

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté De Technologie

Département de Chimie industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

En chimie industrielle

Spécialité : Génie de l'environnement

IMPACT DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS DISPERSÉS SUR LA CROISSANCE D'UNE ESPECE VEGETALE LE HARICOT COMMUN

Par

Messaouda BOULMAALI

Devant le jury composé de:

A. BADIS	Professeur	Université de Blida	Président
A. BENRIMA	Professeur	Université de Blida	Examinatrice
H. BOUTOUMI	Maître de conférences (A)	Université de Blida	Examineur
F. FERNANE	Maître de conférences (A)	Université de Tizi Ouzou	Examinatrice
A. HADJ-ZIANE	Maître de conférences (A)	Université de Blida	Directrice de mémoire

BLIDA 2013

RESUME

L'objectif de cette présente étude est la mise en évidence de l'influence des nanotubes de carbone agglomérés et dispersés sur la croissance d'une espèce végétale; le haricot commun.

L'étape de germination des graines en utilisant différentes concentrations de NTC (0,5; 2 et 5 mg/L) a montré qu'une teneur moyenne permet d'obtenir les meilleurs rendements. L'effet de la dispersion de ces derniers avec la carboxyméthylcellulose (10 mg/L), a été mis en évidence et a montré une influence significative sur les longueurs des racines.

Le suivi du développement des plantes jusqu'au stade fruit et l'évaluation des paramètres morphologiques (biomasse et longueur des deux parties aérienne et souterraine) ainsi que les facteurs physiologiques (chlorophylles, sucres solubles et proline) ainsi que le nombre de gousses ont été déterminés par des analyses spécifiques.

L'ensemble des tests réalisés au cours de cette étude ont révélé une action significative des nanotubes de carbone sur la plante traitée, les teneurs en chlorophylle ont augmenté surtout en état dispersé avec la CMC d'un facteur de trois par rapport au témoin. Le sucre soluble varie en présence de NTC dispersés avec la CMC, la proline révèle des valeurs généralement élevées par rapport au témoin. Enfin le nombre de gousse a été aussi amélioré en fin de cycle.

Mots clés: écotoxicité des nanotubes de carbone, le haricot commun, paramètres morphologiques et physiologiques.

المخلص

تهدف هذه الدراسة إلى اثبات مدى تأثير الألياف الكربونية المتجمعة و الذائبة على نمو كائن نباتي كالفاصوليا الشائعة .

تستخدم في مرحلة إنبات البذور مختلف تركيزات الألياف الكربونية (0,5 ؛ 2 ؛ 5 ملغ/لتر) و إن متوسط القيم المبين في هذه الدراسة يسمح بالحصول على أفضل العوائد. إن عملية تشتيت الألياف الكربونية مع كربوكسي ميثيل سلولوز بتركيز 10 ملغ/لتر و تسليط الضوء عليها تبين و بوضوح تأثيرها على طول الجذور .

إن متابعة و رصد مراحل تطور النباتات إلى غاية مرحلة الإثمار ، و تقييم الصفات المرفولوجية (الكتلة الحيوية ، و طول كلا من الجزء الهوائي و الترابي) ، كذلك العوامل الفيزيولوجية (الكلوروفيل ، السكريات الذائبة و البرولين)، و عدد القرون بموجب تحاليل محددة.

و قد أظهرت مجموعة الاختبارات المنجزة خلال الدراسة نشاط واضح للألياف الكربونية على النبات المعالج، و تضاعفت تركيزات الكلوروفيل خاصة في حالة الذوبان مع كربوكسي ميثيل سلولوز و بمعامل 3 أضعاف مقارنة بالشاهد ، أما فيما يخص السكر الذائب فهو يتغير بوجود الألياف الكربونية المنتشرة مع كربوكسي ميثيل سلولوز ، كما ارتفعت قيم البرولين عموما مقارنة بالشاهد، و أخيرا تحسن أيضا عدد القرون في نهاية الدورة .

كلمات مفاتيح: السمية الايكولوجية لألياف الكربون النانوية، الفاصولياء الشائعة، العوامل المرفولوجية و الفيزيولوجية.

ABSTRACT

The objective of this study is the demonstration of the influence of carbon nanotube agglomerates and dispersed on the growth of a plant species, the common bean.

The step of germination using different concentrations of CNTs (0.5, 2 and 5 mg / L) showed a mean value provides the best returns. The effect of the dispersion of these with carboxymethylcellulose (10 mg / L) was highlighted and showed a significant influence on the length of the radicles.

Monitoring of plant development stage until fruit and evaluation of morphological parameters (biomass and length of both parties aboveground and belowground) and physiological (chlorophyll, soluble sugars and proline) and the number of pods were determined by specific analysis.

All tests in this study showed a significant action of carbon nanotubes on the treated plant, chlorophyll concentrations increased primarily dispersed by a factor of three compared to the control. Soluble sugar varies in the presence of CNTs dispersed with CMC, proline reveals generally high values compared to the control. Finally, the number of pods was also improved at the end of the cycle.

Keywords: Ecotoxicity of carbon nanotubes, common bean, morphological and physiological parameters.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mme. HADJZIANE Amel, maitre de conférence à la Faculté des sciences de l'ingénieur à l'université Saad DAHLEB de Blida, d'avoir eu l'amabilité de diriger ce travail. Qu'elle trouve ici, l'expression de ma profonde et sincère reconnaissance pour tous ses efforts, sa générosité, son savoir, ses critiques constructives et sa confiance.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à Mr A. BADIS Professeur à la faculté des sciences de l'ingénieur à l'université de Blida de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury. Qu'il trouve ici ma reconnaissance et mon respect les plus sincères.

Je suis très particulièrement redevable à Madame A. BENRIMA, professeur à la faculté des Sciences Agronomiques et Vétérinaires de l'université de Blida de l'honneur qu'elle m'a fait en consentant à juger ce travail. En raison de ses connaissances en matière d'agronomie.

Je tiens aussi à remercier Mr. H. BOUTOUMI maitre de conférences à la faculté des sciences de l'ingénieur à l'université de Blida pour sa participation comme membre de jury. C'est avec sincérité que j'exprime ma gratitude et mon profond respect.

Mes remerciements s'adressent également à Mme. F. FERNANE maitre de conférences à l'université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail.

Je remercie tous qui m'ont aidé de loin ou de près à la réalisation de ce travail surtout mon adorable frère qui a fait tout pour moi dans ce travail.

A mes merveilleux papa et maman

A ma grand-mère que j'espère que Dieu sauve.

A mes deux enfants Lina et Hicham que j'adore et à qui je souhaite la réussite dans leur vie.

A mon très cher époux

A mes sœurs qui m'ont soutenue et m'ont encouragée, ma nièce et mon neveu et mes beaux-frères.

A tous mes enseignants durant toute ma formation et à toutes mes amies.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	4
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	8
INTRODUCTION	10
1 - GENERALITES SUR LES NANOTUBES DE CARBONE	12
1. 1. Historique	12
1. 2. Structure	14
1. 3. Les domaines d'application des NTCs	16
1. 4. Synthèse des nanotubes de carbone biparois par dépôt chimique en phase vapeur catalytique (CCVD)	17
1. 5. Propriétés	18
1. 5. 1. Propriétés mécaniques	18
1. 5. 2. Propriétés électriques	19
1. 6. La mise en suspension des nanotubes de carbone	19
2 - LA TOXICITE ET L'ECOTOXICITE	24
2. 1. Introduction	24
2. 2. La toxicité	25
2. 3. L'écotoxicité	28
2. 3. 1. Ecotoxicité du milieu aquatique	28
2. 3. 2. Ecotoxicité des NTC sur les plantes	31
3 - GENERALITES SUR LE HARICOT	33
3. 1. Origine et Historique du haricot	33
3. 2. Caractéristiques botaniques de l'espèce	33
3. 3. Phases végétatives	35
3. 4. Valeur Nutritionnelle	36
3. 5. Les facteurs de croissance de la plante	37
3. 5. 1. Les facteurs édaphiques	37
3. 5. 2. Les facteurs climatiques	37
3. 5. 3. Les facteurs hydriques	38
3. 5. 4. D'autres facteurs	39

3. 6. Travaux d'entretien	39
3. 7. Production et importance de l'haricot	40
3. 7. 1. La place du haricot en Algérie	41
3. 7. 2. La production du haricot en Algérie	41
3. 8. Contraintes liées à la culture et la productivité du haricot commun	42
3. 8. 1. Les maladies rencontrées chez le haricot commun	42
3. 8. 2. Les ravageurs	43
3. 8. 3. Les contraintes abiotiques	43
4 - MATERIELS ET METHDES	45
4. 1. Introduction	45
4. 2. Objectif de l'expérimentation	45
4. 3. Les essais de mise en suspension des nanotubes de carbone	46
4. 3. 1. Matériel	46
4. 3. 2. Etude de la dispersion des NTC à l'aide d'agents dispersants	46
4. 4. Evaluation des paramètres de croissance d'une espèce végétale modèle	48
4. 4. 1. Préparation des pots	49
4. 4. 2. Le substrat	49
4. 4. 3. Essai de germination	49
4. 4. 4. Le semis	50
4. 4. 5. Dispositif expérimental	50
4. 5. Les paramètres étudiés	51
4. 5. 1. Paramètres morphologiques	51
4. 5. 2. Paramètres physiologiques	51
4. 5. 2. 1. La synthèse des pigments	51
4. 5. 2. 2. Les sucres solubles	52
4. 5. 2. 3. Accumulation de la proline	53
4. 6. Analyses statistiques	54
5 - RESULTATS ET DISCUSSION	55
5. 1. Introduction	55
5. 2. Mise en suspension des nanotubes de carbone	55

5. 2. 1. Mesure des densités optiques	56
5. 2. 2. Observations au microscope électronique à balayage	56
5. 3. Paramètres de croissance	57
5. 3. 1. Aspect général de la plante	57
5. 3. 2. Etape de germination	58
5. 3. 2. 1. Le pourcentage de germination	59
5. 3. 2. 2. Biomasse fraîche des cotylédons	60
5. 3. 2. 3. Biomasse fraîche de la radicule	61
5. 3. 2. 4. La longueur de la radicule	62
5. 3. 3. paramètres morphologiques	62
5. 3. 3. 1. La biomasse fraîche de la tige	63
5. 3. 3. 2. La biomasse fraîche racinaire	63
5. 3. 3. 3. La longueur de la partie aérienne	64
5. 3. 3. 4. La longueur de la partie souterraine	65
5. 4. Les paramètres physiologiques	66
5. 4. 1. La chlorophylle a	66
5. 4. 2. La chlorophylle b	67
5. 4. 3. La chlorophylle totale a+b	68
5. 4. 4. Le rapport de la chlorophylle chl a/chl b	69
5. 4. 5. La teneur en sucres solubles dans les feuilles	70
5. 4. 6. Les taux de sucre dans la racine	71
5. 4. 7. La proline dans les feuilles	72
5. 4. 8. La proline dans les tiges	73
5. 4. 9. La proline dans les racines	74
5. 5. Estimation du nombre des gousses	75
5. 6. Discussion générale	77
CONCLUSION GENERALE	80
APPENDICE A. Liste des symboles	82
APPENDICE B. Les tableaux d'analyse de variance	83
APPENDICE C. Les tableaux de résultats	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	91

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1. 1: Représentation schématique de la structure atomique du graphite (a) et du diamant (b)	12
Figure 1. 2 : Représentation schématique de la structure d'une molécule de C60	13
Figure 1. 3 : Représentation d'un NTC monoparoi fermé par deux demi-fullerènes	14
Figure 1. 4 : Représentations schématiques d'un nanotube de carbone (a) biparoi et (b) multiparoi	14
Figure 1. 5 : Représentation schématique de la base du plan graphène et de tris structures limites dites zigzag, armchair et chirale	15
Figure 1. 6 : (a) Image de DWNT en MET-HR, (b) distribution du nombre de parois établie à partir des images de 96 NTC, (c) distribution des diamètres internes (di) et externes do) de ces 96 NTC, (d) distribution en diamètre des DWNT uniquement	17
Figure 1. 7: Mécanisme de l'isolement de nanotubes à partir d'un faisceau obtenu par la stabilisation aux ultrasons et un tensioactif	21
Figure 1. 8: Représentations schématiques du mécanisme d'adsorption des tensioactifs à la surface des nanotubes de carbone: (a) les SWNTs sont encapsulés dans des micelles cylindriques ; (b) des demi-micelles s'adsorbent sur les SWNTs ; (c) adsorption aléatoire des tensioactifs sur les SWNTs	22
Figure 3. 1: L'espèce <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (a): tiges, feuilles et fleurs de l'haricot; (b): feuilles et gousses	33
Figure 3. 2: Organigramme des travaux d'entretien	40
Figure 3. 3: Principaux pays producteurs de l'haricot	41
Figure 3. 4 : la production de l'haricot vert et sec en Algérie	42
Figure 4. 1 : Représentation schématique de la carboxyméthylcellulose	47
Figure 4. 2: L'essai de germination dans l'étuve	50
Figure 4. 3: Schéma du dispositif expérimental	50
Figure 5. 1. Images des suspensions observées au cours du temps à différentes concentrations de carboxyméthylcellulose	55
Figure 5. 2: Variations des densités optiques en fonction du temps pour différentes concentrations de CMC	56
Figure 5. 3: Images des nanotubes de carbone vues au MET à 50nm état aggloméré (a) état dispersé (b)	57
Figure 5. 4: Représentation des plants témoin et traités par la suspension des NTCs	57

Figure 5. 5: Représentation des plants traités par les suspensions de NTCs avec la CMC	58
Figure 5. 6: La germination des graines	59
Figure 5. 7: Le pourcentage de germination des graines d'haricot	60
Figure 5. 8: La biomasse fraîche des cotylédons	61
Figure 5. 9: La biomasse fraîche des racines	61
Figure 5. 10: La longueur des racines pour les différents traitements	62
Figure 5. 11: La biomasse fraîche des tiges	63
Figure 5. 12: La biomasse fraîche des racines	64
Figure 5. 13: La racine du traitement N1C1 à gauche et le témoin à droite	64
Figure 5. 14: La longueur de la partie aérienne pour les différents traitements	65
Figure 5. 15: La longueur de la partie souterraine pour les différents traitements	66
Figure 5.16: La racine du traitement N2C0 à gauche et le témoin à droite	66
Figure 5. 17: Le taux de chlorophylle a pour les différents traitements	67
Figure 5. 18: Le taux de chlorophylle b pour les différents traitements	68
Figure 5. 19: La chlorophylle totale (a+b)	69
Figure 5. 20: Le rapport entre la chlorophylle a et b pour les différents traitements	70
Figure 5. 21: Les sucres solubles dans feuilles	71
Figure 5. 22: Le sucre soluble dans les racines	72
Figure 5. 23: La proline dans les feuilles pour les différents traitements	73
Figure 5. 24: La proline dans les tiges pour les différents traitements	74
Figure 5. 25: La proline dans les racines	75
Figure 5. 26: Le nombre de gousses pour les différents traitements	76
Tableau 1. 1 : Les domaines d'application des NTC	16
Tableau 2. 1: Tableau récapitulatif des effets néfastes des nanotubes de carbone sur différents organismes	30
Tableau 3. 1: Composition du haricot vert (teneurs pour 100 grammes)	36
Tableau 3. 2: Les besoins en température selon les stades de développement	38
Tableau 3. 3: L'influence de la carence hydrique sur la production du haricot.	39
Tableau 4. 1: Les différentes concentrations des suspensions injectées dans la terre	49

INTRODUCTION

De nos jours, les nanosciences et les nanotechnologies promettent des progrès remarquables, dans les domaines de la santé, de l'environnement et de l'énergie. Depuis quelques années, la communauté scientifique montre un intérêt grandissant pour ces « nouvelles sciences » et des moyens humains et financiers sont mis en œuvre pour leur développement.

Cependant, les nanotechnologies, soulèvent de nombreuses inquiétudes concernant leur impact sur l'environnement et la santé Humaine.

Les toxicologues et les concepteurs se sont penchés sur la question dès le début du développement des nanosciences, afin d'anticiper leurs impacts et d'établir des règles d'utilisation. Cette tâche s'avère, toutefois, très complexe : il existe de nombreuses nanoparticules et il a été montré que chaque caractéristique physico-chimique pouvait influencer leurs effets.

Les nanotubes de carbone ont été découverts il y a une dizaine d'années. Depuis, le développement des applications a été considérable et la recherche s'est appliquée à différents domaines (médecine, industrie,etc.).

Les produits mis à la disposition des consommateurs et contenant des nanoparticules sont de plus en plus nombreux : accessoires sportifs, cosmétiques, appareils électroniques, automobiles... De la production à l'utilisation, en passant par le transport et enfin lors de l'élimination en fin de vie, il y a de multiples raisons de retrouver les nano-éléments (nanotubes de carbone) dans les différents milieux : air, eau et sol qui conduiraient à une exposition de la faune et de la flore.

Très peu de connaissances sont actuellement disponibles sur la toxicité des nanotubes de carbone pour l'Homme, la plupart des données toxicologiques provenant d'études réalisées *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal.

Par ailleurs, peu d'études publiées à ce jour concernent les effets de nanomatériaux sur les végétaux supérieurs. Une étude démontre que les nanotubes de carbone sont des fertilisants très efficaces pour les végétaux [1]. En effet, des plants de tomates dont le substrat de germination a été additionné de nanotubes de carbone ont connu un développement plus rapide que des plants témoins (sans nanotubes de carbone). La germination et la croissance de ces

plants semble donc être stimulée par la présence de ces nanoparticules dans leur substrat.

Dans cet axe, l'objectif de notre étude, entrant dans le cadre d'un projet de recherche entre l'université de Blida et le CIRIMAT de Toulouse (France), consiste en l'étude de l'impact des nanotubes de carbone sur la croissance des végétaux.

Le végétal objet de notre étude est le haricot commun : *Phaseolus vulgaris*, que nous avons choisi pour les nombreux avantages qu'il présente : disponibilité, facilité à être cultivé et observation d'un cycle complet légume-fruit sur une période de quatre mois minimum.

Les paramètres suivis sont morphologiques et physiologiques.

Ce mémoire est structuré comme suit :

- une partie théorique qui regroupe une synthèse bibliographique sur les nanotubes de carbone et leur toxicité ainsi qu'une description de notre végétal.
- une partie expérimentale dans laquelle sont décrites les étapes concernant les modes opératoires ainsi que les interprétations des résultats obtenus.
- enfin, ce travail est achevé par une conclusion générale et des perspectives à envisager pour la continuité de l'étude.

CHAPITRE 01

GENERALITES SUR LES NANOTUBES DE CARBONE

1. 1. Historique

Elément chimique parmi les plus abondants, le carbone est à la base de presque tous les composants essentiels à la vie, comme l'ADN, les protéines et les huiles. Cependant il n'existe que sous deux formes pures à l'état naturel: le graphite et le diamant.

Le graphite est l'état thermodynamiquement stable du carbone sous pression atmosphérique et à température ambiante. Il est constitué de plans parallèles d'atomes de carbone distribués au sein d'un réseau hexagonal. Les atomes de carbone y sont d'hybridation sp^2 . Ces plans sont faiblement liés les uns aux autres, ce qui explique la texture friable et les propriétés de lubrification. Au contraire, dans le diamant les atomes de carbone sont distribués en une structure cubique faces centrées et présentent une hybridation sp^3 (Figure 1. 1)

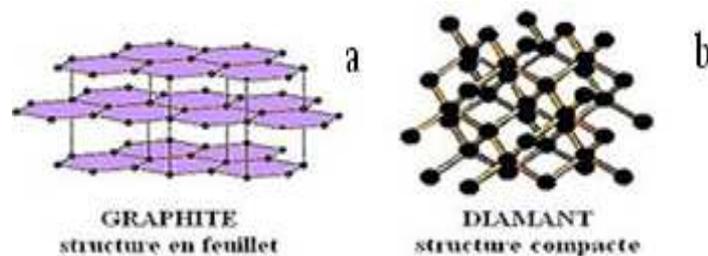


Figure 1. 1: Représentation schématique de la structure atomique du graphite (a) et du diamant (b).

Suite aux découvertes dans les années 1970, de nombreuses molécules exotiques au sein de nuages de gaz de notre galaxie, Kroto, Heath, O'Brien, Curl et Smalley tentent en 1984 de créer au laboratoire les conditions régnant au sein d'étoiles à carbone afin de reproduire certaines molécules. Leur procédé consiste à sublimer du graphite dans un nuage chaud de particules à l'aide d'un puissant laser, puis à refroidir les vapeurs avec un faisceau d'hélium. Une analyse du mélange au spectromètre de masse révèle alors la présence de nombreuses molécules de masse atomique 720. Les quantités étant trop faibles pour procéder

à une analyse structurale, mais le carbone étant le seul atome en présence avec l'hélium inerte, Kroto et al. en déduisent qu'il s'agit d'un édifice moléculaire stable de 60 atomes de carbone de géométrie sphérique, à l'image d'un ballon de football (Figure 1. 2) [2]. Ce n'est qu'en 1990 que Kratschmer et al. vérifient l'hypothèse de Kroto et al. à l'aide d'un procédé par arc électrique, ils synthétisent du C₆₀ en grande quantité et le cristallisent [3]. Ce procédé va être repris dans le monde entier pour synthétiser et étudier les propriétés de cette nouvelle forme allotropique du carbone à l'état pur appelée fullerène en hommage à Buckminster Fuller, créateur des dômes géodésiques.



Figure 1. 2 : Représentation schématique de la structure d'une molécule de C₆₀

En 1991, Sumio Iijima, chercheur chez NEC au Japon, travaille sur la synthèse des fullerènes. À l'issue d'une expérience par arc électrique dans laquelle il a changé l'alimentation en courant alternatif par du courant continu, Iijima observe en microscopie électronique dans la suie carbonée de longs filaments tubulaires [4]. Il détermine qu'ils sont constitués de feuillets de graphène enroulés sur eux-mêmes, et imbriqués de façon coaxiale les uns dans les autres à l'image des poupées russes. Il les appelle nanotubes (multiparois MWNTs), en référence à leur diamètre de quelques nanomètres. En 1993, Iijima et Ichihashi de chez NEC, et Bethune et al. de chez IBM rapportent simultanément la première fabrication de nanotubes ne possédant qu'une seule paroi de carbone ; les nanotubes monoparois (SWNTs) [5, 6]. Bien que certains travaux antérieurs, comme ceux de Oberlin A. et Endo M. en 1976, montrent déjà la présence de ces particules tubulaires par microscopie électronique en transmission [7], ce n'est que depuis les observations d'Iijima en 1991 et le développement des techniques de microscopie électronique que la recherche sur les nanotubes de carbone n'a

cessé de prendre de l'ampleur. Les propriétés intrinsèques des nanotubes de carbone sont désormais dans l'ensemble bien établies, et leur permettent d'être potentiellement utiles dans de nombreuses applications que ce soit en physique, en chimie ou encore en biologie.

1. 2. Structure

Structurellement, on peut voir un nanotube comme un feuillet de graphène enroulé sur lui-même (Figure 1.3), de manière à former un tube dont le diamètre est de l'ordre du nanomètre. Les extrémités de ce tube sont alors généralement fermées par un demi-fullerène. Une autre manière de concevoir un nanotube est de considérer un fullerène que l'on allonge en y insérant toujours la même ceinture d'atomes de carbone, de manière à créer une paroi composée uniquement d'hexagones.

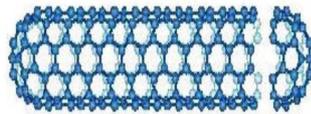


Figure 1. 3 : Représentation d'un NTC monoparoi fermé par deux demi-fullerènes

Un NTC peut être composé d'une paroi unique, on parle de NTC monoparoi (SWNTs pour "single walled", Figure 1. 3), ou de plusieurs parois concentriques et on parle alors de NTC multiparois (MWNTs pour "multi-walled", Figure 1. 4 (b)). Les NTCs double parois ou biparois (DWNTs pour "double walled", Figure 1. 4 (a)) sont un cas particulier à la frontière entre les SWNT et les MWNT en général.

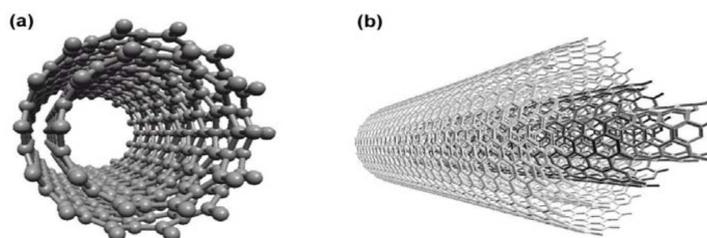


Figure 1. 4 : Représentations schématiques d'un nanotube de carbone (a) biparoi et (b) multiparoi

Le diamètre externe des MWNTs peut varier de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de nanomètres selon les conditions de synthèse. Le diamètre interne est en général de l'ordre de 5 nm. La distance séparant un feuillet de graphène de son voisin est d'environ 3 Å, proche de la distance entre deux feuillets de graphène dans le graphite. Leur longueur, quant à elle, est en règle générale de l'ordre du micron, mais peut atteindre plusieurs centaines de microns selon les conditions de synthèse. Si l'on se focalise sur leur très grand rapport d'anisométrie, c'est à dire le rapport entre leur longueur et leur diamètre, de l'ordre de 10^3 - 10^5 , les nanotubes peuvent être considérés comme des structures unidimensionnelles.

La structure du NTC est définie par un vecteur chiral (Ch) qui s'exprime dans la base du feuillet graphène à l'aide de deux indices entiers n et m : $Ch = na_1 + ma_2$ (Figure 1.5). Le vecteur chiral définit, par rapport à l'axe du tube, un angle θ , appelé angle chiral, qui détermine l'hélicité du NTC. Les valeurs des entiers n et m permettent de classer les NTC en différents types :

- si $m = 0$, le NTC est dit de type zig-zag (figure 1. 5. (b))
- si $m = n$, le NTC est dit de type armchair (figure 1. 5. (a))
- dans les autres cas les NTC sont dits chiraux (figure 1. 5. (c))

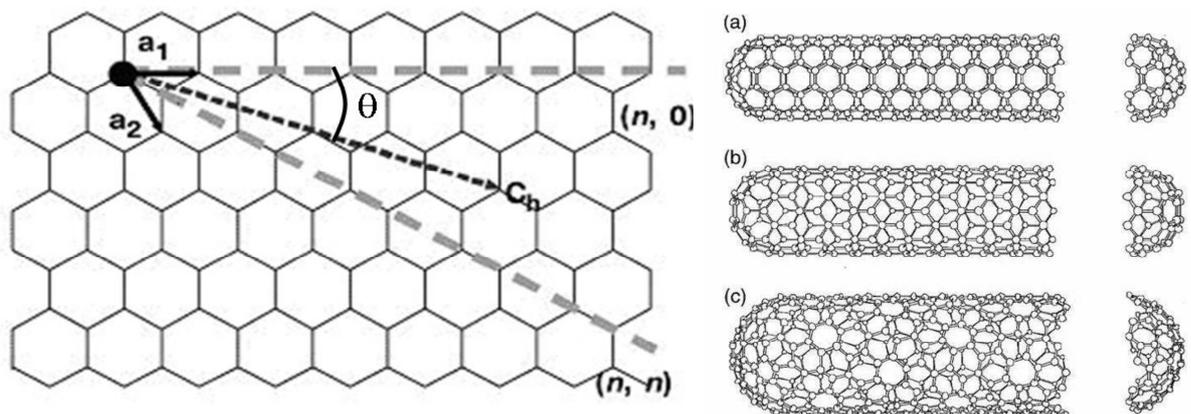


Figure 1. 5 : Représentation schématique de la base du plan graphène et de tris structures limites dites zigzag, armchair et chirale.

1. 3. Les domaines d'application des NTC

Les applications ont été choisies sur une gamme de domaines d'applications potentielles (voir tableau 1. 1), parce qu'ils sont des sujets brûlants en matière de recherche et développement, et déjà sur le marché dans le cas des batteries.

Tableau 1. 1 : Les domaines d'application des NTC [8].

Secteur de l'industrie	Application
Matériaux et chimie	Céramique et métal Polymère (polymère conducteurs de chaleur) Revêtements (les surfaces conductrices) Membranes et catalyse
Médecine et science de la vie	Le diagnostic médical Les applications médicales (administration de médicaments, par exemple) Cosmétiques (crèmes anti-âge) Capteurs chimiques Filtres pour le traitement de l'eau et de nourriture
Electronique	Éléments d'éclairage, à base de nanotubes de carbone: écrans à émission de champ Microélectronique: transistor à électron unique L'informatique moléculaire, et le stockage des données Capteurs électromécaniques ultra-sensibles Systèmes micro-électromécaniques (SMEM)
Energie	Stockage de l'hydrogène, stockage de l'énergie (batteries et super condensateurs) Les cellules solaires Les piles à combustible matériaux supraconducteurs

1. 4. Synthèse des nanotubes de carbone biparois par dépôt chimique en phase vapeur catalytique (CCVD)

Les nanotubes de carbone biparois (DWNTs) représentent une catégorie à part des NTC. Ils sont proches des SWNTs en ce qui concerne leur morphologie et la plupart de leurs propriétés, avec l'avantage d'avoir une paroi externe à laquelle de nombreuses modifications peuvent être apportées sans toucher à la paroi interne.

Zhu et al. utilisent un catalyseur Fe/Co supporté par de la silice mésoporeuse pour synthétiser des DWNT (pas d'indication de rendement ni de sélectivité). Le composite peut être utilisé directement pour la réalisation de composants pour l'électronique [9].

L'équipe Nanocomposites Nanotubes de Carbone (NNC) du CIRIMAT a développé la première synthèse de DWNT en grande quantité (1 g de DWNT pour 10 g de catalyseur) par décomposition d'un mélange H_2/CH_4 sur un catalyseur Co/Mo-MgO [10], avec une grande sélectivité (environ 80 % des NTC sont biparois, Figure 1. 6). L'équipe a initialement développé ces catalyseurs à base de MgO afin de permettre une élimination facile et totale du support oxyde [11]. Un lavage à l'acide chlorhydrique concentré (solution aqueuse) suffit en effet pour dissoudre la magnésie (MgO) et les particules métalliques libres (non encapsulées par du carbone).

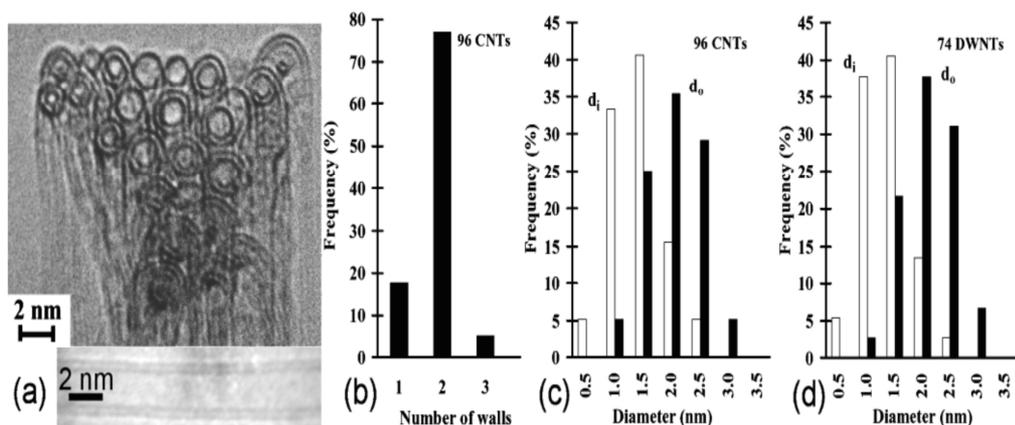


Figure 1. 6 : (a) Image de DWNT en MET-HR, (b) distribution du nombre de parois établie à partir des images de 96 NTC, (c) distribution des diamètres internes (d_i) et externes (d_o) de ces 96 NTC, (d) distribution en diamètre des DWNT uniquement.

Plus récemment, Yamada et al. ont synthétisé des DWNT alignés perpendiculairement à un substrat Si/SiO₂ à partir de catalyseur Al₂O₃/Fe (film de fer déposé par pulvérisation), par décomposition de l'acétylène. Les "forêts" de NTC (population dense perpendiculaire au substrat) obtenues mesurent jusqu'à 2,2 mm de hauteur sur des plaques de 20 x 20 mm. Leur échantillon contient 85% de DWNT dans le meilleur cas [12].

Luy et al. Synthétisent sélectivement des DWNT (95%) par décomposition de l'éthanol à 800°C sur un catalyseur imprégné Fe-Mo/Al₂O₃ [13]. Gruneis et al. sont parvenus aussi à synthétiser des DWNT à 940°C, à partir de catalyseurs Co/Mo-MgO préparés par imprégnation [14]. Les images de MET révèlent bien la présence de DWNT mais aussi de nanofibres de carbone et de carbone amorphe à certains endroits.

1. 5. Propriétés

1. 5. 1. Propriétés mécaniques

Etant donné la force de la liaison C=C, les nanotubes sont souvent considérés comme des matériaux au potentiel exceptionnel, notamment en regard de leurs propriétés axiales. Il existe de nombreux calculs théoriques pour le module d'élasticité (ou module d'Young) dont les valeurs s'échelonnent de 500 à 1500 GPa, selon le modèle utilisé [15]. Des mesures expérimentales ont confirmé des modules d'Young d'environ 1000 GPa [16, 17], ce qui est environ 25% plus élevé que celui des meilleures fibres de carbone produites à ce jour. Les nanotubes possèdent en outre une faible densité, 6 fois plus faible que celle de l'acier par exemple, ainsi qu'une grande résistance à la flexion [18]. La contrainte à la rupture des nanotubes, c'est-à-dire la force (par unité de surface) nécessaire pour induire leur rupture, est comprise entre 30 et 50 GPa [19, 20]. En comparaison, les fibres commerciales les plus résistantes produites à ce jour sont des fibres de carbone dont la contrainte à la rupture est de 6.4 GPa (Toray T1000G®) [21].

1. 5. 2. Propriétés électriques

Il existe de nombreux types de nanotubes chiraux (Figure 1. 5. (c), qui sont définis selon l'enroulement du feuillet de graphène. Selon ce dernier, les nanotubes présentent donc une variété de conformations différentes. Ces conformations ont une forte influence sur les propriétés électriques des nanotubes puisqu'ils peuvent avoir un comportement semi-conducteur ou métallique selon leur diamètre et leur hélicité [15]. Des calculs théoriques montrent ainsi que les nanotubes de type armchair sont exclusivement métalliques, alors que les nanotubes chiraux ou ceux de type zigzag peuvent être métalliques ou semi-conducteurs selon le mode d'enroulement du feuillet de graphène.

La bonne conductivité électrique des nanotubes de carbone combinée à leur grande surface spécifique [15] a un intérêt pour le développement de matériaux antistatiques voire de matériaux de blindage électromagnétique. Les nanotubes de carbone ont une résistivité électrique relativement faible ($\sim 10^{-4}$ Ohm.cm contre 10^{-6} Ohm. cm pour le cuivre) de sorte qu'ils pourraient être potentiellement utiles pour l'amélioration de la conductivité de matériaux composites.

1.6. La mise en suspension des nanotubes de carbone

Il existe différentes voies de dispersion des nanotubes de carbone, entraînant plus ou moins de modifications de leurs propriétés intrinsèques.

Historiquement, la première voie explorée pour disperser les nanotubes de carbone consiste à appliquer des ultrasons en solvant organique [22], mais les taux de nanotubes dispersés par cette méthode restent faibles et les puissances d'ultrasons à fournir endommagent fortement les nanotubes. Les espoirs se sont donc tournés vers la modification de la surface des nanotubes afin de les rendre plus compatibles avec certains solvants [23]. Il s'agit vraisemblablement d'une voie d'avenir, notamment pour des applications dans le domaine des capteurs ou des biocapteurs, mais bien que très riche, elle demeure difficile à mettre en œuvre. De plus, la modification chimique des nanotubes peut également affecter et dégrader leurs propriétés.

Mais les NTC bruts de synthèse sont hydrophobes, s'agglomèrent et sédimentent rapidement dans l'eau et la plupart des solvants. Alors leur mise en suspension est réalisée par l'ajout d'un tensioactif (qui peut être un polymère) selon l'utilisation des NTC.

De nombreuses études recensent l'utilisation de tensioactifs, mais de nombreux composés présentent une capacité à s'adsorber à la surface des nanotubes. Nous pouvons par exemple citer l'enroulement de certaines chaînes de polymères di-blocs [24] ou encore la cristallisation de protéines telles que la streptavidine [25] autour des nanotubes. Elle nécessite cependant l'application d'ultrasons pouvant affecter la taille des nanotubes [26].

Les agents dispersants, comme les agents tensio-actifs, ont été utilisés pour disperser les particules fines des matériaux hydrophobes en solution aqueuse [27]. En général, il y a trois principes pour la dispersion des particules fines dans l'eau: La répulsion entre les particules avec leur potentiel zêta, l'encombrement stérique de la couche d'adsorption, la réduction des liaisons hydrophobes entre les particules dispersées.

Les nanotubes de carbone sont généralement trop longs pour être dispersés dans une solution et n'ont pas de groupes bien définis de la fonction chimique pour être modifiée. Les tensio-actifs peuvent influencer l'interface des particules en suspension à moyen et à prévenir l'agrégation sur de longues périodes. Cependant, la façon dont la dispersion des nanotubes de carbone à l'aide des molécules de surfactant n'est pas encore claire. Il est essentiel d'avoir une connaissance plus complète du mécanisme de dispersion [27].

Dans une procédure typique de la dispersion, après que le tensioactif a été adsorbé sur la surface des nanotubes, l'application des ultrasons pendant quelques minutes ou quelques heures (avec la sonde ou le bain ultrasons, respectivement) peuvent aider un tensio-actif à disperser des nanotubes par des répulsions stériques ou électrostatiques. Des rapports récents [28] montrent que, conformément à cette procédure, les nanotubes ultrapériphériques dans un faisceau sont traités plus que les tubes les plus proches et que les nanotubes restent majoritairement regroupés après que le tensioactif soit ajouté. Par conséquent, l'exfoliation mécanique des faisceaux avant le traitement de surface doit se produire afin d'obtenir des nanotubes de carbone individuels.

Un mécanisme d'isolement des nanotubes à partir d'un faisceau (Figure 1. 7), avec la combinaison d'ultrasons et le tensioactif d'adsorption, est proposé [28]. Le rôle du traitement par ultrasons est susceptible de fournir un fort cisaillement local, en particulier à l'extrémité du faisceau de nanotubes (2). Une fois des espaces ou des interstices des extrémités du faisceau sont formés, ils sont reproduits par adsorption de tensioactif (3), en fin de compte, la séparation des nanotubes individuels du faisceau (4).

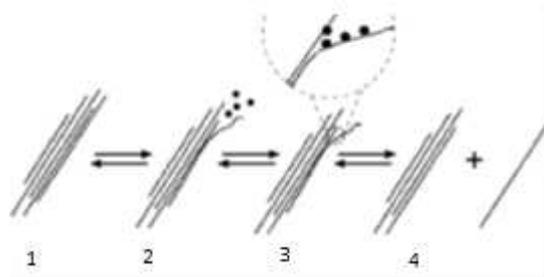


Figure 1. 7: Mécanisme de l'isolement de nanotubes à partir d'un faisceau obtenu par la stabilisation aux ultrasons et un tensioactif

Connaissant la charge de surface des nanotubes de carbone dans les différents milieux est absolument essentiel pour comprendre le mécanisme d'interaction (adsorption) avec les tensio-actifs ioniques, et à prévoir la stabilité colloïdale de solution des nanotubes. Tandis l'analyse du potentiel zêta de MWNTs a montré que les tubes sont chargés négativement dans l'eau [29], certains groupes ont démontré la puissance insuffisante de la dispersion du tensio-actif anionique SDS en raison des répulsions de charge, tandis que d'autres ont rapporté sur la dispersion colloïdale uniforme de nanotubes de carbone avec le SDS.

L'effet de la tête du groupe chargé a été étudié pour différents nanotubes de carbone à base de systèmes, ne révélant aucune conclusion claire sur la supériorité de l'un des tensioactifs cationiques ou anioniques dans la dispersion des tubes. Il semble que le mécanisme d'adsorption des tensioactifs ioniques, qui est favorisé par des interactions électrostatiques avec la surface de NTC, est largement contrôlé par le procédé de purification et de fonctionnalisation de paroi du tube, qui à son tour de déterminer sa charge de surface. Les structures d'auto-assemblage (hemicylindres) de tensioactifs non ioniques adsorbés sur des

surfaces de graphite ont été indiquées pour former l'alignement étroit avec l'axe de symétrie de graphite. Par analogie avec le modèle d'épitaxiale d'adsorption sur le graphite. Différents mécanismes d'adsorption des molécules tensioactives à la surface des SWNTs sont proposés. Les tensioactifs peuvent encapsuler les nanotubes (Figure 1. 8(a)), s'adsorber de manière semi-micellaire sur la surface des SWNTs (Figure 1. 8(b)) ou s'adsorber de manière aléatoire (Figure 1. 8(c)) [29].

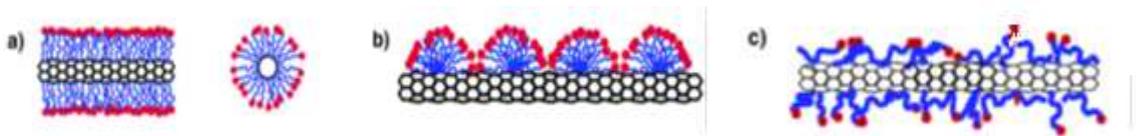


Figure 1. 8: Représentations schématisques du mécanisme d'adsorption des Tensioactifs à la surface des nanotubes de carbone: (a) les SWNTs sont encapsulés dans des micelles cylindriques ; (b) des demi-micelles s'adsorbent sur les SWNTs ; (c) adsorption aléatoire des tensioactifs sur les SWNTs.

Récemment, *Pénicaud et al.* synthétisent des sels de nanotubes en faisant réagir les nanotubes avec un sel réducteur [30]. Les nanotubes se retrouvent chargés en surface, ce qui permet de les solubiliser sans utilisation de tensioactifs. Cette méthode appelée « dissolution douce », présente l'avantage de permettre l'obtention de nanotubes non modifiés, que ce soit par l'utilisation d'ultrasons ou par l'ajout de tensioactifs. Cependant, elle nécessite un milieu non oxydant et donc une absence complète d'humidité.

Dans le cas de la mise en suspension de NTC hors applications biologiques, le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) et le Sodium Dodecyl benzène Sulfonate (SDBS) [31], sont les tensioactifs les plus employés. Cependant ils présentent une toxicité non négligeable [31]. Ne peuvent donc pas être envisagés dans le cas d'études de toxicité ou d'écotoxicité. De nombreux tensioactifs utilisés pour les tests de toxicité sont décrits dans la littérature tels que des polymères), le Tween® 20, 60 et 80 [32], des peptides [33], des protéines [34], des tensioactifs cationiques (chlorures) [35].

Dans le contexte de l'étude de l'écotoxicité des NTC, le fait de disposer de suspensions stables et homogènes permet l'amélioration des conditions d'exposition et la reproductibilité des expériences. Ceci permet aussi de décrire les suspensions en termes de concentration en NTC. Surtout, nous supposons que nous pourrions ainsi avoir accès aux effets biologiques spécifiques dus à la dimension nanométrique de l'objet évalué.

Afin d'étudier les effets toxiques et écotoxiques potentiels des NTC, il est donc indispensable de travailler avec des tensioactifs non toxiques, ou du moins sans effet toxique à la concentration à laquelle il est nécessaire de les mettre en œuvre pour stabiliser les suspensions de NTC. Dans le cas particulier des études écotoxicologiques, nous nous attacherons tout particulièrement à utiliser, le cas échéant, des tensioactifs naturels ou tout au moins susceptibles d'être présents dans les milieux naturels, de façon à prendre en compte le comportement des NTC en présence de ces molécules. De plus, les NTC agglomérés et les NTC dispersés ne devraient pas avoir le même comportement vis-à-vis du vivant et donc a priori pas la même réponse en termes de toxicité et d'écotoxicité [36].

CHAPITRE 02

LA TOXICITE ET L'ECOTOXICITE

2. 1. Introduction

La présence de substances non naturelles dans l'environnement est en augmentation proportionnellement avec leur utilisation par l'Homme. Ainsi le développement des nanotechnologies dans différents domaines tel que la médecine, l'informatique et l'automobile ...etc, et de leurs utilisations, aura très certainement pour conséquence une augmentation de la concentration en nanoparticules dans l'air, les eaux et les sols. Ils pourront donc atteindre les écosystèmes. Des études commencent à montrer l'impact que pourrait avoir les nanoparticules sur l'environnement, mais actuellement il est difficile de savoir si les nanoparticules peuvent poser un problème pour l'environnement à court ou à long terme. C'est pourquoi l'Union Européenne préconise le principe de précaution en ayant adopté un code de bonne conduite pour une recherche responsable en nanosciences et nanotechnologies [37].

Les rapports publiés à ce jour ont pour but d'informer sur le fait que les nanoparticules sont des objets nouveaux et que les données concernant leurs effets potentiels sur la santé et l'environnement sont rarement répertoriés [38, 39, 40, 41, 42] ou lacunaires. Les trois voies d'exposition les plus courantes sont : les voies respiratoires (particules en suspension dans l'air), la voie dermique (contact) et la voie digestive (bien que l'inhalation et l'ingestion soient partiellement reliées).

Les NTCs représentent une grande famille de nanomatériaux. Les échantillons de NTC étudiés sont de type monoparoi, biparoi ou multiparoi; ils peuvent être synthétisés par les différentes voies décrites précédemment (chapitre 1), le catalyseur utilisé peut avoir une composition très variable. Les NTCs peuvent subir des traitements post-synthèse (purification, fonctionnalisation, mise en suspension). Il y aura à prévenir autant de toxicité et d'écotoxicité que de types de NTC.

2. 2. La toxicité

L'étude des effets biologiques des nanotubes de carbone promet d'être une tâche lourde et complexe, en raison de la diversité des caractéristiques (taille, forme, état de surface, fonctionnalisation, *etc.*) des nanotubes existants, qui peuvent influencer leurs effets biologiques. De nombreux articles ont été publiés au sujet de la toxicité des NTC.

Pantarotto *et al.* ont étudié le transport intracellulaire de SWCNTs sur des fibroblastes de quatre humains et de souris *in vitro* (1 ; 5 et 10 μM). Ils ont démontré que ces particules peuvent traverser la membrane cellulaire (par diffusion), s'accumuler dans la cellule et se retrouver dans le noyau de la cellule [43].

Chez le lapin, 24 h après injection intraveineuse (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de masse corporelle) de SWCNTs bruts, Cherukuri *et al.* n'ont observé des concentrations significatives de SWCNTs que dans le foie (parmi les 12 organes analysés dont le cerveau, le coeur et les reins) [44].

Contrairement, dans une autre étude chez la souris exposée par injection intraveineuse (60 μg) à des SWCNTs radiomarqués et fonctionnalisés, les auteurs ont observé que les SWCNTs n'étaient retenus dans aucun organe du système réticulo-endothélial (foie, rate) au bout de 24 h [45].

En utilisant le dosage du nickel (0,53 % de la masse totale des NTCs) présent dans les MWCNTs, d'autres auteurs ont montré que les MWCNTs ne traversent pas significativement la barrière épithéliale pulmonaire mais sont toujours présents dans les poumons 6 mois après une administration intratrachéale chez le rat [46].

En utilisant le dosage du cobalt présent dans les MWCNTs, Ellinger-Ziegelbauer *et al.* ont rapporté une demi-vie d'élimination pulmonaire de 60 ou 140 jours chez le rat après une période d'inhalation par le nez de 6 h (respectivement 11 ou 241 mg/m^3) [47].

Magrez *et al.* ont exposé trois lignées cellulaires de tumeur du poumon humain : H596 (adénocarcinome épidermoïde), H446 (cancer à petites cellules) et Calu-1 (cellules de cancer pulmonaire ayant métastasé à la plèvre) à des MWCNTs en comparaison avec des nanofibres de carbone et du noir de carbone. Ils ont remarqué une diminution de la viabilité des trois types de cellules exposées (due à une condensation de la chromatine près de la membrane nucléaire ainsi qu'à une rétractation du cytoplasme conduisant à une perte de contact entre les cellules) dépendante de la dose de MWCNTs (0,002 à 0,2 µg/mL pendant 4 jours). À noter que le noir de carbone a entraîné la plus forte toxicité et que cette dernière était dépendante de la taille des particules (noir de carbone > fibre de carbone > MWCNTs). Les auteurs ont souligné ainsi que les NTCs ont été moins toxiques que les particules de noir de carbone dans leurs études [58], alors qu'une situation inverse a été observée dans d'autres études [80]. Les auteurs ont également remarqué que la cytotoxicité augmentait quand la surface des particules était fonctionnalisée après un traitement acide [48].

Dans une étude *in vitro* de Shvedova, les SWCNTs ont causé une diminution significative de la viabilité cellulaire et des biomarqueurs du stress oxydant (ex. réserve des antioxydants) avec une relation dose-réponse, ainsi qu'une augmentation significative des peroxydes lipidiques sur les kératinocytes épidermiques humains (0; 0,06; 0,12 et 0,24 mg/mL de SWCNTs pendant 18 h). Les auteurs ont mentionné dans leurs résultats que l'exposition aux SWCNTs non purifiés peut conduire à une augmentation de la toxicité cutanée chez les travailleurs exposés [49].

Manna *et al.* ont étudié la toxicité de SWCNTs sur des keratinocytes humains. Les résultats ont montré une augmentation du stress oxydant et l'inhibition de la prolifération cellulaire suite à des expositions à des concentrations de 0,5 à 10 µg/mL pour des périodes de 12 à 72 heures, de même qu'une diminution de dose-dépendante de la viabilité cellulaire. Les résultats obtenus suggèrent que les SWCNTs activent le facteur de transcription NF-κB des kératinocytes de façon dose-dépendante et que le mécanisme d'activation serait relié à l'activation de kinases due au stress oxydant. L'expression de protéines actives conduirait à une réponse inflammatoire [50].

Murr *et al.* ont comparé la toxicité de SWCNTs et de deux types de MWCNTs sur des macrophages alvéolaires de souris. Le chrysotile 22 et le noir de carbone 23 ont été utilisés comme contrôles. Les cellules ont été exposées à des concentrations allant de 0,005 à 10 µg/mL pendant 48 heures. Toutes les particules ont induit une mort cellulaire et ceci à partir de 2,5 µg/mL. La diminution de la viabilité entraînée par les NTCs est dépendante de la dose, et similaire à celle observée avec le chrysotile. Le noir de carbone a été légèrement moins toxique que les NTCs et le chrysotile [51].

Bottini *et al.* ont montré que 400 µg/mL de MWCNTs pouvait entraîner une augmentation massive des cellules (lympocytes T) en apoptose [52].

Zhu *et al.* ont montré que les MWCNTs pouvaient induire l'apoptose chez des cellules souches embryonnaires de souris et activer l'expression du gène suppresseur de tumeur de la protéine P53 au bout de 2 h d'exposition [53].

Kisin *et al.* n'ont pas observé de micronoyaux dans des fibroblastes de hamster exposés à différentes concentrations de SWCNTs pendant 24 heures [54].

En revanche, Lindberg *et al.* ont observé une augmentation significative du pourcentage de cellules humaines BEAS 2B exposées à des SWCNTs présentant des micronoyaux, mais après un délai de 48 heures. Aucun effet n'a été observé après 24 heures [55].

De même, Migliore *et al.*, en employant une lignée de macrophages murins transformés, ont observé une augmentation dose-dépendante du pourcentage de cellules avec micronoyaux, à partir d'une concentration de 0,10 µg/mL de SWCNTs [56].

Pacurari *et al.* ont exposé des cellules mésothéliales humaines à des SWCNTs. Ils ont montré que les SWCNTs génèrent des espèces réactives de l'oxygène (ROS), augmentaient la mort cellulaire, les dommages à l'ADN [57].

Les études expérimentales menées sur la souris, le rat et le cochon d'Inde ont montré que l'administration de SWCNTs ou de MWCNTs par instillation intratrachéale pouvait provoquer une inflammation, des granulomes au niveau des poumons, de la fibrose, voire même la mort. Les morts observés, du moins dans deux études sur trois, ont été attribuées à un encombrement mécanique des voies respiratoires supérieures [58, 39].

Une étude réalisée sur des souris exposées par voie intrapéritonéale à des MWCNTs a mis en évidence des effets génotoxiques (augmentation significative dose-dépendante d'aberrations chromosomiques structurales, de micronoyaux et de cassures de l'ADN) dans les leucocytes circulants et / ou les cellules de la moelle osseuse [59].

Il s'avère que le test de cytotoxicité utilisé dans les premières études est faussé par les NTC [60, 61]. En réalité la perte de viabilité cellulaire apparaît le plus souvent pour des concentrations supérieures à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et pour des temps d'exposition de un voir plusieurs jours. Cette perte de viabilité cellulaire pourrait être en partie due à de l'apoptose.

2. 3. L'écotoxicité

A ce jour, très peu d'études ont été menées afin d'évaluer les effets des NTCs sur les écosystèmes et les espèces qui les peuplent.

2. 3. 1. Ecotoxicité du milieu aquatique

La toxicité des SWCNTs a été testée sur des algues et des crustacés sans observer des effets significatifs à des concentrations de $100 \mu\text{g/mL}$. L'absence de toxicité est principalement expliquée par la formation dans l'eau naturelle utilisée pour disperser les SWCNTs, de larges particules qui sédimentent rapidement. *Les nanotubes ne sont donc pas suffisamment dispersés en solution pour exercer leur effet écotoxique potentiel* [62].

En revanche, dans une étude avec des MWCNTs oxydés et dispersés dans une solution de Tween 20, une immobilisation de la daphnie (*Daphnia magna*) a

été observée à la concentration maximale utilisée (16 µg/mL), sans effet attribuable au Tween 20.

Les embryons du *Danio rerio* exposés au même produit ont vu une mortalité entre 35 et 45 % à toutes les doses testées (3-16 µg/mL). Toutefois, le Tween seul est responsable d'une mortalité des embryons à hauteur de 20 %. La dérégulation de l'expression des certains gènes (identifiés comme biomarqueurs des processus biologiques liés aux réponses à l'exposition aux agents toxiques) a été observée. Les auteurs de cette étude n'excluent pas un effet possible des contaminants (catalyseurs) sur la mortalité et la mobilité des deux espèces étudiées [63].

D'autre part, dans une étude comparative entre les SWCNTs et des nanoparticules d'oxyde de titane, les nanotubes n'ont pas montré des effets évidents sur la viabilité du ver *Arenicola marina* lorsqu'ils ont été mélangés aux sédiments présents dans les estuaires où ce type d'organisme vit habituellement [64].

Les effets de toxicité aiguë (mortalité), chronique (croissance) et génétique ont principalement été étudiés chez les organismes modèles. En parallèle et dans certains cas, la spectroscopie Raman a été utilisée pour confirmer la présence des DWNTs dans les organismes exposés [65].

Globalement, les premiers résultats obtenus montrent l'importance de disposer de protocoles spécifiques à l'étude de ces matériaux à l'échelle nanométrique ainsi que la grande diversité des réponses biologiques liée, entre autre, à l'état physico-chimique des nanoparticules étudiées.

Les premiers effets significatifs (mortalité et inhibition de croissance) sont observés chez les organismes exposés à partir de 10 mg/L. Des effets modus sur la croissance sont observés chez les organismes exposés en présence de DWNT dispersés. Il semble que la toxicité observée puisse s'expliquer par des effets mécaniques (perturbation des échanges gazeux au niveau des branchies, perturbation du transit intestinal et de la digestion), qui ne seraient pas forcément liés à des effets intrinsèques des DWNTs (le franchissement de la barrière intestinale n'a par exemple pas été mis en évidence).

Tableau 2. 1: Tableau récapitulatif des effets néfastes des nanotubes de carbone sur différents organismes [66]

Type de particule	concentration	Temps d'exposition	Organisme testé	Effet	
le carbone contenant des fullerènes C60 filtrée en suspension dans du tétrahydrofurane	0.5–1 mg mL ⁻¹	48 h	Micropterus salmoides	Peroxydation lipidique importante	
	260 µg L ⁻¹	60 min	Daphnie magna	Augmentation de la fréquence de saut, le mouvement et le rythme cardiaque appendice	
C60 (préparé avec du benzène et d'acétone)	1.5 mg L ⁻¹	96h	Danio rerio	Embryon retardée et développement larvaire, une diminution des taux de survie et éclosion	
nanotubes de carbone	MWCNTs	>1 mg L ⁻¹	5j	Stylonychia mytilus	L'inhibition de la croissance
		0.5–5mg rat ⁻¹	3 – 15j	rat	Génération de collagène riche en granulomes
	SWCNTs	0.1–0.5mg L ⁻¹	>10 j	Oncorhynchus mykiss	Effets du stress oxydatif liés, augmentation du taux de de ventilation, les pathologies des branchies et des sécrétions de mucus
		0.1–0.5 mg souris ⁻¹	7–90 j	souris	La perte de poids, des lésions pulmonaires, nécrose, les macrophages et les granulomes, une inflammation intestinale et péribronchiques

2. 3. 2. Ecotoxicité des NTC sur les plantes

Une étude plus récente a concerné l'impact de MWCNTs et d'autres nanoparticules (Ag, Cu, ZnO, Si) sur la germination de graines et l'élongation de racines du *Cucurbita pepo* (courgette). Les nanotubes étaient mis en suspension en absence ou en présence d'un tensioactif, le sodium dodécyl sulfate (SDS). La présence de SDS seul (contrôle) réduit déjà la germination, mais aucune influence additionnelle n'a été observée après l'ajout des différentes nanoparticules, exception faite des nanoparticules de silice. En absence de SDS, les MWCNTs et les autres nanoparticules n'ont pas d'impact sur la germination. L'effet phytotoxique est donc imputé au SDS. Le traitement des graines du *Cucurbita pepo* avec ces mêmes nanoparticules, avec ou sans SDS, ne modifie pas la vitesse de croissance et la longueur des racines. D'autre part, après 15 jours d'essai, la biomasse des plantes exposées aux MWCNTs a été réduite de 60 % par rapport aux plantes contrôles. Ceci indique probablement que les tests de phytotoxicité, comme l'analyse de la germination et de la croissance de racines, ne sont pas suffisamment sensibles ou appropriés [67].

Les SWCNTs ont affecté significativement l'élongation des racines, de la tomate, le chou, la carotte et la laitue, mais ont favorisé la croissance de l'oignon et de concombre dans les 24 à 48 h [68].

La tomate (*Lycopersicon esculentum*) a montré le plus haut degré de sensibilité aux SWCNTs : parmi les six espèces testées. Les chercheurs ont montré que les NTCs fonctionnalisés ont montré différents comportements toxiques, mais étaient généralement moins toxiques que les NTCs non-fonctionnalisés. Cependant, le mode de fonctionnalisation des NTCs n'a pas été précisé. Néanmoins, ce travail a mis en évidence l'importance des propriétés de surface des nanotubes de carbone dans la détermination de leur phytotoxicité.

Une étude a montré l'absence d'effet chez les plantes supérieures (radis, colza, ivraie, laitue, maïs et concombre) cultivées en présence de MWCNTs en termes de germination des graines et de croissance racinaire [69].

Une étude comparative de la toxicité du fullerène C60 et des DWCNTs vis-à-vis du ver de terre *Eiseniaveneta* (contamination via la nourriture) a montré une influence sur le taux de reproduction à partir de 37 mg DWCNT / kg de nourriture. Le taux de reproduction a été identifié comme étant le paramètre le plus pertinent (pas d'effet sur l'éclosion, la survie ou la mortalité en dessous de 495 mg de DWCNT / kg de nourriture et de 1 000 mg de C60 / kg de nourriture) [70].

Une étude en 2009 a montré que les SWCNTs ont la capacité de traverser la paroi des cellules des plantes. La cytotoxicité éventuelle n'a pas été établie, mais cette étude a mis en évidence *le potentiel des SWCNTs comme transporteurs des molécules dans les cellules végétales* [71].

Une étude *in vitro* sur les cellules d'*Arabidopsis* T87 a montré que des NTC multi paroi sous forme d'agrégats de tailles différentes produisent des effets toxiques en fonction du diamètre moyen des agrégats. Les différents agrégats sont en général toxiques, mais les échantillons de NTC multi paroi les moins agrégés, renfermant probablement des nanotubes individuels, se sont montrés les plus toxiques. Ils diminuent la viabilité cellulaire, la quantité de chlorophylle, l'activité de l'enzyme superoxide dismutase et la matière sèche en fin d'essai. Une hypothèse sur les effets toxiques des NTCs sur ce type de cellules envisage l'induction de signaux d'hypersensibilité par les NTCs multi paroi. A des doses élevées ces signaux induiraient la mort cellulaire [72].

CHAPITRE 03

GENERALITES SUR LE HARICOT

3.1. Origine et Historique du haricot

Le haricot *Phaseolus vulgaris* L. est originaire de L'Amérique centrale (Mexique, Pérou) d'après plusieurs auteurs [73], [74] alors que selon [75], il est originaire d'Amérique du Sud de sa zone tropicale de moyenne montagne. Sa domestication date de plus de 9700 ans. De nos jours, il a une importance considérable, en particulier en Amérique du Sud et en Afrique. L'espèce est bien établie dans de nombreux pays africains où elle a été introduite par les Portugais au XXème siècle, et c'est dans la région des Grands Lacs d'Afrique centrale que sa culture est la plus intensive [76], [77].

3. 2. Caractéristiques botaniques de l'espèce

Le haricot *Phaseolus vulgaris* L. est une plante annuelle herbacée appartenant à:

- **ORDRE** : Rosales
- **FAMILLE** : Leguminosae
- **SOUS- FAMILLE** : Papilionoidae
- **TRIBU** : Phaseoleae
- **SOUS- TRIBU** : Phaseolinae
- **GENRE** : Phaseolus
- **ESPECE** : Phaseolus Vulgaris

La figure ci-après illustre la plante d'haricot



Figure 3.1 : L'espèce *Phaseolus vulgaris* L. (a): tiges, feuilles et fleurs de l'haricot; (b): feuilles et gousses. [78]

Il existe deux types botaniques:

- variété ***communis*** L., appelé haricot à rames, à tige rectangulaire et à croissance indéterminée (2 à 3m de hauteur). [79]
- variété ***nanus*** L., appelé haricot nain, à tige cylindrique et à croissance déterminée et dressée (30 à 50cm de hauteur)

3. 2. 1. Les graines

Les graines de haricot peuvent présenter des formes, des couleurs et des consistances variables [73]. Selon [80], les graines peuvent être blanches, roses, noires, marrons ou violettes. Elles sont rondes uniformes, cylindriques ou ovales.

3. 2. 2. Les racines

La racine principale n'est pas dominante et sa croissance peut être facilement stoppée par les obstacles du sol. Les racines latérales sont nombreuses et ont un développement qui dépasse par la suite la longueur de la racine principale.

En conditions moyennes, les racines atteignent 15 cm de profondeur au stade de la 3^{ème} feuille trifoliolée et dépassent 30cm en début de floraison [81].

3. 2. 3. La tige

La tige du haricot est herbacée, parfois lignifiée à la base. Suivant le port de la tige, on distingue des formes naines et des formes hautes à rames [82]. Elle est angulaire, mince et volubile chez les variétés à rames, pouvant atteindre jusqu'à 3 mètres de hauteur, et de 20 à 40 cm chez les variétés naines, de couleur verte ou violacée vide à l'intérieur et d'un diamètre supérieur à 4mm [80].

3. 2. 4. Les feuilles

Les deux premières feuilles présentent des limbes simples, cordiformes [83], alors que les autres sont composées de trois folioles, pointues à leurs extrémités et arrondies à la base, disposées de façon alternées.

3. 2. 5. Les fleurs

Elles sont papilionacées de type cinq, de couleur blanche, mauve, crème ou rose, l'androcée formée de dix étamines (9 soudées et 1 libre) et le gynécée formé d'un ovaire, style et stigmate.

La floraison débute 28 à 35 jours après le semis, suivant les conditions du climat, du sol ainsi que la variété cultivée [84]. Elle dure de 15 à 20 jours pour les variétés naines, de 30 à 80 jours pour les variétés à rames [85].

3. 2. 6. Les fruits

Le fruit du haricot est une gousse charnue, comestible qui se dessèche et se lignifie par la suite et chaque gousse renferme de 5 à 8 graines [86]. Les gousses sont droites ou arquées, à section aplatie, elliptique ou arrondie, selon les cultivars [83]. Leur couleur est très variée, allant du vert foncé au vert pâle ou bien violet ou même maculée de violet, (Haricot verts panachés). Il existe aussi un groupe de haricots appelés beurre qui se caractérisent par la couleur jaune plus ou moins claire de la gousse [83]. La longueur du fruit varie en fonction du nombre et de l'espacement des graines, [87]. D'après [79]; un fruit atteint de 8 à 10 cm de longueur et renferme 4 à 10 graines. Selon [88], les gousses ont une moyenne de 11cm de longueur, et 1.1cm de largeur.

3. 3. Phases végétatives

Le cycle végétatif du haricot comprend les phases suivantes :

3. 3. 1. Phase de germination

Les graines lèvent en 4 à 8 jours suivant la température. Elles doivent toutes être sorties de terre au bout de 8 jours. Un à deux jours après l'apparition des crosses, les cotylédons sortis du sol, se sont ouverts et la première paire de feuilles apparaît

3. 3. 2. Phase de croissance

Trois à quatre jours après la levée, les cotylédons commencent à se faner." 5 à 6 jours après la levée apparaît la première feuille trifoliolée. 5 à 6 jours après l'apparition de la première feuille trifoliolée apparaît la deuxième.

Au bout d'un mois, le pied du haricot possède une dizaine de feuilles trifoliolées et il a atteint sa hauteur définitive de 30 à 40 cm pour les variétés naines.

3. 3. 3. Phase de floraison

Elle débute 3 semaines à 1 mois environ après le semis. Elle dure 1 mois à 1 mois et demi suivant les conditions climatiques. La jeune gousse met une douzaine de jours environ pour atteindre sa taille définitive.

3. 3. 4. Phase de maturation

Une fois la taille définitive atteinte, les graines se forment en 15 -20 jours. Il faut attendre encore 20 à 30 jours pour que les gousses s'ouvrent d'elles-mêmes, les graines étant mûres. Le cycle végétatif complet du haricot est en moyenne de :

" 75 à 80 jours pour le haricot vert

" 90 à 100 jours pour le haricot demi-sec

" 120 à 130 jours pour le haricot sec.

3. 4. Valeur Nutritionnelle

Le grain de haricot est moins riche en protéines que le soja (38 - 40%) mais se classe honorablement avec environs 24% avant le pois ou la fève.

Le tableau ci-après présente la composition du haricot vert

Tableau 3.1: Composition du haricot vert (teneurs pour 100 grammes). [85]

composants		minéraux		Vitamines	
Energie (cal)	30	Calcium (mg)	56	Provitamine A	0,34
Eau (g)	90	Chlore (mg)	19	Vitamine B1	0,08
Fibre(g)	3	Fer (mg)	01	Vitamine B2	0,1
Glucides(g)	4,6	Magnésium (mg)	28	Vitamine B5	0,9
Protides(g)	2,4	Phosphore (mg)	38	Vitamine C	16
Lipides(g)	0,2	Soufre (mg)	47	Vitamine E	0,24

Selon [89], la graine possède une grande valeur alimentaire. Elle renferme:

* Eau.....12.5 g.

* Matières azotés.....22.5 g.

* Matières hydrocarbonées.....5 g.

* Matières grasses 3 g.

* Divers..... 3 g.

3. 5. Les facteurs de croissance de la plante

3. 5. 1. Les facteurs édaphiques

Les sols les plus indiqués pour la culture du haricot sont ceux à texture moyenne, donc argilo-siliceux, profonds [83], fertiles à pH compris entre 6,5 à 7,5. Voinea et al. notent que le haricot préfère bien les sols peu profonds et bien approvisionnés en eau et en sels minéraux [90].

Les sols destinés à la culture du haricot doivent présenter des caractéristiques générales de perméabilité et un bon état sanitaire et de richesse relative [89].

3. 5. 1. 1. La salinité

Une forte salinité des sols provoque une chute des rendements qui peut atteindre jusqu'à 20 à 25% quand on irrigue avec de l'eau contenant 250 mg/l de Chlore [91]. Les sols les plus propices sont les colluvions, les sols allophanes bien pourvus en matière organique et les vertisols magnésiens, les sols ferrallitiques acides sont les moins appropriés [80].

La salinité a exercé des effets nuisibles non seulement sur la biomasse, mais également sur d'autres paramètres morphologiques tels que la hauteur de la plante, le nombre de feuilles, la longueur des racines [92].

3. 5. 1. 2. Le pH

Le pH optimum se situe entre 6 et 7,5 fourchette qui correspond à l'optimum pour le développement de *rhizobiumphaseoli*, bactérie fixatrice de l'azote de l'air pour le haricot [75].

3. 5. 2. Les facteurs climatiques

3. 5. 2. 1. Température

Les haricots verts sont cultivés en zone tempérée comme en zone tropicale. La température optimale pour sa culture est entre 20°C et 25°C, le zéro végétatif est à 10°C et les fortes chaleurs sont néfastes à la fécondation des fleurs [93]. Les haricots à rames demandent une température un peu élevée que les haricots nains [73]. Sa germination n'est normale qu'au-dessus de 14 à 15°C [83]. Le haricot gèle dès que la température est voisine de - 1 à - 2° C [89].

Tableau 3. 2: Les besoins en température selon les stades de développement. [74]

Stade de développement	germination	croissance végétative	Floraison	Formation des gousses
Besoin en température	20 à 25 °C	15 à 25 °C	15 à 25 °C	>30 °C

3. 5. 2. 2. La lumière

Le haricot est très exigeant en lumière surtout pendant les premières étapes de son développement. Pendant la floraison et la nouaison, la lumière diffusée et une augmentation d'humidité de l'air peuvent favoriser considérablement la qualité des gousses et l'augmentation des rendements [85]. La plante présente une forte sensibilité à l'intensité lumineuse, notamment au moment de la floraison. Une déficience de lumière entraîne l'avortement des fleurs [75].

3. 5. 3. Les facteurs hydriques

Selon [81], du fait que le haricot exige beaucoup de chaleur, l'évapotranspiration est importante, ce qui résulte les besoins très important en eau.

Le tableau ci-après illustre l'influence du manque d'eau sur la production du haricot.

Tableau 3.3: L'influence de la carence hydrique sur la production du haricot [74]

Stade végétative	Levée	Croissance végétative	Floraison	Formation des gousses		
				Grossissement de la gousse	Mangetout, filet	Flageolet ou haricot blanc
Effet d'une carence hydrique	Retard mais surtout irrégularité de levée	Retard de croissance, mais rapide reprise après retour à la normale	Faible incidence sur le rendement mais retard non récupérable	Apparition précoce des grains ; perte de qualité ; réduction de la densité des gousses.	Apparition précoce du fil et du parchemin.	Réduction possible du nombre de grains par gousse.
Niveau du préjudice	Important : culture hétérogène	Faible incidence sur le rendement mais retard non récupérable	Très important : réduction du nombre des gousses et tendance à l'augmentation du calibre	Important sur rendement pondéral et qualitatif.	Perte importante sur la valeur commerciale.	Sans effet noté sur poids de 1000 graines.

3. 5. 4. D'autres facteurs

Les haricots verts apprécient un apport de potasse et de phosphore, qui doit être fait sous une forme rapidement assimilable (superphosphate, sulfate de potasse), étant donné la brièveté du cycle de culture. Comme toutes les légumineuses, assimilent l'azote de l'air, un apport de 60 à 80 unités d'azote à l'hectare [90].

3. 6. Travaux d'entretien

L'intérêt de ces travaux est de favoriser la levée des plants, d'ameublir le sol et détruire les mauvaises herbes et enfin d'éviter les maladies cryptogamiques et les parasites.

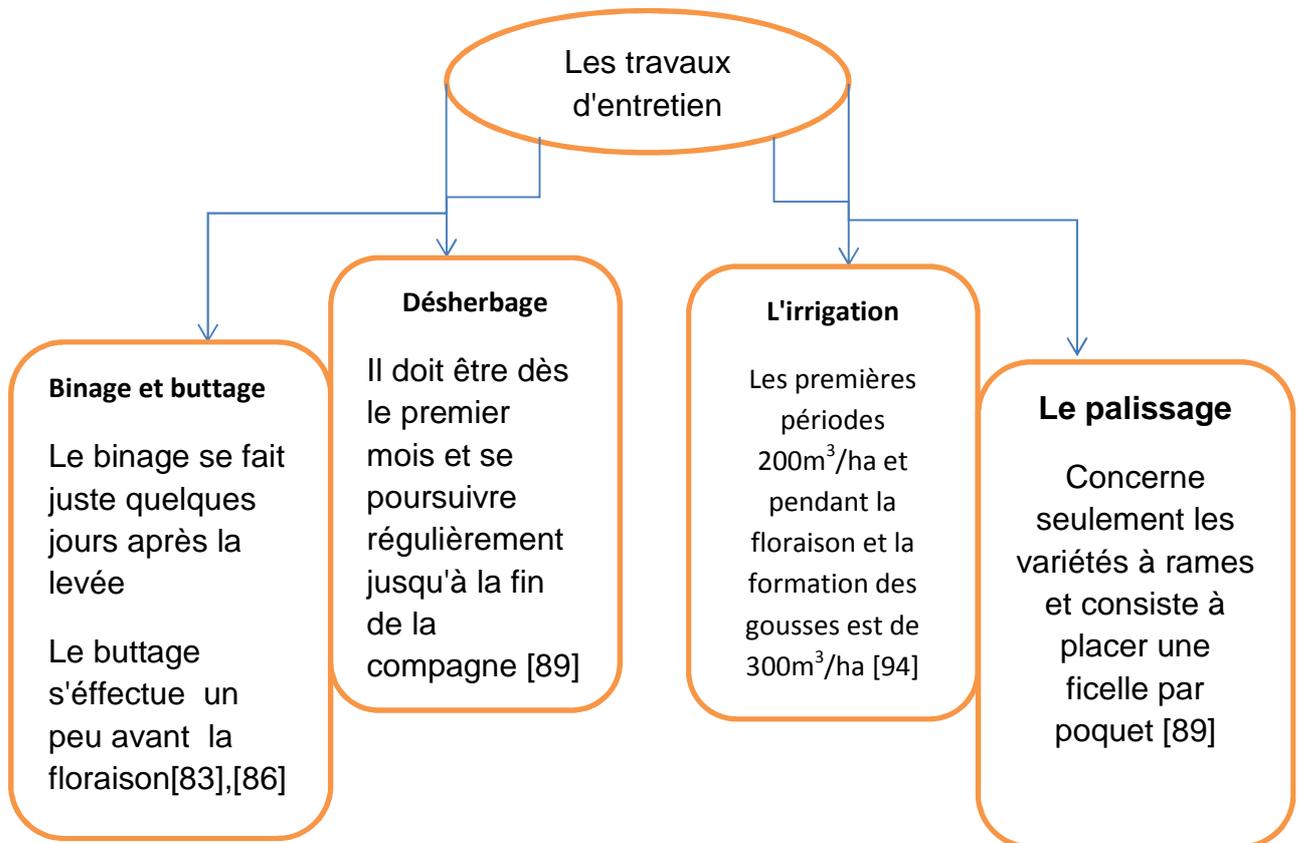


Figure 3. 2. Organigramme des travaux d'entretien

3. 7. Production et importance de l'haricot

La production mondiale de l'haricot vert en 2006 a été estimée à 6.42 millions de tonnes. La surface consacrée à cette production était un peu moins d'un million d'hectares [95].

Le haricot *Phaseolus vulgaris* est une source de protéines diététiques dans beaucoup de pays en développement [96]. Quant au secteur de culture, le haricot représente la troisième plus importante récolte des légumineuses dans le monde [97].

La figure ci-après illustre la production des haricots à travers le monde

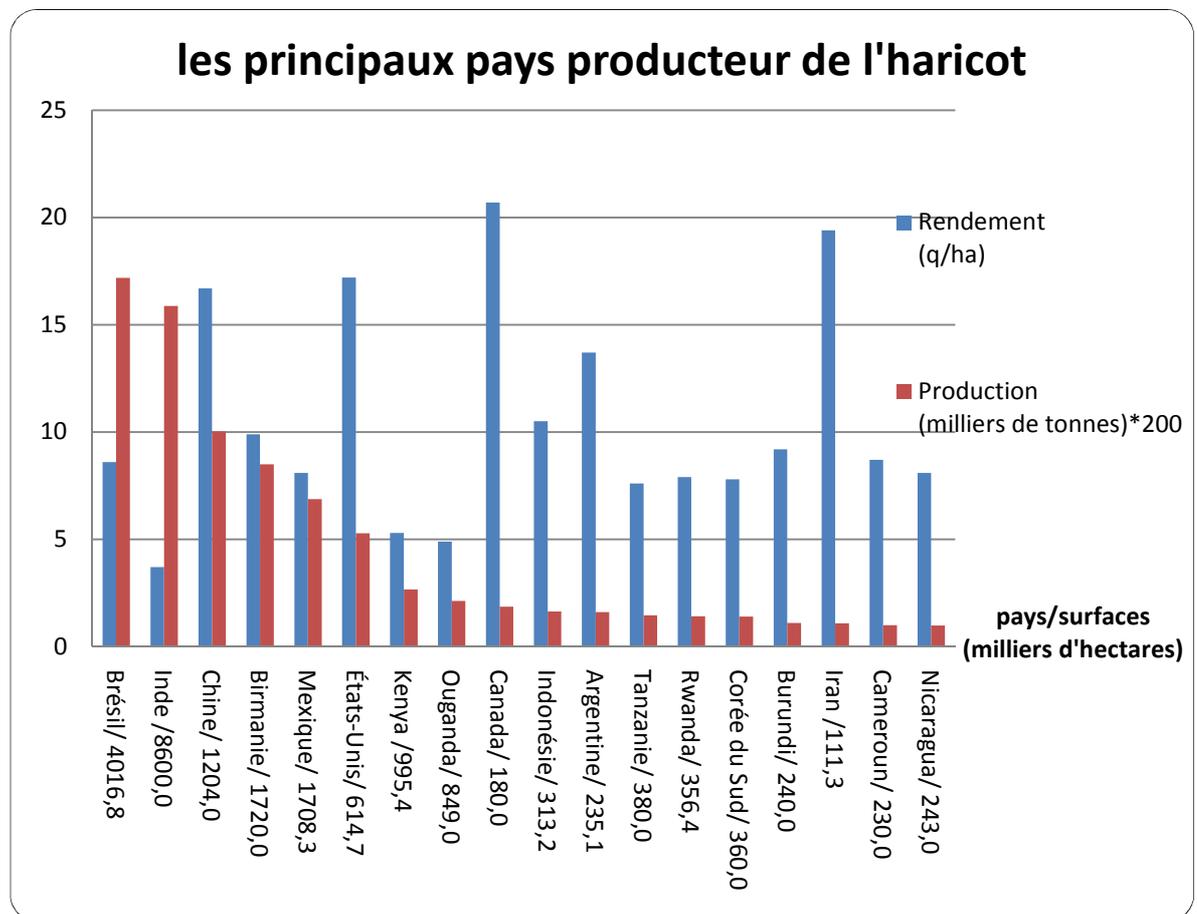


Figure 3. 3 : Principaux pays producteurs de l'haricot

3. 7. 1. La place du haricot en Algérie

Les variétés cultivées en Algérie sont : les haricots à rames et nains (triomphe de farcy, fin de Bagnolet, Arian, processor et contender) [93].

3. 7. 2. La production du haricot en Algérie

Le haricot occupe la 3^{ème} position parmi les légumes par une surface de 14,57%, et ce par rapport à la superficie totale réservée au maraichage. Le haricot est une plante cultivée dans tout le territoire Algérien [78].

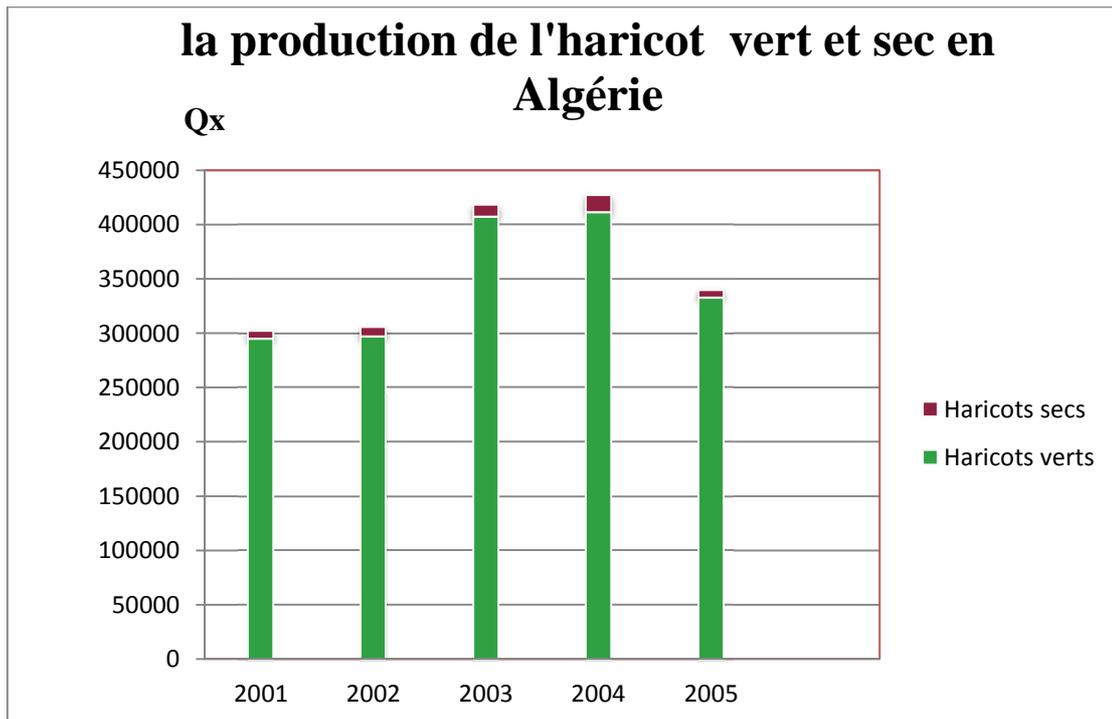


Figure 3.4 : La production de l'haricot vert et sec en Algérie

3. 8. Contraintes liées à la culture et à la productivité du haricot commun

Le haricot commun cultivé est extrêmement sensible aux maladies et aux ravageurs, ainsi qu'aux contraintes édaphiques particulièrement dans les régions tropicales (sols pauvres, températures et humidités relatives trop élevées, favorisant le développement des agents pathogènes) et on estime que plus de 50% de la production est perdue chaque année en Afrique tropicale. Ces maladies et ravageurs sont extrêmement variés. Des sources de résistances ont été identifiées aussi bien dans le pool génique primaire du haricot commun que dans les pools secondaires et tertiaires. Nous citons ici quelques-unes de ces contraintes et quelques gènes de résistance isolés.

3. 8. 1. Les maladies rencontrées chez le haricot commun

La maladie des taches anguleuses des feuilles causée par *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, est très présente dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique Centrale et du Sud, et en Afrique de l'Est et du Centre. C'est la plus importante et la plus répandue des contraintes biotiques qui affectent la production du haricot en Afrique [76]. Des espèces résistantes ont été identifiées dans la collection de *P. vulgaris* du CIAT et aussi à l'intérieur des

espèces *P. coccineus* et *P. polyanthus* qui appartiennent au pool génique secondaire [98], [94].

L'antracnose du haricot est une maladie fongique des semences du haricot commun causée par *Colletotrichum lindemuthianum* Sacc et Magn que l'on retrouve sur toutes les aires de culture de *P. vulgaris* [99].

La pourriture racinaire est causée par un complexe d'agents pathogènes véhiculés par le sol et qui appartiennent aux genres *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Macrophomina*, *Thielaviopsis* et *Aphanomyces* [100]. La pourriture des racines est économiquement importante dans la plupart des régions de cultures du haricot, et surtout dans des régions caractérisées par une faible fertilité des sols [101].

La bactériose à halo est causée par *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolica*. Elle est rencontrée surtout en zone de hautes altitudes, et est favorisée par des basses températures et des pluies abondantes [77]. Neuf souches du pathogène ont été mises en évidence par [102] dont la souche 6 est la plus virulente [103].

3. 8. 2. Les ravageurs

Les mouches du haricot (*Ophiomyia phaseoli* Tryon et *O. spencerella* Greathead) sont des insectes très dommageables du haricot en Afrique et en Asie [104]. Les larves creusent des galeries au niveau des feuilles et des tiges.

Les cicadelles (*Empoasca* spp.) sont des parasites qui se nourrissent des tissus du phloème, transmettent des maladies virales et provoquent des retards de croissance au niveau de la plante [105].

Les thrips sont des ravageurs qui peuvent causer de graves dommages aux plantes non seulement par l'alimentation des larves et des adultes, mais aussi grâce à leur capacité à transmettre des virus de maladies [106].

3. 8. 3. Les contraintes abiotiques

Le terme « stress abiotiques » est un terme général qui comprend de multiples contraintes telles que la chaleur, le froid, la sécheresse, l'excès de lumière, le rayonnement UV-B (rayonnement Ultra-violet de longueur d'onde moyenne entre 315 et 280 nm), l'excès d'eau, la salinité, les blessures occasionnées par les ravageurs et les pratiques culturales, l'exposition à l'ozone, et le choc osmotique ; on estime que 90% des terres arables sont soumises aux

stress abiotiques [81]. Certaines de ces contraintes, telles que la sécheresse, les températures extrêmes et la haute salinité limiteraient fortement la productivité des cultures.

La sécheresse est l'un des principaux facteurs limitant la productivité des cultures dans le monde [107] et les variétés ayant une forte tolérance à cette contrainte sont importantes pour le maintien d'un bon rendement dans les régions où les saisons sèches sont fréquentes.

La salinité du sol peut inhiber la croissance et le rendement du haricot à cause d'une toxicité et d'un déséquilibre ionique, et d'une réduction du potentiel hydrique de la plante [108]. Le haricot commun est extrêmement sensible à la salinité et on estime qu'environ 5 à 30% des zones de production du haricot sont affectées par la salinité du sol [109].

Les hautes températures (> 30°C le jour et > 20°C la nuit) entraînent une réduction du rendement chez le haricot commun à cause d'une transpiration excessive de la plante [75].

Face à toutes ces contraintes biotiques et abiotiques de production du haricot commun cultivé, les chercheurs tentent depuis longtemps d'améliorer cette culture par l'introduction de gènes contrôlant la résistance et la tolérance.

En conclusion, et à l'issue de cette synthèse bibliographique, aucune étude n'a pu aboutir à des informations exactes sur la toxicité des nanoparticules, le champ de recherches reste toujours ouvert.

CHAPITRE 04

MATERIEL ET METHODES

4. 1. Introduction

Dans le cadre d'une démarche "prospective" en écotoxicologie sur les risques éventuels au niveau de l'environnement, il est nécessaire d'évaluer en premier lieu les dangers encourus par les *écosystèmes aquatiques*, receptacles ultimes de toute contamination des milieux. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à une espèce végétale: le haricot commun, exposé au NTC biparois sous forme dispersée. Pour chaque essai, les graines ont été exposées à différentes concentrations de NTC dans l'eau potable. Un témoin négatif (T-, EP seule) et un témoin positif (T+, présence d'un agent dispersant). Les suspensions de NTC de concentrations données sont préparées à partir de la teneur en carbone de la poudre composite dont ils sont issus et en considérant que tout le carbone de l'échantillon est présent sous forme de NTC.

4.2. Objectif de l'expérimentation

L'objectif principal de toute cette présente étude est de mettre en évidence l'influence des nanotubes de carbone et principalement leur effet sur la croissance et le développement des végétaux, dans notre cas le haricot commun.

Les nanotubes de carbone, après synthèse se présentent sous forme d'agrégats, pour cette raison, leur mise en suspension par des agents dispersants appropriés est une étape indispensable, ce qui est le cas dans toutes les applications industrielles de fabrication de produits manufacturés qui sont sujettes à être rejetés dans l'environnement et donc se trouver en contact des sols.

4. 3. Les essais de mise en suspension des nanotubes de carbone

Les essais de mise en suspension ont été réalisés à partir de NTC bruts, ces derniers contenus dans les poudres composites ont été extraits par lavage avec HCl. Après filtration et lavage jusqu'à neutralité. Les NTCs conservés humides ont été utilisés pour réaliser les essais de mise en suspension.

Les nanotubes de carbone sont utilisés à de très faibles concentrations, pour cette raison, des solutions à 0,5, 2, et 5 mg/L ont été préparées dans l'eau potable. Les prélèvements sont alors effectués sous agitation mécanique de manière à injecter dans le sol une suspension homogène.

4. 3. 1. Matériel

Pour permettre aux agrégats de NTC de se casser, il est indispensable de disposer de moyens efficaces et puissants d'agitation mécanique. Pour ce faire, nous avons utilisé une Cuve à ultrasons modèle X-tra 30 H Elmasonic et un homogénéiseur Ultraturax (modèle IKA® T18 basic).

4. 3. 2. Etude de la dispersion des NTCs à l'aide d'agents dispersants

Afin de mettre en suspension les NTCs, nous avons utilisé un dispersant naturel la carboxyméthylcellulose (CMC), qui ne cause pas de nuisances à la matière végétale ni au sol, sa non toxicité a été prouvée par des travaux antérieurs de Florence Mouchet et al. été utilisée pour les tests d'écotoxicité sur les amphibiens [110], Takahashi et al sont parvenus à stabiliser 250 mg/L de SWNT dans de l'eau à l'aide de CMC à 1g/L [111].

Ses principales caractéristiques sont présentées ci-dessous.

La carboxyméthylcellulose (CMC) (E466) est un polymère dérivé de la cellulose naturelle (figure 4. 1). Contrairement à la cellulose, la CMC est très soluble dans l'eau. Elle est utilisée dans certains détergents lessiviels en faible concentration. La formule de la CMC utilisée dans les tests présentés au chapitre 4 est $C_{28}H_{30}Na_8O_{27}$ (982,4 g/mol) de formule chimique

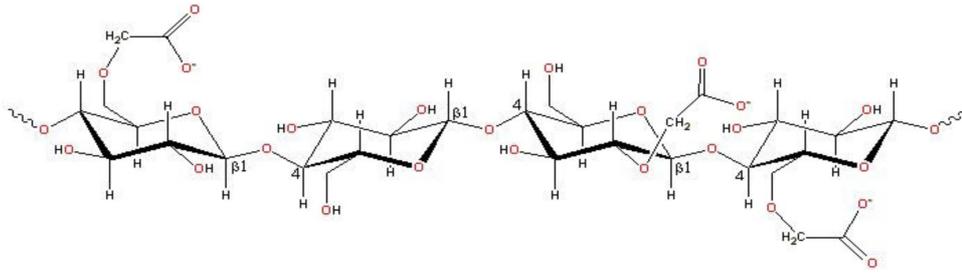


Figure 4. 1 : Représentation schématique de la carboxyméthylcellulose

Une fois les NTCs dispersés dans l'eau par la carboxyméthylcellulose, une caractérisation des suspensions formulées a été réalisée par observation au microscope électronique à transmission et la mesure de la densité optique. Cette étape est indispensable afin d'évaluer la durée de stabilité de la suspension. Pour ce faire, nous avons mesuré les densités optiques

4. 3. 2. 1. Mesure des densités optiques

L'observation visuelle n'est pas suffisante pour déterminer le moment auquel la sédimentation débute. Elle ne s'observe qu'une fois qu'il ne reste plus qu'une faible quantité de NTC en suspension. Les mesures de l'absorbance a été faite pour une longueur d'onde égale à 850 nm par rapport à une courbe d'étalonnage.

4. 3. 2. 2. Observations au microscope électronique à transmission:

La microscopie électronique en transmission MET ou TEM « Transmission Electron Microscopy » est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est transmis à travers un échantillon très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre 0,08 nanomètre.

Les poudres à observer ont été dispersées par ultrasons (cuve) dans de l'éthanol.

Quelques gouttes de la suspension ont été déposées sur une grille porte-échantillon en cuivre comportant un film de carbone percé de trous (Lacey). Les

NTCs sont observés au niveau des trous de manière à éviter toute interférence avec le film de carbone

4. 4. Evaluation des paramètres de croissance d'une espèce végétale modèle

Afin de mettre en évidence l'influence des nanotubes de carbone sur la croissance d'une espèce végétale, nous avons semé plusieurs graines dans des conditions opératoires différentes et on a suivi durant tout un cycle de développement les paramètres morphologiques à savoir :

- Etape de germination
- la partie aérienne (nombre de gousses, longueur et biomasse fraîche des tiges, etc...)
- la partie souterraine (longueur et biomasse fraîche des racines).

Le matériel végétal utilisé est le haricot commun qui est une espèce qui se développe rapidement. Pour cette raison, nous avons testé cette espèce avec la variété Djadida.

D'après [78], Djadida et une variété très cultivée en Algérie qui possède les caractéristiques suivantes :

- Type mangetout ;
- Variété naine ;
- Bonne vigueur ;
- Feuilles longues de couleur verte claire ;
- Fleurs blanches ;
- Couleur verte foncée sans fil ;
- Nombre de graines par gousse 7 ;
- Forme de la graine est subcéniforme de couleur marron noirâtre;
- PMG = 199 g.
- Résistance : BCMV, mildiou poudreux.

Il est à noter que le choix de cette espèce végétale est essentiellement basé sur le cycle court de développement (de la graine jusqu'aux gousses) qui est d'environ quatre mois.

4. 4. 1. Préparation des pots

Les containers utilisés sont des pots en PVC de couleur marron, de capacité de 0,8 l et présentant des orifices de drainage à leur base permettant l'évacuation de la solution excédentaire.

4. 4. 2. Le substrat

Différentes suspensions de NTC sans et avec CMC ont été injectées dans la terre et correspondent aux concentrations présentées dans le tableau suivant:

Tableau 4. 1: Les différentes concentrations des suspensions injectées dans la terre

		Concentration en NTC (mg/L)			
		N0 (0mg/L)	N1 (0.5mg/L)	N2 (2mg/L)	N3 (5mg/L)
Concentration en CMC (mg/L)	C0 (0mg/L)	N0C0=T-	N1C0	N2C0	N3C0
	C1 (10mg/L)	N0C1=T+	N1C1	N2C1	N3C1

4. 4. 3. Essai de germination

Les graines ont été préalablement désinfectées à l'hypochlorite de sodium 5% pendant 10 min, puis rincées abondamment à l'eau distillée. Elles sont ensuite mises à germer dans des boîtes de Pétri, dont le fond est recouvert d'une couche de coton imbibé avec 15 ml de H₂O ou des suspensions de concentrations cités précédemment en NTC. Les essais de germination ont été réalisés dans une étuve à une température de 25 °C. Le nombre des graines ayant germé est noté

pendant trois jours. Le taux de germination est calculé. Les jeunes germinations sont récoltées et rincées abondamment avec l'eau distillée. Après élimination des téguments de la graine, les échantillons sont subdivisés en cotylédons et radicules. La longueur de ces derniers est mesurée et les cotylédons pesés. L'essai de germination est illustré sur la figure ci-après.



Figure 4. 2: L'essai de germination dans l'étuve

4. 4. 4. Le semis

Le semis a été réalisé dans des pots remplis de un tiers de terre non traitée et deux tiers de terre traitée, et arrosés avec de l'eau de robinet. On a utilisé 600 g de terre pour chaque pot, le un tiers non traité est de 200 g et les deux tiers restés sont traités par les différentes suspensions citées précédemment.

4. 4. 5. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est constitué de 56 pots.

8 traitements x 7 répétitions = 56 pots suivi jusqu'au stade fruit puis on procède aux différentes analyses.

N0C1	N3C0	N0C0	N1C0	N2C1	N1C1	N2C0	N3C1
N0C0	N2C1	N0C1	N1C1	N2C0	N3C0	N3C1	N1C0
N2C1	N0C0	N1C0	N2C0	N0C1	N3C1	N1C1	N3C0
N3C1	N0C1	N2C1	N0C0	N1C0	N2C0	N3C0	N1C1
N1C0	N0C0	N1C1	N3C0	N3C1	N0C1	N2C0	N2C1
N1C1	N3C0	N2C1	N1C0	N2C0	N3C1	N0C1	N0C0
N2C0	N1C0	N3C0	N3C1	N1C1	N2C1	N0C0	N0C1

Figure 4. 3: Schéma du dispositif expérimental

4. 5. Les paramètres étudiés

4. 5. 1. Paramètres morphologiques

Les paramètres morphologiques ont été évalués par mesure de la partie aérienne et souterraine. Vers la fin du cycle, on enlève le plant du pot et on sépare la partie aérienne de la partie souterraine, on les lave et on procède à la mesure de la longueur de chaque partie moyennant une règle graduée et on pèse les deux parties séparément avec une balance de précision.

4. 5. 2. Paramètres physiologiques

4. 5. 2. 1. La synthèse des pigments

Le développement des plantes est le résultat de l'intégration et la régulation des processus physiologiques dont le plus dominant est la photosynthèse. La croissance du végétal autant que la production de biomasse est une mesure de la photosynthèse nette et comme les stress environnementaux affectent la croissance donc affectent la photosynthèse.

4. 5. 2. 1. 1. L'extraction des pigments

L'extraction des pigments est réalisée selon la méthode de Francis et al (1970), qui consiste en une macération des feuilles (0.1g) dans 10 ml d'un

mélange de l'acétone et de l'éthanol (75 % et 25%) de volume et de (80% et 40%) de concentration. Les feuilles sont coupées en petits morceaux et mises dans les tubes à essai recouverts avec du papier aluminium (pour éviter l'oxydation de la chlorophylle par la lumière), 48h plus tard, on procède à la lecture des densités optiques des solutions avec un spectrophotomètre, à deux longueurs d'ondes: (645 et 663 nm).

Les teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylle totale, a et b) sont calculés par les formules de Lichtenthaler:

$$\text{Chla} = 12.25A_{663} - 2.79A_{645} \text{ (mgL}^{-1}\text{MF);} \quad (1)$$

$$\text{Chlb} = 21.50A_{645} - 5.10A_{663} \text{ (mgL}^{-1}\text{MF);} \quad (2)$$

$$\text{Chla+b} = 7.15A_{663} + 18.71A_{645} \text{ (mgL}^{-1}\text{MF);} \quad (3)$$

Où:

Chla= chlorophylle a; Chlb= chlorophylle b; Chla+b= chlorophylle totale.

4. 5. 2. 2. Les sucres solubles

Les composés carbonés tels que les sucres solubles jouent un rôle crucial dans le développement et le fonctionnement des cellules vivantes. Ainsi, les sucres solubles constituent la source préférentielle d'énergie et de carbone pour les cellules eucaryotes. Chez les plantes, ils sont impliqués dans la régulation de processus développementaux, tels que le développement de l'embryon et de la graine [112], De plus, des situations de stress, telles que la sécheresse, les fortes salinités, les faibles températures (chilling et freezing) ou un excès d'énergie conduisent à une forte accumulation de sucres solubles, généralement interprétée comme une réponse adaptative [113, 114], où les sucres jouent un rôle de soluté compatible, intervenant dans la stabilisation des protéines et des membranes [115, 116].

4. 5. 2. 2. 1. Dosage des sucres solubles

Nous avons procédé au dosage des sucres solubles dans la plante selon la méthode de Dubois, (1956). Pour l'extraction des sucres solubles, on a suivi le protocole expérimental suivant:

- Mettre 100 mg de matière fraîche végétale dans des tubes à essai.
- Ajouter 2 ml d'éthanol à 80%, Laisser les tubes fermés au repos pendant 48h.
- Faire évaporer l'alcool en mettant les tubes à essai dans un bain Marie à 70°C.
- Après refroidissement, on ajoute 20 ml d'eau distillée dans chaque tube à essai. Prendre 1 ml de la solution et ajouter 1 ml de phénol à 5 % et bien agiter.
- Ajouter ensuite 5 ml d'acide sulfurique concentré, dans chaque tube à essai puis les passer au vortex et les laisser au repos pendant 10mn puis les passer au bain Marie pendant 15 mn à 30°C.
- Procéder ensuite à la lecture au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 490 nm.

La détermination de la teneur des sucres solubles est réalisée selon la formule:

$$\text{Sucres solubles } (\mu\text{g /g MF}) = \text{DO}_{490} \times 1.657 \quad (4)$$

4. 5. 2. 3. Accumulation de la proline

La proline désignée généralement sous le nom de soluté compatible chez les eubactéries, les algues, et les plantes supérieures. L'accumulation de la proline est due principalement à la synthèse de novo [117], et deuxièmement à un taux réduit du catabolisme, et finalement aux systèmes de transport spécifiques qui diffusent la proline aux endroits de besoin.

4. 5. 2. 3. 1. Le dosage de la proline

La proline est dosée selon la technique utilisée par Troll et Lindesly (1955) simplifiée et mise au point par Dreier et Goring (1974) et modifiée par Monneveux et Nemmar (1986).

La proline obtenue par extraction au méthanol à 40 % (v/v), mélangée avec la ninhydrine en milieu acide et à chaud donne un composé rose, soluble dans le

toluène, et susceptible d'un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde de 528nm. Pour chaque échantillon, une biomasse de matière fraîche dont la masse est 100 mg est mélangée au méthanol à 40%. Les tubes recouverts sont portés à ébullition à 85 °C pendant une heure, après refroidissement, 1 ml de la solution a été prélevée de chaque tube et mis dans de nouveaux tubes auxquels, nous avons ajouté 1 ml d'acide acétique et 25 mg de ninhydrine. Ensuite, on ajoute, dans chaque tube, 1 ml d'un mélange contenant:

120 ml d'eau distillée,

300 ml d'acide acétique,

80 ml d'acide orthophosphorique.

Les tubes sont placés dans l'eau bouillante pendant 30 min, une coloration rose se développe.

Après refroidissement des solutions, on ajoute 5 ml de toluène dans chaque tube. Après agitation au vortex, deux phases apparaissent. On prélève la phase supérieure à la qu'elle on ajoute 5 mg du sulfate de sodium, puis on les laisse au repos pendant 48h.

Une lecture de l'absorbance à 528 nm est réalisée. La détermination de la teneur de la proline est réalisée selon la formule:

$$\text{Proline } (\mu\text{g /g MF}) = \text{DO}_{528} \times 0.62 \quad (5)$$

4. 6. Analyses statistiques

Les données obtenues sont soumises à une analyse de la variance à un facteur étudié (traitement). Les moyennes sont comparées selon la méthode de Newman et Keuls (Dagnelie, 1999), qui est basée sur la plus petite valeur significative, réalisés par le logiciel STAT ITCF version 13. 31. On considère que les résultats sont significatifs quand $P \leq 0, 05$.

CHAPITRE 05

RESULTATS ET DISCUSSION

5. 1. Introduction

Dans ce chapitre seront exposés les différents résultats sur les paramètres morphologiques et physiologiques de croissance de l'espèce végétale étudiée, la comparaison par rapport au témoin nous permettra de mettre en évidence l'influence des nanotubes de carbones biparois sur les écosystèmes.

5. 2. Mise en suspension des nanotubes de carbone

La mise en suspension des nanotubes de carbone est une étape essentielle afin de prévoir l'état dans lequel les nanotubes une fois mis en contact direct avec l'espèce végétale.

Visuellement, on remarque que les suspensions sont noires et bien homogènes pour la durée de l'étude, la figure ci-après illustre l'aspect des suspensions

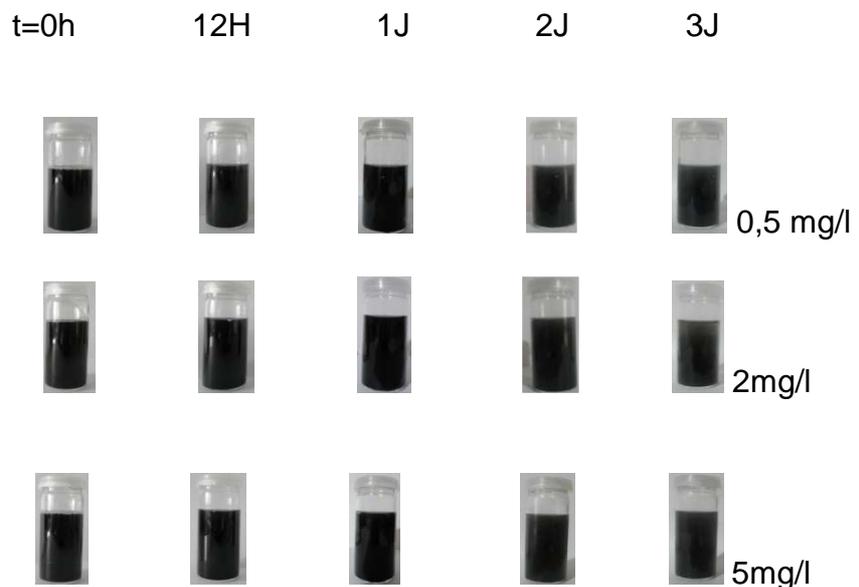


Figure 5. 1. Photo des suspensions observées au cours du temps à différentes concentrations de la CMC

5. 2. 1. Mesure des densités optiques

La figure (5. 2) illustre les variations des densités optiques à 850nm en fonction du temps pour les différentes concentrations de NTC (0,5, 2 et 5 mg/l) avec la carboxyméthylcellulose. Il apparaît clairement que les absorbances sont pratiquement constantes au bout de 72 h, ce résultat confirme l'absence de toute sédimentation ou agrégation pour l'intervalle de temps étudié.

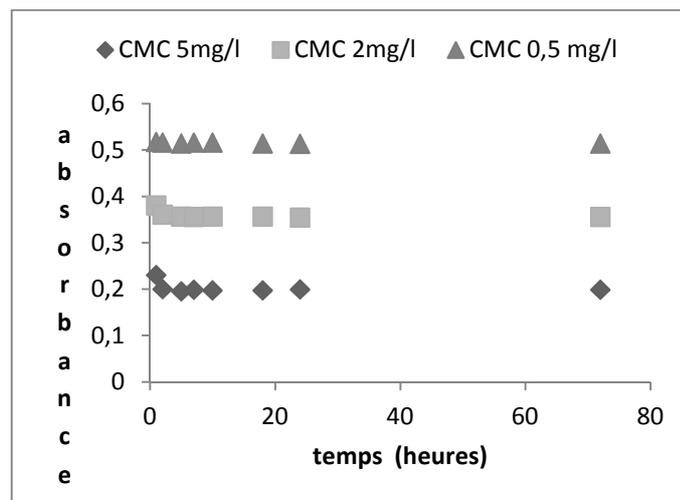


Figure 5. 2: Variations des densités optiques en fonction du temps pour différentes concentrations de CMC

5. 2. 2. Observations au microscope électronique à balayage

Les figures ci-après illustrent l'état des nanotubes à l'état aggloméré (a) et à l'état dispersé (b).

Dans le premier cas, les nanotubes paraissent enchevêtrés et bien enroulés les uns sur les autres alors que dans le second, des filaments bien visibles et distincts de nanotubes mettent en évidence leur état dispersé.

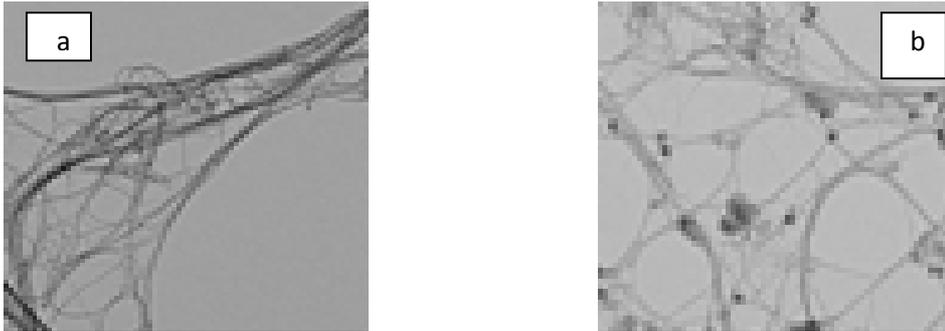


Figure 5. 3: Photo des nanotubes de carbone vues au MET à 50nm

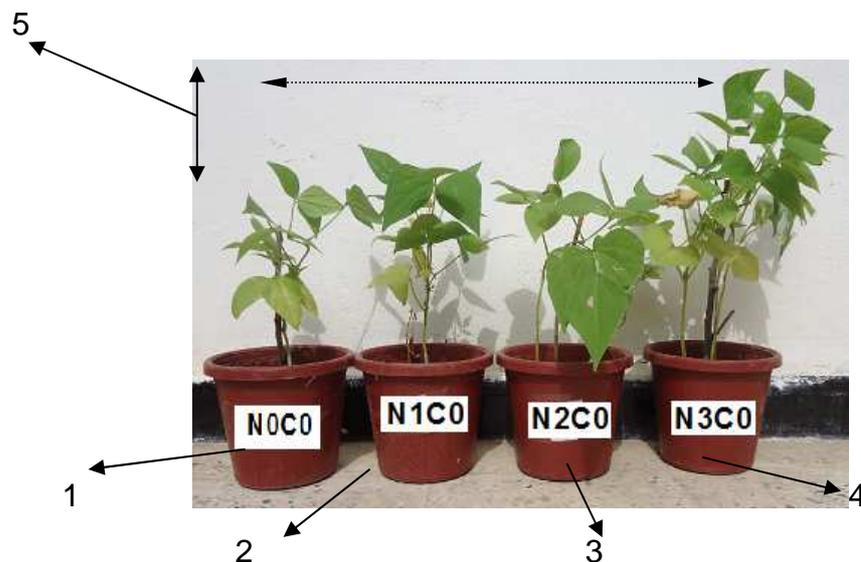
(a) état aggloméré

(b) état dispersé

5. 3. Paramètres de croissance

5. 3. 1. Aspect général de la plante

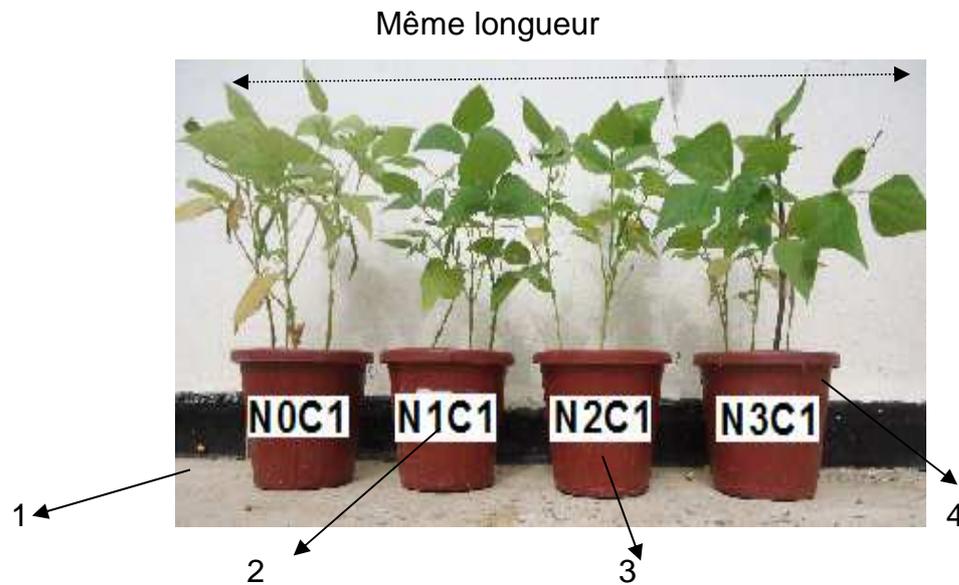
Visuellement, on a pu remarquer l'effet du traitement de la terre par les nanotubes de carbone appliqué sur la variété des haricots Djadida, Il apparaît clairement que la partie aérienne de la plante traitée par les NTCs seuls dans l'eau est bien plus développée que celle qui correspond au témoin (figure 5.4)



1: témoin d'EP, 2; 3 et 4 : les traitements 0,5; 2 et 5 mg de NTC seuls ; 5: la différence de longueur

Figure 5. 4: Représentation des plants témoin et traités par la suspension des NTCs

Pour les plantes dont la terre a été traitée par les nanotubes de carbone mises en suspension par la carboxyméthylcellulose, les parties aériennes ont presque la même longueur quelque soit la concentration en nanotubes de carbone comme l'illustre la figure 5.5.



1: témoin de CMC; 2, 3, 4: traitements de 0,5; 2; et 5 mg de NTC avec la CMC respectivement

Figure 5. 5: Représentation des plants traités par les suspensions de NTCs avec la CMC

5. 3. 2. Etape de germination

Pour mettre en évidence l'effet des nanotubes de carbone sur l'étape de germination des grains de la variété Djadida, en plus des observations visuelles, le pourcentage de germination a été calculé et les deux parties de la graine tel les cotylédons, la radicule ont été pesées. La longueur de la radicule a été aussi mesurée.

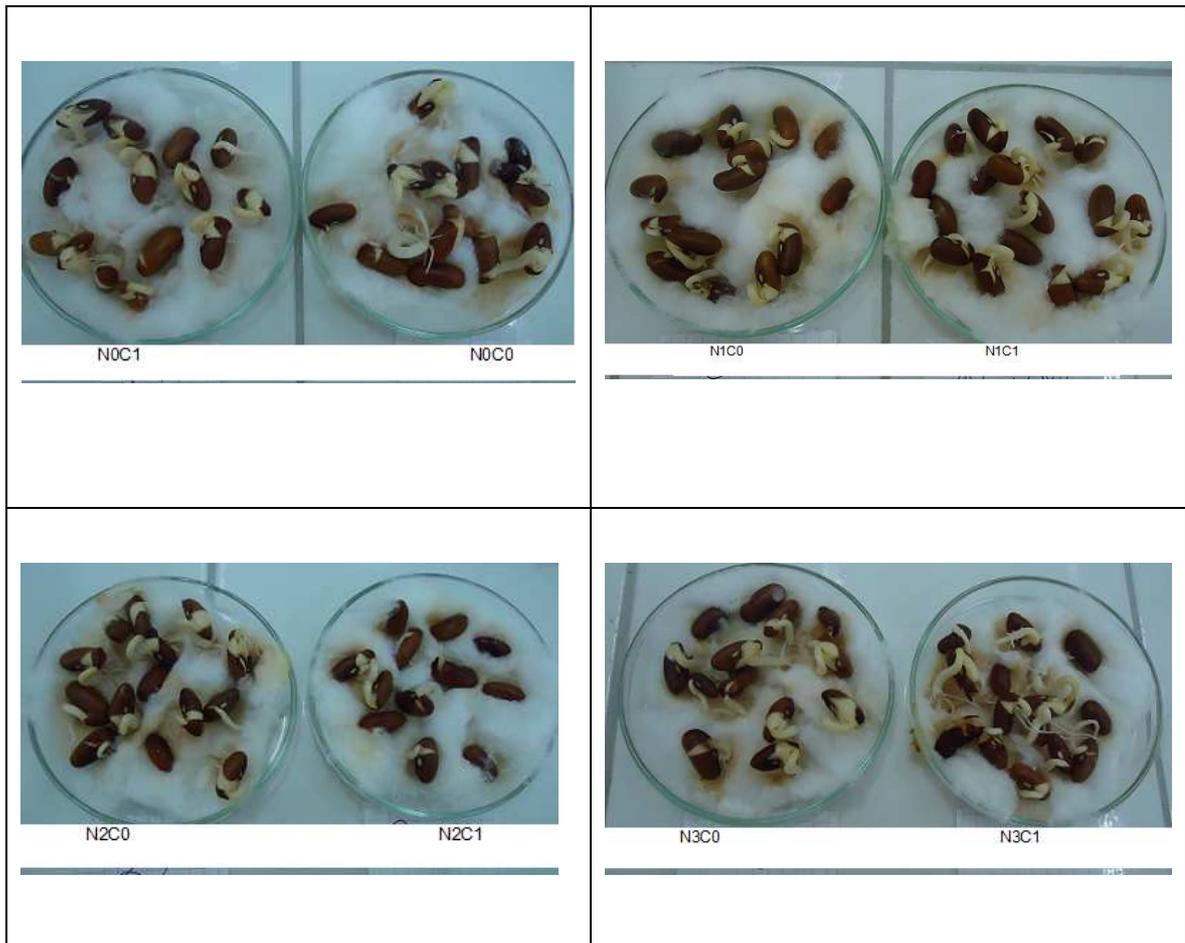


Figure 5. 6: La germination des graines

5. 3. 2. 1. Le pourcentage de germination

L'analyse de la variance montre qu'il y a une différence très hautement significative (annexe B 1) de l'effet du traitement de la terre par les NTCs sur le taux de germination des graines de l'haricot.

Le test de Newman et Keuls au seuil $\alpha = 5\%$ fait ressortir quatre groupements homogènes (annexe C1). Le groupe A dominant représente les traitements N0C1, N2C0 avec 85,64 et 85,73% respectivement, qui constituent presque une augmentation de 34% par rapport au témoin qui enregistre la valeur la plus faible 64,28% du groupe D. Le deuxième groupe B représente les traitements N1C1, N2C1, N3C0 et N3C1. Le traitement N1C0 est présenté par le groupe C avec la valeur 71,76%.

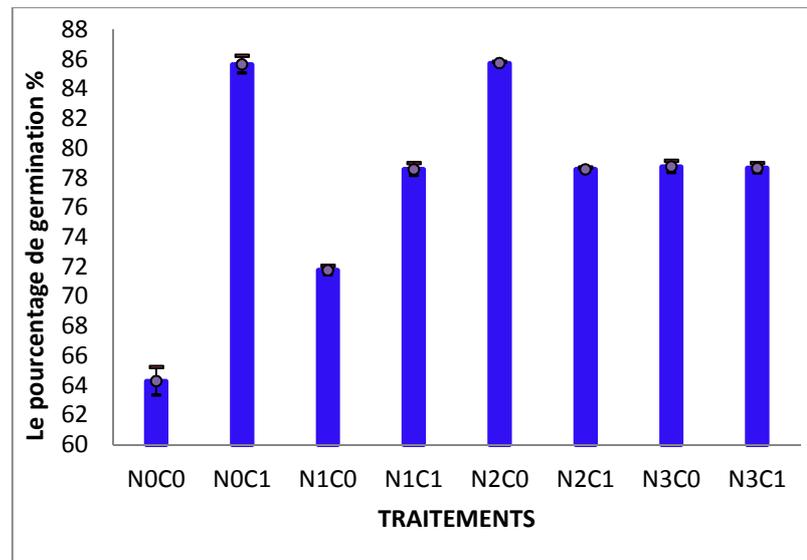


Figure 5. 7: Le pourcentage de germination des graines d'haricot

5. 3. 2. 2. Biomasse fraîche des cotylédons

L'analyse de variance révèle l'existence d'une action significative (annexe B2) de l'effet traitement sur la biomasse fraîche des cotylédons des graines de la variété Djadida.

En effet, le test de Newman et Keuls au seuil $\alpha = 5\%$ fait ressortir trois groupements homogènes (annexe C2). Le groupe A représente les traitements N0C1, N2C0 et N3C0 par les valeurs 0,53, 0,56 et 0,52 (g) respectivement. Les traitements N0C0, N1C0, N1C1 et N3C1 sont présentés par le deuxième groupe (AB), avec les valeurs 0,50, 0,49, 0,51, 0,49 (g) par rapport à la plus faible 0,41 g du groupe B représenté par N2C1. La figure ci-après illustre ces résultats.

Le traitement de la CMC a donné une valeur comparable avec les traitements N2C0 et N3C0.

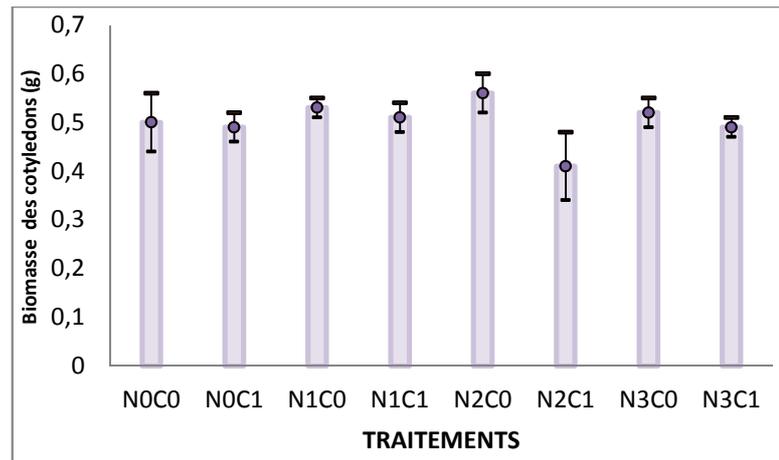


Figure 5.8: La biomasse fraîche des cotylédons

5. 3. 2. 3. Biomasse fraîche de la racicule

Une différence significative a été observée par analyse de la variance (annexe B3) entre les moyennes mesurées de la biomasse fraîche de la racicule de cette variété ce qui met en évidence l'influence du traitement.

Le test de Newman et Keuls au seuil $\alpha = 5\%$ fait ressortir trois groupements homogènes (annexe C3). La valeur la plus élevée est enregistrée par N1C0 0,26 g avec une augmentation de 62,5% par rapport aux traitements du dernier groupe C représenté par le témoin et la CMC seule avec une valeur de 0,16 g, les autres traitements sont présentés par le deuxième groupe B.

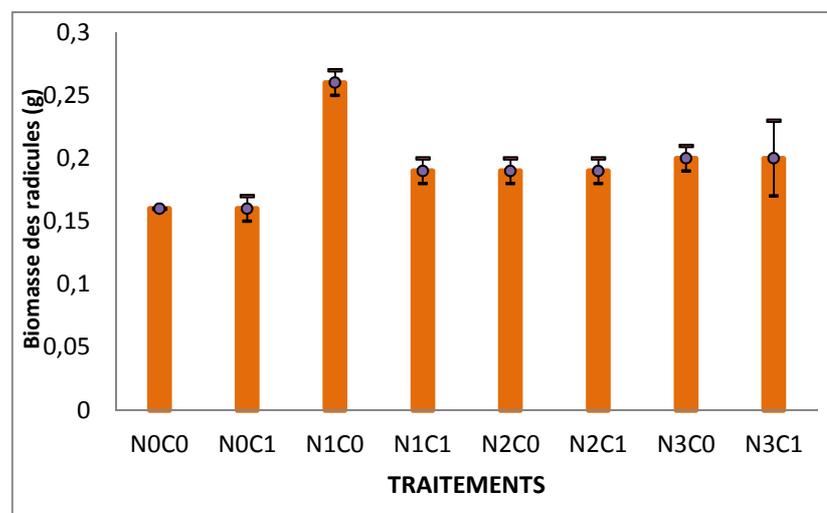


Figure 5. 9: La biomasse fraîche des radicules

5. 3. 2. 4. La longueur de la racicule

De même, on remarque une influence remarquable des NTC sur la longueur de la racicule. En plus de l'analyse de la variance (annexe B4), le test de Newman et Keuls au seuil $\alpha = 5\%$ fait ressortir trois groupements homogènes (annexe C4), le groupe A dominant représenté par les traitements N0C1, N1C1, N2C0 et N3C1 avec 5,47, 5,07, 5,53, et 5,13 cm respectivement. Le deuxième groupe AB représente les autres traitements à part le N2C1 qui est représenté par le troisième groupe B avec une valeur de 4,20 cm.

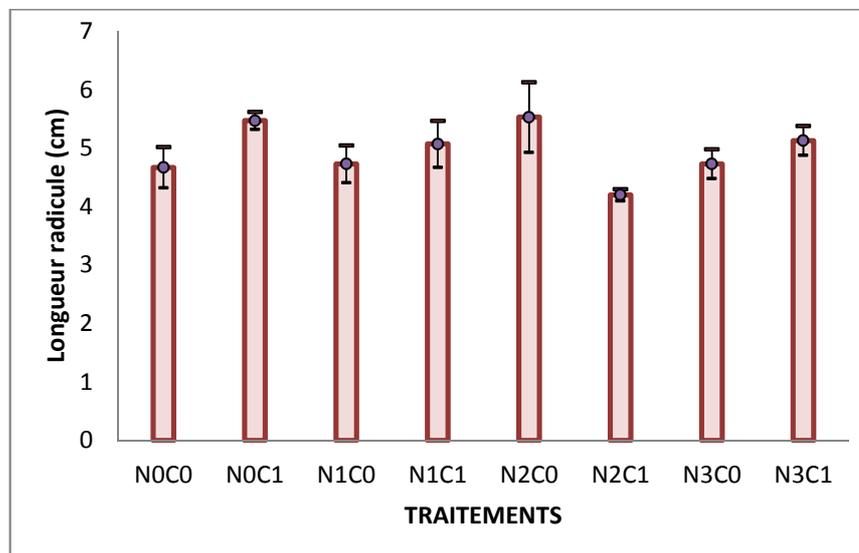


Figure 5. 10: La longueur des racicules pour les différents traitements

5. 3. 3. Paramètres morphologiques

L'exposition des plantules d'haricot à différents traitements de terre en NTC nous a permis de mettre en évidence l'influence de ces derniers sur les paramètres morphologiques tels que le poids frais de la partie aérienne, le poids frais de la partie souterraine et la longueur de la partie aérienne et de la partie souterraine.

5. 3. 3. 1. La biomasse fraîche de la tige

L'analyse de la variance montre qu'il y a une différence très hautement significative de l'effet traitement (annexe B5) entre les différentes moyennes mesurées de la biomasse fraîche de la tige.

Le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha= 5\%$) fait ressortir cinq groupements homogènes(annexe C5) durant tous les stades de développement, le poids frais de la tige le plus élevé est enregistré au niveau des pots du traitement N1C1 groupe (A), dont la valeur est 1.55 g qui constitue une augmentation de 25% par rapport au témoin représenté par le quatrième groupe CD avec les traitements N2C0 et N3C0, le deuxième groupe AB représente les traitements N0C1 et N3C1.

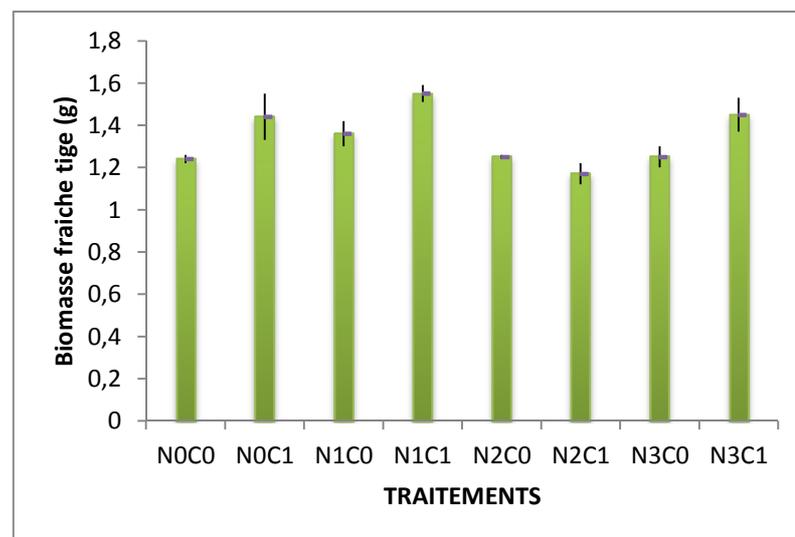


Figure 5. 11: La biomasse fraîche des tiges

5. 3. 3. 2. La biomasse fraîche racinaire

La variance révèle l'existence d'une action notable (annexe B6) de l'effet traitement sur la biomasse fraîche des racines de la variété Djadida.

Le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha= 5\%$) fait ressortir quatre groupements homogènes (annexe C6). Le groupe dominant A représenté par le traitement

N1C1 avec une valeur de 0,73 g qui est deux fois plus grand que le témoin représente le troisième groupe BC avec les traitements N0C1, N1C0, N2C0 et N3C0. Le deuxième groupe B représente le traitement N2C1 par 0,50 g.

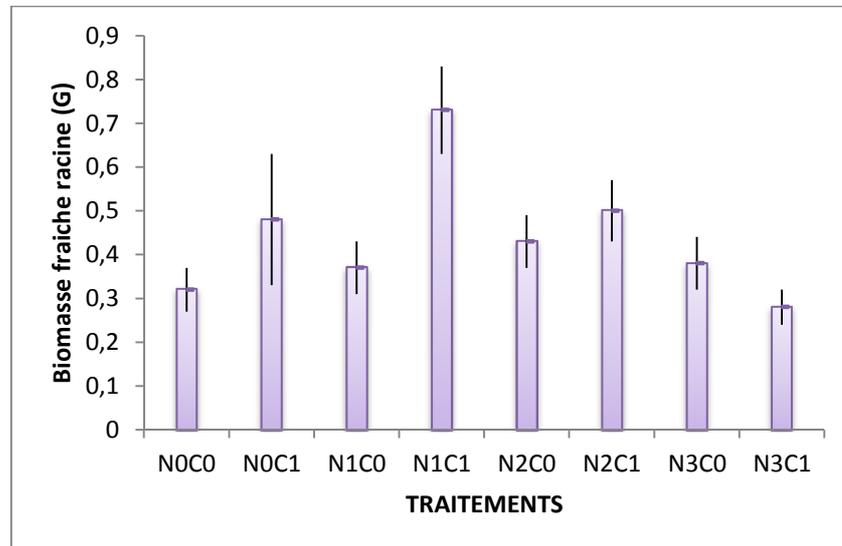


Figure 5. 12: La biomasse fraîche des racines



Figure 5. 13: La racine du traitement N1C1 à gauche et le témoin à droite

5. 3. 3. 3. La longueur de la partie aérienne

L'analyse de la variance montre qu'il n'y a pas de différence significative (annexe B7) de l'effet traitement sur les différentes moyennes mesurées de la longueur de la partie aérienne.

Tous les traitements forment un seul groupement homogène (annexe C7). On constate que la valeur la plus élevée est enregistrée par le traitement N3C0 21,50 cm.

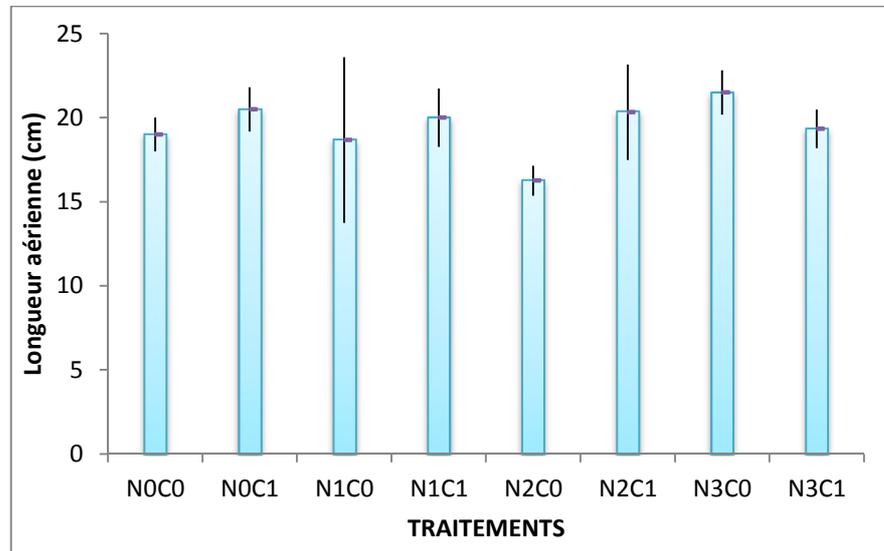


Figure 5. 14: La longueur de la partie aérienne pour les différents traitements

5. 3. 3. 4. La longueur de la partie souterraine

L'analyse de la variance montre qu'il y a une différence très hautement significative (annexe B8) de l'effet traitement sur la longueur des racines de la variété Djadida.

Le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha = 5\%$) fait ressortir cinq groupements homogènes (annexe C8), la valeur la plus élevée de la partie souterraine est enregistrée par le traitement N2C0 avec 11,67 cm qui correspond à une augmentation de 75% par rapport au témoin qui manifeste la plus faible valeur de 6,67 cm du dernier groupe C et les autres traitements enregistrent tous des valeurs plus élevées que le témoin.

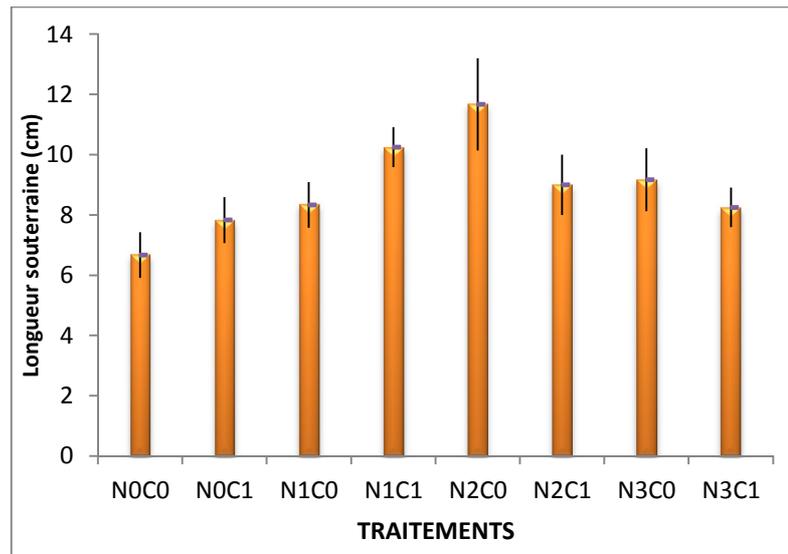


Figure 5. 15: La longueur de la partie souterraine pour les différents traitements



Figure 5.16: La racine du traitement N2C0 à gauche et le témoin à droite

5. 4. Les paramètres physiologiques

5. 4. 1. La chlorophylle a

L'analyse de la variance montre qu'il y a une différence hautement significative (annexe B9) de l'effet traitement sur les différentes moyennes mesurées de la teneur en chlorophylle a.

En effet le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha = 5\%$) classe les traitements en deux groupements homogènes (annexe C9), le premier groupe A dominant avec la valeur de $14,64 \text{ mg l}^{-1} \text{ MF}$ représenté par le traitement N3C1 ce qui

constitue une augmentation de 77,5% par rapport au témoin. Le deuxième groupe B représente tous les autres traitements.

On constate qu'en présence de la CMC, la chlorophylle a est plus synthétisée par rapport aux mêmes traitements sans CMC.

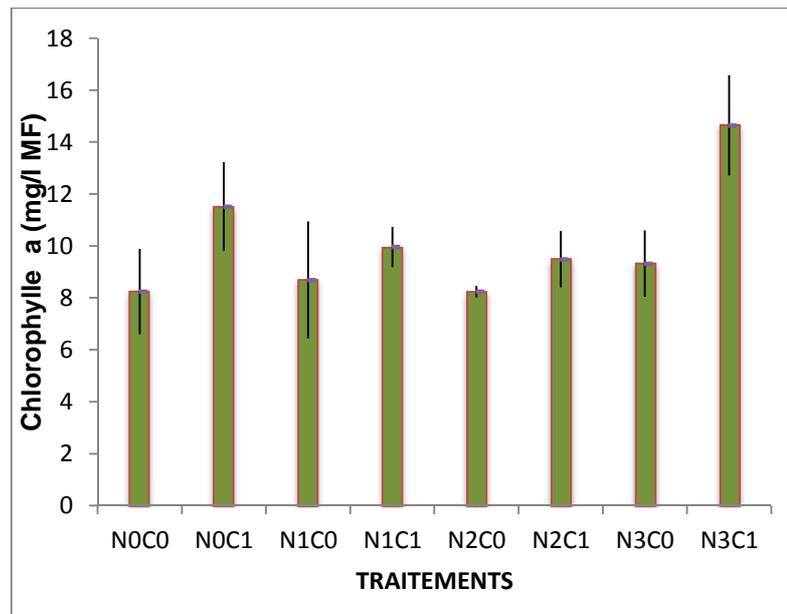


Figure 5. 17: Le taux de chlorophylle a pour les différents traitements

5. 4. 2. La chlorophylle b

L'analyse de la variance a révélé l'existence d'une action remarquable (annexe B10) de l'effet traitement sur la quantité de la chlorophylle b mesurée dans les feuilles de la variété Djadida.

Le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha = 5\%$) indique la présence de deux groupements homogènes (annexe C10), le premier groupe A représenté par les traitements N1C1, N3C1 avec 16,97 et 15,36 respectivement, qui sont trois fois plus grand par rapport au témoin représenté par le deuxième groupe b avec les autres traitements.

On remarque la même chose que précédemment, c'est-à-dire le taux de chlorophylle b est plus élevé en présence de la CMC qu'en son absence.

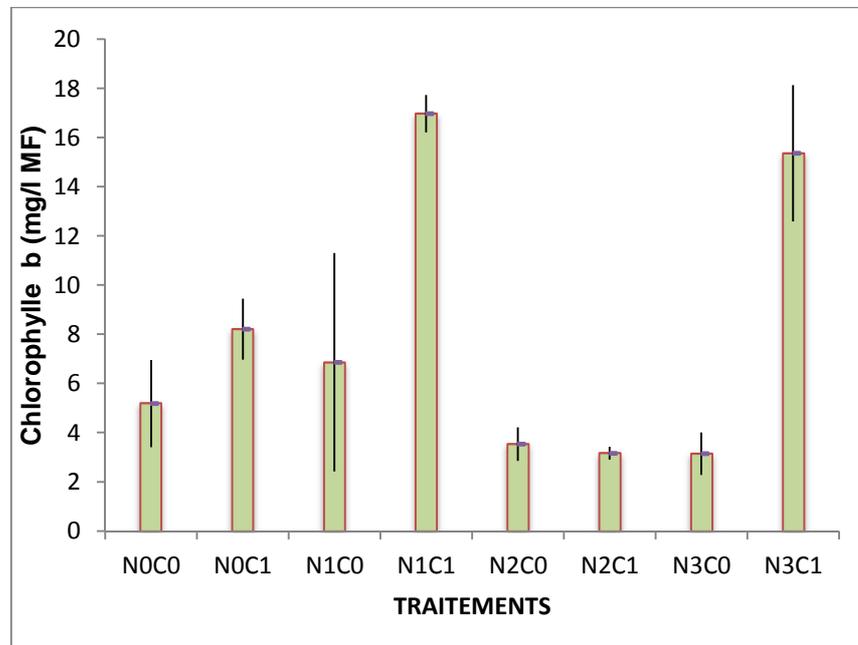


Figure 5. 18: Le taux de chlorophylle b pour les différents traitements

5. 4. 3. La chlorophylle totale a+b

Le taux de chlorophylle total a été très affecté par la présence des nanotubes de carbone dans la terre et ceci a été mis en évidence par analyse de la variance (annexe B11).

De même, Le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha = 5\%$) fait ressortir quatre groupements homogènes (annexe C11). Les résultats présentés dans la figure (5. 19) montrent que la chlorophylle totale augmente en fonction du traitement.

Le témoin manifeste la plus faible valeur, et les résultats aussi confirment qu'en présence de la CMC, la synthèse de la chlorophylle est toujours meilleure que les mêmes traitements sans CMC.

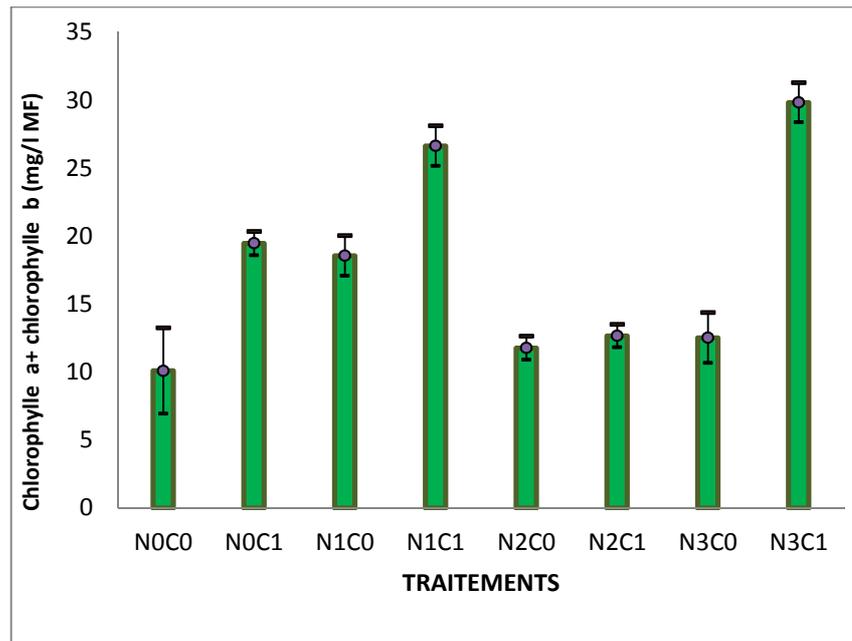


Figure 5. 19: La chlorophylle totale (a+b)

5. 4. 4. Le rapport de la chlorophylle chl_a/chl_b

Le rapport de la chlorophylle chl_a/chl_b est un paramètre important à évaluer pour mesurer les paramètres physiologiques. Ce rapport a été aussi influencé par la présence des NTC et ceci a été démontré par analyse de la variance (annexe B12).

Les traitements N2C1 et N3C0 manifestent les valeurs les plus élevées (annexe C12) du rapport chlorophylle chl_a/chl_b avec 3,03 et 3,11 respectivement. Le traitement N2C0 représenté en deuxième classe avec la valeur 2,40. Le témoin et le traitement NOC1 indiquent la troisième classe, et les autres traitements font partie de la dernière classe qui donne la plus faible valeur.

On remarque que l'augmentation de la concentration en NTC de 0,5 à 5 mg/L a induit une augmentation du rapport chl_a/chl_b car la valeur passe de $0,89 \pm 0,28$ à $3,11 \pm 0,81$.

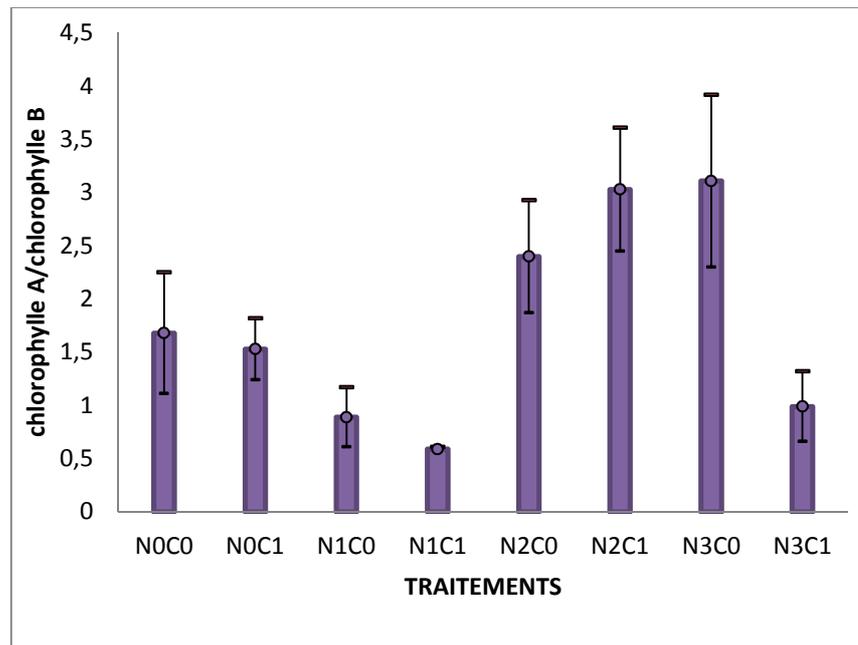


Figure 5. 20: Le rapport entre la chlorophylle a et b pour les différents traitements

5. 4. 5. La teneur en sucres solubles dans les feuilles

La teneur en sucres solubles est un paramètre important qui indique l'état de développement de la matière végétale

Par analyse de la variance (annexe B13), les résultats ont montré que la présence des NTC affecte le taux de sucres solubles. Aussi, Le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha = 5\%$) fait ressortir sept groupements homogènes (annexe C 13). Le taux de sucre le plus élevé est représenté par le traitement NOC1 qui peut être justifié par la présence de la CMC qui est un sucre elle-même. Les traitements N1C0, N2C0, N3C0 manifestent des valeurs plus élevés que les mêmes traitements avec CMC et que le témoin.

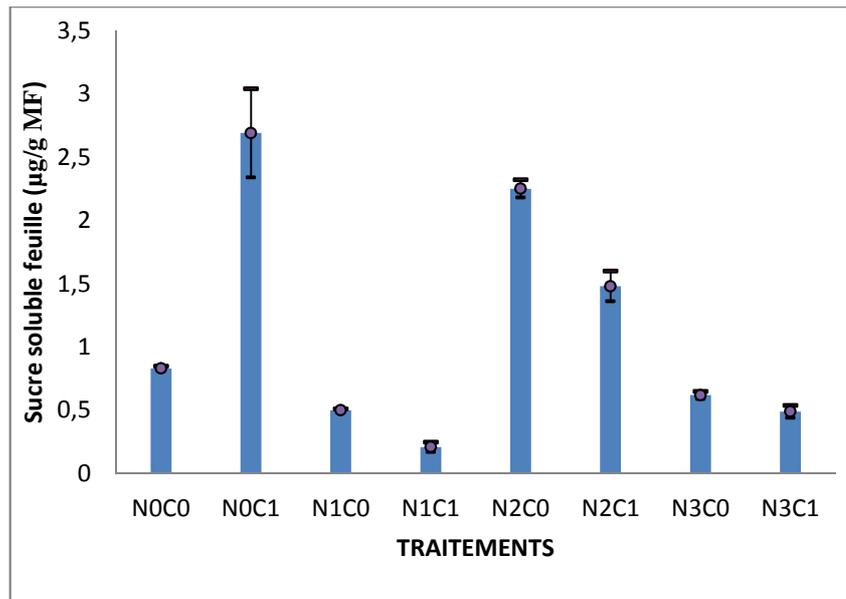


Figure 5. 21: Les sucres solubles dans feuilles

5. 4. 6. Les taux de sucre dans la racine

De même que dans les feuilles, le taux de sucre dans les racines a été aussi affecté par la présence des NTC (annexe B14). Le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha=5\%$) fait ressortir cinq groupements homogènes (annexe C14). Le groupe A représenté par les traitements N0C1 et N1C0 avec $0,52 \mu\text{g/g MF}$ pour les deux, le deuxième groupe AB représenté par N2C0 qui manifeste la valeur $0,46 \mu\text{g/g MF}$, les traitements N3C0, N3C1 sont classés dans le même groupe, mais pour les deux autres concentrations ($0,5$ et 2 mg/l) avec et sans CMC, on remarque que la quantité du sucre soluble est plus faible en présence de la CMC et aussi faible que le témoin.

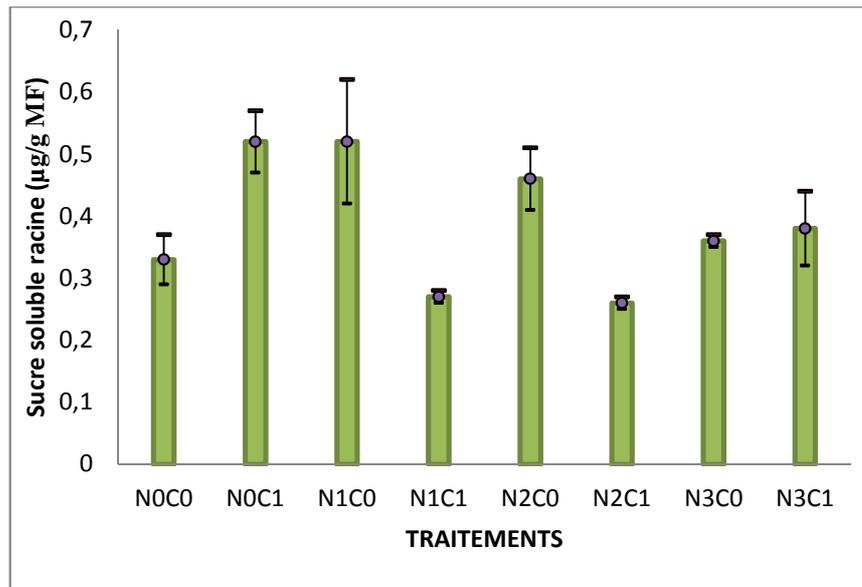


Figure 5. 22: Le sucre soluble dans les racines

5. 4. 7. La proline dans les feuilles

Les quantités de la proline accumulées dans les feuilles des plantes étudiées ont été affectées par effet du traitement, résultat confirmé par analyse de la variance (annexe B15).

Le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha = 5\%$) fait ressortir quatre groupements homogènes (annexe C15). Le premier groupe A est représenté par les traitements N2C0, N2C1 et N3C0 avec 0,20, 0,21, 0,20 $\mu\text{g/g MF}$ respectivement qui constituent une augmentation de 31% par rapport au témoin représenté par le troisième groupe B, le deuxième groupe AB représente les autres traitements à l'exception du N3C1 qui est classé dans le dernier groupe C avec la valeur la plus faible 0,11 $\mu\text{g/g MF}$.

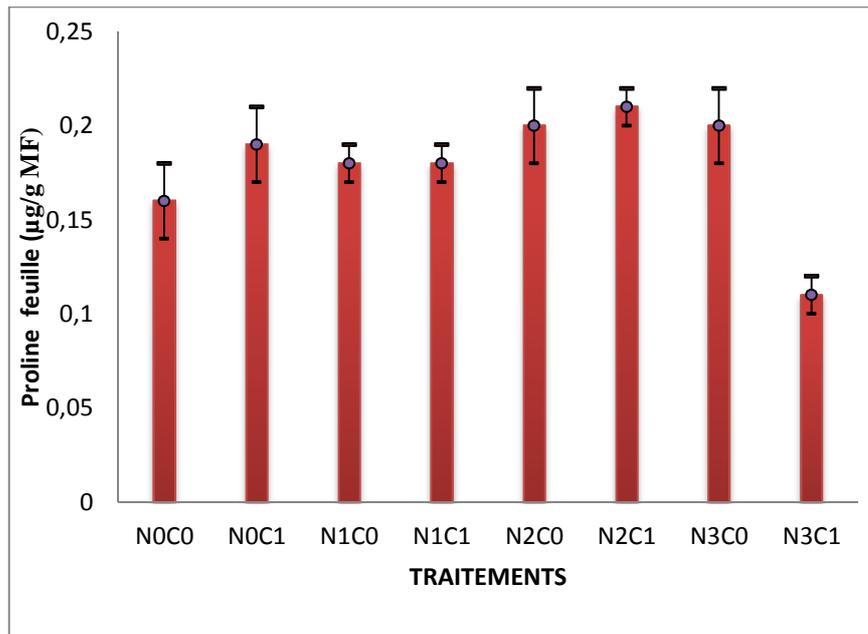


Figure 5. 23: La proline dans les feuilles pour les différents traitements

5. 4. 8. La proline dans les tiges

L'analyse de la variance révèle l'existence d'une différence très hautement significative (annexe B16) de l'effet traitement sur la quantité de la proline synthétisée au niveau des tiges de la variété Djadida. Le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha= 5\%$) fait ressortir six groupements homogènes (annexe C16). Le taux de la proline le plus élevé est enregistré pour le traitement N3C1 avec 0,21 $\mu\text{g/g}$ MF qui correspond à une augmentation de 61,5% par rapport au témoin qui fait partie du quatrième groupe C.

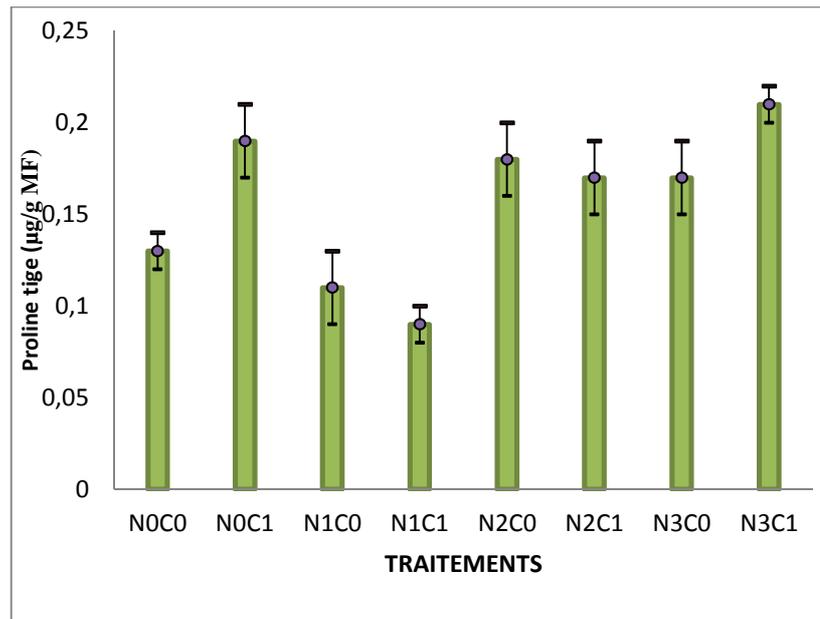


Figure 5. 24: La proline dans les tiges pour les différents traitements

5. 4. 9. La proline dans les racines

Comme dans les tiges et les feuilles, les NTC manifestent un effet remarquable sur le taux de proline (annexe B17). Les résultats montrent que la teneur de la proline la plus élevée (annexe C17) est celle des traitements N0C1, N1C1, N2C0 et N2C1 avec une valeur de 0,18 µg /g MF, la deuxième valeur est donnée par le témoin, les traitements N3C0 et N3C1 manifestent les plus faibles quantités de proline racinaire.

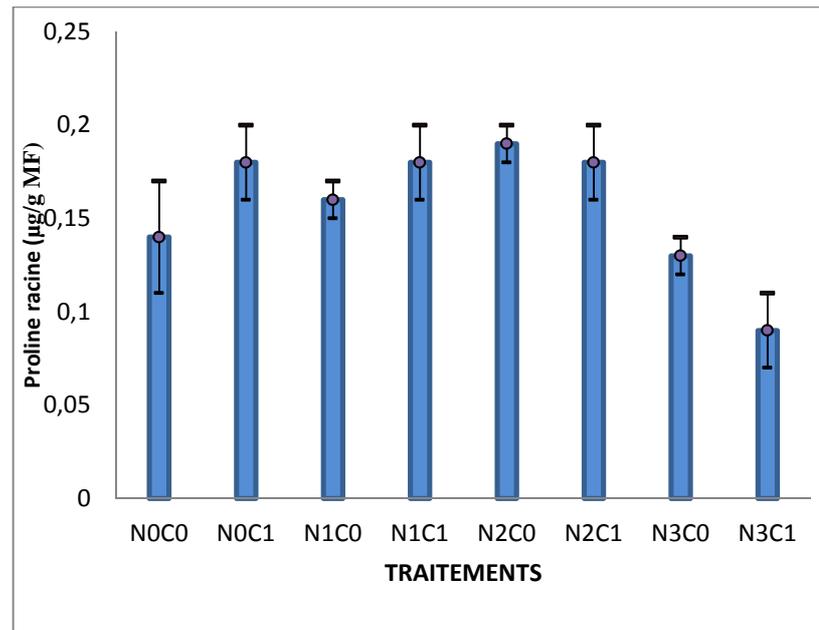


Figure 5. 25: La proline dans les racines

5. 5. Estimation du nombre des gousses

Le nombre de gousses enregistré dans les haricots en fin de cycle de développement a montré une nette influence par la présence des NTC (annexe B18). Le test de Newman et Keuls au seuil ($\alpha= 5\%$) fait ressortir quatre groupements homogènes (annexe C18). La figure (5. 27) montre que le nombre de gousses le plus élevé est enregistré par le traitement N0C1 qui indique une augmentation de 233,5 % par rapport au témoin qui donne la moyenne la plus faible. On constate par ailleurs que les traitements avec les NTC non dispersés donnent en général de bons rendements comparativement aux traitements avec les NTC dispersés par la CMC.

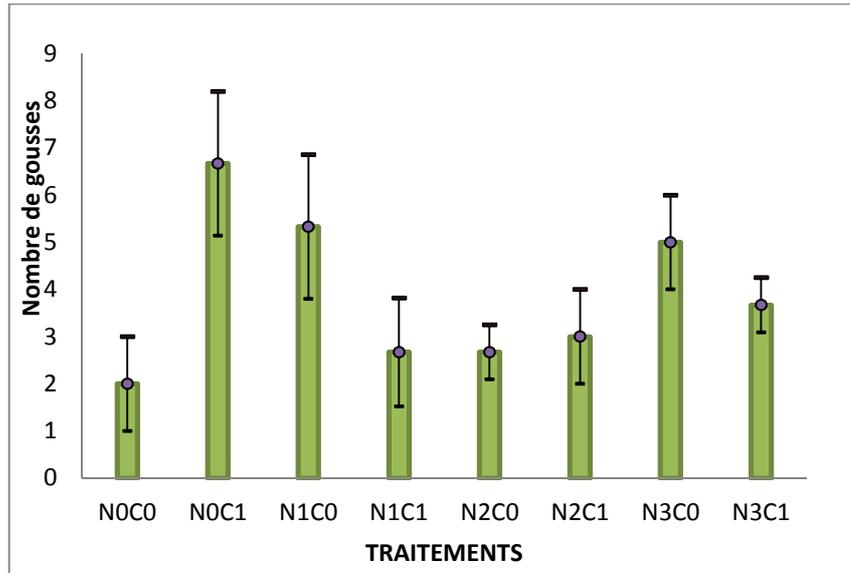


Figure 5. 26: Le nombre de gousses pour les différents traitements

5. 6. Discussion générale

L'exposition de la plante étudiée (le haricot commun) à des différentes concentrations en NTC à l'état dispersés par ou sans CMC a entraîné des changements dans sa physiologie remarquable à travers les paramètres étudiés. La germination du haricot était favorisée en présence de NTC sans et avec CMC par rapport au témoin, même pour la biomasse fraîche des cotylédons et racicules qui manifestent des valeurs élevées beaucoup plus en présence des traitements de NTC seuls. De même pour la longueur de la racicule qui augmente aussi en fonction de la concentration en NTC. Ce même résultat a été mis en évidence par Wild *et al.* [118]. En effet, les nanotubes de carbone pénètrent la peau épaisse des graines et améliorent l'apport en eau à l'intérieur et en conséquence la germination était beaucoup plus prononcée pour les graines cultivées dans un terrain enrichi en nanotubes par rapport au contrôle.

Au cours de cette étude, le suivi des paramètres morphologiques tels que la biomasse fraîche des racines et tiges révèle une augmentation de ces dernières surtout à faible concentration en NTC dispersés avec la CMC, ce qui n'est pas confirmé par Lin *et al.* En effet, les nanotubes individuels, se sont montrés les plus toxiques, ils diminuent la matière sèche en fin d'essai par adsorption d'une plus grande quantité sur la surface de la racine et peut supprimer le flux d'eau et la prise des nutriments, en inhibant ainsi la croissance des plantes [72].

La longueur aérienne de la plante n'a pas été affectée significativement mais on remarque que le traitement N2C0 manifeste la plus faible valeur par rapport aux autres traitements. Par contre la longueur racinaire est affectée et présente presque les mêmes résultats pour les traitements en NTC dispersés avec et sans CMC, qui peut être expliqué par la capacité d'absorption hydrominérale c'est-à-dire une corrélation positive entre la germination et la longueur des racines.

L'effet de ces traitements avec les NTC sur les pigments du haricot est bien visible surtout avec le traitement N3C1 qui manifeste les valeurs les plus élevées pour les chlorophylles a et b, et en présence de la CMC, les chlorophylles a et b sont plus synthétisés qu'en son absence, qui peut être justifié par l'effet de la

CMC sur les NTC en fonction de la concentration et la pénétration des NTCs à l'intérieur des différentes parties de la plante.

Les travaux de Lin *et al*, ont montré que les MWCNTs diminuent la quantité de la chlorophylle [72], alors que pour notre étude, les NTC dispersés provoquent une augmentation de cette dernière.

Il a été aussi rapporté dans des études similaires que le Nano-TiO₂ anatase pourrait améliorer l'absorption de lumière et de promouvoir l'activité de la Rubisco activase d'épinards [119]. Aussi, dans une autre étude qui concerne l'impact des MWCNT sur la physiologie végétale, l'exposition des plantules de blé à 50mg/L de MWCNTs préparés en GA n'a pas d'incidence sur l'activité photosynthétique car la chlorophylle a, la chlorophylle b et les caroténoïdes sont restées inchangée après 7 jours d'exposition [120].

La teneur en sucres solubles dans les organes testés a enregistré la plus grande valeur au niveau du traitement avec la CMC seule, mais sa présence en fonctionnalisation avec les NTCs fait diminuer la quantité des sucres par rapport aux traitements avec ces derniers. Ces résultats peuvent être justifiés par la présence des nanotubes de carbone qui peuvent changer l'effet de la CMC mais avec un mécanisme qu'on n'a pas établi.

La teneur en sucres solubles au niveau des feuilles est augmentée avec la concentration en NTCs à 2 mg/L avec et sans CMC, en revanche, elle est plus faible au niveau des racines pour tous les autres traitements.

Le dosage de la proline dans les réponses des plantes au stress salin, au stress hydrique et aux faibles températures est connu depuis longtemps [121, 122], l'augmentation de cet acide aminé répond en général à un stress dans les plantes [123].

Au cours de notre étude, les traitements testés ont provoqué une augmentation légère de la proline au niveau de tous les organes de la plante (feuilles, tiges et racines). La même concentration en nanotubes de carbone dispersés avec et sans CMC donne presque le même résultat sauf le traitement N3C0 qui manifeste des valeurs faibles au niveau des feuilles et racines et

élevées dans la tige, ce qui traduit probablement les valeurs de la biomasse fraîche et la longueur des racines de ce dernier et aussi la faible quantité en sucres solubles accumulées dans les feuilles et les racines.

La production des gousses a augmenté au niveau des traitements testés par rapport au témoin qui manifeste la plus faible valeur chez le haricot, nous remarquons que le traitement N0C1 qui a donné le meilleur résultat que les autres traitements, ce qui peut être justifié par les résultats des autres paramètres qui sont en général plus élevés par rapport au témoin qui reste assez faible, et on peut expliquer ce phénomène par la plus faible taille des nanotubes de carbone qui ont la capacité de pénétration dans la graine au début du développement et puis la capacité de transporter les molécules pour une bonne croissance

Il a été aussi constaté plusieurs nodosités dans les racines qui sont le système défensif de la plante en présence de corps étrangers et ce phénomène lui permet une très bonne assimilation de l'azote et donc un développement et croissance plus prononcé. Ce phénomène était plus significatif en présence de nanotubes de carbones seuls.

A l'état dispersé, il a été remarqué que l'agent dispersant contribue d'une façon très remarquable sur le comportement de la plante et aussi sur les paramètres physiologiques et morphologiques des différents organes de la plante.

CONCLUSION

L'objectif de cette étude s'oriente vers un cadre écotoxicologique ; il s'agit de l'étude de l'impact des nanotubes de carbone biparois sur la croissance des paramètres morphologiques et physiologiques d'une espèce végétale ; le haricot commun

Le choix de ce type de nanomatériaux est basé sur le développement dans le domaine des nanotechnologies et l'utilisation croissante des nanotubes de carbone dans la fabrication de plusieurs articles commercialisés (pneumatique, loisirs et sports, informatique) et donc une dernière destinée dans l'environnement après usage et comme rejet (eau, air et sol),

D'après les résultats trouvés, nous avons remarqué une influence des nanotubes de carbone sur les paramètres de croissance morphologiques.

La première étape de germination de l'espèce végétale étudiée ; la variété Djadida a révélé une action positive sur tous les paramètres étudiés. En effet pour une teneur en NTC de 2mg/L, on a enregistré une élévation de 34% sur les taux de germination. La biomasse fraîche des racines s'est manifestée avec une progression de 62,5%.

Dans la deuxième étape de l'étude, les résultats ont montré un bon développement en présence des nanotubes de carbone dispersés par la carboxyméthylcellulose sur tous les paramètres morphologiques (la longueur et la biomasse fraîche des racines et tiges).

La chlorophylle a été plus synthétisée avec les nanotubes de carbone et surtout en présence de la CMC.

Les nanotubes de carbone ont provoqué une augmentation de sucres solubles dans les feuilles et les racines du *haricot commun* surtout dans le traitement de la CMC seule et les traitements des NTC seuls.

La quantité de la proline accumulée dans tous les organes de la plante choisie n'indique pas une grande influence remarquable des nanotubes de carbone à cause de son augmentation qui est légère par rapport au témoin.

En fin de cycle, un bon rendement en nombre de gousses a été obtenu.

En conclusion, on peut affirmer par cette présente étude que sur le plan morphologique et physiologique, les nanotubes de carbone se sont montrés très bénéfiques ; résultat à priori encourageant pour les agriculteurs mais on est très loin pour prétendre que les nanotubes de carbone ne sont pas toxiques.

Cette étude est très loin d'être achevée, bon nombre de recommandations s'imposent

- Etudier l'effet des nanotubes de carbone sur les paramètres génétiques (ADN et ARN)
- Mettre en évidence du stress ou non de la plante en présence de nanotubes de carbone
- L'utilisation des méthodes microscopiques pour pouvoir répondre à la question de leur présence ou non dans les organes de l'espèce.
- Etudier le mécanisme qui peut aider la plante à se développer. La présence des nanotubes dans le sol ou dans les eaux d'irrigation qui influe le plus. Faire une caractérisation du sol avant traitement et après traitement et puis après la récolte du fruit pour voir si les NTC sont adsorbés sur la terre ou ils sont véhiculés par l'eau de drainage ou dans la plante.

APPENDICE A: LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique.

BCMV: Bean Common Mosaic Virus

CCVD: Dépôt Chimique en phase Vapeur Catalytique

DWNTs: Double-walled Carbon *Nanotube* (nanotube de carbone double-paroi).

FAO: Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.

MWNTs: Multi-Walled carbon Nanotube (nanotube de carbone multi-paroi).

NF- κ B: nuclear factor- κ B.

NTC: Nanotube de Carbone.

PMG: Poids Moléculaire de la Graine

SDBS: Sodium Dodécyl Benzène sulfonate.

SDS: Sodium Dodécyl Sulfate.

SWNTs: Single-walled carbon Nanotube (nanotube de carbone mono-paroi).

APPENDICE B: LES TABLEAUX D'ANALYSE DE VARIANCE

Annexe 01 : Le pourcentage de germination

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	1042,61	23	45,33	661,07	0,0000	0,47	0,6%
	VAR. FACTEUR 1	1039,02	7	148,43				
	VAR. RESIDUELLE 1	3,59	16	0,22				

Annexe 02 : La biomasse des cotylédons

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	0,06	23	0,00	3,27	0,0235	0,04	8,1%
	VAR. FACTEUR 1	0,04	7	0,01				
	VAR. RESIDUELLE 1	0,03	16	0,00				

Annexe 03 : La biomasse de la radicule.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	0,02	23	0,00	12,01	0,0000	0,01	6,2%
	VAR. FACTEUR 1	0,02	7	0,00				
	VAR. RESIDUELLE 1	0,00	16	0,00				

Annexe 04 : La Longueur de la racine.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	6,00	23	0,26	5,22	0,0031	0,34	6,8%
	VAR. FACTEUR 1	4,17	7	0,60				
	VAR. RESIDUELLE 1	1,83	16	0,11				

Annexe 05 : La biomasse fraiche des tiges.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	0,42	23	0,02	14,03	0,0000	0,06	4,5%
	VAR. FACTEUR 1	0,36	7	0,05				
	VAR. RESIDUELLE 1	0,06	16	0,00				

Annexe 06 : La biomasse fraiche de la racine.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	0,52	23	0,02	9,42	0,0001	0,08	18,2%
	VAR. FACTEUR 1	0,42	7	0,06				
	VAR. RESIDUELLE 1	0,10	16	0,01				

Annexe 07 : La longueur aérienne.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	136,50	23	5,93	1,42	0,2629	2,29	11,8%
	VAR. FACTEUR 1	52,36	7	7,48				
	VAR. RESIDUELLE 1	84,13	16	5,26				

Annexe 08 : La Longueur souterraine

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	63,36	23	2,75	8,00	0,0003	0,94	10,5%
	VAR. FACTEUR 1	49,28	7	7,04				
	VAR. RESIDUELLE 1	14,08	16	0,88				

Annexe 09 : La chlorophylle a.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	133,04	23	5,78	6,22	0,0013	1,49	14,9%
	VAR. FACTEUR 1	97,31	7	13,90				
	VAR. RESIDUELLE 1	35,73	16	2,23				

Annexe 10 : la chlorophylle b.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	699,84	23	30,43	21,27	0,0000	2,06	26,4%
	VAR. FACTEUR 1	631,93	7	90,28				
	VAR. RESIDUELLE 1	67,91	16	4,24				

Annexe 11: Chlorophylle a + Chlorophylle b.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE FINALE	VAR. TOTALE	1171,15	23	50,92	60,24	0,0000	1,64	9,2%
	VAR. FACTEUR 1	1128,34	7	161,19				
	VAR. RESIDUELLE 1	42,81	16	2,68				

Annexe 12 : La chlorophylle a / chlorophylle b.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROB A	E.T	C.V
COUPE FINALE	VAR. TOTALE	23,57	23	1,02	12,11	0,0000	0,48	27,2 %
	VAR. FACTEUR 1	19,83	7	2,83				
	VAR. RESIDUELLE 1	3,74	16	0,23				

Annexe 13 : Sucres solubles dans les feuilles.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	17,72	23	0,77	139,46	0,0000	0,13	11,8%
	VAR. FACTEUR 1	17,43	7	2,49				
	VAR. RESIDUELLE 1	0,29	16	0,02				

Annexe 14 : Sucre soluble dans les racines.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	0,26	23	0,01	12,05	0,0000	0,05	13,1%
	VAR. FACTEUR 1	0,22	7	0,03				
	VAR. RESIDUELLE 1	0,04	16	0,00				

Annexe 15 : La proline des feuilles.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	0,03	23	0,00	15,62	0,0000	0,01	7,9%
	VAR. FACTEUR 1	0,02	7	0,00				
	VAR. RESIDUELLE 1	0,00	16	0,00				

Annexe 16 : La proline des tiges.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	0,04	23	0,00	23,36	0,0000	0,01	9,0%
	VAR. FACTEUR 1	0,03	7	0,00				
	VAR. RESIDUELLE 1	0,00	16	0,00				

Annexe 17 : La proline des racines.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROBA	E.T	C.V
COUPE Finale	VAR. TOTALE	0,03	23	0,00	11,43	0,0000	0,02	10,7%
	VAR. FACTEUR 1	0,02	7	0,00				
	VAR. RESIDUELLE 1	0,00	16	0,00				

Annexe 18 : Le nombre des gousses.

	SOURCE DE VARIATION	S.C.E	DDL	CARRES MOYENS	TEST F	PROB A	E.T	C.V
COUPE FINALE	VAR. TOTALE	74,63	23	3,24	6,54	0,0010	1,10	28,4 %
	VAR. FACTEUR 1	55,29	7	7,90				
	VAR. RESIDUELLE 1	19,33	16	1,21				

APPENDICE C: LES TABLEAUX DE RESULTATS

Annexe 1: Le pourcentage de germination

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
%Germination	64,28	85,64	71,76	78,56	85,73	78,57	78,75	78,65
	± 0,95	± 0,58	± 0,30	± 0,42	± 0,08	± 0,12	± 0,40	± 0,33
	D	A	C	B	A	B	B	B

Annexe 2: La biomasse fraiche des cotylédons

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Biomasse cotylédons(g)	0,50±	0,49±	0,53±	0,51±	0,56±	0,41±	0,52±	0,49±
	0,06	0,03	0,02	0,03	0,04	0,07	0,03	0,02
	A B	A B	A	A B	A	B	A	A B

Annexe 3: La biomasse fraiche des racicules

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Biomasse racicule(g)	0,16±	0,16±	0,26±	0,19±	0,19±	0,19±	0,20±	0,20±
	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03
	C	C	A	B	B	B	B	B

Annexe 4: la longueur des racicules

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Long racicule(cm)	4,67±	5,47±	4,73±	5,07±	5,53±	4,20±	4,73±	5,13±
	0,35	0,15	0,32	0,40	0,60	0,10	0,25	0,25
	A B	A	A B	A	A	B	A B	A

Annexe 5: La biomasse fraiche des tiges

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Biomasse fraiche tige (g)	1,24±	1,44±	1,36±	1,55±	1,25±	1,17±	1,25±	1,45±
	0,02	0,11	0,06	0,04	0,01	0,05	0,05	0,08
	C D	A B	B C	A	C D	D	C D	A B

Annexe 6: La biomasse fraiche racinaire

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Biomasse fraiche racinaire(g)	0,32±	0,48±	0,37±	0,73±	0,43±	0,50±	0,38±	0,28±
	0,05	0,15	0,06	0,10	0,06	0,07	0,06	0,04
	B C	B C	B C	A	B C	B	B C	C

Annexe 7: La longueur aérienne

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Long aér (cm)	19,00± 1,00	20,50± 1,32	18,67± 4,93	20,00± 1,73	16,25± 0,90	20,33± 2,84	21,50± 1,32	19,33± 1,15

Annexe 8: La longueur souterraine

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Long partie souterraine(cm)	6,67± 0,76 C	7,83± 0,76 B C	8,33± 0,76 B C	10,25± 0,66 A B	11,67± 1,53 A	9,00± 1,00 B C	9,17± 1,04 B	8,25± 0,66 B C

Annexe 9: La chlorophylle a

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Chlorophylle a (mg/l MF)	8,25± 1,64 B	11,52± 1,71 B	8,69± 2,25 B	9,96± 0,77 B	8,24± 0,22 B	9,49± 1,08 B	9,32± 1,28 B	14,64± 1,93 A

Annexe 10: La chlorophylle b

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
CHLOROPHYL B (mg/l MF)	5,18± 1,77 B	8,21± 1,24 B	6,86± 4,44 B	16,97± 0,76 A	3,53± 0,68 B	3,16± 0,26 B	3,14± 0,86 B	15,36± 2,77 A

Annexe 11: La chlorophylle a + la chlorophylle b

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
CH A+CH B (mg/l MF)	10,09± 3,16 d	19,47± 0,88 c	18,55± 1,48 c	26,63± 1,48 b	11,77± 0,87 d	12,66± 0,84 d	12,52± 1,85 d	29,83± 1,45 a

Annexe 12: Le rapport entre la chlorophylle a et b

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
CH A /CH B	1,68± 0,57 B C	1,53± 0,29 B C	0,89± 0,28 C	0,59± 0,02 C	2,40± 0,53 A B	3,03± 0,58 A	3,11± 0,81 A	0,99± 0,33 C

Annexe 13: Le sucre soluble dans les feuilles

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
S/S	0,83±	2,69±	0,50±	0,21±	2,25±	1,48±	0,62±	0,49±
FEUILLE (µg/g MF)	0,02 D	0,35 A	0,01 E	0,04 F	0,07 B	0,12 C	0,03 D E	0,05 E

Annexe 14: Le sucre soluble dans les racines

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
S/S	0,33±	0,52±	0,52±	0,27±	0,46±	0,26±	0,36±	0,38±
RACINE (µg/g MF)	0,04 C	0,05 A	0,10 A	0,01 C	0,05 A B	0,01 C	0,01 B C	0,06 B C

Annexe 15: La proline dans les feuilles

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Proline feuille	0,16±	0,19±	0,18±	0,18±	0,20±	0,21±	0,20±	0,11±
(µg/g MF)	0,02 B	0,02 A B	0,01 A B	0,01 A B	0,02 A	0,01 A	0,02 A	0,01 C

Annexe 16: La proline dans les tiges

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Proline tige (µg/g MF)	0,13±	0,19±	0,11±	0,09±	0,18±	0,17±	0,17±	0,21±
	0,01 C	0,02 A B	0,02 C D	0,01 D	0,02 B	0,02 B	0,02 B	0,01 A

Annexe 17: La proline dans les racines

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Proline racine	0,14±	0,18±	0,16±	0,18±	0,19±	0,18±	0,13±	0,09±
(µg/g MF)	0,03 A B	0,02 A	0,01 A B	0,02 A	0,01 A	0,02 A	0,01 B	0,02 C

Annexe 18: L'estimation du nombre de gousses

	N0C0	N0C1	N1C0	N1C1	N2C0	N2C1	N3C0	N3C1
Nombre de gousse	2,00±	6,67±	5,33±	2,67±	2,67±	3,00±	5,00±	3,67±
	1,00 C	1,53 A	1,53 A B	1,15 B C	0,58 B C	1,00 B C	1,00 A B	0,58 B C

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Khodakovskaya, M., Dervishi, E., Mahmood, M., *et al.* "Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth". *ACS Nano* 3(10), (2009), 3221-7.
2. Kroto, H.W., Heath, J.R., O'Brien, S.C., Curl, R.F., and Smalley, R.E., "C60: Buckminster fullerene". *Nature*, 368, (1985).
3. Krätschmer, W., Lamb, L.D., Fostiropoulos, K., and Huffman, D.R., "Solid C60: a new form of carbon". *Nature*, 347, (1990).
4. Iijima, S., "Helical microtubules of graphitic carbon". *Nature*, 354(6348), (1991), 56–58.
5. Iijima, S., Ichihashi, T., "Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter". *Nature*, 363, 603; (1993).
6. Bethune, D. S., Klang, CH., de Vries, MS., Gorman, G., Savoy, R., Vasquez, J., Beyers. R., "Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls", *Nature*, 363-605, (1993).
7. Oberlin, A., Endo, M., Koyama, T., "Filamentous growth of carbon through benzene decomposition". *Journal of Crystal Growth*, 32, (1976).
8. Andreas, R. K., Claudia, S., Aasgeir, H., Fadri, G., " Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle". *Journal of Cleaner Production*, 16, (2008), 927- 937.
9. Zhu, J., Kim, JD., Peng, H., Margrave, JL., Khabashesku, VN., Barrera, EV., "Improving the dispersion and integration od single-walled carbon nanotubes in epoxy composites through functionalization". *Nano Letters*, 3, (2003), 1107.
10. Flahaut, E., Bacsa, R., Peigney, A., Laurent, C., "Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes", *Chemical Communications*, 9 (12), (2003), 1442 p.
11. Flahaut, E., Peigney, A., Laurent, Ch., Rousset, A., "synthesis of single walled carbon nanotube Co-MgO composite powders and extraction of the nanotubes". *Mater, Chem*, 10, (2000), 249-252
12. Yamada, T., Namai, T., Hata, K., Hata, D. N., Futaba, K. D., Mizuno, N., Fan, J., Yudasaka, M., Yumura, M., Iijima, S., "Size-selective growth of double-walled carbon nanotube forests from engineered iron catalysts". *Nature Nanotechnology*, 1, (2006), 131-136.
13. Luy, S. C., Lee, T. J., Yang, C. W., Lee, C. J., "synthesis and characterization of high quality double-walled carbon nanotubes by catalytic decomposition of alcohol". *Chem. Comm.*, (2003) 1404-1405.
14. Gruneis, A., Rummeli, M. H., Kramberger, C., Barreiro, A., Pichler, T., Pfeiffer, R., Kuzmany, H., Gemming, T., Buchner, B., "High quality double wall carbon nanotubes with a defined diameter distribution by chemical vapor deposition from alcohol". *Carbon*, 44, (2006), 3177-3182.
15. Saito, R., Dresselhaus, G., Dresselhaus, M.S., "Physical properties of carbon nanotubes", Imperial College Press, (1998), London.

16. Treacy, MJ., Ebbesen, TW., Gibson, JM., "Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes", *Nature*, 381, 678; (1996).
17. Krishnan, A., Dujardin, E., Ebbesen, TW., Yianilos, PN., Treacy, MJ., "Young's modulus of single-walled nanotubes". *Physical Review B*, 58 (20), (1998), 14013.
18. Iijima, S., Brabec, C., Maiti, A., Bernholc, J., "Structural flexibility of carbon nanotubes". *Journal of Chemical Physics*, 104 (5), (1996), 2089.
19. Walters, DA., Ericson, LM., Casavant, MJ., Liu, J., Colbert, DT., Smith, KA., Smalley, RE., "Elastic strain of freely suspended single-wall carbon nanotubes ropes". *Applied Physics Letters*, 74 (25), (1999), 3803.
20. Yu, M-F., Files, BS., Arepalli, S., Ruoff, RS., "Tensile loading of ropes of single wall carbon nanotubes and their mechanical properties". *Physical Review Letters*, 84 (24), 5552, (2000).
21. Toray (fibres de carbone, PPS, PTFE) ; <http://www.toray.com>
22. Lu, K.L., Lago, R.M., Chen, Y.K., Green, M.L., Harris, P.J.F., Tsang, S.C., "Mechanical damage of carbon nanotubes by ultrasound". *Carbon*, 34, (1996), 814.
23. Chen, J., Hamon, MA., Hu, H., Chen, Y., Rao, AM., Eklund, PC., Haddon, R., "Solution Properties of Single-Walled Carbon Nanotubes". *Science*, 282, (1998), 95.
24. Curran, SA., Ajayan, PM., Blau, WJ., Carroll, DL., Coleman, JN., Dalton, AB., Davey, AP., Drury, A., McCarthy, B., Maier, B., Strevens, A., "A Composite from Poly(*m*-phenylenevinylene-co-2,5-dioctoxy-*p*-phenylenevinylene) and Carbon Nanotubes: A Novel Material for Molecular Optoelectronics". *Advanced Materials*, 10 (14), (1998), 1091.
25. Balavoine, F., Schultz, P., Richard, C., Mallouh, V., Ebbesen, TW., Miokowski, C., "Helical crystallization of proteins on carbon nanotubes : A first step towards the development of new biosensors" , *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38, (1999), 1913.
26. Badaire, S., "Etude de suspensions et de fibres de nanotubes de carbone", Thèse – Université Bordeaux I, (2005).
27. Linqin, J., Lian G., Jing S., "Production of aqueous colloidal dispersions of carbon nanotubes". *J. Colloid and Interface Science*, 260, (2003), 89–94.
28. Strano, M.S., Moore, V.C., Miller, M.K., Allen, M.J., Haroz, E.H., Kittrell, C., Hauge, R.H., Smalley, R.E., "The Role of Surfactant Adsorption during Ultrasonication in the Dispersion of Single-walled Carbon Nanotubes". *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 3, 81; (2003).
29. Yurekli, K., Mitchell, C.A., Krishnamoorti, R., "Small-angle neutron scattering from surfactant-assisted aqueous dispersions of carbon nanotubes". *Journal of the American Chemical Society*, 126 (32), (2004), 9902,.
30. Pénicaud, A., Poulin, P., Derré, A., Anglaret, E., Petit, P., "Spontaneous dissolution of a single-wall carbon nanotube salt". *Journal of American*

- Chemical Society*, 127, 8, (2005).
31. Dong, L., Joseph, K. L., Witkowski, C. M., Craig, M. M., "Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes suspended in various surfactants". *Nanotechnology*, 19, 255702, (2008), 5p.
 32. Monteiro-Riviere, A. O., Inman, Y. Y., Wang, R. J., Nemanich, "Surfactant effects on carbon nanotube interactions with human keratinocytes". *Nanomedicine*, 1(4), (2005), 293–299.
 33. Chin, SF., Baughman Ray, H., Dalton Alan, B., Dieckmann Gregg, R., et al. "Amphiphilic helical peptide enhances the uptake of single-walled carbon nanotubes by living cells". *Exp Biol Med (Maywood)*, 232(9), (2007), 1236-1244.
 34. Salvador-Morales, C., Townsend P., Flahaut, E., et al. "Binding of pulmonary surfactant proteins to carbon nanotubes; potential for damage to lung immune defense mechanisms". *Carbon*, 45, (2007), 607-617.
 35. Rosen, M. J., Li, F., Morrall, S. W., Versteeg, D. J., "The relationship between the interfacial properties of surfactants and their toxicity to aquatic organisms". *Environ Sci Technol*, 35, (2001), 954-959.
 36. Wick, P., Manser, P., Limbach, L. K., et al. "The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity". *Toxicol Lett*, 168(2), (2007), 121–131.
 37. Union Européenne, Recommandation de la commission du 7 février 2008 concernant un code de bonne conduite pour une recherche responsable en nanosciences et nanotechnologies. Journal officiel de l'Union européenne (2008).
 38. Lanone, S., Boczowski, J., "Effets des nanomatériaux sur la santé Environnement". *Environnement, Risques et Santé*, 4, (2005), 405-409.
 39. Warheit, DB., Laurence, BR., Reed, KL., et al. "Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats". *Toxicol Sci* 77, 1, (2004), 117-125.
 40. Cliff, R., "Special Session of the Joint Meeting: Potential Implication of Manufactured Nanomaterials for Human Health and Environmental Safety", 7th June 2005.
 41. Comité de la Prévention et de la Précaution, Nanotechnologies Nanoparticules, Mai 2006.
 42. Oberdörster, G., Stone, V., Donaldson, K., "Toxicology of nanoparticles: A historical perspective". *Nanotoxicology*, 1(1), (2007), 2-25.
 43. Pantarotto, D., Briand, JP., Prato, M., et al. "Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes". *Chem Comm* (2004), 16-17.
 44. Cherukuri, P., Bachilo, S. M., Litovsky, S. H., et al. "Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells". *J Am Chem Soc*, 126(48), (2004), 15638–15639.
 45. Singh, R., Pantarotto, D., Lacerda, L., Pastorin, G., Klumpp, C., Prato, M., Bianco, A., and Kostarelos, K. "Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(9), (2006), 3357–3362.
 46. Elgrabli, D., Floriani, M., Abella-Gallart, S., Meunier, L., Gamez, C., et al. "Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung". *Particle and Fibre Toxicology* (2008), 5-20.

47. Ellinger-Ziegelbauer, H., Pauluhn, J., "Pulmonary toxicity of multi-walled carbon nanotubes (Baytubes®) relative to α -quartz following a single 6 h inhalation exposure of rats and a 3 months post-exposure period". *Toxicology* 266 (2009) 16–29.
48. Magrez, A., Kasas, S., Salicio, V., *et al.* "Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials". *Nano Lett*, 6(6), (2006), 1121–1125.
49. Shvedova, AA., Castranova, V., Kisin, ER., *et al.* "Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells". *J Toxicol Environ Health A*. (2003) Oct 24; 66(20),1909-26.
50. Manna, S. K., Sarkar, S., Barr, J., *et al.* "Single-walled carbon nanotube induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kappaB in human keratinocytes". *Nano Lett*, 5(9), (2005), 1676–1684.
51. Murr, LE., Garza, KM., Soto, KF., *et al.* "Cytotoxicity assessment of some carbon nanotubes and related carbon nanoparticle aggregates and the implications for anthropogenic carbon nanotube aggregates in the environment". *Int J Environ Res Public Health*. 2(1), (2005) Apr, 31-42.
52. Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., *et al.* "Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis". *Toxicol Lett*. 160(2), (2006), 121–126.
53. Zhu, X., Zhu, L., Li, Y., *et al.* "Developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: buckminsterfullerene aggregates (nC60) and fullerol". *Environ Toxicol Chem*. 26(5), (2007), 976-9.
54. Kisin, E.R., Murray, A.R., Keane, M.J., *et al.* "Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells". *J Toxicol Environ Health A*, 70, (2007), 2071-2079.
55. Lindberg, HK., Falcka, G., Suhonena, S., *et al.* "Genotoxicity of nanomaterials: DNA damage and micronuclei induced by carbon nanotubes and graphite nanofibres in human bronchial epithelial cells *in vitro*". *Toxicology Letters*. 186, (2009), 166–173.
56. Migliore, L., Saracino, D., Bonelli, A., *et al.* "Carbon nanotubes induce oxidative DNA damage in RAW 264.7 cells". *Environ Mol Mutagen*. 51(4), (2010) May, 294-303.
57. Pacurari, M., Yin, Zhao, *et al.* "Raw Single-Wall Carbon Nanotubes Induce Oxidative Stress and Activate MAPKs, AP-1, NF- κ B, and Akt in Normal and Malignant Human Mesothelial Cells". *Environmental Health Perspectives*. Vol .116, num. 9, September 2008.
58. Carrero-Sanchez, JC., Elías, AL., Mancilla, R., *et al.* "Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen". *Nano Lett*. 2006 Aug, 6(8):1609-16.
59. Patlolla, A., Knighten, B., Tchounwou, P., "Multi-walled carbon nanotubes induce cytotoxicity, genotoxicity and apoptosis in normal human dermal fibroblast cells". *Ethn Dis*. 20(1 Suppl 1), 2010 Winter, S1-65-72.
60. Wörle-Knirsch, J. M., Pulskamp, K., and Krug, H. F., "Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays". *Nano Lett*, 6(6), (2006), 1261–1268.
61. Casey, A., Davoren, M., Herzog, E., *et al.* "Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing". *Carbon*, 45(1), (2007), 34–40.
62. Velzeboer, I., Hendriks, AJ., Ragas, AMJ., *et al.* "Aquatic ecotoxicity tests

- of some nanomaterials". *Environ. Toxicol. Chem.* 27(9), (2008), 1942-1947.
63. Olasagasti, M., Alvarez, N., Vera, C., *et al.* "Evaluation of MWNTC toxic effects on daphnia and zebrafish embryos". *J. Phys: Conference Series* 170, (2009), 012018.
 64. Galloway, T., Lewis, C., Dolciotti, I., *et al.* "Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete". *Environ. pollution* 158(5), (2010), 1748-55.
 65. Mouchet, F., Landois, P., Datsyuk, V., Puech, P., Pinelli, E., Flahaut, E., Gauthier, L., "Use of the international amphibian micronucleus standardised procedure (ISO 21427-1) for in vivo evaluation of double-walled carbon nanotubes (DWNTs) toxicity and genotoxicity in water". *Env. Toxicology*, 2009, DOI : 10.1002/tox.20537.
 66. Indu, B., Bhumi, N. T., "Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment", *Chemosphere*, 82, (2011), 308–317.
 67. Stampoulis, D., Sinha, SK., White, JC., "Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants". *Environ. Sci. Technol.* 43(24), (2009), 9473-9.
 68. Cañas. J.E., Long. M., Nations. S., *et al.* "Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species". *Environ. Toxicol. Chem.* 27(9) (2008), 1922-31.
 69. Daohui, L., Baoshan, X., "Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth". *Environ Pollut.* 150(2), (2007), 243-250.
 70. Scott-Fordsmand, JJ., Krogh, PH., Schaefer, M., *et al.* "The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms". *Ecotoxicol. Environ. Safety* 71(3), (2008), 616-9.
 71. Liu, Q., Chen, B., Wang, Q., *et al.* "Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells". *Nano Lett.* 9(3), (2009), 1007-10.
 72. Lin; C., Fugetsu, B., Su, Y., Watari, F., "Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on *Arabidopsis* T87 suspension cells". *J. Hazard Mater.* 170(2-3), (2009), 578-83.
 73. Dore, C., Varoquaux, F., "Histoires et amélioration de cinquante plantes cultivées", Ed INRA, Paris, (2006).
 74. Chaux, C., et Foury, C., "Production légumière: Légumineuses potagères, Légumes fruits", Tome 3, Ed Tec et Doc, Lavoisier, (1994), 563.
 75. Peron, J.Y., "Référence, productions légumières", 2eme édition, Ed Lavoisier, (2006), 613 p.
 76. Wortmann, C.S., Kirkby, R.A., Eledu, C.A., Allen, D.J., Atlas of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Africa. CIAT, Cali, Colombia (1998).
 77. Nyabyenda, P., "Les plantes cultivées en régions tropicales d'altitude d'Afrique : Généralités, Légumineuses alimentaires, Plantes à tubercules et racines, Céréales". Gembloux : Presses Agronomiques de Gembloux (2005).
 78. Anonyme. "La ministère de l'agriculture service des statistiques", (2006).
 79. Salontai et Muntean, "Cours de phytotechnie", Tipo - agronomia Cluz Napoka (1982). 264-282.
 80. Caburet, A., Lethève, H. C., "Agriculture spéciale. Les plantes à autres

- usages: les plantes médicinales, cosmétiques, à parfum et à huiles". Montpellier : CIRAD, (2002), 1203-1222.
81. Dita, M.A., Rispaïl, N., Prats, E., Rubiales, D., Singh, K.B. "Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes". *Euphytica* 147, (2006), 1-24.
 82. Bezpaly, I., "Les plantes cultivées en Afrique occidentale" .Ed. MIR. Moscou. (1984), 104.
 83. CHAUX, C., « Production légumière », Ed J.B Baillièrre, 1972, 414.
 84. Messiaen, C. N., "Le potager tropical". Ed. Techniques vivantes, 1989, 341-343.
 85. Kolev, N., "Les cultures maraîchères en Algérie", Tome I, "légumes fruits", I.T.C.M.I. Staouili, (1976), 6-33.
 86. Indria et al., "Guide pratique pour les cultures légumières". Cluj et Napoca (1988), 55-58.
 87. Messiaen, C. N., "Le potager tropical 2". Cultures spéciales, (1975), 300-316.
 88. Guide de fertilisation des cultures maraichères en Algérie. I. T. C.M.I Staoueli, (1989), 39.
 89. Laumonier, R., "Cultures légumières et maraîchères", Tome III, Ed J.B Baillièrre, Paris, (1979), 1276p.3
 90. Voinea et Maier, "Les cultures légumières". Edition CERES, Bucaresti, (1976), 115-129
 91. HENRI, "La fertilisation des cultures légumières". Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes, 1983, 287-293.
 92. Gama, P. B. S., Inanaga, S., Tanaka, K., Nakazawa, R., "Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (2), (2007), 079-088.
 93. ITCMI, "Guide pratique des cultures maraichères". (1997).
 94. Mahuku, G., Montoya, C., Henriquez, M.A., Jara, C., Teran, H., Beebe, S., "Inheritance and characterization of angular leaf spot resistance gene present in common bean accession G 10474 and identification of an AFLP marker linked to the resistance gene". *Crop Sci* 44, (2004), 1817-1824.
 95. FAO., « La production mondiale de haricots verts », 2006.
 96. Bayuelo-Jiménez, J., Debouck, D.G., Lynch, J.P., "Salinity tolerance in *Phaseolus* species during early vegetative growth". *Crop Science*, (2002), 2184.
 97. Aydin, A., Tusan, M., Sezen, Y., "Effect of sodium salt on growth and nutrient uptake of spinach (*Spinacea oleracea*) and bean (*Phaseolus vulgaris*)" (1997).
 98. Schwartz, H.F., Pastor-Corrales, M.A., Singh, S.P., "New sources of resistance to anthracnose and angular leaf spot of beans (*Phaseolus vulgaris* L.)". *Euphytica* 31, (1982), 741- 754.
 99. Melotto, M., Balardin, R.S., Kelly, J.D., "Host-pathogen interaction and variability of *Colletotrichum lindemuthianum*". (2000). *In*: Prusky, D.,

- Freeman, S., Dickman, M.B., eds, "Colletotrichum *host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*". St. Paul, Minnesota, USA: APS Press, 346-361
100. Abawi, G.S., Pastor Corrales, M.A., "Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies and management strategies". (1990), CIAT, C27ali, Colombia 114p.
 101. Snapp, S., Kirk, W., Roman-Avilés, B., Kelly, J., "Root traits play a role in integrated management of *Fusarium* root rot in snap beans". Hortscience 38, (2003), 187-191.
 102. Taylor, J.D., Teverson, D.M., Allen, D.J. Pastor-Corrales, M.A., "Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas". Plant Pathol. 45 (3), (1996), 469-478.
 103. Lamppa, R.S., Gross, P.L., Del Rio, L.E., "Races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaeolicola* in North Dakota". Annu Rep Bean Improv Coop 45, (2002), 104–105.
 104. Hillocks, R.J., Madata, C.S., Chirwa, R., Minja, E.M., Msolla, S., "*Phaseolus* bean improvement in Tanzania", 1959–2005. Euphytica 150,(2006), 215 – 231. DOI: 10.1007/s10681-006-9112-9.
 105. Kornegay, J., Cardona C., van Esch, J., Alvarado, M., "Identification of common bean lines with ovipositional resistance to *Empoasca kraemeri* (Homoptera: Cicadellidae)". J Econ Entomol 82, (1989), 649–654.
 106. Rendón, F., Cardona, M.C., Bueno, J.M., "Losses caused by *Trialeurod vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) and *Trips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) on snap beans in the Cauca Valley of Colombia". Revista Colombiana de Entomología 27 (1- 2), (2001), 39-43.
 107. Sharma, K.K., Lavanya, M., "Recent developments in transgenics for abiotic stress in legumes of the semi-arid tropics". JIRCAS Working Report 23, (2002), 61-73.
 108. Ashraf, M., "Improvement of salt tolerance in some native pulse crops". In: Jaiwal, P.K., Singh, R.P., Gulati, A., eds. "*Strategies for improvement of salt tolerance in higher plants*". New Delhi, India: Oxford and IBH Publishing (1997). Co. Pvt. Ltd, 413-434.
 109. CIAT (1992). "Constraints to and opportunities for improving bean production". A planning document 1993–98. An achievement document 1987–92, CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, Colombia.
 110. Florence, M., Perine, L., Elodie, Sarremejean., Guillaume, Bernard., et al. " Characterisation and in vivo ecotoxicity evaluation of double-wall carbon nanotubes in larvae of the amphibian *Xenopus laevis*". Aquatic Toxicology 87, (2008), 127–137.
 111. Takahashi, T., Tsunoda, K., Yajima, H., Ishii, T., "Dispersion and Purification of Single-Wall Carbon Nanotubes Using Carboxymethylcellulose". Jap. J. Appl. Phys., 43, (2004), 3636-3639.

112. Hills, MJ., "Control of storage-product synthesis in seeds". *Current Opinion in Plant Biology* 7,(2004),302-308.
113. Roitsch, T., "Source-sink regulation by sugar and stress". *Current Opinion in Plant Biology* 2,(1999), 198-206.
114. Korn, M., Peterek, S., Mock, HP., Heyer, AG., Hinch, DK., "Heterosis in the freezing tolerance, and sugar and flavonoid contents of crosses between *Arabidopsis thaliana* accessions of widely varying freezing tolerance". *Plant Cell and Environment* 31, (2008), 813- 827.
115. Crowe, JH., Carpenter, JF., Crowe, LM., Anchordoguy, TJ., "Are freezing and dehydration similar stress vectors - A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules". *Cryobiology* 27, (1990), 219-231.
116. Crowe, JH., Crowe, LM., Carpenter, JF., Wistrom, CA., "Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars". *Biochemical Journal* 242, (1987), 1-10.
117. Garrett Reginald, H., Grisham Charles, M., "Biochimie". Traduction de la 2eme édition américaine par Lubochinsky, B., De Boeck université s. a (2000), p 900
118. Wild, E., Jones, KC., "Novel method for the direct visualization of *in vivo* nanomaterials and chemical interactions in plants". *Environ. Sci. Technol.* 43(14), (2009), 5290-4.
119. Gao, F., Liu, C., Qu, C., Zheng, L., Yang, F., Su, M., Hong, F., "Was improvement of spinach growth by nano-TiO₂ treatment related to the changes of Rubisco activase?". *BioMetals* 21, (2007), 211-217.
120. Camille, L., Mathieu, P., Bertrand, C., et al. "Quantitative evaluation of multi-walled carbon nanotube uptake in wheat and rapeseed". *Journal of Hazardous Materials* 227– 228 (2012) 155– 163
121. Sharma, S.S., Diestz, K.J., "The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress". *J. Exp. Bot.* 57, (2006), 711-726.
122. Ashraf, M., Foolad, M.R., "roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance". *Environ. Exp. Bot.* 59, (2007), 206-216.
123. Aspinall, D., Paleg, L.G., "Proline accumulation: physiological aspects". In: Paleg, L.G., Aspinall, D. (Eds), "the physiology and biochemistry of drought resistance in plants". Academic Press, Sydney, Australia, (1981), 205-240.

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté De Technologie

Département de Chimie industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

En chimie industrielle

Spécialité : Génie de l'environnement

IMPACT DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS DISPERSÉS SUR LA CROISSANCE D'UNE ESPECE VEGETALE LE HARICOT COMMUN

Par

Messaouda BOULMAALI

Devant le jury composé de:

A. BADIS	Professeur	Université de Blida	Président
A. BENRIMA	Professeur	Université de Blida	Examinatrice
H. BOUTOUMI	Maître de conférences (A)	Université de Blida	Examineur
F. FERNANE	Maître de conférences (A)	Université de Tizi Ouzou	Examinatrice
A. HADJ-ZIANE	Maître de conférences (A)	Université de Blida	Directrice de mémoire

BLIDA 2013