sont des espèces chimiques neutres ou chargées présentant dans leur orbite électronique externe un électron non apparié dit célibataire. Le radical libre est instable et très réactif et pour devenir stable, il doit appairer son électron ou bien céder le sien à une autre molécule. Chacune de ces réactions aboutit à la formation de nouveaux radicaux libres. Dans les cellules végétales, les chloroplastes, les mitochondries et les peroxyosomes sont les principales sources génératrices des ROS [271] ; [272] ; [273].

Les radicaux libres sont des espèces chimiques qui possèdent un électron célibataire qui, parce qu'il n'est pas apparié à un autre électron de spin opposé, confère à la molécule une très forte réactivité. Le radical hydroxyle OH^\cdot , produit au cours de cette réaction, est un puissant agent oxydant [112].

Par ailleurs, même des métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation, tels que le cadmium et le nickel par exemple, peuvent induire une accumulation de ROS pour trois raisons : une perturbation de certaines voies métaboliques, une inactivation et un «down régulation » des enzymes du système anti-oxydant, ou un épuisement du stock de molécules de faible masse moléculaire comme l'ascorbate, le glutathion, la vitamine E ou les caroténoïdes, qui présentent des capacités anti-oxydantes [192].

Plusieurs auteurs ont montré que les métaux lourds (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+}) causent des aberrations chromosomiques en induisant des micronoyaux, des ponts et des fragments de chromosomes [274] ; [275] ; [276] ; [277]. Ils altèrent le fonctionnement du fuseau mitotique et leur interférence avec la division cellulaire peut induire une inhibition de l'élongation racinaire [278] ; [279].

L'ADN est une molécule très sensible à l'attaque par les ROS générés par les métaux lourds. Cinq classes principales de dommages oxydants via OH[•] peuvent être induites, parmi lesquelles, les bases oxydées, les sites abasiques, des adduits intra-caténaux, des cassures de brins et des pontages ADN-protéines [280].

I. 3. 4. Tolérance aux métaux

I. 3. 4. 1. Tolérance au cours de la germination

Les graines mises en germination en présence d'excès d'éléments métalliques réagissent par deux stratégies majeures : la chélation et la séquestration et/ou induction du système anti-oxydant pour les métaux causant un stress oxydatif.

Les principaux chélateurs de métaux dans les graines semblent être les ferritines et les métallothionéines, avec moins de rapports sur l'implication des acides aminés ou des acides organiques dans la chélation des métaux dans les graines. Les ferritines sont une famille de protéines de stockage du fer présentes dans les plantes, les animaux, les bactéries et les champignons [281]. Chez les plantes, ils se trouvent dans les chloroplastes et s'accumulent dans les plastes non verts de la tige, de l'apex des racines, des graines et des nodules [221]. BRIAT ET LOBREAUX [282], rapportent que l'abondance d'une sous-unité de ferritine (FER2) dans les graines augmente pendant la maturation, mais est ensuite dégradée pendant la germination. Ceci a conduit à l'hypothèse que la ferritine des graines représente un pool de Fe, qui est mobilisé pendant la germination pour fournir du Fe requis pour les protéines contenant du Fe impliquées dans la photosynthèse. Les preuves de la présence de phytochélatines dans les graines sont rares, ce qui reflète peut-être les faibles niveaux de métaux dans les graines par rapport aux autres tissus [221].

Une petite molécule qui peut avoir une importance en tant que chélateur des métaux, en particulier dans les graines, est l'acide phytique (myo-inositol hexa kis phosphate). L'acide phytique est la principale forme de stockage de P dans les graines, représentant 50 à 80% de la teneur totale en P des graines matures. L'acide phytique est un anion à pH physiologique, et en tant que tel, est capable de chélateur les cations nutritifs tels que K, Mg, Ca, Fe, Zn et Mn ; le complexe de phytate est ensuite séquestré dans des vacuoles de stockage de protéines jusqu'à ce qu'il soit utilisé pour la germination et la croissance des plantules [221].

Selon DORIA et al. [283], la chélation de Fe empêchera la génération de ROS via la réaction de Fenton, et l'acide phytique peut alors fournir une protection contre la toxicité des métaux dans la graine. À l'appui de cette hypothèse, un mutant de maïs déficient dans la synthèse de l'acide phytique au cours de la maturation des graines, a montré des niveaux accrus de H₂O₂ et de teneurs élevées en Fe libre dans la graine.

L'ascorbate (AsA) et le GSH sont les principaux antioxydants à petites molécules présents dans les plantes et jouent un rôle clé dans l'homéostasie des ROS. Pendant la germination des graines et la croissance des plantules en présence de métaux, des changements dans les niveaux d'AsA et de GSH ont été rapportés. Par exemple, l'ascorbate (AsA) a augmenté dans les pousses de riz sous contrainte de Ni, alors que les concentrations de GSH sont diminuées. En dépit d'une augmentation des activités des enzymes du cycle ascorbate-glutathion, cela s'est accompagné d'une baisse du rapport de l'AsA et du GSH réduits à leurs formes oxydées correspondantes, le déshydro ascorbate et le disulfure de glutathion, respectivement [227].

Dans les semences, les preuves sont rares, ce qui indique que le principal moyen de faire face au stress des métaux est d'employer des stratégies d'évitement. Des changements dans le système antioxydant ont été plus largement rapportés chez les pousses après la germination et la croissance en présence de métaux, et le modèle de réponse antioxydante aux métaux semble varier en fonction du type et de la concentration des métaux, ainsi que des espèces végétales [221].

I. 3. 4. 2. Tolérance au cours de la croissance

○ *Protection pariétale et contrôle plasmique*

Les différents groupements chimiques de la paroi peuvent, participer à différentes réactions incluant les échanges ioniques, l'adsorption, la complexation, la précipitation ou la cristallisation, permettant la séquestration des ETM dans la paroi lors d'un stress métallique [284].

Chez *Sedum alfredii* tolérant au Zn [285], et chez *Silene vulgaris*, la tolérance repose sur la capacité de la plante à maintenir son intégrité membranaire [286]. Il existe de nombreux transporteurs intervenant dans le déplacement des éléments métalliques dans les cellules végétales. Certains permettent aux ions métalliques de traverser la membrane plasmique, tels que les CNGC, ZIP, NRAMP et les pompes ATPases de type P. Une fois

entrés dans la cellule, ces éléments peuvent être chélatés ou non à des molécules comme le GSH ou les PCs et sont pris en charge dans le symplasme ou stockés dans des vacuoles grâce à d'autres transporteurs, tels que des CDF, des antiports cation/H⁺ et des transporteurs ABC [43].

- *Induction du système antioxydant*

Le stress oxydant ; conséquence naturelle du métabolisme de l'oxygène, est normalement contrôlé par des systèmes endogènes de défense antioxydante. Les antioxydants cellulaires peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques [287]. HALLIWELL ET GUTTERIDGE [288] appellent antioxydante « toute molécule qui, présente en une faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou empêche significativement l'oxydation de ce substrat ».

- *Principaux antioxydants enzymatiques*

Les cellules végétales possèdent de nombreuses voies de dégradation enzymatique des ROS. Certaines enzymes n'utilisent pas de co-substrat pour réduire les ROS. Au contraire, d'autres utilisent plusieurs co-substrats dont certains antioxydants (ASC, GSH) [207]. Trois activités enzymatiques clefs occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxification des ROS : il s'agit des superoxyde-dismutases (SOD), des catalases (CAT) et des peroxydases (POX).

Les superoxyde-dismutases (EC 1.15.1.1) sont des métallo-enzymes se retrouvant dans l'ensemble du monde du vivant, mis à part dans quelques microorganismes [289]. Les POX (EC 1.11.1.x) sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons. Dans certaines conditions, une partie des POX (classe I et III) peut avoir une activité similaire à la catalase (catalase-like), c'est-à-dire qu'elles possèdent la capacité de réduire l'H₂O₂ en absence de co-substrat [290]. Les catalases (EC 1.11.1.6) sont des enzymes majoritairement peroxysomales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène [270].

- *Principaux antioxydants non enzymatiques*

L'acide ascorbique ou vitamine C (ASC) ; un des principaux acides faibles de la cellule végétale [291] ; [292]. Le glutathion ; un thiol très abondant se retrouvant de façon ubiquitaire chez les plantes, les animaux et les végétaux [293] ; [294]. La vitamine E

désignant un groupe de composés lipophiles possédant l'activité biologique de l' α -tocophérol. Ce groupe comprend les α -, β -, γ -, et δ -tocophérols et les α -, β -, γ -, et δ -tocotrienols. Des huit molécules composant le groupe de la vitamine E, l' α -tocophérol possède la plus grande activité biologique [295]. Les caroténoïdes ; pigments végétaux lipophiles formant une famille de plus de 600 molécules. Les caroténoïdes associés au PSII ou à l'antenne collectrice, participent à la protection de l'appareil photosynthétique contre les ROS [296] ; [297].

○ *Rôles physiologiques des ROS et signalisation oxydative*

En dehors des mitochondries, chloroplastes et peroxysomes, des quantités importantes de ROS (en grande partie de l' H_2O_2) sont produites au niveau des parois. Cette libération localisée d' H_2O_2 répond à deux rôles contradictoires. D'une part, elle contribue à un relâchement pariétal permettant la croissance cellulaire [298] ; [299]. D'autre part, elle limite l'élongation cellulaire en favorisant la rigidification pariétale par lignification [298]. Les ROS jouent un rôle important dans le système de défense contre les pathogènes [300] et permettent la lignification et le déclenchement d'autres processus comme la mort cellulaire programmée [301]. Elles jouent le rôle d'une molécule signal et alertent la cellule de la présence du stress environnant [302]. Au contact de certains champignons ou bactéries, différentes enzymes apoplastiques ou membranaires produisent une flambée oxydative [303] ; [304] ; [305]. Cette flambée contribue à détruire une partie des microorganismes et entraîne toute une série de mécanismes de signalisation permettant à la plante de mettre en place des systèmes de défense [207].

Les ROS participent également à des processus physiologiques comme la fermeture des stomates [306], le gravitropisme [307], la subérisation des cellules épidermiques [308], ou encore la régulation des canaux calciques et potassiques [309].

FOYER ET NOCTOR [310], ont proposé de réévaluer le concept de stress oxydatif en distinguant la signalisation oxydative du stress oxydatif. En effet, la flambée oxydative, induite par différents stress, modifie le statut redox cellulaire. Ce mécanisme de réduction/oxydation agit comme un « interrupteur » de l'activité de nombreuses enzymes intervenant notamment dans les événements de signalisation (protéines kinases) et dans le contrôle du cycle cellulaire [207].

Les ROS et le statut redox participent ainsi, par l'intermédiaire de cette régulation redox, ou par d'autres mécanismes, à l'activation de nombreuses cascades de transduction du signal (protéines kinases, signalisation calcique). Le statut redox est considéré comme un véritable senseur de l'état physiologique de la cellule, toute flambée oxydative étant la conséquence indirecte d'un stress. La redondance des systèmes de production de ROS et des systèmes de détoxication permet une régulation fine du signal transmis et une réponse appropriée de la cellule. En fait, même s'il existe des mécanismes de réponses communs, il apparaît que les voies de signalisation ne sont pas régulées de la même façon pour les différents types de stress. En effet, les cellules ne répondent pas d'une façon identique à un stress biotique ou abiotique [207].

En résumé, le système antioxydant cellulaire maintient l'homéostasie redox intracellulaire, en prévenant l'accumulation de ROS toxiques, tout en permettant la signalisation via les ROS [311].

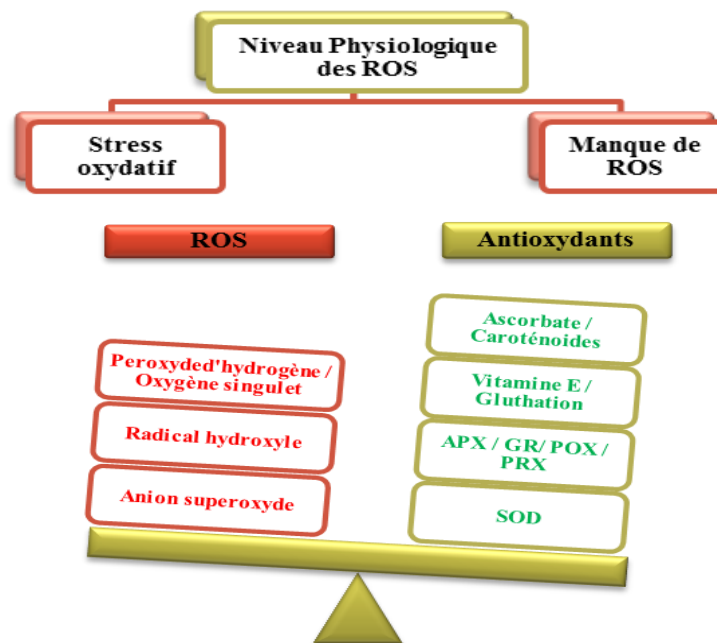


Figure I. 3. 2. Schématisation de la balance entre les ROS et les antioxydants (POURRUT, 2008) [298].

- *Chélation et compartimentation cellulaire*

Une stratégie pour que les cellules neutralisent les ions non-essentiels et l'excès des ions essentiels, est la synthèse de ligands organiques intracellulaires, qui assurent la

complexation et donc la détoxification de nombreux ions métalliques. Chez les plantes, il existe plusieurs types de ligands : polypeptides et acides organiques aminés [112].

Les phytochélatines (PCs) sont des structures composées de deux à 11 répétitions du dipeptides γ -GluCys. Elles possèdent en C-terminal, un acide aminé variable : glycine, γ - alanine, serine ou acide glutamique [312], et sont classées en fonction de cet acide aminé terminal. La synthèse des PCs est induite par de nombreux métaux [313] ; [314]: ceux-ci se lient à une enzyme constitutive, la phytochélatine-synthase (PC synthase) [315], qui catalyse la biosynthèse de la PC à partir du glutathion (GSH). L'expression de la phytochélatine-synthase a été signalée dans les feuilles, les racines, les tiges et les cotylédons d'*Arabidopsis*, ainsi que dans les racines et les tiges des plants de tomate [316]. Les phytochélatines jouent un rôle dans la détoxification des métaux par des ions métalliques chélatants, et les complexes phytochélatine-métal sont transportés dans la vacuole par l'intermédiaire de transporteurs ATP-dépendants [312] ;[317]. Par exemple une molécule de PC se lie à un ion Pb^{2+} [318]. Les complexes PC-métaux lourds peuvent ensuite, être séquestrés dans les vacuoles [312] ; [314]. Le cadmium forme avec les phytochélatines des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight (LMW)). Le complexe PC-Cd (LMW) n'affecte pas le métabolisme au niveau du cytoplasme.

Le glutathion (GSH ; γ -glutamyl-cysteinyl-glycine) est un tri-peptide synthétisé, dans le cytosol et les chloroplastes [319], à partir de molécules de cystéine et de glutamate, par deux enzymes : l' γ -glutamylcystéine synthétase (γ -ECS), et la glutathion synthétase (GSHS) [320]. Le GSH peut former des complexes avec les ions métalliques comme le Pb ou le Cd [321]. Cette réaction de conjugaison se fait grâce à une enzyme ; la glutathion-S-transférase (GST) [322] ; [323].

Les métallothionéines (MTs) sont des protéines de faible poids moléculaire (6-7KDa) riches en résidus cystéines présentant trois motifs conservés : Cys-Cys, Cys-X-Cys et Cys-X-X-Cys. La transcription des gènes de MT est induite par les métaux lourds via des « Metal Response Element » (MRE) qui sont présents en une ou plusieurs copie(s) au niveau du promoteur proximal de ces gènes [324]. Les métallothionéines sont codées par des gènes qui sont classés en deux groupes (MT1 et MT2). Chez certaines plantes supérieures, incluant *A. thaliana*, on a remarqué l'existence de deux autres types de métallothionéines, MT3 et MT4 en plus des classes 1 et 2 de métallothionéines [325].

En raison de la réactivité des ions métalliques avec les atomes de soufre, d'azote et d'oxygène, les acides carboxyliques et les acides aminés sont des chélateurs potentiels : les acides carboxyliques, les acides organiques comme le citrate, l'oxalate ou le malate, et les acides aminés comme l'histidine et la proline. Ils peuvent avoir un rôle important dans la tolérance des plantes aux métaux, et dans la détoxification de ces éléments [318] ; [326]; [327]. À titre d'exemple, des complexes Cd-citrate ont été identifiés dans la sève xylémique collectée chez la tomate traitée par le cadmium [328].

Une des hypothèses les plus fréquentes pouvant expliquer le phénomène de tolérance serait attribuée à la compartimentation accrue des métaux lourds sous forme ionique dans la vacuole, grâce à plusieurs familles de transporteurs protéiques. Par exemple, un transporteur tonoplastique appartenant à la famille des protéines GTP a été identifié chez un écotype de *Silene vulgaris* tolérant au zinc. Le transport de zinc sous forme ionique dans les vacuoles dépend de la présence de magnésium et de GTP, et permet la détoxification du zinc plus rapidement que chez l'écotype sensible [329].

Après chélation du cadmium, le complexe PC-Cd (LMW) est acheminé vers la vacuole. Une fois dans la vacuole, les complexes PC-Cd (LMWs) s'agrègent les uns aux autres, par des ponts sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée (High Molecular Weight (HMW) [117]. Ce cycle se termine par la dissociation de ses complexes, à cause du pH vacuolaire, provoquant la libération des ions Cd^{2+} qui seront pris en charge par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate. Les PCs sont recyclées et réexportées dans le cytoplasme pour capter d'autres ions et les réacheminer dans la vacuole [330]. Des antiports cation/ H^+ sont situés dans la membrane de la vacuole et participent à la régulation des concentrations en Na^+ et Ca^{2+} dans le cytoplasme [331]. Un antiport $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^+$ présent sur la membrane tonoplastique a été décrit dans les racines d'avoine [332]. Cet antiport présente une faible affinité pour le cadmium mais qui est similaire à celle de l'antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. MOREL ET AL. [333] ont démontré l'implication d'une pompe ATPase dans la sequestration vacuolaire du cadmium. Des études ont montré la compartimentation du Cu ou des complexes Cu-ligands dans la vacuole [114], par exemple, chez *Datura stramonium* [334], chez *Elsholtzia splendens* [335] ou chez *Armeria maritima* [336].



Partie II
Approche
expérimentale

APPROCHE EXPERIMENTALE MATERIEL VEGETAL ET PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

II. A. Matériel végétal

Les graines utilisées pour réaliser l'ensemble des expérimentations proviennent de deux écotypes d'*Atriplex halimus* L. L'écotype Mostaganem (MOS) a été prélevé au bord de la mer (Commune de Mostaganem ; une zone littorale : Latitude : 35°58' 20,60'' Nord ; Longitude : 0° 05' 47,79'' Est), et l'écotype Relizane (REL) a été récolté sur un terrain pollué (Commune de Relizane ; zone intérieure : Latitude : 35°44' 23,88'' Nord ; Longitude : 0° 34' 20,82'' Est) (Figure II).

Les graines de chaque écotype sont prélevées à partir d'un même pied au centre d'une nappe d'arbustes d'*A. halimus*. La récolte des graines est faite le mois de Novembre.

En absence de données montrant l'état réel de la pollution en métaux lourds des zones de récoltes des graines, le choix des zones est justifié par les observations suivantes :

L'écotype Mostaganem provient du littoral, où les conditions de salinité excessive sont bien connues, en outre, la pollution marine par les métaux lourds est un problème émergeant faisant actuellement l'objet de débats sérieux en Algérie.

L'écotype Relizane provient d'une zone fortement polluée par des ordures ménagères dispersées par tout, au bord d'un axe routier national à forte circulation d'automobiles, et dont la présence d'un oued d'assainissement des eaux usées, au centre de la zone, aggrave l'état de la pollution. Cette zone dominée par les Atriplexaies, est avérée idéale pour le prélèvement des graines, où se réunissent une pollution atmosphérique (gaz et rejets d'automobiles), une pollution hydrique (l'oued), et une pollution des sols (activité agricole à proximité et ordures diverses).

Pour l'ensemble des expérimentations, des tests comparatifs entre les réponses des deux écotypes seront établis, cela permettrait de vérifier l'hypothèse de la convenance des halophytes à la phytoremédiation des métaux lourds.

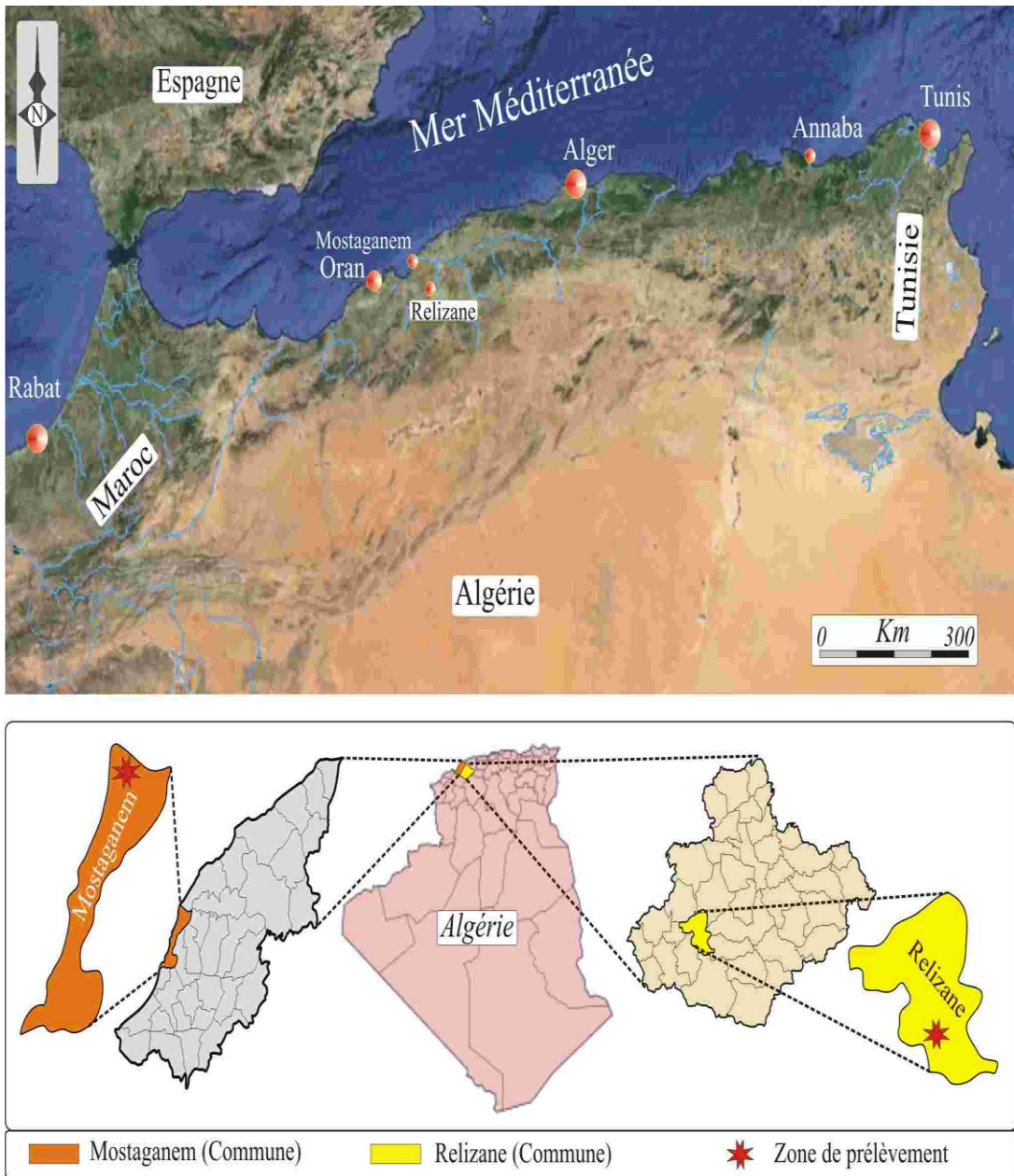


Figure II. Situation géographique des zones de prélèvement des graines d'*A. halimus* L.

II. B. Protocoles expérimentaux

Quatre expérimentations sont conduites, dont deux portent sur la germination et la croissance germinative de l'*A. halimus* L. en présence des métaux lourds, et deux autres pour tester la croissance végétative et la tolérance de cette espèce sous stress métallique :

Ainsi le premier test de germination, qui a fait l'objet du premier article, est réalisé au niveau du Laboratoire des Recherche sur les Systèmes Biologiques et Géomatique (LRSBG) à l'université Mustapha Stambouli - Mascara.

Le deuxième test de germination est réalisé au niveau du Laboratoire d'Agro Biotechnologie et Nutrition dans les zones Semi Arides (LABNSA) trouvant à l'université Ibn Khaldoun - Tiaret.

La troisième expérimentation, conduite en hydroponie, est réalisée au niveau d'une serre semi-automatique à l'université de Mascara. Dans la serre, les températures diurnes sont comprises entre 20°C et 27°C. L'hygrométrie est de l'ordre de 40 à 60%. Les mesures et analyses correspondantes sont faites au laboratoire précité (LRSBG).

La quatrième expérimentation, réalisée en pots, est conduite sous une serre semi-automatique trouvant à l'université de Tiaret. Les analyses correspondantes sont faites au laboratoire (LABNSA).

Les protocoles expérimentaux, ainsi que les méthodes d'études des quatre expériences, sont détaillés dans les chapitres correspondants suivants :

Chapitre 1 : Impact du cadmium, du zinc et du plomb sur la germination des graines d'*Atriplex halimus* L.

Chapitre 2 : La longueur cellulaire de la racine peut-elle expliquer le taux de germination sous stress métallique ? « *Effets du cadmium, du zinc et du plomb sur la germination des graines et la croissance des racines d'Atriplex halimus* L. ».

Chapitre 3 : Impact de l'accumulation des métaux cadmium, zinc et plomb sur la croissance de l'*Atriplex halimus* L. (Amaranthaceae), en conduite hydroponique.

Chapitre 4 : Tolérance aux métaux lourds de l'*Atriplex halimus* : Réponses physiologiques et osmorégulation.

Chapitre 1

**Impact du cadmium, du
zinc et du plomb sur la
germination des graines
d'*Atriplex halimus* L.**

CHAPITRE 1

IMPACT DU CADMIUM, DU ZINC ET DU PLOMB SUR LA GERMINATION DES GRAINES D'*ATRIPLEX HALIMUS* L.

II. 1. 1. Introduction

Les sols sont des réservoirs de métaux lourds : arsenic (As), cuivre (Cu), cadmium (Cd), manganèse (Mn), nickel (Ni), plomb (Pb) et zinc (Zn). Ces importants polluants sont générés continuellement par l'activité anthropogénique : agriculture, industrie et exploitations minières [337] ; [89].

Certains métaux, tels Cu, Zn, Co, Fe et Mn, sont essentiels pour le métabolisme cellulaire, ils agissent en tant que cofacteurs des enzymes [338] ; [339] ; [340]. Certains d'autres comme Cd, Pb, Hg (mercure) et Ag (argent) sont toxiques pour les organismes vivants, ils inhibent l'activité enzymatique, et activent les mécanismes de défense dans les cellules [341] ; [342]. Une alimentation excessive en microéléments essentiels et/ou en certains qui sont inutiles peut provoquer, à partir de certains seuils, des toxicités tant chez les végétaux que chez les animaux [343].

Les concentrations critiques des métaux dans les plantes (en mg.Kg⁻¹ MS) sont de l'ordre de 150 pour le zinc, 5 pour le plomb, et de 1,1 pour le cadmium [344].

Plusieurs espèces appartenant au genre *Atriplex* sont bien adaptées à des conditions environnementales extrêmes [345]. *Atriplex halimus* L. est l'une des plus abondantes halophytes pérennes présentes dans les steppes salines algériennes en association avec *Salsola vermiculata* et *Suaeda fruticosa* [36]. La capacité de cette espèce à stabiliser physiquement les sols et sa haute tolérance aux éléments traces métalliques doivent être exploitées pour la phytoremédiation des sites contaminés par les métaux dans les zones arides et semi arides [89].

L'étude des mécanismes physiologiques assurant la survie des halophytes dans des conditions d'excès de métaux lourds est devenue une urgence [346] ; [347].

La germination est un stade critique dans le cycle de vie et du développement de plusieurs plantes désertiques. Elle assure la reproduction et, par conséquent, contrôle la dynamique des populations [348].

Peu de rapports détaillent les impacts des métaux sur le métabolisme des graines, leur viabilité et germination, par rapport aux nombreuses publications abordant les effets des métaux sur les tissus végétaux aériens et souterrains [221].

La présente étude a pour objectif de déterminer l'impact de fortes doses de métaux lourds sur la germination des graines d'*Atriplex halimus*. La tolérance est testée durant les trois étapes de la germination : imbibition des graines, percée du tégument par la radicule, et croissance de celle-ci car ces étapes conditionnent largement l'établissement de la plante, surtout dans des environnements extrêmes.

II. 1. 2. Conduite de l'expérimentation

Les graines récoltées sont séchées à l'air libre et décortiquées manuellement. L'enlèvement des valves fructifères semble éliminer les inhibiteurs chimiques restreignant la germination [349]. Après désinfection à l'éthanol à 95 % pendant 30 secondes, puis au formaldéhyde à 0,8 % pendant 10 minutes, les graines sont rincées par passage dans trois bains successifs d'eau distillée stérile de cinq minutes chacun. Les graines sont mises à germer dans des boîtes de pétri (de 9 cm de diamètre) doublement tapissées par du papier filtre stérile (Wathman 1) imbibé de 15 ml de solution test.

Les solutions tests sont préparées à partir des sulfates des métaux ($\text{Cd SO}_4 \cdot 8/3 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ et Pb SO_4), et sont fournies à des concentrations de l'ordre de 1000, 5000 et 10 000 ppm. Le traitement témoin est présenté par l'eau distillée.

Pour mieux caractériser les réponses germinatives des graines au plomb, un autre traitement a été prévu par l'ajout d'un chélateur ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) à des concentrations équimolaires (Pb-C). Le chélateur assure la solubilisation des sulfates de plomb et leur mobilisation dans le milieu de germination.

La germination a duré 14 jours et a eu lieu à 26 °C et à l'obscurité. Chaque traitement comporte 50 graines par boîte. Trois répétitions par traitement sont réalisées.



Préparation des boîtes et des solutions métalliques tests



Mise en germination dans des boîtes stériles



Incubation à 26°C et à l'obscurité

Figure II. 1. 1. Dispositif expérimental du test de germination N°1.

II. 1. 3. Mesures effectuées

La cinétique d'imbibition a été déterminée par le suivi des taux d'imbibition à chaque 3 h d'intervalle jusqu'au déclenchement de la germination (percée de la radicule). Le taux d'imbibition est déterminé par le rapport suivant : imbibition (%) = $((Pt-Pi)/Pi) \times 100$. Avec Pt: le poids au temps (t), et Pi : le poids initial (avant la mise en germination).

Le taux de germination correspond au pourcentage de graines germées après 14 jours divisé par le nombre de graines mises en germination.

La cinétique d'élongation radiculaire a été évaluée par des relevés des longueurs radiculaires de six graines par boîte tous les 2 jours.

II. 1. 4. Analyses statistiques

Les résultats sont soumis à une analyse de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel *Statbox* (Version 6. 4). Si les différences s'avèrent statistiquement significatives, une comparaison des moyennes selon le test de Newman-Keuls au seuil de 5 % est établie.

II. 1. 5. Résultats

L'analyse de la variance des paramètres de germination montre des effets hautement significatifs ($P < 0,01$) des facteurs écotype, métal et concentration sur l'ensemble des paramètres étudiés et à chaque période de mesure (Tableaux II.1. 1 et II. 1. 2). Ces résultats montrent que les métaux agissent par leur nature et leurs concentrations sur le processus de germination, et que les écotypes testés montrent des réponses différentes vis-à-vis des traitements métalliques.

Le regroupement des moyennes par le test de Newman-Keuls selon le facteur écotype montre, qu'au cours de l'imbibition, l'écotype MOS enregistre des taux plus élevés comparé à REL. Cependant, les taux de germination notés chez ce dernier écotype (93 %) sont significativement supérieurs à ceux relevés chez MOS (87 %). Quant à l'élongation radiculaire, les graines provenant de Relizane montrent des cinétiques de croissance plus élevées dans l'ensemble des traitements métalliques.

Tableau II. 1. 1. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des taux d'imbibition et taux de germination de deux écotypes d'*A. halimus*.

Variables	DDL	3j	5j	7j	9j	11j
Ecotype	1	9**	6**	9,4**	10,1***	8,7**
Métal	3	129,6***	145***	184,3***	230***	226,7***
Concentration	3	571,6***	501,3***	574,3***	626***	625,4***
Ecotype x Métal	3	1,8 ^{N.S.}	2,5**	1,2 ^{N.S.}	0,7 ^{N.S.}	0,7 ^{N.S.}
Ecotype x Concentration	3	2,1 ^{N.S.}	23,9***	22,6***	21,4***	19,7***
Métal x Concentration	9	15,5***	16,7***	21***	27,4***	27,2***
Ecotype x Métal x Concentration	9	0,9 ^{N.S.}	0,5 ^{N.S.}	0,6 ^{N.S.}	0,4 ^{N.S.}	0,4 ^{N.S.}

Les chiffres représentent les valeurs de F : * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ^{N.S.}, non significatif.

II. 1. 5. 1. Effets des métaux lourds sur la cinétique d'imbibition

L'évolution des taux d'imbibition des téguments (Figure II.1. 2) montre que les métaux Cd, Zn et Pb apportés aux concentrations précitées ont exercé des effets différents sur ce paramètre. L'analyse des variations obtenues montre des effets très hautement significatifs des facteurs métal ($P < 0,001$) et concentrations ($P < 0,001$) durant les trois périodes de mesure.

Tableau II. 1. 2. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des longueurs radiculaires de deux écotypes d'*A. halimus* L.

Variables	DDL	3j	5j	7j	9j	11j
Ecotype	1	9**	6**	9,4**	10,1***	8,7**
Métal	3	129,6***	145***	184,3***	230***	226,7***
Concentration	3	571,6***	501,3***	574,3***	626***	625,4***
Ecotype x Métal	3	1,8 ^{N.S.}	2,5**	1,2 ^{N.S.}	0,7 ^{N.S.}	0,7 ^{N.S.}
Ecotype x Concentration	3	2,1 ^{N.S.}	23,9***	22,6***	21,4***	19,7***
Métal x Concentration	9	15,5***	16,7***	21***	27,4***	27,2***
Ecotype x Métal x Concentration	9	0,9 ^{N.S.}	0,5 ^{N.S.}	0,6 ^{N.S.}	0,4 ^{N.S.}	0,4 ^{N.S.}

Les chiffres représentent les valeurs de F : * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ^{N.S.}, non significatif.

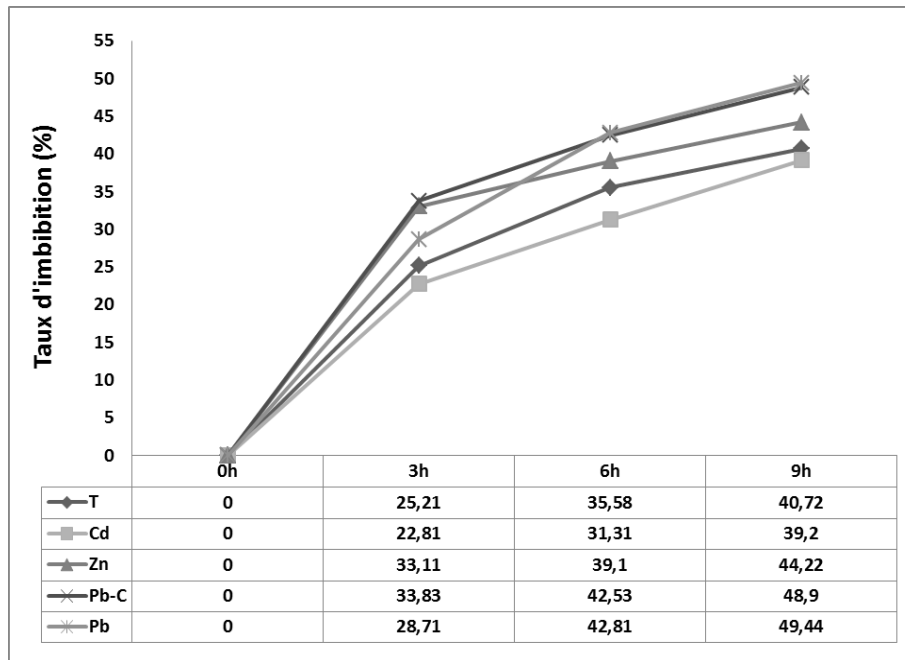


Figure II. 1. 2. Cinétique d'absorption d'eau par les graines d'*A. halimus* au cours de leur germination en présence des métaux Cd, Zn et Pb. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences individuelles (\pm SD).

L'étude de la cinétique d'imbibition illustre combien l'imbibition s'amplifie dans l'ensemble des lots. La figure II. 1. 3 montre les variations des cinétiques d'imbibition en fonction des traitements métalliques. Les résultats montrent que, dans l'ensemble des traitements et après 3, 6 et 9 heures de mise en germination, l'écotype MOS a enregistré des taux d'imbibition significativement plus élevés (31 %, 41 % et 47 %) par rapport à l'écotype REL (28 %, 36 % et 43 %). Les traitements métalliques induisent des modifications significatives des taux d'imbibition et ce par augmentation des taux : Pb, Pb-C et Zn (49 %, 48 %, 44 % respectivement), ou par réduction : Cd (39 %) par rapport aux témoins (40 %). Avec ou sans chélateur, le plomb montre des effets similaires.

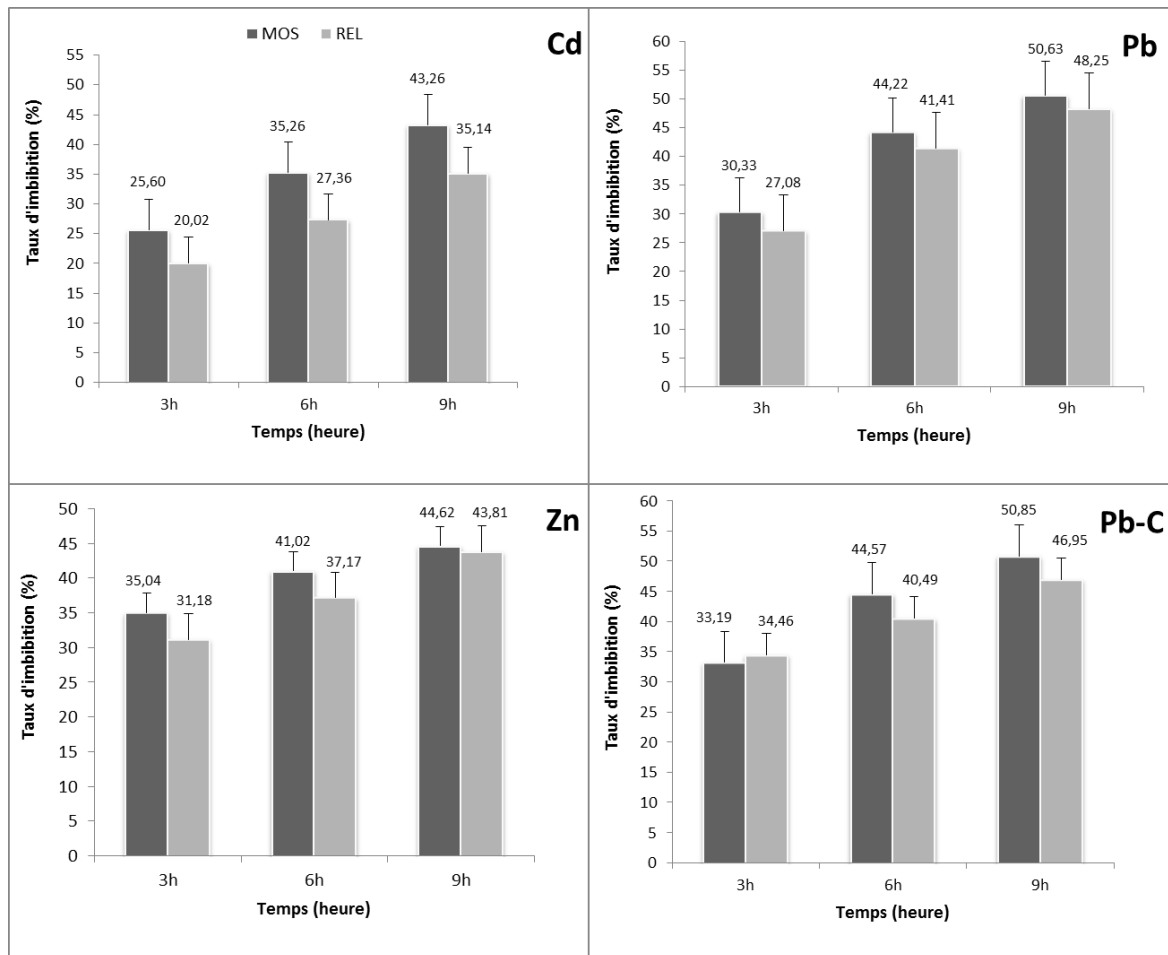


Figure II. 1. 3. Effets des métaux Cd, Zn et Pb sur la cinétique d'imbibition des graines de deux écotypes d'*A. halimus* au cours de leur germination. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences individuelles (\pm SD).

II. 1. 5. 2. Effets des métaux lourds sur le taux de germination

L'impact de doses croissantes des métaux Cd, Zn et Pb sur la germination des graines d'*A. halimus* est illustré chez les deux écotypes dans la figure II. 1. 4. Le maximum de germination (100 %) est obtenu pour le traitement témoin. Une diminution générale des taux de germination est notée en rapport avec les augmentations des concentrations des métaux. Les diminutions des taux de germination sont de l'ordre de 8 % pour 1000 ppm, 12 % pour 5000 ppm et 19 % pour 10 000 ppm de métaux. Toutefois, le pouvoir germinatif des graines demeure important, dépassant les 70 % chez les deux écotypes et pour l'ensemble des traitements métalliques.

L'analyse de l'impact des différents traitements métalliques sur la germination (Figure II.1. 5) montre que le plomb apporté sans chélateur n'a pas d'effets significatifs sur les taux de germination (95 %). Au contraire, le plomb mobilisé par un chélateur réduit significativement la germination des graines chez l'écotype MOS, du même ordre que les réductions dues à l'action du Cd chez ce même écotype.

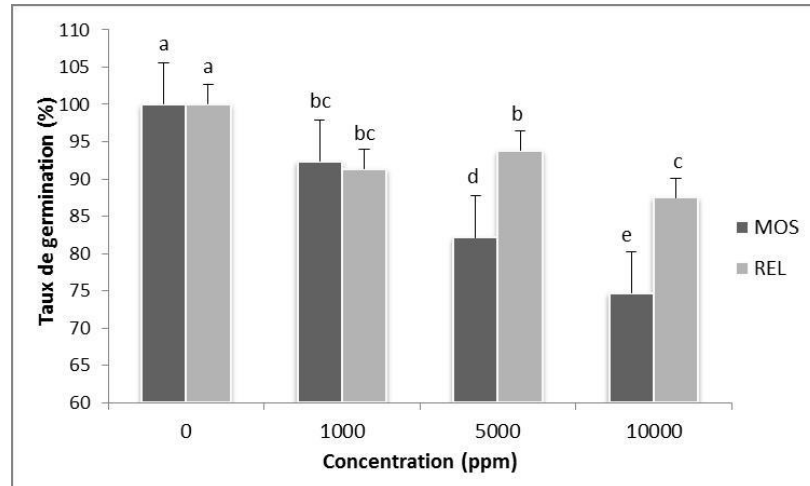


Figure II. 1. 4. Effets des concentrations des métaux Cd, Zn et Pb sur le taux de germination des graines de deux écotypes d'*A. halimus*. Les valeurs représentent la moyenne de 48 expériences individuelles (\pm SD).

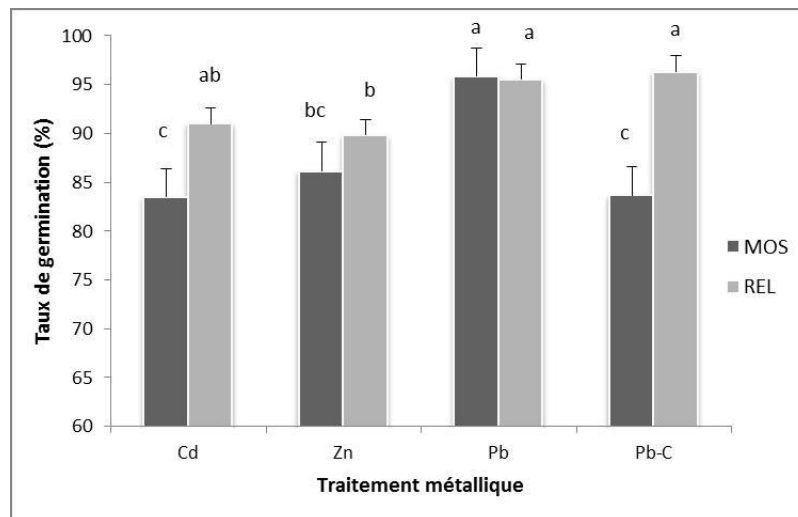


Figure II. 1. 5. Effets des traitements métalliques sur le taux de germination des graines de deux écotypes d'*A. halimus*. Les valeurs représentent la moyenne de 48 expériences individuelles (\pm SD).

II. 1. 5. 3. Effets des métaux lourds sur la croissance des racicules

L'analyse de variance des cinétiques d'élongation des racicules en fonction des traitements métalliques sont résumées dans le tableau II.1. 1. Parmi les effets d'interaction, les effets écotype x concentration et métal x concentration entraînent des variations très hautement significatives ($P < 0,001$) des longueurs des racicules.

Les longueurs maximales sont relevées en présence d'eau distillée. L'allongement se poursuit jusqu'au neuvième jour pour se stabiliser aux alentours du onzième jour pour l'ensemble des traitements (Figure II.1. 6).

Les métaux réduisent significativement la croissance des racicules. Cette réduction est d'autant plus prononcée que les concentrations sont élevées, notamment au cours de la première moitié de croissance (jours 3-5).

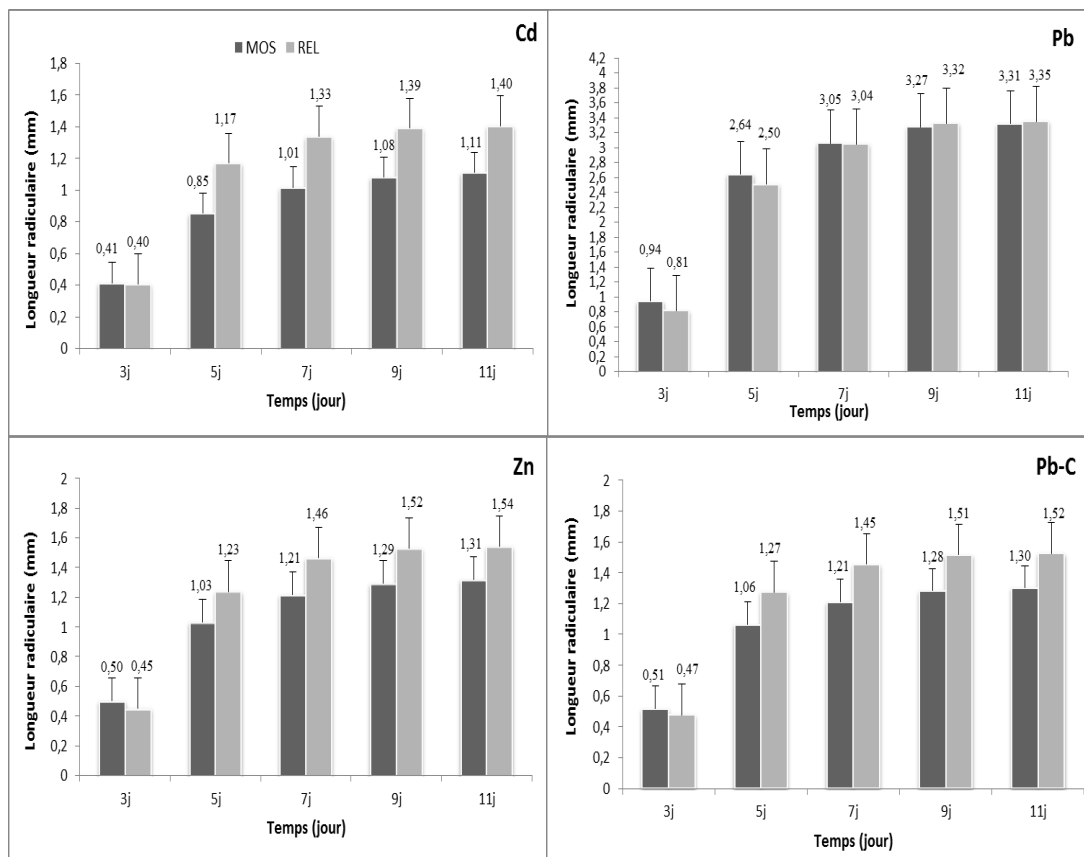


Figure II. 1. 6. Effets des métaux Cd, Zn et Pb sur la cinétique d'élongation des racicules de deux écotypes d'*A. halimus*. Les valeurs représentent la moyenne de 72 mesures individuelles (\pm SD).

Les réductions des longueurs enregistrées à la fin de l'expérimentation, par rapport au témoin, sont de l'ordre de 67 % suite à l'ajout de zinc et de plomb associé à un chélateur dans le milieu, et de 72 % pour le cadmium. Les réductions minimales des longueurs sont induites par le plomb sans chélateur (23 %). Les effets inhibiteurs du plomb ne deviennent significatifs qu'après complexation avec un chélateur (Pb-C).

L'analyse des cinétiques de croissance montre que les impacts des traitements au Zn, au Pb-C et au Cd sur l'allongement des racicules sont statistiquement similaires, cependant les effets du Cd sont plus précoces.

II. 1. 6. Discussion

Dans cette étude, la germination des graines d'*A. halimusa* été étudiée en réponse à des stress métalliques. Les deux écotypes testés, MOS et REL, ont réagi différemment aux ETM quant aux étapes : imbibition, percée de la radicule et la croissance ultérieure de la racine ; ceci peut être imputé au polymorphisme assez prononcé de cette espèce [350] ; [351] ; [352]. Les résultats montrent que le taux d'imbibition des graines est supérieur chez les graines de l'écotype provenant de Mostaganem, par rapport à celui des graines ramenées de Relizane. Ces dernières ont enregistré des taux maximums de germination et une supériorité des longueurs radiculaire. Selon KRANNER et COLVILLE [221], il existe des variations inter- et intra-spécifiques des germinations des graines soumises à un stress métallique. Chez plusieurs espèces végétales, le tégument assure une très haute protection contre les stress abiotiques, et les fortes variations interspécifiques des morphologies de ces téguments peuvent affecter leur perméabilité aux métaux [219].

Dans cette recherche, les métaux cadmium, zinc et plomb sont testés pour expliquer une part de la tolérance des graines d'*A. halimus* aux métaux lourds. Parmi ces métaux, le plomb se caractérise par une solubilité limitée. Selon HUANG et al. [353], pour la plupart des sols contaminés par le plomb, le taux du Pb dissout dans la solution du sol est moins de 0,1 % du Pb total, ainsi la disponibilité du plomb aux plantes reste limitée. Les chercheurs ont démontré que le plomb est rapidement accumulé dans les racines s'il est biodisponible dans la rhizosphère. Cependant, seule une proportion minime du métal absorbé est acheminée vers la végétation aérienne [118].

Il est souvent recommandé d'utiliser des chélateurs lors des expériences visant l'étude de l'impact du plomb sur la croissance végétale, et / ou sur l'étude des facteurs

d'accumulation et de translocation de ce métal, lors de travaux de phytoextraction *in situ* (phytoextraction induite). Pratiquement, la bibliographie abordant l'intérêt de la chélation lors des études de la tolérance des graines au plomb, est rare.

Nos résultats montrent que les graines des deux écotypes ont réagi différemment aux traitements au plomb durant les phases de germination étudiées. En effet, l'ajout d'un chélateur n'a pas modifié les taux d'imbibition des téguments des deux écotypes, cependant les taux de germination des graines de l'écotype MOS ont été réduits significativement suite à l'association avec de l'EDTA, donnant des résultats similaires à ceux obtenus pour le cadmium. La germination des graines de l'écotype REL est indifférente à la chélation. Quant à la croissance des radicules, l'application d'un chélateur a modifié significativement les résultats chez les deux écotypes. Les longueurs enregistrées en présence de l'EDTA sont statistiquement similaires à celles obtenues par le zinc et sont inférieures à celles notées chez les témoins et les plantes traitées par le plomb seul.

Un certain nombre de travaux montrent que la première étape de la germination est l'absorption d'eau et la réhydratation des graines par le processus d'imbibition [354] ; [355] ; [356]. Ce processus implique un mouvement d'eau dans le sens des potentiels hydriques décroissants [357]. Les graines d'*A. halimus* ont montré des cinétiques d'imbibition différentes en relation avec le métal en question. Le plomb et le zinc ont permis d'obtenir des taux d'imbibition plus élevés que ceux des témoins imbibés par de l'eau distillée. Ces résultats montrent que, même à des concentrations extrêmement élevées (jusqu'à 10 000 ppm) pour ces métaux, les taux d'imbibition demeurent importants et favorables à une réhydratation optimale des téguments. [358] expliquent que l'imbibition ne se réalise que si les forces de l'eau au niveau du milieu de germination sont plus faibles que celles d'appel exercées par les tissus de la graine ; en d'autres termes, le potentiel hydrique de la graine doit être inférieur à celui du milieu de germination. L'augmentation des taux d'imbibition par le Pb et le Zn pourrait être expliquée par leur adsorption sur les cellules du tégument. Ces résultats corroborent ceux trouvés par [359] qui ont montré que le tégument constitue une barrière entre l'embryon et son environnement immédiat pour l'adsorption des métaux. BRUNET [43] a expliqué l'effet inhibiteur de fortes concentrations de Zn sur la germination, et non pas sur l'imbibition, par le fait que ce métal induit ses effets après imbibition, c'est-à-dire une fois en contact avec les cellules de l'embryon et des tissus qui l'entourent. Plusieurs auteurs ont évoqué le phénomène d'adsorption d'eau en analysant l'impact des métaux sur la germination des graines [221] ;

[360]; [361]. La présence du cadmium dans le milieu de germination a limité significativement la réhydratation des téguments, tout en réduisant par la suite le taux de germination et la croissance racinaire. En 2009, [38] ont reporté le même constat en analysant l'effet du Cd sur l'imbibition des graines de *Dorycnium pentphyllum* et sur leur germination.

SEREGIN ET KOZHEVNIKOVA [362] ont trouvé que le Cd et le Pb sont adsorbés par les téguments des graines de *Zea mays* ; cependant, dans le cas du Ni, celui-ci traverse les téguments et rejoint les cellules de l'endosperme et du scutellum. Selon KRANNER ET COLVILLE [221], la perméabilité des téguments des graines dépend des propriétés physiques et chimiques des différents métaux.

Il apparaît que les graines d'*A. halimus* mettent en jeu différentes stratégies pour surmonter le stress métallique au cours de leur imbibition ; le plomb et le zinc semblent être adsorbés au niveau des téguments, et ces derniers s'avèrent mieux perméables au cadmium. L'analyse de la distribution des métaux au cours de l'imbibition des graines sera d'un intérêt certain pour expliquer en partie la forte tolérance aux métaux de cette espèce au cours de sa germination.

L'analyse des effets des métaux sur la faculté germinative des graines montre une diminution des taux de germination en passant des plantes témoins aux plantes traitées ; cependant, l'effet inhibiteur est minime et les pourcentages obtenus demeurent toujours élevés (80 % à 10000 ppm de métaux). Les taux de germination obtenus sont négativement corrélés aux concentrations en éléments pour l'ensemble des métaux testés. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par de nombreux chercheurs testant l'impact de différentes concentrations de métaux sur différentes plantes. Les résultats de ces travaux sont résumés par KRANNER ET COLVILLE [221] qui affirment qu'à de fortes concentrations les métaux entraînent un déclin des taux de germination, mais cette dernière n'est jamais complètement inhibée. En analysant l'impact des métaux lourds sur de nombreuses fonctions physiologiques vitales de la plante, [363] a admis que la germination, qui est un processus certes vulnérable au stress métallique, serait un mécanisme des plus résistants parmi les autres phases du développement de la plante. L'auteur a suggéré que les barrières tégumentaires des graines y empêcheraient une forte accumulation des métaux lourds. Selon WOOLHOUSE [238], et FERNANDES ET HENRIQUES [364] pour tout processus physiologique ou métabolique, ce sont les seuils

critiques de phytotoxicité, définis en termes d'accumulation tissulaire, qui déterminent la sensibilité aux métaux lourds. MIHOUB et al. [365] suggèrent que la germination ne doit pas être considérée comme processus tolérant ou résistant aux métaux lourds ; la vulnérabilité de la germination devrait être associée aux niveaux d'accumulation réelle des métaux qui interfèrent avec les voies métaboliques dans les tissus de la graine.

Les effets inhibiteurs des fortes concentrations pourraient être, en grande partie, expliqués par une action inhibitrice des métaux sur les enzymes chargées de la reprise de vie et sur l'édification d'une nouvelle plante, et/ou sur une inhibition des activités hydrolytiques au cours de la germination des graines exposées aux métaux lourds [366] ; [367]. L'inhibition de la germination semble dépendre du métal, de sa concentration, de la durée d'exposition des graines, de l'espèce végétale, voire même de la variété et de la graine, notamment la nature de ses téguments [368] ; [369] et a été le plus souvent imputée à des perturbations dans le métabolisme respiratoire [370] ; [371].

Chez la plupart des espèces, la germination est terminée lorsque la radicule émerge des téguments de la graine [357]. La croissance de l'hypocotyle et de l'axe racinaire est plus sensible à l'action toxique des métaux et est souvent complètement inhibée par de faibles concentrations qui ont peu d'effets sur la germination [221] ; [372] ; [373]. Les résultats dégagés de la présente étude sont cohérents avec ceux cités par KRANNER ET COLVILLE [221], confirmant l'inhibition de la croissance racinaire chez plus de 15 espèces végétales en présence de concentrations croissantes de métaux (Cr, Cd, Cu, Zn, Pb, Ni et Hg). L'analyse de l'action spécifique des métaux sur la cinétique de croissance racinaire montre que, pendant la phase d'élongation, le cadmium inhibe significativement la croissance. Cette inhibition est d'autant plus importante que les concentrations en Cd sont en augmentation. Ce résultat corrobore ceux trouvés par WEIQIANG et al. [374] montrant que les concentrations en Cu, Pb, Zn et Hg, qui entraînent une inhibition de la croissance des racicules d'*Arabidopsis thaliana*, n'inhibent pas la germination, contrairement au Cd qui inhibe la germination et la croissance racinaire à des concentrations similaires.

Après chélation par l'EDTA, le Pb a réduit significativement la croissance des racicules. La bibliographie montre que les chélateurs pourraient augmenter significativement l'accumulation de ce métal dans la plante en augmentant sa biodisponibilité [353]. En comparant l'efficacité de cinq chélateurs synthétiques sur la

désorption du Pb du sol, HUANG et al. [353] ont établi la classification suivante : EDTA > HEDTA > DTPA > EGTA > EDDHA. Selon ces auteurs, l'EDTA augmente significativement la translocation du Pb des racines à la végétation aérienne.

II. 1. 7. Conclusion

Plusieurs recherches ont mis la lumière sur les mécanismes physiologiques et biochimiques qui, ensemble avec les caractéristiques morphologiques et anatomiques d'*Atriplex halimus* L., contribuent à sa remarquable tolérance aux stress abiotiques, en l'occurrence la salinité, la sécheresse, les températures extrêmes et la contamination des sols par les éléments traces métalliques [89].

Les études de la tolérance à la salinité des graines d'*A. halimus* démontrent que, comme la plupart des halophytes, cette espèce est très sensible à la salinité au stade de la germination. En outre, les fortes concentrations de sel inhibent sa germination, mais ne tuent pas la graine [385]. Les graines des halophytes tolèrent la salinité durant leur séjour dans le sol et germent quand le niveau de salinité est réduit. Cette stratégie est un critère de tolérance au stress salin qui les distingue des glycophytes [376] ; [377] ; [378]. En analysant les mécanismes d'action du sel sur les graines d'*A. prostrata*, [379] suggèrent que l'influence du NaCl est une combinaison d'effets osmotiques et d'effets toxiques dus à l'action spécifique de l'ion.

Les résultats dégagés dans notre étude montrent qu'*A. halimus* peut germer dans des milieux fortement pollués par les métaux zinc, plomb et cadmium. De ce fait, la culture de cette espèce souvent recommandée pour la phytostabilisation des sites pollués par les métaux, pourrait être établie par semis. La cinétique d'imbibition, le taux de germination et la cinétique de croissance racinaire constitueraient des marqueurs intéressants pour le criblage d'écotypes tolérants aux métaux au cours de leur germination.

Chapitre 2

**La longueur cellulaire de la racine
peut-elle expliquer le taux de
germination sous stress métallique?
Effets du cadmium, du zinc et du plomb
sur la germination des graines et la
croissance des racines d'*Atriplex
halimus L.***

CHAPITRE 2
LA LONGUEUR CELLULAIRE DE LA RADICULE PEUT-ELLE
EXPLIQUER LE TAUX DE GERMINATION SOUS STRESS METALLIQUE?
*« Effets du cadmium, du zinc et du plomb sur la germination des graines et la croissance des racicules d'*Atriplex halimus* L. »*

II. 2. 1. Introduction

Les graines représentent les organes les plus protégés du cycle de vie de la plante [219]. La germination des graines est la première étape de vie des végétaux, et c'est l'un des processus physiologiques les plus sensibles ; elle est affectée par les interactions hormonales et les facteurs environnementaux ; stress biotiques et abiotiques [380] ; [381].

La germination est l'ensemble des événements qui commencent par l'étape cruciale de l'absorption de l'eau par la graine, et se termine par l'allongement de l'axe embryonnaire et l'émergence de la racicule à travers les structures entourant l'embryon [382]. De nombreuses contraintes environnementales peuvent compromettre la capacité des graines à germer, la salinité, le stress hydrique, l'humidité inadéquate, la température et les métaux lourds [365]. Certains métaux à faibles doses sont des micronutriments essentiels pour les plantes, mais en plus grande quantité, ils peuvent causer des troubles métaboliques et une inhibition de la croissance pour la plupart des espèces végétales [383].

Les mécanismes précis d'action des métaux sur la germination sont loin d'être compris. Il est largement inconnu où les métaux sont déposés dans les graines en développement, et quels niveaux sont toxiques pour l'embryon par rapport à l'endosperme ou aux cotylédons [231].

Les recherches menées sont plus focalisées sur la germination chez les plantes tolérantes aux métaux, en vue de comprendre les traits de tolérance induits par les ETM à différentes phases de la germination. Ainsi, différentes approches sont suivies telles l'approche protéomique [231] ; [226] ; [384] ; [385], et l'approche cytologique [222] ; [386] ; [387] ; [388]. Un modèle hydrothermal temporel a été développé [223] ; [389] et a montré que le potentiel hydrique des graines est étroitement corrélé aux changements de la

vitesse et du pourcentage de germination, et affecte également la vitesse de levée de la dormance.

DENG et al. [390], ont expliqué l'effet des faibles et hautes concentrations des métaux essentiels et non essentiels sur la germination des graines de maïs en combinant un autre stress abiotique (stress thermique : hautes températures), et en explorant l'équilibre ABA / ROS.

Atriplex halimus est un arbuste halophyte pérenne possédant l'anatomie et la physiologie photosynthétiques C4. Il pousse dans les conditions semi-arides et arides. De nombreuses études ont mis en lumière, les mécanismes physiologiques et biochimiques qui, ensemble avec les caractéristiques morphologiques et anatomiques de cette espèce, contribuent à sa tolérance notable aux stress abiotiques importants ; salinité, sécheresse, température extrême et contamination du sol par des éléments traces [89]. Plusieurs recherches ont été menées pour montrer les effets des métaux lourds sur la germination et la croissance des graines d'*Atriplex halimus* [42] ; [88] ; [391] ; [392] ; [393], Cependant, aucune donnée n'est disponible pour expliquer ces effets, et à quel niveau les métaux testés agissent.

Cette étude suppose que la germination réduite par les traitements métalliques pourrait être la conséquence d'une restriction de la croissance cellulaire de l'axe racinaire après imbibition. L'évaluation des effets des métaux lourds sur l'expansion cellulaire n'a jusqu'à présent pas été abordée.

Cette approche tend à vérifier cette hypothèse en étudiant les corrélations entre les taux de germination des graines et les longueurs des racines, à hautes concentrations de métaux, afin de couvrir les seuils de tolérance ;

Aux faibles concentrations, les corrélations seront établies entre les pourcentages de germination et les longueurs des cellules parenchymateuses des racines, et ce pour s'assurer de l'intégrité et de la viabilité des cellules.

II. 2. 2. Matériel et méthodes

II. 2. 2. 1. Préparation des graines

Les graines sont stérilisées par immersion dans l'éthanol à 95% pendant 30 secondes, puis par trempage dans du formaldéhyde à 0, 8% pendant 15 minutes, ensuite

elles sont rincées trois fois successives dans de l'eau distillée stérile. Les graines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri de 9 cm doublement tapissées par du papier-filtre (Wathman1), et imbibées de 15 ml de solution test ou d'eau bi distillée.

II. 2. 2. 2. Traitements métalliques et tests de germination

Les solutions tests sont préparées à partir des métaux ($\text{Cd SO}_4 \cdot 8/3 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et PbSO_4). Deux intervalles de concentrations sont utilisés pour étudier la germination et la croissance post-germinative.

À l'intervalle des concentrations élevées (0, 12000, 14000, 16000, 18000 et 20000 ppm), sont étudiés :

1. L'indice de vigueur des plantules (Shoot Vigor Index : SVI) déterminé au cinquième jour de mise en germination et exprimé comme étant le pourcentage de germination multiplié par la longueur de la plantule.
2. Le taux final de germination (G%) exprimé en pourcentage de graines germées après 14 jours de germination.
3. La longueur de la racine (Root length : RL) mesurée 14 jours après la germination.

À l'intervalle des faibles concentrations (0, 500, 1000 ppm) sont estimés :

1. Les taux de germination relevés 14 jours après l'installation de l'essai ;
2. Les longueurs des cellules parenchymateuses des racines (Cell length : CL) déterminées au niveau de la partie externe du parenchyme cortical. Les cellules sont isolées selon le protocole de RASCIO et al. [394] ; l'extrémité de la racine est délicatement coupée puis fixée dans une mixture d'éthanol, formol, acide acétique (17 : 3 : 1), ensuite immergée pendant 36 h dans du NaOH 6N. Les échantillons sont ensuite rincés dans de l'eau, et enfin, mis sur une lame de verre dans une goutte de safranine aqueuse à 0,1%. Les longueurs de cellules sont déterminées par un microscope couplé à un micromètre (Zeiss, Allemagne).

Trois répétitions de chaque traitement sont envisagées, avec 50 graines par boîte, les graines sont incubées à 26 °C et à l'obscurité.

II. 2. 2. 3. Analyses statistiques

Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel Statbox (version 6.1). Les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Newman-Keuls ($P < 0, 05$). Les corrélations de Pearson (r) sont établies entre la germination des graines et la croissance des racicules pour l'ensemble des traitements.

II. 2. 3. Résultats

II. 2. 3. 1. Effets des fortes concentrations de métaux lourds sur l'indice de vigueur des plantules, le taux de germination et la longueur des racicules

Les variances des trois paramètres sont analysées. Le tableau II. 2. 1 montre des effets très hautement significatifs des facteurs « écotype », « métal » et « concentration » sur l'indice de vigueur des plantules, le taux de germination et la longueur des racicules.

La comparaison des moyennes du facteur « écotype » selon le test de Newman-Keuls, montre que l'expression de l'écotype REL est meilleure par rapport à MOS pour les trois paramètres étudiés. À fortes concentrations, les métaux réduisent considérablement l'indice de vigueur des pousses, le pourcentage de germination et la longueur des racines (figures II. 2.1, II. 2. 2 et II. 2. 3).

Pour le SVI, les résultats indiquent que 73% des réductions sont causées par le plomb, et qu'environ 81% sont réduits par le zinc et le cadmium comparés aux témoins. En ce qui concerne le taux de germination, environ 23%, 29% et 40% sont respectivement réduits par le Pb, Cd et Zn par rapport aux témoins.

Les résultats montrent que le Cd, le Zn et le Pb réduisent respectivement la longueur des racines de 80%, 78% et 63% par rapport aux témoins.

La comparaison des effets des métaux selon le test de Newman-Keuls, sur les paramètres SVI, G% et RL, montre que le zinc affecte plus négativement le pourcentage de germination, et le plomb a le moindre effet sur SVI et RL. Le cadmium affecte plus la croissance des racicules que la germination des graines.

Nos résultats montrent que des concentrations de métaux allant de 12000 ppm à 20000 ppm induisent le même degré d'inhibition sur SVI, G% et RL. Il apparaît qu'à des

concentrations très élevées, les métaux Cd, Zn et Pb affectent la germination et la croissance racinaire par leur toxicité spécifique et non par leurs concentrations.

Tableau II. 2. 1. Effets des variables 'Ecotype', 'Métal', 'Concentration' et leurs interactions sur les variations des indices de vigueur des plantules (SVI), des pourcentages de germination (G%), et des longueurs des racicules d'*A. halimus* L. Les variations sont étudiées chez deux écotypes MOS et REL à fortes concentrations (Jusqu'à 20 000 ppm) de métaux.

Trait	DDL	SVI	G%	RL
Ecotype	1	122,99***	6,87**	25,50***
Métal	2	30,13***	10,57***	70,16***
Concentration	5	1044,69***	18,10***	566,42***
Ecotype x Métal	2	7,94***	3,44*	0,875 N.S.
Ecotype x Concentration	5	54,37***	2,57*	18,08***
Métal x Concentration	10	1,95*	3,65***	3,29***
Ecotype x Métal x Concentration	10	0,91 N.S.	2,06*	1,38 N.S.

Les valeurs représentent F, *, **, *** Significatif à $P < 0,1$, $P < 0,01$, $P < 0,001$, respectivement, N.S : non significatif.

II. 2. 3. 2. Effets des faibles concentrations de métaux lourds sur le taux de germination et la longueur des cellules racinaires

Les écotypes testés ont montré des pourcentages de germination similaires à faibles doses de métaux, mais l'écotype REL semble mieux tolérer les métaux que MOS de point de vue longueur des cellules parenchymateuses des racicules.

Les facteurs « métal », « concentration » et leurs interactions réduisent significativement les pourcentages de germination ($P < 0,001$) (Tableau II. 2. 2). Cependant, les taux de réduction restent faibles d'environ 0,5% pour le plomb, 5% pour le zinc et 17% pour le cadmium (Figure II. 2. 4). En outre, les réductions sont d'autant plus importantes que les concentrations augmentent (7% à 500 ppm et 15% à 1000 ppm de métaux par rapport aux témoins).

L'analyse de la variance des longueurs cellulaires du parenchyme cortical révèle des effets très hautement significatifs de tous les facteurs d'étude (Tableau II. 2. 2). Le tableau II. 2. 3 résume les valeurs des longueurs des cellules. Les métaux inhibent fortement la croissance cellulaire en longueur ; ces réductions sont d'environ 41% par le Zn, 44% par le

Pb et 51% par le Cd. Il semble que le plomb affecte moins la germination des graines, toutefois, sur la longueur des cellules radiculaires, ce métal permet statistiquement, le même degré d'inhibition que le zinc. Le cadmium a l'effet le plus préjudiciable sur la germination des graines et la longueur des cellules radiculaires.

Tableau II. 2. 2. Effets des variables 'Écotype', 'Métal', 'Concentration' et leurs interactions sur les variations des pourcentages de germination (G%), et des longueurs des cellules radiculaires d'*A. halimus* L. Les variations sont étudiées chez deux écotypes MOS et REL à faibles concentrations (0, 500 et 1000 ppm) de métaux.

Trait	DDL	G%	CL
Écotype	1	2,67*	196,18***
Métal	2	31,02***	15,94***
Concentration	2	25,31***	873,55***
Écotype x Métal	2	1,66 ^{N.S}	3,12*
Écotype x Concentration	2	0,1 ^{N.S}	94,75***
Métal x Concentration	4	8,43***	8,00***
Écotype x Métal x Concentration	4	2,29*	5,23***

Les valeurs représentent F, *, **, *** Significatif à $P < 0,1$, $P < 0,01$, $P < 0,001$, respectivement, N.S : non significatif.

Les longueurs des cellules sont négativement corrélées aux concentrations des métaux, ainsi, 500 ppm de métaux induisent 62% des réductions par rapport aux témoins, et 74% sont réduits par 1000 ppm de métaux.

Tableau II. 2. 3. Effets des métaux lourds sur les longueurs des cellules parenchymateuses des racines de deux écotypes d'*A. halimus* MOS et REL.

Traitement	Concentration (ppm)	Longueurs des cellules parenchymateuses	
		MOS	REL
Témoin	0	100,9 ± 16,5 b	170,9 ± 11,3 a
Cd	500	31,8 ± 2,6 ef	31,4 ± 1,7 ef
	1000	23,2 ± 1,1f	33,8 ± 16,4 ef
Zn	500	48,1 ± 2,3 e	83,3 ± 2,7 c
	1000	33,6 ± 8,5 ef	40,7 ± 15,6 ef
Pb	500	43,2 ± 5,2 e	67,0 ± 7 d
	1000	44,9 ± 17,6 e	27,9 ± 2,8 ef

Les valeurs représentent la moyenne ± ED de six répétitions (n= 6). Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les traitements selon le test de Newman-Keuls à ($P < 0, 05$).

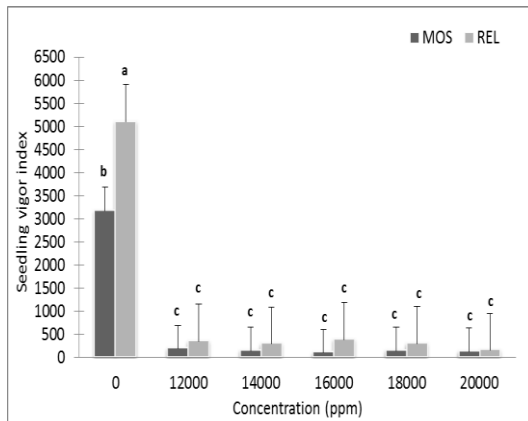


Figure II. 2. 1. Effets des métaux lourds sur l'indice de vigueur des plantules. Le SVI est mesuré sur deux écotypes d' *A. halimus* L. MOS et REL. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes (n = 3); les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (test de Newman-Keuls à $p < 0, 05$) et les barres indiquent + ES.

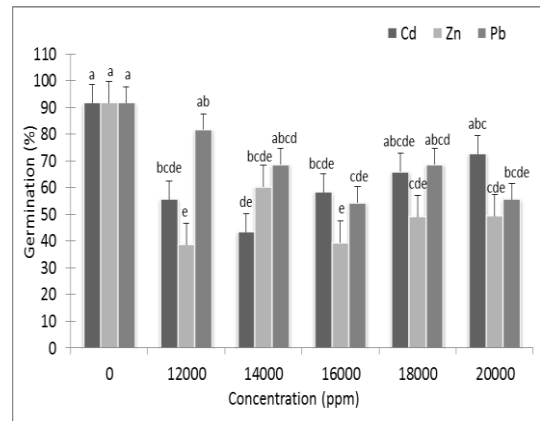


Figure II. 2. 2. Effets des fortes concentrations de métaux lourds sur le pourcentage de germination. Les valeurs sont les moyennes de 3 expériences indépendantes (n = 3); les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (test de Newman-Keuls à $p < 0, 05$) et les barres indiquent + ES.

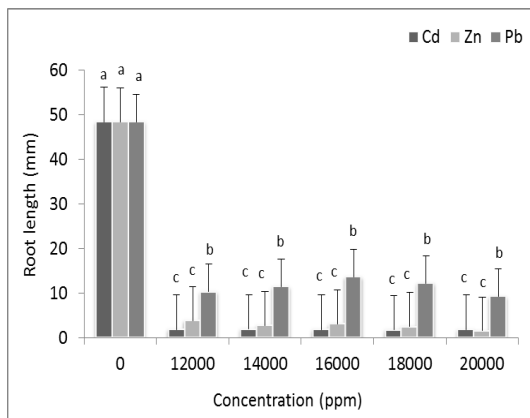


Figure II. 2. 3. Effets des métaux lourds sur la longueur de la racine. Les valeurs sont les moyennes de trois expériences indépendantes (n = 3); les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (test de Newman-Keuls à $p < 0, 05$) et les barres indiquent + ES.

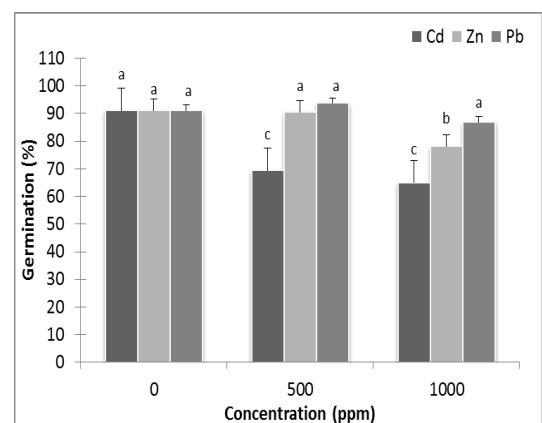


Figure II. 2. 4. Effets des faibles concentrations de métaux lourds sur le pourcentage de germination. Les valeurs sont les moyennes de six expériences indépendantes (n = 6); les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (test de Newman-Keuls à $p < 0, 05$) et les barres indiquent + ES.

II. 2. 4. Discussion

La germination et la croissance des racines sont les événements clés pour l'établissement des plantes dans n'importe quel environnement [395]. Dans cette recherche, la germination des graines et la croissance des racines d'*A. halimus* ont été étudiées à deux intervalles de concentrations des métaux Cd, Zn et Pb.

Les résultats montrent que l'écotype MOS présente une meilleure germination et meilleure croissance post-germinative que REL. Les différences dans les réponses des graines au stress métallique pourraient être expliquées par l'hétéromorphisme des graines. Selon IMBERT [396], ce phénomène est bien connu chez les Amaranthaceae.

Le polymorphisme des graines serait la conséquence d'une plasticité écologique entraînant une adaptation et une amélioration du niveau de tolérance. CHUDZINSKA et al. [397] montrent que la différenciation génétique des populations de *Pin sylvestre* poussant dans un environnement pollué est fortement corrélée à l'importante contamination par les métaux.

Dans cette recherche, les effets de fortes concentrations de métaux sur l'indice de vigueur des pousses (SVI) ont été étudiés. SUBIN ET STEFFY [398] définissent le SVI comme étant les potentialités en germination des graines et la taille des pousses vis à vis la toxicité et la tolérance aux métaux. Les résultats obtenus montrent que de telles concentrations induisent une réduction drastique de ce paramètre. Ces résultats sont en accord avec ceux de SUBIN ET STEFFY [398], qui ont signalé une tendance à la baisse du SVI chez les pousses de *Cucurbita maxima* traitées par différentes concentrations de cadmium.

Les auteurs suggèrent que la réduction de l'indice de vigueur des plantules avec l'augmentation des concentrations en Cd est probablement due à une moindre tolérance. Selon LIU et al. [399], des concentrations toxiques de cadmium réduisent le SVI en retardant la croissance racinaire en raison de l'inhibition de la division cellulaire résultant des aberrations chromosomiques.

A. halimus L. montre une germination élevée dans les sols contaminés par les métaux [42]. Les fortes concentrations en Cu, Mn, Ni et Zn (2 mM) n'affectaient pas la vitesse et le pourcentage de germination des graines d'*A. halimus* [400]. MESNOUA ET

LOTMANI [392] signalent que la germination des graines d'*A. halimus* n'a pas été influencée par le Zn ou le Cu à des concentrations allant de 50 à 4000 μM , tandis que le Cd réduisait significativement la germination des graines à 1500 μM .

Dans une étude antérieure, FATARNA et al. [393] signalaient une diminution générale des taux de germination corrélée aux augmentations des concentrations des métaux. Dans cette étude, les taux de réduction des pourcentages de germination enregistrés à fortes concentrations (de 12 000 à 20 000 ppm) sont respectivement de 23%, 41% et 40% pour les traitements au plomb, au cadmium et au zinc. Dans cet intervalle de concentrations, les métaux agissent sur la germination uniquement par leur toxicité spécifique indépendamment des concentrations fournies. KRANNER ET COLVILLE [221] ont rapporté que les graines des plantes tolérantes aux métaux et d'espèces hyperaccumulatrices peuvent avoir un seuil de toxicité nettement plus élevé que les graines des plantes non tolérantes.

Les racines sont les premières cibles affectées par les ions métalliques et leur croissance est généralement plus gravement touchée que celle des parties aériennes [401], et les expériences sur les racines sont largement utilisées pour évaluer les niveaux de toxicité des substances toxiques, y compris les métaux lourds [402]. Dans cette investigation, la tolérance des racines aux métaux sera étudiée pour comprendre certains des effets des métaux sur la germination et la croissance post-germinative.

Les résultats montrent l'effet très restrictif des métaux sur la croissance des racines. Ceci est en accord avec les nombreux travaux rapportant que la croissance des racines et de l'hypocotyle était plus sévèrement affectée et complètement inhibée par des concentrations relativement faibles qui avaient peu d'effets sur la germination [401] ; [403].

Selon YANG et al. [404], les radicules sont le premier point de contact avec les éléments toxiques, et la réduction de la croissance est généralement le premier effet visible de la phytotoxicité par les métaux. En outre, les métaux inhibent d'avantage la croissance des radicules que celle des parties aériennes.

Généralement les métaux inhibent la germination et la croissance dépendamment de leurs concentrations, cependant, le degré d'inhibition est corrélatif aux espèces végétales et aux types de métaux. Ceci est cohérent avec les rapports de KRANNER ET COLVILLE [221], indiquant que lorsqu'ils sont appliqués de manière exogène et à l'échelle micro-milli

molaire, les métaux et métalloïdes affectent souvent la viabilité et la germination des graines d'une manière strictement dépendante de leurs concentrations.

À fortes concentrations, des corrélations ont été établies entre le pourcentage de germination et la longueur des racines pour les métaux testés. Les résultats montrent des corrélations positivement significatives dans les traitements au Cd, Zn et Pb ($r = 0,57$, $r = 0,67$ et $r = 0,48$) respectivement. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la germination induite par les traitements métalliques pourrait résulter d'une restriction de la croissance de l'axe embryonnaire lorsque les métaux traversent la barrière tégumentaire de la graine. Ceci est cohérent avec les rapports de KO et al. [405], montrant que les métaux affectent le processus de germination par leurs propriétés physiques et chimiques, et en fonction de leur capacité à atteindre les tissus embryonnaires à travers les téguments. WEIQIANG et al. [374] rapportent que les embryons isolés étaient beaucoup plus sensibles aux métaux que les graines intactes.

MAHESHWARI ET DUBEY [227] rapportent que lors de l'imbibition du riz au Nickel (200 ou 400 M), le Ni était plus accumulé dans l'axe embryonnaire que dans l'endosperme, entraînant ainsi, une diminution générale du taux de germination, de la longueur des racines et des pousses, et du poids des plantules.

Pratiquement aucun travail n'a révélé jusqu'à présent la corrélation entre le taux de germination et la croissance des racines sous contrainte métallique, cependant, presque tous les travaux qui ont démontré l'effet inhibiteur des métaux sur le processus de germination ont montré également un effet inhibiteur, souvent plus prononcé sur l'élongation racinaire. SUBIN ET STEFFY [398] ont indiqué une diminution du pourcentage de germination et de la croissance des racines de *Cucurbita maxima* dans le traitement au Cd à des concentrations supérieures à 25 ppm. MIHOUB et al. [365] ont trouvé que 5 mM de Cd ou de Cu provoquent une réduction significative de la germination dès le premier jour d'imbibition, et une forte inhibition de l'élongation racinaire chez *Pisum sativum*.

Nos résultats démontrant la corrélation significative entre la germination et l'élongation racinaire, sont en accord avec les rapports précédents sur l'effet des métaux sur la germination et la croissance post-germinative, et supposent qu'un retard de l'allongement

des racines sous contrainte métallique pourrait être à l'origine de l'inhibition de la germination en présence de fortes concentrations de métaux.

Aux faibles concentrations, les taux de germination sont significativement mais légèrement affectés par les métaux. Dans ce cas, les métaux agissent par leurs toxicités spécifiques et leurs concentrations. Les faibles réductions des pourcentages de germination suggèrent que ces concentrations demeurent inférieures aux seuils de toxicité des métaux testés, notamment pour le traitement au plomb.

L'estimation des longueurs des cellules radiculaires sous contrainte métallique montre des effets hautement et négativement significatifs des métaux sur l'expansion cellulaire. Les taux de réduction sont positivement corrélés aux augmentations des concentrations.

Des corrélations ont été établies entre les pourcentages de germination et les longueurs des cellules radiculaires dans les traitements au Cd, Zn et Pb. Une corrélation positivement significative a été enregistrée dans les traitements Cd et Zn ($r = 0,71$ et $r = 0,39$ respectivement), dans le traitement au plomb, la corrélation est non significative ($r = 0,08$).

Ces résultats pourraient expliquer les corrélations significatives trouvées en haut entre les pourcentages de germination et les longueurs des racines pour les trois traitements métalliques, et qui pourraient expliquer la restriction de la germination sous stress métallique par limitation de la croissance des racines après passage des métaux dans l'axe embryonnaire. Par conséquent, il s'avère que la limitation précoce de la croissance en longueur des racines par le Cd et le Zn pourrait être due à une limitation de l'élongation des cellules radiculaires.

La germination et la dormance sont contrôlées par l'interaction entre les phytohormones et les gènes. En fait, des phytohormones spécifiques activent certains gènes, ce qui permet de réguler l'expression génique, permettant ainsi d'améliorer la germination des graines [406]. LEE et al. [407] révèlent le rôle central de l'ABA dans l'adaptation des plantes aux variations des conditions physiologiques et environnementales. Les auteurs ont montré que sous stress, les plantes produisent rapidement cette phytohormone sous forme d' α -glucosidase. GRAEBER et al. [408], ont montré que les gènes responsables de la synthèse d'ABA sont impliqués dans le processus de germination,

et que cette hormone inhibe la germination en retardant l'expansion racinaire et l'affranchissement de l'endosperme, en plus, la germination des graines est sévèrement affectée par l'expression améliorée des facteurs de transcription.

Les recherches menées par MUNZUROGLU et al. [409] ont démontré que le traitement par les métaux lourds pouvait induire l'accumulation d'ABA. L'étude des effets des métaux (Cu^{2+} , Cd^{2+} et Hg^{2+}) sur la germination des graines de maïs a confirmé que la synthèse d'ABA induite par les fortes concentrations de métaux pourrait être à l'origine de l'inhibition de la germination [390]. En fait, depuis 1970, WALTON [410] a démontré que l'ABA est un inhibiteur efficace de l'élongation cellulaire dans les embryons excisés d'haricots, et ce que l'hormone soit ajouté avant ou après le début de l'élongation cellulaire.

En outre, la surproduction de ROS (Reactive Oxygen Species) suite à la contrainte métallique affecterait la germination par entrave de l'émergence des racines [411]. Selon SCHÜTZENDÜBEL ET POLLE [229], la génération des ROS augmente les dommages oxydatifs des métaux entraînant ainsi, de nombreux effets toxiques sur les graines. KRANNER ET COLVILLE [221], signalent que le code génétique des embryons pourrait être affecté par les ROS qui atteignent les acides nucléiques. En fait, les ROS affectant la germination et l'établissement des plantules entraînent des effets potentiellement mutagènes sur la future plante.

Dans les traitements plombiques, les corrélations non significatives trouvées entre les pourcentages de germination et les longueurs des cellules radiculaires, laisse supposer que les réductions des taux de germination ne peuvent pas être imputées aux restrictions de l'allongement des cellules des racines. En fait, le plomb pourrait inhiber la germination par limitation de la l'allongement des axes embryonnaires des racines, sans limiter l'expansion cellulaire des racines.

Selon les résultats dégagés de cette étude, le plomb réduirait la fréquence de mitoses des cellules de l'axe embryonnaire. Le plomb agirait donc, sur la mèrese et non sur l'auxèse. Ceci est en accord avec les nombreux rapports démontrant ce constat pour plusieurs espèces. BHOWMIK [412] a montré des effets cytotoxiques de doses croissantes de plomb (0,001 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 mg/kg) sur *Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Trigonella foenumgraecum*, *Coriandrum sativum* indiquant que le plomb induit une réduction

progressive des index mitotiques et une augmentation des fréquences des aberrations chromosomiques, corrélativement aux augmentations des concentrations.

SILVA et al. [413], signalent un effet génotoxique du Pb sur la laitue attesté par un accroissement du nombre de cellules micronuclées, et une élévation de fragmentation de l'ADN. La toxicité significative de faibles doses de plomb qui n'affectent pas la germination et la croissance était liée aux dommages d'ADN, et aux troubles mitotiques / interphasiques. Les auteurs confirment que le Pb affecte toute la dynamique du cycle cellulaire avec des altérations plus prononcées au niveau de l'anaphase.

Selon PATRA et al. [387], les sels inorganiques de plomb (chlorures et nitrates) génèrent de nombreuses c-mitoses et diminuent l'activité mitotique menant à une forte inhibition de la croissance des racines. VENKATACHALAM et al. [414], ont décrit les principaux changements génomiques induits par le Pb sur *Acalypha indica* L. comme étant une altération de la force des amplicons d'ADN, une absence de brins normaux et l'amplification de nouveaux brins que les témoins n'en possèdent pas. De plus, peu de brins disparaissent aux fortes concentrations de Pb (500 mg. L⁻¹) par rapport aux plantes témoins.

ATIENZAR [415] a confirmé que la génotoxicité induite par les métaux lourds est due au stress oxydatif résultant des mutations générées par l'apparition de nouveaux amplicons d'ADN, et par la désintégration de l'ADN ou le réarrangement du matériel génétique. En plus, la rupture du cycle cellulaire par le plomb résulte de l'adsorption du Pb à la paroi cellulaire et aux membranes conduisant à la perturbation de l'organisation des microtubules, augmentant ainsi leur rigidité.

JIANG et al. [416], ont confirmé que la perturbation du cycle cellulaire induite par le Pb est une conséquence de la fixation du Pb sur la paroi cellulaire et aux membranes, augmentant leur rigidité, et / ou en raison de la perturbation de l'organisation des microtubules. Selon PATRA et al. [387], toutes les formes de plomb agissent de la même manière sur la mitose et la différence est notée au niveau de la biodisponibilité aux plantes.

II. 2. 5. Conclusion

Atriplex halimus L. est une espèce hautement tolérante au métal (loïde)s. Sa germination apparaît résistante à des niveaux élevés d'oligo-éléments. La germination à des concentrations élevées (jusqu'à 20000 ppm) de cadmium, de zinc et de plomb, montre que

cette plante à de fortes potentialités et pourrait avoir les caractéristiques d'une plante modèle pour élucider les stratégies impliquées dans le phénomène de tolérance des graines aux métaux.

Comprendre les mécanismes d'action des métaux sur le processus de germination et la croissance précoce des pousses peut être d'un intérêt pratique immédiat, et permet d'ouvrir de nouvelles voies en biotechnologies.

Cette étude montre que le cadmium affecte plus négativement la croissance précoce des pousses, et que les métaux testés réduisent le taux final de germination en réduisant la croissance des racines.

Le cadmium et le zinc diminuent les longueurs des racines en diminuant la longueur des cellules. Le plomb pourrait limiter l'allongement des racines par des effets génotoxiques entraînant des perturbations de l'activité mitotique.

En guise de perspectives, il serait utile d'étudier l'impact des métaux sur la plasticité des parois cellulaires et le relâchement pariétal pendant la germination à des concentrations élevées de métaux essentiels et non essentiels.

Chapitre 3

Impact de l'accumulation des métaux cadmium, zinc et plomb sur la croissance de l'*Atriplex halimus* L. (Amaranthaceae), en conduite hydroponique

CHAPITRE 3

IMPACT DE L'ACCUMULATION DES METAUX CADMIUM, ZINC ET PLOMB SUR LA CROISSANCE DE L'*ATRIPLEX HALIMUS* L. (AMARANTHACEAE), EN CONDUITE HYDROPONIQUE

II. 3. 1. Introduction

Dans les écosystèmes terrestres, les métaux jouent un rôle important pour le développement et la croissance des plantes [417]. Certains métaux à faibles doses sont des micronutriments essentiels, mais à des doses plus élevées, ils peuvent provoquer des troubles métaboliques et une inhibition de la croissance pour la plupart des espèces végétales [256]. Les métaux lourds n'ont aucune fonction pour l'organisme et peuvent être hautement toxiques lorsque leurs concentrations dépassent certains seuils [16].

Certaines plantes hyper-accumulent des métaux lourds dans leurs tissus et peuvent donc être potentiellement utilisées comme moyen efficace de remédiation [106]. La phytoremédiation est actuellement admise comme étant une alternative commerciale aux techniques conventionnelles de décontamination des sols modérément contaminés [114]. C'est une technologie relativement nouvelle et prometteuse pour les sites contaminés par des métaux lourds. La phytoremédiation est l'utilisation de plantes pour éliminer les contaminants organiques et / ou inorganiques du biote (phytoextraction), l'absorption et la conversion en formes non toxiques (phytovolatilisation), ou la stabilisation d'une forme inorganique dans une forme moins soluble (phytostabilisation) [418]. Le succès de la phytoremédiation dépend des potentialités des plantes à absorber et à transloquer les métaux lourds; une fonction spécifique du génotype et du phénotype [419]. Ces hyper-accumulateurs doivent ensuite être domestiqués (adaptation aux sols, climats, nature des contaminants, amélioration génétique des espèces sauvages).

La phytoextraction s'est concentrée sur les plantes hyperaccumulatrices, qui sont capables d'accumuler des concentrations extrêmement élevées de métaux dans leur biomasse aérienne sans être altérées [420]. En fait, les plantes hyperaccumulatrices possèdent souvent une faible biomasse, elles ne tolèrent généralement qu'un ou deux métaux et sont sensibles aux conditions climatiques [421].

L'utilisation des halophytes à des fins de phytoextraction a été recommandée, car ces plantes sont naturellement présentes dans des milieux caractérisés par un excès d'ions toxiques [422]. *A. halimus* dispose d'un système racinaire profond capable de faire face à

la mauvaise structure et aux caractéristiques xériques de plusieurs substrats [423]. Cette espèce est également capable de produire plus de quatre tonnes de matière sèche par hectare et par an [82]. Des études ont démontré la capacité d'*A. halimus* à tolérer et à accumuler d'importantes quantités de métaux [391].

Nombreuses sont les études qui ont testé l'impact des éléments traces métalliques (ETM) sur la croissance et le développement des végétaux, cependant aucun travail n'a montré jusqu'aujourd'hui l'effet de l'accumulation des métaux sur l'évolution des paramètres morphométriques. Ce travail vise à montrer en premier, les potentialités phytoremédiantes de l'*A. halimus*, ensuite des marqueurs morphologiques de l'accumulation des métaux seront proposés suite à l'étude des corrélations entre la croissance et l'accumulation.

II. 3. 2. Matériels et méthodes

II. 3. 2. 1. Stérilisation des graines et élevage des plants

Les graines récoltées sont séchées à l'air libre puis décortiquées manuellement, ensuite elles sont désinfectées par trempage dans deux bains successifs d'eau de Javel à 25% et d'eau distillée stérile pendant 10 min pour chacun.

Les graines sont semées dans des pots de 152 ml, remplis d'un substrat constitué de deux tiers de tourbe stérilisée, et un tier de sable de rivière déminéralisé. Les pots perforés sont disposés dans des bacs contenant la solution d'irrigation. Le régime d'alimentation hydrominérale suivi et comme suit : 30 jours d'eau distillée stérile, puis 15 jours d'une solution de Murashige et Skoog (MS) 10 fois diluée [424]. Les solutions d'irrigation sont préparées à un pH de 5,8 et sont renouvelées hebdomadairement.

II. 3. 2. 2. Dispositif expérimental et conduite de l'essai

Après déterrement, les plants les plus homogènes sont transférés dans des bacs remplis de trois litres de solution nutritive et surmontées de plaques de polyester perforées. Six plants par bac sont envisagés (2 provenances x 3 répétitions). Après un mois de croissance (environ 15 à 17 étages foliaires), le stress métallique a été appliqué. Les solutions tests ont été préparées à partir des métaux ($\text{Cd SO}_4 \cdot 8/3 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ et Pb SO_4) fournies aux concentrations de 5000 et 10000 ppm.

Pour les traitements plombiques, le plomb est utilisé sans (Pb) ou avec chélateur (Pb-C) en ajoutant le (Na₂-EDTA) à des concentrations équimolaires. Les traitements témoins correspondent à la solution nutritive (MS x10). Toutes les solutions sont ajustées à un pH de 5,8 et sont renouvelées régulièrement. Trois bacs par traitement métallique sont envisagés.

II. 3. 2. 3. Mesures effectuées

Après cinq jours de stress, les plants ont été récupérés, rincés à l'eau distillée, essayés par du papier filtre, puis destinés à l'étude des paramètres biométriques et biochimiques.

L'ensemble des paramètres biométriques sont rapportés aux témoins de chaque traitement pour estimer la variation relative de chaque paramètre selon la formule suivante :

La variation relative (%) = (variation des plantes traitées / variation des plantes témoins) * 100

Ainsi ont été déterminés : Hauteur relative des tiges (Haut. T), longueur relative des racines (Long. R), élargissement relatif des axes caulinaires (Diam. T), élargissement relatif des axes racinaires (Diam. R), croissance relative des tiges (PF. T), croissance relative des racines (PF. R), rendement relatif en matière sèche des tiges (PS. T), rendement relatif en matière sèche des racines (PS. R), néoformation relative des nœuds (NN).

Les paramètres biochimiques étudiés sont les taux d'accumulation et de translocation des métaux. Le taux d'accumulation est déterminé selon le protocole de VOGEL-MILKUS et al. [425] consistant à dissoudre 30 mg de poudre végétale dans 3,5 ml de mélange (HNO₃ / HClO₄) (7V / 1V), l'incubation à l'obscurité pendant 24 heures puis dilution dans 05 ml de HNO₃ à 0,2 %. Le dosage a été réalisé par un spectrophotomètre à absorption atomique de marque A 300 à des longueurs d'onde de 217 nm pour le Pb, 213,9 nm pour le Zn et 228,8 nm pour le Cd.

Le taux de translocation des métaux est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Translocation \%} = \frac{\text{quantité accumulée dans les feuilles } (\mu\text{g})}{\text{quantité accumulée dans les racines } (\mu\text{g}) + \text{quantité accumulée dans les feuilles } (\mu\text{g})} * 100$$



Semis et sélection des plantules homogènes d'*A. halimus* L.



Mise en culture sur solutions nutritives et adaptation à la conduite



Plants d'*A. halimus* après 15 jours de croissance sur solutions enrichies par les métaux (Cd, Zn et Pb)



Figure II. 3. 1. Dispositif expérimental de l'essai sous serre (culture hydroponique).

II. 3. 3. Résultats

II. 3. 3. 1. Effets des métaux lourds sur la croissance

Les variations des paramètres biométriques en fonction des facteurs provenance, métal, concentration et leurs interactions sont regroupées dans le tableau II.3. 1. L'analyse de ce tableau montre que le facteur écotype permet des variations significatives ($P < 0,1$) des diamètres des racines et des poids secs des tiges, des variations hautement significatives ($P < 0,01$) des hauteurs des tiges, et des variations très hautement significatives ($P < 0,001$) des diamètres des tiges, et des poids frais aériens et souterrains. Ceci montre que les écotypes testés répondent différemment aux métaux quant aux paramètres cités.

Tableau II. 3. 1. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des taux relatifs de croissance (**Haut.T** : Hauteur des tiges ; **Long.R** : Longueur des racines ; **Diam.T** : Diamètre des tiges ; **Diam.R** : Diamètre des racines ; **PF.A** : Poids frais aérien ; **PF.R** : poids frais racinaire ; **PS.A** : Poids sec aérien ; **PS.R** : Poids sec racinaire ; **NN** : Néof ormation des nœuds) de deux écotypes d'*Atriplex halimus*L. (MOS et REL).

Variables	DDL	Haut.T	Long.R	Diam.T	Diam.R	PF.A	PF.R	PS.A	PS.R	NN
Ecotype	1	6,722**	0,049 ^{N.S.}	33,386***	2,617*	16,467***	14,832***	5,484*	0,049 ^{N.S.}	1,614 ^{N.S.}
Métal	3	5,547***	1,911 ^{N.S.}	4,117**	2,507*	42,207***	4,361**	1,025 ^{N.S.}	1,911 ^{N.S.}	9,437***
Concentration	2	34,951***	0,37 ^{N.S.}	9,763***	14,606***	32,699***	2,034 ^{N.S.}	4,401*	0,37 ^{N.S.}	39,267***
Ecotype x Métal	3	2,285*	0,107 ^{N.S.}	0,156 ^{N.S.}	0,701 ^{N.S.}	1,538 ^{N.S.}	0,796 ^{N.S.}	0,5 ^{N.S.}	0,107 ^{N.S.}	0,852 ^{N.S.}
Eco. x Concentration	2	1,89 ^{N.S.}	0,269 ^{N.S.}	9,171***	1,3 ^{N.S.}	4,146**	3,867*	1,518 ^{N.S.}	0,269 ^{N.S.}	0,632 ^{N.S.}
Métal x Concentration	6	1,959*	1,056 ^{N.S.}	1,6 ^{N.S.}	1,069 ^{N.S.}	10,825***	2,058*	0,604 ^{N.S.}	1,056 ^{N.S.}	3,929***
Eco. x Métal x Con.	6	0,63 ^{N.S.}	0,8 ^{N.S.}	0,074 ^{N.S.}	0,763 ^{N.S.}	0,475 ^{N.S.}	0,584 ^{N.S.}	0,752 ^{N.S.}	0,8 ^{N.S.}	0,782 ^{N.S.}

Les chiffres représentent les valeurs de F : * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; N.S., non significatif.

Le facteur métal exerce à son tour des effets significatifs ($P < 0,1$) sur les variations des diamètres des axes racinaires, et des effets hautement significatifs ($P < 0,01$) sur les diamètres des axes caulinaires et les poids frais des parties souterraines. Les effets très hautement significatifs ($P < 0,001$) sont relevés au niveau de la végétation aérienne en variant fortement la hauteur, le poids frais et la néof ormation des nœuds. Ainsi, il s'avère que la croissance est affectée significativement par la nature du métal en question.

Tous les paramètres caulinaires sont sensibles aux variations des concentrations des métaux. Les variations des diamètres racinaires sont fortement régies par les doses des métaux dans la rhizosphère ($P < 0,001$).

Parmi les effets d'interactions, le facteur écotype-concentration permet des effets très hautement significatifs sur les variations des diamètres des axes caulinaires ($P < 0,001$), et l'interaction métal-concentration conditionne largement les poids frais aériens et nombre de nœuds néoformés ($P < 0,001$).

La comparaison des moyennes des facteurs d'étude selon le test de Newman-Keuls montre une supériorité des moyennes de l'écotype MOS par rapport à REL.

L'étude du facteur métal montre que les traitements plombiques demeurent sans effets notables sur la végétation aérienne, cependant une fois associés à un chélateur, ils permettent des effets statistiquement similaires au cadmium et au zinc sur la hauteur et le poids frais des tiges, ainsi que sur la néoformation des nœuds. Les effets préjudiciables du pb-C sont plus prononcés sur le poids frais racinaire. Sur les diamètres caulinaires, la chélation est non significative (96,58% pour le Pb et 95,82% pour le Pb-C). Le zinc et le cadmium réduisent significativement la majorité des paramètres biométriques avec des taux relatifs respectifs de l'ordre de 33,7 % et 36,8 % pour la hauteur des tiges, 86% et 86,5 % pour le diamètre des tiges, 58% et 57% pour le poids frais des tiges, et 35% et 35,6% pour la néoformation des nœuds (Figure II. 3. 2).

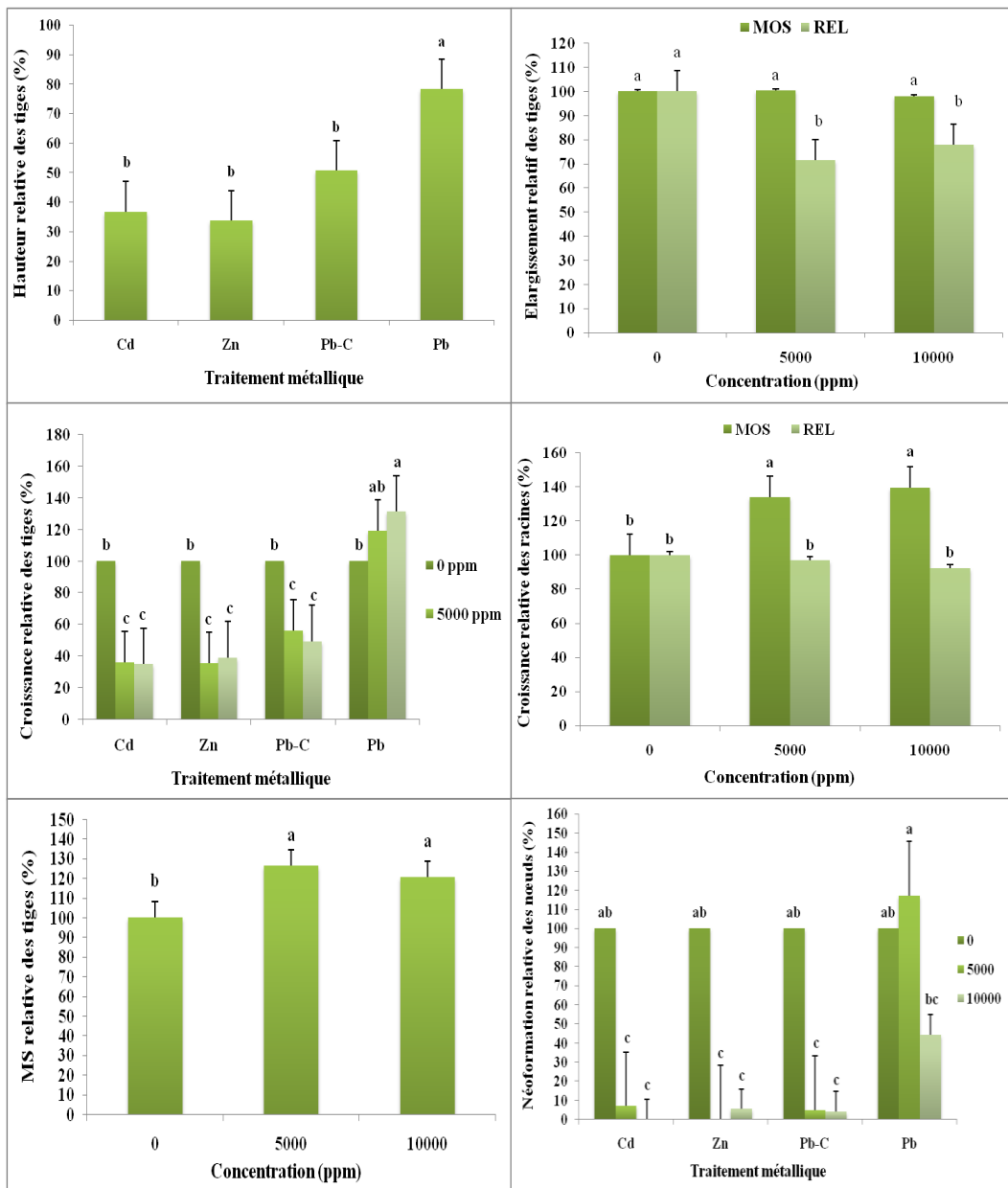


Figure II. 3. 2. Effets des traitements métalliques Cd, Zn, Pb et Pb-C sur les variations relatives de la croissance des parties aériennes et souterraines de deux écotypes d'*A. halimus* L (MOS et REL) cultivés en hydroponie. Les résultats sont comparés par le test de Newman-Keuls et représentent la moyenne de six répétitions \pm ET.

II. 3. 3. 2. Accumulation et translocation des métaux

Des taux d'ETM accumulés dans les parties aériennes et souterraines des jeunes plants ont été déterminés. Le tableau II. 3. 2 résume les résultats de l'analyse de la variance de ces deux paramètres. Il se montre que les trois facteurs d'étude ainsi que leurs interactions permettent des effets hautement significatifs sur les variations obtenues.

Tableau II. 3. 2. Effets des variables « écotype », « métal », « concentration » et leurs interactions sur les variations des taux d'accumulation (**ETM.PA** : Dans les pousses ; **ETM.PS** : Dans les racines), et de translocation (**% TRANS**) des métaux Cd, Zn et Pb de *Atriplex halimus* L.

Variables	DDL	ETM PA	ETM PS	% TRANS
Ecotype	1	2,151 ^{N.S.}	20,476 ^{***}	0,01 ^{N.S.}
Métal	3	566,01 ^{***}	17297,72 ^{***}	292,692 ^{***}
Concentration	2	518,127 ^{***}	11609,48 ^{***}	261,372 ^{***}
Ecotype x Métal	3	1,783 ^{N.S.}	11,392 ^{***}	0,048 ^{N.S.}
Ecotype x Concentration	2	5,139 ^{**}	12,343 ^{***}	0,109 ^{N.S.}
Métal x Concentration	6	147,6 ^{***}	4523,598 ^{***}	85,012 ^{***}
Ecotypex Métal x Concentration	6	3,594 ^{**}	3,586 ^{**}	0,04 ^{N.S.}

Les chiffres représentent les valeurs de F : *P < 0,1 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001 ; N.S., non significatif.

L'analyse des moyennes selon le test de Newman-Keuls indique que les deux écotypes MOS et REL accumulent les métaux dans leur végétation aérienne en fonction de la nature du métal et de sa concentration indépendamment des variations génotypiques. Cependant, l'écotype REL se montre plus apte à accumuler les métaux dans les parties souterraines.

Le plomb est le métal le plus accumulé dans la partie racinaire, mais avec un chélateur, il devient le moins présent dans les racines. Au niveau des tiges, c'est tout à fait l'inverse, à savoir, peu accumulé seul et le plus accumulé après mobilisation comparativement aux deux autres métaux.

Tableau II. 3. 3. Accumulation des éléments traces métalliques (Cd, Zn et Pb) dans les parties aériennes et souterraines de deux écotypes d'*A. halimus* L. (MOS et REL) cultivés en hydroponie.

Métal	Concentration (ppm)	ETM.PA		ETM.PS	
		MOS	REL	MOS	REL
Cd	0	0 ± 0 e	0 ± 0 e	0 ± 0 k	0 ± 0 k
	5000	4920,5 ± 32,7 d	4854,4 ± 16,3 d	4939,4 ± 32,716 e	4977,2 ± 43,2 e
	10000	4987,6 ± 29,7 d	5043,3 ± 28,3 d	5118,8 ± 16,3 e	5147,2 ± 32,7 e
Zn	0	1277,8 ± 289,9 e	996,3 ± 723,7 e	1442,1 ± 127,6 i	882,1 ± 85,2 j
	5000	5365,3 ± 68,4 d	5202 ± 125,5 d	4962,1 ± 22,9 e	5038,6 ± 101,2 e
	10000	5501,3 ± 148,3 d	5562,7 ± 26,3 d	5195,3 ± 77,7 e	5196,3 ± 17,2 e
Pb-C	0	0 ± 0 e	0 ± 0 e	0 ± 0 k	0 ± 0 k
	5000	17425 ± 2162,2 ab	16452,2 ± 214,5 b	1318,4 ± 320,3 ij	1950,2 ± 678,2 h
	10000	14620 ± 5511,4 c	18671,6 ± 1740,8 a	3134,6 ± 299 g	4097 ± 479,7 f
Pb	0	0 ± 0 e	0 ± 0 e	0 ± 0 k	0 ± 0 k
	5000	0 ± 0 e	261,6 ± 453,1 e	27776,1 ± 460,6 d	29495 ± 1186,2 c
	10000	576,1 ± 229,9 e	1042,6 ± 1264,2 e	30033,3 ± 566,6 b	30600 ± 1235 a

Les valeurs représentent les moyennes ± ET.

Les taux d'accumulation sont relatifs aux concentrations fournies, avec des augmentations des taux positivement corrélés aux augmentations des concentrations. Les taux moyens de métaux accumulés dans les parties aériennes et souterraines sont illustrés dans le tableau 3. 3.L'analyse de la variance de translocation des métaux (Tableau II. 3.2), montre des effets très hautement significatifs ($P < 0,001$) des facteurs métal, concentration et leurs effets d'interactions. Les taux de translocation enregistrés chez les deux écotypes varient en fonction de la nature du métal en question et de sa concentration dans le milieu (Figure II. 3. 3).

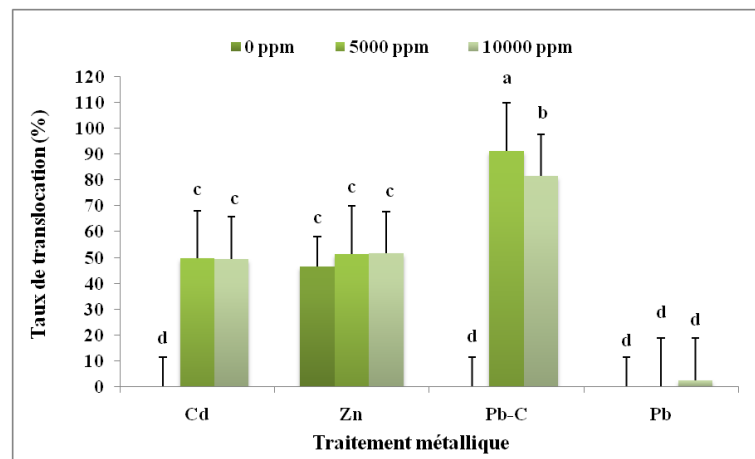


Figure II. 3. 3. Taux de translocation des métaux Cd, Zn et Pb chez *A. halimus* L cultivée en hydroponie. (Pb-C : Pb avec chélateur). Les valeurs sont dégagées par le test de Newman-Keuls et représentent la moyenne de six répétitions ± ET.

II. 3. 4. Discussion

Chez les végétaux, la morphogenèse est largement post-embryonnaire et comme la croissance des organes, elle est influencée par les facteurs environnementaux [426]. Les métaux lourds font partie des stress environnementaux qui peuvent causer des perturbations dans le cycle de vie et la diminution de la croissance des plantes [427].

L'utilisation d'une plante en phytoremédiation implique une bonne croissance, un niveau adéquat d'accumulation et une translocation efficace des métaux absorbés. Les résultats montrent que pour l'ensemble des paramètres biométriques testés, l'écotype MOS enregistre les valeurs maximums de croissance, et ce dans l'ensemble des traitements métalliques. Cette différence de réaction entre provenances d'*A. halimus* a été évoquée par plusieurs auteurs [91] ; [352] ; [375]. MAALEM et al. [428] prétendent que la grande divergence existante entre les génotypes de l'espèce *A. halimus*, trouverait son origine dans le caractère hétérozygote et polyploïde caractérisant cette espèce. HADDIOUI ET BAAZIZ [429] ont découvert à travers une étude iso enzymatique, une ample différence génétique entre populations d'*A. halimus*, et ont montré qu'elle est due, aux différences de fréquences des allèles plutôt qu'à leur polymorphisme.

L'étude de l'évolution relative (par rapport aux témoins) des longueurs, diamètres, poids frais et secs des parties aériennes et souterraines des plants, ainsi que la néoformation des nœuds a permis les discussions suivantes : Pour les racines, les résultats montrent que même à 10000 ppm de métaux, le poids frais de REL n'est pas affecté, au moment où celui de MOS transgresse les témoins. Quant à la végétation aérienne, les poids secs obtenus montrent que les métaux aux doses utilisées ont amélioré (augmenté) ce paramètre. Ces résultats corroborent ceux rapportés par TAUQEER et al. [4], qui en étudiant les effets des métaux Cd et Pb sur la croissance d'*Alternanthera bettzickiana*, ont observé une grande tolérance, sans exhibition des symptômes de phytotoxicité. Les auteurs ont relevé une augmentation graduelle des paramètres de croissance en augmentant les concentrations des deux métaux jusqu'à 1mM. Cependant, la croissance des plantes est réduite par des concentrations plus élevées (à 2 mM).

A fortes concentrations, les métaux induisent une réduction générale des autres paramètres testés. Cependant, aucune mortalité n'a été relevée. Cette réduction est fonction de la nature du métal en question et de sa concentration. Selon LIAO et al. [430], Le Cd induit chez *A. halimus* L., des changements complexes notés à l'échelle génétique,

biochimique et physiologique conduisant à la phytotoxicité, et dont les symptômes les plus évidents sont la réduction de la croissance des tissus et des organes [39]. BEN GHNAYA et al. [431], ont montré qu'en réponse au stress métallique induit par 2000 μ M de Zn et 250 μ M de Cd, les plants de *Brassica napus* L. ont réagi par une diminution de leur poids frais et secs.

La croissance des plants d'*Atriplex* (*A. hortensis* et *A. rosea*) exprimée en poids sec des pousses et des racines a été inhibée par de fortes concentrations de Cu, Ni, Pb et Zn [423]. AMNA et al. [33], ont rapporté que la croissance et la biomasse de *Linum usitatissimum* diminuaient progressivement avec l'augmentation des concentrations du cadmium dans le sol.

L'analyse comparative des impacts des métaux sur la croissance montre que le plomb appliqué seul n'entrave pas la croissance aérienne ni souterraine des plants, mais une fois combiné à un chélateur, il induit une réduction des paramètres aériens (poids frais, hauteur et nombre de nœuds néoformés) statistiquement du même ordre que celle causée par le cadmium et le zinc. TAUQEER et al. [4] ont trouvé qu'à la même concentration, le Cd inhibe plus la croissance des plantes d'*A. bettzickiana* par rapport au Pb. Les résultats dégagés de cette recherche montrent que l'évolution des diamètres des axes caulinaires s'est montrée inchangée par la chélation et que les effets les plus préjudiciables du Pb sont observés au niveau du poids frais racinaire. La croissance des racines est plus sensible aux métaux que celle des végétations aériennes [432]. Ceci pourrait être dû au fait que les racines sont la première interface en contact avec les métaux toxiques et dont en découlent de nombreuses conséquences néfastes sur leur croissance et sur toute la plante ultérieurement.

Il a été démontré que l'ajout de l'EDTA augmente significativement l'accumulation du Pb dans les pousses [353]. La pollution par le zinc montre que ce sont les paramètres aériens (hauteur des tiges, poids frais de la végétation et nombre de nouveaux nœuds), qui sont les plus affectés par ce métal. Les plantes poussant sur un excès de Zn le stockent dans les feuilles, ce métal est un cofacteur de nombreuses enzymes impliquées dans la respiration, la photosynthèse et la biosynthèse des hormones végétales [433]. Ainsi le zinc affecte négativement la physiologie et la morphologie de la feuille ; diminution du nombre de chloroplastes par cellule et de la quantité d'amidon dans chaque chloroplaste, aussi augmentation du nombre de plastoglobules. Les modifications morphologiques observées

comprennent également l'augmentation de la largeur des cellules palissadiques, l'épaississement de l'épiderme supérieur et des troubles cellulaires générales [434].

Les effets inhibiteurs des métaux Zn, Pb et Cd trouvés dans cette étude, statistiquement similaires ont été évoqués par ODJEGBA ET FASIDI [435], démontrant qu'à fortes concentrations, le zinc devient phyto-toxique du même ordre que les métaux non impliqués dans le métabolisme des plantes tels le cadmium ou le mercure.

Dans cette recherche, les taux d'accumulation des métaux Cd, Zn et Pb ont été calculés, les résultats montrent que les deux écotypes testés présentent la même tendance d'accumulation dans les parties aériennes et que les taux atteints sont tributaires du métal en question et de sa concentration dans le milieu. Ainsi l'ordre d'accumulation est comme suit : Pb-C > Zn > Cd > Pb, avec des taux respectifs d'accumulation de l'ordre de : 11194,82 mg. Kg⁻¹, 3984, 29mg.Kg¹, 3300, 99mg.Kg⁻¹, 313,39 mg. Kg⁻¹(MS). A l'échelle racinaire, les résultats montrent que la provenance REL enregistre un taux moyen d'accumulation de 7281,983 mg. Kg⁻¹(MS) ; ce taux est significativement plus élevé que celui de MOS (6993,377 mg. Kg⁻¹MS). Ce résultat pourrait expliquer la meilleure croissance déjà observée de ce dernier écotype et qui pourrait être imputée à la moindre accumulation des métaux.

La capacité de translocation représente la quantité de métal présent dans les parties aériennes rapportée à la quantité totale de métal absorbé par la plante [50]. Les taux moyens de translocation estimés pour les quatre traitements métalliques Pb-C, Zn, Cd et Pb sont respectivement : 81,49%, 51,51%, 49,42%, 2,51%.

Dans le cadre de la phytoremédiation, les seuils d'accumulation sur la base de la matière sèche aérienne sont fixés par BAKER et al. [436] à 10000 mg. Kg⁻¹ (1%) pour le Zn, 1000 mg. Kg⁻¹ (0.1%) pour le Pb et 100 mg. Kg⁻¹ (0.01%) pour le Cd. Ainsi, en se référant à ces normes, il s'avère qu'*A. halimus* est hyperaccumulateur de cadmium, cependant plus de la moitié de la quantité absorbée reste liée aux racines. Ce résultat est en accord avec les nombreux travaux montrant que la grande quantité du Cd absorbé est retenue par les racines d'*A. halimus* [39] ; [40] de *Lactuca sativa*[48] d'*Oryza sativa*[437] et du *Pisum sativum* [438]. NEDJIMI ET DAOUD [39] ont trouvé qu'environ 75% du Cd reste adsorbée au niveau des racines. Comparativement à ce résultat, MESNOUA et al. [40] ont trouvé des taux d'accumulation trois fois plus élevés dans les parties aériennes et multipliés par quatre dans les racines, et ont expliqué la différence par les conditions

d'expérimentations différentes. La nature génotypique des écotypes testés pourrait à son tour expliquer cette différence d'affinité pour ce métal et pourrait construire un élément de criblage génétique à l'accumulation du cadmium.

Pour l'ensemble des traitements métalliques, les quantités accumulées dans les pousses et les racines sont positivement et significativement liées aux concentrations fournies (Tableau II. 3. 4), ceci est en accord avec les rapports de [4] et [423]. L'étude de l'accumulation du plomb montre que ce métal est majoritairement retenu par les racines, mais avec un chélateur, il se trouve hyper-accumulé dans la végétation aérienne [353]. Dans cette étude, la chélation a permis de multiplier la quantité accumulée dans les pousses par 35 et le taux de translocation est 32 fois plus élevé comparé à celui des traitements sans chélateurs.

L'*A. halimus* montre de faibles taux d'accumulation en zinc par rapport aux normes, cependant le taux de translocation est plus élevé par rapport au cadmium, ainsi plus de la moitié du métal absorbé est acheminé à la végétation aérienne.

Les coefficients de corrélations entre les quantités de métaux accumulées dans les parties aériennes et souterraines des plantes sont calculés. Ces coefficients sont de 1 (Cd), 0,99 (Zn), 0,42 (Pb) et 0,77 (Pb-C). Ce résultat mène à s'interroger si la répartition des métaux absorbés entre compartiments aériens et souterrains pourrait renseigner sur le niveau de régulation imposée par la plante pour adapter sa morphologie et sa physiologie au stress métallique ? S'agit-il du niveau de tolérance (réarrangement interne et adaptation) ?

Les corrélations significativement élevées entre les taux d'accumulation et les variations des paramètres morphologiques présument que ces derniers sont des marqueurs d'accumulation. Les coefficients de corrélations calculés sont regroupés dans le tableau II. 3. 4. D'après ce tableau, les fortes corrélations sont relevées au niveau des paramètres aériens ; élongation caulinaire, poids frais des pousses et néoformation des nœuds pour les trois traitements métalliques (Cd, Zn et Pb-C). Ce résultat est en agrément avec HU et al. (2012) démontrant que le plomb a significativement inhibé la croissance des pousses de *Chenopodium album*, avec un taux de réduction de 35% à 300 mg/L, et de 45% de réduction des longueurs des pousses par rapport au témoin à 800 mg / L de Pb en solution. Selon KACHOUT et al. [423], la croissance de l'*Atriplex* a été fortement inhibée par les fortes concentrations de polluants. La réduction de la croissance pourrait aussi être due à la

suppression de la croissance en longueur des cellules [423]. En outre, une réduction de la biomasse et de la taille des feuilles de *Salix viminalis* L. a été observée en augmentant les concentrations de Cd. Le Cd à 20M réduit la biomasse des pousses de 18% par rapport au témoin, et c'est à 50M que les racines subissent une réduction significative [339]. L'élongation racinaire est significativement corrélée à l'accumulation du cadmium, du zinc et du plomb au niveau de la végétation aérienne après chélation. Les symptômes de toxicité par le zinc incluent l'inhibition de la croissance des racines [251]. En outre, le test de corrélations montre que la croissance en largeur des diamètres racinaires est également significativement corrélée à l'accumulation des trois métaux. Ce résultat confirme ceux trouvés par EBBS ET KOCHIAN [423], montrant que les racines des plantes poussant sur de hautes teneurs en Zn avaient des diamètres plus petits que celles des témoins. La biomasse racinaire était significativement plus faible pour les espèces du genre Brassica en présence des métaux Cu et Zn [423]. Le diamètre des axes caulinaires est un indicateur de l'accumulation des métaux Cd et Zn dans les pousses et les racines, alors le poids sec de la végétation marque l'accumulation du Zn dans les compartiments aériens et souterrains de la plante.

Tableau II. 3. 4. Coefficients de corrélation (r) entre les paramètres morphométriques et les taux d'éléments traces métalliques Cd, Zn et Pb accumulés dans les compartiments aériens et souterrains de deux écotypes d'*A. halimus* (MOS et REL) Cultivés en hydroponie.

Variables / Métaux	Taux d'accumulation	Concentration	Haut.T	Long.R	Diam.T	Diam.R	PF.A	PF.R	PS.A	PS.R	NN
Cd	ETM.PA	0,88*	-0,97*	-0,86*	-0,50*	-0,36*	-0,93*	0,02	0,15	-0,19	-0,98*
	ETM.PS	0,88*	-0,97*	-0,87*	-0,50*	-0,36*	-0,93*	0,02	0,15	-0,19	-0,98*
Zn	ETM.PA	0,88*	-0,99*	-0,85*	-0,50*	-0,55*	-0,87*	0,18	0,37*	0,10	-0,96*
	ETM.PS	0,88*	-0,99*	-0,86*	-0,50*	-0,54*	-0,88*	0,18	0,36*	0,09	-0,97*
Pb-C	ETM.PA	0,82*	-0,43*	-0,34*	-0,17	-0,45*	-0,63*	-0,15	0,12	0,19	-0,91*
	ETM.PS	0,95*	-0,52*	-0,16	-0,10	-0,51*	-0,60*	-0,09	0,02	0,14	-0,78*
Pb	ETM.PA	0,55*	-0,27	0,03	0,02	-0,17	-0,11	0,24	-0,10	0,09	-0,09
	ETM.PS	0,89*	-0,19	0,05	-0,14	-0,25	0,27	0,39*	0,26	-0,09	-0,11

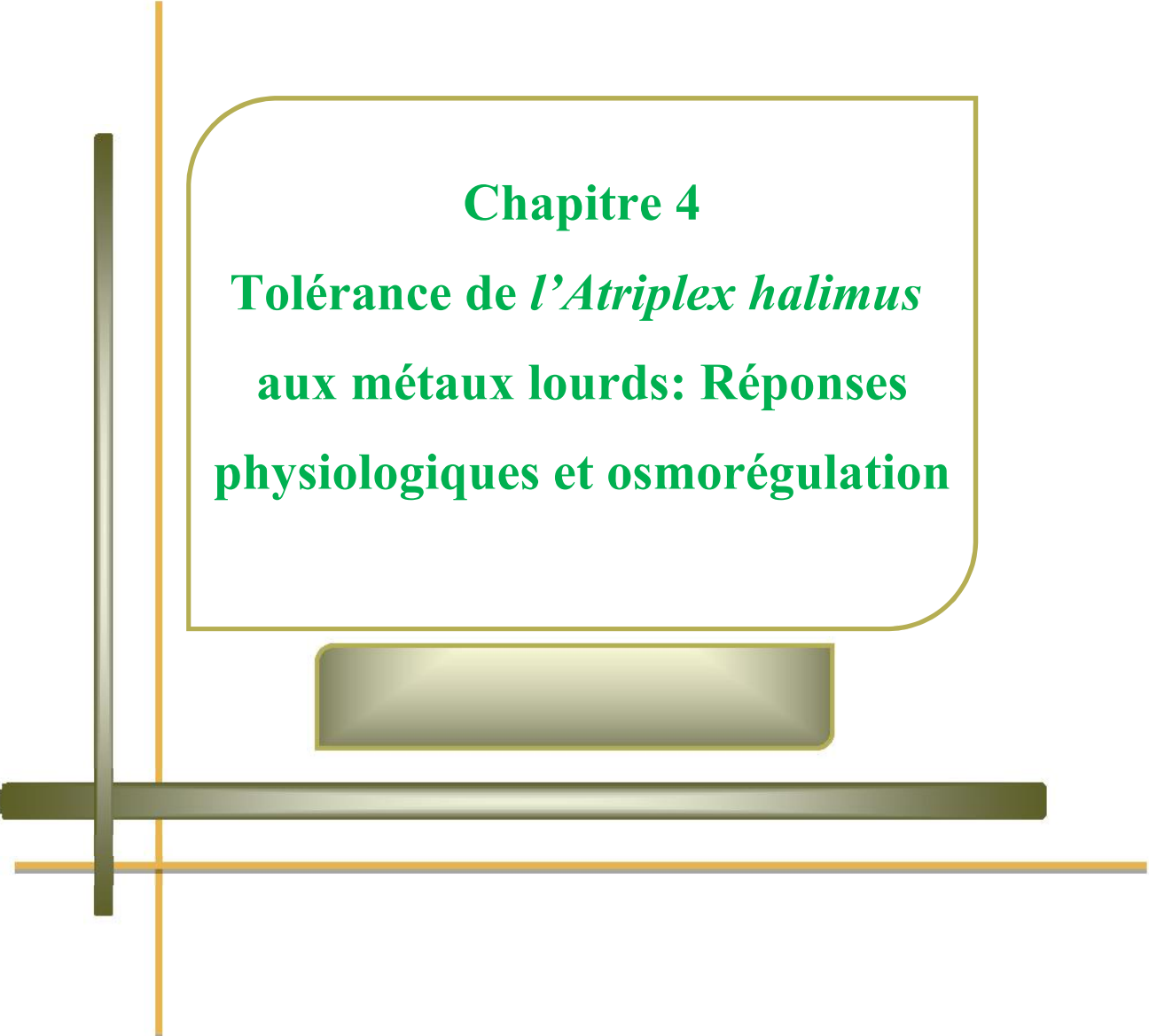
*Corrélation significative au seuil $\alpha = 0,05$.

II. 3. 5. Conclusion

Une culture hydroponique de deux écotypes d'*A. halimus* a été conduite pour répondre aux questions suivantes : Peut *A. halimus* être utilisé en phytoremédiation des métaux cadmium, zinc et plomb ? Par quelle stratégie ? Et quel paramètre morphologique peut-on utiliser comme marqueur d'accumulation ?

Les résultats montrent qu'*A. halimus* est un hyper-accumulateur de cadmium cependant, plus de la moitié de la quantité absorbée reste fixée au niveau des racines, ainsi cette espèce peut être utilisée comme plante phytostabilisante. Le taux de translocation atteint reste intéressant menant à penser à la phytoextraction induite par les chélateurs. Si l'*A. halimus* est à utiliser comme couvert végétal dans les sols multi-pollués par les métaux, l'écotype MOS, serait le plus recommandé vu sa tolérance et adaptation. La plante est stabilisante du plomb et par la chélation elle devient idéale pour une phytoextraction efficace de ce métal.

Les paramètres : hauteur des pousses, poids frais des pousses, néoformation des nœuds et diamètre des racines peuvent construire de bons marqueurs de l'accumulation du Cd, Zn et Pb. L'élongation racinaire témoigne l'accumulation du Cd et du Zn, et le diamètre de l'axe racinaire est un indicateur de l'accumulation du zinc et du cadmium. La matière sèche aérienne est un indicateur spécifique pour l'accumulation du zinc. L'estimation de l'efficacité de ces marqueurs morphologiques d'accumulation sur d'autres écotypes, voire espèces, métaux et concentrations, leur donnent plus de crédibilité pour qu'ils soient universels.



Chapitre 4
Tolérance de *Atriplex halimus*
aux métaux lourds: Réponses
physiologiques et osmorégulation

CHAPITRE 4

TOLERANCE DE L'*ATRIPLEX HALIMUS* AUX METAUX PLOMB, ZINC ET CADMIUM : REPONSES PHYSIOLOGIQUES ET OSMOREGULATION

II. 4. 1. Introduction

Les éléments minéraux sont largement répandus dans la terre et sont essentiels pour la vie humaine et la viabilité de l'ensemble des êtres vivants ; le cuivre, le zinc, le manganèse, le fer et d'autres micronutriments sont essentiels pour tous les végétaux. Parmi les métaux non nutritionnels, le cadmium et le plomb sont les plus fréquents et nocifs [279].

Les végétaux terrestres peuvent souffrir des pollutions suite aux dépôts atmosphériques de métaux, la contamination des eaux d'irrigation, ou suite à un déséquilibre de la formule métallique du sol par excès d'éléments utiles ou présence inhabituelle d'éléments inutiles.

La contamination des sols par les métaux est une préoccupation mondiale sérieuse ; et le développement des technologies de remédiation efficaces est nécessaire. La phytoremédiation est une technologie solaire, respectueuse de l'environnement et bien acceptée par la communauté scientifique, elle est basée sur l'utilisation des plantes [13].

La découverte de nouvelles plantes tolérantes à la pollution métallique, et à larges spectres d'accumulation est primordiale pour la réussite des technologies de phytoremédiation. En outre, la compréhension des stratégies adaptatives et la définition des marqueurs de tolérance et d'accumulation communs chez l'ensemble des plantes accumulatrices, et/ou spécifiques aux espèces endémiques des zones à risques de pollution, permettraient plus d'avancées en recherche fondamentale et plus de rentabilité des projets effectifs de dépollution.

Atriplex halimus L. (Amaranthaceae) ; un des principaux arbustes xéro-halophyles peuplant les zones semi-arides et arides (pluviométrie annuelle < 600 mm) est particulièrement répandu dans les sols salins et dégradés [89]. En plus de sa remarquable résistance aux stress abiotiques tels le stress hydrique [65] et le stress salin [440], il résiste aux métaux lourds [34] ; [391] ; [441].

Des explications des mécanismes mis en œuvre par cette espèce face aux conditions extrêmes du milieu ont été fournies suite aux études des traits morphologiques, physiologiques, anatomiques et biochimiques contribuant à sa notable tolérance aux stress abiotiques [89]. Des auteurs ont montré que le stress salin se traduisant généralement par un stress hydrique secondaire inhibe la croissance en affectant l'absorption et l'acheminement d'eau et du fait du faible potentiel hydrique (Ψ_w) du milieu salin [442] ; [443] ; [87]. MUNNS [444], affirme que la toxicité ionique due à l'accumulation tissulaire des ions Na^+ et Cl^- déséquilibre le statut nutritionnel en minéraux des tissus.

L'ajustement osmotique (AO) est l'un des paramètres les plus communément étudiés lors des situations de stress. Il s'agit d'une compartimentation d'osmolytes organiques ou inorganiques.

Les relations hydriques, les pigments chlorophylliens, les activités photosynthétique et enzymatique, les aspects nutritionnels et métaboliques ont toujours constitué des marqueurs de choix pour l'étude des niveaux de tolérance et des impacts de divers stress sur le fonctionnement des systèmes végétaux. Beaucoup de ces marqueurs ont déjà été testés pour étudier la tolérance de l'*A. halimus* aux métaux lourds, cependant, peu est connu sur la physiologie de l'adaptation au stress métallique et l'intérêt de l'ajustement osmotique dans la tolérance en relation avec les niveaux d'accumulation des métaux.

Cette espèce exhibe un grand polymorphisme intra et interspécifique [375]; [445], ses capacités phytoremédiantes varient considérablement d'une population à l'autre [441], donc, ses stratégies adaptatives sont revues à la variabilité et leur détermination est d'un apport significatif pour la généralisation des mécanismes de tolérance entre écotypes et à divers métaux.

Cette recherche vise l'étude des potentialités phytoremédiantes de l'*A. halimus* L. et l'implication des marqueurs communs de tolérance aux stress hydrique et au salin dans la tolérance au stress métallique. La contribution et la crédibilité des marqueurs physiologiques et l'ajustement osmotique sont vérifiés à travers l'étude de deux écotypes d'*A. halimus* ; un prélevé d'une zone saline (Mostaganem) et l'autre ramené d'une zone aride (Relizane). Une étude comparative des réponses en fonction des types de métaux ; nutritionnels (Zn) et non nutritionnels (Cd, Pb) est établie, ainsi seront estimées les corrélations entre les niveaux d'accumulation des métaux lourds dans les compartiments aériens et souterrains des plants avec la compartimentation des cations calcium et potassium.

II. 4. 2. Méthodes

II. 4. 2. 1. Dispositif expérimental et conditions de culture

Les graines des deux écotypes ont été séchées à l'air libre puis décortiquées manuellement, ensuite elles sont désinfectées par trempage dans deux bains successifs d'eau de Javel à 25% et d'eau distillée stérile pendant 10 min pour chacun.

Les graines ont été semées séparément dans des bacs remplis de tourbe industrielle et irrigués quotidiennement. Après deux mois (ce qui correspond à 6 à 8 étages foliaires), les plants les plus homogènes ont été sélectionnés et transplantés dans des pots (d'un volume de trois litres) remplis d'un substrat constitué de tourbe et sable déminéralisé (2V : 1V). Le substrat est d'une capacité de rétention de 60%, d'une capacité d'échange cationique (CEC) de. Les pots sont disposés dans une serre semi-automatique, et sont irrigués par de l'eau distillée dont les quantités apportées quotidiennement sont déterminées par voie pondérale, ce pour éviter tout risque de stress hydrique secondaire. Après quatre mois de culture, le stress métallique a été imposé par des solutions des métaux ($\text{Cd SO}_4 \cdot 8/3 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Zn SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ et Pb SO_4) à des concentrations de 500, 1000 ou 1500 ppm. Les solutions sont ajustées à un PH de 5,8. Les traitements plombiques sont combinés à un chélateur (Na_2 - EDTA) à des concentrations équimolaires. Les témoins sont irrigués par de l'eau distillée. Trois répétitions par traitement sont prévues et les pots sont arrangés selon une disposition complètement randomisée à raison de trois répétitions par traitement métallique.

Après deux mois d'irrigation par les solutions tests, les plants ont été déterrés, scindés en leurs parties aériennes et souterraines et soumis aux mesures et analyses suivantes.



Semis et sélection des plantules homogènes d'*A. halimus* L.



Elevage et sélection des plants d'*A. halimus* L.



Plants d'*A. halimus* après application des solutions métalliques

Figure II. 4. 1. Dispositif expérimental de l'essai sous serre (culture en pots).

II. 4. 2. 2. Mesures effectuées

Le poids spécifique des feuilles calculé à partir du rapport poids sec /surface foliaire [464]. Le poids sec est déterminé par séchage à l'étuve à 60°C pendant 48h, et la surface foliaire est mesurée par le logiciel Mesurim ; Logiciel d'acquisition et traitement d'images téléchargeable au site :

(<http://acces.enslyon.fr/acces/logiciels/applications/mesurim/telechargement>).

La teneur relative en eau TRE (%), déterminée selon l'équation de BARRS ET WEATHELEY [447]: $TRE (\%) = [(Pf-Ps) / (Ppt-Ps)] \times 100$. Avec Pf : Poids frais ; mesuré immédiatement après prélèvement des feuilles. Ppt : Poids plein turgescence ; déterminé 24 h après trempage des feuilles dans des tubes d'eau distillée placés à 4°C et à l'obscurité. Ps : Poids sec ; obtenu après 48 h d'étuvage à 60° C.

Le potentiel osmotique (PO) déterminé par un micro-osmomètre manuel de marque Löser type 6/6M. 100 µl d'extrait foliaire de chaque traitement ont servi d'échantillon de mesures.

La conductance stomatique (gs) estimée *in vivo* par un poromètre, dont le thermocouple est mis en contact avec la partie centrale de la feuille. Les résultats sont rapportés à 20°C par des corrections automatiques des variations d'humidité relative de l'air et des températures foliaires et ambiantes.

Les pigments chlorophylliens. Les teneurs en chlorophylles a et b et caroténoïdes sont déterminées selon le protocole de LICHTENTHALER [448] consistant à une extraction à froid d'environ 1g de matière fraîche foliaire dans 25 ml d'acétone. Après 10 min de centrifugation à 5000 g à 4°C, une mesure de l'absorbance A est effectuée à 470, 662 et 645 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Marque : Shimadzu UV-1605). Les teneurs en pigments, exprimées en µg. g⁻¹MF, sont calculées à partir des équations suivantes :

$$\text{Ch. A} = 11,24 A_{662} - 2,04 A_{645}$$

$$\text{Ch. B} = 20,13 A_{645} - 4,19 A_{662}$$

$$\text{Ch. X + C} = (1000 A_{470} - 1,90 \text{ Ch. A} - 63,14 \text{ Ch. B}) / 214$$

(Ch. A et Ch. B : Concentration en chlorophylles a et b ; Ch. X + C : Concentration en caroténoïdes).

La teneur en proline est déterminée selon la méthode colorimétrique de TROLL ET LINDSLEY [449] reprise par MAGNE ET LARHERN [450]. Le protocole comporte une étape d'extraction à partir de 150 mg de feuilles jeunes prises près de l'apex et mises dans 3 ml de méthanol. L'extraction se fait à chaud dans un bain-marie à 90°C pendant une heure. Après refroidissement, vient l'étape de dosage consistant à ajouter à 1 ml de l'extrait, de 2 ml d'une solution de ninhydrine à 1% dans l'acide acétique glacial : eau (60 :40 V/V). L'ensemble est placé dans un bain-marie à 100°C pendant une heure. Après refroidissement, 5 ml de toluène sont ajoutés et le mélange est vigoureusement agité. Après 30 minutes de repos, la phase supérieure est prélevée et la densité optique est lue à 520nm. Les résultats exprimés en $\mu\text{mol. g}^{-1}$ MF sont référés à une courbe étalon établie à partir des concentrations croissantes d'une solution de proline à 1 $\mu\text{g/ml}$.

Dosage des sucres solubles, les sucres simples sont extraits selon la méthode de SCHIELDS ET BURNETT [451] reprise par GOMEZ [452]. Cette méthode est basée sur le fait que l'acide sulfurique très concentré transforme à chaud les oses en dérivés furfuraux qui seront condensés et prennent la couleur bleu vert en présence de l'anthrone. 100 mg de feuilles sont macérés dans 2,25 ml d'éthanol à 80% pendant 20 heures. 2 ml de cet extrait sont prélevés et 10 fois dilué avec l'éthanol 80% (réactif A). 04 heures avant l'initiation de l'essai, 2g d'anthrone pur est additionné à 11 d'acide sulfurique (réactif B). 4 ml de ce réactif est ajouté au réactif A. L'ensemble est délicatement mélangé et maintenue dans la glace fondante. Les tubes sont agités au vortex, placés dans un bain-marie à 92°C pendant 8 minutes et enfin refroidis pendant 30 minutes à l'obscurité. L'absorbance est lue à 585nm, et les résultats sont exprimés en mg. g^{-1} de MF.

Les teneurs en cations Ca^{2+} et K^{+} et les taux d'accumulation des métaux cadmium, zinc et plomb sont déterminés après mise en solution des métaux par digestion acideselon le protocole de VOGEL-MILKUS et al. [425] détaillé dans le chapitre précédent. Les absorbances sont lues par un spectrophotomètre à flamme à des longueurs d'onde de 768 (K^{+}) et 554 (Ca^{2+}). Les concentrations en minéraux sont exprimées en g. Kg^{-1} MS.

Les taux d'accumulation des métaux cadmium, zinc et plomb sont estimés selon le protocole ci-dessus dans les feuilles, tiges et racines des plants témoins et traités. Les taux sont exprimés en mg. Kg^{-1} MS.

Les facteurs de translocation (FT) des métaux absorbés sont calculés selon CHEN et al. [453] à partir de la formule suivante :

$$FT = \frac{\text{quantité accumulée dans les feuilles (mg)}}{\text{quantité accumulée dans les racines (mg)}}$$

II. 4. 2. 3. Analyses statistiques

Les résultats obtenus sont soumis à une analyse de variance par le logiciel *Statbox* (Version 6.4), ensuite une comparaison des moyennes des variables avérées significatives est effectuée selon le test de Newman-Keuls au seuil 5%. Les corrélations de Pearson entre l'ensemble des paramètres étudiés sont établies, seules celles avérées significatives sont mentionnées.

II. 4. 3. Résultats

II. 4. 3. 1. Effets des métaux sur les paramètres physiologiques

Les effets des métaux cadmium, zinc et plomb sur les variations des paramètres physiologiques et biochimiques en fonction des variables ; écotpe, métal et concentration sont analysés dans le tableau II. 4.1. L'étude des paramètres hydriques de la plante permet de vérifier si les métaux affectent le statut hydrique provoquant ainsi un stress hydrique secondaire. Les réactions physiologiques sont les réponses les plus immédiatement et fortement liées aux variations des conditions de culture et sont souvent en continuelles fluctuations selon la sévérité du stress et les niveaux de tolérance de la plante stressée.

Tableau II. 4.1. Effets des variables écotpe, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des paramètres physiologiques et biochimiques de l'*Atriplex halimus* L.

Variables	DDL	TRE	PO	gs	Ch. A	Ch. B	Ch. x + c	Proline	Sucres
Ecotype	1	0,36 ^{N.S.}	13,752 ^{***}	0,6 ^{N.S.}	11,418 ^{**}	0,34 ^{N.S.}	7,557 ^{**}	0,348 ^{N.S.}	4,115 [*]
Métal	2	4,413 [*]	11,295 ^{***}	0,449 ^{N.S.}	0,089 ^{N.S.}	0,688 ^{N.S.}	1,279 ^{N.S.}	0,656 ^{N.S.}	2,587 [*]
Concentration	3	3,752 [*]	1,361 ^{N.S.}	20,701 ^{***}	1,69 ^{N.S.}	0,706 ^{N.S.}	1,071 ^{N.S.}	5,579 ^{**}	1,085 ^{N.S.}
Ecotype x Métal	2	2,397 [*]	13,515 ^{***}	0,646 ^{N.S.}	0,279 ^{N.S.}	1,181 ^{N.S.}	0,863 ^{N.S.}	1,278 ^{N.S.}	1,249 ^{N.S.}
Eco. x Concentration	3	0,824 ^{N.S.}	4,906 ^{**}	2,093 ^{N.S.}	0,06 ^{N.S.}	1,114 ^{N.S.}	0,537 ^{N.S.}	2,593 [*]	0,818 ^{N.S.}
Métal x Concentration	6	4,177 ^{**}	3,297 ^{**}	0,409 ^{N.S.}	0,407 ^{N.S.}	0,492 ^{N.S.}	0,438 ^{N.S.}	0,963 ^{N.S.}	1,208 ^{N.S.}
Eco. x Métal x Con.	6	6,124 ^{***}	5,864 ^{***}	0,337 ^{N.S.}	1,376 ^{N.S.}	0,438 ^{N.S.}	1,326 ^{N.S.}	1,226 ^{N.S.}	0,69 ^{N.S.}

Les chiffres représentent les valeurs de F : *P < 0,1 ; **P < 0,01 ; ***P < 0,001 ; N.S., non significatif.

La teneur relative en eau est un bon indicateur de l'état de turgescence des cellules et donc de l'équilibre hydrique interne de la plante. L'analyse de la variance de la TRE montre que les facteurs métal et concentration permettent des variations significatives

($P < 0,1$) et leurs interactions, permettent des variations hautement significatives ($P < 0,01$). L'interaction tri factorielle permet à son tour des variations très hautement significatives ($P < 0,001$).

La comparaison des moyennes du facteur métal selon le test de Newan-Keuls montre que les métaux Zn et Pb permettent des niveaux d'hydratation plus élevés par rapport au Cd. L'analyse statistique des effets des concentrations montre qu'à la concentration de 500 ppm de métaux, les TRE sont les plus élevés (Figure II. 4. 2). L'irrigation de l'écotype MOS par 1500 ppm de cadmium provoque une diminution significative de ce paramètre par rapport à l'ensemble des traitements étudiés.

Le potentiel osmotique des feuilles permet de se prononcer sur les niveaux d'accumulation d'osmotocums au niveau cellulaire. L'analyse des variations de ce paramètre montre que son expression est sous l'étroite dépendance des facteurs écotype, métal ainsi que leur interaction ($P < 0,001$). La conjugaison des trois facteurs d'étude constitue à son tour une source de variation de très haut niveau ($P < 0,001$). L'écotype MOS réduit plus son potentiel osmotique comparé à REL. Quant à l'analyse des effets des métaux, il s'avère qu'en présence du cadmium, ce potentiel est nettement plus négatif par rapport aux deux autres métaux (Figure II.4. 3). Ainsi la croissance de l'écotype MOS dans un milieu irrigué par 1500 ppm de Cd induit une réduction de 113 % par rapport au traitement témoin de cet écotype qui à la même concentration de zinc enregistre les valeurs de potentiel osmotique les plus élevées avec une augmentation d'environ 49% par rapport au témoin).

La conductance stomatique renseigne sur le degré d'ouverture des stomates et ainsi sur les taux de transpiration foliaire. L'analyse de la variance de ce paramètre (Tableau II. 4. 1), montre que seules les concentrations régissent la perte d'eau et ce par des effets très hautement significatifs ($P < 0,001$). Le test de Newman-Keuls montre que les différentes concentrations étudiées induisent des effets similaires en réduisant la conductance stomatique comparativement aux témoins (Figure II. 4. 4). Les taux de réduction générés par les concentrations 500, 1000 et 1500 ppm sont respectivement d'environ 65 %, 72% et 94%.

L'étude statistique des variations des teneurs en pigments chlorophylliens des feuilles montre de faibles fluctuations régies principalement par la variabilité génotypique

($P < 0,1$) pour les chlorophylles A et les Caroténoïdes, et non significatives pour la chlorophylle B (Figure II. 4. 5).

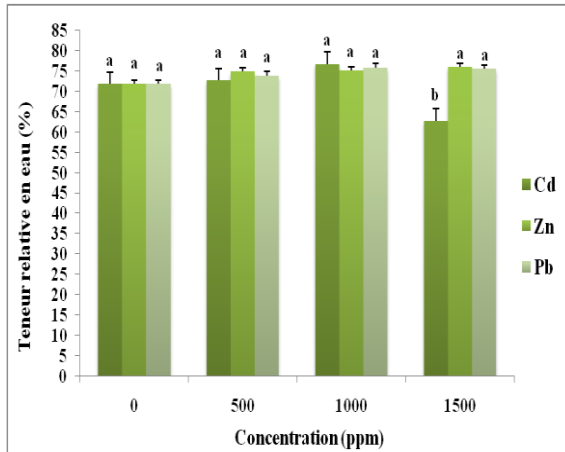


Figure II. 4. 2. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur relative en eau de deux écotypes d'*Atriplex halimus* (MOS et REL). Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon l'interaction Métal- Concentration et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

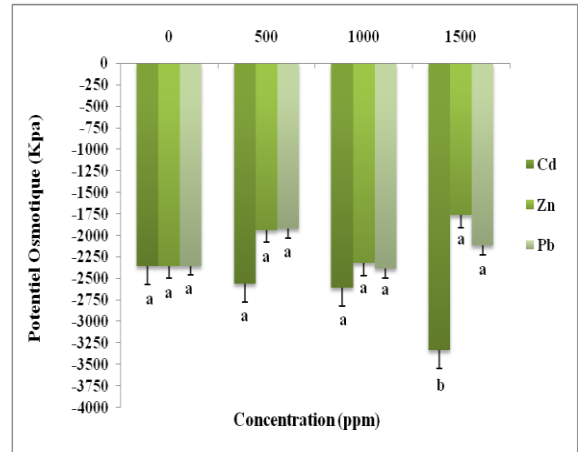


Figure II. 4. 3. Effets des traitements métalliques sur les variations du potentiel osmotique de deux écotypes d'*Atriplex halimus* (MOS et REL). Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon l'interaction « Métal-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

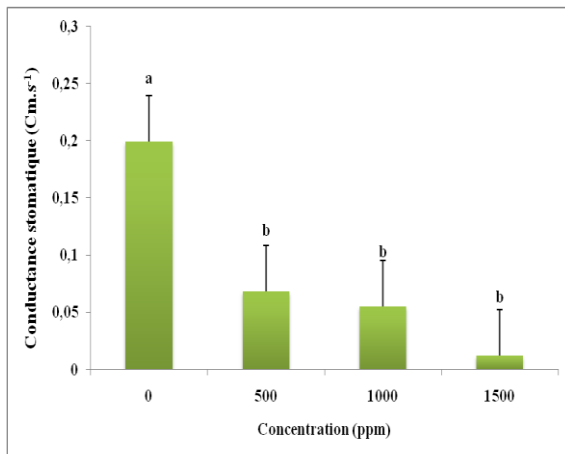


Figure II. 4. 4. Effets des traitements métalliques sur les variations de la conductance stomatique de deux écotypes d'*Atriplex halimus* (MOS et REL). Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

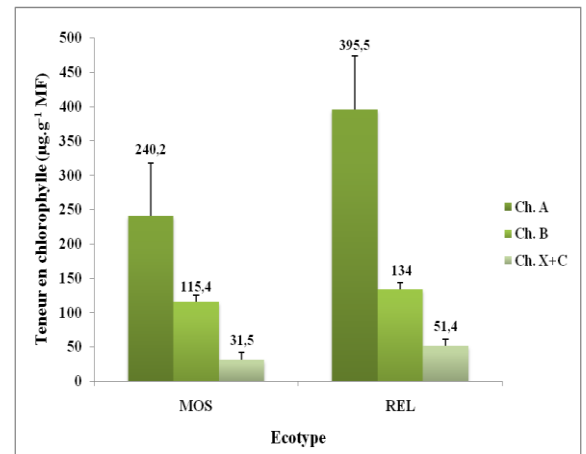


Figure II. 4. 5. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur en chlorophylle des feuilles de deux écotypes d'*Atriplex halimus* (MOS et REL). Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls (au seuil 0,05) selon le facteur Ecotype et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET.

II. 4. 3. 2. Effet des métaux sur l'ajustement osmotique

a. Accumulation d'osmoticums organiques

Le tableau d'analyse de la variance révèle que les variations des teneurs foliaires en proline obtenues émanent essentiellement des concentrations fournies en métaux ($P < 0,01$) (Tableau II. 4. 1). Cependant, les trois concentrations étudiées permettent des augmentations statistiquement similaires (Figure II. 4. 6) des teneurs en proline par rapport aux témoins avec un taux de variation moyen de 20 %. L'interaction écotype-concentration conditionne moins significativement les tendances d'accumulation de cet acide amine ($P < 0,1$).

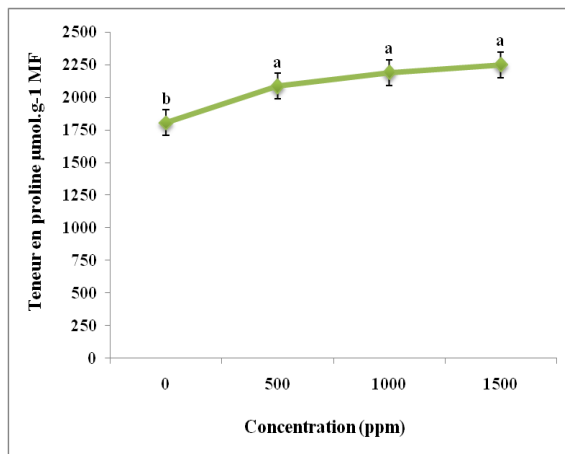


Figure II. 4. 6. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur en proline de deux écotypes d'*Atriplex halimus* (MOS et REL). Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls (au seuil 0,05) selon le facteur « Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions ± ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

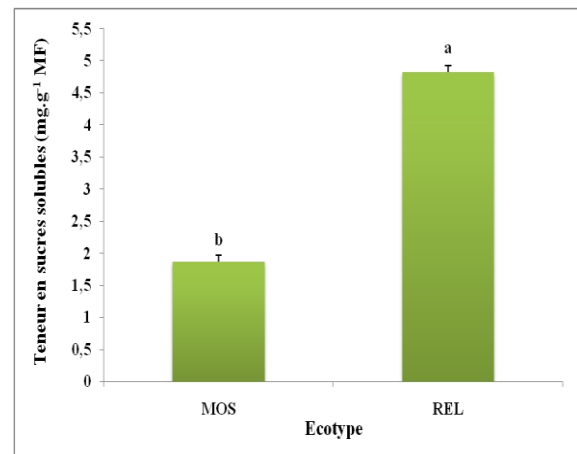


Figure II. 4. 7. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur en sucres solubles de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype » et représentent la moyenne de trois répétitions ± ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

Les teneurs en sucres solubles ont été estimés en situation de contrainte métallique pour voir l'implication de ces solutés dans l'osmorégulation, comme stratégie de tolérance aux métaux. Statistiquement, la variabilité d'expression enregistré n'est attribuée qu'à la différence des écotypes testés ($P < 0,1$) et à moindre mesure des différences des métaux ($P < 0,1$). L'écotype REL présente plus de sucres solubles que MOS (Figure II. 4.7).

b. Accumulation d'osmotocums minéraux

Le tableau II. 4. 2 résume les résultats dégagés de l'analyse de la variance des taux d'accumulation des cations Ca^{2+} et K^+ dans les trois compartiments ; feuilles, tiges et racines des plants. L'étude de la compartimentation du calcium montre que comparativement, les taux d'accumulation en calcium sont presque similaires entre les trois parties des plants témoins avec une légère supériorité à l'échelle foliaire (Figure II.4. 8). Au niveau des plants conduits en stress métallique, les teneurs en Ca^{2+} des feuilles excèdent celles des tiges et des racines. A 500 ppm de métaux (Cd, Zn ou Pb), les teneurs foliaires et caulinaires augmentent avec des taux moyens de 52 % et 25 % respectivement, cependant les taux racinaires subissent une réduction d'un taux moyen de 25 % par rapport aux témoins.

L'analyse statistique des variations des taux de calcium par organe (tiges, feuilles ou racines) montre que pour les feuilles, les grandeurs obtenues sont sous la dépendance très hautement significative du facteur concentration et ses interactions bi factorielles ($P < 0,001$) et tri factorielle ($P < 0,001$) avec les facteurs écotype et métal.

Tableau II. 4. 2. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des teneurs en cations calcium et potassium de l'*Atriplex halimus* L.

Variables	DDL	Ca^{2+}			K^+		
		Feuilles	Tiges	Racines	Feuilles	Tiges	Racines
Ecotype	1	2,52 ^{N.S.}	43,39 ^{***}	6,54 ^{**}	167,75 ^{***}	0,26 ^{N.S.}	0,63 ^{N.S.}
Métal	2	0,14 ^{N.S.}	2,17 ^{N.S.}	0,50 ^{N.S.}	19,08 ^{***}	2,82 [*]	0,48 ^{N.S.}
Concentration	3	28,12 ^{***}	6,69 ^{***}	11,26 ^{***}	2,512 [*]	2,715 [*]	3,17 [*]
Ecotype x Métal	2	0,31 ^{N.S.}	7,045 ^{**}	4,64 ^{**}	11,45 ^{***}	3,09 [*]	0,79 ^{N.S.}
Eco. x Concentration	3	5,83 ^{**}	6,33 ^{**}	14,67 ^{***}	5,28 ^{**}	1,00 ^{N.S.}	1,29 ^{N.S.}
Métal x Concentration	6	7,45 ^{***}	5,59 ^{***}	3,18 ^{**}	3,93 ^{**}	2,11 [*]	0,65 ^{N.S.}
Eco. x Métal x Con.	6	10,73 ^{***}	3,64 ^{**}	2,45 [*]	1,97 [*]	3,3 ^{**}	1,33 ^{N.S.}

Les chiffres représentent les valeurs de F : * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; N.S., non significatif.

La comparaison des moyennes selon le test de Newman-Keuls en fonction des concentrations démontre que les métaux induisent une élévation générale des taux foliaires en Ca^{2+} proportionnellement aux augmentations des concentrations. L'écotype MOS exhibe plus de fluctuations des teneurs en Ca en enregistrant les teneurs minimale

(8,34 g.Kg⁻¹MS) notée chez les témoins, et maximale (21, 29 g. Kg⁻¹MS) relevée à 1000 ppm de Cd (Figure II. 4. 9).

Au niveau caulinaire, l'analyse de la variance indique que l'accumulation du calcium dans les tiges est fortement régie par les différences génotypiques, les concentrations étudiées, ainsi que leur interaction (P<0,001). Les interactions provenance-métal et provenance-métal-concentration contribuent significativement à l'élaboration de ce paramètre (P<0,01). Cela signifie que les deux écotypes testés expriment des tendances variables d'accumulation du Ca²⁺ au niveau de leurs tiges et que cette variabilité est également tributaire des concentrations des métaux testés. La figure II. 4. 10 montre que les concentrations de 500 ppm et 1000 ppm favorisent plus l'acquisition du Ca au niveau des tiges et que les témoins non irrigués et ceux irrigués par 1500 ppm de métaux en retiennent moins.

L'analyse de la variance des teneurs en calcium des racines (Tableau II.4. 2) révèle que les tendances de compartimentation de ce cation à l'échelle racinaire sont régies par les effets très hautement significatifs des facteurs provenance, concentration ainsi que de leur interaction (P<0,001). La conjugaison des effets des du métal en question avec la concentration à laquelle est-il fourni et à l'écotype testé constituent des sources de variabilité importantes (P<0,01).

L'analyse des effets des métaux en fonction de leurs concentrations (Figure II. 4. 11) montre que l'apport de 1000 ppm de cadmium ou de plomb favorise la rétention du calcium au niveau des racines.

Le regroupement d'essais selon le test de comparaison de moyennes montre que les teneurs en Ca²⁺ des racines oscillent entre 3,12 g. Kg⁻¹ MS relevé chez l'écotype REL irrigué par 1500 ppm de Cd et 12,12 g. Kg⁻¹ MS noté chez l'écotype MOS sous 1000 ppm du même métal.

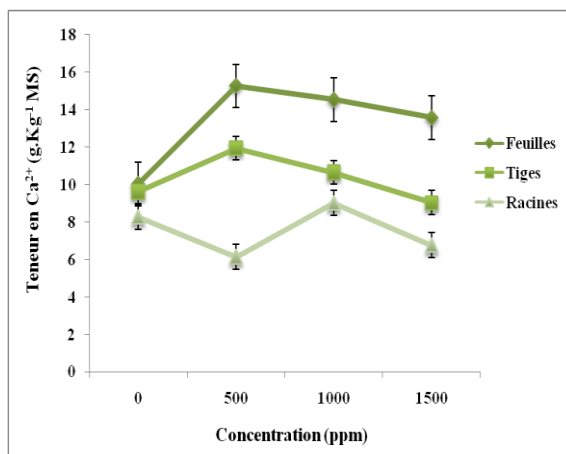


Figure II. 4. 8. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des feuilles, tiges et racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls (au seuil 0,05) selon le facteur « Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET.

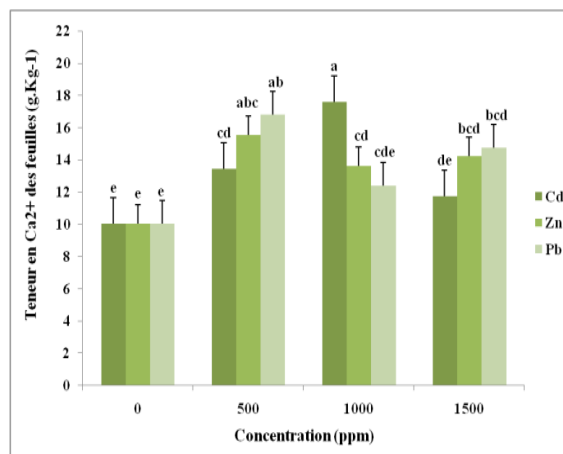


Figure II. 4. 9. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des feuilles de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls (au seuil 0,05) selon l'interaction « Métal-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

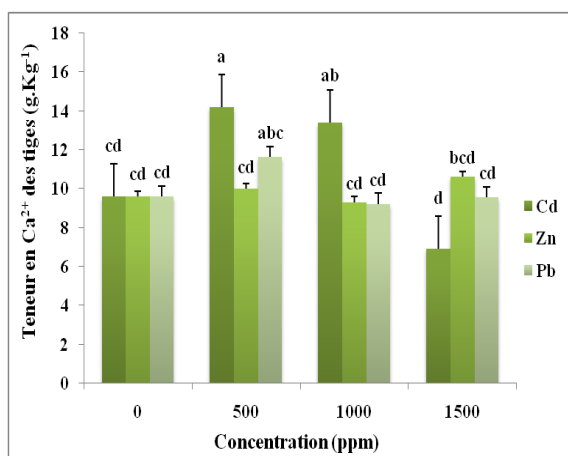


Figure II. 4. 10. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des tiges de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keulselon le facteur « Métal-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

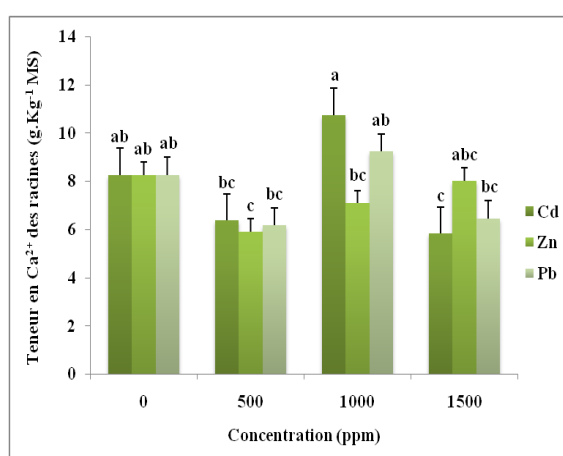


Figure II. 4. 11. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des racines de l'*A. halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keulselon le facteur « Métal-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

La compartimentation du potassium absorbé sous différentes situations de stress par les métaux est illustrée dans la figure II. 4. 12. Il se trace qu'en situation normale ou contraignante, les teneurs foliaires en K^+ dépassent celles caulinaires et racinaires, en outre, les teneurs accumulées de ce cation dans toutes les parties de la plante excèdent significativement celles du calcium.

L'analyse de la variance de la répartition du potassium dans la plante en fonction des géotypes testés et les traitements métalliques (Tableau II. 4. 2) fait ressortir des effets très hautement significatifs ($P < 0,001$) des variables écotype, métal ainsi que de leurs effets conjugués sur les teneurs foliaires. Les concentrations induisent quant à elles la variabilité de ce paramètre en liaison avec des écotypes testés ($P < 0,01$) et les métaux en question ($P < 0,01$). Les variations des teneurs en potassium des tiges sont essentiellement gouvernées par l'interaction des trois facteurs d'étude ($P < 0,01$). Au niveau des racines, les grandeurs obtenues ne sont tributaires qu'aux concentrations des métaux.

La figure II. 4. 13 montre que l'écotype REL enregistre les teneurs foliaires en K^+ les plus élevées et ce quel que soit le métal utilisé et la concentration testée (de 440 à 504 g. $Kg^{-1}MS$). L'écotype MOS exhibe le minimum d'accumulation (187 g. $Kg^{-1}MS$) aux traitements témoins et un taux maximum (317 g. $Kg^{-1}MS$) suite à l'irrigation par 500 ppm de Cd. La figure II. 4. 14 indique que l'écotype MOS accumule des teneurs statistiquement similaires en potassium dans les feuilles et ce quel que soit la concentration utilisée. En regroupant les moyennes des deux écotypes, il se trace que les teneurs accumulées régressent avec la progression des concentrations (Figure II. 4. 15).

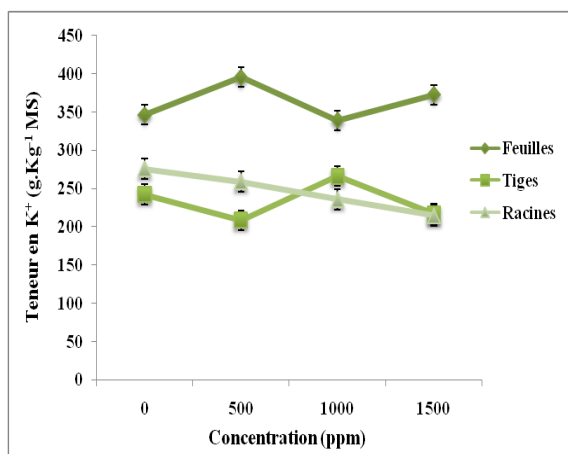


Figure II. 4. 12. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur potassium des feuilles, tiges et racines de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls (au seuil 0,05) selon le facteur « Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET.

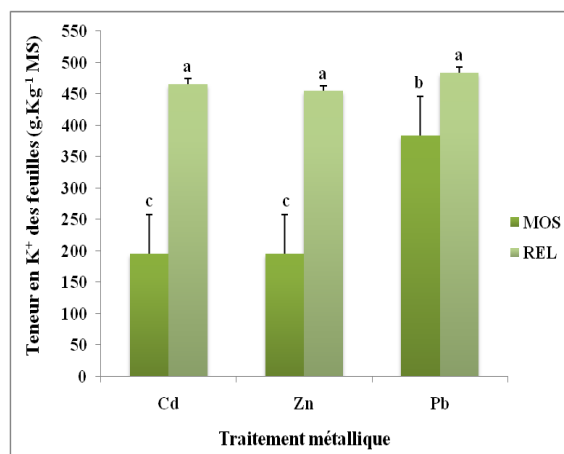


Figure II. 4. 13. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des racines de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Métal-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions + ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

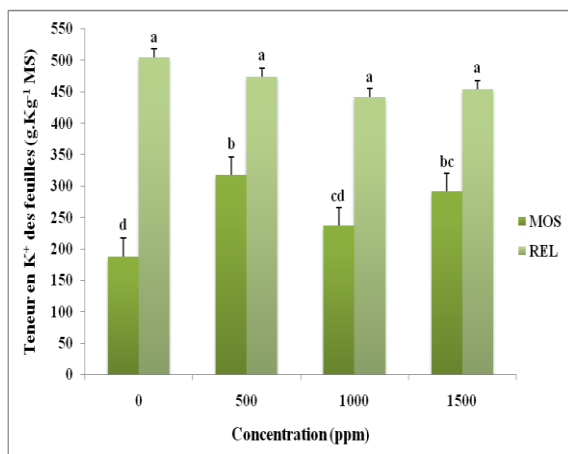


Figure II. 4. 14. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des racines de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

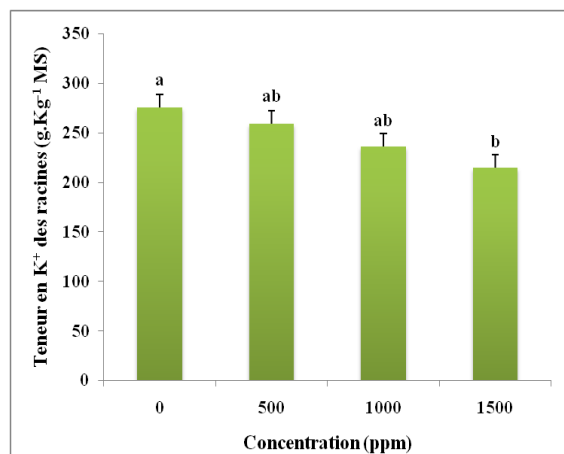


Figure II. 4. 15. Effets des traitements métalliques sur les variations de la teneur calcium des racines de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Métal-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

II. 4. 3. 3. Accumulation et compartimentation des métaux Cd, Zn et Pb

L'analyse de la variance des taux d'accumulation des métaux cadmium, zinc et plomb dans les compartiments feuilles, tiges et racines est illustré dans le tableau II.4. 3.

L'accumulation du cadmium au niveau des feuilles et des racines est fortement régie par la différence génotypique, les variations des concentrations et leurs effets conjugués ($P < 0,001$). Au niveau des tiges, les taux enregistrés sont significativement conditionnés par les facteurs écotype et concentration ($P < 0,01$).

La comparaison des taux moyens d'accumulation foliaire en Cd selon le test de Newman-Keuls (Figure II. 4. 16) montre que l'écotype MOS (153,57 mg. Kg⁻¹MS) excède significativement REL (105,86 mg. Kg⁻¹ MS). Les taux d'accumulation augmentent proportionnellement aux augmentations des concentrations (Figure II. 4. 17). Les taux d'augmentation sont respectivement de l'ordre de 580 %, 1264 % et 3457 % en passant des témoins aux concentrations 500, 1000 et 1500 ppm de cadmium.

Tableau II. 4. 3. Effets des variables écotype, métal, concentration et leurs interactions sur les variations des taux d'accumulation des métaux cadmium, zinc et plomb dans les compartiments feuilles, tiges et racine de l'*Atriplex halimus* L.

Variables	DDL	Cadmium			Zinc			Plomb		
		Feuille	Tiges	Racines	Feuille	Tiges	Racines	Feuille	Tiges	Racines
Ecotype	1	6602,78***	11,36**	9,29***	11,36**	0,31 ^{N.S.}	51,85***	722809,8***	11,36**	970317,9***
Concentration	3	54927,74***	7,53**	276,14***	7,53**	28,53***	30,09***	563655,9***	7,53**	269815,6***
Eco. x Concentration	3	8985,37***	3,20*	14,39***	3,20*	0,24 ^{N.S.}	43,07***	292384,8***	3,20*	172065,3***

Les chiffres représentent les valeurs de F : * $P < 0,1$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; N.S., non significatif.

L'analyse statistique de l'accumulation du zinc montre qu'au niveau des feuilles, la variabilité émanant des différences d'écotypes et de concentration est hautement significative ($P < 0,01$). Au niveau des tiges, seule la variabilité des concentrations est à l'origine des variances avec des effets très hautement significatifs ($P < 0,001$). Quant aux racines, les grandeurs enregistrées se révèlent sous l'étroite dépendance des effets singuliers et conjugués des variables écotype et concentration ($P < 0,001$). Cela signifie que l'accumulation et la compartimentation du zinc varie en fonction du génotype considéré et des concentrations à laquelle ce métal est utilisé.

La comparaison des moyennes d'accumulation foliaires selon le test de Newman-Keuls (Figure II. 4. 18) révèle que les limites d'accumulation sont enregistrées à 1500 ppm, avec un minimum exhibé par l'écotype REL (27,12 mg. Kg⁻¹ MS) et un maximum d'accumulation noté chez l'écotype MOS (422,25 mg. Kg⁻¹ MS). Les limites d'accumulation au niveau des racines (Figure II. 4. 19) sont également relevées à 1500 ppm de Zn avec 40,42 mg. Kg⁻¹ MS chez l'écotype MOS et 2960,27 mg. Kg⁻¹ MS exprimé par l'écotype REL.

L'étude statistique de la variance d'accumulation du plomb au niveau foliaire et racinaire (Tableau II. 4. 3) fait ressortir des effets très hautement significatifs de l'ensemble des variables (P<0,001). Au niveau caulinaire, les effets sont moins significatifs.

L'étude de l'accumulation du plomb au niveau foliaire montre que l'écotype MOS accumule des teneurs significativement plus élevées que l'écotype REL (Figure II. 4. 20), et qu'à l'échelle des racines, le maximum d'accumulation est toujours exhibé par l'écotype MOS à la concentration de 1000 ppm (Figure II. 4. 21).

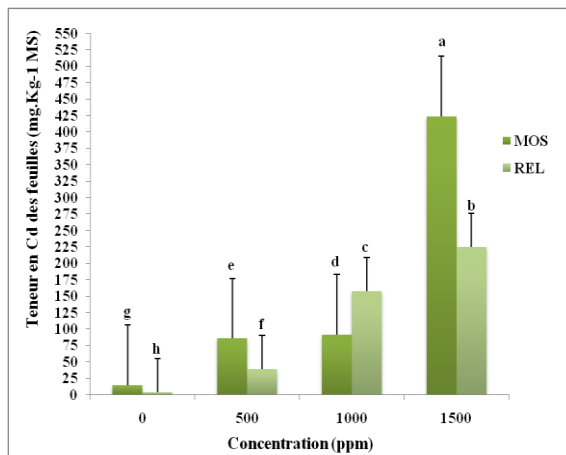


Figure II. 4. 16. Teneurs en cadmium des feuilles de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

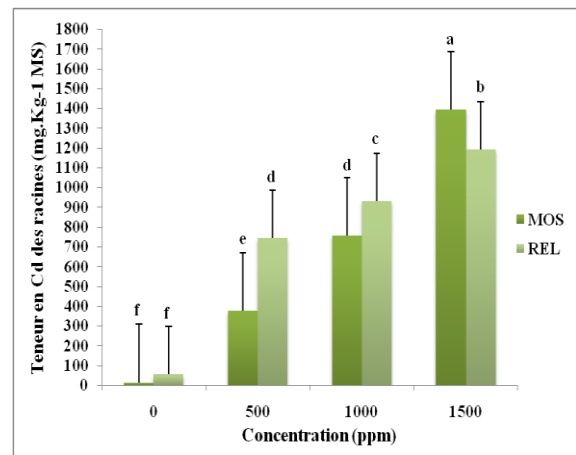


Figure II. 4. 17. Teneurs en cadmium des racines de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions + ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

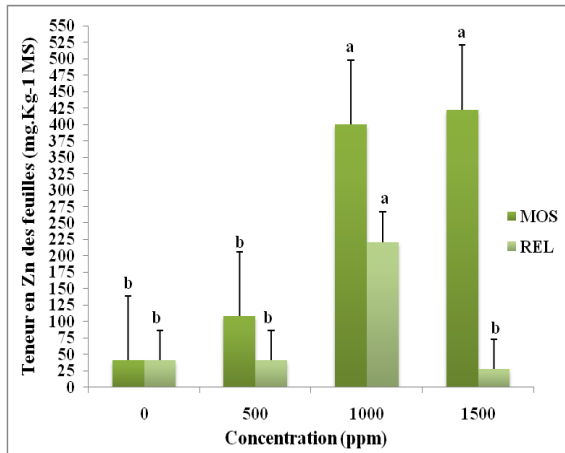


Figure II. 4. 18. Teneurs en zinc des feuilles de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions + ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

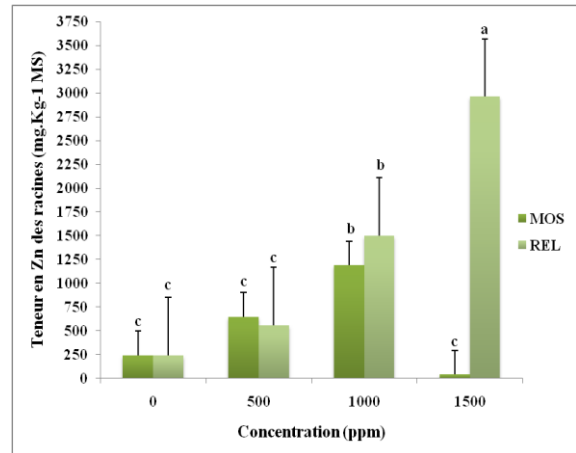


Figure II. 4. 19. Teneurs en zinc des racines de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions+ ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

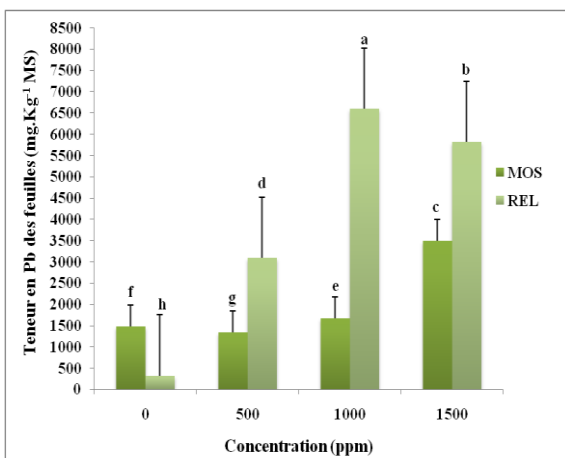


Figure II. 4. 20. Teneurs en plomb des feuilles de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions + ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

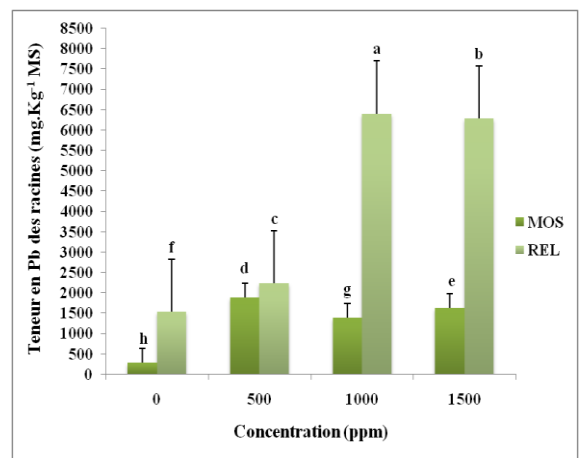


Figure II. 4. 21. Teneurs en plomb des racines de l'*Atriplex halimus*. Les résultats sont regroupés par le test de Newman-Keuls selon le facteur « Ecotype-Concentration » et représentent la moyenne de trois répétitions + ET. Les lettres différentes signifient des différences significatives au seuil 0,05.

II. 4. 4. Discussion

Le problème de la pollution de l'environnement par les métaux lourds devient de plus en plus urgent [279].

Atriplex halimus est un xéro-halophylle bien répandu en Algérie, il montre différentes stratégies d'adaptation aux conditions extrêmes du milieu. Des recherches ont démontré ses potentialités en phytoremédiation des métaux lourds. Les capacités des plantes à accumuler des métaux lourds et à tolérer leur abondance sont des traits spécifiques aux espèces.

Cette recherche se focalise sur la caractérisation des remaniements hydriques, nutritionnels et l'osmorégulation chez deux écotypes d'*A. halimus* en relation avec l'accumulation et la compartimentation par organe des métaux cadmium, zinc et plomb.

Les résultats obtenus montrent que les traitements métalliques testés ont constitué des sources de variations significatives de l'état hydrique des plants. Ainsi pour la teneur relative en eau, les métaux ont induit des variations significatives en fonction de leurs natures et concentrations. Les niveaux d'hydratation sont minimums à 1500 ppm de métaux et sont plus affectés par le cadmium. La dépression de la teneur relative en eau des tissus de l'*A. halimus* est évoqué par NEDJIMI ET DAOUED [39] et NEDJIMI [454] suite au stress par les métaux, par MARTINEZ et al. [455], en situation de stress hydrique, et par WALKER ET LUTTS [89] etBAJJI et al. [455] en réponse au stress salin.

L'abaissement de la teneur relative en eau en situation de stress pourrait être attribué à la réduction du potentiel osmotique. Ceci est confirmé par la corrélation positive et hautement significative ($r=0,62$) relevée entre ces deux paramètres en situation de stress métallique. Les variations du potentiel osmotique se sont montrées significativement corrélées aux spécificités métalliques ($r=0,27$). Les résultats trouvés montrent que le cadmium accentue le potentiel osmotique tissulaire en valeur absolue chez les deux écotypes. POSCHENRIEDER et al. [247], ont montré que chez les végétaux, les niveaux élevés de métaux lourds peuvent induire un stress hydrique secondaire. HAAG-KERWER et al. [252], et SALT et al. [106], ont révélé que la translocation des métaux lourds est principalement due au flux d'eau conduit par la transpiration et la pression radicaire.

Comme les cellules ajustent leur teneur en eau en fonction des fluctuations de leur activité métabolique ou des conditions de l'environnement, le statut hydrique de la cellule

est en changement constant. Ce flux dynamique d'eau sera inévitablement accompagné de modifications de volume de protoplaste ainsi que des potentiels hydriques, osmotique et surtout de la pression de turgescence [357].

Les résultats obtenus montrent que les réductions des teneurs en eau ont été concomitantes aux réductions de potentiels osmotiques foliaires, cependant les niveaux de turgescence se sont maintenus favorables au maintien du port dressé des plants dans l'ensemble des traitements, mis à part à 1500 ppm de cadmium, où le flétrissement a commencé à avoir lieu. Selon MARTINEZ et al. [456]. Le maintien de la turgescence pendant les changements des états hydriques des plantes peut préserver leurs processus métaboliques et contribuer à leur croissance. En outre, la capacité des plantes à réguler ses fonctions métaboliques et physiologiques pourrait jouer un rôle important dans les conditions contraignantes.

Chez les végétaux, le maintien de la turgescence cellulaire, et donc du port dressé sous contrainte hydrique ou/ou osmotique, pourrait résulter d'une osmorégulation favorisée par l'accumulation de composés osmorégulateurs garantissant ainsi un gradient de potentiel chimique, et / ou d'un relatif renforcement de la rigidité pariétale face à la déformation suite à une absorption massive d'eau ou à une plasmolyse. L'ajustement osmotique via l'accumulation intracellulaire active d'osmolytes génère de faibles valeurs de Ψ_w tissulaire ; ces faibles valeurs coïncidentes du faible potentiel osmotique (Ψ_s) maintiennent la turgescence tissulaire [440] ; [89]. L'osmorégulation peut aider à atteindre cet objectif et est considérée comme un mécanisme bénéfique de tolérance au déficit hydrique chez plusieurs espèces végétales [476].

MARTINEZ et al. [456], indiquent que la modification de la composition de la paroi cellulaire peut être impliquée dans le maintien de la turgescence en modifiant l'élasticité de la paroi. Lorsque les cellules absorbent ou perdent de l'eau, elles subissent des variations infimes de volume et de potentiel osmotique. Par contre, à cause de la présence d'une paroi solide et relativement rigide, les cellules végétales sont capables de développer des pressions de turgescence élevées. Les parois des cellules végétales résistent généralement bien aux déformations mécaniques, et sont donc relativement rigides ou non élastiques [459]; [357]. En revanche, les espèces ligneuses avec des parois cellulaires élastiques ont une forte tolérance inhérente à la dessiccation en l'absence d'ajustement

osmotique car dans cette situation, le potentiel de turgescence est maintenu sur une large gamme de teneur relative en eau (RWC) [460].

Le degré d'ouverture des stomates en réponse à un stress traduit la capacité de la plante à percevoir le signal racinaire, et à réguler ses fonctions pour préserver son état hydrique. L'étude de la conductance stomatique montre un véritable contrôle de la transpiration et des échanges gazeux. Ce contrôle est significativement corrélé aux concentrations métalliques ($r=-0,65$), montrant ainsi que l'accentuation du stress par les métaux réduit la conductance stomatique et donc la surface d'échanges gazeux et hydriques. Ce résultat concorde celui de MESNOUA et al. [40] observé chez *A. halimus* sous régime contraignant de cadmium. Cette réaction est déjà bien documentée en situation de stress hydrique et salin chez cette même espèce [461] ; [86]. Ces auteurs suggèrent que sous stress osmotique, l'ABA améliore la régulation stomatique et l'efficacité de l'utilisation de l'eau, tandis que sous salinité externe, l'hormone favorise l'excrétion de Na^+ et de Cl^- dans les poils vésiculés.

Les métaux affectent les échanges gazeux au niveau des surfaces foliaires en contrôlant l'activité photosynthétique [462] ; [463], celle-ci est souvent caractérisée par une diminution du taux de photosynthèse nette et de la conductance stomatique [256]. L'altération des échanges gazeux au niveau des feuilles peut être due à la fermeture des stomates induite par la perturbation de l'état hydrique des plantes stressées par ces éléments [464]. En outre, La diminution de la conductance stomatique entraîne une limitation du flux de CO_2 entrant ; phénomène considéré comme la cause principale de la forte réduction de la fixation du CO_2 [465]. Les éléments traces peuvent également inhiber certaines enzymes intervenant dans le cycle de Calvin notamment la Rubilose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase (Rubisco) qui joue un rôle clé dans l'assimilation du CO_2 [466] ; [467].

L'estimation des pigments chlorophylliens, montre que ces derniers semblent inaffectés par les traitements métalliques testés et que les différences obtenues émanent principalement de la différence génotypique. Vraisemblablement, les doses des métaux Cd, Zn et Pb testées dans cette étude demeurent inférieures aux seuils de toxicité des métaux utilisés. Ce résultat pourrait refléter le haut niveau de tolérance de cette espèce. En fait, les variations des poids spécifiques foliaires se sont montrées également non significatives, indiquant que les feuilles des plants pollués différemment par les métaux sont

statistiquement identiques à celles des témoins, et que les variations morphologiques s'opéraient en dehors de l'action spécifique des métaux. Ces résultats rejoignent ceux de RABIER et al. [441], indiquant que les indices moyens de chlorophylle relevés *in situ* correspondent aux indices de référence pour les feuilles saines pour trois sites multi pollués par les métaux, et laisse supposer une tolérance aux métaux et métalloïdes de cette espèce. Selon ces chercheurs, ce niveau de tolérance explique les observations visuelles d'absence de pourcentages significatifs de feuilles jaunies ou nécrosées d'*A. halimus*.

Dans cette recherche, les teneurs en proline et en sucres solubles ont été estimés pour montrer l'importance de l'osmorégulation comme stratégie de tolérance aux métaux. L'accumulation de la proline suite à l'exposition aux métaux lourds et est considérée comme impliquée dans la résistance particulière aux stress [468] ; [469] ; [470]. Les résultats montrent que l'apport de métaux aux concentrations précitées, a induit une accumulation significative ($r=0,41$) de proline au niveau des feuilles. Ce résultat est en accord avec celui de NEDJIMI ET DAOUD [39], montrant que les teneurs racinaires et foliaires en proline augmentent suivant l'augmentation des concentrations du Cd Cl₂. MARTINEZ et al. [456] indiquent que la proline n'est pas impliquée dans l'ajustement osmotique des plants d'*A. halimus* soumis au stress hydrique car sa teneur dans les feuilles était relativement faible et n'était pas modifiée en réponse au déficit hydrique, bien que la TRE et le Ψ_s des feuilles aient diminué de façon significative. Cette tendance est évoquée par BAJJI et al. [473] chez la même espèce en conditions de stress salin ; les auteurs suggèrent que les altérations dues au déficit hydrique sont moins importantes que les dommages causés par le sel où probablement, les ions Na⁺ et Cl⁻ peuvent avoir des effets toxiques supplémentaires entraînant directement une surproduction de proline indépendamment de la composante osmotique du stress salin. Cette stratégie pourrait expliquer l'induction de l'ajustement osmotique via l'accumulation de la proline suite aux toxicités spécifiques des métaux.

Les résultats montrent que les deux écotypes testés accumulent de façons similaires la proline et ce quel que soit la nature du métal en question et sa concentration. Ainsi cette stratégie est induite par la seule présence de polluants métalliques indifféremment des origines des écotypes ou de métaux.

Quant aux sucres solubles, les différences de teneurs foliaires obtenues se sont avérées majoritairement imputées aux différences génotypiques avec une supériorité très

hautement significative chez l'écotype REL. MARTINEZ et al. [456] rapportent que chez *A. halimus*, les concentrations foliaires en sucre soluble augmentent significativement avec la diminution de la teneur relative en eau foliaire.

BAJJI et al. [455] démontrent que chez l'arbuste xero-halophylle *A. halimus*, la proline, les composés d'ammonium quaternaires et les sucres solubles s'accumulent à la fois dans les lignées cellulaires et dans les plantes entières exposées à la salinité. Ces composés bénéficient aux cellules stressées de deux façons : (i) en agissant comme osmolytes cytoplasmiques, facilitant l'absorption et la rétention d'eau [471], et (ii) en protégeant et en stabilisant les macromolécules et les structures (les protéines, les membranes, les chloroplastes et les liposomes) contre les dommages induits par les conditions de stress [472]; [473]; [474], et (dans le cas de la proline) pour réguler le métabolisme, en agissant comme antioxydants favorisant la restauration une fois le stress levé [475].

L'étude de l'accumulation et la compartimentation des cations calcium et potassium en relation avec les traitements métalliques permet de montrer si ces ions sont impliqués dans l'osmorégulation par accumulation ou leurs niveaux internes sont altérés suite aux déséquilibres nutritionnels. RABIER et al. [441], ont montré que la tolérance de l'*A. halimus* est largement due aux mécanismes d'exclusion.

L'ion Ca^{2+} existe essentiellement à l'état libre dans les tissus où il est réparti entre plusieurs compartiments, avec très souvent des différences importantes dans les concentrations, par exemple environ 100 nM dans le cytosol et jusqu'à 100 mM dans la vacuole. De telles différences constituent une condition favorable pour que le Ca^{2+} cytosolique se comporte comme un messager secondaire impliqué dans la transmission des informations provenant de stimulus divers. En effet, ces concentrations peuvent subir des variations rapides, généralement transitoires et parfois cycliques, en fonction des conditions externes [476]. Le calcium est également nécessaire à la fois au maintien de l'intégrité physique et au fonctionnement normal des membranes. Il est considéré comme messager secondaire dans certaines réponses hormonales ainsi que dans certaines réponses aux facteurs de l'environnement [357].

Les résultats trouvés montrent que les métaux induisent une élévation générale des taux foliaires en Ca^{2+} , les teneurs accumulées sont significativement corrélées aux concentrations des métaux testés ($r=0,31$). Au niveau des tiges, l'analyse statistique montre

des réponses controverses en fonction des concentrations, ainsi, 500 et 1000 ppm de métaux induisent une hausse des niveaux de Ca^{2+} , et à 1500 ppm, les teneurs sont statistiquement similaires aux témoins. Quant aux racines, il se démontre que 1000 ppm de plomb ou de zinc favorisent l'adsorption du calcium à ce niveau. Parmi les corrélations, il se trace que les teneurs accumulées au niveau des racines sont positivement et significativement corrélées aux teneurs caulinaires ($r=0,33$). D'un autre côté, il s'avère que les teneurs racinaires en calcium sont négativement et significativement corrélées à l'accumulation de la proline ($r=-0,31$).

La multiplicité des échanges entre compartiments assure une très grande flexibilité des concentrations du Ca^{2+} , notamment dans le compartiment cytosolique. Les variations sont pour une part dues à une régulation très sélective exercée par les systèmes de transport qui contrôlent les influx et les efflux [476]. En tant que messager secondaire impliqué dans la phosphorylation des protéines, le Ca^{2+} pourrait être un facteur important dans la régulation des activités de nombreuses enzymes [357].

L'ion potassium exerce un rôle d'activation de nombreuses enzymes, en particulier celles impliquées dans la photosynthèse et la respiration, la synthèse de l'amidon ainsi que celle des protéines. Le transfert de potassium est le principal facteur de mouvements des plantes, comme les mouvements d'ouverture ou de fermeture des cellules de garde des stomates, les mouvements nyctipériodiques ou l'orientation des feuilles durant la journée [357].

Cette étude démontre que les teneurs en potassium des tissus de l'*A. halimus* excèdent significativement celles en calcium, et que la majeure partie du K^+ absorbée est stockée dans les feuilles. Des corrélations significatives sont relevées entre les teneurs foliaires en potassium et les différences génotypiques ($r= 0,71$) et métalliques ($r=0,28$). L'écotype REL exhibe une richesse foliaire en potassium par rapport à MOS dans toutes les situations. L'augmentation des concentrations des métaux testés au niveau racinaire est en faveur d'une diminution des teneurs en potassium ($r=-0,35$). Les résultats montrent également que les teneurs foliaires en potassium sont significativement corrélées au potentiel osmotique ($r=0,28$). DI MARTINI et al. [477] ont évoqué que les halophytes et les glycophytes tolérants qui accumulent du Na^+ présentent une réduction de leur contenu en K^+ en fonction de l'augmentation croissante du sel dans le sol. Cette diminution semble être liée au remplacement de K^+ vacuolaire par Na^+ . Selon HOPKINS [357], le potassium

ne semble pas contracter de liaisons avec des éléments structurels dans la plante, mais tout comme l'azote ou le phosphore, il est très mobile. NEDJIMI ET DAOUD [39] ont trouvé que les concentrations de Ca^{2+} et de K^+ dans les deux compartiments aériens et souterrains des plants d'*A. halimus* ont diminué de façon significative avec l'augmentation du niveau de Cd. L'accumulation de sels (NaCl, KCl, sels de Mg et Ca) dans les vésicules foliaires et les tissus périphériques des racines a été observée et ces sels peuvent entrer en compétition avec l'absorption des éléments métalliques [441].

Comme les interactions entre les éléments minéraux sont répandues chez les végétaux, et l'osmorégulation est tributaire du stress en question et des osmolytes minéraux considérés, des corrélations entre les taux d'accumulation des métaux testés ; cadmium, zinc et plomb et les cations majeurs calcium et potassium dans les trois compartiments : feuilles, tiges et racines ont été établies.

Dans les lots irrigués par le cadmium, les résultats montrent que la nature génotypique est significativement corrélée au calcium racinaire ($r=0,44$), et au potassium foliaire ($r= 0,94$). En outre, parmi les corrélations significatives, le calcium foliaire est positivement corrélé à celui caulinaire ($r=0,64$), et ce dernier est également positivement corrélé aux teneurs racinaires ($r=0,74$).

La corrélation négative reportée au niveau des racines montre l'effet antagoniste de l'absorption du potassium exercé par le cadmium ($r=-0,44$). Ceci est en faveur d'une entrave d'absorption de ce cation. Ce résultat est en accord avec ceux de NEDJIMI ET DAOUED [39], et MESNOUA et al. [40].

L'irrigation par des doses croissantes de zinc montre que la rétention du calcium au niveau des racines s'oppose significativement à sa migration et son stockage foliaire ($r=-0,57$). L'accumulation du zinc à l'échelle foliaire s'accompagne d'une rétention significative du calcium au niveau des tiges ($r=0,51$). Le stockage du zinc au niveau des feuilles est négativement corrélé aux quantités de potassium amoncelées dans les feuilles ($r=-0,49$). Ces résultats démontrent l'importance du calcium dans les racines et son rôle dans la transduction du signal du stress abiotique émet par l'excès de zinc.

Quant aux traitements plombiques, il s'avère que les taux de calcium racinaire s'opposent significativement aux taux caulinaires ($r=-0,43$), et que les teneurs foliaires en calcium et en potassium augmentent conjointement ($r=0,53$). En outre, les teneurs foliaires

et racinaires du plomb sont négativement corrélées aux teneurs caulinaires ($r=-0,47$) et ($r=-0,59$) respectivement.

L'addition du Cadmium dans le milieu de culture affecte la nutrition en calcium et en potassium dans les racines et les pousses aériennes [39]. Une restriction de la croissance concomitante à une perturbation de l'absorption du Calcium induite par le Cd a été rapportée chez plusieurs espèces végétales [478]; [479]. D'après CLEMENS et al. [480], le Cadmium entre en compétition avec le Calcium et d'autres cations pour pénétrer les cellules végétales. MESNOUA et al. [40] ont noté que le Cadmium entraînait une réduction considérable des macronutriments (K, P et Mg) et des micronutriments (Fe et Mn) dans les pousses et / ou les racines des plantes de *A. halimus*. La réduction de l'absorption des éléments minéraux essentiels a été décrite comme l'un des effets des métaux lourds sur plusieurs plantes [37]. La réduction des micronutriments comme Mn est probablement due à la concurrence pour les transporteurs ou à l'interférence avec l'expression du gène du transporteur [481]. La différence de macronutriments solubles et la pénétration d'ions salins résulte de leur compétition au niveau des transporteurs membranaires [482].

Dans la racine d'*A. halimus*, les cations Ca, Mg et K ont été détectés principalement dans le phloème. L'ordre de grandeurs en éléments détectés est $Ca < Mg < K$. K était également présent dans le xylème primaire et secondaire. En outre, Na était plus concentré près de la limite intérieure du phloème. Ceci confirme l'hypothèse d'une dispersion d'éléments dans tous les tissus végétaux et non un stockage dépendant des tissus dans un même organe [441].

Les macronutriments Ca, Mg et K ont tous été trouvés sous forme de couches diffuses et de concrétions dans les racines. La présence de ces concrétions pourrait également incorporer des éléments traces métalliques [441].

En conditions de salinité, les concentrations du potassium dans les tissus diminuent, cependant, la croissance n'est pas affectée ou même stimulée [455] ; [483]. D'après WALKER et al. [484], ce fait est dû à la faible teneur totale en potassium nécessaire pour la plante pour remplir ses rôles cytosoliques spécifiques, ainsi sa substitution par d'autres cations tels que le Na^+ en tant que d'osmolyte vacuolaire.

Les taux d'accumulation et de translocation des métaux enregistrés montrent qu'*A. halimus* présente un large spectre d'accumulation des métaux avec une variabilité de

translocation relative aux conditions de culture. Ainsi, il se démontre que l'écotype MOS accumule plus de cadmium que REL, et que les taux accumulés soient amplifiés par les élévations de doses, avec des degrés de corrélations très hautement significatifs pour les organes ; feuilles ($r=0,86$), tiges ($r=0,82$) et racines ($r=0,96$).

L'accumulation du zinc, est fortement sensible aux variabilités imposées, ainsi, les taux foliaires sont significativement corrélés aux variations génotypiques ($r=0,44$), et de concentrations ($r=0,50$). Les taux caulinaires sont significativement corrélés aux concentrations ($r=0,89$), et les taux racinaires montrent des corrélations positives hautement significatives avec les écotypes ($r=0,42$), et les concentrations ($r=0,55$). L'écotype MOS accumule d'avantage le zinc que REL.

L'accumulation du plomb dans les feuilles, tiges et racines est significativement corrélée aux concentrations ($r=0,70$; $r=0,61$ et $r=0,57$ respectivement). L'écotype MOS accumule plus de plomb dans ses feuilles et ses racines que REL.

L'ordre moyen d'accumulation des trois métaux dans les feuilles des deux écotypes MOS et REL est respectivement : (Pb : 2975, 49 mg. Kg⁻¹ MS) > (Zn : 162,29 mg. Kg⁻¹ MS) > (Cd : 129,71 mg. Kg⁻¹ MS). En confrontant ces résultats aux seuils d'accumulation fixés par BAKER et al. (1994) [436] à 10000 mg. Kg⁻¹ (1%) pour le Zn, 1000 mg. Kg⁻¹ (0.1%) pour le Pb et 100 mg. Kg⁻¹ (0.01%) pour le Cd, Il se démontre que l'*A. halimus* est hyperaccumulateur de plomb (par chélation) et accumulateur de cadmium. L'estimation des taux de translocation moyens estimés chez les deux écotypes montrent que la translocation est maximale à 1500 ppm de métaux, et est de l'ordre de 0,24 pour le Cadmium, 1,5 pour le plomb et 5,2 pour le zinc. Ces résultats concordent ceux trouvés précédemment (chapitre 3 ; en conduite hydroponique) et confirment les potentialités phytoremédiantes de cette espèce en plomb et en cadmium, et sont en accord avec ceux de LOTMANI et al. [42] confirmant que les éléments Zn, Cu et Pb étaient préférentiellement stockés dans les parties racinaires plutôt que transférés dans les parties aériennes des plantes, et ceux de RABIER et al. [441], suggérant que la translocation des éléments traces dans les parties aériennes implique certainement des mécanismes d'exclusion selon un diagnostic phytosanitaire et la disposition d'un système racinaire profond, *A. halimus* apparaît selon ces auteurs comme un bon candidat pour la phytostabilisation des métaux traces et des métalloïdes dans les sols du littoral méditerranéen contaminés par le sel.

Selon SEREGIN ET IVANOV [279], les végétaux accumulateurs amassent les métaux principalement dans leurs pousses aériennes, à faibles et hautes concentrations de métaux dans le sol. LIU et al. [485], confirment que les plantes ayant un facteur de bioaccumulation élevé et un faible facteur de translocation ont un potentiel de phytostabilisation. Ainsi, *Atriplex halimus* L. se montre une plante intéressante dans les stratégies de phytostabilisation du cadmium et l'hyperaccumulation du plomb par extraction induite en utilisant des chélateurs.

II. 4. 5. Conclusion et perspectives

Atriplex halimus une xérohalophylle à large polymorphisme et potentialités en phytoremédiation. Les résultats montrent que parmi ses stratégies d'adaptation aux métaux lourds, le maintien de son état hydrique par abaissement du potentiel osmotique et la réduction de la conductance stomatique et encore l'accumulation de la proline. L'étude de la dynamique des cations calcium et potassium en relation avec l'accumulation des métaux montre que le cadmium entraîne une accumulation du calcium qui pourrait jouer le rôle d'un osmorégulateur foliaire et une altération des niveaux du potassium dans tous les organes de la plante. L'accumulation du zinc entraîne une rétention massive du calcium au niveau des racines, et l'augmentation des niveaux du plomb fait augmenter les teneurs en calcium et en potassium de tous les organes, ce qui milite vers l'osmorégulation ionique.

L'estimation des taux d'accumulation et de translocation des trois métaux montre que cette plante est prometteuse en phyto stabilisation du cadmium et l'hyper accumulation du plomb par phytoextraction induite via la chélation.

Les taux d'accumulation des métaux dans les tiges d'*A. halimus* estimés pour la première fois dans cette étude montrent l'importance des taux de plomb accumulés (par chélation) à ce niveau et évalués à 1894,9 mg. Kg⁻¹ MS chez MOS et à 3295,5 mg. Kg⁻¹ MS chez REL, sachant que cette plante présente un système de branchement important offrant un compartiment supplémentaire d'accumulation, ce qui renforce les potentialités phytoremédiantes en plomb de cette espèce.

Les résultats montrent que l'écotype Mostaganem (MOS) accumule davantage les métaux que Relizane (REL). Ce résultat est en faveur de l'utilisation des halophytes dans la phytoremédiation du moment que le premier écotype peuple la zone littorale, où il forme des nappes sur de larges étendues. L'étude de l'apport de la salinisation sur les niveaux de

tolérance et d'accumulation serait d'un apport significatif. En outre, la caractérisation de la variabilité génétique des populations étudiées a fin de distinguer les facteurs codant pour la résistance de l'*A. halimus* aux métaux pourrait proposer cette espèce comme modèle pour la compréhension des mécanismes communs et spécifiques de tolérance et d'accumulation et leurs supports génétiques.



**Discussion
générale et
conclusion**

DISCUSSION GENERALE

Le monde connaît actuellement un vrai problème de pollution touchant les compartiments ; atmosphère, hydrosphère et lithosphère ; la biosphère dans son ensemble est menacée. La pollution par les métaux lourds est la plus problématique des pollutions vue la nature non biodégradable des métaux, et leur persistance dans l'environnement. En outre, la biodisponibilité, la spéciation et l'accumulation des métaux dans divers organismes amplifient leur toxicité.

Les végétaux constituent un maillon clé dans les processus de génération et de cyclisme des espèces métalliques, et c'est à travers lesquels, que ces polluants majeurs atteignent les voies alimentaires des humains, d'autre part, c'est sur les végétaux que les effets préjudiciables des métaux, sont immédiatement discernables.

Les productions végétales sont la base de l'alimentation humaine, et les progrès en agriculture doivent être multipliés face aux changements et défis imposés par l'avènement des notions de développement durable et de l'agro-écologie, cette dernière consistant à maximiser la biodisponibilité fonctionnelle, et à renforcer les régulations biologiques, garantit respect et protection de l'environnement.

Un des défis de l'agriculture d'aujourd'hui est de surmonter le problème de la pollution des sols par les métaux lourds, et l'une des solutions écologiques est la phytoremédiation ; là encore, les végétaux constituent une clé de récupération et d'amendement des sols pour répondre aux besoins croissants en productions végétales et animales de qualité, saines et importantes.

L'utilisation des halophytes indigènes est l'une des stratégies de réussite en phytoremédiation. Cette thèse a été conduite dans la perspective de fournir une plante efficace en phytoremédiation des métaux plomb, zinc et cadmium, et également de proposer une plante modèle pour investiguer les mécanismes d'ordres divers impliqués dans les phénomènes de tolérance et d'accumulation des métaux.

L'étude a porté sur deux stades essentiels à l'installation d'une culture ; la germination et la croissance juvénile. Les résultats émanant des deux tests de germination ont permis les conclusions suivantes :

A. halimus germe potentiellement dans des milieux fortement pollués par les métaux : zinc, plomb et cadmium, de ce fait, sa culture pour la remédiation des sites pollués par les métaux, peut être établie par semis.

Au cours de leur imbibition, les graines d'*A. halimus* répondent différemment en fonction du métal en question ; le plomb et le zinc semblent être adsorbés au niveau des téguments, et le cadmium a plus de tendances d'affranchir la barrière tégumentaire et rejoindre les tissus embryonnaires, ce qui explique ses effets précoces et préjudiciables.

Les métaux réduisent significativement la germination des graines, avec des pourcentages négativement corrélés aux concentrations (jusqu'à 19 % à 10 000 ppm de métaux), cependant, l'inhibition est minime, et les pourcentages enregistrés demeurent toujours élevés (80 % à 10000 ppm de métaux). Après chélation par l'EDTA, le Pb a réduit significativement la croissance des racines. Les chélateurs pourraient augmenter significativement la mobilité de ce métal, ce qui permet de mieux étudier ses impacts sur les graines en germination.

Les métaux cadmium, zinc et plomb réduisent les taux de germination en réduisant la croissance des racines. Le cadmium et le zinc diminuent les longueurs des racines par diminution des longueurs cellulaires. Le plomb limite l'allongement des racines par des effets génotoxiques se traduisant par des perturbations de l'activité mitotique.

L'estimation des taux d'accumulation et de translocation des métaux par des plantules d'*A. halimus* cultivées en hydroponie à des concentrations très élevées ; 5000 et 10000 ppm de métaux, montre que cette plante a la capacité d'hyper-accumuler le cadmium, mais, plus de la moitié de la quantité absorbée reste adsorbée au niveau des racines, ce qui fait de la plante plus propice à la phytostabilisation. La plante est hyper-accumulatrice de plomb, toutefois, la translocation n'est efficace que suite à une chélation, donc cette plante revêtirait une importance dans les projets de phytoextraction induite du cadmium et du plomb. Notre candidate enregistre des taux d'accumulation en zinc faibles par rapport aux normes, avec des taux de translocation plus élevés comparativement à ceux du cadmium. L'*A. halimus* peut être utilisée comme couvert végétal pour stabiliser les sols pollués par les métaux, et l'écotype MOS est le plus recommandé du fait qu'il en accumule moins mais sa tolérance et croissance sont mieux par rapport à REL, ce dernier accumule mieux.

Cette étude a montré la meilleure croissance de l'*A. halimus* en conditions d'excès des métaux Cd, Zn et Pb, et a permis de dégager certains marqueurs morphologiques d'accumulation des métaux, en l'occurrence, la hauteur et le poids frais des pousses, la néoformation des nœuds, le diamètre des axes racinaires témoignent l'accumulation des trois métaux étudiés dans les pousses et les racines des plants traités. L'élongation des

.....

racines est un marqueur d'accumulation du cadmium et du zinc dans toute la plante. Le rendement en matière sèche marque l'accumulation et la translocation du zinc.

Selon RABIER et al. [459], la haute résistance apparente aux métaux et métalloïdes de l'*A. halimus* pourrait être liée à des mécanismes de tolérance au niveau racinaire dus à l'action des niveaux de salinité et aux associations symbiotiques, et au niveau des feuilles vue la présence de trichomes.

La culture en pots et l'irrigation par des concentrations très faibles par rapport à celles utilisées précédemment (500, 1000 et 1500 ppm), ont été procédés dans la dernière expérimentation. Le but de ce volet est de comprendre les mécanismes physiologiques, et l'intérêt de l'osmorégulation dans la tolérance aux métaux, les conditions de cultures sont présumées similaires à celles des contaminations naturelles ; à savoir un apport continu de faibles doses de métaux sur des cultures installées en sol.

Les résultats montrent que dans de telles conditions, les plants préservent leurs états hydriques à des niveaux optimums par réduction du potentiel osmotique et de la conductance stomatique. Concernant les teneurs en pigments chlorophylliens, aucune différence significative n'a été relevée entre les témoins et les traités. Ceci est en accord avec les rapports de RABIER et al. [441], montrant que les feuilles d'*A. halimus* présentaient un processus de sénescence léger et lent lors de l'incubation des feuilles détachées dans l'obscurité, c'est-à-dire qu'aucune différence visuelle dans la perte de chlorophylle n'a été détectée entre les feuilles non sénescentes et sénescentes après 15 jours.

En outre, une accumulation de la proline a été enregistrée dans les feuilles de l'ensemble des traitements métalliques, ce qui démontre son importance comme osmolyte organique. L'accumulation de la proline contribue, efficacement à l'osmorégulation [486].

L'estimation des teneurs en calcium et en potassium dans les différents compartiments de la plante, montre que les métaux induisent des différences significatives de répartition de ces cations, et qui sont reliées aux niveaux d'accumulation des métaux. Ainsi, les plants stressés au cadmium exhibent une accumulation du Ca^{2+} comme osmolyte dans les feuilles, et une diminution des teneurs en K^+ , tandis que le zinc entraîne une accumulation du Ca^{2+} au niveau des racines. L'osmorégulation par accumulation de ces deux cations dans toutes les parties de la plante est nette et significative dans les traitements au plomb.

Selon TATTINI et al. [487], L'accumulation de solutés organiques dans les cellules permettrait la protection de l'état physiologique de la plante, malgré les dégradations

.....

internes conséquentes. Dans le cas des ions, l'osmorégulation génère de faibles valeurs de potentiel hydrique tissulaire (Ψ_w), ainsi que de potentiel osmotique, ce qui maintiendrait la turgescence cellulaire, et donc, l'absorption d'eau de milieux extrêmement salins [455]. Le Cd peut interférer avec l'absorption des nutriments, en altérant la perméabilité de la membrane plasmique, et en affectant les processus de transport des éléments à travers la membrane, en particulier ceux ayant la même valence comme Fe et Mn... [488]. En outre, l'excrétion des sels via les trichomes des halophytes tel *A. halimus* n'est pas toujours spécifique aux ions sodium et chlorure, d'autres ions potentiellement toxiques comme le zinc, le cuivre ou le plomb peuvent être excrétés par les trichomes sur la couche supérieure des feuilles à travers une solution solide dans le réseau cristallin [35].

L'étude des capacités d'accumulation des trois métaux montre les mêmes tendances qu'en culture hydroponique sous de fortes concentrations ; en l'occurrence, une phytostabilisation du cadmium, hyperaccumulation du plomb après chélation, et faibles taux d'accumulation du zinc malgré l'importance de la translocation. Cependant, les écotypes testés montrent cette fois-ci un comportement controversé ; à savoir des niveaux d'accumulation plus élevées chez l'écotype Mostaganem que Relizane.

Ce résultat laisse supposer que les potentialités en phytoremédiation des différents métaux de cette espèce ne doivent pas être prises comme caractère commun mais la base génétique de cette accumulation doit être étudiée en investiguant le polymorphisme étendu de cette espèce.

Parmi les objectifs de ce travail de thèse, la création d'un matériel végétal efficace en phytoremédiation, par amélioration des taux d'accumulation et de translocation des métaux, et ce par pression de sélection. Cet objectif n'a pas pu être atteint vu les contraintes techniques et l'indisponibilité des moyens et conditions de travail. Ce qui suit est un exposé des principes et protocole expérimental du travail espéré.

Principe : Le travail fait partie de l'amélioration *in vitro* de la phytoremédiation, il repose sur l'exploitation de la variation soma-clonale induite par les métaux. La variation soma-clonale, induite par une culture plus ou moins longue des cellules en conditions artificielles, est bien connue chez les plantes. Une partie de cette variation est due à des mutations de gènes, qui sont transmises par voie sexuée. Ces mutations ne diffèrent pas essentiellement de celles qui apparaissent spontanément ou sont induites par des traitements mutagènes. Pour autant que la régénération des plantes à partir des cultures soit efficace, la variation soma-clonale est une source de diversité complémentaire, parfois utilisable en sélection, en raison du grand nombre de cellules susceptibles d'être atteintes.

.....

Son utilisation se justifie surtout lorsque le caractère recherché peut être sélectionné par des pressions appliquées aux cultures cellulaires elles-mêmes [489].

Selon DRUART et al. [490], grâce à la variation somaclonale associée à la présence du cadmium, comme agent de pression de sélection, il est possible d'améliorer la tolérance aux métaux et leur translocation vers la tige afin de rendre plus efficace la phytoextraction de polluants métalliques. L'amélioration *in vitro* des propriétés d'extraction et d'accumulation des métaux lourds a déjà été effectuée chez le tabac ; *Nicotiana tabacum* pour le Cd [491], chez la moutarde indienne ; *Brassica juncea* pour le Pb et le Cd [492], et chez le colza *Brassic anapus* L. pour le Zn [493].

La sélection *in vitro* pour l'obtention de plantes résistantes au stress des métaux lourds comprend les trois étapes successives suivantes: (i) l'initiation de cellules callogènes, dont certaines sont des variants somaclonaux avec de nouveaux caractères, (ii) l'exposition des cals aux métaux lourds en tant qu'agents sélectifs au cours de la prolifération pour la sélection de variants somaclonaux avec une résistance accrue aux métaux lourds, et (iii) la sélection des variants résistants espérés après la régénération de la plante en présence des métaux lourds [494].

L'induction de la callogenèse a été expérimentée sur des milieux contenant 1/10^e de la concentration usuelle de macroéléments, et seuls les macroéléments de Gamborg dilués au 1/10^e ont produit un effet callogène très net. Le contrôle de la callogenèse semble être possible par le choix des macroéléments utilisés au cours du développement de la plantule [495]. La morphogénèse et la callogénèse chez *A. halimus* ne nécessitent pas obligatoirement un supplément d'hormones, cependant le 2-4D_Kinétine améliore le rendement en cals (100%). L'embryogénèse somatique apparaît comme une alternative intéressante pour la propagation de cette espèce. Une large diversité génétique a été obtenue sur le même milieu de culture. Le clonage *in vitro* est une technique particulièrement adaptée à la sauvegarde de la diversité génétique [496]. Le clonage des individus, présentant des réponses différentes (vitesse d'apparition et importance du cal) à un même milieu de culture, permettra d'envisager une étude génétique du phénomène [495].

Ainsi, il est possible, après optimisation des conditions de culture d'utiliser des concentrations croissantes des métaux cadmium, zinc et plomb comme agents de pression de sélection pour l'amélioration des taux d'accumulation et de translocation de ces métaux.

Il est possible également de créer un matériel à performances améliorées en phytoremédiation, et ce en suivant les techniques d'ALDAHAK et al. [101] optimisées en vue de sélectionner *in vitro* des plants d'*A. halimus* tolérants à la salinité. L'approche consiste à initier des micro-boutures enracinées qui, après acclimatation, vont être cultivées sur des milieux enrichies par des concentrations allant de 25 à 1000 mM de Na Cl. Le peu de plants ayant survécu sur 600 mM de sel, ont été propagés sous les mêmes conditions de stress. Selon ces chercheurs, cette méthode produit potentiellement des masses de plantules en peu de temps et leur culture peut être étendue dans les zones arides affectées par la salinité. L'essentiel des techniques de micro propagation testées par ces chercheurs est mentionné dans le chapitre I. 1. (Page 35).

Une autre alternative émergente de l'amélioration *in vitro* des potentialités phytoremédiantes des plantes est la technique dite par CCM : Couche Cellulaire Mince (ou TCLs : Plant thin cell layers). Les couches cellulaires minces sont des explants petits et polyvalents pour la culture *in vitro* des plantes. À première vue, leur productivité morphogénétique peut sembler être inférieur à celle des explants conventionnels, mais une fois que le facteur de correction de la croissance des plantes et le facteur géométrique sont appliqués, la productivité réelle (potentielle) dépasse celle d'un explant conventionnel. C'est pour cette raison que depuis près de 45 ans, les CCM ont été appliqués à la culture *in vitro* de près de 90 espèces ou hybrides [497].

Par exemple, BEN GHAYYA et al. [493], ont sélectionné *in vitro* des plantes de colza (*Brassica napus* L.) par la technique des couches cellulaires minces transversales (CCMts) couplée avec un crible de sélection. L'idée était que la pression de sélection exercée par un polluant métallique durant la phase de néoformation *in vitro* devait permettre de sélectionner des plantes tolérantes, et éventuellement hyperaccumulatrices. Selon ces auteurs, à partir de 500 μ M de ZnSO₄, le pourcentage de mortalité des CCMts atteint 96%, mais la pression de sélection est élevée pour les plantes restées vivantes, lesquelles ont pu être néoformées, acclimatées en serre et étudiées. Les caractères morphologiques et physiologiques des plantes acclimatées et cultivées en serre dépendent fortement de la concentration en zinc appliquée au cours de la phase de néoformation *in vitro*.

.....

SEYEDARDALAN ET LEUNG [494], détaillent, en se basant sur une bibliographie abondante, les principes et techniques de la multiplication *in vitro* de plants résistants aux métaux lourds. La figure ci-dessous schématise le principe de ces techniques.

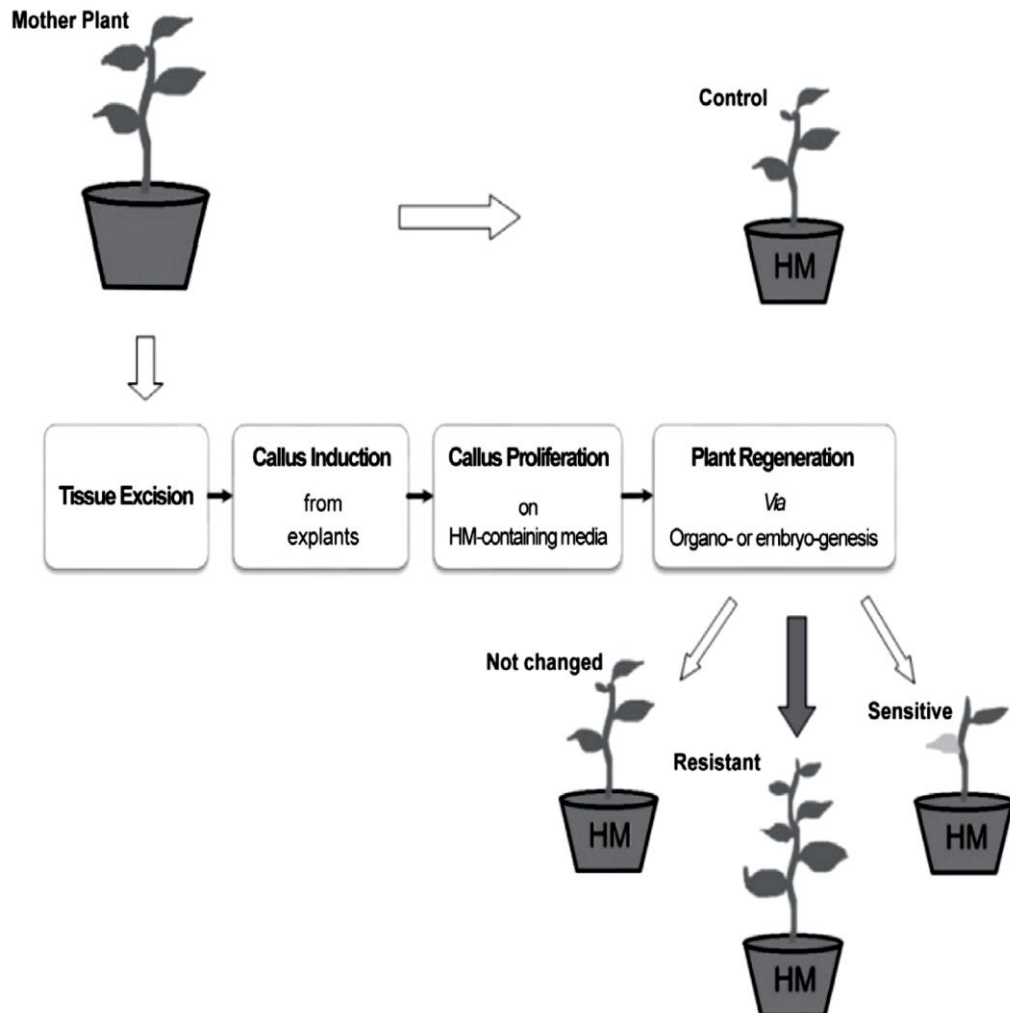


Figure II.2. Schéma des procédures de développement *in vitro* de plantes résistantes aux ETM (SEYEDARDALAN ET LEUNG, 2015) [512].

La morphologie de la progéniture peut représenter le niveau de résistance en la comparant aux plantes témoins dérivées directement des plantes mères.

L'ensemble des techniques précitées peut être testé pour en choisir la méthode la plus adaptée aux objectifs d'obtention *in vitro* d'un matériel végétal à performances améliorées en phytoremédiation. La rentabilité des techniques portera sur la masse végétale, les niveaux de tolérance et d'accumulation, et éventuellement sur l'étendue du spectre d'accumulation e vue de réhabilitation des sols multi-pollués par les métaux. Ceci demeure une perspective primordiale à ce travail de thèse.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a été entrepris pour répondre à une part des besoins de la phytoremédiation tant que biotechnologie de dépollution des sites affectés par les métaux, et un axe de recherche multidisciplinaire ; le premier but est à atteindre à travers la sélection (*in vivo* et *in vitro*) d'un matériel à fortes potentialités phytoremediantes exhibées par des niveaux élevés de tolérance et d'accumulation. Le second objectif est vérifié par l'étude de l'impact des métaux sur la plante au cours de la germination et la croissance, ainsi que la détermination des traits morphologiques, physiologiques et biochimiques caractérisant la réponse des plants aux différents métaux.

Cette recherche s'est articulée autour de quatre questions majeures :

1. Comment agissent les métaux sur les graines d'*A. halimus* en germination ?
2. Est-ce que les réductions des taux de germination sous stress métalliques, peuvent être imputées à la restriction de la croissance des axes embryonnaires après franchissement de la barrière tégumentaire ?
3. Peut *A. halimus* être utilisé en phytoremédiation des métaux cadmium, zinc et plomb ? et par quelles stratégies ?
4. Quelles sont les stratégies de tolérance et d'accumulation des trois métaux en conditions de culture en pots par apport de concentrations modérées de métaux ?

Concernant la germination, les résultats montrent des comportements divergents des graines des deux écotypes MOS (Mostaganem) et REL (Relizane) ; l'imbibition est meilleure chez les graines MOS, cependant, les taux de germination et la croissance des racines sont significativement plus élevées chez REL. L'étude de la cinétique d'imbibition montre que même à fortes concentrations (jusqu'à 10 000 ppm de métaux), les taux d'imbibition demeurent importants, avec une augmentation significative par le Zn et le Pb évaluée à 17 % et 8 % respectivement, le Cd réduit les taux d'imbibition de 4 % par rapport aux témoins. La croissance racinaire est plus sensible aux métaux que la germination, l'effet inhibiteur du Cd sur la croissance est plus précoce comparé à ceux du

.....

Zn et du Pb. L'utilisation d'un chélateur (EDTA) rend l'impact du plomb plus visible sur la germination, ce qui aide à mieux caractériser la tolérance des graines à ce métal.

La mesure des longueurs radiculaires au cours de la germination, et celles des cellules parenchymateuses des axes radiculaires, montre que les concentrations de métaux dépassant les seuils de tolérance inhibent la germination par inhibition de la croissance des axes radiculaires embryonnaires, et ce en partie, par restriction de l'auxèse (Pb) ou de la mérése (Cd et Zn).

L'analyse de la distribution des métaux au cours de l'imbibition des graines serait d'un intérêt certain pour expliquer la forte tolérance aux métaux de cette espèce au cours de sa germination. La germination dans des milieux enrichis par de fortes concentrations de métaux (jusqu'à 20000 ppm), montre les potentialités germinatives intéressantes de cette halophyte, ce qui pourrait la caractériser comme plante modèle permettant l'exploration des stratégies impliquées dans le phénomène de la tolérance aux métaux au cours de la germination.

Les résultats émanant de la culture hydroponique montrent que les fortes concentrations (5000 et 10000 ppm) induisent une réduction générale de la croissance sans compromettre la vitalité des plants. L'ordre d'accumulation des métaux dans les pousses est comme suit : 11194,82 mg. Kg⁻¹ (Pb-C : plomb avec chélateur), 3984,29 mg. Kg⁻¹ (Zn), 3300,99 mg. Kg⁻¹ (Cd), 313,39 mg. Kg⁻¹ (Pb). Les taux moyens de translocation sont : 81,49% (Pb-C), 51,51% (Zn), 49,42% (Cd), 2,51% (Pb). Les paramètres : Hauteur des tiges, Poids frais aérien, Néof ormation des nœuds sont significativement corrélées aux taux d'accumulation des trois métaux dans les compartiments aériens et souterrains. *A. halimus* est un hyper accumulateur de cadmium et de plomb après chélation.

La culture en pots et l'irrigation par des concentrations moins importantes (500, 1000 et 1500 ppm de métaux) montre que de telles concentrations réduisent les teneurs relatives en eau des plants, cependant, les plants restent viables, à ports dressés et sans perte de pigments chlorophylliens. Comme stratégie de tolérance, les plantes agissent par réduction de la conductance stomatique et du potentiel osmotique. L'osmorégulation par accumulation de la proline est commune chez l'ensemble des traitements métalliques, en revanche, l'accumulation d'osmolytes minéraux diffère selon le métal en question. Ainsi, le plomb induit une accumulation du calcium et du potassium, le zinc favorise l'adsorption

du Ca^{2+} au niveau racinaire, et le cadmium génère une osmorégulation par accumulation du calcium au niveau des feuilles tout en altérant la nutrition en potassium.

Comme perspectives à ce travail, nous proposons la confirmation de l'efficacité des marqueurs morphologiques dégagés, en les testant sur d'autres écotypes, d'autres espèces et d'autres traitements métalliques.

L'étude des changements anatomiques des tiges et des racines, induits par l'accumulation des différents métaux ;

L'étude de la compartimentation des métaux accumulés dans les différents organes de la plante, notamment sur les surfaces foliaires, par microscopie électronique à balayage (MEB).

La création de souches à capacités d'accumulation améliorées, par pression de sélection, imposée par des concentrations extrêmement élevées de métaux.



**Références
bibliographiques**

REFERENCES

1. Sharma P, Pandey S. 2014. Status of phytoremediation in world scenario. Int.J. Environ. Biorem. Biodegrad 2: 178-191.
2. Rascio N and Navari Izzo F. 2010 Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? Plant Science 180: 169-181.
3. Bernardini A, Salvatori E, Guerrini V, Fusaro L, Canepari S and Manes F. 2016. Effects of high Zn and Pb concentrations on *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex. Steudel: Photosynthetic performance and metal accumulation capacity under controlled conditions. Int J Phytoremediation 18 (1):16-24.
4. Tauqeer H M, Ali S, Rizwan M, Ali Q, Saeed R, Iftikhar U, Ahmad R, Farid M, Abbasi G H . 2016. Phytoremediation of heavy metals by *Alternanthera bettzickiana*: Growth and physiological response. Ecotoxicology and Environmental Safety 126: 138-146.
5. Ay Ç, Özcan AS, Erdoğan Y, Özcan A. 2017. Characterization and lead (II) Ions Removal of Modified *Punica granatum* L. Peels. International Journal of Phytoremediation 19(4): 1549-7879.
6. Kabata-Pendias A, Pendias H. 1992. Trace Elements in Soils and Plants, 2nd Edition, CRC Press, London, 365p.
7. Asopa PP, Bhatt R, Sihag S, Kothari SL, Kachhwaha S. 2017. Effect of cadmium on physiological parameters of cereal and millet plants-A comparative study. Int J Phytoremediation 19 (3): 225-230.
8. Lane TW, Saito MA, George GN, Pickering IJ, Prince RC, Morel FM 2005. Biochemistry: a cadmium enzyme from a marine diatom. *Nature* 435 (7038): 42.
9. Park H, Song B, Morel FM 2007. Diversity of the cadmium-containing carbonic anhydrase in marine diatoms and natural waters. *Environ Microbiol* 9(2): 403-13.
10. Adrees M, Ali S, Rizwan M, Ibrahim M, Abbas F, Farid M, Rehman MZ, Irshad MK, Bharwana SA, 2015. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: areview. Environ. Sci. Pollut. Res. 22: 8148-8162.
11. Ali S, Chaudhary A, Rizwan M, Anwar HT, Adrees M, Farid M, Irshad MK, Hayat T, Anjum SA, 2015. Alleviation of chromium toxicity by glycinebetaine is related to elevated antioxidant enzymes and suppressed chromium uptake and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). Environ.Sci.Pollut.Res. 22: 10669-10678.
12. Keller C, Rizwan M, Davidian JC, Pokrovsky OS, Bovet N, Chaurand P, Meunier JD. 2015. Effect of Silicon on wheat seedlings (*Triticum turgidum* L.) grown in hydroponics under Cu stress. *Planta* 241: 847-860.
13. Mahar A, Wang P, Ali A, Awasthi MK, Lahori AH, Li QWR, Zhang Z. 2016. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: Areview. Ecotoxicology and Environmental Safety 126: 111-121.

14. Nadeem M, Mahmood A, Shahid SA, Shah SS, Khalid A M, McKay G. 2006. Sorption of lead from aqueous solution by chemically modified carbon adsorbents. *J Hazard Mater* 138: 604 - 613.
15. Kuo CY. 2009. Water purification of removal aqueous copper (II) by As-grown and modified multi-walled carbon nanotubes. *Desalination* 249: 781-785.
16. Wang L, Zhang J, Zhao R, Li Y, Li C, Zhang C. 2010. Adsorption of Pb (II) on activated carbon prepared from *Polygonum orientale* Linn: kinetic, isotherm, pH, and ionic strength studies. *Bioresource Technol.* 101: 5808-5814.
17. Choppala G, Saifullah BN, Bibi S, Iqbal M, Rengel Z, Ok YS. 2014. Cellular mechanisms in higher plants governing tolerance to cadmium toxicity. *Crit. Rev. Plant Sci.* 33(5): 374-391.
18. Martin S, Griswold W. 2009. Human Health Effects of Heavy Metals. *Environmental Science and Technology Briefs for Citizens* 15: 1-5.
19. Bert V, Deram A. 1999. Guide des phytotechnologies : utilisation des plantes dans la dépollution et la réhabilitation des sites contaminés par les métaux lourds, France, Environnement et Développement alternatif.
20. Liu W, Yang YS, Francis D, Rogers HJ, Li P, Zhang Q. 2008. Cadmium stress alters gene expression of DNA mismatch repair related genes in *Arabidopsis* seedlings. *Chemosphere* 73: 1138 - 1144.
21. Hafeez B, Khanif YM, Saleem M. 2013. Role of zinc in plant nutrition-a review. *Am J Exp Agric.* 3:374.
22. Cakmak I. 2000. Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. *New Phytol* 146:185-205.
23. Punz WF, Sieghardt H. 1993. The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany* 33: 85-98.
24. Wang S, Li R, Zhang Z, Feng J, Shen F. 2014. Assessment of the heavy metal pollution and potential ecological hazardous in agricultural soils and crops of Tongguan, Shaanxi Province. *J. Environ.Sci.China* 34 : 2313-2320.
25. Meziane A, 2013. "Au port d'Alger, la pollution atteint des cimes". *Ecologie, environnement, nature, économie verte et développement durable en Algérie. NOUARA ALGÉRIE.COM.* <http://www.nouara-algerie.com/article-au-port-d-alger-la-pollution-atteint-des-cimes-par-algerie-confluences-118613538.html>.
26. Chiudioni F, Trabace T, Di Gennaro S, Palma A, Manes F, Mancini L. 2017. Phytoremediation applications in natural condition and in mesocosm: the uptake of Cadmium by *Lemna minuta* Kunth, a non native species in Italian watercourses. *Int. J. Phytoremediation.* 19 (4): 371-376.
27. Wuana RA, Okieimen FE. 2011. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecol.* 1-20.

28. Barcelo J, Poschenrieder C. 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contrib. Sci.* 2: 333-344.
29. Sheoran V, Sheoran A, Poonia P. 2011. Role of hyperaccumulators in phytoextraction of metals from contaminated miningsites: areview. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 41: 168-214.
30. Lutts S, Lefèvre I. 2015. How can we take advantage of halophyte properties to cope with heavy metal toxicity in salt-affected areas? *Ann. Bot.* 115: 509–528.
31. Bang J, Kamala-Kannan S, Lee KJ, Cho M, Kim CH, Kim,YJ, Bae JH, Kim KH, Myung H, OH BT.2015. Phytoremediation of heavy metals in contaminated water and soil using *Miscanthus* sp. *Goedae-Uksae1.Int.J.Phytorem.*17: 515-520.
32. Ehsan S, Ali S, Noureen S, Mahmood K, Farid M, Ishaque W, Shakoor MB, Rizwan, M. 2014. Citric acid assisted phytoremediation of cadmium by *Brassica napus* L. *Ecotoxicol. Environ.Saf.*106: 164-172.
33. Amna AN, Masood S, Mukhtar T, Kamran MA, Rafique M, Munis MFH, Chaudhary HJ. 2015.Differential effects of cadmium and chromium on growth, photosynthetic activity, and metal uptake of *Linum usitatissimum* in association with *Glomus intraradices*. *Environ. Monit. Assess.* 187:1-11.
34. Lutts, S., Lefèvre, I., Delpérée, S., Kivits, S., Dechamps, C., Robledo, A., Correal, E., 2004. Heavy metal accumulation by the halophyte species Mediterranean saltbush. *J. Environ. Qual.* 33: 1271-1279.
35. Manousaki E, Kalogerakis N. 2009. Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): metal uptake in relation to salinity. *Environmental Science and Pollution Research* 16: 844-854.
36. Ortiz-Dorda J, Martinez-Mora C, Correal E, Simón B, Cenis JL. 2005. Genetic structure of *Atriplex halimus* populations in the Mediterranean basin. *Ann. Bot.* 95: 827-834.
37. Kabata-Pendias A Pendias H. 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, FL (3rd edition): pp. 413.
38. Lefèvre I, Marchal G, Meerts P, Correal E, Lutts S. 2009. Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. *Environ. Exp. Bot.* 65: 142-152.
39. Nedjimi B, Daoud Y, 2009. Effects of calcium chloride on growth, membrane permeability and root hydraulic conductivity in two *Atriplex* species grown at high (sodium chloride) salinity. *J. Plant Nutr.* 32: 1818-1830.
40. Mesnoua M, Mateos-Naranjo E, Barcia-Piedras JM, Perez-Romero JA, Lotmani B, Redondo-Gomez S. 2016. Physiological and biochemical mechanisms preventing Cd-toxicity in the hyperaccumulator *Atriplex halimus* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 106: 30-38.
41. 42. Tapia Y, Diaz O, Pizarro C, Segura R, Vines M, Zuniga G, Moreno-Jiménez E. 2013. *Atriplex atacamensis* and *Atriplex halimus* resist as contamination in Pre-Andean soils (northern Chile). *Sci. Total Environ.* 450/451: 188-196.

42. 43. Lotmani B, Fatarna L, Berkani A, Rabier J, Prudent P, Laffont-Schwob I. 2011. Algerian populations of the Mediterranean saltbush, *Atriplex halimus*, tolerant to high concentrations of lead, zinc, and copper for phytostabilization of heavy metal-contaminated soils. *Eur. J. Plant Sci. Biotechnol.* 5 : 20-26.
43. Brunet J. 2008. Adaptation aux métaux lourds d'une Fabacée (légumineuse) : Réponses phénologique et moléculaire au plomb du *Lathyrus sativus* L. Thèse. Université Paris Est. 230P.
44. Bourrelier, P.H. and Berthelin, J. (1998). Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. *CR. Acc Sci*, 42. Ed. Lavoisier, Paris.
45. Huynh TMD 2009. Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante / ver de terre / microflore tellurique. Thèse. Ecologie Microbienne Université Paris Est. 152 P.
46. Mulla PJ, Page AI, Ganje TJ. 1980. Cadmium accumulation and bioavailability in soils from long-term phosphorus fertilization. *J. Environ. Qual.* 10: 193-197.
47. Petruzelli G, Ottaviani M, Lubrano L, Veschetti E. 1994. Characterization of heavy metal mobile species in sewage sludge for agricultural utilization. *Agrochem* 38(4): 277-284.
48. Zorrig W. 2011. Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue "*Lactuca sativa*". Thèse de doctorat. Biologie Intégrative des Plantes. Université Tunis El Manar. 262p.
49. Baize D. 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions. Paris. 408 p.
50. Ramade F. 1982. Elements d'écologie. Ecologie appliquée. Ed. *Mc Grow-Will*. Paris. 452p.
51. Kamnev AA, Van der Lelie D. 2000. Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Bioscience Reports.* 20 (04): 239-258.
52. Hadjiliadis ND. 1997. Cytotoxicity, mutagenicity and carcinogenic potential of heavy metals related to human environment. Ed. *NATO-ASI ser.2. Environment*. Vol 26. Dordrecht.
53. Saa I, Smedob M, Cunha ME. 2016. Kidney cancer. Heavy metals as a risk factor, *Porto Biomed. J.* 1(1): 25-28.
54. Rengel Z. 1999. Heavy Metals as Essential Nutrients. In: Prasad, MNV & Hagemayer J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, 231-251.
55. Chaignon V. 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse école doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille.
56. Sekhar KC, Kamala CT, Chary NS, Balarm V, Garcia G. 2004. Potential of *Hemidesmus indicus* for phytoextraction of lead from industrially contaminated soils. *Chemosphere* 58 (4): 507-514.

57. Mellanby K. 1976. Biologie de la pollution. Ed. Librairie Vuibert. Paris. 71p.
58. Barnea M, Ursu P. 1974. Pollution et protection de l'atmosphère. Ed. Eyrolles. Paris. 307p.
59. Defrancexhi M. 1996. L'eau dans tous ces états. Ed. Ellipses. Paris. 127p.
60. Wu F, Dong J, Jia G, Zheng S, Zhang G. 2006. Genotypic difference in the responses of seedling growth and Cd toxicity in rice (*Oryza sativa* L.). Agric.Sci.China 5: 68-76.
61. Lima AIG, Pereira SIA, Figueira EMP, Caldeira GCN, Caldeira HDQ. 2006. Cadmium detoxification in roots of *Pisum sativum* seedlings: relationship between toxicity levels, thiol pool alterations and growth. Environ. Exp. Bot. 55: 149-162.
62. Mishra S, Srivastava S, Tripathia RD, Govindarajan R, Kuriakose SV, Prasad MNV. 2006. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. Plant Physiol. Biochem. 44: 25-37.
63. Clemens S, Palmgren MG, Kraemer U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. Trends Plant Sci. 7: 309-315.
64. Sridhar BM, Diehl SV, Han FX, Monts DL, Su Y. 2005. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). Environ. Exp. Bot. 54: 131-141.
65. Le Houérou HN. 1992. The role of saltbushes (*Atriplex* spp) in arid lands rehabilitation in the Mediterranean basin. A review. *Agroforestry systems*. 18: 107-148.
66. Abbad A, Benchaabane A. 2004. The phonological study of *Atriplex halimus* L. *Afric. Journal of ecology*. 42: 69-73.
67. Najar T, Héli S, Nasr H. 2011. Valorisation des plantes tolérantes à la salinité par les petits ruminants. *Options Médit*. 97: 73-77.
68. Nedjimi B. 2012. Seasonal variation in productivity, water relations and ion contents of *Atriplex halimus* spp. *Schweinfurthii* grown in Chott Zehrez wetland. Algeria. J. Saudi Soc. Agric. Sci. 11: 43-49.
69. Nefzaoui A, Chermiti A. 1991. Place et rôles des arbustes fourragers dans les parcours des zones arides et semi arides de la Tunisie. *Options Médit*. 16: 119-125.
70. Nedjimi B, Guit B, Toumi M, Beladel B, Akam A, Daoud Y. 2013. *Atriplex halimus* subsp. *Schweinfurthii* (*Chenopodiaceae*): Description, écologie et utilisations pastorales et thérapeutiques. *Fourrages* 216: 333-338.
71. Aharonson Z, Shani J, Sulman FG. 1969. Hypoglycaemic effect of the salt bush (*Atriplex halimus*) - A feeding source of the sand rat (*Psammomys obesus*). *Diabetologia* 5: 379-383.
72. Belouad A. 2001. *Plantes médicinales d'Algérie*, éd. office des Publications Universitaires, Alger, 284 p.

73. Emam SS. 2011. Bioactive constituents of *Atriplex halimus* plant. J. Nat. Prod. 4: 25-41.
74. Walker DJ, Lutts S, Sánchez-García M, Correal E. 2014. *Atriplex halimus* L.: Its biology and uses. Journal of Arid Environments 100-101: 111-121.
75. Al-Turki TA, Omer S, Ghafoor, A. 2000. A synopsis of the genus *Atriplex* L. (Chenopodiaceae) in Saudi Arabia. Feddes Repert. 111: 261-293.
76. Talamali A, Bajji M, Le Thomas A, Kinet JM, Dutuit P. 2003. Flower architecture and sex determination: how does *Atriplex halimus* play with floral morphogenesis and sex genes? New Phytol. 157, 105-113.
77. Quezel P, Sanata S. 1962. Nouvelle flore des régions désertiques méditerranéennes 1. CNRS. Paris. 303p.
78. Francllet A, Le Houérou HN. 1971. Les *Atriplex* en Tunisie et en Afrique du Nord. Food and Agriculture Organization, Rome.
79. Mâalem S, Khoufi S, Rahmoune C, Bennacer M. 2011. Analyse moléculaire de la diversité génétique de plantes Xéro/Halophytes du genre *Atriplex* moyennant RAPD-PCR. *Algerian journal of arid environment* 1 (1) : 50-59.
80. Ben Ahmed H, Zid E, El Gazzah M, Grignon C, 1996. Croissance et accumulation ionique chez *Atriplex halimus* L. Cah. Agric. 5: 367-372.
81. Zervoudakis G, Angelopoulos K, Salahas G, Georgiou CD. 1998. Differences in cold inactivation of phosphoenolpyruvate carboxylase among C4 species: the effect of pH and of enzyme concentration. *Photosynthetica* 35: 169-175.
82. Shomer-Ilan A, Nissenbaum A, Waisel Y. 1981. Photosynthetic pathways and the ecological distribution of the Chenopodiaceae in Israel. *ecologia* 48: 244-248.
83. Mozafar A, Goodin JR. 1970. Vesiculated hairs: a mechanism for salt tolerance in *Atriplex halimus* L. *Plant Physiol.* 45: 62-65.
84. Smaoui A, Barhoumi Z, Rabhi M, Abdelly C. 2011. Localization of potential ion transport pathways in vesicular trichome cells of *Atriplex halimus* L. *Protoplasma* 248: 363-372.
85. Streb P, Tel-Or E, Feierabend J. 1997. Light stress effects and antioxidative protection in two desert plants. *Funct. Ecol.* 11: 416-424.
86. Ben Hassine H, Lutts S. 2010. Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene. *J. Plant Physiol.* 167: 1448-1456.
87. Nemat Alla, MM, Khedr AHA, Serag MM, Abu-Alnaga AZ, Nada RM. 2012. Regulation of metabolomics in *Atriplex halimus* growth under salt and drought stress. *Plant Growth Regul.* 67: 281-304.
88. Márquez-García B, Márquez C, Sanjosé I, Nieva FJJ, Rodríguez-Rubio P, Muñoz-Rodríguez AF. 2013. The effects of heavy metals on germination and seedling

- characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Mar. Pollut. Bull.* 70: 119-124.
89. Walker DJ, Lutts S. 2014. The tolerance of *Atriplex halimus* L. to environmental stresses. *Emir. J. Food Agric.* 26 (12): 1081-1090.
 90. Talamali A, Dutuit P, Le Thomas A, Gorenflot R. 2001. Polygamie chez *Atriplex halimus* L. (Chenopodiaceae). *Comptes Rendus de L'Académie des Sciences de la vie* 324 : 107-113.
 91. Talamali A., Gorenflot R., Dutuit P. (2007) Hétérostylie intra-individuelle chez *Atriplex halimus* L. (Amaranthaceae). *Biologie et pathologie végétales. C. R. Biologies* 330, 871-879.
 92. Talamali A, Gorenflot R, Haïcour R, Henry Y, Dutuit P. 2007. Embryogenesis of *Atriplex halimus* L. (Amaranthaceae). *Acta Botanica Gallica* 154 (4) : 651-659.
 93. Vilax EJ. 1963. Les cahiers de la recherche agronomique N°17. *Ed: INRAT- Rabat.* 641p.
 94. Froment D. 1972. Etablissement des cultures d'*Atriplex* en Tunisie centrale. In : Séminaire d'étude des problèmes méditerranéens, du 13 au 17 Septembre 1971.
 95. Souayah N, Khouja ML, Rejeb MN, Bouzid S. Micropropagation d'un arbuste sylvo-pastoral, *Atriplex halimus* L. (Chénopodiacées). In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). *Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens.* Zaragoza: CIHEAM, 2004. p. 131 -135 (Cahiers Options Méditerranéennes; n ° 62)
 96. Ellern SJ. 1970. Rooting cuttings of saltbush (*Atriplex halimus* L.). *Technical notes.* 1828: 154-155.
 97. Francllet A, Le Houérou, H.N. 1971. Les *Atriplex* en Tunisie et en Afrique du Nord. *Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO).* Rome. 271p.
 98. Souayah, N. 2000. Nouvelles possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones d'*Atriplex halimus* L. par micropropagation *in vitro* à partir d'organes végétatifs et reproducteurs. Approches morphogénétique et physiologique. *Thèse de doctorat en biologie. Fac. Sci. Tunis.* Tunisie. 172p.
 99. Wochoc ZS, Sluis CJ. 1980. Gibberellic acid promotes *Atriplex* shoot multiplication and elongation. *Plant Science letters*, 17: 363-369.
 100. Ferchichi OH. 2005. Effect of mineral concentration of culture media without growth substances on the callogenesis of *Atriplex halimus* L. *African journal of biotechnology.* 4 (9): 960-962.
 101. Aldahhak O, Zaidi S, Teixeira da Silva JA, Abdul-Kader AM. 2010. *In vitro* approach to the multiplication of a halophyte species forage shrub *atriplex halimus* l. and *in vitro* selection for salt tolerance. *International journal of plant developmental biology* 4 (1): 8-14.
 102. Dutuit P. 1999. Etude de la diversité biologique de *Atriplex halimus* par le repérage *in vitro* et *in vivo* d'individus résistants à des conditions extrêmes du milieu et
-

- constitution de clones. *Université de Paris-Sud. CTA. Contrat TS3. CT94*. 264: 138-141.
103. Ozenda P. 1983. Flore du Sahara, CNRS, Paris. 617 p.
 104. Nègre R. 1961. Petite Flore des régions arides du Maroc occidental I, CNRS, Paris, 415 p.
 105. Gadd JM. 2000. Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. Raskin I, Ensley BD. John Wiley & Sons, Inc, New York, 304.
 106. Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiol*. 109: 1427-1433.
 107. Shelton DR, Karns JS, Hapeman-Somich CJ. 1992. Pesticide waste management. Technology and Regulation. Biological methods for the disposal of coumaphos waste. Ed. Bourke JB, Felsot AS, Gilding TJ, Jensen JK, Seiber JN. ACS Symp. 510: 216-223.
 108. Felsot AS. 1996. Potential of biostimulation to enhance dissipation of herbicide residues in landfarmed waste. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 212: 96-AGRO.
 109. Kruger EL, Anhalt JC, Sorenson D, Nelson B, Chouhy AL, Anderson TA, Coats JR. 1997. Atrazine degradation in pesticide-contaminate soils: Phytoremediation potential 54-64.
 110. Pignol D, Coves J. 2003. Des bactéries toxico- résistantes décontaminantes. *Clefs CEA*. 48: 87-88.
 111. Brooks RR, Morrison RS, Reeves RD, Dudley TR, Akman Y. 1998. Hyperaccumulation of nickel by *alyssum linnaeus* (Cruciferae) *proc R.Soc London, Ser B*. 203: 387- 403.
 112. Remon E. 2006. Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques: Vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Thèse de doctorat en Biologie Végétale. Université Jean Monnet, Saint Etienne. 157P.
 113. Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 643–668.
 114. Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annu.Rev.PlantBiol.*56:15-39.
 115. Baumann A. 1885. Das verhalten von zinksätzen gegen pflanzen und imboden. *Landwirtsch.Verss.* 3: 1-53
 116. Ghosh M, Singh SP. 2005. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. *Appl. Ecol. Environ. Res.*3:1-18.
 117. Henry JR 2000. An overview of the phytoremediation of lead and mercury. National network of environmental management studies (NNEMS) fellow. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office, Washington.
-

118. Kumar P, Dushenkob V, Motto H, Raskin I. 1995. Phytoextraction: The use of plant to remove heavy metals from soils. *Environmental Science and Technology* 29: 1232-1238.
119. Tissut M, Raveton M, Ravanel P. 2006. Ecoremediation. Cooperation between plants and soil microorganisms, molecular aspects and limits, pp. 489-504. In: Twardowska I, Allen HE, Haggblom MM, Stefaniak S. [eds.]. *Viable Methods of Soil and Water Pollution Monitoring. Protection and Remediation*.
120. San Miguel A. 2011. *Phytoremédiation des organochlorés. Etude mécanistique et fonctionnelle des capacités épuratrices du système plante-rhizosphère*. Thèse. Santé et environnement. L'université de Grenoble (MBS). 312P.
121. Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *In Biorecovery*, Vol 1. AB Academic Publishers 81-126.
122. Kirpichtchikova T. 2009. *Phytoremédiation par Jardins Filtrants d'un sol pollué par des métaux lourds. Approche de la phytoremédiation dans des casiers végétalisés par des plantes de milieux humides et étude des mécanismes de remobilisation / immobilisation du zinc et du cuivre*. Thèse. Sciences de la Terre, de l'Univers et de l'Environnement. Université Joseph Fourier - Grenoble I.
123. Clemens S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707-1719.
124. Yang X, Feng Y, He Z, Stoffella PJ. 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18: 339-353
125. Lorec A, Mathé F, Bourguignon J, Vavasseur A. 2016. *La phytoremédiation. Les défis du CEA, n°208*
126. Puschenreiter M, Wenzel WW. 2005. Rhizosphere processes involved in phytoremediation of contaminated soils. In: Galazka HK, editor. *Current developments in remediation of contaminated lands*, Pulawy, Poland.
127. Blaylock MJ, Huang JW. 2000. Phytoextraction of metals. In: I Raskin, BD Ensley, eds, *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley and Sons, New York, p 53-70.
128. McGrath SP. 1998. Phytoextraction for soil remediation. In: R.R. Brooks (ed.) *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CAB Int., Wallingford, UK, 261-287.
129. Raskin I, Smith RD, Salt DE. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8(2): 221-226.
130. Bridgwater AV, Meier D, Radlein D. 1999. An overview of fast pyrolysis of biomass. *Organic Chemistry* 30: 1479-1493.
131. Cooper EM, Sims JT, Cunningham SD, Huang JW, Berti WR. 1999. Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 28: 1709 -1719.

132. Prasad MNV, Freitas HMO. 2003. Metal hyperaccumulation in plants biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron.J.Bio-technol.* 6(3): 285-321.
133. Peng HY, Yang XE, Jiang LY, He ZL. 2005. Copper phytoavailability and uptake by *Elsholtziasplendens* from contaminated soil as affected by soil amendments. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 40: 839-856.
134. Cunningham SD, Berti WR, Huang JW. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends Biotechnol.* 13: 393-397.
135. Dec J, Bollag JM. 1994. Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotechnol. Bioeng* 44: 1132-1139.
136. Curl EA, Truelove B. 1986. *The Rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin.
137. Zayed AM, Terry N. 1994. Selenium volatilization in roots and shoots -effects of shoot removal and sulfate level. *Journal of Plant Physiology* 143: 8-14.
138. Chaney RL, M Malik, YM Li, SL Brown, EP Brewer, JS Angle, Baker AJM. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Environmental Biotechnology* 8: 279-284.
139. Wong MH. 2003. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metalcontaminated soils. *Chemosphere* 50: 775-780.
140. Chaudhry TM, Hayes WJ, Khan AG, Khoo CS. 1998. Phytoremediation - focusing on accumulator plants that remediate metalcontaminated soils. *Austraasian Journal of Ecotoxicology* 4: 37-51.
141. Raskin I, Ensley BD. 2000. *Phytoremediation of toxic metals; using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons, New York.
142. Keller C, Hammer D, Kayser A, Richner W, Brodbeck M, Sennhauser M. 2003. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant and Soil* 249: 67-81.
143. Boon GT, Bouwman LA, Bloem J, Römkens P. 1998. Effects of a copper-tolerant grass *Agrostis capillaries* on the ecosystem of a copper- contaminated arable soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 1964-1971.
144. Priha O, Grauston SJ, Pennanen T, Smolander A. 1999. Microbial activities related to C and N cycling and microbial community structure in the rhizosphere of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings in an organic and mineral soil. *FEMS. Ecol.* 30: 187-199.
145. Del Rio M, Font R, Almela C, Velez D, Montoro R, Bailon AD. 2002. Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcollar mine. *Journal of Biotechnology* 98: 125-137.
146. Aronson P, Perttu K. 1994. *Willow vegetation filters for municipal wastewaters and sludge. A biological purification system*. Uppsala: Swedish university of agricultural sciences. 230p.

147. Glimerveen I. 1996. Heavy metals and trees. Edinburgh: Institute of chartered foresters. 206p.
148. Baker JM, McGrath SP, Reeves RD, Smith JAC. 2000. Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Banuelos NTG, editor. Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press LLC.
149. Stoltz E, Greger M. 2002. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. *Environmental and Experimental Botany* 47: 271-280.
150. Singh, OV, Labana S., Pandey G, Budhiraja R, Jain RK. 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 405-412.
151. Shah K., Nongkynrih JM. 2007. Metal hyperaccumulation and bioremediation. *Biologia Plantarum* 51: 618-634.
152. Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D. 2009. Genome Survey and Characterization of Endophytic Bacteria Exhibiting a Beneficial Effect on Growth and Development of Poplar Trees. *Applied and Environmental Microbiology* 75:748-757.
153. Kärenlampi S. 2000. Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. *Environ. Pollution* 107: 225-231.
154. Vavasseur A, Peltier G, Bourguignon J, 2003. Biodépollution, Bioremediation. Des plantes pour nettoyer les sols et les eaux. *CLEFS CEA48*: 85-88.
155. Harkey GA, Pradham SP. 1998. Relationship between contaminant loss and toxicity during phytoremediation using solid-phase microtox (R) tests. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 61: 419 - 425.
156. Briat, J.F, Lebrun H, 1999. Plant responses to metal toxicity. *C.R. Acad. Sci. III* 322: 43-54.
157. Marty L. 2000. The use of local ecotypes for the revegetation of acid / heavy metal contaminated lands in western Montana. *Billings land reclamation symposium Leslie Marty* 406: 662-3579.
158. Williams DG, Baruch Z. 2000. African grass invasion in the Americas: ecosystem consequences and the role of ecophysiology. *Biological Invasions*, 2: 123-140
159. Li-Chan ECY, Sultanbawa F, Losso JN, Oomah BD, Mazza G. 2002. Characterization of phytochelatin-like complexes from flax (*Linum usitatissimum*) seed. *J. Food Biochem.* 26: 271-293.
160. Axelsen KB, Palmgren MG. 2001. Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126 (2):696-706.
161. Juste C, Solda P. 1984. Factors influencing heavy metal availability in field experiments with sewage sludges. *Chemical methods for assessing bio-*

- available metals in sludges and soils (eds): Leschber R, Davis RD, L'Hermite P. Elsevier Applied Science Publishers, London. 82 - 88.
162. Hinsinger P, Schneider A, Dufey JE. 2005. Le sol: Ressource en nutriments et biodisponibilité. In : Sols et Environnement, Dunod (ed), Paris, 285-305.
 163. 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.
 164. Tessier A, Campbell PGC, Bisson M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metal. *Analytical Chemistry* 51: 844-851.
 165. 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.
 166. Delmas-Gadras C. 2000. Influence des conditions physico-chimiques sur la mobilité du plomb et du zinc dans un sol et un sédiment en domaine routier. Thèse : Université de Pau et des pays de l'Adour, U.F.R. Sciences.
 167. Li, LY, Li RS. 2000. The role of clay minerals and effect of H⁺ ions on removal of heavy metal (Pb²⁺) from contaminated soil. *Can. J. Geotech/Rev.* 37: 296-307.
 168. Lamy I. 2002. Réactivité des matières organiques des sols vis-à-vis des métaux. Journées nationales de l'étude des sols. 22.
 169. Le Goff F, Bonnomet V. 2004. Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM. Rapport technique. INERIS Direction des Risques Chroniques, Unité Evaluation des risques écotoxicologiques, 85p.
 170. Morel JL. 1997. Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. - Chapter 6, In: Tarradellas J, Bitton G, Rossel D. (Eds.), *Soil Ecotoxicology*. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton, Fl., 141-176.
 171. Blanchard C. 2000. Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon.
 172. Lesoin S. 1997. Migration cationique et anionique des métaux toxiques (Plomb, Chrome et Zinc) dans les sols sous l'effet d'un champ électrique. Thèse de Doctorat, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, 217p.
 173. Sheoran AS, Sheoran V. 2006. Heavy metal removal mechanism of acid mine drainage in wetlands: A critical review. *Minerals Engineering* 19: 105-116.
 174. Wu J, West LJ, Stewart DI. 2002. Effect of humic substances on Cu(II) solubility in kaolin-sand soil. *Journal of Hazardous Materials* 94: 223-238.
 175. Christensen TH. 1984. Cadmium soil sorption at low concentrations: I. Effect of time, cadmium load, pH and calcium. *Water Air Soil Pollut.* 21: 105-114.
 176. Sanders JR, McGrath SP, Adams, TM. 1986. Zinc, copper and nickel concentrations in ryegrass grown on sewage sludge-contaminated soils of different pH. *J. Sci. Food Agr.* 37: 961-968.
-

177. Guittonny-Philippe A, Masotti V, Höhener P, Boudenne JL, Viglione J, Laffontschwob I. 2014. Constructed wetlands to reduce metal pollution from industrial catchments in aquatic Mediterranean ecosystems: A review to overcome obstacles and suggest potential solutions. *Environment International* 64: 1-16.
178. 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.
179. Ponnampereuma FN. 1972. The chemistry of submerged soils. Academic Press NY and London, 96p.
180. Lespagnol G. 2003. Lixiviation du Chrome, du Cuivre et de l'Arseenic (CCA) à partir de sols contaminés sur des sites de traitement du bois. Thèse : Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, Université Jean Monnet.
181. Foy CD, Chaney RL, White MC. 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Rev. Plant Physiol.* 29: 511-566.
182. Mor'el JR. 1985. Contribution à l'étude des transferts de métaux lourds dans le système sol-plante. Thèse de doctorat Institut National Polytechnique de Lorraine.
183. Hinsinger P. 2001. Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. In: Gobran GR, Wenzel WW, Lombi E. (Eds.), *Trace Elements in the Rhizosphere*. CRC Press LCC, Boca Raton, Florida, USA, pp. 25- 41.
184. Oburger E, Jones DL, Wenzel WW. 2011. Phosphorus saturation and pH differentially regulate the efficiency of organic acid anion-mediated P solubilization mechanisms in soil. *Plant and soil* 341, 363-382.
185. Lee, J.O. 1979. Précis de chimie minérale. Dunod Université. Bordas, Paris, 282 p.
186. Giller EK, Ernst W, Mcgrath PS. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil. Biol. Biochem.* 30: 1389-1414.
187. 194. Giordano PM, May DA, Belli AD. 1979. Soil temperature effects on uptake of cadmium and zinc by vegetables grown on sludge amended soil. 1. *Environ. Qual.* 8: 233-236.
188. Juste C, Solda P. 1984. Factors influencing heavy metal availability in field experiments with sewage sludges. *Chemical methods for assessing bio-available metals in sludges and soils* (eds: R. Leschber, R.D. Davis and P.L'Hermite), 82-88, Elsevier Applied Science Publishers, London.
189. Mahar A, Wang P, Li R, Zhang Z. 2015. Immobilization of lead and cadmium in contaminated soil using amendments: a review. *Pedosphere* 25:555-568.
190. Dong L, Jonathan O. Sharp Jörg E. Drewes. 2015. Influence of Wastewater Discharge on the Metabolic Potential of the Microbial Community in River Sediments. *Microbial Ecology* 70 (2): 301-578.

191. Sendra V. 2007. Homeostasie et resistance au cuivre chez *Cupriavidus metallidurans* CH34: la proteine CopH et les transporteurs membranaires CusA et CzcA. Thèse en Biochimie. Universite Joseph-Fourier - Grenoble I. France.
192. Muschitz A. 2009. Réponses physiologiques des végétaux supérieurs aux stress métalliques. Caractérisation du rôle des parois cellulaires dans les stratégies défensives des cellules de tomate (*Solanum lycopersicum* Mill.) face aux éléments traces métalliques). Artois.
193. Tremel-Schaub A, Feix I. 2005. Contamination des sols : transferts des sols vers les plantes, EDP Scienc. eds. ADEME, Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.
194. Prasad MNV, Hagemeyer F. 1999. Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems. Berlin, Springer-Verlag.
195. Godzik B (1993). "Heavy metal contents in plants from zinc dumps and reference area." Polish Botanical Studies 5: 113-132.
196. 203. Dalenberg JW, Van Driel W. 1990. Contribution of atmospheric deposition to heavy-metal concentrations in field crops. Netherlands journal of agricultural science 38: 369-379.
197. 204. Hovmand MF, Tjell JC, Mosbaek H. 1983. Plant uptake of airborne cadmium. Environ Poll. 30: 27-38
198. Shahid M, Dumat C, Khalid S, Schreck E, Xiong T, Niazi NK. 2016. Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake, Journal of Hazardous Materials. doi.org/10.1016/j.jhazmat.11.063
199. Marschner H. 1985 Mineral Nutrition of Higher Plants. Institute of Plant Nutrition Univerity Hohenheim. Germany.
200. Scott D. Cunningham, Berti R. 1993 Remediation of contaminated soils with green plants. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. 29: 207-212.
201. Callot G, Chamayou H, Maertens C, Salsac L. 1982. Les interactions sol-racine, incidence sur la nutrition minérale. INRA. 325p.
202. Lasat MM, Baker AJM, Kochian LV. 1998. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. Plant Physiol. 118: 875-883.
203. Smolders E, Lambregts RM., McLaughlin MJ, Tiller KG. 1998. Effect of soil solution chloride on cadmium availability to Swiss chard. *J. Environ. Qual.* 27: 426-431.
204. Tung G, Temple PJ. 1996. Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. Science of The Total Environment 188 (2-3): 71-85.
205. Seregin IV, Ivanov VB. 2001. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. Russian Journal of Plant Physiology 48 (4): 523-544.

206. Wierzbicka M. 1987. Lead translocation and localization in *Allium cepa* roots. Canadian Journal of Botany 65(9): 1851-1860.
207. Pourrut B. 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Doctorat de l'université de Toulouse. 284 P.
208. Huang JW, Cunningham SD. 1996. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. NewPhytol. 134 : 75-84.
209. Aoun M. 2009. Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne *Brassica juncea* (L.) Czern, néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines. Thèse de doctorat. Université de Bretagne occidentale. 135P.
210. Baker AJM, Walker PL. 1990. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plant. In : Shaw JA. Heavy Metal Tolerance In: Plants: Evolutionary Aspects, Florida, Crc Press.155-177.
211. Otte ML, Rozema J, Koster L, Haarsma MS, Broekman RA. 1987. The iron-plaque on the roots of saltmarsh plants: A barrier to heavy metal uptake? International Conference Heavy Metals in the Environment, New Orleans (USA).CEP Consultants, Edinburgh.
212. Ye Z, Baker AJM, Wong MH, Willis AJ. 1998. Zinc, lead and cadmium accumulation and tolerance in *Typha latifolia* as affected by iron plaque on the root surface. Aquatic Botany 61(1): 55-67.
213. Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany 53(366): 1-11.
214. Dahmani-Muller H, Van Oort F, Gelie B, Balabane M. 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. Environmental Pollution109 (2): 231-238.
215. Malan HL, Farrant JM. 1998. Effects of the metal pollutants cadmium and nickel on soybean seed development. Seed Sci. Res. 8: 445-453.
216. Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S. 2005. Chromium toxicity in plants. Environ. Int. 31: 739-753.
217. Laszlo JA, 1994. Changes in soybean fruit (Ca^{2+}) (Sr^{2+}) and K^+ (Rb^+) transport ability during development. Plant Physiol. 104: 937-944.
218. Stacey MG, Patel A, McClain WE, Mathieu M, Remley M, Rogers EE, Gassmann W, Blevins DG, Stacey G. 2008. The Arabidopsis AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing seeds. Plant Physiol. 146: 589-601.
219. Moise JA, Han S, Gudynaite-Savitch L, Johnson DA, Miki, BLA. 2005. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 41: 620-644.
220. Li WQ, Khan MA, Yamaguchi S, Kamiya Y. 2005. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. Plant Growth Regul. 46: 45-50.

221. Kranner I, Colville L. 2011. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environ. Exp. Bot.* 72: 93-105.
222. Ni BR, Bradford KJ. 1992. Quantitative models characterizing seed-germination responses to abscisic-acid and osmoticum. *Plant Physiol.* 98: 1057-1068.
223. Alvarado V, Bradford KJ. 2005. Hydrothermal time analysis of seed dormancy in true (botanical) potato seeds. *Seed Sci. Res.* 15: 77-88.
224. Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V., 2008. Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* L. Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. *Plant Growth Regul.* 54: 143-156.
225. Siddiqui S, Meghvansi M, Wani M, Jabee F. 2009. Evaluating cadmium toxicity in the root meristem of *Pisum sativum* L. *Acta Physiol. Plantarum* 31: 531-536.
226. Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Kim, PJ, Yoon HS, Kim JS, Lee BH. 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67: 1182-1193.
227. Maheshwari R, Dubey R. 2008. Inhibition of ribonuclease and protease activities in germinating rice seeds exposed to nickel. *Acta Physiol. Plantarum* 30: 863-872.
228. Murthy UMN, Kumar PP, Sun WQ. 2003. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. *J. Exp. Bot.* 54: 1057-1067.
229. 236. Schützendübel, A., Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Bot.* 53: 1351-1365.
230. Sharma SS, Dietz KJ. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci.* 14: 43-50.
231. Domash VI, Sharpio TP, Zabreiko SA, Sosnovskaya TF. 2008. Proteolytic enzymes and trypsin inhibitors of higher plants under stress conditions. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 34: 318-322.
232. 240. Wang C, Zhang J, Liu X, Li Z, Wu G, Cai J, Flowers TJ, Wang S. 2009. *Puccinellia tenuiflora* maintains a low Na⁺ level under salinity by limiting unidirectional Na⁺ influx resulting in a high selectivity for K⁺ over Na⁺. *Plant, Cell & Environment* 32: 486- 496.
233. Xu Q, Min H, Cai S, Fu Y, Sha S, Xie K, Du K. 2012. Subcellular distribution and toxicity of cadmium in *Potamogeton crispus* L. *Chemosphere* 89: 114-120.
234. Zhao H, Wu L, Chai T. 2012. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca americana*. *Journal of Plant Physiology* 169 (13): 1243-1252.

235. Evlard A. 2013. Le potentiel du saule pour la phytostabilisation des sols pollués par les éléments-traces métalliques. Thèse de Doctorat en Sciences. Gembloux Agro Bio Tech.
236. Rooney JP. 2007. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology* 234(3): 145-56.
237. Cseh E. 2002. Metal permeability, transport and efflux in plants. *In: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Prasad MNV et Strzalka K. (eds). pp 1-36.
238. Woolhouse HW. 1983. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. Pp 245-300 *In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H. (eds.). Encyclopaedia of Plant Physiology, New Series 12C, Springer-Verlag, Berlin.*
239. Arduini I, Godbold DL, Onnis A, Stefani A. 1998. Heavy metals influence mineral nutrition of tree seedlings. *Chemosphere* 36 (4-5): 739-744.
240. Van Assche F, Clijsters H. 1988 Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: Dose-respons relation *Phaseolus vulgaris* L treated with zinc and cadmium. *Environ. Pollut.* 52: 103115.
241. Petroic N, Kastorl R, Rajican I. 1990. The effect of cadmium on nitrate reductase activity in sugar beet (*Beta vulgaris*) *In: Van Beusichem ML (ed) Plant Nutrition-Physiology and applications* pp. 107-109. Kluwer Academie Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
242. Tu SI, Broutlletc IN. 1987 Metalion inhibition of cotton root plasma membrane ATPase. *Phytochemistry* 26: 65-69.
243. Wilkins DA. 1978. The measunment of tolerance to edaphic factors by means of root growth. *New Phytol.* 80: 623-633.
244. Yusuf M, Fariduddin Q, Hayat S, Ahmad A. 2011. Nickel: An overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86 (1): 1-17.
245. Singh DP, Sing S. 1987. Action of heavy metals on hill activity and evolution *Anacystils nidulans*. *Plant Physiol.* 83: 12-14.
246. Romanowska E. 2002. Gas exchange functions in heavy metal stressed plants. *In : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Prasad MNV, Strzalka K. eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 257- 285.
247. Barcelo J. Cabot C, Poschenrleder Ch. 1986. Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolusvulgaris* L. cv*Contenderi*). II. Effects of Cd on endogenous abscisic acid levels. *J. Plant Physiol.* 125: 27-34.
248. Vazquez MD. Poschenrleder Ch, Barceld J. 1987 Chromium VI inducced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Bot.* 59: 427- 438.
249. Fodor F. 2002. Physiological reponses of vascular plants to heavy metals. *In : Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*, Prasad MNV, Strzalka K. eds, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 149-177.

258. Poschenrieder C, Gunsé B, Barcelo J. 1989. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol.*90: 1365-1371.
251. Barcelo J, Poschenrieder C. 1990. Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *J. Plant Nutr.*13: 1-37.
252. Haag-Kerwer A, Schäfer HJ, Heiss S, Walter C, Rausch T. 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J. Exp. Bot.*50: 1827-1835.
253. Van Assche F, Clijsters H. 1986. Inhibition of photosynthesis in *Phaseolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase /oxygenase. *J. Plant Physiol.* 125: 335-360.
254. Chatterjee J, Chatterjee C. 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environ. Pollut.*109: 69-74.
255. Mysliwa-Kurdziel B, Prasad MNV, Strzalka K. 2002. Heavy metal influence on the light phase of photosynthesis. *In: Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants.* Prasad MNV, Strzalka K. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 229-255.
256. He JY, Ren YF, Zhu C, Yan YP, Jiang DA. 2008. Effect of Cd on growth, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll fluorescence of wild and Cd-sensitive mutant rice. *Photosynthetica* 46: 466-470. doi:10.1007/s11099-008-0080-2
257. Ran X, Liu R, Xu S, Bai F, Xu J, Yang Y, Shi J, Wu Z. 2014. Assessment of growth rate, chlorophyll a fluorescence, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in *Aphanizomenon flos-aquae*, *Pediastrum simplex* and *Synedra acus* exposed to cadmium. *Ecotoxicology* 24: 468-77. doi:10.1007/s10646-014-1395-3
258. Nies DH. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*51(6): 730-50.
259. Pokorny B, Al Sayegh-Petkovsek S, Ribaric-Lasnik C, Vrtacnik J, Doganoc DZ, Adamic M. 2004. Fungi ingestion as an important factor influencing heavy metal intake in roe deer: evidence from faeces. *Sci Total Environ.* 324: 223-234
260. De La Rosa G, Peralta-Videa JR, Montes M, Parsons JG, Cano-Aguilera I, Gardea-Torresdey JL (2004) Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere* 55: 1159-1168.
261. Cherif J, Mediouni C, Ammar WB, Jemal F. 2011. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanumlycopersicum*). *Journal of Environmental Sciences* 23 (5): 837-844.
262. Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* 12: 98-105.
263. Wierzbicka M.1989. Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead. *Environmental and Experimental Botany* 29: 123-133.

264. Wozny A, Jerczynska E. 1991. The effect of Lead on early stages of *Phaseolus vulgaris* L. growth in vitro conditions. *Biologia Plantarum* 33: 32-39.
265. Eun SO, Youn HS, Lee Y .2000. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum* 110: 357-365.
266. Malecka A, Jarmuszkiewicz W, Tomaszewska B. 2001. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. *Acta Biochimica Polonica* 48: 687-698.
267. Radetski CM, Ferrari B, Cotelle S, Masfaraud JF, Ferrard, JF. 2004. Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste in cinerator bottom ash leachates. *Sci. Total Environ.* 333: 209-216.
268. Piqueras A, Olmas E, Martinez-Solano, JR, Hellin E. 1999. Cd induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time course, subcellular location and antioxidant response. In: Lin R ed. Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 69: 89-98.
269. Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82(2): 291-295.
270. Arora A, Sairam R, Srivastava G .2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82 (10): 1227-1238.
271. Hernandez JA, Olmos E, Corpas JF, Sevilla, F. del Rio, L. A. 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci.* 105: 151-167.
272. 281. Lamb C, Dixon R A. 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-271.
273. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. 2003. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of Botany* 91(2): 179-194.
274. Liu D, Jiang W, Wang W, Zhai L. 1995. Evaluation of metal ion on root tip cells by the *Allium* Test. *Israel J. Plant Sci.* 43: 125-133.
275. Gichner T, Patkova Z, Szakova J, Demnerova K. 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mut. Res.* 559: 49-57.
276. Ünyayar S, Çelik A, Çekiç Ö F, Gözel A. 2006. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis* 21(1): 77-81.
277. Souguir D, Ferjani E, Ledoigt G, Goupil P. 2008. Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity. *Protoplasma* 233(3-4): 203-207.
278. Jiang W, Liu D, Li A. 2000. Effects of Cu²⁺ on root growth; cell division and nucleolus of *Helianthus annuus* L. *Sci. Total Environ.* 256: 59-65.
279. Seregin IV, Ivanov VB. 2001. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 48 (4): 606-630.

280. Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, Sauvaigo S. 2002. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol. Chem.* 383(6): 93.
281. Arosio P, Levi S. 2002. Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* 33: 457-463.
282. Briat JF, Lobreaux S. 1997. Iron transport and storage in plants. *Trends Plant Sci.* 2: 187-193.
283. Doria E, Galleschi L, Calucci L, Pinzino C, Pilu R, Cassani E, Nielsen E. 2009. Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from amaize (*Zea mays* L.) low phytic acid mutant. *J. Exp. Bot.* 60: 967-978.
284. Mullen MD, Wolf DC, Beveridge TJ, Bailey GW. 1992. Sorption of heavy metals by the soil fungi *Aspergillus niger* and *Mucor rouxii*. *Soil Biol. Biochem.* 24: 129-135.
285. Jin XF, Yang XE, Islam E, Liu D, Mahmood Q, Li H, Li J. 2008. Ultrastructural changes, zinc hyperaccumulation and its relation with antioxidants in two ecotypes of *Sedumalfredii* Hance. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 997-1006.
286. Vos CR, Schat H, Waal MAMD, Vooijs R, Ernst WHO. 1989. Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Journal of Plant Physiology* 135, 165-169.
287. Cho UH, Seo NH. 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. In: Lin R, Wang X, Luo Y., Du W, Guo H, Yin D. 2007. Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 69: 89-98.
288. Haliwell B, Gutteridge JMC. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
289. Alscher RG, Erturk N, Heath LS. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants." *Journal of Experimental Botany* 53(372): 1331-1341.
290. Mika A, Minibayeva F, Beckett R, Lüthje S. 2004. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews* 3(1): 173-193.
291. Navas P, Villalba J, Córdoba F. 1994. Ascorbate function at the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1197(1): 1-13.
292. Heber U, Miyake C, Mano J, Ohno C, Asada K. 1996. Monodehydroascorbate Radical Detected by Electron Paramagnetic Resonance Spectrometry Is a Sensitive Probe of Oxidative Stress in Intact Leaves. *Plant Cell and Physiology* 37(8): 1066-1072.

293. May M, Vernoux T, Leaver C, Van, Montagu M, Inze D. 1998. Review article. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* 49 (321): 649-667.
294. Noctor G, Arisi A, Jouanin L, Kunert K, Rennenberg H, Foyer C. 1998. Review article. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49(321): 623-647.
295. Weiser H, Vecchi M. 1982. Stereoisomers of alpha-tocopheryl acetate. II. Biopotencies of all eight stereoisomers, individually or in mixtures, as determined by rat resorption-gestation tests. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research* 52(3): 351-370.
296. Asada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues In: Foyer CH, Mullineaux PM (eds) *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*, CRC Press, Boca Raton FL, pp 77-104
297. Miller NJ, J Sampson, LP Candeias, PM Bramley and CA Rice-Evans. 1996. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* 384(3): 240-242.
298. Laloi C, Apel K, Danon A. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Current Opinion in Plant Biology* 7(3): 323-328.
299. 309. Passardi F, C Cosio, C Penel and C Dunand. 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24(5): 255-265.
300. Bolwell G, Wojtaszek P. 1997. Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defense - a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol.* 51:347- 66.
301. Teichmann T. 2001. The biology of wood formation: scientific challenges and biotechnological perspectives. In: SG Panadalai, ed. *Recent Research Developments in Plant Physiology*. Research Signpost, Trivandrum, India; 269-284.
302. Maksymiec W. 2007. Signaling responses in plants to heavy metals. *Acta Physiol. Plant* 29: 177-187.
303. Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79(4): 583-593.
304. Wojtaszek P. 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem Journal* 322(3): 681-692.
305. Langebartels C, Wohlgemuth H, Kschieschan S, Grün S, Sandermann H. 2002. Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40(6-8): 567-575.
306. Pei Z-M, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klusener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI. 2000. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406 (6797): 731-734.
307. Joo JH, Bae YS, Lee JS. 2001. Role of Auxin-Induced Reactive Oxygen Species in Root Gravitropism. *Plant Physiology* 126(3): 1055-1060.

308. Keren-Keiserman A, Tanami Z, Shoseyov O, Ginzberg I. 2004. Peroxidase activity associated with suberization processes of the muskmelon (*Cucumis melo*) rind. *Physiologia Plantarum* 121(1): 141-148.
309. Demidchik V, Shabala SN, Coutts KB, Tester MA, Davies JM. 2003. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca²⁺ and K⁺ permeable channels in plant root cells. *Journal of Cell Sciences* 116(1): 81-88.
310. Foyer CH, Noctor G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell and Environment* 28: 1056-1071.
311. Foyer C, Noctor G. 2009. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. *Antioxid.Redox Sign.* 11: 861-905.
312. Cobbett C, Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159-182.
313. Gupta M, Tripathi RD, Rai UN, Haq W. 1999. Lead induced synthesis of metal binding peptides (Phytochelatins) in submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 5: 173-180
314. Piechalak A, Tomaszewska B, Baralkiewicz D, Malecka A 2002. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. *Phytochemistry* 60: 153-162.
315. Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Jouanin L, Terry N. 1999. Overexpression of Glutathione Synthetase in Indian Mustard Enhances Cadmium Accumulation and Tolerance. *Plant physiol.* 119: 73-79
316. Gasic K, Korban SS. 2006. Heavy metal stress. In: Madhava KV, Raghavendra AS, Janardhan Reddy K. (Eds.). *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Springer, The Netherlands, pp. 219-254.
317. Verbruggen N, Hermans C, Schat H. 2009. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Curr.Opin. Plant Biol.* 12: 364-372.
318. Clemens S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212: 475-486.
319. Noctor G, Foyer CH. 1998. Ascorbate and glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249- 279.
320. Meister A. 1995. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol.* 251: 3-13.
321. Reddy A, Kumar S, Jyothsnakumari G, Thimmanaik S, Sudhakar C. 2005. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). *Chemosphere* 60: 97-104.
322. Chasseaud LF. 1979. The role of glutathione S-transferases in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. *Advance Cancer Research* 29: 175-185.
323. Peuke AD, Rennenberg H. 2005. Phytoremediation. *EMBO reports* 6: 497-501.

324. Bourdineaud JP, Baudrimont M, Gonzalez P, Moreau JL. 2006. Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88: 1787-1792.
325. Goldsbrough P. 2000. Metal tolerance in plants: the role of phytochelatin and metallothioneins. In: Terry N, Banuelos G, eds. *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC Press LLC, pp: 221-233.
326. Siripornadulsil S, Traina S, Verma DP, Sayre RT. 2002. Molecular mechanisms of proline-mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell*. 14: 2837-2847.
327. Bäckor M, Fahselt D, Wu CT. 2004. Free proline content is positively correlated with copper tolerance of the lichen photobiont *Trebouxiaerici* (Chlorophyta). *Plant Sci*. 167: 151-157.
328. Senden MHMN, Van Der Meer AJGM, Verburg TG, Wolterbeek HT. 1995. Citric acid in tomato plant roots and its effect on cadmium uptake and distribution. *Plant Soil* 171: 333-339.
329. Chardonnens AN, Koevoets PLM, Van Zanten A, Schat H, Verkleij JAC, 1999. Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiology* 120: 779-785.
330. Sanita Di Toppi L, Gabbrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.
331. Gaxiola RA, Fink GR, Hirschi KD. Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiol*. 129 (3): 967-973.
332. Salt DE, Wagner GJ. 1993. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd^{2+}/H^{+} antiport activity. *J Biol Chem*. 268: 12297-12302.
333. Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A, Richaud P. 2009. AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd / Zn / Co / Pb vacuolar storage in Arabidopsis. *Plant Physiol* 149: 894-904.
334. Boojar MMA, Goodarzi F. 2007. The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. *Chemosphere* 67: 2138-2147.
335. Ni CY, Chen YX, Lin Q & Tian GM. 2005. Subcellular localization of copper in tolerant and non-tolerant plant. *Journal of Environmental Sciences-China* 17: 452-456.
336. Neumann H, Bode-Kirchhoff A, Madeheim A, Wetzel A. 1998. Toxicity testing of heavy metals with the rhizobium-legume symbiosis: high sensitivity to cadmium and arsenic compounds. *Environmental Science and Pollution Research* 5: 28-36.
337. Boularbah A, Schwartz CB, Bitton GC, Abouddrar WA Ouhammou AD, Morel JL. 2006. Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. *Chemosphere* 63: 811-817.

338. Clarkson T. 1995. Health effects of metal: A role for evolution. *Environ. Health Perspect.* 103:9-12.
339. Grotz N, Fox T, Connolly E, Park W, Guerinot ML, Eide D. 1998. Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that responds to zinc deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7220-7224.
340. Kägi JHR, Schäffer A. 1988. Biochemistry of metallothioneins. *Biochem.* 27: 8509-8515.
341. Golan-Goldhirsh U, Barazani O, Nepovim U, Soudek P, Smrcek S, Dufkova L, Krenkova S, Yrjala K, Schroder P, et Vanek T. 2004. Réponse des plantes aux métaux lourds et les polluants organiques dans la culture cellulaire et au niveau de la plante entier. *J. souille des sédiments* 2 : 133 -140.
342. Thomine S, Wang JM, Crawford NM, Schroeder JJE. 2000. Cadmium and iron transport by members of a family of metal transport in the plant *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4991 - 4996.
343. Coïc Y. et coppenet M. 1989. Les oligoéléments en egriculture et élevage. Ed. INRA. Paris. 114P.
344. Poldešáková E, Němecek J, Vácha R. 2002. Critical valurs of trace elements in soils from the viewpoint of the transfer pathway soil-plant. *Rosthinna vyroba* 48 (5): 193-202.
345. Martinez JP, Ledent JF, Bajji M, Kinet JM, Lutts S. 2003. Effect of water stress on growth Na^+ and K^+ accumulation and water use efficiency in relation to osmotic adjustment in two populations of *Atriplex halimus* L. *plant Growth regulation*, 63-73.
346. Jordan FL, Robin-Abbot MM, Maier R, Glenn EP. 2002.A. Comparison of chelator-facilitated uptake by a halophyte and glycophyte. *Environ. Toxicol. Chem.* 212: 698-704.
347. Shevyakova, NI, Netronina, IA, Aronova EE, Kuznetsov VIV. 2003. Compartmentation of Cadmium and Iron in *Mesembryanthmumcrystallinum plantis* during the adaptation to Cadmium stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 50 (5): 678 - 685.
348. 358. Radosovich S, Holt J, Ghera C. 1997. Associations of weeds and crops. 589 p *In: Weed ecology: implications for vegetation management*, 2 ed. New York, Wiley & Sons.
349. Osman, AE, Ghassali F. 1997. Effect of storage conditions and presence of fruiting bracts on the germination of *Atriplex halimus* and *Salsola vermiculata*. *Expl. Agric.* 33: 149 - 156.
350. Kinet JM, Benrebiha S, Bouzid S, Laihacar P, Dutuit P. 1998. Biodiversity study on *Atriplex halimus* L. for *in vitro* and *in vivo* detection of plants resistant to harsh environmental conditions and for potential micropropagation. *Cah. Agri.* 7(6): 505-509.
351. Le Houérou HN. 2000. Utilization of fodder trees and shrubs in the arid and semi-arid zones of West Asia and North Africa. *Arid Soil Res. Reh.* 14: 101-135.

352. Debez, A., Chaibi, W. & Bouzid, S. 2001. Effet du Na Cl et des régulateurs de croissance sur la germination d'*Atriplex halimus* L. *Cahiers Agri.*, 10 : 135-138.
353. Huang JW, Chen J, Berti WR, Cunningham SD. 1997. Phytoremediation of lead contaminated soils. Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.* 31: 800-805.
354. Alei M, Zaefizadeh M, Khayatnezhad M, Alaei Z, Alaei Y. 2010. Evaluation of Germination Properties of Different Durum Wheat Genotypes under Osmotic Stress. *Middle-East Journal of Scientific Research* 6 (6): 642- 646.
355. Dov K. 1972. Environmental control of seed germination. Pp 1-101 In: Kozlowski TT (ed.). *Seed biology. Vol. II: Germination control, metabolism, and pathology.* Elsevier.
356. Johansson I, Karlsson M, Johansson U, Larsson C, Kjellbom P. 2000. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochem Biophys Acta* 1465: 324-342.
357. Hopkins GW. 2003. *Physiologie végétale.* 1ère ed De Boeck. 514 P.
358. Almansouri M, Kinet JM, Lutts S. 2001. Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and soil* 231: 243-254.
359. Di Salvatore M, Garafa AM, Carratù G. 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere* 73: 1461-1464.
360. Mayer AM, Poljakoff-Mayber A. 1989. *The germination of seeds.* Fourth edition. Pergamon Press. Toronto, ON. 270 p.
361. Araùjo ASF, Monteiro RTR. 2005. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost. *Sci. Agric. Piracicaba* 62: 286-290.
362. Seregin IV, Kozhevnikova AD. 2005. Distribution of cadmium, lead, nickel, and strontium in imbibing maize caryopses. *Russ. J. Plant Physiol.* 52: 565 - 569.
363. Ernst WHO. 1998. Effects of heavy Metal in plants at the cellular and organismic level ecotoxicology. Pp 587-620 In: Gerrit S, Bernd M. (eds.). *III. Bioaccumulation and Biological Effects of Chemicals.* John Wiley & Sons and Spektrum Akademischer, Verlag.
364. Fernandes, JC, Henriques, FS. 1991. Biochemical, physiological and structural effects of excess copper in plants. *Bot. Rev.* 57: 246 -273.
365. Mihoub A, Chaoui A, El Ferjani E. 2005. Changements biochimiques induits par le cadmium et le cuivre au cours de la germination des graines de petit pois (*Pisum sativum* L.). *C. R. Biol.* 328 : 33 - 41.
366. Chugh LK, Sawhney S.K. 1999. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. *Environ. Pollut.* 92: 1-5.
367. Bansal P, Sharma P, Dhindsa K. 2001. Impact of Pb²⁺ and Cd²⁺ on activities of hydrolytic enzymes in germinating pea seeds. *Ann. Agri- Bio. Res.* 6: 113-122.

368. Carlson CL, Adriano DC, Sajwan KS, Abels SL, Thoma DP, Driver JT. 1991. Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species. *Water, Air, Soil Pollut.* 59: 231-240.
369. Munzuroglu O, Geckil H. 2002. Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 203 - 213.
370. Bansal P, Sharma P. 2000. Effect of Pb²⁺ and Cd²⁺ on respiration and mitochondrial electron transport chain in germinating pea seeds (*Pisum sativum* L.). *Indian J. Environ. Ecoplan.* 3: 249-254.
371. Bansal P, Sharma P, Goyal V. 2002. Impact of lead and cadmium on enzyme of citric acid cycle in germinating pea seeds. *Biol. Plant* 45: 125-127.
372. Mahmood S, Hussain A, Saeed Z, Athar M. 2005. Germination and seedling growth of corn (*Zea mays* L.) under varying levels of copper and zinc. *Int. J. Environ. Sc. Tech.*, 2 (3): 269- 274.
373. Aydinalp C, Marinova S. 2009. The effects of heavy metals on seed germination and plant growth on alfalfa plant (*Medicago sativa*). *Bulgarian Journal of Agricultural Science, Agricultural Academy* 15 (4): 347-350.
374. Weiqiang L, Khan MA, Yamaguchi S, Kamiya Y. 2005. Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 46: 45-50.
375. Abbad A, Cherkaoui M, Walid N, El Hadrami A, Benchaabane A. 2004. Variabilités phénotypique et génotypique de trios populations naturelles d'*Atriplex halimus*. *C. R. Biologies.* 327: 371-380.
376. Khan MA, Ungar IA. 1984. The effect of salinity and temperature on the germination of polymorphic seeds and growth of *Atriplex triangularis* Willd. *American Journal of Botany* 71: 481-489.
377. Ungar LA. 1996. Effect of salinity on seed germination, growth and ion accumulation of *Atriplex patina* (Chenopodiaceae). *Is. J. Bot.* 83: 604-607.
378. Keiffer CH, Ungar LA. 1997. The effect of extended exposure to hypersaline conditions on the germination of five species of the inland halophyte. *Is. J. Bot.* 84: 104-111.
379. Wang YK, Samos CH, Peoples R, Perez-Jurado LA, Nusse R, Francke U. 1997. A novel human homologue of the *Drosophila frizzled* wnt receptor gene binds wingless protein and is in the Williams syndrome deletion at 7q11.23. *Hum. Mol. Genet.* 6: 465 - 472.
380. Ahsan N, Lee DG, Lee SH, Kang KY, Lee JJ, Kim PJ, Yoon HS, Kim JS, Lee BH, 2007. Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67 1182-1193.
381. Moosavi SE, Gharineh MH, Afshari RT, Ebrahimi A. 2012. Effects of some heavy metals on seed germination characteristics of canola (*Barassica napus*), wheat

- (*Triticum aestivum*) and sunflower (*Carthamus tinctorious*) to evaluate phytoremediation potential of these crops. J. Agric. Sci. 4: 1-19.
382. Bewley DJ. 1997. Seed germination and dormancy. Plant Cell. 9: 1055-1066.
383. Claire LC, Adriano DC, Sajwan KS, Abel SL, Thomas DP and Driver JT. 1991. Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species. Water, Air and Soil Poll. 59: 231-240.
384. Labra M, Gianazza E, Waitt R, Eberini I, Sozzi A, Regondi S, Grassi F, Agradi E. 2006. *Zea mays* L. protein changes in response to potassium dichromate treatments. Chemosphere. 62: 1234-1244.
385. Zhang H, Lian C, Shen Z. 2009. Proteomic identification of small, copper responsive proteins in germinating embryos of *Oryza sativa*. Ann. Bot. London 103: 923-930.
386. Kiran Y, Sahin A. 2005. The effects of the lead on the seed germination, root growth, and root tip cell mitotic divisions of *Lens culinaris medik*. Gazi Univ. J. Sci. 18: 17-25.
387. Patra M, Bhowmik N, Bandopadhyay B, Sharma A. 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. Environ. Exp. Bot. 52: 199-223.
388. Kumar G, Tripathi R. 2008. Lead-induced cytotoxicity and mutagenicity in grass pea. Turk. J. Biol. 32: 73-78.
389. Alvarado V, Bradford KJ. 2002. A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination. Plant Cell Environ. 25: 1061-1069.
390. 400. Deng B, Yang K, Zhang Y, Li Z. 2016. Can heavy metal pollution defend seed germination against heat stress? Effect of heavy metals (Cu^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+}) on maize seed germination under high temperature. Environmental Pollution. 216 : 46-52.
391. Mateos-Naranjo E, Andrades-Moreno L, Cambrolle J, Perez-Martin A. 2013. Assessing the effect of copper on growth, copper accumulation and physiological responses of grazing species *Atriplex halimus*: Ecotoxicological implications. Ecotoxicology and Environmental Safety. 90: 136-142.
392. Mesnoua M, Lotmani B. 2015. Effect of some heavy metals on germination and early seedling growth of *Atriplex halimus* subsp. *Schweinfurthii*. Am. Euras. J. Agric & Environ. Sci. 15 (11) : 2235-2240.
393. Fatarna L, Boutekrabi A, Arabi Y, Adda A. 2017. Impact du cadmium, du zinc et du plomb sur la germination des graines d'*Atriplex halimus* l. (Amaranthaceae). Revue d'Ecologie (Terre et Vie). 72 (1) : 61-72.
394. Rascio A, Cedola MC, Toponi M, Flagella Z, Wittmer G. 1990. Leaf morphology and water status changes in *Triticum durum* under water stress. Physiol. Plant. 78: 462-467.

395. Welbaum GE, Bradford KJ, Kyuock Y, Oluoch MO. 1998. Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. *Seed Sci. Res.* 8:161-172.
396. Imbert E. 2002. Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics.* 5: 13-36.
397. Chudzińska E, Celiński K, Pawlaczyk EM, Wojnicka-Półtorak A, Diatta JB. 2016. Trace element contamination differentiates the natural population of Scots pine: evidence from DNA microsatellites and needle morphology. *Environ Sci Pollut Res.* 23: 22151- 22162
398. Subin M P, Steff y F. 2013. Phytotoxic effects of cadmium on seed germination, early seedling growth and antioxidant enzyme activities in *Cucurbita maxima* Duchesne. *Int. Res. J. Biological Sci.* 2 (9): 40-47.
399. Liu DH, Jaing WS, Li MX. 1993. Effect of chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*, *Israel j. Plant Sci.* 42: 235-243.
400. Márquez-García B, Márquez C, Sanjosé I, Nieva Fjj, Rodríguez-Rubio P, Muñoz-Rodríguez AF. 2013. The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Marine Pollution Bulletin* 70: 119-124.
401. Márquez-García B, Márquez C, Sanjosé I, Nieva FJJ, Rodríguez-Rubio P, Muñoz-Rodríguez AF. 2013. The effects of heavy metals on germination and seedling characteristics in two halophyte species in Mediterranean marshes. *Marine Pollution Bulletin.* 70: 119-124.
402. Pereira S, Saker ML, Vale M, Vasconcelos VM. 2009. Comparison of sensitivity of grasses (*Lolium perenne* L. and *Festuca rubra* L.) and lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposed to water contaminated with microcystins. *Bull Environ Contam Toxicol* 83(1): 81-4.
403. Rad M, Rad JS. 2013. Effect of abiotic stress conditions on seed germination and seedling growth of medical plant, hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *Intl J of Agri Crop Sci* 5(21): 2593-2597.
404. Yang Y, Wei X, Lu J, You J, Wang W, Shi R. 2010. Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73: 1982-1987.
405. Ko KS, Lee PK, Kong IC. 2012. Evaluation of the toxic effects of arsenite, chromate, cadmium, and copper using a battery of four bioassays. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 95: 1343-1350.
406. Miransari M, Smith DL. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany* 99: 110-121.
407. Lee KH, Kim HY, Piao HL, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee IJ, Hwang I. 2006. Activation of glucosidase via stress-induced poly-merization rapidly increases active pools of abscisic acid. *Cell* 126: 1109-1120.

408. Graeber K, Linkies A, Müller K, Wunchova A, Rott A, Leubner-Metzger G. 2010. Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae *DOG1* genes. *Plant Molecular Biology* 73: 67-87.
409. Munzuroğlu Ö, Zengin F, Yahyagil Z. 2008. The abscisic acid levels of wheat (*Triticum aestivum* L. cv. cakmak 79) seeds that were germinated under heavy metal (Hg^{++} , Cd^{++} , Cu^{++}) stress. *Gazi Univ. J. Sci.* 21: 1-7.
410. Walton DC, Soofi GS, Sondheimer E 1970. The Effects of Abscisic Acid on Growth and Nucleic Acid Synthesis in Excised Embryonic Bean Axes. *Plant Physiol* 45: 37-40.
411. Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F. 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C. R. Biol.* 331: 806-814.
412. Bhowmik N .2000. Cytotoxic effects of lead compounds on plant systems.Ph.D. thesis.University of Calcutta, Calcutta. Carter CT, Ungar IA (2003) Germination response of dimorphic seeds of two halophyte species to environmentally controlled and natural conditions. *Canadian Journal of Botany* 81: 918-926.
413. Silva S, Silva P, Oliveira H, Gaivão I, Matos M, Pinto-Carnide O, Santos C. 2017. Pb low doses induced genotoxicity in *Lactuca sativa* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 112: 109-116.
414. Venkatachalam P, Jayalakshmi N, Geetha N, Sahi SV, Sharma NC, Rene ER, Sarkar, SK, Favas PJC. 2017. Accumulation efficiency, genotoxicity and antioxidant defense mechanisms in medicinal plant *Acalypha indica* L. under lead stress. *Chemosphere* 171:544-553.
415. Atienzar FA, Cordi B, Donkin ME, Evenden AJ, Jha AN, Depledge MH. 2000. Comparison of ultraviolet-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA with chlorophyll fluorescence and growth in a marine macroalgae *Palmaria palmata*. *Aquat.Toxicol.* 50: 1-12.
416. Jiang Z, Qin R, Zhang HH, Zou JH, Shi QY, Wang JR, Jiang, WS, Liu, DH. 2014. Determination of Pb genotoxic effects in *Allium cepa* root cells by fluorescent probe, microtubular immunofluorescence and comet assay. *Plant Soil* 383 (1-2): 357-372.
417. Hall JL, Williams L.E. 2003. Transition metal transporters in plants. *J. Exp. Botany* 54: 2601 - 2613.
418. Turgut C, Pepe MK, Cutright TJ. 2004. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environmental Pollution* 131:147-154.
419. Chen YX, Lin Q, Luo YM, He YF, Zhen SJ, Yu YL, Tian GM, Wong MH. 2003. The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere* 50: 807- 811.
420. Dickinson NM, Baker AJM, Doronila A, Laidlaw S, Reeves RD. 2009. Phytoremediation of inorganics: realism and synergies. *Int. J. Phytorem.* 11: 97-114.

421. Mendez MO, Glenn EP, Maier RM. 2007. Phytostabilization potential of quailbush for mine tailings: growth, metal accumulation, and microbial community changes. *J. Environ. Qual.* 36: 245-253.
422. Zhao FJ, Lombi E, McGrath SP. 2003. Assessing the potential for zinc and cadmium phytoextraction with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 249: 37-43.
423. Kachout SS, Ben Mansoura A, Ennajah A, Leclerc JC, Ouerghi Z, Karray Bouraoui N. 2015. Effects of Metal Toxicity on Growth and Pigment Contents of Annual Halophyte (*A. hortensis* and *A. rosea*). *Int. J. Environ. Res.* 9 (2): 613-620.
424. Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
425. Vogel-milkus K, Drobne D, Regvar M. 2005. Zn, Cd and Pb accumulation and arbuscular mycorrhizal colonisation of pennycress *Thlaspi praecox* Wulf.(Brassicaceae) from the vicinity of a lead mine and Smelter in Slovenia. *Environ Pollut.* 133 (2): 233-42.
426. Ingram GC, Waites R. 2006. Keeping it Together: coordinating plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9: 12-20.
427. Saberi M, Tarnian F, Davari A, Ebrahimzadeh A, nik HA. 2013. Comparing cadmium and copper sulfate effects on seed germination and seedling initial growth properties in two range Species. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 5-9: 997-1001.
428. Mâalem S, Khoufi, S., Rahmoune, C. & Bennacer... . 2011, Analyse moléculaire de la diversité génétique de plantes Xéro/Halophytes du genre *Atriplex* moyennant RAPD-PCR. *Algerian journal of arid environment* 50 (1) : 50-59.
429. Haddioui A, Baaziz M. 2001. Genetic diversity of natural populations of *Atriplex halimus* L. in Morocco: an isoenzyme-based overview. *Euphytica* 121: 99-106.
430. Liao B, Liu H, Zeng Q, Yu P, Probst A, Probst J. 2005. Complex toxic effects of Cd²⁺, Zn²⁺, and acid rain on growth of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Environ. Int.*, 31: 891-895.
431. Ben Ghnaya A, Charles G, Hourmant A, Ben Hamida J, Branchard M. 2009. Physiological behaviour of four rapeseed cultivar (*Brassica napus* L.) submitted to metal stress. *C. R. Biologies* 332: 363-370.
432. Ebbs DS, Kochian LV. 1997. Toxicity of zinc and copper of Brassica species: Implications for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26: 776-781.
433. Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. 2007, Zinc in plants. *New Phytol.* 173: 677-702.
434. Todeschinia V, Linguaa G, D'Agostino G, Carniatob F, Roccotiello E. Bertaa G. 2011. Effects of high zinc concentration on poplar leaves: A morphological and biochemical study. *Environmental and Experimental Botany* 71. 50 - 56.

435. Odjegba VJ, Fasidi IO. 2004. Accumulation of trace elements by *Pistiastratoides*: implications for phytoremediation. *Ecotoxicology* 13: 637- 646.
436. Baker AJM, Reeves RD, Hajar ASM. 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in British population of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae). *New Phytologist* 127: 61-68.
437. Ros R, Cooke DT, Martinez-Cortina C, Picazo I. 1992. Nickel and cadmium-related changes in growth, plasma membrane lipid composition, ATPase hydrolytic activity and oration pumping of rice (*Oryza sativa* L. CV. Bahia) shoots. *J Exp Bot.* 43: 1475-1481.
338. Chugh LK, Gupta VK, Sawhney SK. 1992, Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry* 31: 395-400.
339. Cosio C, Vollenweider P, Keller C. 2006. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58: 64-74.
440. Bajji M, Kinet JM, Lutts S. 2002. Osmotic and ionic effects of NaCl on germination, early seedling growth and ion content of *Atriplex halimus* (Chenopodiaceae). *Can. J. Bot.* 80:297-304.
441. Rabier J, Laffont-Schwob I, Pricop A, Ellili A, D'Enjoy-Weinkammerer G, MD Salducci, Prudent P, Lotmani B, Tonetto A, Masotti V. 2014. HeavyMetal and Arsenic Resistance of the Halophyte *Atriplex halimus* L. Along a Gradient of Contamination in a French Mediterranean Spray Zone. *Water Air Soil Pollut.* 225:1993.
442. Martínez JP, Kinet JM, Bajji M, Lutts S. 2005. NaCl alleviates polyethylene glycol-induced water stress in the halophyte species *Atriplex halimus* L. *J. Exp. Bot.* 56: 2421-2431.
443. Munns R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167: 645-663.
444. Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* 25:239- 250.
445. Ortíz-Dorda J, Martínez-Mora C, Correal E, Simón B, Cenis JL. 2005. Genetic structure of *Atriplex halimus* populations in the Mediterranean Basin. *Annals of Botany* 95: 827-834.
446. Baret FT. 1997. Fourty Estimation of leaf water content and specific leaf weight from reflectance and transmittance measurements. *Agronomie* 17: 455 - 464.
447. Barrs C, Weatheley PE (1968) A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficit in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences* 15: 413- 428.
448. Lichtenthaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 351-382.

449. 467. Troll W, Lindsley J. 1955. A photometric method for determination of proline. *J. Biol. Biochem.* 215: 655-660.
450. Magné C, Larher F. 1992. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Anal Biochem.* 200 (1):115-8.
451. Shields R, Burnett W. 1960. Determination of protein bound carbohydrate in serum by a just modified anthrone method. *Anal. Chem.* 32: 885-886.
452. Gomez L, Rubia E, Augé M. A new procedure for extraction and measurement of soluble sugars in ligneous plants. *J Sei Food Agric* 2002; 82 : 360-9.
453. Chen L, Long XH, Zhang ZH, Zheng XT, Rengel Z, Liu ZP. 2011. Cadmium accumulation and translocation in two Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Cultiv. Pedosphere* 21: 573-580.
454. Bankaji I, Sleimi N, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM. 2016. NaCl protects against Cd and Cu-induced toxicity in the halophyte *Atriplex halimus*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 14(4): 810-822.
455. Bajji M, Kinet JM, Lutts S. 1998. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Sci.* 137:131-142.
456. Martínez JP, Lutts S, Schank A, Bajji M, Kinet JM. 2004. Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub *Atripex halimus* L. *J. Plant Physiol.* 161:1041-1051.
457. Zhang J, Nguyen HT, Blum A. 1999. Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J Exp Bot.* 50:291-302.
458. Wang ZL, Huang BR, Xu QZ. 2003. Effects of abscissic acid on drought responses of Kentucky bluegrass. *J Am Soc Hort Sci.*128: 36-41.
459. Clifford SC, Arndt SK, Corlett JE, Joshi S, Sankhla N, Popp M, Jones HG. 1998. The role of solute accumulation, osmotic adjustment and changes in cell wall elasticity in drought tolerance in *Ziziphus mauritiana* (Lamk.). *J Exp Bot.* 49:967-77.
460. Fan S, Blake TJ, Blumwald E. 1994. The relative contribution of elastic and osmotic adjustments to turgor maintenance in woody species. *Physiol Plant* 90:408-413.
461. Ben Hassine H, Ghanem ME, Bouzid S, Lutts S. 2009. Abscisic acid has contrasting effects on salt excretion and polyamine concentrations of an inland and a coastal population of the Mediterranean xerohalophyte species *Atriplex halimus*. *Ann. Bot.* 104: 925-936.
462. Schultz E, Joutti A. 2007. Arsenic Ecotoxicity in Soils. Geological Survey of Finland, Miscellaneous Publications. 53 p.
463. Vernay P, Austruy A, Gauthier-Moussard C, Hitmi A. 2009. Germination et fonctionnement du système photosynthétique des végétaux comme bioindicateurs de pollution des sols. *Étude et Gestion des Sols.* 16 (3/4) 349 à 357.

464. Schurr U, Walter A, Rascher U. 2006. Functional dynamics of plant growth and photosynthesis from steady-state to dynamics from homogeneity to heterogeneity. *Plant Cell Environ.* 29: 340-352.
465. Flexas J, Medrano H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Ann. Bot.* 89: 183-189.
466. Stoeva N, Bineva Tz. 2003. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As-contaminated soil. *Bulg. J. Plant Physiol.* 29: 87-95.
467. Duquesnoy P, Escudier E, Vincensini L, Freshour J, Bridoux AM, Coste A, Deschildre A, de Blic J, Legendre M, Montantin G, Tenreiro H, Vojtek AM, Loussert C, Clement A, Escalier D, Bastin P, Mitchell DR, Amselem S. 2009. Loss-of-function mutations in the human ortholog of *Chlamydomonas reinhardtii* ODA7 disrupt dynein arm assembly and cause primary ciliary dyskinesia. *Am. J. Hum. Genet.* 85(6):890-896.
468. Chen CT, Chen TH, Lo KF, Chiu CY. 2004. Effects of proline on copper transport in rice seedlings under excess copper stress. *Plant Sci.* 166: 103-111.
479. Gouia H, Suzuki A, Brulfert J, Ghorbal MH., 2003. Effects of cadmium on the coordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. *J. Plant Physiol.* 160, 367–376.
470. O'ncel, I., Keles-, Y., U'stu' n, A.S., 2000. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. *Environ. Pollut.* 107, 315–320.
471. Hare PD, Cress WA, Van Staden J. 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21:535-53.
472. Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. 1992. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54:579-99.
473. Papageorgiou GC, Murata N. 1995. The unusually strong stabilizing effects of glycinebetaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem-II complex. *Photosynthet Res.* 44:243-52.
474. Bohnert HJ, Jensen RG. 1996. Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends Biotech.* 14: 89-97.
475. Szabados, L. and A. Saviouré. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15:89-97.
476. Heller R, Esnault R, Lance C. 2000. *Physiologie végétale. II. Développement.* 6 éditions. Edit. Dunod. 366p.
477. Di-Martino C, Delfine S, Pizzuto R, Loreto F, Fuggi A. 2003. Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. *New Phytol.* 158: 455-463.
478. Ghnaya T, Nouairi I, Slama I, Messedi D, Grignon C, Abdelly C, Ghorbel MH. 2005. Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium*

- portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. J. Plant Physiol.162: 1133-1140.
479. Zhou W, Qiu B. 2005. Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (Crassulaceae). PlantSci.169:737-745.
480. Clemens S, Antosiewicz DM, Ward JM, Schatman DP, Schroeder JI. 1998. The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 12043-12048.
481. Küpper H, Kochian LV. 2010. Transcriptional regulation of metal transport genes and mineral nutrition during acclimatization to cadmium and zinc in the Cd/Zn hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens* (Ganges population). New Phytol. 185: 114-129.
482. Herbert J. Kronzucker, Dev T. Britto. 2011. Sodium transport in plants: A critical review. New Phytologist 189: 54-81.
483. Nemat Alla, M. M., A.-H. A. Khedr, M. M. Serag, A. Z. Abu-Alnaga and R. M. Nada. 2011. Physiological aspects of tolerance in *Atriplex halimus* L. to NaCl and drought. Acta Physiol. Plant. 33:547-557.
484. Walker DJ, Leigh RA and Miller AJ. 1996. Potassium homeostasis in vacuolated plant cells. P. Natl. Acad. Sci. USA. 93:10510-10514.
485. Liu Z, He X, Chen W, Yuan F, Yan K, Tao D. 2009. Accumulation and tolerance characteristics of cadmium in a potential hyperaccumulatore *Lonicera japonica* Thunb. J. Hazard. Mater. 169: 170-175.
486. Majumder M, Shukla AK. 2010. Nutrient release and fungal succession during decomposition of crop residues in a shifting cultivation system. Communications in Soil Science and Plant Analysis 41: 497-515. ISSN: 0010-3624, Taylor & Francis, UK
487. Tattini M, Melgar JC, Traversi ML. 2008. Responses of *Olea europaea* to high salinity: a brief-ecophysiological-review. Advances in Horticultural Science 22 (3): 159-173.
488. Dong J, Wu F, Zhang G. 2006. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). Chemosphere 64 : 1659-1666.
489. Bouharmont J. 1991. Utilisation de la variation somaclonale et de la sélection *in vitro* à l'amélioration du riz. In : *L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides*. Ed. AUPELFUREF. John Libbey. Eurotext. Paris. 1-8 pp.
490. Druart P, Husson C, Paul R. 2014. Renaturation des berges de cours d'eau et phytoremédiation. . Les Presses Agronomiques De Gembloux 201. Passage des Déportés 2, B-5030 Gembloux. 156 p. ISBN 978-2-87016-126-5
491. Guadagnini M. 2000. *In vitro*-breeding for metal accumulation in two tobacco (*Nicotiana tabacum*) cultivars. Thesis no. 1288, University Freiburg, Switzerland, p 109.

492. Nehnevajova E, Herzig R, Erismann K-H, Schwitzguébel J-P. 2007. In vitro breeding of *Brassica juncea* L. to enhance metal accumulation and extraction properties. *Plant Cell. Rep.* 26:429- 437.
493. Ben Ghnaya A, Charles G, Hourmant A, Ben hamida J. Branchard M. 2007. Morphological and physiological characteristics of rapeed plants regenerated in vitro from thin cell layers in the presence of zinc. *C.R. Biologies* 330: 728-734.
494. Seyedardalan A, Leung DMW. 2015. In: *Vitro Breeding of Heavy Metal-Resistant Plants: A Review.* *Hort. Environ. Biotechnol.* 56(2):131-136.
495. Benrebiha FZ, Pourrat Y, Dutuit P. 1992. Induction de la callogenèse chez l'*Atriplex halimus* sur des milieux de culture dépourvus d'hormones de croissance. Rôle des éléments minéraux, *Bulletin de la Société Botanique de France. Lettres Botaniques*, 139(3) : 219-222.
496. Benrebiha FZ. 2003. Etude de différents milieux de culture, de substance de croissance et de salinité sur la morphogenèse de l'*Atriplex halimu*, Thèse Doct. Université de Blida. Algérie. 120 p.
497. Teixeira da Silva JA, Dobránszki J2015. Plant thin cell layers: update and perspectives. *Folia Hort.* 27(2): 183-190.



Appendices

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

- % TRANS : Pourcentage de translocation des métaux.
- ABC : Transporteur ATP Binding Cassette
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AO : Ajustement osmotique
- AsA: Ascorbate
- ATPases: Adenosine triphosphatase.
- CCM : Couche Cellulaire Mince
- CCMts : Couches cellulaires minces transversales
- CE : Conductivité électrique
- CEC : Capacité d'échange cationique
- Ch. A : Concentration en chlorophylles a
- Ch. B : Concentration en chlorophylles b
- Ch. X + C : Concentration en caroténoïdes
- CL : Celllength
- DDL : Degré de liberté
- Diam. R : Elargissement relatif des axes racinaires.
- Diam. T : Elargissement relatif des axes caulinaires.
- dS m⁻¹ : Deci Siemens par mètre
- DTPA: Diethylene triamine penta acetic acid (C₁₄H₂₃O₁₀N₃).
- EDDHA : Ethylene diamine diamine di-o-hydroxy phenylacetic acid (C₁₈H₂₀O₆ N₂).
- EGTA: Ethylene glycol bis (2-aminoethyl ether) tetra acetic acid C₁₄H₂₄O₁₀N₂).
- SE : Standard error
- ET : Ecart type
- ETM : Elements traces métalliques
- ETM.PA : Taux d'accumulation des ETM dans les pousses aériennes.
- ETM.PS : Taux d'accumulation des ETM dans les racines.
- G% : Taux final de germination
- gs : Conductance stomatique
- GSH : Glutathion
- GSHS : Glutathion synthétase
- GST : Glutathion-S-transférase
- H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HAP : Hydrocarbures polycycliques aromatiques
Haut. T : Hauteur relative des tiges.
HEDTA: Hydroxy ethylene diamine tri acetic acid ($C_{10}H_{18}O_7 N_2$).
HMW: High MolecularWeight
HO•: Radical hydroxyle
IBA: 1H-Indole-3-butanoic acid, IBA ($C_{12}H_{13}NO_2$).
KDa: kilodalton
LMW: Low Molecular Weight
Long. R : Longueur relative des racines.
MF : Matière fraîche
MOS : Ecotype Mostaganem
MS : Matière sèche
MTBE : Méthyle tertiaire butyle éther
MTs : Métallothionéines
Na₂- EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra acétique
NN : Néof ormation relative des nœuds
Pb-C : Plomb avec chélateur
PCB : biphényle polychloré
PCs : Phytochélatines
PEP : Phospho-énolpyruvate
PF. R : Croissance relative des racines.
PF. T : Croissance relative des tiges.
PO : Potentiel osmotique
Ppm : Partie par million
PS. R : Rendement relatif en matière sèche des racines,
PS. T : Rendement relatif en matière sèche des tiges,
PSII : Photosystème II
r : Coefficient de corrélation de Pearson
REL: Ecotype Relizane
RL: Rootlength
ROS: ReactiveOxygenSpecies
Rubisco : Rubilose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygénase
SVI : Indice de vigueur des plantules (Shoot Vigor Index : SVI)
TCE: Trichloréthylène

TCLs: Plant thin cell layers.

TNT : Trinitrotoluène

TRE : Teneur relative en eau = RWC : Relative Water Content

UF/ha : Unité fourragère par hectare

Ψ_s : Potentiel osmotique

Ψ_w : Potentiel hydrique

2,4-D: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid ($C_8H_6Cl_2O_3$).

CNGC: Cyclic nucleotide gated channel

ZIP: ZRT, IRT-like protein

NRAMP: Natural resistance associated macrophage protein

1. Décret exécutif n° 17-170 du 25 Chaâbane 1438 correspondant au 22 mai 2017 fixant les modalités de fonctionnement du compte d'affectation spéciale n° 302-065 intitulé « Fonds national de l'environnement et du littoral ». Disponible sur le site :

<http://www.cntppdz.com/uploads/D%C3%A9cret%20ex%C3%A9cutif%20n%C2%B017-170.pdf>.

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES DANS LE CADRE DE LA THESE

- **FATARNA L., BOUTEKRABT A.** 2012. *Atriplex halimus* L ; un candidat prometteur pour la dépollution des sites affectés par les métaux lourds (Plomb, Zinc et Cadmium). 3^{ème} Colloque international « Terre et eau ». 20- 22 Novembre. Université Badji Mokhtar, Annaba.
- **FATARNA L., BOUTEKRABT A., DJELLA M., ARABI Y.** 2012. Contribution à l'étude du pouvoir phyto-accumulateur en métaux lourds de *Atriplex halimus* L. en vue de futures utilisations dans le contexte de la phytoremédiation. Séminaire National de protection de cultures et environnement. Le 10 et 11 Décembre 2012. Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.
- **FATARNA L., BOUTEKRABT A.** 2014. Culture *in vitro* d'*Atriplex halimus* L. et étude du pouvoir phyto-accumulateur en métaux lourds pour de futures utilisations dans le contexte de la phytoremédiation. II Congrès international de biotechnologies et valorisation des Bio ressources (BVBR). Du 18 au 20 Mars 2014. TABARKA. Tunisie.
- **FATARNA L., 2014.** La phytoremédiation : Stratégies et perspectives pour la dépollution des sites contaminés par les métaux lourds. Conférence nationale sur la pollution et déchets industriels CNPDI). 04-05 Juin. Université 20 AOUT 1955. Skikda.
- **FATARNA L., 2015.** Etude du pouvoir phyto-accumulateur en métaux de *Atriplex halimus* L. en vue de tester ses capacités phytoremédiantes des métaux (Plomb, Zinc et Cadmium. Séminaire international sur « La restauration des Ecosystèmes Naturels Face aux Changements Climatiques ». 17-18 Mai 2015. Université de Mascara.

Articles

- **BOUTEKRABT A., FATARNA L.** 2014. Comportement germinatif des graines d'*Atriplex halimus* L. stressées par les métaux Cd, Zn et Pb. **Revue des Régions Arides**, (35) 191-199. Actes du 4ème Meeting International 'Aridoculture et Cultures Oasiennes : Gestion des Ressources et Applications Biotechnologiques en Aridoculture et Cultures Sahariennes : perspectives pour un développement durable des zones arides 17-19/12/2013.
- **L. FATARNA, A. BOUTEKRABT, Y. ARABI & A. ADDA.** 2017. Impact du cadmium, du zinc et du plomb sur la germination des graines d'*Atriplex halimus* (Amaranthaceae). *Revue d'Ecologie (Terre et Vie)*. Vol. 72 (1) : 61-72.

RESUME

Population, civilisation et pollution sont en croissance non cessante. La pollution par les métaux lourds est la plus problématique vue son large étendue et ses graves conséquences sur les compartiments sol, eau et atmosphère, et surtout sa bio toxicité affectant l'ensemble des êtres vivants ; faune, flore et humains. Dans une optique de développement durable, la phytoremédiation est devenue une urgence absolue comme technologie verte de dépollution. En outre, pour plus d'efficacité et de durabilité de cette technologie, il y'a toujours besoin de découvrir des plantes hyper accumulatrices, voire, des plantes modèles pouvant être explorées du phénotype au génotype pour déchiffrer les codes de la tolérance et de l'accumulation des métaux. *Atriplex halimus* est une xéro-halophyte qui s'adapte bien aux conditions d'aridité, l'espèce constitue un matériel de choix pour la réhabilitation des terres marginales et dégradées. Cette recherche vise essentiellement l'étude des potentialités de l'*A. halimus* en phytoremédiation des métaux cadmium, zinc et plomb. Le second objectif est d'expliquer une part de la phyto-tolérance au stress métallique au cours de la germination et de la croissance végétative. La recherche consiste à tester l'impact des métaux sur la germination et la croissance, évaluer les taux d'accumulation et de translocation des métaux et en dernier, d'analyser les stratégies de tolérance notamment la physiologie et l'osmorégulation. Les résultats montrent que les métaux diminuent les taux de germination des graines et ce proportionnellement à leurs concentrations (jusqu'à 19 % à 10 000 ppm), et que la croissance racinaire est plus sensible aux métaux que la germination. L'effet inhibiteur du Cd sur la croissance est plus précoce comparé à ceux du Zn et du Pb. L'étude des corrélations entre les taux de germination et l'allongement des racicules et des cellules racinaires a montré que l'inhibition de la germination suite aux traitements métalliques pourrait être due à une restriction de la croissance de l'axe embryonnaire, ainsi, le Cd et le Zn limiteraient la croissance en longueur des cellules parenchymateuses, tandis que le Pb diminuerait l'activité mitotique des cellules des racicules. Les résultats issus de la culture hydroponique montrent que les fortes concentrations induisent une réduction générale de la croissance sans compromettre la vitalité des plants. L'ordre d'accumulation des métaux dans les pousses est comme suit : 11194,82 mg.Kg⁻¹ (Pb-C : plomb avec chélateur), 3984,29 mg.Kg⁻¹ (Zn), 3300,99 mg.Kg⁻¹ (Cd), 313,39 mg.Kg⁻¹ (Pb). Les taux moyens de translocation sont de l'ordre de : 81,49% (Pb-C), 51,51% (Zn), 49,42% (Cd) et 2,51%(Pb). *A. halimus* est avéré hyper accumulateur de cadmium et de plomb après chélation. Les paramètres : hauteur des tiges, poids frais aérien, néoformation des nœuds pourront être utilisés comme marqueurs d'accumulation des trois métaux dans les compartiments aériens et souterrains des plants. La culture en pots à 500, 1000 et 1500 ppm de métaux n'altère pas les niveaux d'hydratation des tissus foliaires, ni les teneurs en pigments chlorophylliens, cependant la conductance stomatique et le potentiel osmotique baissent significativement. L'osmorégulation par accumulation de la proline est commune chez l'ensemble des traitements métalliques, le calcium et le potassium se comportent comme osmolytes minéraux dans les traitements plombiques, en présence du zinc, le Ca²⁺ est accumulé davantage dans les racines, et le cadmium induit une diminution significative de l'assimilation du K⁺ et une accumulation du Ca²⁺ au niveau des feuilles. Dans ces conditions, l'*A. halimus* se montre efficace dans la rhizostabilisation du cadmium et du zinc et l'hyperaccumulation du plomb par chélation. Les tiges chez cette espèce fournissent un organe supplémentaire d'accumulation du plomb en enregistrant des taux moyens de 1894,9 mg. Kg⁻¹ MS chez l'écotype MOS et de 3295,5 mg. Kg⁻¹ MS chez REL.

Mots clés : Métaux lourds, Phytoremédiation, *Atriplex halimus*, Germination, tolérance.