

Université Paul Verlaine (Metz) – UFR Sci F. A.

Laboratoire d'Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité Ecosystème UMR 7146 CNRS

Présenté par Eric Béraud

En vue de l'obtention du grade de
Docteur *ès sciences*
mention « Toxicologie de l'environnement »

**Etude des effets génotoxiques et de l'induction des phytochélatines
chez *Vicia faba* (Fabaceae) exposée au cadmium. Application du test
Vicia micronoyaux à des matrices complexes.**

Soutenue publiquement
Le 25 Mai 2007

Membres du Jury :

Mme. C. Van Haluwyn , Professeur, Université de Lille	Rapporteur
M. P. Leroy , Professeur, Université de Nancy	Rapporteur
Mme. C Leyval , Professeur, LIMOS, Nancy	Examineur
Mme N. Nassr-Amellal , Docteur, RITMO, Nambenheim	Examineur
Mme. S. Cotelle , Docteur, Université de Metz	Co-Encadrant de thèse
M. J.F. Féraud , Professeur, Université de Metz	Directeur de thèse

*"Lorsque le dernier arbre aura été abattu,
la dernière rivière polluée, le dernier poisson pêché,
les hommes s'apercevront que l'argent n'était pas comestible."*

Un Chef indien

*" L'homme qui s'est assis sur le sol... pour méditer sur la vie et son sens,
en acceptant une filiation commune à toutes les créatures,
a reconnu l'unité de l'univers. "*

Crazy Horse 1839-1877

*" L'avenir de notre Planète est menacé !
Face aux périls compromettant notre survie,
l'éveil des consciences est impératif
pour nous aider à devenir responsables et solidaires. "*

J. M. Pelt

Bien que la thèse soit communément considérée comme le reflet des travaux d'un doctorant, elle n'en reste pas moins celui de la collaboration de personnes, qui ont, chacune à leur manière, joué un rôle dans l'obtention de ce manuscrit.

Je tiens à remercier le professeur Paule Vasseur qui, il y a quelques années maintenant, m'a accueilli au sein du laboratoire. Cette première expérience m'a permis de me conforter dans le choix de mes études. Dès lors, il m'est apparu comme évident qu'il me fallait poursuivre en Doctorat.

Je remercie aussi le Professeur Jean-François Féraud ainsi que le Docteur Sylvie Cotelle qui, après m'avoir accueilli au sein de leur équipe et encadré durant mon DEA, m'ont donné l'opportunité d'approfondir mes recherches dans le cadre de la thèse. Leur aide, leurs conseils ainsi que leur soutien m'ont aidé à mener à bien ces travaux. Grâce à eux, j'ai eu l'opportunité d'être intégré au sein d'un projet impliquant plusieurs équipes. Cela m'aura permis d'acquérir de l'expérience sur les travaux de groupe, liant autant de personnes.

Je remercie sincèrement Mme Van Haluwyn, Professeur de l'Université de Lille et M Leroy, Professeur de l'Université de Nancy, d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Leyval, Directeur du LIMOS ainsi qu'à Mme Nassr-Amella, Docteur au RITMO, pour avoir consacré de leur temps pour juger mon travail.

Je remercie également le Docteur Pascal Poupin pour sa disponibilité, son soutien et ses précieux conseils, aussi bien en microbiologie qu'en protéomique, le Docteur Marie-Aline Maire pour sa disponibilité et son aide, ainsi que le Docteur Johanne Nahmani pour son aide en statistiques.

Je remercie enfin l'ensemble de l'équipe pour les moments passés au laboratoire : Mireille, pour son aide et sa gentillesse, Marilyne pour son aide dans les démarches administratives, Chantal pour sa bonne humeur et ses talents en pâtisserie (vive les préparations...), sans oublier Rosy, pour son travail dans l'ombre, qui a le mérite de nous simplifier la vie.

J'ai une attention toute particulière pour Mme Claudine Rast et Mme Anne-Marie Veber, pour leur gentillesse, leur disponibilité ainsi que leur soutien dans les moments difficiles.

J'adresse mes remerciements au Professeur Pierre Leroy de la Faculté de Pharmacie de Nancy 1, pour nous avoir aidé à nos débuts dans l'étude des phytochélatines. Je remercie également le Docteur Roberta Ruotolo ainsi que le Professeur Simone Ottonello de l'Université de Parme pour avoir mis à notre disposition un étalon phytochélatines. Je remercie enfin Marion Minoufflet, Doctorant de l'Institut F.A. Forel (Université de Genève) pour nous avoir permis de quantifier les phytochélatines, grâce à une collaboration avec le C.A.B.E. (Laboratoire de chimie analytique et de biophysico-chimie de l'environnement).

Je tiens à remercier également le gouvernement monégasque pour son soutien tout au long de ma scolarité et plus particulièrement lors ces dernières années de thèse.

Je remercie mes camarades pour tous les moments passés ensemble, au laboratoire ou ailleurs.

Marc , ces années passées dans la même équipe nous aurons permis de parfaire nos connaissances cinématographiques, vive la « Shaw brothers ». Cela nous aura aidé à rompre la glace rapidement avec Quang-Ying et aura occasionné de bons fous rires, nous permettant de relâcher la pression à des

moments qui ne s'y prêtaient pas. Cette collaboration aura été fructueuse, j'espère que nous en aurons encore la possibilité, d'ici quelques temps, lorsque nous aurons intégré le milieu professionnel.

La communauté de l'unio ; Aurélie ; l'aventure est longue, difficile, pleine de rebondissements, mais on est content d'en écrire le dernier chapitre. Voici maintenant le moment où la compagnie doit se séparer, mais Gandalfe le blanc veille et il est toujours de bon conseil. Gandalfe, après avoir partagé quelques campagnes avec toi, l'expérience me dit qu'il faut se ranger de ton côté pour gagner. Merci, pour ces bons moments, j'espère que l'on aura l'occasion de faire d'autres campagnes ensemble. Ce sera plus dur, mais le soleil est de mon côté, alors rejoins-moi quand tu veux. Périne, les bons moments n'ont pas manqué à l'occasion de sorties, autour d'un verre, d'un repas, d'un café ou d'un jeu. Cela aura été l'opportunité de bon nombre d'éclats de rire durant lesquels le travail n'avait que peu d'importance, le principal étant de travailler dans la joie et la bonne humeur. J'espère que, dans l'avenir nous aurons encore d'autres occasions comme celles-ci pour passer de bons moments. Nous pourrions, pourquoi pas, nous rappeler de ces bons moments et parler collaboration. Il fait bon aussi de travailler sous le soleil, il faut juste penser à s'en protéger. J'espère que lorsque tu auras l'occasion de lire ces quelques lignes tu seras sur le point de soutenir. Ne t'en fais pas : je te raconterai comment c'est lorsqu'on le vit du bas de l'amphi. Encore merci pour ta collaboration postale, Bonne chance !

Renaud et Pascal, « Pitchra bien qui Pitchra le dernier » maintenant que notre spécialiste est parti, la dernière place cherche preneur. Tout est affaire de doigté. Je ne compte plus les bons moments passés ensemble afin de récupérer de nos fastidieuses journées. Dans l'avenir, cela sera plus dur mais toujours possible, d'autant que, dans le sud, le climat s'y prête mieux, le soleil est au rendez-vous au moins six mois de l'année.

Asma courage, garde le moral et fais preuve de confiance en toi. La fin est proche et ce n'est pas le plus dur qui reste. Dans un futur proche, tu y penseras lorsque à ton tour, tu seras dans ma position. Bonne continuation.

Anne-Sophie, il paraît que « lorsqu'un volcan s'éteint un être s'éveille ». Loin de moi l'idée de me prendre pour un monstre du relief géologique passant au travers des âges, mais j'espère avoir fait correctement mon travail en te passant le flambeau, ainsi que les quelques pistes que j'aurais voulu suivre si le temps ne passait pas si vite, bonne chance pour la suite.

Cai Quan-Ying, il me reste encore beaucoup de progrès à faire en chinois, mais au moins après quelques mois, je maîtrise l'essentiel, je saurai dire bonjour. Cela ne sera pas facile à placer dans une conversation, mais je ne sais pas ce que l'avenir me réserve.

Je n'ometts pas de mentionner les anciens qui nous ont déjà quitté Christophe avec qui nous avons eu de grandes discussions philosophiques autour de « l'expresso » de 12h40. Merci pour ton aide technique et tes conseils. Stéphanie malgré tous nos efforts, tu ne sais toujours pas ce qu'est la vraie musique, pourtant ce n'est pas faute d'avoir essayé. Il paraît que l'union fait la force, malgré cela tu nous auras tenu tête, cela peut être une qualité. Si tel est le cas, j'espère que ça te permettra de ne pas te décourager trop vite. Sinon il ne te reste plus que les bulles, mais à consommer avec modération. Anna merci pour les moments où l'on a apporté un morceau du sud avec nous au travers de recettes culinaires notamment en hiver lorsque le soleil gris ne nous lâchait plus. Merci pour ton aide, car il est vrai que mon Italien est quelque peu rouillé. Eom Ig-Chun, même si la barrière de la langue pouvait poser problème, cela ne nous aura pas empêché de partager quelques bons moments, en découvrant la culture Coréenne à distance, ainsi que sa cuisine.

Je n'oublie pas les derniers arrivés, Yann, François, Marc, Sophie, pour les moments de détente passés à la pause-café ou dans un recoin de couloir, bon courage à tous.

Je ne pourrais terminer ces remerciements, sans une pensée pour quelques-uns de mes anciens professeurs, qui ont su éveiller ma curiosité, réformer radicalement ma méthodologie et me conseiller sur l'orientation de mes études. Pour finir, je soulignerai l'importance du soutien de ma famille et de mes amis. Cela m'a aidé à gérer l'éloignement et les difficultés rencontrées tout au long de ces années. Merci à ma femme d'avoir accepté l'éloignement pendant cette longue période, avec tout ce que cela impliquait, le boulot, les vacances, l'absence. Je sais très bien que cela n'a pas toujours été facile, de mon côté aussi, même si j'ai toujours fait preuve d'une certaine fatalité.

Enfin, mes plus grands fans, mes parents qui m'ont soutenu et encouragé durant toute ma scolarité. Il m'a souvent été reproché de ne pas aller au fond des choses. Avec le recul, je pense que se disperser est le risque de s'intéresser à trop de sujets. Les exemples ne sont pas nombreux, mais une fois de plus je pense avoir démontré que j'en étais capable, bien que je considère la thèse comme une ouverture sur de nouvelles perspectives et non une finalité.

Je vous dédie cet ouvrage et m'excuse auprès des lecteurs pour le message personnel qui va suivre.

A men païre,

Voualà a darrie pàgina à scrìve.

*Tenou à te dedicà esta obra, vare ço que vare,
mà sabou que e empourtant à tu couhe per ço que rapresenta.
Se scrìvou este quarqu rege ancuì ese ben gràcia à vou.*

Aloura merci, merci per cada.

*A tante cause que tenemou per aquista, aquestou d'aquí era una tra ele,
couma ben d'autre, e pourtan ancuì nou esse à men coustà per spartì à este
moument.*

Te piàijia de me repeta una frasa de men paigran :

« Mielh un giorno de leone che cento de pecore ».

Ese devengù per aishì dî ou ditan d'à familha.

*Pendan tout este anàie voustre auriar gardà à part de pecore
e m'auriar laishà aquelà de leone.*

Ahura era à tu de pilhà este part de cèrnia.

*Es parti trop de boun'oura, avia tante moumente à spartì e
toun assença es autant mai pesent que ru moument san empourtant.*

*Aloura me piàije à crè que douna ese,
aural chu trovà u mote que te an mancà e que à tant regreta este vint darrie anàie.*

Esta obra, nou serà a prova d'a mia reüshita, ma d'a voustra.

Per anà del avant, m'a emparà de noun scourdà qu semù ni douna sema vengu.

Ten enseïgnament noun auraia stach inùtile.

Sabù que este fierou de mi et speru que le serè sempre.

Un souret augurou, esse a l'atura de voustre sperance.

Ten 'fidiceou meu'

Liste des Abréviations

ACP	Analyse en composantes principales	LIEBE	Laboratoire d'Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité Ecosystème
APX	Ascorbate peroxydase	LMW	Faible poids moléculaire
BSO	Buthionine sulfoximine	LOEC	plus faible concentration induisant un effet
CAT	Catalase	MDA	malondialdéhyde
CEC	Capacité d'Echange Cationique	ML	Métaux lourds
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer	MNX	Micronoyaux
CS	Cystéine Synthase	OAS	O-acetyl-L-sérine
DOSE	dictionnaire des substances et de leurs effets	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique	PC	Phytochélatines
ERO	Espèces réactives de l'oxygène	PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
EXAFS	analyse spectroscopique issue du rayonnement synchrotron	PCS	Phytochélatine synthase
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture	p f	Poids frais
FISH	Fluorescence en hybridation in situ	POP	Polluant organique persistant
γ EC	γ -glutamylcysteine	PSI	Photosystème I
γ ECS	γ -glutamylcysteine synthase	PSII	Photosystème II
GISFI	Groupeement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles	PNUE	Programme pour l'environnement des Nations Unies
GPX	Guaïacol peroxydase	q s p	Quantite suffisant pour
GR	Glutathion réductase	REACH	Enregistrement, évaluation, autorisation et restrictions relatifs aux substances chimiques
GS	Glutathion synthase	SAT	Sérine acétyltransférase
hGS	Homo- glutathion synthase	SOD	Superoxyde dismutase
HMW	Haut poids moléculaire	UNESCO	Organisation des Nations unies pour l'éducation, la science et la culture
HPLC	Chromatographie à haute pression liquide	UNIP	Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes Riches en Protéines
IPPB	programme international sur les tests sur plantes	WWF	Organisation mondiale de protection de l'environnement

Liste des Figures

Figure 1	Détail de <i>Vicia faba</i>	p 5
Figure 2	Aire de répartition de <i>Vicia faba</i>	p 6
Figure 3	Evolution de la production et des surfaces de cultures de <i>Vicia faba</i> dans le monde	p 8
Figure 4	Surface et rendement de <i>Vicia faba</i> dans quelques pays d'Europe	p 9
Figure 5	Répartition spécifique des surfaces cultivées en France (2001 / 2002)	p 9
Figure 6	Evolution des ventes et des certifications des semences de <i>Vicia faba</i>	p 10
Figure 7	Dé-excitation de la chlorophylle a liée à la photosynthèse, émission de chaleur et émission de fluorescence chez les végétaux	p 26
Figure 8	Principaux bioligands des métaux	p 30
Figure 9	Mécanismes cellulaires de résistance aux métaux	p 30
Figure 10	Structures de: (A) $[\text{Cd}(\text{SPh})_4]^{2-}$; (B) $[\text{Cd}_4(\text{SPh})_{10}]^{2-}$; et (C) $[\text{S}_4\text{Cd}_{10}(\text{SPh})_{16}]^{4-}$	p 34
Figure 11	Modèle structurel du complexe $\text{Cd}(\text{SCys})_4$	p 35
Figure 12	Schéma de la régulation de la biosynthèse du glutathion (GHS) et des PC	p 37
Figure 13	Voie des synthèses du glutathion et d'homoglutathion	p 37
Figure 14	Comparaison des Phytochélatines synthèses de divers organismes	p 41
Figure 15	Schéma de la transpeptidation.	p 42
Figure 16	Multiplés connexions entre le métabolisme du soufre, la détoxification des métaux lourds et l'homéostasie chez les végétaux	p 43
Figure 17	Gènes et fonctions contribuant à la détoxification du Cd chez les plantes et les champignons	p 45
Figure 18	Modes d'action possible d'un agent génotoxique	p 48
Figure 19	Schéma coupe longitudinale racinaire	p 51
Figure 20	Pousse des racines primaires	p 54
Figure 21	Pousse des racines secondaires dans le milieu d'Hoagland	p 54
Figure 22	Exposition en milieu liquide	p 55

Figure 23	Exposition en milieu solide	p 55
Figure 24	Observation des phases de mitose au microscope	p 56
Figure 25	Observation des micronoyaux au microscope	p 56
Figure 26	Schéma explicatif de la dérivation des thiols	p 58
Figure 27	Profil du gradient de phases	p 59
Figure 28	Effet de la concentration en CdCl ₂ du milieu sur l'induction des PC dans les racines (Organismes de 9 jours)	p 65
Figure 29	Effet de la concentration en CdCl ₂ du milieu sur l'induction des PC dans les feuilles (Organismes de 9 jours)	p 65
Figure 30	Effet de la concentration en CdCl ₂ du milieu sur les quantités de γ -Glu-Cys et de GSH dans les racines (Organismes de 18 jours)	p 67
Figure 31	Effet de la concentration en CdCl ₂ du milieu sur l'induction des PC dans les racines (Organismes de 18 jours).	p 67
Figure 32	Effet de la concentration en CdCl ₂ du milieu sur les quantités de γ -Glu-Cys et de GSH dans les feuilles de rang 1 (Organismes de 18 jours)	p 68
Figure 33	Effet de la concentration en CdCl ₂ du milieu sur l'induction des PC dans les feuilles de rang 1 (Organismes de 18 jours)	p 68
Figure 34	Effet de la concentration en CdCl ₂ du milieu sur les quantités de γ -Glu-Cys et de GSH dans les feuilles (Organismes de 18 jours, exposés à 10 ⁻⁵ M).	p 69
Figure 35	Effet de la concentration en CdCl ₂ du milieu sur l'induction des PC dans les feuilles (Organismes de 18 jours, exposés à 10 ⁻⁵ M)	p 69
Figure 36	Proportion de PC LMW/HMW dans les racines en fonction de la concentration en CdCl ₂ (Organismes de 18 Jours)	p 69
Figure 37	Proportion de PC LMW/HMW dans les feuilles en fonction de la concentration en CdCl ₂ (Organismes de 18 Jours)	p 70
Figure 38	Rapport de PC racines/feuilles (Organismes de 18 jours, exposés à 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂)	p 70
Figure 39	Proportion de PC LMW/HMW dans les racines en fonction de la concentration en CdCl ₂ (Organismes de 18 jours)	p 71
Figure 40	Proportion de PC LMW/HMW dans les feuilles en fonction de la concentration en CdCl ₂ (Organismes de 18 jours)	p 71
Figure 41	Proportion de PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 1 en fonction de la concentration en CdCl ₂ (Organismes de 18 jours)	p 72
Figure 42	Proportion de PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 2 en fonction de la concentration en CdCl ₂ (Organismes de 18 jours)	p 72
Figure 43	Proportion de PC LMW/HMW dans l'apex en fonction de la concentration en CdCl ₂ (Organismes de 18 jours)	p 72

Figure 44	Quantité de GSH chez les individus en fonction de l'environnement de germination	p 73
Figure 45	Quantité de PC ₂ chez les individus en fonction de l'environnement de germination	p 73
Figure 46	PC ₂ induites à 10 ⁻⁵ M dans les racines de <i>Vicia faba</i> en fonction du temps	p 74
Figure 47	Proportion de PC LMW/HMW dans les racines en fonction du temps d'exposition à un solution de 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 75
Figure 48	Proportion de PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps d'exposition à un solution de 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 75
Figure 49	Proportion de t PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps d'exposition à un solution de 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 76
Figure 50	Proportion de PC LMW/HMW dans l'apex en fonction du temps d'exposition à un solution de 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 76
Figure 51	PC ₂ dans les racines en fonction du temps	p 76
Figure 52	PC ₂ LMW/HMW dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps	p 77
Figure 53	PC ₂ LMW/HMW dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps	p 77
Figure 54	Proportion PC LMW/HMW dans l'apex en fonction du temps	p 77
Figure 55	Proportion PC LMW/HMW dans les racines en fonction du temps, exposition à 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 78
Figure 56	Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps, exposition à 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 78
Figure 57	Rapport PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps, exposition à 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 78
Figure 58	Proportion PC LMW/HMW dans l'apex en fonction du temps, exposition à 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 78
Figure 59	Proportion PC LMW/HMW dans les racines en fonction du temps, exposition à 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 79
Figure 60	Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps, exposition à 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 79
Figure 61	Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps, exposition à 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 79
Figure 62	Proportion PC LMW/HMW dans l'apex en fonction du temps, exposition à 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	p 80
Figure 63	Effet de la concentration en CdCl ₂ sur quatre biomarqueurs mesurés sur les racines (Organismes de 9 jours)	p 81
Figure 64	Effet de la concentration en CdCl ₂ sur l'activité enzymatique des enzymes du stress oxydant des feuilles (Organismes de 9 jours)	p 82

Figure 65	Activité de la catalase en fonction du temps et du compartiment (Organismes de 18 jours)	p 82
Figure 66	Activité de l'APX en fonction du temps et du compartiment (Organismes de 18 jours)	p 82
Figure 67	Activité de la SOD en fonction du temps d'exposition à 10^{-5} M de CdCl_2 et du compartiment (Organismes de 18 jours)	p 83
Figure 68	Quantité de MDA produite en fonction du temps d'exposition à 10^{-5} M de CdCl_2 et du compartiment (Organismes de 18 jours)	p 83
Figure 69	Pourcentages de mitoses en fonction de la concentration en CdCl_2 pour les différents types de sols	p 85
Figure 70	Fréquences de micronoyaux en fonction de la concentration en CdCl_2 pour les différents types de sols	p 85
Figure 71	Activité enzymatique des différentes enzymes du stress oxydant en fonction de la concentration en CdCl_2 (LUFA 2.2)	p 86
Figure 72	Activité enzymatique de l'APX en fonction de la concentration en CdCl_2 (LUFA 2.2)	p 86
Figure 73	Induction des PC dans les racines d'organismes jeunes en fonction de la concentration en CdCl_2 (LUFA 2.2)	p 87
Figure 74	Induction des PC dans les racines d'organismes de 18 Jours en fonction de la concentration en CdCl_2 (LUFA 2.2)	p 88
Figure 75	Induction des PC dans les feuilles d'organismes de 18 jours en fonction de la concentration en CdCl_2 (LUFA 2.2)	p 88
Figure 76	Echelles de sensibilité des bio-indicateurs étudiés	p 105

Liste des tableaux

Tableau I	Classification phylogénique de <i>Vicia faba</i>	p 4
Tableau II	Eléments traces des roches minérales communes	p 10
Tableau III	Quantité naturelle de métaux dans certaines roches (ppm)	p 12
Tableau IV	Concentration moyenne en ETM des boues d'épuration	p 14
Tableau V	Teneurs limites en ETM des boues	p 14
Tableau VI	Effets des paramètres physico-chimiques sur la toxicité des métaux, chez les végétaux non vasculaires	p 20
Tableau VII	Les différentes catégories de phytochélatines	p 35
Tableau VIII	Test des micronoyaux sur les racines de <i>Vicia faba</i> . Durée d'exposition 30 heures	p 64
Tableau IX	Test des micronoyaux sur les racines de <i>Vicia faba</i> . Durée d'exposition 39 heures	p 64
Tableau X	Test des micronoyaux sur les racines de <i>Vicia faba</i> . Durée d'exposition 48 heures	p 64
Tableau XI	Résultats du test à long terme en phase solide : effets d'une concentration génotoxique de cadmium sur la floraison	p 89
Tableau XII	Résultats du test à long terme en phase solide : effets d'une concentration génotoxique de cadmium sur la production de fruits	p 89
Tableau XIII	Résultats sur lixiviats	p 90
Tableau XIV	Résultats sur percolats	p 91
Tableau XV	Résultats Test <i>Vicia</i> -micronoyaux (Sédiment Baerenthal)	p 92
Tableau XVI	Résultats Test <i>Vicia</i> -micronoyaux (Sédiment Erbsenthal)	p 92
Tableau XVII	Dosage des métaux dans les sédiments de l'étang de Baerenthal et d'Erbsenthal	p 93
Tableau XVIII	Dosage des métaux dans les sédiments	p 93
Tableau XIX	Résultat Test <i>Vicia</i> -micronoyaux (Station 1 du ruisseau de Veymerange)	p 94
Tableau XX	Résultat Test <i>Vicia</i> -micronoyaux (Station 2 du ruisseau de Veymerange)	p 94
Tableau XXI	Résultat Test <i>Vicia</i> -micronoyaux (Station 3 du ruisseau de Veymerange)	p 94

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1 - LA FEVE (<i>VICIA FABIA</i>).....	4
1.1 - <i>HISTORIQUE</i>	4
1.2 - <i>CARACTERISTIQUES</i>	5
1.2.1 - Description	5
1.2.2 - Distribution	6
1.2.3 - Habitat	6
1.2.4 - Biologie	7
1.2.5 - Culture.....	7
1.2.5.1 - Maladies.....	7
1.2.5.2 - Ravageurs	7
1.2.5.3 - Utilisation	8
1.3 - <i>IMPLICATION EN AGRICULTURE</i>	8
1.4 - <i>LE FAVISME</i>	10
2 - LES METAUX DANS L'ENVIRONNEMENT.....	11
2.1 - <i>SOURCES NATURELLES (Bradl, 2005)</i>	11
2.1.1 - Roches et sols.....	11
2.1.1.1 - Les roches.....	11
2.1.1.2 - Les sols	12
2.1.2 - Eaux de surface et nappes phréatiques.....	13
2.2 - <i>SOURCES ANTHROPIQUES (Bradl, 2005)</i>	13
2.2.1 - Les activités agricoles.....	13
2.2.2 - Les activités industrielles et métallurgiques	15
2.2.2.1 - L'exploitation minière.....	15
2.2.2.2 - Combustion de charbon et pétrochimie.....	15
2.2.2.3 - Les environnements domestiques et urbains.....	16
2.2.2.4 - Traitement des déchets solides	16
2.3 - <i>LE CADMIUM (Bradl et al., 2005)</i>	16
2.3.1 - Propriétés physico-chimiques.....	16
2.3.2 - Origines et usages du cadmium.....	18
2.3.3 - Effets écotoxicologiques du cadmium	19
2.4 - <i>LA BIODISPONIBILITE DES METAUX</i>	19
2.4.1 - Définition	19
2.4.2 - Facteurs agissant sur la biodisponibilité	20
3 - TOXICITE DES METAUX ET TOLERANCE DES PLANTES	21
3.1 - <i>Modes de toxicité des métaux</i>	22
3.1.1 - Dommages membranaires	24
3.1.2 - Inactivation enzymatique.....	25
3.1.2.1 - Dommages sur le métabolisme de production d'énergie.....	25

3.1.2.2 - Effet des métaux sur la chlorophylle	26
3.1.2.3 - Métaux et acides nucléiques	27
3.1.2.4 - Formation de radicaux libres	28
3.2 - <i>TOLERANCE ET ACCUMULATION DES METAUX DANS LES PLANTES</i>	30
3.2.1 - Le stress oxydant	31
3.2.1.1 - Antioxydants non enzymatiques.....	32
3.2.1.2 - Enzymes antioxydantes.....	32
3.2.1.2.1 - Superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	32
3.2.1.2.2 - Catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	33
3.2.1.2.3 - Guaiacol peroxydase (GPX, EC 1.11.1.7).....	33
3.2.1.2.4 - Ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11).....	33
3.2.1.2.5 - Glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2).....	34
3.2.2 - Les phytochélatines (PC).....	34
3.2.2.1 - Synthèse du glutathion	36
3.2.2.2 - Biosynthèse des PC	38
3.2.2.2.1 - La phytochélatine synthase (PCS)	39
3.2.2.2.2 - Les gènes de la PCS.....	40
3.2.2.2.3 - Activation catalytique de la PCS.....	41
3.2.2.3 - Liens entre composés thiolés et métabolisme du soufre.....	42
3.2.2.4 - La compartimentalisation vacuolaire.....	43
4 - TESTS DE GENOTOXICITE SUR LES VEGETAUX SUPERIEURS.....	46
4.1 - <i>Historique</i>	46
4.2 - <i>Les critères de génotoxicité</i>	48
4.3 - <i>Avantages et limites</i>	49
4.3.1 - Représentativité.....	49
4.3.2 - Faisabilité	50
4.3.3 - Sensibilité.....	50
4.3.4 - Inconvénients	51
4.4 - <i>Le test Vicia-micronoyaux</i>	51
MATERIEL ET METHODES.....	53
1 - LE MATERIEL VEGETAL	53
2 - CONDITIONS DE CULTURE	53
2.1 - <i>Cultures dans le phytotron</i>	53
2.2 - <i>Cultures dans la serre</i>	53
3 - PREPARATION DES ORGANISMES VEGETAUX	54
3.1 - <i>Croissance des racines primaires</i>	54
3.2 - <i>Croissance des racines secondaires</i>	54
3.2.1 - En milieu liquide.....	54
3.2.2 - En milieu solide	54
4 - DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	55
4.1 - <i>Exposition en milieu liquide</i>	55
4.2 - <i>Exposition en milieu solide</i>	55

5 - TESTS SELECTIONNES.....	55
5.1 - <i>Test Vicia-micronoyaux</i>	55
5.1.1 - Préparation de la solution d'acéto-orcéine 1 %.....	56
5.1.2 - Fixation et coloration des extrémités racinaires.....	56
5.1.3 - Examen des cellules des extrémités racinaires.....	56
5.1.4 - Analyse statistique.....	57
5.2 - <i>Evaluation des PC et du Glutathion</i>	57
5.2.1 - Préparation des solutions.....	57
5.2.2 - Préparation des échantillons.....	57
5.2.3 - Réduction et pré-dérivation des thiols.....	58
5.2.4 - Dosage HPLC des thiols.....	59
5.2.5 - Analyse statistique.....	59
5.3 - <i>systemeS anti-oxydant</i>	60
5.3.1 - Préparation des échantillons.....	60
5.3.2 - Protocoles.....	60
5.3.2.1 - Superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	60
5.3.2.2 - Catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	60
5.3.2.3 - Guaiacol peroxydase (GPX, EC 1.11.1.7).....	61
5.3.2.4 - Ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11).....	61
5.3.2.5 - Glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2).....	61
5.3.2.6 - La peroxydation lipidique.....	61
5.3.3 - Analyse statistique.....	62
RESULTATS.....	63
1 - ETUDE DES MECANISMES D'ACTION DU CADMIUM.....	63
1.1 - <i>ETUDES REALISEES En phase Liquide</i>	63
1.1.1 - Génotoxicité du CdCl ₂ (Test <i>Vicia</i> micronoyaux).....	63
1.1.2 - Etude de l'induction des phytochélatines (PC).....	65
1.1.2.1 - Effet de la concentration en CdCl ₂	65
1.1.2.2 - Effet de l'âge des plantules.....	66
1.1.2.3 - Répartition entre PC de faible poids moléculaire (LMW) et de haut poids moléculaire (HMW).	69
1.1.2.4 - Induction des PC aux différents niveaux de la plante.....	71
1.1.2.5 - Effet du CdCl ₂ pendant la germination.....	72
1.1.2.6 - Cinétique d'induction des PC.....	74
1.1.2.6.1 - Cinétique des PC sur 10 jours.....	74
1.1.2.6.2 - Comportement des PC après une exposition de 48 heures au cadmium.....	76
1.1.2.6.3 - Rapidité de l'induction des PC.....	77
1.1.3 - Etude des enzymes du stress oxydant.....	81
1.1.3.1 - Effet de la concentration en cadmium.....	81
1.1.3.2 - Cinétique d'induction des enzymes du stress oxydant à 10 ⁻⁵ M de CdCl ₂	82
1.2 - <i>ETUDES REALISEES en Phase solide</i>	84
1.2.1 - Résultats du test <i>Vicia</i> -micronoyaux.....	85
1.2.2 - Etude du stress oxydant.....	85
1.2.3 - Induction des PC.....	87

1.2.3.1 - Test avec la gamme contenant le pic génotoxique.....	87
1.2.3.2 - Test avec une gamme comprise entre 0,5 et 1,5 g Cd/ Kg de sol.....	87
1.2.4 - Essai à long terme en phase solide.....	88
2 - APPLICATION DU TEST <i>Vicia</i> -MCN A DES MATRICES COMPLEXES LIQUIDES ET SOLIDES.....	90
2.1 - <i>Lixiviats multi contaminés (GISFI)</i>	90
2.2 - <i>Percolats multi contaminés (GISFI)</i>	91
2.3 - <i>Essais en phase solide sur des sédiments</i>	92
2.3.1 - Vosges du nord.....	92
2.3.2 - Ruisseau du Veymerange.....	93
DISCUSSION	95
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	106
LISTE BIBLIOGRAPHIQUE	108

INTRODUCTION

Depuis maintenant plusieurs années, médecins, écologues, hommes publics n'ont de cesse de nous mettre en garde sur la santé de notre planète et nous poussent à prendre conscience des changements radicaux qu'il faut opérer rapidement. Malheureusement, il est difficile d'aboutir à une prise de conscience générale. Cela demande plus de temps encore, pour que des décisions soient prises, comme le souligne déjà Lamarck, dans cette citation : « *Quelque difficulté qu'il y ait à découvrir des vérités nouvelles en étudiant la nature, il s'en trouve de plus grandes encore à les faire reconnaître* ». Les exemples ne manquent pas, pour illustrer cette lenteur collective.

Un communiqué de presse de l'OMS (2000) informe que les experts imputent près de 30% des cas de cancer à la dégradation de notre environnement. Une telle affirmation avait déjà été faite en 1975 par le docteur Higginson, directeur du Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) de Lyon, qui affirmait que 80 % des cancers avaient une cause environnementale. Trente ans plus tard, le professeur D. Belpomme (2004), mettait en cause l'impact des molécules chimiques sur la santé, ainsi que celui de la pollution, dans la génération de nombreuses pathologies (telles que la bronchiolite, l'asthme, les allergies, la stérilité masculine, les malformations néonatales chez les garçons), et en particulier du cancer. Même si cette quantité de molécules chimiques environnementales n'en est pas la cause unique, elle n'en reste pas moins une composante de l'équation sachant qu'entre 1930 et 2004, la production mondiale de ces substances est passée d'un à 400 million de tonnes. Pendant ce temps, entre les années 1980 et 2000, le nombre de décès liés aux cancers passait de 125 000 à 150 000, la quantité de cancers nouveaux décelés de 170 000 à 278 000. Progression préoccupante quand on sait que les progrès de la médecine ne permettent de guérir qu'environ un cancer sur deux. Ainsi si rien n'est fait, le Rapport sur le cancer dans « le Monde », publié par l'organisation mondiale de la santé (OMS), conjecture que la fréquence des cancers pourrait augmenter de 50 % d'ici 2020.

Parmi les molécules chimiques figurent les pesticides, dont on sait aujourd'hui que les effets nuisibles consécutifs à leur usage se multiplient. La plupart d'entre eux sont des perturbateurs endocriniens. Cette pollution chronique de l'environnement se poursuit depuis plus d'un demi-siècle et contamine de nombreuses espèces animales, entraînant leur féminisation. Celle-ci a été observée notamment aux Etats-Unis, comme le rapporte l'ouvrage de Théo Colborn : "la fin de l'espèce humaine". Qu'il s'agisse de poissons, de reptiles, d'oiseaux ou de mammifères, les observations convergent vers le même constat inquiétant : des cas de transsexualité sont de plus en plus souvent observés chez les mâles, comme dans le cas des alligators du lac Apopka en Floride, dont les graisses et le sang contenaient de

fortes teneurs en pesticides et où la plupart des mâles ne manifestaient plus aucun intérêt pour les femelles.

Les premiers rapports concernant l'homme sont liés aux observations du professeur Skaekelbek. On sait aujourd'hui que le sperme humain (en Europe) a perdu près de la moitié de ses spermatozoïdes, depuis l'entrée des pesticides en agriculture. Des observations de plus en plus nombreuses rendent compte de cas d'azoospermies (spermatozoïdes immobiles). Ces deux facteurs jouent de manière synergique en faveur d'une augmentation dûment constatée de l'infertilité masculine, progression de l'ordre de 1 % par an.

Dès à présent, quasiment l'ensemble des eaux de surface et environ les trois quarts des nappes phréatiques sont contaminées par des pesticides, comme le sont aussi le sang et les lipides des humains. La WWF l'a démontré en mettant en évidence une moyenne d'une dizaine de molécules suspectes dans le sang des ministres de l'environnement de l'Union Européenne, ainsi que de parlementaires européens. Plus préoccupant encore est le transfert de ces molécules suspectes de la mère à son fœtus par le cordon ombilical, le contaminant dès sa naissance. Il continuera à l'être si des mesures draconiennes ne sont pas mises en œuvre pour restreindre les usages jugés beaucoup trop généreux de ces produits.

Heureusement, avec le temps, les prémisses du sens civique planétaire rêvé par Paul-Emile Victor semblent poindre. Ainsi des réflexions sont entreprises afin de définir les principaux obstacles à surmonter pour mettre en place des actions applicables à des conditions socio-économiques et à des cadres différents.

Ainsi, la réglementation REACH¹ adopté par l'union européenne en décembre 2006, vise à tester un grand nombre de molécules chimiques mises sur le marché, notamment avant 1981, sans qu'aucun test de toxicologie ne leur ait été appliqué. Or parmi celles-ci, bon nombre sont considérées comme cancérigènes ou comme suspectes de l'être, par le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC). Elles devront donc disparaître pour être remplacées par des produits dont l'innocuité devra être prouvée par les fabricants, et reconnue par des experts de l'Union.

Des mesures sont également prises concernant la gestion des déchets (Convention sur les polluants organiques persistants : P.O.P.) notamment leur incinération, génératrice et émettrice de dioxines. A une plus grande échelle des mesures sont prises dans le bien de tous, Sommet de la Terre (Stockholm, 1972 ; Rio, 1992 et Johannesburg, 2002), Sommet du G8 (tous les ans depuis 1975).

¹ Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals (enregistrement, évaluation, autorisation et restrictions relatifs aux substances chimiques)

De tout temps, le progrès technique a permis la mise au point d'outils permettant de faire avancer la science. Ces découvertes sont souvent à l'origine de l'évolution des modes de pensée. Elles contribuent également à l'apparition de nouveaux besoins et visent à apporter des réponses aux nouvelles problématiques qui se profilent. Elles ont finalement permis d'affiner les réponses à des problèmes préexistants.

La pollution environnementale est une thématique très large dont on distingue communément trois échelles : les approches populationnelle, individuelle, et une autre plus mécanistique au niveau cellulaire. Cette distinction contribue à sa complexité, ce qui en multiplie les approches possibles.

Afin que des mesures soient prises lors de problèmes environnementaux, il est indispensable que les cercles de réflexion disposent de la meilleure information. Pour ce faire, la communauté scientifique se doit de disposer des outils nécessaires à l'obtention d'une telle information. Elle doit évoluer avec les problématiques rencontrées, tout en tenant compte des progrès technologiques mis à sa disposition. De plus, il serait intéressant de pouvoir diagnostiquer l'état de notre environnement, avant que celui-ci n'ait des répercussions préjudiciables sur l'Homme.

Cette étude s'inscrit dans cette optique. Dans un premier temps, nous tenterons de justifier le choix de notre modèle : *Vicia faba* / cadmium. Puis nous réaliserons une approche mécanistique d'un des systèmes de résistance aux métaux : les phytochélatines. Ensuite, nous tenterons de replacer ce mécanisme dans le phénomène de résistance aux métaux, chez les végétaux supérieurs. Enfin, nous nous rapprocherons des conditions environnementales, dans le but de tester la faisabilité d'une approche intégrant l'outil phytochélatines, ainsi que le test *Vicia*-micronoyaux en phase solide.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1 - LA FEVE (*Vicia faba*)

La position taxonomique de la fève est présentée dans le tableau I

règne <i>Plantae</i>
sous-règne <i>Tracheobionata</i>
division <i>Magnoliophyta</i>
classe <i>Magnoliopsida</i>
sous-classe <i>Rosidae</i>
ordre <i>Fabales</i>
famille <i>Fabaceae</i> (Légumineuses)
sous-famille <i>Faboideae</i>
tribu <i>Fabeae</i>
genre <i>Vicia</i>
espèce <i>faba</i>

Tableau I : Classification phylogénique de *Vicia faba*

Elle est communément appelée Fève de Cala, Fève des marais, Fève des champs, Gorgane, Gourgane (Broad bean ou Horse bean en anglais). Il s'agit d'une plante annuelle dont il existe plusieurs variétés :

- maraîchère var. *faba*
- fourragère var. *minuta*
- à cheval var. *equina*

1.1 - HISTORIQUE

Le terme de « fève », qui vient du latin *faba*, est apparu dans la langue française en 1265. Présenté comme un québécoisisme, le terme « gourgane » apparaît pour la première fois dans l'édition 2004 du Petit Larousse. Mais le mot serait plutôt d'origine française, si l'on en juge par le sobriquet « gourganiens » qui désignait jadis les habitants d'une commune de Bretagne, dont l'alimentation était essentiellement constituée de fève des marais.



Figure 1 : Détail de *Vicia faba*
(www.wikipedia.org)

C'est sans doute la plus ancienne légumineuse, avec la lentille dont on retrouve les traces jusque dans la préhistoire. En Egypte, des graines de fève ont été trouvées dans les tombes de la 12^{ème} dynastie (2002-2400 av J.C.)

Du fait de sa taille et de la grande valeur nutritive de l'amidon qu'elle renferme, la fève a été l'un des premiers aliments à être récolté en grande quantité, dans le but de constituer des réserves en cas de pénurie. Même à l'état sauvage tel qu'on la ramassait il y a quelques milliers d'années dans son milieu d'origine en Asie Centrale, sa taille ne dépassait pas le centimètre. Sa domestication, vieille d'au moins 10.000 ans, a eu lieu avant celle du pois, pourtant très ancien.

La fève s'est largement diffusée vers les régions tempérées de l'hémisphère Nord. Les Romains la consommaient en grande quantité. Pline l'Ancien lui accordait la première place parmi les légumes. En période de disette, on en faisait une sorte de gruau, habitude qui s'est maintenue pendant des siècles en Europe. Dans son *De RE Conquinaria* (un des plus anciens livres de cuisine), Apicius mentionne de nombreux plats composés de fèves.

Dans la Rome antique, la fève servait de jeton pour désigner le roi du banquet lors des saturnales. Plus tard, cette coutume s'est transformée en se glissant dans la galette des rois pour désigner celui qui portera la couronne.

En France, elle restera populaire durant tout le Moyen Âge. On l'appréciait tout particulièrement en début de saison tandis qu'elle était bien verte et fraîche.

1.2 - CARACTERISTIQUES

1.2.1 - Description

Il s'agit d'une plante herbacée robuste, pouvant atteindre un mètre. Les tiges sont simples, creuses, carrées et dressées, tandis que les feuilles sont composées, ovales, charnues, terminées par une pointe, de couleur vert pâle à grise. Les folioles sont larges, de couleur verte plus terne, sans vrille. L'inflorescence est en racème de deux à cinq fleurs (parfois les fleurs sont solitaires), à corolle blanche ou rosée, avec des taches noires sur les ailes insérées aux noeuds. Il n'y a pas d'inflorescence terminale ce qui fait que la floraison est en principe indéfinie. Le fruit est une gousse dressée de 15 à 25 cm de long contenant 5 à 10 graines de forme ovale et aplatie avec une peau épaisse : les fèves. Elles sont protégées par une couche duveteuse blanchâtre (figure 1). Les racines sont pivotantes avec de très nombreuses radicelles portant des nodosités.

1.2.2 - Distribution

Plante originaire du Moyen-Orient, elle est cultivée dans le monde entier, plus particulièrement en Chine, pays qui fournit les deux tiers de la production mondiale, où elle est présente dans la cuisine depuis le V^{ème} millénaire avant J.C.. Elle joue un rôle important dans l'alimentation des peuples africains, asiatiques, du Moyen-Orient et de certaines populations européennes. Introduite dans le Nouveau Monde par les Espagnols, elle n'y sera jamais populaire, faute de climat compatible avec sa culture, sauf dans les pays Andins, où elle est devenue l'une des spécialités culinaires.

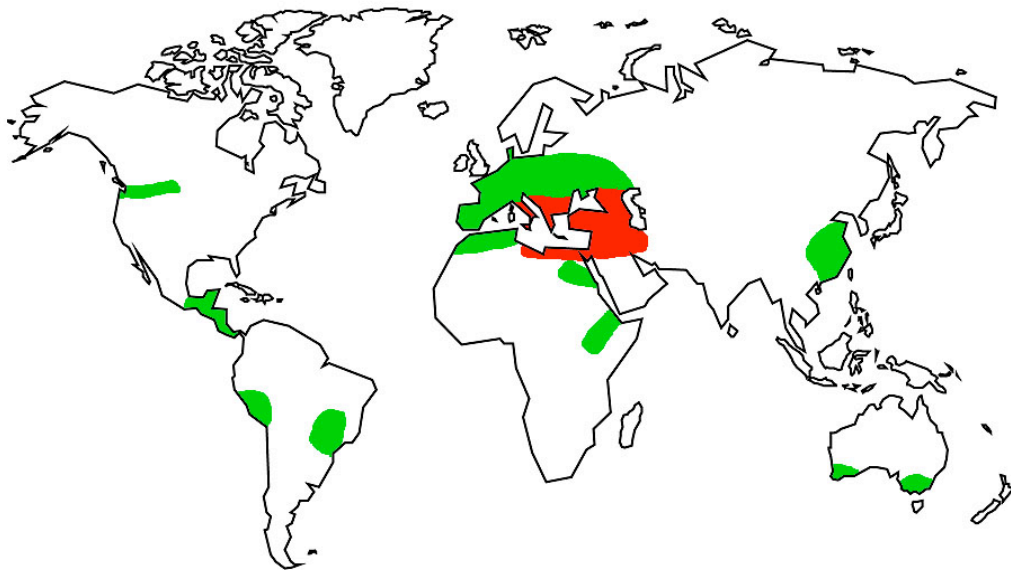


Figure 2 : Aire de répartition de *Vicia faba* (origine en rouge, surface agricole en vert) (www.mpiz-koeln.mpg.de, Institut Max Planck)

1.2.3 - Habitat

Elle affectionne les climats tempérés, avec un peu de fraîcheur dans son quotidien. Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds, alors que les formes herbacées sont présentes dans les régions tempérées. Elle s'accommode de tous les sols (ayant une bonne capacité de rétention en eau), de préférence pas trop acides, plutôt argilo-calcaires, profonds et frais. Il s'agit plutôt d'une plante méditerranéenne.

Comme les autres légumineuses, la fève a la propriété de fixer l'azote atmosphérique dans le sol. De plus, contrairement aux autres légumineuses, elle fournit une très grande quantité de matière organique (www.biodiversity.soton.ac.uk/ildis/index.shtml Université de Southampton).

1.2.4 - Biologie

On distingue les fèves de printemps et celles d'hiver. Cette classification ne repose pas, comme chez les céréales, sur des exigences absolues en matière de froid pour initier la floraison. Elle repose plutôt sur le caractère d'adaptation. Le type hiver, où le tallage est plus abondant, se caractérise essentiellement par une meilleure résistance au froid. Le système racinaire y est plus développé. Elle possède une autogamie plus accentuée et un cycle végétatif plus long (240-270 jours contre 170-190 jours pour les espèces printanières).

Les fèves sont entomophiles. Pendant la phase de fin de floraison, période de remplissage du grain. Elles ont un besoin en eau relativement élevé et elles craignent les fortes températures. Un excès d'eau peut cependant pénaliser l'enracinement et réduire le fonctionnement des nodosités, indispensables à une bonne nutrition azotée.

1.2.5 - Culture

La fève de printemps est cultivée dans la partie nord de la France depuis la Bretagne et le Cotentin jusqu'à la Lorraine. La floraison varie de la fin du mois de mai à début juin avec une récolte en août.

La fève d'hiver, quant à elle, est cultivée dans toute la France. La floraison varie de mi-avril à mi-mai avec des récoltes qui se font entre fin juillet et fin août.

1.2.5.1 - Maladies

Les maladies pouvant être traitées sont l'antracnose (*Ascochyta fabae*), la maladie des taches chocolats (*Botrytis fabae*), le mildiou et la rouille, qui est la plus dangereuse de part les dégâts qu'elle peut occasionner.

Des champignons du sol (de type *Fusarium* ou *Verticilium*) peuvent provoquer des dégâts importants pouvant aller jusqu'à la disparition des pieds.

1.2.5.2 - Ravageurs

Il en existe quatre principaux : l'anguillule des céréales (*Ditylenchus dipsaci*), le thrips du pois (*Frankliniella robusta*) et les deux plus importants, au vu des dégâts qu'ils causent, sont la bruche de la fève (*Bruchus rufimanus*) et le puceron noir de la fève (*Aphis fabae*).

Culture de la fève

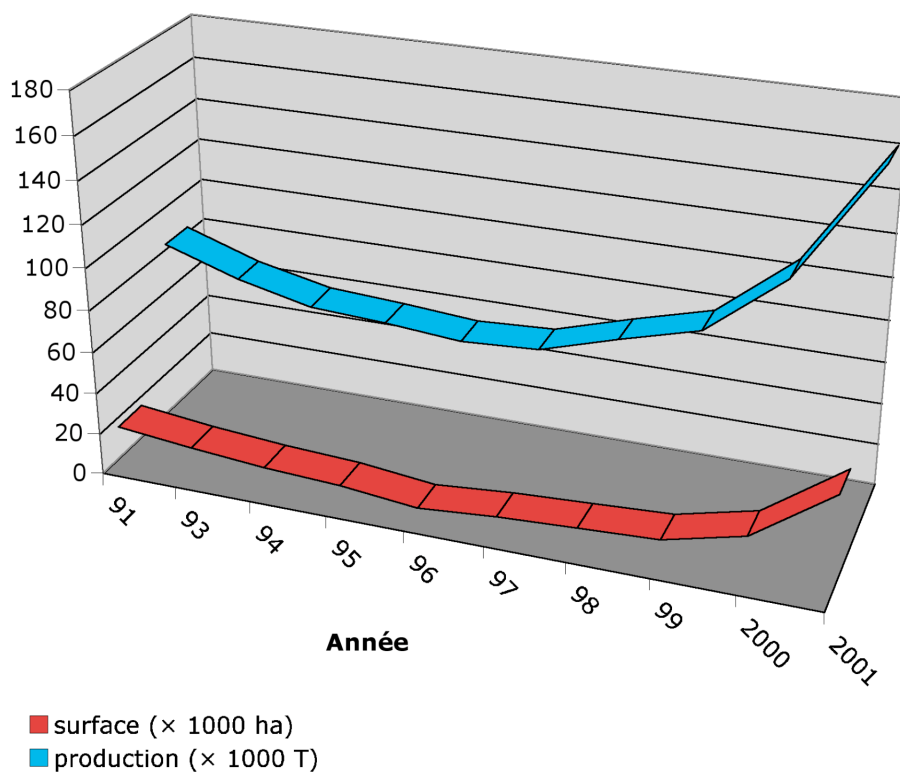


Figure 3 : Evolution de la production et des surfaces de cultures de *Vicia faba* dans le monde

1.2.5.3 - Utilisation

De grande valeur nutritionnelle (grande quantité d'amidon), la fève a joué et joue un rôle important dans l'alimentation en Afrique, Asie, au Moyen-Orient et en Europe. Elle entre dans la composition de différents plats (Espagne : fabada ; Italie : alla pancetta ; Moyen-Orient : purée, beignets et salades) ou peut être consommée crue.

1.3 - IMPLICATION EN AGRICULTURE

La récolte mondiale (figure 3) de fèves s'élève à 4,75 millions de tonnes (FAO² 2002) dont :

- fèves vertes : 1,02 millions de tonnes
- fèves sèches : 3,73 millions de tonnes

En France, depuis 1998, la fève connaît un regain d'intérêt, avec une progression régulière des surfaces cultivées. Le maintien des prix de vente élevés depuis 1995/1996 donne à nouveau de l'intérêt à cette culture, dont la demande est importante aussi bien sur le plan national qu'à l'exportation (Italie, Espagne). Cette culture rencontre également un intérêt croissant en agriculture biologique dans certaines régions.

En ce qui concerne d'autres pays Européens, la culture de la fève y est tout autant développée (figure 4).

² Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture

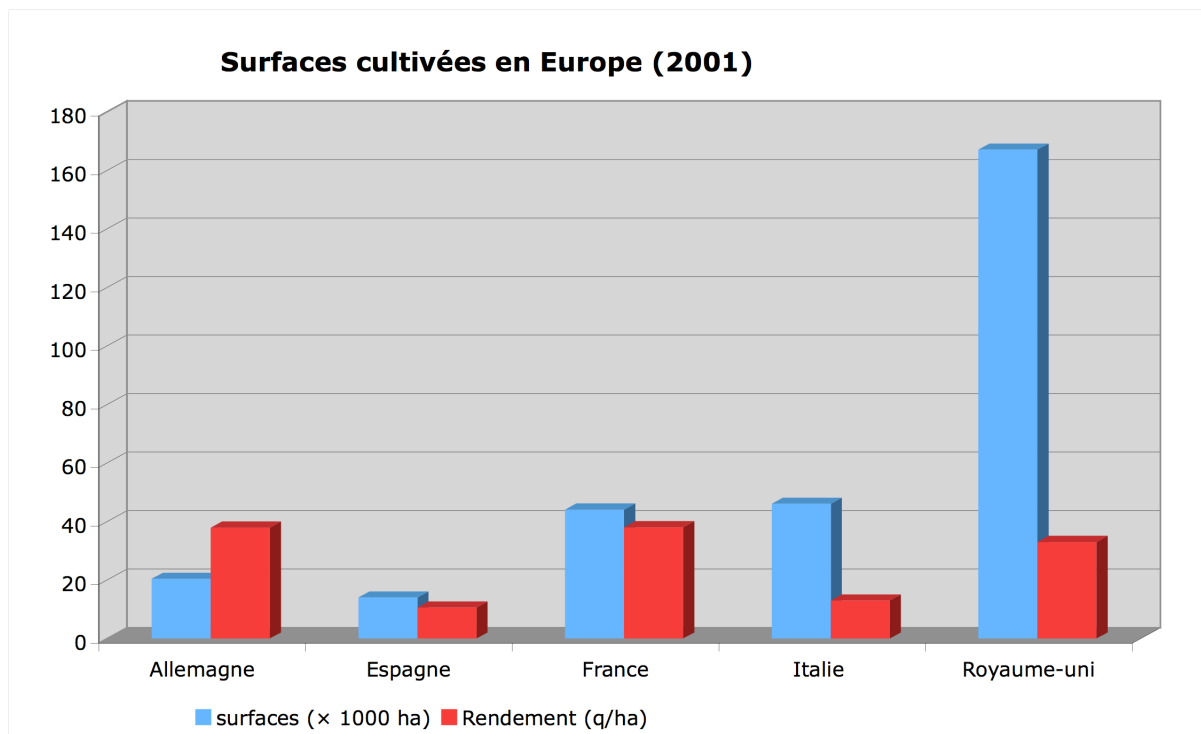


Figure 4 : Surface et rendement de *Vicia faba* dans quelques pays d'Europe (Source UNIP³)

En France (données 2001), la culture de la fève représente 1,3 % des surfaces cultivées totales et 13 % des surfaces non destinées à la culture intensive, juste derrière le pois et la luzerne (figure 5).

La forte augmentation des surfaces de cultures de *Vicia faba* (qui représentait 47.000 ha en 2001) s'est accompagnée d'un effort important de la production de semences de la part des semenciers français. La production de semences a ainsi augmenté de 136 % et les ventes de 168% par rapport à 2000 (figure 6).

³ Union Nationale Interprofessionnelle des Plantes Riches en Protéines

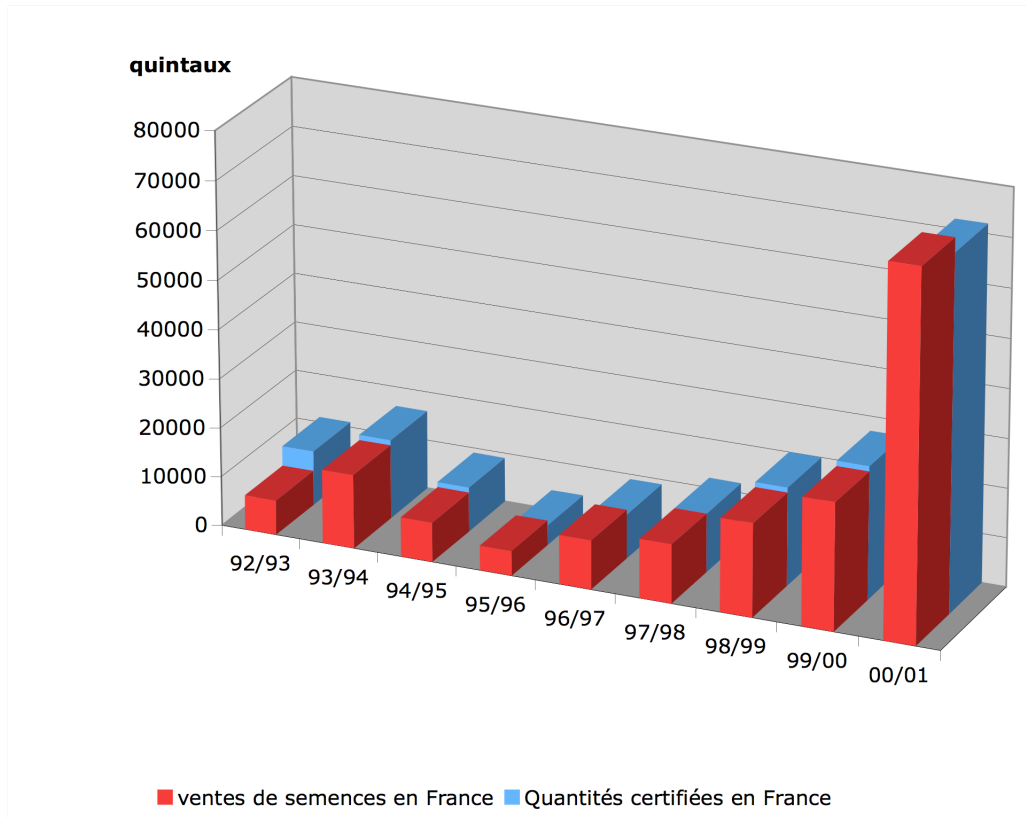


Figure 6 : Evolution des ventes et des certifications des semences de *Vicia faba*

1.4 - LE FAVISME

Cette maladie touche les personnes porteuses d'une mutation chromosomique. Elle aboutit à un dérèglement du fonctionnement de la glucose-6-phosphate déshydrogénase.

Il s'agit d'une anémie hémolytique observée après ingestion de fèves ou après inhalation de pollen de *Vicia faba*.

La fève constitue un bon modèle végétal car elle possède une large aire de répartition géographique. De plus, sa culture est maîtrisée et peu coûteuse.

Minéraux	Elément Trace	Résistance aux intempéries
Olivine	Ni, Co, Mn, Li, Zn, Cu, Mo	Faible
Hornblende	Ni, Co, Mn, Se, Li, V, Zn, Cu, Ga	
Augite	Ni, Co, Mn, Se, Li, V, Zn, Pb, Cu, Ga	
Biotite	Rb, Ba, Ni, Co, Mn, Se, Li, V, Zn, Cu, Ga	
Apatite	Elt rare Pb, Sr	
Anorthite	Sr, Cu, Ga, Mn	
Andesine	Sr, Cu, Ga, Mn	
Oligoclase	Cu, Ga	
Albite	Cu, Ga	
Garnet	Mn, Cr, Ga	stabilité intermédiaire
Orthoclase	Rb, Ga, Sr, Cu, Ga	
Muscovite	F, Rb, Ba, Sr, Cu, Ga, V	
Titanite	Elt rare V, Sn	
Ilmenite	Co, Ni, Cr, V	
Titanite	Zn, Co, Ni, Cr, V	
Turmaline	Li, F, Ga	
Zircon	Hf, U	
Quartz	-	Résistant

Tableau II : Eléments traces des roches minérales communes.

2 - LES METAUX DANS L'ENVIRONNEMENT

Il existe différentes sources de métaux lourds dans l'environnement. Elles ont deux origines possibles, naturelle ou anthropique.

2.1 - SOURCES NATURELLES (Bradl, 2005)

Les métaux sont naturellement présents dans les sols. Un grand nombre de facteurs, notamment les conditions climatiques et édaphiques font que ces métaux peuvent se retrouver naturellement (par ruissellement) dans les eaux de surface, ou dans les nappes phréatiques.

2.1.1 - Roches et sols

Il existe principalement deux sources naturelles de métaux lourds dans l'environnement : les roches et les sols.

2.1.1.1 - Les roches

Pendant la formation des roches primaires dites magmatiques, les métaux lourds peuvent prendre la place d'autres atomes au cours de la cristallisation. Ce phénomène est appelé substitution isomorphique. Les métaux lourds ainsi incorporés se retrouvent à l'état de traces dans les cristaux primaires lors du refroidissement magmatique. Le taux de cette substitution dépend de plusieurs facteurs : la taille de l'ion, sa charge, l'électronégativité de l'élément ainsi que celle de l'élément substitué. Le tableau II donne les éléments traces des principales roches minérales.

Pendant la formation des roches, le magma s'épuise en éléments minéraux cristallisés pendant qu'il s'enrichit en éléments non incorporés. Ainsi, la plupart des métaux lourds se trouvent principalement dans le magma résiduel. Plus tardivement dans la différenciation, la concentration en métaux augmentant, cela permet la précipitation du métal en son propre minéral (e.g. U : uranitite ou Be : beryl). La partie fluide hydrothermale chaude de la dernière phase de différenciation magmatique concentre les métaux lourds et s'infiltré dans les roches. Des réactions peuvent alors avoir lieu entre les roches et le fluide, permettant la précipitation des minéraux en minerais. Ex : Hg cinabre (HgS), As arsenopyrite (FeAsS), Zn sphalérite (ZnS), Cd Greenockite (CdS), Sphalirite (Zn(Cd)S).

Elément	Granit	Basalte	Argile/ Schiste	Argile Océanique	Pierre Calcaire	Carbonate Marin	Ruisseaux (ppb)
Al (%)	7,2	8,2	8	8,4	0,42	2	50
As	2	2,2	13	13	1	1	2
Be	3	0,7	3	2,6	0,X	0,X	0,001
Cd	0,13	0,21	0,3	0,03	0,3	0,0X	0,01
Co	4	47	20	74	0,1	7	0,1
Cr	10	185	100	90	11	11	1
Cu	20	94	50	250	4	30	7
Fe (%)	1,42	8,6	5,1	6,5	0,38	0,9	40
Hg (%)	0,03	0,09	0,4	0,03	0,38	0,X	0,07
Mn (%)	0,045	0,18	0,09	0,07	0,11	0,1	7
Mo	1	1,5	2,627	0,4	3	-	0,6
Ni	10	145	60	230	20	30	0,3
Pb	17	7	20	30	9	9	1
Sb	0,22	0,6	1,5	1	0,2	0,15	0,07
Sc	7	27	16	19	1	2	0,004
Se	0,05	0,05	0,6	0,17	0,08	0,17	0,06
Sn	3	1,5	6	1,5	0,X	0,X	0,04
Ti (%)	0,12	1,14	0,6	0,46	0,04	0,08	3
Tl	2,3	0,21	1,4	0,8	0,0X	0,16	-
V	50	225	140	120	20	20	0,9
Zn	50	118	85	200	20	35	20

Tableau III : Quantités naturelles moyennes d'éléments dans certaines roches (ppm sauf informations contraires) et dans les ruisseaux (Taylor et McLennan, 1995).

Les roches sédimentaires sont formées lors de l'accrétion de particules provenant de la désintégration des roches primaires. Leur formation est très lente. Elles sont caractérisées par deux propriétés. D'une part, elles ont une structure poreuse leur permettant de contenir des fluides (eau, gaz, pétrole), et d'autre part, elles sont perméables, ce qui leur permet de les transporter. De cette façon, elles peuvent renfermer des minerais de métaux lourds déposés par des fluides hydrothermaux.

Les roches métamorphiques proviennent de la réorganisation et de la recristallisation des minéraux formant les roches. Deux composantes physiques principales doivent être réunies : une augmentation de la température et de la pression. Elles sont présentes lors de la métamorphose régionale (par transport vers le manteau inférieur) et de la métamorphose de contact (par montée du magma au contact de la roche).

2.1.1.2 - Les sols

La formation des sols (ou pédogénèse) est liée à l'action des conditions climatiques sur les roches. Les minéraux solubles sont dissous grâce à l'action combinée des acides carboniques et de l'eau, alors que les minéraux insolubles, tels que le quartz, sont réduits en fines particules. C'est ainsi que le sol formé constitue un milieu hétérogène très complexe, qui comprend d'une part, une phase solide (la matrice) contenant les matières minérales et organiques, et d'autre part, une phase fluide constituée d'eau interstitielle et d'air. Il existe des interactions entre ces différents compartiments. La pédogénèse est dépendante des facteurs climatiques, de la topographie, de la nature des roches mères et du temps. La composition très variable du sol s'explique si l'on tient compte de l'ensemble de ces facteurs. C'est la raison pour laquelle la concentration des métaux lourds peut varier significativement d'une zone à une autre (tableau III).

Dans les sols, se distinguent plusieurs couches appelées horizons. Le premier d'entre eux est l'horizon O. Il se compose en grande partie de matière organique en décomposition. L'horizon immédiatement inférieur est le A, où l'on peut trouver de la matière minérale et de la matière organique. Cette partie est soumise à l'éluviation par percolation des eaux de pluie. Les particules les plus fines ainsi que les éléments dissous sont transportés vers l'horizon inférieur : B. Ses principaux constituants sont de fines particules minérales et d'oxy-hydroxide de fer, qui sont susceptibles d'adsorber les métaux lourds. Pour finir, le plus profond de ces horizons, le C, se compose de morceaux des roches mères altérées.

Tous les sols contiennent de la matière organique sous forme d'organismes vivants, de matériaux organiques en décomposition et de substances humiques comportant divers groupes : carboxyles, hydroxyles, phénoliques, carbonyles, esters, aminés.

Les fines particules minérales sont produites par la dégradation des feldspaths, qui ont la propriété de présenter une grande surface spécifique chargée négativement et permettent l'adsorption de cations.

2.1.2 - Eaux de surface et nappes phréatiques

Les types de sols et de roches rencontrés influent sur la chimie des eaux de surface (flaques, rivières, lacs...). Les principaux paramètres physiques, chimiques et biochimiques agissant sur la composition de l'eau sont la température, le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, les procédés d'adsorption et de désorption de la matière en suspension (organique ou inorganique), les sédiments, la capacité d'échange cationique, la dilution, l'évaporation et les organismes présents.

Tous ces facteurs influencent la mobilité des métaux (Siegel, 2002), qui peuvent être dispersés par ruissellement, adsorbés sur les fines particules minérales et les oxy-hydroxydes de Fe et Mn, absorbés par les algues en début de chaîne trophique. Ces métaux lourds peuvent être accumulés jusqu'à des niveaux critiques et ainsi causer des dommages sur des organismes de niveaux trophiques plus élevés (Siegel, 2002).

2.2 - SOURCES ANTHROPIQUES (Bradl, 2005)

Diverses activités humaines sont à l'origine du relargage des métaux lourds dans l'environnement. Elles sont principalement liées à des activités agricoles, recourant à des engrais, fumiers et pesticides contenant des métaux lourds. En outre, les métaux lourds sont largement utilisés dans la production industrielle. Ils peuvent donc se retrouver, en bout de chaîne de production, sous forme de déchets.

2.2.1 - Les activités agricoles

Elles tiennent une place de plus en plus importante compte tenu des besoins croissants en nourriture, liés à l'évolution de la population mondiale. Il en découle souvent une utilisation massive de fertilisants et de pesticides. Les engrais ont deux types d'action : ils apportent les nutriments nécessaires aux cultures ou peuvent rendre les nutriments biodisponibles en agissant sur le pH du sol. Des amendements peuvent être réalisés à partir de boues de stations d'épuration, de sédiments dragués dans les ports et les rivières qui sont fréquemment riches en métaux (Alloway et Jackson, 1991).

Elements traces (ETM)	Moyenne (mg/kg de MS)	Valeur-limite réglementaire (mg/kg de MS)
Cadmium (Cd)	5,3	20
Chrome (Cr)	80	1000
Cuivre (Cu)	334	1000
Mercure (Hg)	2,7	10
Nickel (Ni)	39	200
Plomb (Pb)	133	800
Zinc (Zn)	921	3000

Tableau IV : Concentration moyenne en ETM des boues d'épuration (ADEME)
www.inra.fr/dpenv/lesboues.htm

Eléments traces métalliques (ETM)	Valeur limites (mg/kg de MS)	Flux maximal cumulé en 10 ans (g/m ²)
Cd	20 (*)	0,03 (**)
Cr	1000	1,5
Cu	1000	1,5
Hg	10	0,015
Ni	200	0,3
Pd	800	1,5
Zn	3000	4,5

(*) 15 mg/Kg de MS à compter du 01/01/2001 et 10 mg/kg de MS à compter du 01/01/2004

(**) 0,015 g/m² à compter du 01/01/2001

Tableau V : Teneurs limites en ETM des boues

www.inra.fr/dpenv/lesboues.htm#legislation

En fonction des roches mères dont ils sont issus, les engrais phosphatés peuvent contenir diverses quantités de métaux lourds. Par exemple, ceux issus de roches sédimentaires ont tendance à avoir des quantités de Cd plus élevées que ceux dérivés de roches magmatiques (Adriano, 2001). L'apport de Cd dans les sols de culture dépend donc du type d'engrais utilisé (Darby *et al.*, 1986). Les engrais azotés et phosphatés peuvent contenir respectivement jusqu'à 8,5 mg et 170 Cd/kg poids sec de sol (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Ces cinquante dernières années, l'épandage d'eaux usées a largement été employé dans les régions industrialisées. Bien que cette utilisation présente des points positifs, tels que le recyclage de nutriments, la prévention de pollution des ruisseaux, ou la diminution de l'utilisation d'engrais commerciaux, elle pose également des inconvénients, que sont les coûts de transport, l'appauvrissement des sols et les risques de pollution aux métaux lourds (Senesi *et al.*, 1999).

En ce qui concerne l'épandage de boues ou de fumier, riches en nutriments et en matières organiques, il est utilisé afin d'enrichir les sols. De plus il va contribuer à alléger les sols, et faciliter le labourage, l'aération des sols. Cela va également augmenter la capacité de rétention d'eau. Ces boues et fumiers peuvent contenir des métaux lourds (dont les plus importants sont Cd, Zn, Cu, Pb, Se, Mo, Hg et Cr, tableau IV) ainsi que des agents pathogènes (*E. coli*). Ces métaux se retrouvent dans la zone des quinze premiers centimètres de profondeur (Adriano, 1992).

En France, la législation en place depuis de nombreuses années et définie par la directive européenne du 12 juin 1986 (directive 86/278/CEE), la loi sur l'eau du 3 janvier 1992 (92-3) et la loi de 1975 sur les déchets, a été renforcée en 1997-98 par le décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 et l'arrêté du 8 janvier 1998. Cette évolution de la réglementation a pour objectif de protéger les acteurs socio-économiques des filières d'épandage ainsi que de définir les meilleures conditions d'innocuité pour l'Homme et son environnement, et de fait, éviter tous les abus et dérives.

Des seuils plus sévères ont été fixés, par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, pour les micropolluants et des flux maximaux cumulés sont imposés: les teneurs limites en éléments traces métalliques des boues sont diminuées de moitié par rapport à la norme NF U 44-041 (1998) . Elles sont présentées dans le tableau V.

Les déchets animaux et les engrais posent des problèmes environnementaux, car ils contiennent des agents pathogènes. Ils causent également des nuisances publiques (mauvaises odeurs, mouches). La concentration en métaux lourds des boues animales dépend de divers facteurs : le type d'animal (bétail, porc, volaille...), leur âge, la nature de la nourriture utilisée, le type d'enclos et de gestion des déchets (Adriano, 2001). Bien qu'habituellement peu chargés en métaux lourds, les déchets animaux contiennent une

grande quantité d'azote et de sels, si bien que le déséquilibre des nutriments pour la plante peut poser problème (Siegel, 2002).

2.2.2 - Les activités industrielles et métallurgiques

Diverses activités industrielles ont été identifiées comme rejetant des métaux lourds dans l'environnement. Les principales sont l'exploitation minière, la combustion de charbon, l'utilisation d'effluents et l'épandage de boues.

2.2.2.1 - L'exploitation minière

Beaucoup de métaux se trouvant déposés dans les minerais vont, pendant les procédés d'exploitation, se retrouver dans la grande quantité de déchets produite. Ceux-ci sont soit déposés en tas soit utilisés comme remblais. A cause des conditions environnementales, les déblais exposés subissent une oxydation, ce qui crée un drainage « minier acide » comme cela peut être le cas pour la pyrite. Ces conditions acides mobilisent les métaux lourds présents dans ces roches.

De telles conditions peuvent engendrer des problèmes environnementaux ou de santé publique, liés à l'utilisation d'eau polluée (cuisine, boisson...), ou à la consommation d'aliments cultivés sur des sols pollués (irrigation...).

Ainsi, de nombreux problèmes de santé publique liés aux métaux lourds (As, Cd, Hg, et Pb) sont connus. On peut citer l'exemple de l'utilisation du mercure pour l'extraction de l'or : le mercure est relâché dans les rivières par le nettoyage à grande eau ou se retrouve dans l'atmosphère par combustion. Il en résulte une grande bioaccumulation dans la chaîne alimentaire (Cleary *et al.*, 1994 ; Lacerda *et al.*, 1994).

2.2.2.2 - Combustion de charbon et pétrochimie

L'utilisation de combustibles fossiles contribue activement au relargage de métaux lourds dans l'environnement, en particulier dans l'atmosphère. Le charbon peut être utilisé pour produire de l'électricité, comme source de chaleur. Seul un tiers des cendres volatiles générées est recyclé (ciment, céramiques...) (Carlson et Adriano, 1993). La nature et la concentration des métaux lourds présents dans les résidus de charbon dépendent de la composition du charbon à l'origine, des conditions de combustion, de la qualité du dispositif de contrôle d'émission, du stockage et de la manipulation des produits, et du climat. Les

principaux métaux lourds présents dans les résidus carbonés sont Cd, Mo, Se et Zn (Carlson et Adriano, 1993).

2.2.2.3 - Les environnements domestiques et urbains

Les espaces urbains ne cessent de s'accroître et se caractérisent par une forte densité de population, ce qui entraîne une consommation électrique excessive, une expansion industrielle et une activité des transports importante liée au mode de logement. Ils nécessitent également un approvisionnement en eau et un besoin d'énergie considérables, ainsi qu'une collecte et un dépôt des déchets plus importants. Ces éléments contribuent à la surpollution de cet environnement. Les gaz d'échappement des automobiles sont responsables de la pollution des bas-côtés et de la végétation par les métaux lourds (Pb, Zn, Cd, Cu, Ni) (Zupancic, 1999) ainsi que par les éléments du groupe du platine (platinoïdes), utilisés dans les échappements catalytiques (Ravindra *et al.*, 2004). Les zones contaminées peuvent s'étendre à plusieurs dizaines de mètres de la route en fonction de la fréquentation et de la localisation (Zupancic, 1999).

2.2.2.4 - Traitement des déchets solides

La société de consommation actuelle produit une grande quantité de déchets solides. Les principales sources de déchets solides contenant des métaux lourds sont : les activités industrielles et en particulier la production d'énergie, l'exploitation minière, les déchets domestiques (tels que batteries, pneus, appareils électriques ménagers, voitures usagées).

La combustion des déchets solides, à l'aide d'incinérateurs de déchets, peut être une des sources principales de la présence de métaux lourds dans l'atmosphère (Pb, Hg, Cd, etc...).

2.3 - LE CADMIUM (Bradl et al., 2005)

2.3.1 - Propriétés physico-chimiques

Le cadmium est un métal malléable, blanc et brillant. Son poids atomique est de 112,4. Il possède une masse volumique de $8,64 \text{ g cm}^{-3}$ et un point de fusion de 321°C . Il existe 8 isotopes stables : ^{106}Cd (1,22%), ^{108}Cd (0,88%), ^{110}Cd (12,39%), ^{111}Cd (12,75%), ^{112}Cd (24,08%), ^{113}Cd (12,26%), ^{114}Cd (28,85%), ^{116}Cd (7,58%).

Le cadmium est un métal de transition du groupe 2-B du tableau périodique. Le plus souvent, il est divalent. C'est le cas dans tous les composés stables, les formes hydroxydes, les ions complexes (avec ammonium et cyanures) ainsi que dans les complexes organiques. Les formes cadmiées ont tendance à précipiter en présence de carbonates, d'arséniates, de phosphates, d'oxalates et de ferrocyanures. Le cadmium est soluble dans l'acide nitrique et il est abondamment utilisé dans les alliages dont le point de fusion n'est pas élevé.

Sa mobilité et sa biodisponibilité sont fonction de ses formes chimiques. Dans les sols et les sédiments, le cadmium se trouve principalement dans la fraction échangeable ainsi que dans la fraction carbonée. La fraction organique est négligeable. Le cadmium des sols pollués par les activités anthropiques semble être plus biodisponible que celui des sols naturels non modifiés (Chang, 1996). Dans la solution du sol, une grande partie du cadmium se trouve sous forme libre Cd^{2+} et CdHCO_3^+ , alors que dans la phase solide le cadmium des sols calcaires est rapidement adsorbé et précipité (Barrow et Cox, 1992) ; les complexes organo-cadmiés y sont minoritaires. En présence de fortes concentrations de Cl^- et SO_4^{2-} dans le sol, le cadmium forme prioritairement des chloro et sulfato-complexes (Kinniburgh et Jackson, 1978). Contrairement aux autres métaux (Cu, Pb, Hg...), plusieurs études montrent que les formes dominantes dans la plupart des boues et sols arables sont les ions cadmium libres ainsi que le cadmium complexé par des ligands inorganiques (Barrow et Cox, 1992 ; Sarkar *et al.*, 1999). Sur la base d'une composition moyenne d'eau de rivières, la distribution des formes solubles du cadmium peut être prédite (Hirschet Banin, 1990). Le phénomène d'adsorption du cadmium est très rapide : 95% de l'adsorption a lieu dans les dix premières minutes et l'équilibre est atteint après une heure (Santillan-Medrano et Jurinak, 1975). La précipitation joue un rôle non négligeable dans la quantité de cadmium présente dans le sol. Pour les sols calcaires, la solubilité du cadmium tend à diminuer avec les faibles concentrations et l'augmentation du pH. La précipitation de CdCO_3 a lieu dans les sols sableux ayant une faible CEC, une faible concentration en matière organique et un pH alcalin (McBride, 1980). La précipitation prédomine aux fortes concentrations, pour lesquelles les échanges ioniques sont plus importants par rapport aux faibles concentrations. Plusieurs paramètres vont influencer l'adsorption du cadmium : le pH, la force ionique et les cations échangeables (Elliott et Denny, 1982), la présence de ligands organiques tels que l'EDTA ou le NTA (Holm *et al.*, 1996). En présence d'ions chlorure (Cl^-) divers complexes peuvent se former : CdCl_2^0 , CdCl_3^- , CdCl_4^{2-} . Ces complexes chlorés sont moins fortement adsorbés que les ions libres Cd^{2+} . Par ailleurs, la présence de carbone organique dissous et/ou d'agents chélateurs, peut empêcher la coprecipitation du métal avec CdCO_3 et/ou minorer l'adsorption du métal dans les phases solides (Christensen, 1984).

L'adsorption du cadmium est aussi fortement influencée par la présence de cations divalents tels que Ca, Zn. Ces cations entrent en compétition avec le Cd et sont capables de désorber le Cd des sols. Sur les sites d'adsorption des argiles pures, les ions Cd^{2+} entrent en compétition avec les ions Ca^{2+} . Dans le cas de sols différenciés, c'est le Cd qui est préférentiellement fixé (Cowan *et al.*, 1991). Comparativement aux argiles pures, les colloïdes du sol possèdent un grand nombre de sites spécifiques d'adsorption de forte affinité pour le cadmium. Cependant aux concentrations environnementales, la présence d'éléments alcalins dans les sols n'a qu'un effet mineur sur la fixation du Cd par les oxy-hydroxydes ferreux amorphes (Davis et Leckie, 1980).

2.3.2 - Origines et usages du cadmium

Le cadmium est un sous-produit de l'industrie du zinc. Il est extrait lors de la fusion et de la purification des concentrés de zinc. Il est communément utilisé dans les alliages, en galvanisation, dans les pigments, comme stabilisateur pour les plastiques à base de PVC, dans les batteries et pour protéger le fer et l'acier de la corrosion. Bien que l'usage du Cd diminue au niveau mondial, il reste présent dans de nombreux biens de consommation et dans certains fongicides.

Dans la nature, le Cd se trouve sous le second état d'oxydation. Il est placé au 64ème rang des éléments de la croûte terrestre (Krauskopf, 1979), avec une gamme de concentrations comprise entre 0,15 et 0,20 ppm. Les principales sources anthropiques responsables de la présence de Cd dans l'environnement sont l'utilisation d'engrais phosphatés (McLaughlin et Tiller, 1994), l'épandage de boues de station d'épuration. A ceci s'ajoutent les dépôts atmosphériques (Pignata *et al.*, 2002 ; Galsomiès *et al.*, 2003 ; Gombert *et al.*, 2004) pouvant provenir de l'activité minière et métallurgique, mais aussi de l'incinération de plastiques, des peintures, des énergies fossiles, ainsi que de l'activité automobile (Preer et Rosen, 1977).

Les activités minières peuvent engendrer une eau chargée en Cd, ce qui peut affecter de larges zones. L'exemple le plus connu est celui de la rivière Jinzu au Japon, où les habitants ont été exposés au Cd sur une période de 30 ans. L'eau de rivière, chargée en Cd était utilisée pour irriguer les rizières ce qui provoqua l'apparition de la maladie d'itaï-itaï (Takijima et Katsumi, 1973). La source de pollution des rizières du bassin de la rivière Jinzu était la mine de Kamioka située à 40 Km en amont sur la rivière. La concentration en Cd des sols des rizières était comprise entre 1,35 à 6,88 mg Kg^{-1} et de 0,37 mg Kg^{-1} dans le riz.

2.3.3 - Effets écotoxicologiques du cadmium

Le Cd est toxique pour une grande partie des plantes, pour les invertébrés et les vertébrés à de plus faibles concentrations que le Zn, Pb ou le Cu : à titre d'exemple, la CL50(96h) est de 5,70 µg Cd/L pour la truite arc-en-ciel, la CE50(21 jours) est de 14 µg Cd/L pour *Daphnia magna* (D.O.S.E.⁴) il existe des valeurs plus faibles pour la daphnie. La phytotoxicité dépend des espèces et de la concentration de l'élément dans le milieu. Les symptômes typiques de la toxicité des plantes au Cd ressemblent à ceux de la chlorose : diminution de la quantité de chlorophylle et de la photosynthèse due à l'inhibition d'enzymes, par exemple la RubisCo (Chugh et Sawhney, 1999), perturbation des photosystèmes (Lang *et al.*, 1995). Ils s'accompagnent d'une nécrose, avec diminution de la croissance. Ces symptômes ont déjà été décrits pour le riz et le radis (Khan et Frankland, 1983). Le cadmium interfère donc avec le métabolisme des plantes. De nombreuses conséquences peuvent en découler, telles qu'un retard de croissance, une subérisation, des dommages des structures racinaires internes et externes, une diminution du transport de l'eau, des interférences dans l'absorption et le transport des nutriments, une diminution de la quantité de chlorophylle, des interférences avec les activités enzymatiques et une diminution de l'activité stomatale (De Vos *et al.*, 1991, Waisel *et al.*, 1991, Lagriffoul *et al.*, 1998).

2.4 - LA BIODISPONIBILITE DES METAUX

2.4.1 - Définition

Il s'agit de la proportion d'un élément susceptible d'être absorbée par un organisme vivant. Pour les végétaux on parle de phytodisponibilité. Elle est fonction des facteurs qui régissent l'équilibre entre la fraction métallique de la phase liquide et celle liée aux constituants du sol de la phase solide. Quelle que soit l'origine de la pollution, les avis diffèrent quant à une présence importante du cadmium dans la phase liquide du sol dite aussi mobile, donc facilement échangeable (Legret *et al.*, 1988 ; Garcia Sanchez *et al.*, 1999) et son faible transfert vers les systèmes aquatiques (Peakall et Burger, 2003). Cependant dans le sable, qui possède de gros pores permettant la circulation de l'eau, le Cd a été retrouvé à deux mètres de profondeur à des concentrations pouvant atteindre 0,1 à 0,2 mg Kg⁻¹ de terre (Sterckeman *et al.*, 2000).

⁴ Dictionary of Substances and Their Effects (dictionnaire des substances et de leurs effets)

Paramètres	Effet sur la toxicité du métal
Température	Augmente avec la température
Lumière	Peut intervenir dans certains cas
pH	Les faibles pH augmentent la toxicité
Potentiel d'oxydo-réduction	Un potentiel négatif décroît la toxicité
Cations monovalents (Na et K)	Chute de la toxicité avec l'augmentation de leur concentration
Cations divalents (Ca, Mg, Mn et Fe)	Chute de la toxicité avec l'augmentation de leur concentration
Métaux lourds	Effet synergique/antagoniste en fonction de la combinaison des métaux, de leurs concentrations et de leur séquence d'addition
Anions (Acétate, phosphate, nitrate et sulfate)	Réduit la toxicité
Produits extracellulaires (Acides organiques, polyphénols, polysaccharides, polypeptides)	Réduit la toxicité
Les acides aminés soufrés	Réduit la toxicité
Les fractions sédimentaires (Solides Suspendus et colloïdes)	Réduit la toxicité

Tableau VI : Effets des paramètres physico-chimiques sur la toxicité des métaux, chez les végétaux non vasculaires (Mallick et Rai, 2002)

Cette phytodisponibilité est fonction de divers facteurs environnementaux d'ordre physiques, chimiques mais aussi biologiques.

2.4.2 - Facteurs agissant sur la biodisponibilité

Les facteurs agissant sur la disponibilité des métaux des écosystèmes sont le pH, le potentiel redox, la salinité, la présence d'anions, de cations, d'acides aminés, de composés soufrés, de ligands et d'acide carbonique. L'importance de la spéciation des métaux ainsi que la concentration des ions métalliques libres ou complexés ont largement été étudiées, ce qui a conduit à des modèles intéressants (tableau VI).

La toxicité des métaux est étroitement corrélée au pH. A pH acide, les métaux tendent à exister sous forme d'ions hydratés libres très toxiques alors qu'à pH alcalin ils peuvent être précipités sous la forme de complexes insolubles. Néanmoins la réponse au pH est complexe et les faibles pH ne conduisent pas toujours à une augmentation de la toxicité (Rai *et al.*, 1990). Une étude montre que la concentration en Al chez *Scapania undulata*, une herbe aquatique, augmente dans les habitats neutres par rapport à ceux acides (Yoshimura *et al.*, 1998). De plus, la réponse observée à un pH spécifique est probablement due à la relation entre la spéciation des métaux et le pH optimum des organismes (Kelly, 1988). De ce point de vue, le lichen *Byoria fuscescens* répond de manière intéressante à la toxicité métallique à pH acide. Le partenaire algal est plus sensible au pH faible. Les dommages apparaissent dans les chloroplastes et les mitochondries, où les cristaux thylacoïdiens et mitochondriaux sont gonflés (Tarhanen, 1998). Le champignon est plus sensible aux pH élevés, évoquant une modulation de l'action du pH sur la toxicité des métaux.

Le potentiel redox est le facteur majeur de la régulation de la disponibilité des électrons. Lorsqu'il est négatif, il est caractéristique des milieux réducteurs. Les conditions réductrices rencontrées en milieux anaérobies, conduisent à la conversion des sulfates en sulfites avec la précipitation des métaux (formation de complexes métal/sulfites), diminuant ainsi leur disponibilité et par conséquent leur toxicité. De plus le potentiel redox environnemental détermine la valence de certains métaux. Ainsi en milieu oxygéné du fjord de Saanich Inlet, en Colombie Britannique, le Cr est sous la forme Cr (IV), alors qu'en milieu anoxique il est sous la forme Cr (III). La différence de charge d'un même élément entraîne une toxicité différente, le Cr (IV) étant généralement plus toxique que le Cr (III) comme cela a été démontré pour les champignons terrestres *Penicillium vermiculatum* ou *Rhizopus stolonifer* (Babich et Stozky, 1983).

En présence de cations (mono- ou divalents), la toxicité des métaux décroît. La sensibilité aux métaux est généralement plus grande à faible salinité (Haglund *et al.*, 1996).

Cependant, l'augmentation de la toxicité aux métaux chez *Scenedesmus armatus* et *Oocystis submarina* avec celle de la salinité, a été observée par Adam et Waldemar (1998). Une réduction de la toxicité a été mise en évidence en présence d'anions, tels que hydroxyle, acétate, sulfate, phosphate, nitrate et sélénite. L'eau dure (contenant calcium et magnésium) tend à réduire la toxicité de la plupart des métaux (Gagnon *et al.*, 1998).

La température et la pression hydrostatique sont des facteurs secondaires pouvant agir sur la toxicité : une élévation de ces facteurs cause une augmentation de la toxicité (Jung-Ho *et al.*, 1998).

Les émissions de polluants sont souvent multiples, ce qui expose les *biota* à plusieurs métaux. Le type et les combinaisons de métaux vont avoir des effets antagonistes ou synergiques. L'interaction spécifique métal-métal dépend de l'organisme, des concentrations relatives et de la séquence d'exposition aux métaux (Pietilanien, 1975 ; Stratton et Corke, 1979 ; Mallick et Rai, 1989).

Au niveau des racines des végétaux, des exsudats sont excrétés. Ils vont modifier les caractéristiques physico-chimiques du sol. C'est ainsi que les acides organiques situés au niveau de la rhizosphère diminuent la mobilité des métaux (Halim *et al.*, 2003). Le type de couverture végétale ainsi que la croissance de la plante jouent sur l'absorption des métaux (Caille *et al.*, 2005). Ainsi la stratégie employée par les dicotylédones pour libérer des nutriments consiste à acidifier le milieu en augmentant l'activité des pompes ATPase H⁺ dépendantes (Marschner, 1998). Cette technique peut modifier la solubilité des métaux (*e.i.* Zn), et par conséquent les rendre bio disponible (Caille *et al.*, 2005).

Cependant, la croissance du végétal peut créer un effet de dilution saisonnier, dont il faut tenir compte. Cet effet est plus ou moins marqué en fonction du caractère hyper accumulateur de l'espèce végétale considérée (Deram *et al.*, 2006).

3 - TOXICITE DES METAUX ET TOLERANCE DES PLANTES

Les végétaux puisent les nutriments dont ils ont besoin pour se développer dans le sol. Dans le cas d'une pollution métallique, ces mêmes mécanismes vont faciliter l'entrée d'éléments non essentiels au niveau cellulaire. Cependant certains végétaux vont résister à cette pollution alors que d'autres vont périr. Plusieurs mécanismes sont à l'origine de ce phénomène de tolérance.

3.1 - MODES DE TOXICITE DES METAUX

Le mode d'action des micropolluants chez les végétaux supérieurs présente des caractéristiques particulières ; pour agir au niveau du génome, une substance chimique doit franchir un certain nombre d'étapes :

- la pénétration correspond au passage de la barrière cuticulaire constituée de cutines et de cires dans les parties aériennes et de subérines dans les parties souterraines. Ces substances vont laisser passer préférentiellement les substances lipophiles. Le nombre d'époxydes et d'hydroxyles qui régulent le caractère lipophile de cette barrière varie selon les plantes et l'âge des plantes, ce qui rend certains végétaux plus sensibles aux polluants que d'autres.

Les autres étapes impliquent des systèmes enzymatiques assez similaires à ceux des animaux (Sandermann, 1994). De nombreux promutagènes sont ainsi activés : le benzo[a]pyrène, certaines nitrosamines (Plewa et Wagner, 1993), des aflatoxines, des amines aromatiques (Veleminsky et Gichner, 1988).

- la fonctionnalisation assurée par des enzymes de phase I, qui rendent les molécules réactives en ajoutant une fonction nouvelle. Ceci se traduit par un gain de polarité des micropolluants. Il y a trois grands types de transformation : les réductions, les hydrolyses de groupements amides ou esters par exemple, et les oxydations. Ce dernier type de transformation est le plus important au niveau qualitatif et quantitatif. Il met en jeu des enzymes telles que des peroxydases (qui sont des hémoprotéines), des peroxygénases et des monooxygénases à cytochrome P-450 (ces dernières étant des enzymes endomembranaires qui peuvent être inhibées, par exemple, par le cadmium).

- la conjugaison est réalisée par des enzymes de phase II qui assurent le transfert d'acide glucuronique, glutathion, acides aminés, etc. vers la molécule fonctionnalisée qui accroît encore sa polarité.

- la compartimentation : stockage dans la vacuole des molécules devenues hydrophiles, incorporation dans la paroi (e.g. le benzo[a]pyrène forme des liaisons covalentes avec la lignine des parois).

Ces étapes de métabolisation peuvent constituer une source d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), dont certaines sont des radicaux. Ceux-ci sont des atomes ou des molécules présentant un ou plusieurs électrons célibataires qui sont facteurs d'instabilité et de réactivité. Les formes réactives de l'oxygène sont par exemple l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, l'anion

superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle OH^\bullet et les radicaux hydroperoxydes. Le système des monooxygénases à cytochrome P-450 présente notamment un puissant potentiel de production d'espèces réactives. Il faut encore noter que les cellules photosynthétiques sont prédisposées au stress oxydant parce qu'elles produisent et consomment de l'oxygène (Vangronsveld *et al.*, 1997). Les plantes supérieures ont un système antioxydant relativement efficace pour faire face à la toxicité et à la génotoxicité des espèces réactives de l'oxygène (Asada 1994, Foyer et Harbinson 1997). En outre, les plantes supérieures contiennent des substances anti-oxydantes telles que des composés phénoliques, des caroténoïdes, etc. qui réagissent avec les espèces réactives de l'oxygène (Larson, 1995).

Lorsque les enzymes du stress oxydant sont inefficaces, les espèces réactives de l'oxygène peuvent avoir une action nocive sur l'ensemble des constituants cellulaires, (Cossu *et al.*, 1997 ; Van Breusegem *et al.*, 2001) :

- la peroxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides est une réaction destructrice très importante. Elle peut se traduire par une destruction des membranes de la cellule et des organites . (Vangronsveld *et al.*, 1997).
- l'altération des protéines
- les dommages à l'ADN, comme des coupures de brins d'ADN et des lésions de bases par l'anion superoxyde (Radetski, 1996).

Par ailleurs, les effets génotoxiques des métaux ne se produisent pas seulement par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène. Ils peuvent également agir directement, comme le plomb par exemple qui perturbe l'activité physiologique de la calmoduline en l'empêchant de réguler la dépolymérisation et la polymérisation des microtubules du fuseau mitotique (Liu *et al.*, 1994). Le plomb est également soupçonné d'inhiber les enzymes de réparation (Dryanovska, 1987). Pour ce qui est du chrome, la forme chromate est celle qui est la plus toxique car elle est capable de traverser les membranes cellulaires en utilisant les mêmes mécanismes de transport que les ions sulfate et phosphate (Jennette 1981) . Dans le cytoplasme, le Chrome VI est réduit par l'action combinée des enzymes du cytochrome P-450 et par le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit) en chrome III qui se lie aux acides nucléiques et aux nucléoprotéines et par conséquent peut induire des effets génotoxiques (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1986).

La toxicité des métaux peut aussi se manifester par la répression des enzymes du cycle de l'azote, tels que nitrogénase, nitrate réductase, glutamine synthase (Campbell, 1999) ou, la chute de l'activité ATPase (Rai *et al.*, 1994 ; Husaini *et al.*, 1996a), la chute du pH cytoplasmique et l'augmentation de la viscosité du cytoplasme (Grabowski *et al.*, 1997).

Tous les métaux, essentiels ou non, peuvent exercer une toxicité en fonction de leur concentration. Le seuil de toxicité peut être très faible pour les métaux les plus toxiques. Les

mécanismes de toxicité incluent le blocage des groupes fonctionnels des molécules importantes (telles que les enzymes, les polynucléotides, les systèmes de transport des ions et des nutriments essentiels), le déplacement et/ou la substitution d'ions essentiels des sites cellulaires, la dénaturation et l'inactivation d'enzymes, la disruption de l'intégrité membranaire cellulaire, D'un point de vue biochimique, tous les indicateurs d'intégrité des cellules vivantes peuvent être affectés par une pollution métallique (Reddy et Prasad 1992a, b, 1994 ; Nagalakshmi et Prasad 1998, 2000 ; Prasad *et al.*, 1998).

Le caractère le plus facile à étudier est l'inhibition de la croissance, résultant de l'ensemble des dysfonctionnements des mécanismes cellulaires. Elle se mesure par pesée ou par mesure de l'élongation racinaire.

3.1.1 - Dommages membranaires

La membrane cytoplasmique est la première cible des métaux. Les métaux peuvent interagir avec les composants cellulaires uniquement après l'avoir franchie. Chez *Plectonema boryanum* des verticilles extra-membranaires apparaissent après un traitement au Zn, Cu, Hg, Cd et Ni (Rachlin *et al.*, 1982). Rachlin *et al.* (1984) ont montré chez *Anabaena flos-aquae* une disparition de plusieurs composants internes cellulaires après une exposition au Cd, ainsi qu'un éloignement de la paroi pecto-cellulosique de la membrane plasmique. Il s'en suit une augmentation du volume relatif de la paroi secondaire (interne). Après une exposition au Cd, Rai *et al.* (1990) ont mis en évidence une dégradation du peptidoglycane de la paroi, qui est plus flagrante aux pH extrêmes. La dégradation du peptidoglycane est complète à 1,18 μ M Cd pour un pH de 4,0.

Un autre effet important des métaux sur la membrane concerne la perméabilité, entraînant la perte d'ions et de solutés (De Filippis, 1979). Les métaux sont connus pour altérer la perméabilité de la membrane des lichens et des bryophytes. Brown et Slingsby (1972) ont montré qu'une faible concentration de Ni induisait une faible perte de potassium chez *Cladonia rangiformis*, mais à des concentrations plus élevées, la perte est brutale. A l'opposé, une perte importante de potassium apparaît à faible concentration avec Cu, Hg et Ag chez les cellules algales (Overnell, 1975).

L'altération du fonctionnement de la membrane cellulaire se fait au travers de réactions avec les groupes sulfoniques des constituants de la paroi et de la peroxydation lipidique. Les métaux sont connus pour avoir une forte affinité avec les groupes sulfoniques et carboxyliques, en fonction des caractéristiques physico-chimiques du cation (De Filippis, 1979). De plus, les pompes ATPase transportant les électrons et les nutriments sont, elles aussi, affectées par les métaux (Rai *et al.*, 1994 ; Husaini *et al.*, 1996). La pompe H^+/K^+ ATP dépendante joue un rôle important dans le transport des H^+ au travers de la membrane, ce qui permet le maintien de la neutralité du pH cytoplasmique. L'inhibition de ces pompes

entraîne une acidification du cytoplasme. La non conservation du gradient H^+ dans le cytoplasme ou dans les thylakoïdes conduit à une diminution de la photosynthèse et d'autres processus cellulaires (Grabowski *et al.*, 1997). Husaini *et al.* (1996) ont mis en évidence une inhibition des pompes Ca^{2+} et Mg^{2+} ATPase chez les algues *Nostoc linckia* et *Chlorella vulgaris* en présence d'aluminium. Cette inhibition peut alors être à l'origine du dysfonctionnement de la signalisation intracellulaire et de différents processus physiologiques, pouvant entraîner la mort de l'organisme, comme cela a été démontré chez des bryophytes tels que *Conocephalum conicum* L. (Trebacz *et al.*, 1994).

La peroxydation lipidique est une réaction destructive importante de la membrane. Elle est initiée par la formation de radicaux libres. Il en résulte une augmentation de la perméabilité membranaire qui peut engendrer une perte totale des constituants cellulaires. De Vos *et al.* (1989) suggèrent que les premières actions du Cu sont l'oxydation et la liaison aux groupes sulfates de la membrane. Elles sont suivies d'une peroxydation lipidique qui influe sur la perméabilité par action sur les lipides et les thiols membranaires.

3.1.2 - Inactivation enzymatique

Des concentrations élevées de métaux ont des effets significatifs sur les systèmes enzymatiques qui contrôlent les procédés biochimiques et physiologiques comme la photosynthèse, la respiration et la synthèse de biomolécules. Les métaux peuvent inactiver les enzymes par oxydation de leur fonction $-SH$ ou en se substituant au cation nécessaire à leur activité catalytique.

Souvent les sites de coordination des enzymes sont occupés par des métaux. L'inhibition de la fonction enzymatique se fait lorsqu'un métal essentiel est remplacé par un autre qui ne possède pas les propriétés chimiques nécessaires au maintien de l'activité biochimique. De cette manière, beaucoup de métalloenzymes peuvent être inhibées, comme c'est le cas des enzymes du cycle de Calvin e.g. glycéraldéhyde-3-phosphate kinase (Weigel, 1985). La RubisCo peut être aussi inhibée par les métaux lourds par interaction avec les fonctions $-SH$ et ou par la substitution de Mg par un autre métal toxique (Van Assche et Clijsters, 1990).

3.1.2.1 - Dommages sur le métabolisme de production d'énergie

Tous les métaux étudiés sont des inhibiteurs potentiels du photosystème II ; le photosystème I semble moins sensible. Des expérimentations *in vitro* ont permis d'identifier au moins deux sites métallo-sensibles dans la chaîne photosynthétique de transport d'électrons : celui

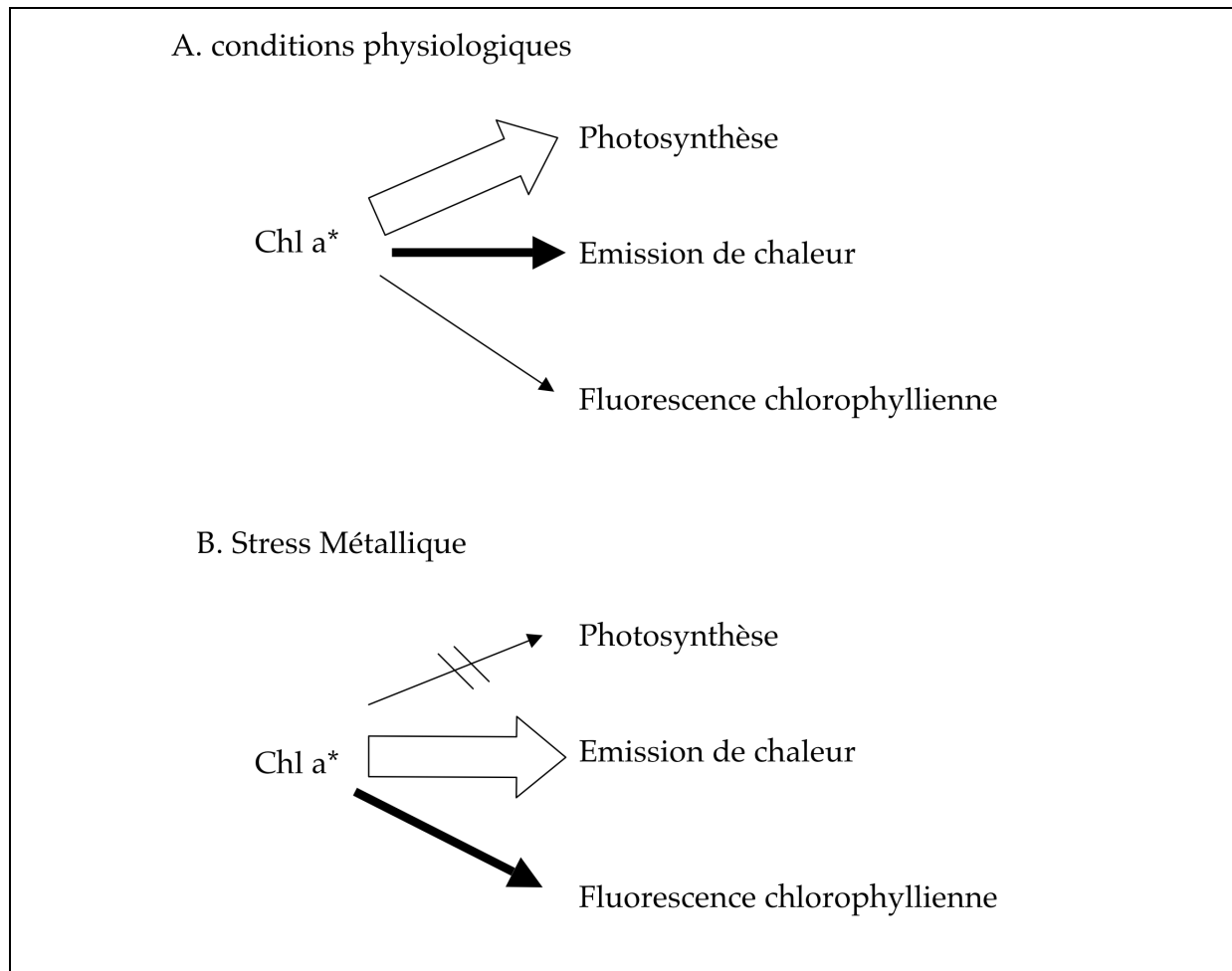


Figure 7 : Dé-excitation de la chlorophylle a liée à la photosynthèse, émission de chaleur et émission de fluorescence chez les végétaux A) conditions physiologique et B) conditions de stress métallique. L'épaisseur des traits des flèches indique la proportion relative des trois procédés de dé-excitation. (d'après Lichtenthaler, 1996)

d'oxydation et le centre réactionnel du PSII chez l'algue *Chlorella vulgaris* (Rai *et al.*, 1991, 1994) chez la cyanobactérie *Anabaena doliolum* (Mallick et Rai, 1992) chez la cyanobactérie *Nostoc muscorum* (Prasad *et al.*, 1991). *In vivo*, la mesure de la fluorescence de la chlorophylle *a* est l'un des meilleurs outils pour étudier l'effet de composés sur le PSII (Salvetat *et al.*, 1998). La figure 7 résume, chez les végétaux photosynthétiques, les façons dont la chlorophylle *a* peut être désexcitée. En conditions physiologiques (A), 80 à 90 % de l'énergie lumineuse absorbée est dissipée grâce à la chlorophylle *a* via la voie de conversion d'énergie photosynthétique (émission de chaleur comprise entre 5 et 15 % ; fluorescence chlorophyllienne comprise entre 0,5 et 2 %). Lors d'un stress métallique (B), la voie de conversion d'énergie photosynthétique est perturbée au profit de la dissipation calorifique et de la fluorescence chlorophyllienne, dont les émissions augmentent considérablement.

Mallick et Mohn (2001) ont mis en évidence une diminution générale de la production d'énergie chez une micro algue verte *Scenedesmus obliquus* soumise à un stress causé par Cu, Ni, Pb, Cr et Cd. Cette diminution de l'efficacité du photosystème en présence de métaux découle d'une diminution de la photophosphorylation et, par conséquent, d'une diminution de la production d'ATP (Kessler et Brand, 1994a, b). La diminution de la quantité d'ATP est caractéristique de la réponse d'exposition aux métaux lourds (De Filippis et Ziegler, 1993). Cette exposition est responsable de la réduction du métabolisme cellulaire.

3.1.2.2 - Effet des métaux sur la chlorophylle

La chlorose se traduit par une diminution de la quantité de chlorophylle dans les feuilles. Elle est souvent observée comme symptôme d'une exposition aux métaux. Une substitution de Mg^{2+} par un ion métallique s'opère (Küpper *et al.*, 1996, 1998). Tous les métaux n'ont pas la même toxicité vis-à-vis de la chlorophylle. Chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*, 50 et 100 μM de Cu^{2+} causent une diminution de la quantité de chlorophylle supérieure à celle provoquée par une exposition au cadmium à des concentrations identiques (Prasad *et al.*, 1998).

Lorsque le cadmium est présent dans le sol, et bien qu'il soit un composant non essentiel pour les végétaux, il est facilement mobilisé au niveau des racines et transporté vers les feuilles (Siedlecka et Krupa, 1997). Le cadmium provoque une diminution de la quantité de chlorophylle chez plusieurs espèces végétales : le riz, le blé, l'orge (Naguib *et al.*, 1982 ; Malik *et al.*, 1992 ; Vassilev *et al.*, 1998) et le pois (Chugh et Sawhney, 1999). L'effet du cadmium sur la chlorophylle dépend aussi bien de l'espèce végétale que du mode de traitement. Schlegel *et al.* (1987) ont observé une diminution de la chlorophylle dans les premières feuilles et les cotylédons des graines d'épicea, après 5 semaines de traitement avec

des concentrations comprises entre 1 et 15 μM de Cd. Alors que chez les graines de betterave à sucre un traitement à l'aide de 5 μM de Cd ne montre aucune différence significative de la baisse de la chlorophylle par aire de feuille, comparé à un témoin de 4 semaines (Greger et Ogren, 1991). Une augmentation de la concentration de Cd à 20 μM cause une inhibition de la biosynthèse de la chlorophylle de 75 % (Greger et Ogren, 1991).

Une diminution des chlorophylles *a* et *b* a également été observée chez le tournesol âgé de 5 semaines traité deux semaines avec des concentrations de 10 et 40 μM de Cd (Gadallah, 1995). Les quantités de chlorophylles *a* et *b* étaient respectivement de 72 et 57 % (pour 10 μM) et 88-57 % (pour 40 μM) par rapport au témoin. Chez le maïs, une diminution significative de 35 % a été observée pour des concentrations de 100 et 250 μM (Ferretti *et al.*, 1993). Pour le blé âgé de 40 jours traité 2 et 4 jours avec 5 et 10 mM de Cd, la diminution de la chlorophylle totale dans la troisième feuille est environ deux fois plus rapide que dans la première feuille (Bishnoi *et al.*, 1999).

La diminution de la biosynthèse de la chlorophylle est indépendante de la quantité d'azote inorganique (Parekh *et al.*, 1990) ainsi que de la quantité de fer du milieu (Fodor *et al.*, 1996).

L'effet inhibiteur du cadmium sur la synthèse de la chlorophylle peut être réduit ou partiellement inversé en présence de kinétine (Gadallah, 1995) et d'uniconazole, un dérivé triazolé (Thomas et Singh, 1996).

L'effet du cadmium sur la chlorophylle est fonction de sa concentration, mais il semble être aussi fortement dépendant du stade de développement des végétaux (Skòzynska-Polit et Bazynski, 1995 ; Shaw et Rout, 1998).

Enfin, les mécanismes de chlorose dus à une longue exposition au cadmium semblent être la conséquence d'un déficit en Fe et Mg (Siedlecka et Kupra, 1997) ou de l'action du cadmium sur les enzymes de la synthèse chlorophyllienne.

3.1.2.3 - Métaux et acides nucléiques

En général les métaux agissent directement sur les acides nucléiques. Les premiers travaux concernant les propriétés mutagènes des polluants sur les plantes datent des années 1950 (Sparrow, 1951, Sparrow *et al.*, 1952). Différents travaux ont mis en évidence les dommages causés à l'ADN par des polluants (Ma *et al.*, 1995 ; Steinkellner *et al.*, 1998). Les métaux peuvent provoquer l'apparition de micronoyaux par cassure chromosomique (clastogénèse) ou par un dysfonctionnement du fuseau mitotique (aneugénèse) (cf figure 18).

Ernst (1980) signale l'augmentation d'aberrations chromosomiques après que des graines de crépide verdoyante (*Crepis capillaris*) aient été traitées au cadmium. Des liaisons entre les deux brins d'ADN, des cassures de brins d'ADN (simple ou double brin) et des

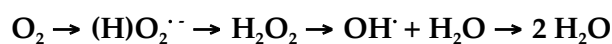
complexes ADN/métaux ont été signalés (Gebhart et Rossman, 1991). De plus, la génération de radicaux libres par les métaux peut induire indirectement des cassures dans les brins d'ADN (Halliwell et Gutteridge 1984). Des études de fragments d'ADN par « slot blot hybridation⁵ » montrent des changements au niveau de la transcription de l'ADN après exposition de blé au Cd, Pb et Zn (Meng *et al.*, 1998). Une analyse plus fine par méthode PCR sur *Arabidopsis thaliana* (arabette de Thalius) montre des bandes d'ADN polymorphiques chez les végétaux exposés aux métaux, alors qu'elles n'existent pas chez les organismes non exposés (Conte *et al.*, 1998). Des cassures chromosomiques et des ponts apparaissent de suite après l'exposition au cadmium. Le Cd est aussi connu pour altérer l'ADN chez *Arabidopsis thaliana* (Thomine *et al.*, 2000).

3.1.2.4 - Formation de radicaux libres

Les organismes aérobies tirent des avantages énergétiques en utilisant l'oxygène comme oxydant terminal de la respiration. Toutefois, la présence d'oxygène dans l'environnement cellulaire est une source potentielle d'exposition aux radicaux libres (ERO) (Alscher *et al.*, 1997). L'O₂ est une molécule inoffensive mais qui peut être réduite en espèces réactives de l'oxygène, lors de stress environnementaux (tels que des expositions aux UV, à l'ozone, à de fortes concentrations en métaux lourds...). Chez les végétaux, les ERO sont formées par la perte d'électron de l'oxygène moléculaire par action du transport des électrons dans les chloroplastes, les mitochondries (Fridovich, 1995 ; Foyer, 1997).

De plus plusieurs métaux comme le zinc, le cadmium, le nickel et le mercure forment des complexes très stables avec le glutathion et perturbent l'équilibre glutathion oxydé/glutathion réduit, ce qui diminue la quantité d'antioxydant disponible dans la cellule (Christie et Costa, 1984).

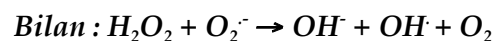
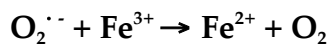
A l'état fondamental, l'oxygène moléculaire (O₂) est relativement peu réactif, et doit être activé pour manifester sa toxicité, soit par une activation photodynamique qui aboutit à l'oxygène singulet (¹O₂), soit par une activation réductrice avec formation séquentielle de l'anion superoxyde (O₂^{•-}), du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et du radical hydroxyle (OH[•]). Van Breusegem *et al.* (2001) résumant les différentes étapes de la réduction de l'oxygène moléculaire par la réaction séquentielle suivante :



⁵ hybridation d'ADN transféré sur membrane

La première étape de la réduction de l'oxygène moléculaire produit dans un premier temps l'hydroperoxyde ((H)O₂⁻ peu diffusible et à durée de vie très courte) puis l'ion superoxyde (O₂⁻ très stable en milieu hydrophobe) très réactif pouvant oxyder des acides aminés (comme l'histidine, la méthionine et le tryptophane) et causer une peroxydation lipidique au niveau des membranes cellulaires (Cossu *et al.*, 1997). Enfin, il est chimiquement incapable d'endommager l'ADN mais il peut accélérer les attaques à l'ADN en augmentant les niveaux de fer libre. Le fer ainsi libéré des ferritines va pouvoir participer aux réactions de peroxydation des membranes cellulaires (Noci-Charissou, 2002).

La seconde étape de la réduction de l'oxygène moléculaire génère, par dismutation de l'anion superoxyde, du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), une molécule qui peut se diffuser à travers l'organisme. La toxicité de cette molécule est liée à sa capacité à oxyder les groupements -SH. Ces oxydations peuvent être favorisées par la présence de métaux de transition (fer, cuivre) qui jouent alors le rôle de catalyseurs dans les réactions de Fenton (*in vitro*) ou d'Haber Weiss (*in vivo*) (Noci-Charissou, 2002) :



Ces réactions conduisent toutes à la dernière espèce réactive de l'oxygène à être produite lors de cette réaction : le radical hydroxyle (OH[·]) qui est extrêmement réactif. Il a une très grande affinité avec les biomolécules et de ce fait agit uniquement au niveau de son site de production.

Ces radicaux libres sont des oxydants redoutables, capables d'arracher des électrons aux macromolécules organiques cellulaires, provoquant ainsi la peroxydation des lipides membranaires, l'oxydation de bases azotées de l'ADN (8OH-dG par exemple) ou de protéines (Cossu *et al.*, 1997 ; Mayer *et al.*, 2001).

Si les ERO sont généralement issues du métabolisme cellulaire, elles peuvent être aussi générées lors d'un dérèglement des systèmes de transport des électrons en période de stress. Les principaux sites de production de ces radicaux libres sont les chloroplastes (au niveau des photosystèmes), les peroxysomes (sièges de la photorespiration) ou les mitochondries.

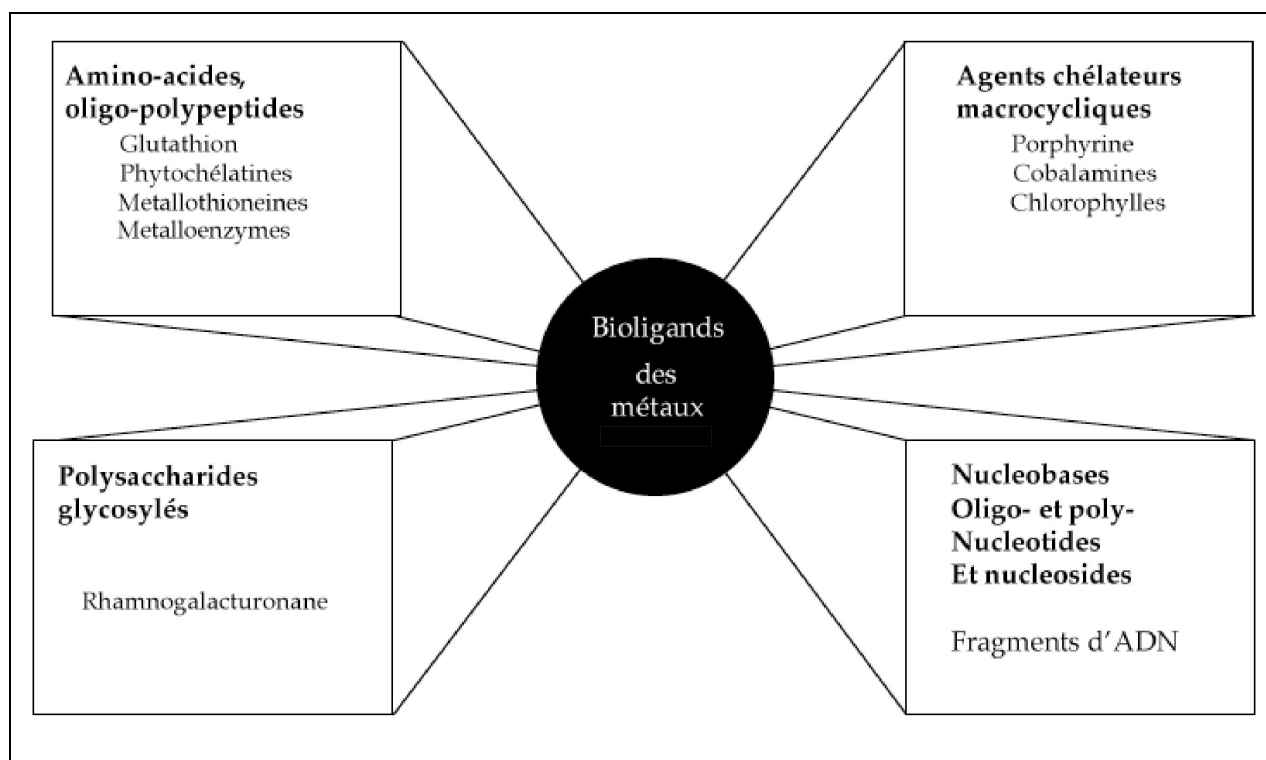


Figure 8 : Principaux bioligands des métaux. (Prasad, 2001)

3.2 - TOLERANCE ET ACCUMULATION DES METAUX DANS LES PLANTES

Les végétaux sont capables de supporter une forte quantité de métal dans leur environnement. Ils utilisent des mécanismes spécifiques pour neutraliser les métaux, en les rendant non disponibles (figure 8).

Deux stratégies différentes ont été identifiées :

- L'exclusion, qui concerne le faible prélèvement net de métaux même lorsqu'ils sont présents en grande quantité dans le sol
- L'accumulation en grande quantité des métaux même lorsqu'ils sont en faible quantité dans le sol.

De plus, certains végétaux tolèrent les métaux en n'en transférant qu'une petite quantité vers les feuilles, ce qui préserve la photosynthèse de dommages éventuels.

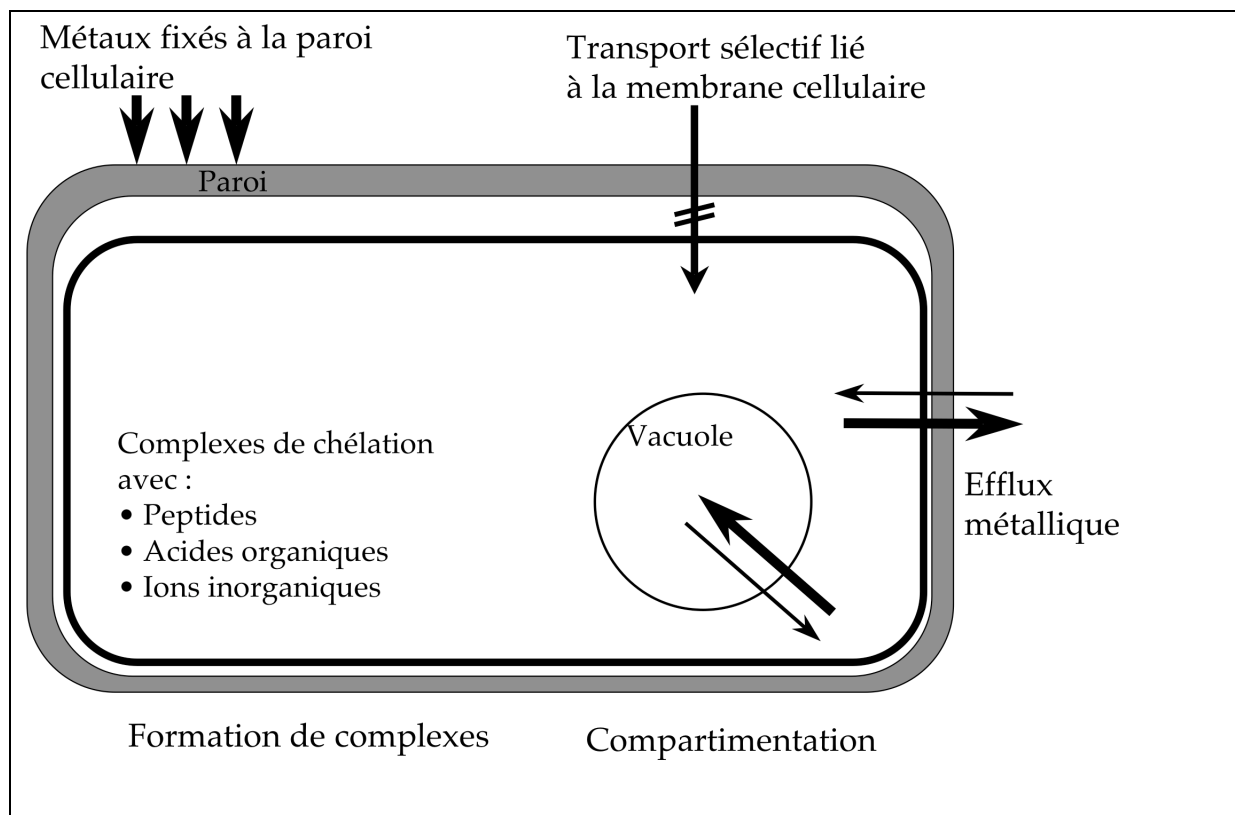


Figure 9 : Mécanismes cellulaires de résistance aux métaux (d'après Hall, 2002)

La tolérance vis-à-vis des métaux s'effectue de différentes façons (figure 9) : fixation sur la paroi, chélation par des ligands extra ou intra-cytoplasmiques (Grill *et al.*, 1985 ; Clemens, 2001), séquestration vacuolaire (Lichtenberger et Neumann, 1997) ou dans l'épiderme des feuilles et les trichomes (Foley et Singh, 1994 ; Neumann *et al.*, 1995 ; Krämer *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 2003), ou par exclusion active du métal (Zhang et Taylor, 1990 ;

Lindberg, 1990). Ainsi l'élément toxique n'est plus à même d'interférer avec les réactions du métabolisme du végétal. En présence de métaux toxiques, la tolérance aux métaux peut avoir la capacité d'atteindre ou de rétablir rapidement l'homéostasie interne de Ca^{2+} , K^+ et H^+ . Grâce à des mécanismes plus lents, les éléments toxiques interfèrent peu avec le prélèvement et l'utilisation des nutriments essentiels dépendant de pompes à protons. De plus, la résistance peut se faire grâce à l'existence d'enzymes métallo-résistantes.

Le cadmium a plusieurs sites d'action chez les végétaux, mais le phénomène de tolérance est principalement dû aux mécanismes d'exclusion et de séquestration dans des compartiments où la toxicité sera moindre (Grill *et al.*, 1985 ; Jackson *et al.*, 1990 ; Cobbett, 2000b). C'est ainsi que chez le bouleau (*Betula pendula*), le cadmium est accumulé dans les fines racines (Gussarsson, 1994). Il a aussi été démontré que les feuilles du bouleau sont plus sensibles aux métaux que celles de l'épicéa ou du pin, alors que ce dernier possède des racines plus sensibles (Österas *et al.*, 2000). La tolérance au Cd peut aussi être due à un fort efflux racinaire du métal. Les clones Cd-tolérants de *Salix* ont un efflux deux fois supérieur à celui des clones Cd-sensibles (Landberg et Greger, 2002). Il semble que les espèces de *Salix* aient une stratégie de tolérance liée à un faible prélèvement de métal (Landberg et Greger, 2002). Il est possible que les premiers ions Cd pénétrant les racines agissent comme un signal de commencement de l'efflux, de manière à décroître le prélèvement net (Landberg et Greger, 2002).

3.2.1 - Le stress oxydant

Dans les conditions normales, les processus oxydants sont impliqués dans divers mécanismes indispensables à la survie cellulaire (Inzé et Van Montagu, 1995) : la protéolyse (dégradation des protéines qui intervient aux différents stades de développement des végétaux), la formation de lignine au niveau des parois cellulaires, l'embryogenèse somatique (Kairong *et al.*, 1999), l'organogenèse (Tian *et al.*, 2003), les réactions d'hypersensibilité (stimulant les défenses cellulaires lors d'infections par des agents pathogènes), l'activation de gènes, la fermeture des stomates, le gravitropisme des racines ou la mort cellulaire programmée.

Ainsi, en conditions physiologiques, il existe un équilibre parfait entre la production d'ERO et les systèmes de défense antioxydants. Un stress oxydant se définira lorsqu'il y aura un déséquilibre profond entre antioxydants et pro-oxydants en faveur de ces derniers (Sies, 1991). Dès lors, les cellules végétales nécessitent au moins deux mécanismes de régulation des concentrations intracellulaires en ERO : l'un qui va moduler la production des ERO par rapport aux voies de signalisation décrites précédemment, l'autre permettant la détoxification des ERO en excès (Mittler, 2002).

Le réseau antioxydant implique diverses voies métaboliques catalysées ou non par des enzymes, et faisant intervenir aussi bien des molécules hydrophiles (que l'on trouvera au niveau du cytosol) qu'hydrophobes (que l'on trouvera au niveau des membranes cellulaires). Généralement, les molécules intervenant dans les processus de détoxification sont classées en deux groupes distincts : les antioxydants non enzymatiques et enzymatiques.

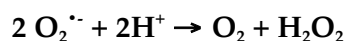
3.2.1.1 - Antioxydants non enzymatiques

Les composés non enzymatiques du système anti-oxydant se composent de molécules de faible poids moléculaire, telles que l'acide ascorbique (vitamine C) (Pignocchi et Foyer, 2003), l'alpha-tocophérol (vitamine E), les pigments caroténoïdes ou encore le glutathion (Podsdek, 2007). Les vitamines C et E piègent les radicaux hydroxyles, l'oxygène singulet et l'anion radical superoxyde (Yu, 1994). Les pigments caroténoïdiens peuvent prévenir la formation de l'oxygène singulet en absorbant l'énergie excédentaire de la chlorophylle. Le glutathion réagit avec l'oxygène singulet et le radical hydroxyle. Il peut aussi intervenir comme réducteur, dans le but de protéger les groupements thiols des enzymes ou comme régénérateur de l'ascorbate.

3.2.1.2 - Enzymes antioxydantes

3.2.1.2.1 - Superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

Ce sont des metalloenzymes découvertes pour la première fois, en 1969, par Mc Cord et Fridovich. Elles transforment l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), chez tous les organismes aérobies ainsi que chez quelques organismes anaérobies (Hassan, 1989), suivant la réaction :



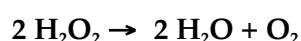
Elles sont considérées comme les premières lignes de défense cellulaire contre les radicaux oxygénés (Alscher *et al.*, 1997). Elles sont facilement induites (Kitagawa *et al.*, 1991), et la réaction de dismutation est catalysée par divers ions métalliques (Cu, Mg, Fe). Les SOD sont classées en trois catégories, les Cu/ZnSODs, les MnSODs et les FeSODs, proches phylogénétiquement (Alscher *et al.*, 2002). Les végétaux possèdent les trois types de SOD. Des isoenzymes ont été identifiées dans le cytosol, les mitochondries et les chloroplastes (Kwiatowski *et al.*, 1985 ; Palma *et al.*, 1986 ; Kanematsu et Asada, 1990), mais aussi dans les

peroxysomes (Sandalio et del Rio, 1988), les glyoxysomes (Bueno et del Rio, 1992) et dans l'espace extracellulaire (Schinkel *et al.*, 1998).

Chez les végétaux, les SOD sont encodées par le génome nucléaire (Peerl-Treves *et al.*, 1990) et les isoenzymes des organites sont transportées post-transcriptionnellement vers le compartiment désiré.

3.2.1.2.2 - Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Elles transforment le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) suivant la réaction :



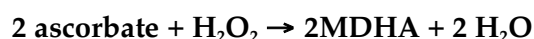
Dans les feuilles, les catalases se trouvent dans les peroxysomes, où elles neutralisent H₂O₂ produit par le cycle de photorespiration en C2 (Willekens *et al.*, 1995).

3.2.1.2.3 - Guaiacol peroxydase (GPX, EC 1.11.1.7)

Deux types d'isoenzymes ont été identifiés : une forme anionique (acide) et une forme cationique (basique). La première est impliquée dans les mécanismes de synthèse de la paroi cellulaire (lignine et subérine) tandis que la seconde intervient dans les voies de régulation de différentes phytohormones (l'éthylène en particulier). Par ailleurs, différentes études ont montré l'activation de cette enzyme lors de stress oxydants liés à des contaminations métalliques (Fieldes et Gerhardt, 1998 ; Kanazawa *et al.*, 2000).

3.2.1.2.4 - Ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11)

Elles réduisent le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) avec production de monodéhydroxyascorbate (MDHA) suivant la réaction :



Il existe des isoformes de l'enzyme : cytosoliques (Mittler et Zilinkas, 1992), thylakoïdiennes et stromatiques, que l'on retrouve dans les chloroplastes (Miyake et Asada, 1992). Ainsi, elles pourront, au niveau des thylakoïdes, limiter la propagation et les réactions des ERO entre elles. Dans le stroma, elles opéreront comme deuxième ligne de défense en protégeant les enzymes du cycle de Calvin.

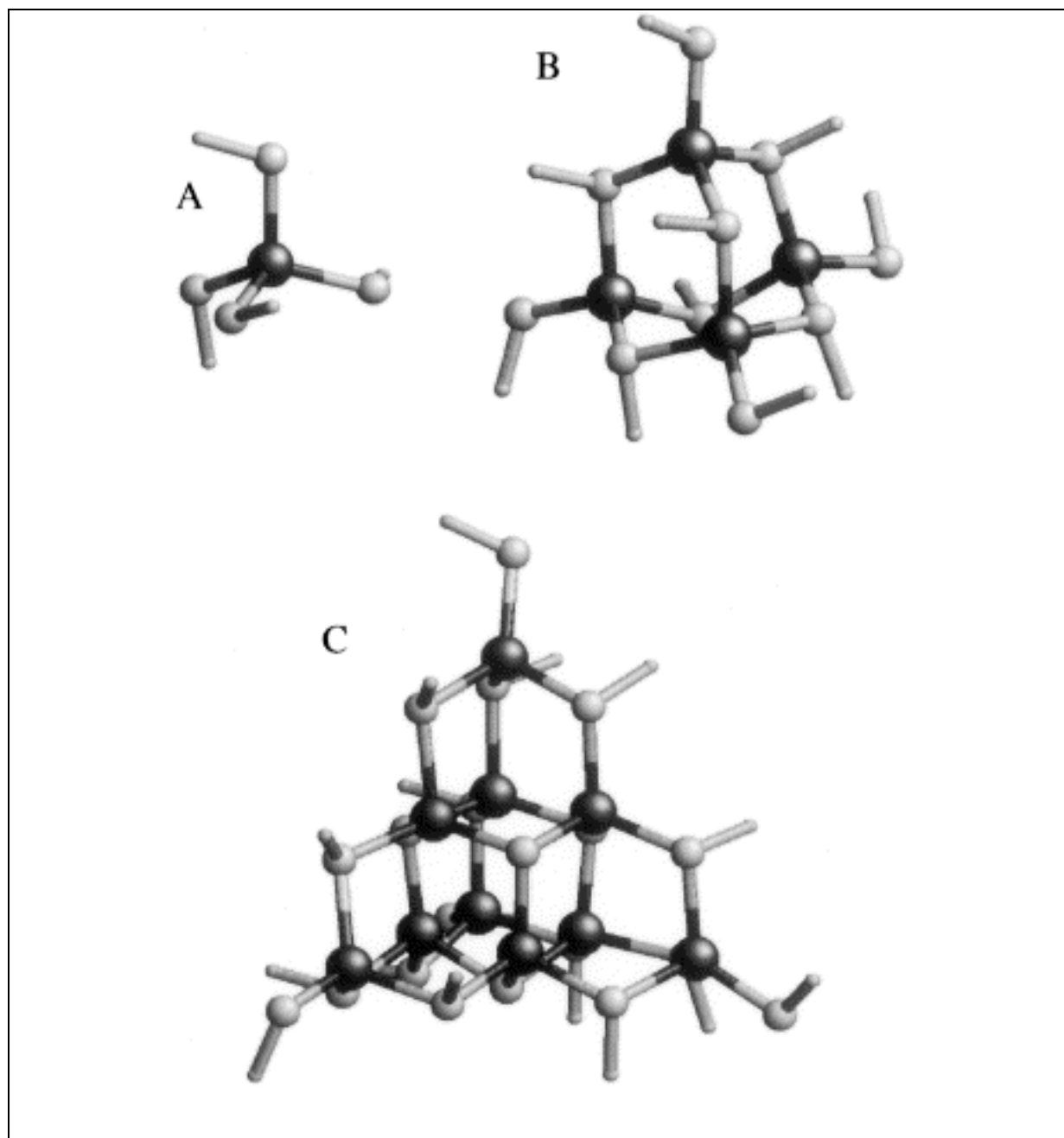
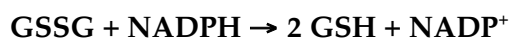


Figure 10 : Structures de : (A) $[\text{Cd}(\text{SPh})_4]^{2-}$; (B) $[\text{Cd}_4(\text{SPh})_{10}]^{2-}$; et (C) $[\text{S}_4\text{Cd}_{10}(\text{SPh})_{16}]^4$.

Les atomes de cadmium sont symbolisés par de larges sphères noires, les atomes de soufre par de moyennes sphères et les carbones qui lient les atomes de soufre par de petites sphères claires. SPh : benzènethiolate (Pickering *et al.*, 1999)

3.2.1.2.5 - Glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2)

Elle aide à la régénération du pool de glutathion et utilise le NADPH comme donneur d'électrons.



L'activité de la glutathion réductase est maximale dans les chloroplastes (Foyer et Halliwell, 1976). On retrouve aussi l'enzyme dans les mitochondries et le cytoplasme (Drumm-Herrel *et al.*, 1989, Edwards *et al.*, 1990).

3.2.2 - Les phytochélatines (PC)

Elles ont été identifiées pour la première fois chez *Rauwolfia serpentina* traitée par du Cd (Grill *et al.*, 1985), et ont d'abord été appelées métallothionéines de Classe III (MT-III). C'est plus tard, lorsque leur mode d'induction sera connu, qu'elles prendront le nom de phytochélatines pour les différencier des métallothionéines. Elles ont un rôle de détoxification des métaux lourds chez les algues, les champignons, les mousses et les plantes supérieures, en neutralisant les métaux et en aidant à leur transport vers des compartiments où ils ne pourront intervenir dans le métabolisme cellulaire (Kotrba *et al.*, 1999 ; Rauser, 1999 ; Sanità di Toppi et Gabrielli, 1999 ; Cobbett, 2000a,b ; Clemens, 2001).

Liées à la présence des groupes -SH de la cystéine, les PC forment des complexes avec plusieurs métaux lourds. Elles en diminuent la quantité libre circulant dans le cytosol (Grill *et al.*, 1985). En condition non « sur-saturée » en ions métalliques, seul le groupe sulfhydryle de la cystéine intervient et non les atomes d'hydrogène d'azote ou d'oxygène du peptide (Pickering *et al.*, 1999) (figure 10).

La masse des complexes Cd-PC est comprise entre 1800 et 4000 Da, mais peut parfois atteindre 8000 Da (Grill *et al.*, 1987 ; Rauser, 1999). La longueur d'une liaison Cd-S du complexe PC-Cd ($2,52 \pm 0,02 \text{ \AA}$) a été déterminée par spectrométrie d'absorption aux rayons X (EXAFS) (Strasdeit *et al.*, 1991). Avec cette technique, des graines de maïs exposées à de faibles concentrations en Cd ($3 \mu\text{M}$ pendant 5 à 7 jours) ont permis de mettre en évidence la formation de macromolécules autour de plusieurs noyaux de cadmium (figure 10) (Pickering *et al.*, 1999). Certains complexes PC-Cd incorporent du soufre (S^{2-}), qui augmente la stabilité et le pouvoir de séquestration du Cd.

Cinq structures primaires de PC sont connues (tableau VII) (Rauser, 1995 ; Zenk, 1996). De manière générale, elles se composent d'un glutamate en position N-terminale avec une cystéine fixée sur sa fonction γ -COOH. Elle forme une liaison peptidique γ et non pas α comme on le trouve communément chez les protéines. L'acide aminé en C-terminale permet

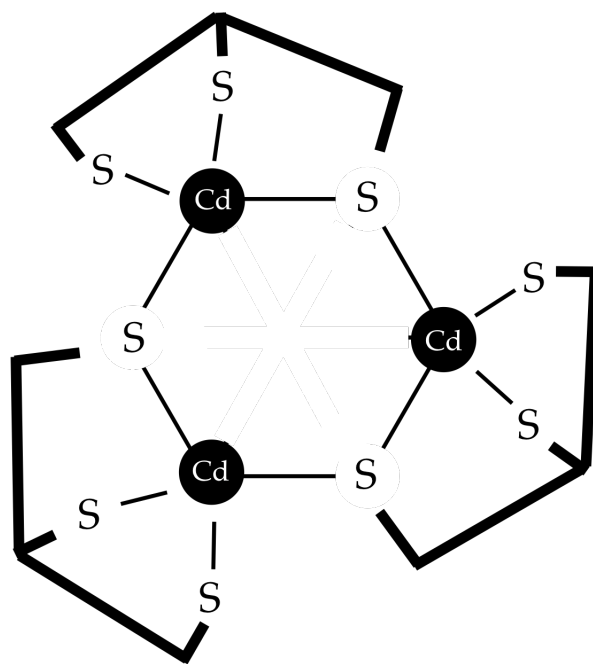


Figure 11 : Modèle structurel du complexe Cd(SCys)₄ d'après Zenk 1996

de faire la distinction entre les cinq catégories (Rauser, 1995). Toutefois une sixième famille a été identifiée plus récemment chez *Armoracia rusticana*, avec la glutamine comme acide aminé en C-terminale (Kubota *et al.*, 2000). Les PC sont synthétisées lors de l'exposition des plantes aux métaux lourds en présence de GSH (Rauser, 1995 ; Zenk, 1996 ; Rüegeberger *et al.*, 1990 ; Tukendorf et Rauser, 1990).

Phytochélatines (PC) : $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ Chez <i>Rauwolfia serpentina</i>	n= 2-11	Grill <i>et al.</i> , 1985
Homophytochélatines (hPC) : $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$ Chez les Fabaceae	n= 2-7	Grill <i>et al.</i> , 1986
Hydroxyméthylphytochélatines (iso-PC) : $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$ Chez <i>Oryza sativa</i>	n= 2-4	Klapheck <i>et al.</i> , 1994
IsoPC (Glu) : $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$ Chez <i>Zea Mays</i>	n= 2-3	Meuwly <i>et al.</i> , 1993
Desglycylpeptides : $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$ Chez <i>Candida glabrata</i> et <i>Schizosaccharomyces Pombe</i> et <i>Rubia tinctorum</i> L	n= 2-5	Mehra <i>et al.</i> , 1988 Kubota <i>et al.</i> , 1995 Maitani <i>et al.</i> , 1996
IsoPC (Gln) : $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gln}$ Chez <i>Armoracia rusticana</i>	n= 1-3	Kubota <i>et al.</i> , 2000

Tableau VII : Les différentes catégories de PC

Mehra *et al.* (1988) estiment que, chez le champignon *Candida glabrata* exposé au cuivre, il y a, à la fois, une production de métallothionéines et de PC. Plus tard, il a été démontré que la résistance au Cd de *Candida glabrata* était liée à la capacité des PC à fixer les « cristaux » CdS (Mehra *et al.*, 1995) (figure 11).

Les PC sont synthétisées à partir du GSH, grâce à une enzyme cytosolique, la γ -glutamylcystéine transférase (E.C. 2.3.2.15.) également appelée phytochélatine synthase (PCS). Celle-ci peut être activée par une grande variété de métaux lourds, tels que Ag, Bi, Cd, Cu, Mg, Pb, Sn, Zn (Zenk, 1996). Les PC sont capables de chélater les métaux lourds (ML) grâce à la grande quantité de cystéine présente dans la structure de ces molécules.

Des études (Gekeler *et al.*, 1989) menées sur plus de 200 espèces et cultures cellulaires végétales traitées aux métaux lourds comme le Cd, ont montré la présence de métallo-complexes (ML-PC) de divers degrés de polymérisation (n=2 à 11). Ces complexes ont une longueur variable (2,5 à 3,6 kDa) qui dépend des espèces végétales, de la durée d'exposition et de la quantité du métal auquel ils sont exposés (Grill *et al.*, 1987).

L'association métaux-lourds/PC est réalisée grâce à la présence des fonctions thiols (-SH) (Zenk, 1996). La fixation d'ion S^{2-} dans la structure augmente leur poids moléculaire,

leur stabilité et leur capacité à fixer les métaux (Zenk, 1996). La distinction est faite entre les LMW (Low Molecular Weight où $n < 4$) et les HMW (Heavy Molecular Weight où $n > 7$) chez *Rovolfia serpentina*. *Arabidopsis thaliana* mutant *cad1* est hypersensible vis-à-vis du Cd, car incapable de synthétiser des HMW, mais seulement une faible quantité de LMW (Howden *et al.*, 1995a,b). Récemment, Rauser (2000) a démontré que la proportion de mono- et di-thiol est plus importante chez les complexes de faible poids moléculaire que chez ceux de haut poids moléculaire. Les complexes HMW vacuolaires contiennent plus de Cd par molécule thiolée. Les complexes LMW sont localisés dans le cytosol et contiennent une grande quantité d'acide labile soufré. A eux deux, ces complexes chélatent 75 à 88 % du Cd contenu dans les racines de maïs.

Les complexes LMW sont transportés dans la vacuole (Ortiz *et al.*, 1992, 1995) par un transporteur ATP-dépendant chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*. Salt et Rauser (1995) ont identifié un transporteur identique Mg^{2+} et ATP-dépendant facilitant le transport de complexes LMW au travers du tonoplaste des vacuoles racinaires de l'avoine. Le cadmium pénètre dans la vacuole via un antiport $Cd^{2+}/2H^{+}$ (Salt et Wagner, 1993), où il forme avec les ions S^{2-} et les PC de faible poids moléculaire, des complexes plus stables de haut poids moléculaire (Speiser *et al.*, 1992 ; Ortiz *et al.*, 1995).

Il semblerait que le rôle joué par les PC ne soit que transitoire dans la fonction de détoxification des métaux lourds (Leopold *et al.*, 1999 ; Piechalak *et al.*, 2002). Après un temps de récupération (sans métal) plus ou moins long, les métallo-complexes disparaissent et les métaux doivent être pris en charge par des molécules de plus petit poids moléculaire que les PC.

Le GSH, lui aussi, est capable de former des complexes avec les métaux lourds. La formation de complexe $Cd-(GSH)_2$ et son rôle de médiateur dans le transport vers les PC ont été démontrés par Mehra *et al.* (1995, 1996), mais aussi par Bea et Mehra (1997).

3.2.2.1 - Synthèse du glutathion

Le glutathion est la principale réserve de soufre non protéique (du fait de sa synthèse non ribosomale et sa structure particulière : deux fonctions carboxyliques et une amine) (Kunert et Foyer, 1993). Il est synthétisé à la fois dans le cytosol et les chloroplastes (Rennenberg et Brunold, 1994 ; Noctor *et al.*, 1998). Le GSH est transporté des feuilles et il est redistribué par l'intermédiaire du phloème vers les fruits, les graines et les racines (Leustek *et al.*, 2000). La quantité de GSH présente dans les cellules est un équilibre dynamique entre sa synthèse et sa dégradation.

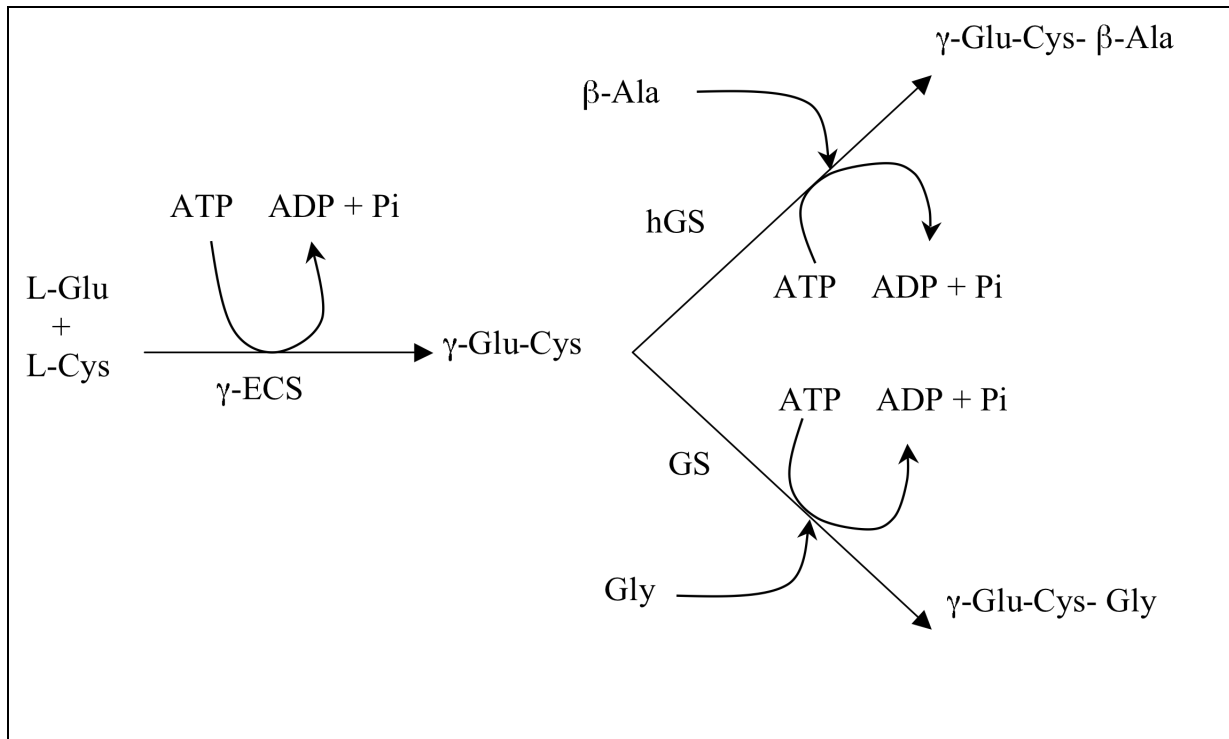


Figure 13 : Voie des synthèses du glutathion et d'homocysteine
 (d'après Grill *et al.*, 1985, 1986)

γ -ECS : γ -glutamylcystéine synthase ; GS : Glutathion synthase ;
 hGS : Homo-glutathion synthase

Le GSH est synthétisé par le biais de deux réactions (figure 12), à partir d'acide glutamique, cystéine et glycine (Noctor *et al.*, 1998). La première de ces réactions est catalysée par la γ -glutamylcystéine synthase (γ -ECS)(E.C. 6.3.2.2.), pendant laquelle une liaison est faite entre la fonction γ -carboxylique de l'acide glutamique et la fonction amine de la cystéine. La seconde réaction, catalysée par la glutathion synthase (GS) (E.C. 6.3.2.3.), fixe la glycine au C-terminal de la γ -glutamylcystéine (γ -EC).

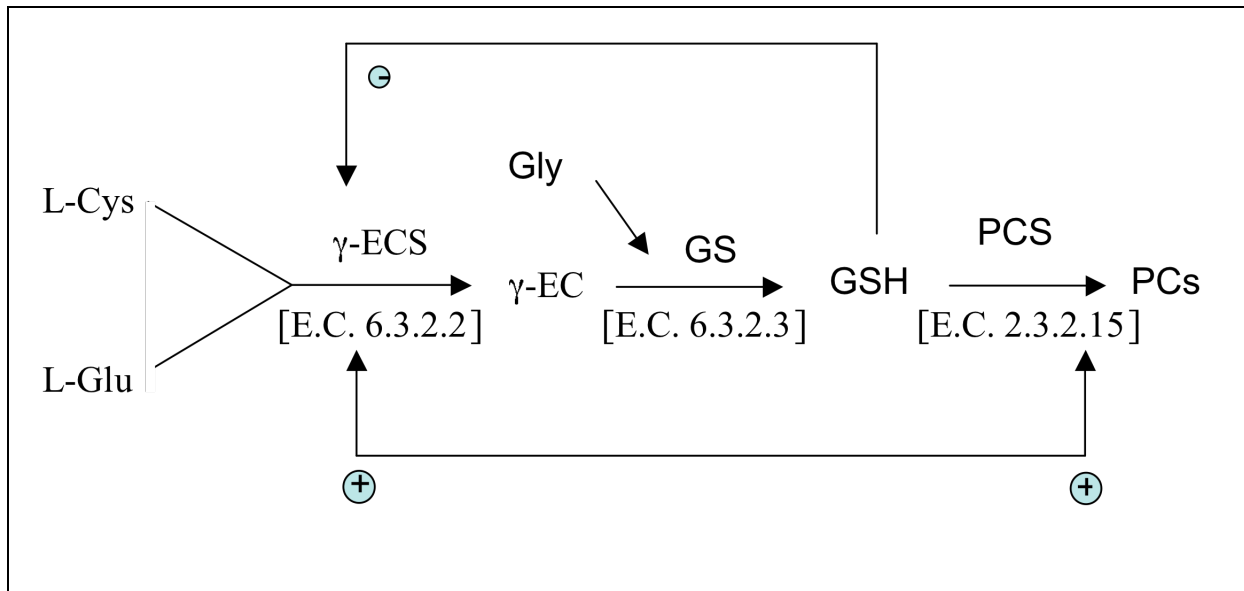


Figure 12: Schéma de la régulation de la biosynthèse du glutathion (GSH) et des PC . ⊕ activation, ⊖ inhibition (d'après Cobbett, 2000)

L'activité de γ -ECS est inhibée par la quantité de GSH cellulaire (quelques mM suffisent). Chez certains végétaux, des homologues du GSH existent. Ils diffèrent par l'acide aminé fixé en C-terminal de γ -ECS *e.g.* γ -Glu-Cys- β -Ala (cf. Tableau VII) . Cette réaction est catalysée par l'homoglutathion synthase, hGS (Klapheck, 1988 ; Rauser, 1995)(figure 13).

Frendo *et al.* (1999) suggèrent que ces deux enzymes sont codées par deux gènes différents. Ils ont isolé chez *Medicago truncatula*, deux séquences partielles d'ADNc *gsh1* et *gsh2*. L'expression du gène *gsh1* est plus importante dans les feuilles et les fleurs, contrairement à *gsh2* qui l'est dans les racines et les nodules. Ces auteurs émettent l'hypothèse que *gsh1* et *gsh2* encodent respectivement pour GS et hGS. Les proportions GS/hGS semblent varier en fonction des plantes et des organes d'une même espèce (Frendo *et al.*, 1999).

L'induction de la biosynthèse du glutathion est un mécanisme rapide, permettant aux plantes de se protéger vis-à-vis des métaux lourds. Une augmentation de la quantité foliaire du GSH est alors observée. Il sert de substrat à la synthèse de PC qui vont, grâce à leur fonction -SH, chélater les métaux lourds (Zhu *et al.*, 1999).

3.2.2.2 - Biosynthèse des PC

La structure primaire des PC suggère qu'elles proviennent du GSH et de ses dérivés. Deux structures des PC indiquent que leur synthèse n'est pas transcriptionnelle :

- la liaison γ -carboxylique
- l'existence de l'homo-PC PC-(β -Ala), un amino-acide C-terminal non conventionnel pour lequel il n'existe pas d'ARN-t, ce qui suggère une synthèse non ribosomale.

D'autres points de l'origine non transcriptionnelle des PC par leur élongation avec le GSH sont :

- la structure similaire de la liaison peptidique entre le GSH et les PC;
- la relation inverse induite par les métaux lourds entre l'accumulation des PC et le niveau du GSH (Grill *et al.*, 1985 ; Scheller *et al.*, 1987 ; Delhaize *et al.*, 1989)
- le blocage de la synthèse des PC par la buthionine sulfoximine (BSO), inhibiteur spécifique de la γ -EC synthétase (Steffens *et al.*, 1986 ; Reese et Wagner, 1987 ; Scheller *et al.*, 1987).

La liaison γ -Glutamyl de l'acide glutamique et la cystéine, confère à ces peptides une résistance accrue à l'action des peptidases. En 1987, Grill *et al.* avaient déjà démontré le caractère inductible de l'enzyme catalysant la réaction de synthèse des PC, par Cd(NO₃)₂ dans une suspension cellulaire de *Rauvolfia serpentina*. Celle-ci s'accompagne d'une déplétion de la quantité de GSH endogène (Zenk, 1996). La phytochélatine synthase (PCS) catalyse le transport du groupe γ -Glu-Cys du glutathion donneur vers un accepteur moléculaire ou une PC (Grill *et al.*, 1989 ; Loeffler *et al.*, 1989).

Le fait que le glutathion soit le précurseur des PC est confirmé par la chute drastique de la concentration cytosolique ainsi que l'induction des enzymes de synthèse du GSH, la γ -ECS et la GS (Rüegsegger *et al.*, 1990 ; Rüegsegger et Brunold, 1992).

La PCS, quant à elle, peut être activée par plusieurs métaux lourds, dont la capacité d'induction varie sur une culture cellulaire de *Silene cucubalus* (Grill *et al.*, 1987) : Cd²⁺ > Pb²⁺ > Zn²⁺ > Sb³⁺ > Ag⁺ > Hg²⁺ > As⁵⁺ > Cu²⁺ > Sn²⁺ > Au³⁺ > Bi³⁺. Chacun de ces métaux se caractérise par une concentration (in vitro) optimale d'activation de l'enzyme. La régulation de l'activité de l'enzyme se fait par les PC elles-mêmes, qui forment des complexes stables avec les métaux. La quantité de métal libre diminuant, cela a une action inhibitrice sur la synthèse. Les PC à longue chaîne, caractérisées par une plus grande affinité à complexer les métaux, sont capables d'inhiber plus rapidement la réaction de synthèse (Zenk, 1996).

La PCS est constituée de 4 sous-unités de 95000 Da chacune. Le Km_{GSH} est de 6,7mM, sa température et son pH de fonctionnement optimal sont respectivement de 35°C et 7,9. Les PC ont été identifiées chez plusieurs espèces végétales : *Silene cucubalus* (Grill *et al.*, 1989 ; Loeffler *et al.*, 1989), *Pisum sativum* (Klapheck *et al.*, 1995 ; Piechalak *et al.*, 2002), *Arabidopsis*

thaliana (Howden, 1995b), *Daucus carota* (Sanità di Toppi *et al.*, 1999), les tomates (Chen et Goldsbrough, 1994 ; Chen *et al.*, 1997), les feuilles de tabac (Nakazawa et Takenaga, 1998), *Rauvolfia serpentina* (Friederich *et al.*, 1998).

Le rôle du GSH dans la synthèse des PC a été prouvé grâce à l'utilisation d'inhibiteurs et de mutants. La buthionine sulfoximine (BSO) est un inhibiteur spécifique de la première enzyme de la synthèse du GSH (Griffith et Meister, 1979). L'addition de cet inhibiteur à des nutriments diminue à la fois la quantité de GSH et de PC, réduisant la tolérance aux métaux lourds (Grill *et al.*, 1987 ; Reese et Wagner, 1987 ; Tomaszewska *et al.*, 1996). Les mutants *Arabidopsis thaliana* ne possèdent ni la γ -ECS ni la GS et sont hypersensibles au Cd (Howden *et al.*, 1995a,b ; Cobbett *et al.*, 1998). La surexpression de la γ -ECS de tomate ou d'*Arabidopsis* chez des mutants cad2 (cadmium-sensible) restaure la tolérance (May *et al.*, 1998). Une culture de cellules de tomate, sélectionnées pour accroître la résistance au cadmium, a montré une augmentation de l'activité de sa γ -ECS (Chen et Goldsbrough, 1994). La quantité de GSH est plus faible dans les racines et les tiges de maïs exposées au Cd (Rauser *et al.*, 1991), ce qui est concomitant avec l'augmentation de l'activité de la γ -ECS dans les racines (Rüeggsegger et Brunold, 1992). L'activité des deux enzymes responsables de la synthèse du GSH augmente dans la culture de cellules du tabac traitées avec du cadmium (Schneider et Bergmann, 1995).

Dans le cas d'*Arabidopsis thaliana* exposé au Cd, Xiang et Olivier (1998) ont mis en évidence une augmentation de l'expression génique de γ -ECS. De même, dans les racines et les feuilles de moutarde *Brassica juncea*, le cuivre fait augmenter la quantité d'ARNm de γ -ECS (Schäfer *et al.*, 1997). De plus, Haag-Kerwer *et al.* (1999) ont montré que l'expression des gènes codant pour la γ -ECS est corrélée avec la synthèse de PC et est sous l'influence du Cd chez *Brassica juncea*.

Chez les végétaux supérieurs, la biosynthèse de PC est atypique, elle est enzymatique. Elle a lieu en présence de GSH (produit de l'activité conjuguée de deux enzymes, la γ -ECS et la GS) et d'ions métalliques, lesquels induisent la synthèse de la γ -ECS et de la PCS.

3.2.2.2.1 - La phytochélatine synthase (PCS)

Le mécanisme d'activation de la PCS n'est pas encore réellement connu. Néanmoins son inductibilité est plus sensible à certains métaux. Il suffit de quelques minutes d'exposition de la PCS au Cd pour activer sa synthèse (Grill *et al.*, 1989 ; Chen et Goldsbrough, 1994 ; Howden *et al.*, 1995a,b ; Chen *et al.*, 1997).

Le gène *cad1* d'*Arabidopsis* contient 8 introns et se trouve sur le chromosome 5. Le produit ADNc de l'*AtPCS1* (CAD1) est un polypeptide de 55 KDa composé de 485 AA.

Comme montré par l'alignement de séquences polypeptidiques, la PCS comporte une région N-terminale fortement conservée (220 AA, 45 à 76 % d'homologie), qui contient 6 Cys alignées (dont 2 adjacentes) ainsi qu'une région C-terminale faiblement conservée (6 à 41 % d'homologie), caractérisée par la présence de 7 à 14 résidus Cys dont au moins 4 sont par paires. De ces observations, il en a été déduit que la région la plus conservée était celle où avait lieu la réaction de transpeptidation et que la région la moins conservée avait un rôle moindre (Cobbett *et al.*, 2000a).

3.2.2.2.2 - Les gènes de la PCS

Les gènes codant pour la PCS ont été clonés (Clemens *et al.*, 1999 ; Ha *et al.*, 1999 ; Vatamaniuk *et al.*, 1999). Ha *et al.* (1999) ont isolé les gènes codant la PCS chez *Arabidopsis* (*AtPCS1*) et *Schizosaccharomyces pombe* (*SpPCS1*). Un autre groupe de scientifiques a isolé l'ADNc du gène *TaPCS1* du blé (Clemens *et al.*, 1999). Des levures mutantes *SpPCS* déficientes, et donc déficientes en PC, sont cadmium sensibles. Ces résultats indiquent un rôle identique des produits de ces gènes chez les plantes et les levures (figure 14).

Un gène similaire à celui de la PCS d'*Arabidopsis thaliana* a été identifié chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Clemens *et al.*, 2001). La région N-terminale du produit du gène *CePCS1* est similaire à celles trouvées chez les végétaux et les levures. Le domaine C-terminal est beaucoup moins conservé. Il possède néanmoins de multiples paires de résidus Cys. Le produit du gène *CePCS1* est composé de 371 AA, alors que celui du gène d'*AtPCS1* est un polypeptide de 485 AA. Ceux des gènes *SpPCS1* et *TaPCS1* correspondent respectivement à 414 et 500 AA.

La comparaison des structures des PCS isolées de différents organismes permet de constater qu'elles ont un domaine N-terminal très conservé (40 % d'homologie) montrant une activité catalytique, et un domaine C-terminal, riche en résidus cystéiques, souvent rencontrés par paire, qui piègent les métaux et les présentent au site catalytique (Ha *et al.*, 1999).

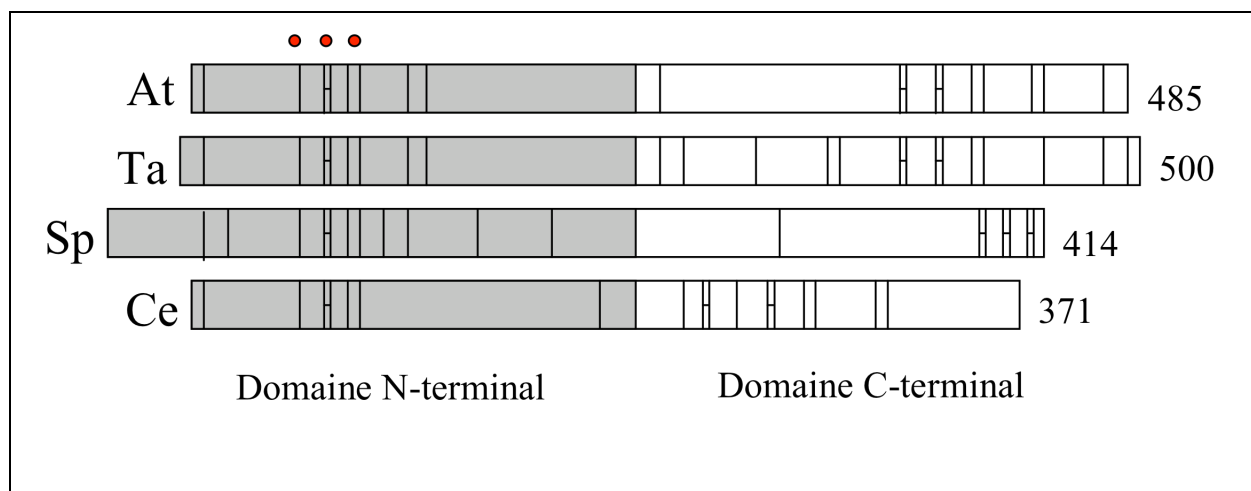


Figure 14 : Comparaison des PC synthèses de divers organismes (d'après Cobbett, 2000a).
 Les nombres à droite représentent le nombre d'acides aminés, les barres verticales les résidus Cys. – la liaison entre 2 résidus Cys. • Résidus cystéiques conservés
AtPCS1 Arabidopsis thaliana TaPCS1 Triticum aestivum
SpPCS1 Schizosaccharomyces pombe CePCS1 Caenorhabditis elegans

3.2.2.2.3 - Activation catalytique de la PCS

Les deux mécanismes que sont la chélation des métaux lourds (ML) par le GSH aboutissant à des complexes ML-GSH (et ou GS-ML-SG) et la prise en charge de ces complexes par la PCS sont deux mécanismes bien distincts (Cobbett *et al.*, 2000a). Des travaux (Vatamaniuk *et al.*, 2000) ont montré que l'interaction enzyme/complexe métal-thiol explique en grande partie les effets activateurs des ions de métaux lourds. Basé sur la stabilité des complexes Cd-GS et Cd-GS₂, la quantité d'ions Cd²⁺ libres permettant la réaction (typiquement 0,025 mM Cd²⁺ et 3,3 mM GSH) est 6 fois plus faible que la constante de fixation du Cd avec l'*AtPCS1* (K_d = 0,54 ± 0,21 μM). Une analyse de la cinétique de la réaction montre que la synthèse des PC peut provenir d'un mécanisme enzymatique de substitution, pour lequel GSH et les complexes GSH/métal servent de co-substrats avec un K_m respectif de 13,6 mM et 9,2 μM. Cette analyse est en accord avec de précédentes observations où le GSH-S-bimane (GSB) pouvait lui aussi servir de substrat à la PCS. La valeur de son K_m (1,5 mM) est alors inférieure à celle du substrat naturel (GSH), suggérant que la liaison GSH-S-métal n'est pas une nécessité pour la synthèse (Grill *et al.*, 1989).

Ainsi, le minimum requis pour la synthèse de PC est que le groupe thiolé ou l'un des co-substrats soit bloqué par une liaison thiol/métal ou par une S-alkylation. De plus, le GSH S-substitué est suffisant pour la réaction de synthèse, mais l'ajout de Cd augmente le taux de biosynthèse d'un facteur 2 (Vatanamiuk *et al.*, 2000). Cet effet activateur, qui requiert une concentration en ions cadmium 5 fois supérieure à celle trouvée habituellement avec du GSH

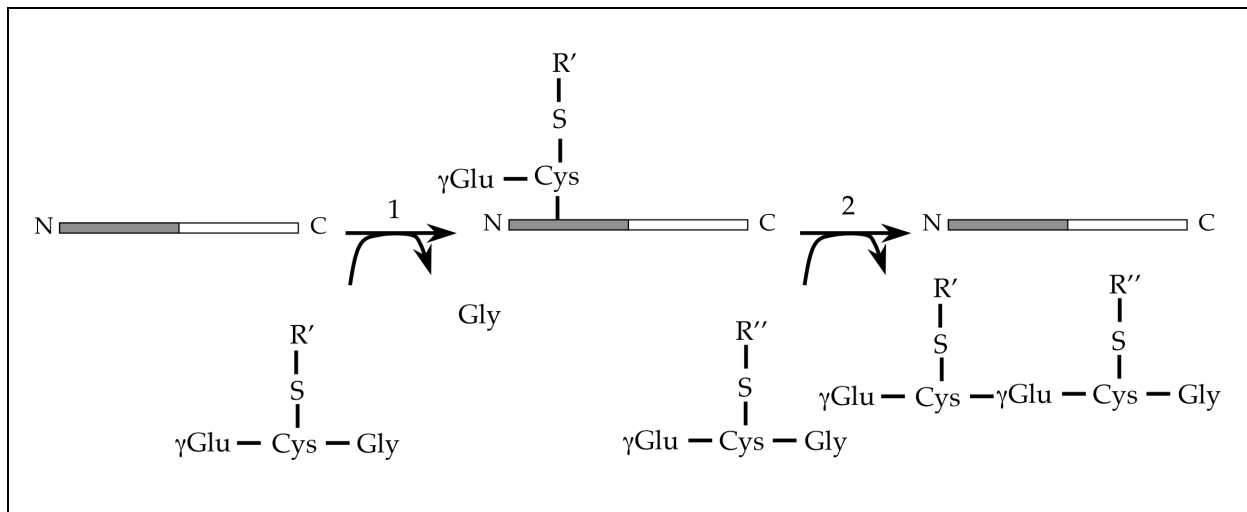


Figure 15 : Schéma de la transpeptidation. (D'après Vatamaniuk et al., 2000)

non substitué, est dû à une interaction directe enzyme/Cd. Il est communément considéré que :

- la concentration intracellulaire de GSH est comprise entre 1 et 10 mM (Inzé et Van Montagu, 1995 ; Noctor *et al.*, 1998),
- que celle du Cd doit être comprise entre 0,04 et 0,3 μM

Il en résulte que l'augmentation de la synthèse de PC, liée aux interactions Cd/enzyme, est probablement peu significative physiologiquement dans la plupart des conditions environnementales. L'activation directe par les métaux lourds non complexés pourrait être plus significative en présence d'une concentration relativement importante de métal par rapport à une forte concentration de formes complexées avec le GSH, ou dans des conditions de sols multi contaminés (*e.g.* Cu et Zn) plus communément rencontrées dans l'environnement (Backer *et al.*, 1990).

Selon les résultats de Vanatamiuk *et al.* (2000) sur la cinétique menée *in vitro* avec l'*AtPCS1*, GSH ou (GS₂-ML) doit donner, en premier lieu, l'intermédiaire acyl-enzyme (γ -Glu-Cys-enzyme). Il aboutit à la formation d'une PC₂, par le transfert de γ -Glu-Cys, de cet intermédiaire à une autre molécule GSH ou (ML-GS₂) (figure 15). Le seul pré-requis, pour la réaction enzymatique de transpeptidation, est que l'une des deux molécules substrats (R' ou R'') soit complexée avec un métal lourd, *e. g.* (Cd)-GS₂.

Dans le cas d'une faible quantité de métaux lourds et d'une grande quantité de GSH décrit par Vanatamiuk *et al.* (2000), deux autres aspects importants sont à noter. Premièrement, le mécanisme d'arrêt de la synthèse de PC : cette inhibition est due à la fois au GSH libre et aux PC, et non pas à la chélation des métaux lourds par le GSH ou les PC. Deuxièmement, malgré une concentration en ion cadmium extrêmement faible, dans les conditions de stabilité du complexe Cd-GSH, des co-substrats métal/thiol sont formés et utilisés immédiatement pour l'expression constitutive de la PCS.

3.2.2.3 - Liens entre composés thiolés et métabolisme du soufre

La plupart des plantes tirent le soufre du sol sous forme de sulfate et la concentration de GSH des plantes dépend entre autres, des réserves de sulfates du sol (Herschbach et Rennenberg, 1994). Les sulfates sont réduits en sulfites, qui sont transférés à l'O-acetyl-L-sérine (OAS) par l'enzyme OAS(thiol) lyase (OASTL, E.C. 4.2.99.8). Finalement une grande partie du soufre réduit est transformé en cystéine. L'OAS, accepteur de sulfites, est produit à

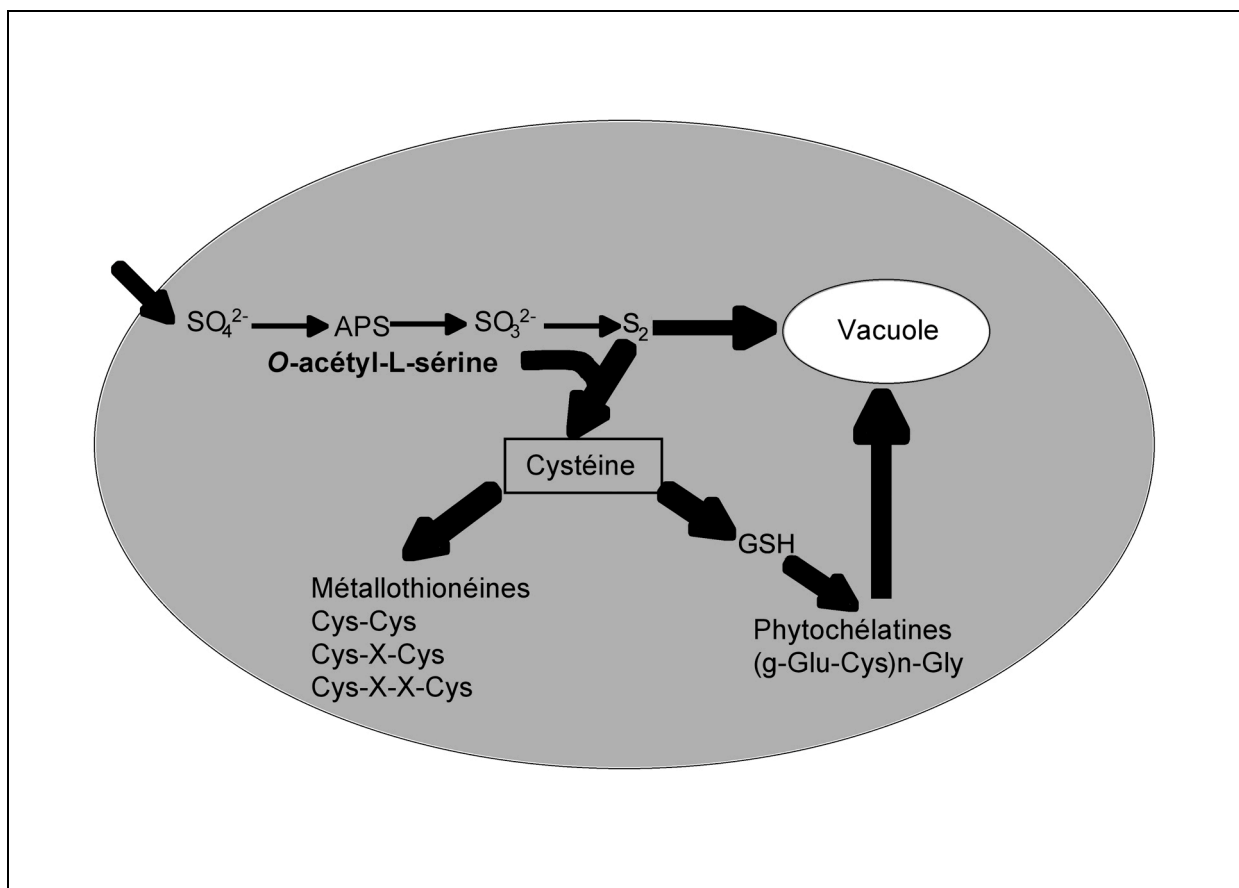


Figure 16 : Multiples connexions entre le métabolisme du soufre, la détoxification des métaux lourds et l'homéostasie chez les végétaux (d'après Ow, 1996)
 APS : adénoside 5'-phosphosulfate

partir de la sérine et de l'acétyl-CoA dans une réaction catalysée par l'enzyme sérine acétyltransférase (SAT) (E.C. 2.3.1.30.) (Leustek, 1996 ; Leustek et Saito, 1999) (figure 16).

La réaction de synthèse de l'OAS est essentielle pour le métabolisme du soufre, car sa disponibilité pourrait réguler la synthèse de la cystéine. La réaction de biosynthèse de la cystéine est catalysée par un complexe enzymatique appelé cystéine synthase (CS, E.C. 4.2.99.8.) composé de SAT et OAS-TL. Les produits de cette réaction sont la cystéine et l'acétate (Takahashi et Saito, 1996). Les deux enzymes SAT et OAS-TL sont localisées chez les cellules végétales dans les plasmides, les mitochondries et le cytosol (Rennenberg et Brunold, 1994 ; Hell, 1997 ; Hesse *et al.*, 1999). La cystéine est présente dans les tissus des végétaux en faible quantité, à cause de sa réactivité élevée (Rennenberg et Brunold, 1994). Elle est transférée à des molécules moins réactives, comme le GSH.

3.2.2.4 - La compartimentalisation vacuolaire

La compartimentalisation au sein des vacuoles joue un rôle essentiel dans la détoxification des métaux lourds, car elle évite une accumulation des ions métalliques dans le cytosol où ils ont un effet toxique. Il a été démontré que l'exposition au Cd stimule la synthèse des PC, qui sont rapidement transformées en LMW (notamment PC₃) (Vögeli-Lange et Wagner, 1996 ; Abrahamson *et al.*, 1992 ; Vögeli-Lange et Wagner, 1996). Ces complexes entrent dans la vacuole, où ils s'enrichissent en soufre (S²⁻) et forment de nouveaux complexes HMW (Speiser *et al.*, 1992), qui ont une plus grande affinité avec le Cd. Les différences majeures entre LMW et HMW sont :

- la quantité d'ion (S²⁻) associée, avec un ratio S²⁻ / Cd²⁺ typique respectif de 0,01 (pour les LMW) et il est compris entre 0,1-1 (pour les HMW) ;
- une abondance relative supérieure pour les complexes HMW ;
- un degré de polymérisation, une capacité à capter les métaux et une stabilité à pH acide plus importante pour les complexes HMW, avec une demi-dissociation aux valeurs de pH comprises entre 3,8 et 4 contre 5 et 5,4 pour les complexes LMW ;
- une différence dans la distribution subcellulaire et une biogenèse plutôt cytosolique pour LMW tandis qu'elle est majoritairement vacuolaire pour HMW.

Peu d'éléments sont connus sur la relation HMW/ S²⁻ chez les végétaux. Mais des études montrent clairement le rôle majeur de cette relation dans la détoxification du Cd par les PC. Les sulfites sont des intermédiaires toxiques produits par la voie d'assimilation du soufre, qui sont créés par la réaction de réduction des sulfites ferrédoxine-dépendants (catalysée par le sirohème⁶ de la sulfite réductase (Leustek *et al.*, 2000)) et qui sont ensuite incorporés par

⁶Hème d'enzyme catalysant la réduction des 6 électrons des sulfites et nitrites

l'OAS pour produire la cystéine. L'importance d'une production adéquate de S^{2-} pour la détoxification des métaux lourds a été mise en évidence chez une levure *Candida glabrata* (*hem2*) Cd hypersensible, laquelle est déficiente en enzyme porphobilinogène synthase, nécessaire à la biosynthèse du sirohème (Hunter et Mehra, 1998). Une partie de la bactérie mutante (*hmt2*) provenant d'une oxydoréductase mitochondriale sulfite/quinone, intervient dans la détoxification des sulfites endogènes, accumulés à un niveau élevé de S^{2-} en dépit de l'exposition au Cd (Vande Weghe et Ow, 1999).

Des approches génétiques et biochimiques chez *Schizosaccharomyces pombe* ont permis d'identifier un gène *HMT1* codant pour un transporteur membranaire permettant la translocation des complexes ML-PC à l'intérieur de la vacuole (Ortiz *et al.*, 1992, 1995). Ce transporteur (ABC Transporteur) requiert de l'ATP (Ortiz *et al.*, 1995) pour l'internalisation des PC et des complexes PC-Cd. En revanche, il ne transporte ni le métal libre ni les complexes thiolés Cd-GS₂ (Ortiz *et al.*, 1992). Des protéines aux fonctions équivalentes ont été identifiées dans le mésophylle des protoplastes du tabac (Vögeli-Lange et Wagner, 1990) et dans le tonoplaste des vésicules des racines du blé (Salt et Rauser, 1995). De plus, en présence de Mg-ATP, les PC et les complexes PC-Cd sont transportés au travers du tonoplaste contre leur gradient de concentration. Leur accumulation dans les vésicules des racines du blé est alors 38 fois plus importante que celle de la solution extérieure (Salt et Rauser, 1995). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, un autre transporteur de type ABC (YCF1) transporte les GSH conjugués et les complexes Cd-(GS₂) dans la vacuole (Li *et al.*, 1997). D'autres transporteurs relatifs au transport du Cd et distincts des transporteurs ABC des PC ont été identifiés chez les levures et les plantes (Rea *et al.*, 1998). Les ions Cd²⁺ sont transportés dans la vacuole via un anti-port Cd²⁺/2H⁺ (Salt et Wagner, 1993 ; Gries et Wagner 1998). En milieu acide vacuolaire, les complexes PC-Cd se dissocient (Krotz *et al.*, 1989). Le Cd relargué peut être pris en charge par les acides organiques vacuolaires (citrate, oxalate, malate) (Krotz *et al.*, 1989). Les PC présentes dans la vacuole peuvent être dégradées par les hydrolases vacuolaires ou retourner dans le cytosol, où les éléments constitutifs pourront continuer à jouer un rôle.

Des expérimentations ont montré que 60 % du Cd intracellulaire est chélaté par des ligands soufrés, probablement des PC. Les 40 % restants sont chélatés par des ligands comportant de l'oxygène, probablement des acides organiques (Salt *et al.*, 1995, 1997). Rauser (1999) a établi que la fonction des PC est de fixer le Cd intracellulaire. Cette chélation dépend du temps d'exposition et de l'action des autres ligands. Kneer et Zenk (1992) ont démontré que certaines enzymes sensibles aux métaux tolèrent 10 à 1000 fois plus de Cd chélaté par les PC que d'ions cadmium libres.

Comme discuté par Ow (1996), des facteurs autres que la quantité de PC intracellulaires, pourraient être cruciaux pour la détoxification du Cd. Dans le cas du mutant *Schizosaccharomyces pombe* JS563, une réductase disulfite FAD/NAD (peut-être une PC

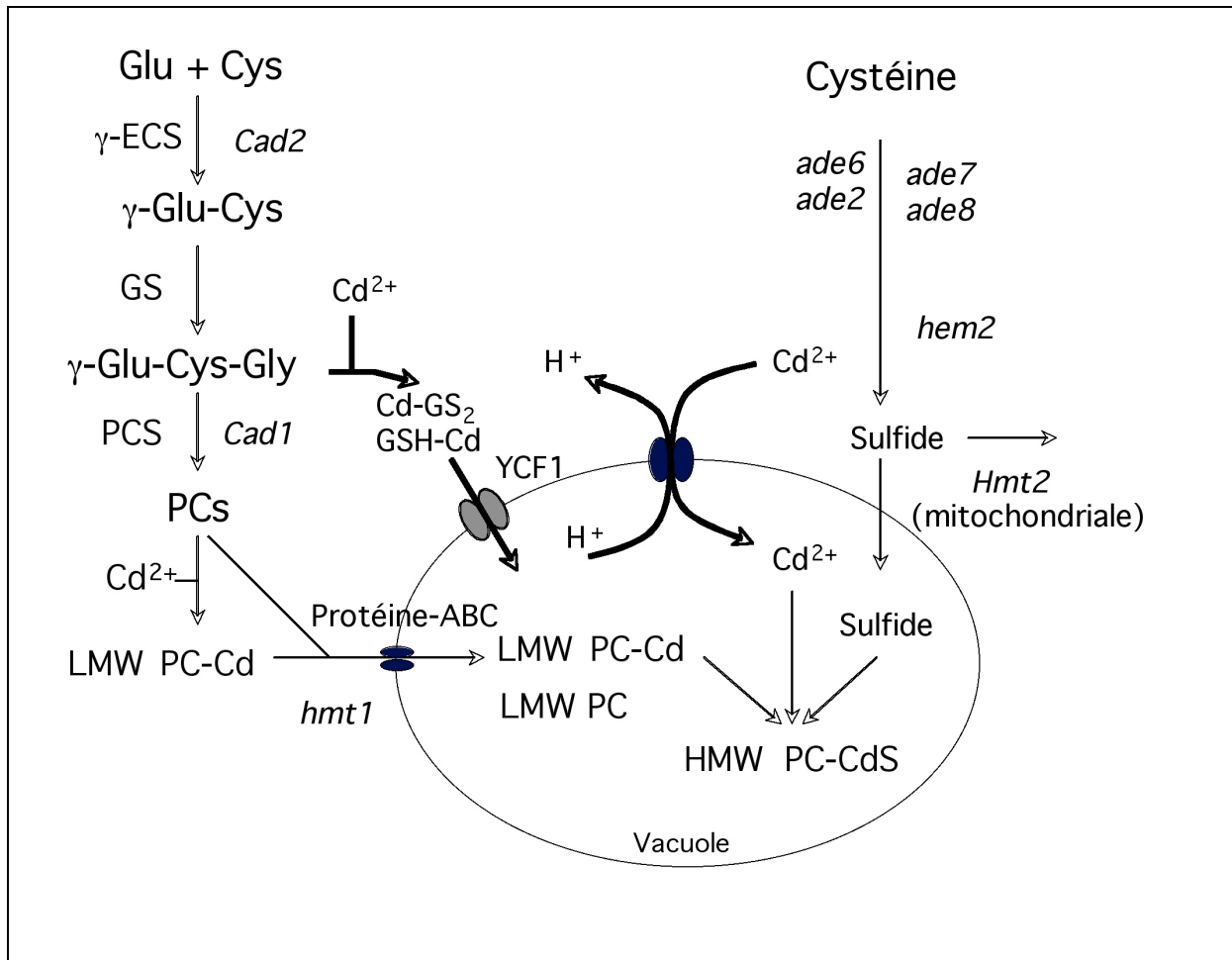


Figure 17 : Gènes et fonctions contribuant à la détoxification du Cd chez les plantes et les champignons. (D'après Cobbett et Goldsbrough, 2000)

Cad1 et *Cad2* chez *Arabidopsis thaliana* ; *hmt1*, *hmt2*, *ade2*, *ade6*, *ade7*, *ade8* chez les levures ; *hem2* chez *Candida glabrata*

γ -ECS : γ -glutamylcystéine synthase ; GS : Glutathion synthase ;

PCS : Phytochélatine synthase

réductase) a été découverte. Cette enzyme semble avoir un rôle essentiel pour assurer un pouvoir réducteur suffisant et éviter l'oxydation, et par conséquent l'inactivation des PC induites. De plus, la formation rapide des complexes HMW, stabilisés par le S^{2-} , semble avoir une importance particulière pour la détoxification du Cd (Verkleij *et al.*, 1990 ; Ortiz *et al.*, 1992 ; Speiser *et al.*, 1992 ; Kneer et Zenk, 1997).

Plus généralement, il apparaît que l'assimilation de sulfate réduit et que le stock de cystéine et de GSH jouent un rôle crucial dans la médiation des PC vis-à-vis de la tolérance aux métaux lourds. De plus, comme l'indique le K_m élevé du GSH libre (6,2- 13,6 mM), ce dernier est un facteur limitant de la formation des PC. De ce point de vue, l'activité (Chen *et al.*, 1997 ; De Knecht *et al.*, 1995 ; Nagalakshmi et Prasad, 2001 ; Noctor *et al.*, 1998 ; Pilon-Smith *et al.*, 1999 ; Ruögsegger et Brunold, 1992) et le niveau d'ARNm (Dominguez-Solis *et al.*, 2001 ; Heiss *et al.*, 1999 ; Lee et Leustek, 1999 ; Schäfer *et al.*, 1998) des enzymes nécessaires à l'assimilation du soufre et à la biosynthèse du GSH sont régulées par l'exposition aux métaux lourds. En particulier, les ARNm codant pour la γ -EC synthétase et la GSH synthétase (GS), aussi bien que pour la GSH réductase, sont régulés par l'exposition au Cd des graines d'*Arabidopsis*. En même temps, une substantielle augmentation des PC est observée (Xiang et Olivier, 1998).

Tout ceci suggère que le métabolisme du soufre et la détoxification des métaux lourds sont étroitement liés (figure 17). De plus, le fait qu'il y ait une faible quantité de PC, même en l'absence d'exposition aux métaux (Kneer et Zenk, 1992) et que le niveau de PC augmente en même temps que la déplétion du Cu ou Zn, lors du transfert d'une culture de suspension cellulaire dans un milieu minimum (Grill *et al.*, 1989), indique clairement le rôle des PC dans l'homéostasie des métaux lourds essentiels. L'hypothèse a été faite que les PC ne constituent pas simplement un mécanisme de détoxification des métaux lourds *stricto sensu*. Dans le cas de faibles concentrations de métaux essentiels, les PC pourraient être une clé de l'homéostasie des métaux (Thumann *et al.*, 1991).

4 - TESTS DE GENOTOXICITE SUR LES VEGETAUX SUPERIEURS

Selon Grant (1994), les tests de génotoxicité sur plantes devraient davantage être intégrés dans les études écotoxicologiques, en complément d'autres tests ou en tant que première étape de la détection de la génotoxicité potentielle des substances chimiques et des matrices complexes..

4.1 - HISTORIQUE

A l'origine de l'utilisation des plantes dans l'évaluation des dommages de l'ADN, celles-ci ont principalement servi à l'étude de l'impact des radiations dans les années 30. Ces études ont abouti à un symposium intitulé "Effects of ionizing radiation on plants" en 1957. Il faudra attendre 1978 pour qu'un colloque sur les effets des produits chimiques sur les plantes, intitulé "Higher plant systems as monitors of environmental mutagens" soit organisé par De Serres (Research Triangle Institute, USA) et financé par l'US National Institute of Environmental Health Sciences. Notons que, parallèlement au développement des tests de génotoxicité sur plantes, c'est à cette époque que le test d'Ames a été mis au point.

En 1979-1980, le programme GENE-TOX conduit par l'U.S. Environmental Protection Agency a recensé une trentaine de bioessais utilisant des animaux, des plantes et des bactéries pour la détection de la génotoxicité. Neuf tests de génotoxicité impliquaient des plantes et se sont avérés sensibles. Les données obtenues sur divers composés chimiques avec chacun de ces tests ont été rassemblées dans une publication de Constantin et Owens (1982).

Il s'agissait des tests de cytogénicité:

- *Allium cepa*-aberrations chromosomiques (Grant, 1982a)
- *Hordeum vulgare*-aberrations chromosomiques (Constantin et Nilan, 1982)
- *Vicia faba*-aberrations chromosomiques (Ma, 1982)

et de tests de mutagénicité sur les plantes suivantes :

- *Arabidopsis thaliana* (Rédei, 1982)
- *Glycine max* (Vig, 1982)
- *Hordeum vulgare* (Constantin et Nilan, 1982)
- *Tradescantia* (Van't Hof et Schairer, 1982)
- *Zea mays* (Plewa, 1982)

Un congrès (“Pollen systems to detect biological activity of environmental pollutants”) a été ensuite organisé par l’US National Institute of Environmental Health Sciences et l’US Environmental Protection Agency en 1981.

Par la suite, une étude financée par l’Organisation Mondiale de la Santé et le programme pour l’environnement des Nations Unies (PNUE) a été mise en place à partir de 1984, intitulée “ International Program on Chemical Safety Collaborative Study on Plant Systems ”. Cette étude avait pour objet de comparer et de calibrer, à l’aide de 4 produits chimiques (hydrazide maléique, azoture de sodium, méthyl-nitrosourée et azidoglycérol), plusieurs tests de génotoxicité utilisant des modèles végétaux et d’évaluer leur variabilité inter- et intra-laboratoire (Sandhu *et al.*, 1991). Les essais choisis étaient les suivants :

- *Tradescantia*-micronoyaux (Ma *et al.*, 1994a)
- *Tradescantia*-mutations (Ma *et al.*, 1994b)
- *Arabidopsis*-mutations (Gichner *et al.*, 1994)
- *Vicia*-aberrations chromosomiques (Kanaya *et al.*, 1994)

Les résultats de ce programme (impliquant 11 laboratoires de pays différents), qui a abouti à un meeting à St-Petersbourg (Russie), en 1992 ont été publiés dans un numéro spécial de Mutation Research en 1994.

Enfin, un programme international sur les tests sur plantes (IPPB⁷) a été initié en 1994, dont le principal objectif était de réunir le plus grand nombre de personnes travaillant sur les tests *Vicia*, *Allium* (micronoyaux et aberrations chromosomiques) et *Tradescantia* (micronoyaux et mutations). Un atelier pratique, dénommé “Hands-on Workshop on Plant Bioassays” a été organisé à Qingdao-(République Populaire de Chine) en 1995. Cet atelier, auquel le laboratoire a participé, était financé par le PNUE et a permis d’homogénéiser le protocole de chacun des tests et de valider ensuite leur applicabilité à l’étude de la génotoxicité des sols contaminés.

⁷ International Program on Plant Bioassays

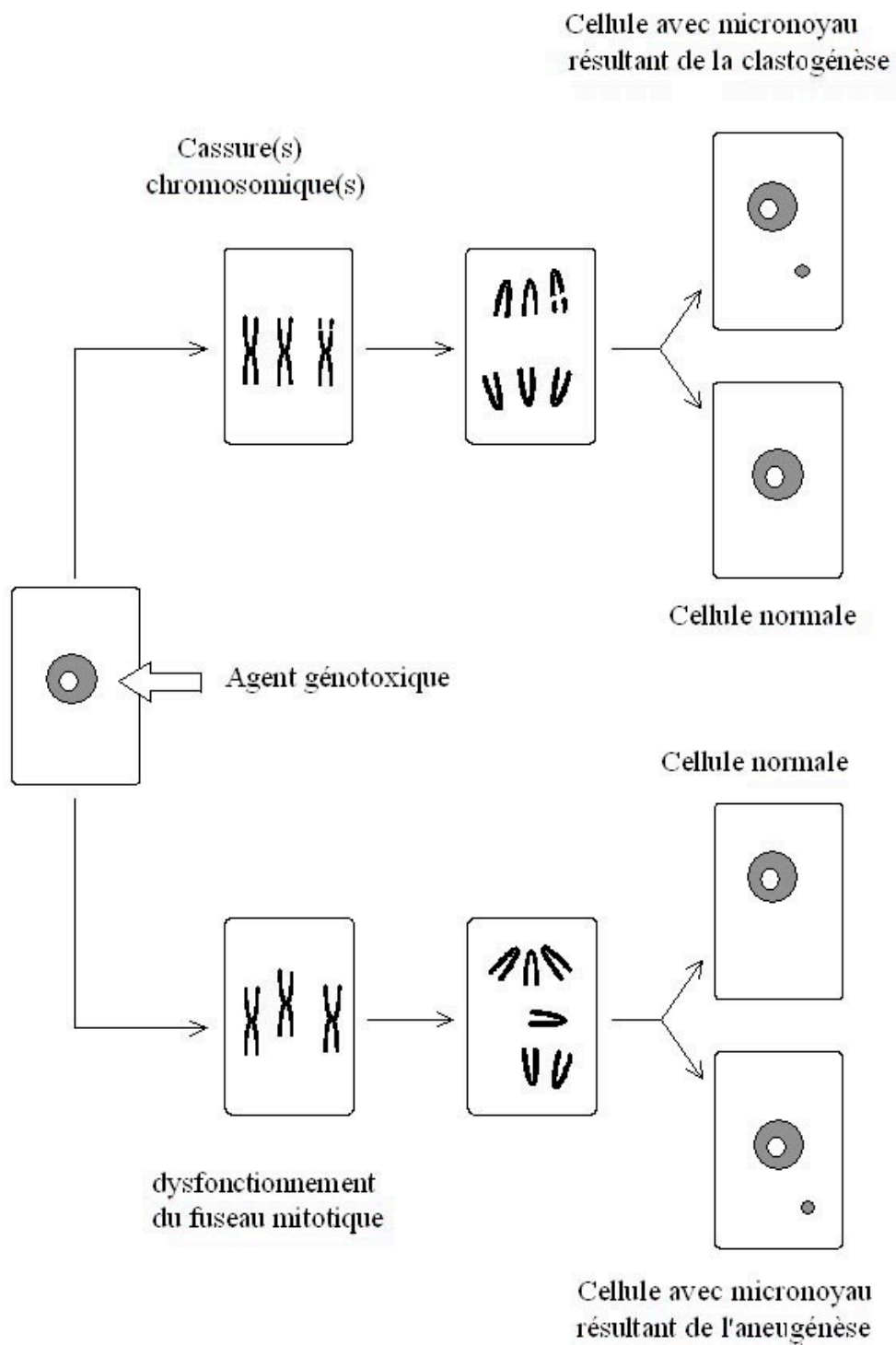


Figure 18 : modes d'action possible d'un agent génotoxique, (d'après Fenech 1997)

4.2 - LES CRITERES DE GENOTOXICITE

Les plantes permettent de détecter des critères de génotoxicité nombreux et variés : mutations, cassures de chromosomes, aberrations chromosomiques, échanges de chromatides sœurs, micronoyaux, etc. (Grant, 1994).

Le premier critère de génotoxicité analysé est la fréquence d'aberrations chromosomiques dans les années 1930. Ce critère est encore utilisé aujourd'hui, mais il est quelque peu délaissé au profit de la fréquence d'apparition de micronoyaux. Il existe différents types d'aberrations chromosomiques : ponts (chromosome(s) qui ne migre(nt) pas correctement lors de l'anaphase), fragments, anaphases multipolaires, c-mitose (les agents c-mitotiques ou colchicomitotiques induisent un effet similaire à celui induit par la colchicine, c'est-à-dire la non-construction du fuseau mitotique, ce qui a pour conséquence de disperser les chromosomes en c-métaphase), etc. Les aberrations chromosomiques sont comptées dans les cellules en mitose et peuvent être détectées lors des différents stades : la métaphase, l'anaphase ou la télophase.

L'utilisation du critère "micronoyaux" comme critère d'effets cytogénétiques a débuté dans les années 1940 mais a surtout été développée dans les années 1970 sur de nombreux organismes (Godet *et al.*, 1993) : les plantes comme *Tradescantia*, *V. faba*, *A. cepa*, mais aussi *Hordeum vulgare* (Guérin, 1999), les mollusques (Mersch et Beauvais, 1997), les poissons (De Flora *et al.*, 1993), les amphibiens (Jaylet *et al.*, 1986; Krauter *et al.*, 1987), les souris (dans les érythrocytes polychromatiques), l'homme (dans les lymphocytes), etc... .

Rieger *et al.* (1968) dans leur "Glossary of Genetics and Cytogenetics" définissent un micronoyau comme étant : "un petit noyau surnuméraire séparé du noyau principal de la cellule, formé pendant la télophase mitotique ou méiotique et constitué de chromosomes entiers ou de fragments acentriques d'ADN résultant de modifications structurales, spontanées ou expérimentales des chromosomes".

Les micronoyaux sont visibles dans le cytoplasme des cellules et résultent d'une cassure chromosomique (effet de substances clastogènes ou chromatoclastiques) ou d'un dysfonctionnement du fuseau mitotique (effet de poisons fusoriaux, appelés aussi substances aneugènes ou mitoclastiques). Dans les deux cas, les fragments de chromosomes ou les chromosomes entiers ne peuvent pas migrer à l'un des pôles du fuseau lors de l'anaphase de la division et forment donc un ou plusieurs micronoyaux visibles pendant l'interphase (figure 18). Les substances clastogènes induisent principalement des modifications intra-chromosomiques qualitatives (mutations, etc...) et les poisons fusoriaux des modifications

inter-chromosomiques quantitatives (aneuploïdie). La seule observation des micronoyaux ne permet pas de déterminer leur cause. Des techniques ont donc été mises au point, comme par exemple la "fluorescence in situ hybridization" (FISH) qui consiste à hybrider l'ADN avec des sondes fluorescentes spécifiques des centromères (Kirsch-Volders, 1997).

Les produits clastogènes peuvent être classés en composés :

- radiomimétiques, indépendants de la phase S du cycle cellulaire, c'est-à-dire que le mode d'action est similaire à celui des radiations ionisantes. Quel que soit le stade du cycle cellulaire lors de l'exposition, des micronoyaux peuvent être visibles à l'interphase. C'est par exemple le cas de l'hydrazide maléique.
- non radiomimétiques (S-dépendants) : après l'exposition, une phase S complète doit se dérouler pour que les effets soient visibles ultérieurement (e.g. mitomycine C, méthyl méthanesulfonate) (Marzin, 1998).

Le critère "micronoyaux" présente un certain nombre d'avantages (Heddle *et al.*, 1983) :

- ils sont observés dans les cellules en interphase, ce qui représente le stade du cycle cellulaire le plus long. Le nombre de cellules examinables est, par conséquent, plus important que pour les aberrations chromosomiques, d'où un gain de temps considérable.
- ils sont plus faciles à identifier que les aberrations chromosomiques.
- le taux de micronoyaux spontanés est très faible et présente une bonne reproductibilité.
- ils persistent au moins pendant deux cycles cellulaires.

Cependant, contrairement aux aberrations chromosomiques, il faut que la division cellulaire ne soit pas altérée par le produit testé pour que les micronoyaux soient visibles dans les cellules. Sinon les effets cytotoxiques peuvent "masquer" les effets génotoxiques.

4.3 - AVANTAGES ET LIMITES

Les végétaux supérieurs représentent d'excellents candidats pour évaluer la (géo)toxicité de substances chimiques et de matrices complexes grâce à leurs nombreux avantages.

4.3.1 - Représentativité

Les réponses des végétaux aux agents mutagènes/cancérogènes sont similaires à celles des animaux (Clive et Spector, 1978). Cela peut être expliqué en partie par la similitude de la morphologie et du fonctionnement des chromosomes entre les systèmes végétaux et

animaux, tous deux eucaryotes (Sparrow *et al.*, 1972). Il existe tout de même des différences pharmacocinétiques et biochimiques majeures entre plantes et animaux qu'il ne faut pas négliger (Grant, 1994).

Les deux systèmes de division des cellules sont présents chez les plantes : la mitose dans les cellules somatiques (racines, étamines, etc...) et la méiose dans les cellules germinales (cellules de pollen) (Grant, 1982a).

L'un des grands avantages des plantes, qui s'applique évidemment à *Vicia*, est leur disponibilité. En effet, les graines de fève sont disponibles toute l'année et dans la majeure partie des pays (Grant, 1982b).

4.3.2 - Faisabilité

Les tests sur végétaux supérieurs présentent un rapport coût-efficacité très satisfaisant puisqu'il suffit d'un microscope et de chambres de culture (Grant *et al.*, 1981).

Les études peuvent être réalisées sur des cultures cellulaires, sur des plantes entières (avec système racinaire) ou encore sur une partie seulement des plantes (Laouedj, 1994). En effet, de nombreuses parties végétales peuvent être utilisées pour examiner les effets génotoxiques : les feuilles, les racines, les bourgeons, les fleurs, etc. (Grant, 1993).

Un grand nombre de plantes possèdent des chromosomes de grande taille, permettant des études cytologiques facilitées (Grant, 1982a).

Les plantes sont adaptées pour les études *in situ* (Constantin et Owens, 1982).

Les tests ne requièrent pas de suppléments nutritifs en grande quantité, ce qui évite l'interférence de ces produits avec les micropolluants (Wang, 1991).

Aucune préparation des matrices à tester n'est nécessaire : pas de filtration, ni d'ajustement de pH, ce qui permet de tester les effluents, les lixiviats et même les sols directement dans leur état brut, sans aucune modification.

4.3.3 - Sensibilité

Les principaux tests de phytogénotoxicité se sont avérés très sensibles, tout en ayant une brève durée d'exposition (Nilan, 1978) comparé aux autres tests sur bactéries ou animaux, et présentent peu de "faux négatifs" et de "faux positifs" (Ennever *et al.*, 1988).

Les tissus végétaux constituent, pour la plupart, le siège de transformations métaboliques complexes capables d'activer les promutagènes, de la même façon que chez les animaux (Plewa et Wagner, 1993).

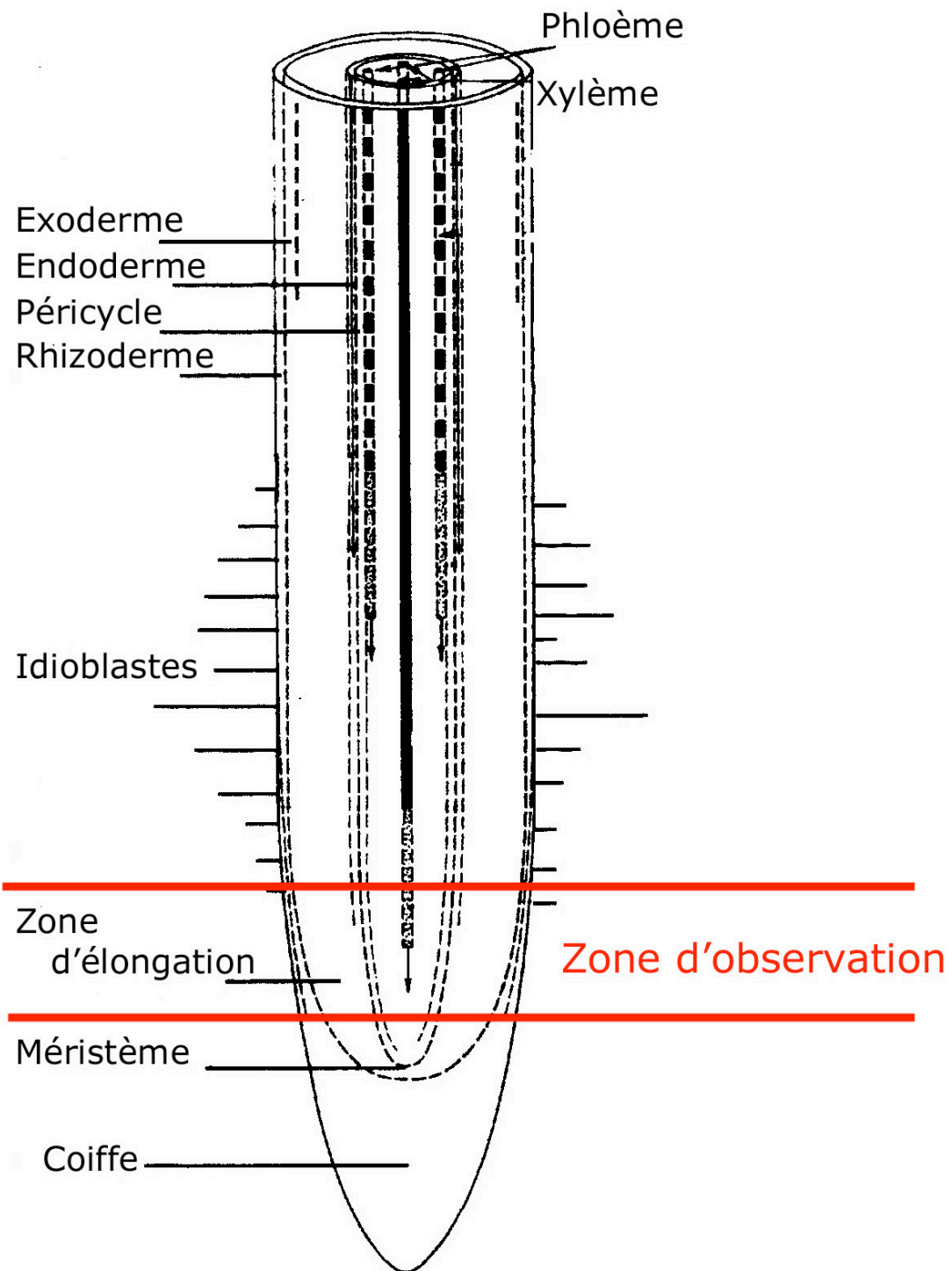


Figure 19 : Schéma coupe longitudinale racinaire

4.3.4 - Inconvénients

Les plantes acquises dans le commerce peuvent être traitées avec des inhibiteurs de croissance, qui peuvent être des agents génotoxiques (Grant, 1982b).

Les plantes ont un cycle de vie plus long que les bactéries, les levures et les drosophiles (Grant, 1994).

Les effets génotoxiques des agents testés dépendent de leur solubilité et de leur capacité à franchir la paroi pecto-cellulosique des cellules végétales (Fiskesjö, 1995).

4.4 - LE TEST *VICIA*-MICRONOYAUX

Le comptage des micronoyaux se fait en général dans les racines secondaires, mais certaines études peuvent être réalisées avec les racines primaires (De Simone *et al.*, 1995). Il s'agit donc d'exposer les racines à une solution de produits chimiques à tester, ou à des matrices complexes en phase liquide ou solide (eaux, effluents, sédiments, sols,...) et d'examiner les cellules des extrémités racinaires après une période minimale de 30 heures. Cette période de 30 heures correspond à la durée moyenne entre le traitement des cellules méristématiques, qui doit se faire durant la division cellulaire, et le comptage des micronoyaux dans les cellules en interphase (ou début de prophase) lorsque le cycle mitotique est terminé. Dans le cas où le traitement est inférieur à 30 heures, il s'agit alors de transférer les graines germées dans un milieu nutritif pour que les cellules terminent leur division. Cette période est appelée période de récupération (Ma *et al.*, 1995). Cependant, cette période peut être plus longue dans le cas où un délai mitotique est provoqué par les produits testés, c'est-à-dire lorsque ces produits retardent la division cellulaire. Dans ce cas, 30 heures ne sont pas suffisantes pour rendre les micronoyaux visibles. Certains auteurs choisissent des durées supérieures : 62 heures pour l'exposition de *V. faba* à la mitomycine C ou au méthyl méthanesulfonate (Degrassi et Rizzoni, 1982), 84 heures dans le cas des lanthanides (Jha et Singh, 1994).

Une très petite quantité de cellules méristématiques se divise transversalement pour accroître la circonférence de la racine. Mais la majorité d'entre elles se divise de façon longitudinale, contribuant ainsi à l'élongation racinaire. Par conséquent, une très grande partie des micronoyaux formés va se retrouver dans les cellules filles de la région F1 définie par Ma *et al.* (1995), qui recommandent de ne prélever que cette partie de la racine pour le comptage des micronoyaux (figure 19). D'autres auteurs pensent que des erreurs peuvent se

produire lors du prélèvement de la région F1 et prélèvent donc toute l'extrémité, c'est-à-dire les régions M et F1 (Minissi et Lombi, 1997).

Les résultats sont généralement exprimés en nombre de micronoyaux pour 1000 cellules observées par champs.

Le test *Vicia*-micronoyaux a été efficacement appliqué à l'étude des radiations ionisantes, au tri des produits chimiques, métalliques et organiques, à l'évaluation du potentiel génotoxique des sols artificiellement contaminés au laboratoire et à des échantillons de déchets, d'eaux, de sédiments et d'effluents (Cotelle, 1999). Rappelons qu'il est intégré dans la batterie de tests sélectionnés dans le cadre de l'IPPB, de l'UNEP (Gopalan, 1999). D'autre part, il a été utilisé afin d'évaluer les effets génotoxiques du chrome (Wang, 1999), du nickel et de l'antimoine (Knasmüller *et al.*, 1998) contenus dans des lixiviats de sols contaminés.

Il est couramment utilisé, dans le but d'évaluer les risques de pollution environnementale en milieu aquatique : sur des eaux de rivières (Miao *et al.*, 1999 ; Ji *et al.*, 1999) ou de lac (Duan *et al.*, 1999). Il est également utilisé pour l'évaluation de risques pouvant être engendrés par la présence de décharges municipales à proximité d'aquifères (Sang et Li, 2004) ou par l'utilisation des déchets d'usines d'incinération d'ordures ménagères (Feng *et al.*, 2007).

Ce test sert aussi à évaluer la génotoxicité potentielle de pesticides composés de différentes substances actives (clopyralide, deltaméthrine, alachlore, *et.*) mélangés à un sol (De Marco *et al.*, 2000). Il a également été utilisé pour évaluer la capacité de certains traitements, comme le vermicompostage, à diminuer le potentiel génotoxique de cendres volantes issues d'un centre de production thermique d'électricité mélangées à un sol (Jain *et al.*, 2004).

Bien que ce test ait été retenu dans la batterie de test de l'IPPB (Ma, 1999), certains auteurs comme Duan *et al.* (2000) en soulignent les limites. En effet, cette équipe a mis en évidence que la sensibilité au cadmium tend à diminuer au fil des générations. Ainsi, un individu provenant d'un autre individu exposé au polluant montre une sensibilité plus faible vis-à-vis de celui-ci. Cette sensibilité diminue de génération en génération et ce, jusqu'à la troisième génération. D'où l'importance d'utiliser un stock de graines provenant d'organismes n'ayant jamais été exposés à des polluants.

MATERIEL ET METHODES

1 - LE MATERIEL VEGETAL

Vicia faba possède $2n = 12$ chromosomes de grande taille, qui peuvent donc se prêter à diverses analyses cytologiques dans l'étude des altérations du génome.

Les graines de *Vicia faba* (variété de fève d'Aguadulce à très longue cosse, commercialisée par Vilmorin) sont conservées à 4°C en chambre froide pendant une durée maximale d'un an.

2 - CONDITIONS DE CULTURE

Deux types d'enceintes de culture ont été utilisés pour ces travaux : un phytotron de 6 m² et une serre de culture de 30 m². Les conditions de culture ont été identiques pour toutes les expérimentations se déroulant dans le phytotron. Le second type d'enceinte est caractérisé par des conditions beaucoup plus variables, mais a permis d'avoir des conditions plus proches des conditions naturelles.

2.1 - CULTURES DANS LE PHYTROTRON

La majeure partie des expériences a été menée dans le phytotron. Ce type d'enceinte permet le contrôle de la température (22 ± 2 °C), de la photopériode (16h/8h; jour/nuit), de l'éclairement (25 000 lm/m²), de l'hygrométrie (70 ± 5 %). Cela permet également un apport hydrique adéquat (85 % de la capacité de rétention en eau).

2.2 - CULTURES DANS LA SERRE

Les expérimentations menées dans cette enceinte nous ont permis de nous rapprocher des conditions naturelles, tout en préservant le matériel biologique des rigueurs climatiques de la région (faibles températures). Seul un paramètre a été maîtrisé : l'arrosage (85% de la capacité de rétention en eau).

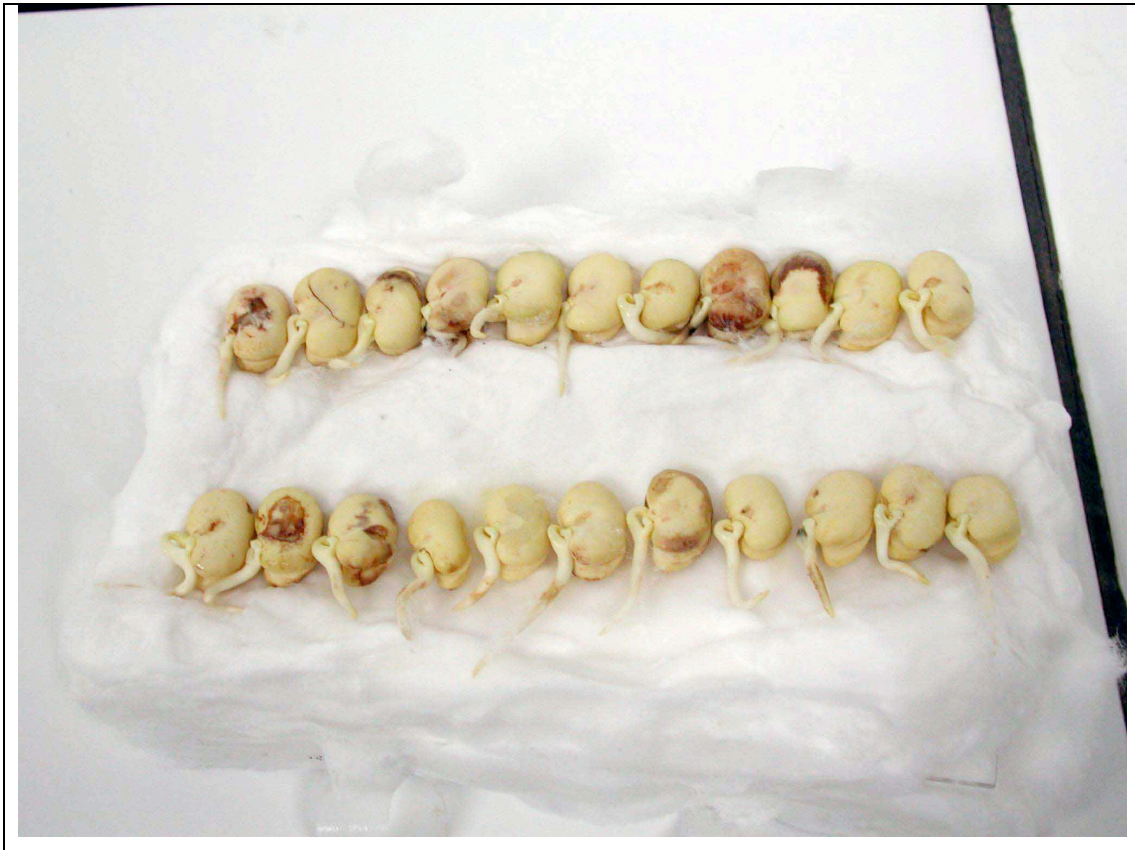


Figure 20 : pousse des racines primaires



Figure 21 : Pousse des racines secondaires dans le milieu d'Hoagland
(photo prise le dernier jour de pousse des racines secondaires).

3 - PREPARATION DES ORGANISMES VEGETAUX

Elle est identique pour l'ensemble des essais menés.

3.1 - CROISSANCE DES RACINES PRIMAIRES

Les graines de *Vicia faba* sont nettoyées et immergées dans de l'eau déminéralisée pendant une journée, à 20°C. Les cosses sont alors enlevées et les graines mises à germer à environ 22°C dans du coton constamment humidifié (figure 20) (Ma *et al.*, 1995). Au bout de 3 jours, les graines laissent apparaître une racine primaire de quelques centimètres dont l'extrémité est coupée (environ 5 mm), afin d'interrompre la croissance de cette racine principale et de stimuler celle des racines secondaires.

3.2 - CROISSANCE DES RACINES SECONDAIRES

Celle-ci varie, d'une part, selon que l'expérimentation se fait en milieu liquide ou en milieu solide, et d'autre part en fonction de l'« âge des organismes ».

3.2.1 - En milieu liquide

Les graines dont la taille de la racine primaire est de 3 à 5 cm sont sélectionnées et placées en phytotron, au-dessus d'un récipient contenant du milieu de Hoagland préalablement aéré par bullage. La composition du milieu de Hoagland est telle que le végétal y trouve tous les éléments dont il a besoin pour une croissance optimale (Hoagland et Arnon, 1950). Celui-ci est renouvelé une fois par jour afin que l'organisme ne subisse pas de carence. Les racines secondaires des graines atteignent 1 à 3 cm après une période de 5 jours (figure 21). Celles-ci sont alors utilisées pour les tests dits « organismes jeunes ». La période de pousse des racines secondaires sera plus longue (de 15 jours) pour les tests dits « organismes âgés ».

3.2.2 - En milieu solide

Les graines dont la taille de la racine primaire est de 3 à 5 cm sont sélectionnées et placées en phytotron dans des pots cylindriques de 10 cm de diamètre et d'une hauteur d'environ 12 cm. La base des pots est perforée et recouverte de papier filtre. Les pots contiennent 200 g de sol standard frais (Annexe A). Après une période de 5 jours, les organismes sont utilisés pour les tests dits « organismes jeunes ». La période de pousse des racines secondaires sera plus longue (de 15 jours) pour les tests dits « organismes âgés ».



Figure 22 : exposition en milieu liquide



Figure 23 : exposition en milieu solide

4 - DISPOSITIF EXPERIMENTAL

Celui-ci varie selon que l'expérimentation se fait en milieu liquide ou solide.

4.1 - EXPOSITION EN MILIEU LIQUIDE

Il s'agit de placer 3 graines germées dans un bécher contenant 200 mL de solution à tester, de façon à ce que seules les racines soient immergées (figure 22). Le témoin négatif est constitué de milieu de Hoagland préalablement oxygéné. La durée d'exposition varie de 30 heures à plusieurs jours en fonction des tests.

4.2 - EXPOSITION EN MILIEU SOLIDE

Dans un premier temps, la capacité de rétention en eau des sols utilisée est déterminée suivant la norme ISO 11274 (1998). Le taux d'humidité choisi est de 85 % de la capacité de rétention. Trois graines préalablement germées dans le coton sont placées dans un pot contenant 200 g de sol (frais). Elles sont enterrées jusqu'à la limite hypocotyle/épicotyle (figure 23). Le cadmium, au préalable dissous dans de l'eau distillée est incorporé au sol q.s.p. 85 % de rétention. La durée d'exposition varie de cinq à plusieurs jours en fonction des tests.

5 - TESTS SELECTIONNES

5.1 - TEST VICIA-MICRONOYAUX

Le protocole est inspiré de celui de Ma *et al.* (1995), modifié par Cotelle (1999) et décrit dans la norme AFNOR NF T90-327 (2004). Les références des produits et du matériel utilisés se trouvent en annexe B.

Les racines des fèves permettent de réaliser le test des micronoyaux. Elles permettent, en outre, de déterminer des critères de phytotoxicité tels que l'élongation racinaire et l'indice mitotique. L'essai de génotoxicité est basé sur la détection de micronoyaux dans les cellules des extrémités racinaires de *Vicia faba* (fève).



Figure 24 : Observation des phases de mitose au microscope
(grossissement $\times 1000$)

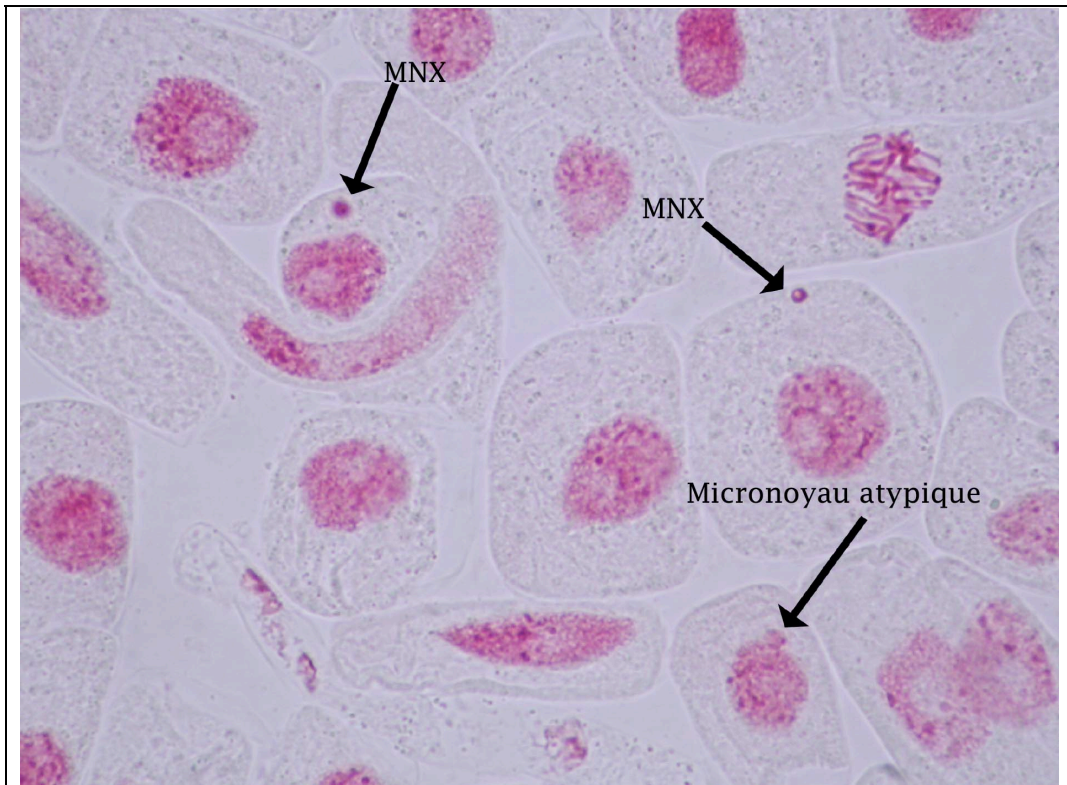


Figure 25 : Observation des micronoyaux au microscope
(grossissement $\times 1000$)

5.1.1 - Préparation de la solution d'acéto-orcéine 1 %

0,2 g d'orcéine sont ajoutés à 20 mL d'acide acétique 45 % (9 mL d'acide acétique + 11 mL d'eau ultra-pure). Ce mélange est porté à ébullition pendant 10 minutes, puis filtré après refroidissement. Lors de son utilisation, il est important de filtrer le colorant une fois par jour afin d'éviter la formation de cristaux d'orcéine qui pourraient être confondus avec des micronoyaux pendant l'examen microscopique des cellules.

5.1.2 - Fixation et coloration des extrémités racinaires

Les racines sont nettoyées à l'eau ultra-pure et les deux derniers centimètres sont prélevés et fixés à 4°C pendant une durée minimale d'une nuit dans un mélange éthanol/acide acétique glacial (3:1) préparé extemporanément. Ce mélange, appelé solution de Carnoy, est très instable. Il peut se produire une estérification s'il n'est pas préparé au moment de l'utilisation. L'éthanol a pour effet de précipiter et de dénaturer les protéines, de dissoudre certains lipides et de durcir les tissus. L'acide acétique est un bon fixateur des chromosomes ; il précipite les protéines du noyau.

Les extrémités racinaires peuvent ensuite être conservées à long terme dans de l'éthanol à 70 % pour une observation différée, ou être hydrolysées dans le cas d'une observation immédiate. Les extrémités racinaires sont alors placées dans de l'eau distillée pendant 10 minutes, hydrolysées dans HCl 1N à 60°C pendant 6 minutes puis sont de nouveau transférées dans de l'eau distillée. L'hydrolyse a pour but la destruction de la lamelle moyenne composée principalement de pectines, ce qui facilite les étalements cellulaires.

Il s'agit ensuite de poser une extrémité racinaire sur une lame, d'enlever la coiffe et le premier millimètre correspondant à la région méristématique et de ne garder que le deuxième millimètre qui est constitué par les cellules filles F1 (cf. figure 19) (Ma *et al.*, 1995). La coloration des cellules est réalisée en écrasant les racines avec une goutte d'acéto-orcéine avant de placer la lamelle.

5.1.3 - Examen des cellules des extrémités racinaires

L'examen microscopique des lames est réalisé à un grossissement de 400. Deux ou trois lames sont préparées pour chacun des trois réplicats au sein de chaque groupe. Etant donné que 1000 cellules par lame sont observées, le comptage des micronoyaux est effectué pour 6000 à 9000 cellules par groupe (figures 24 et 25).

Les résultats sont exprimés en nombre de micronoyaux (et non pas en nombre de cellules micronucléées) pour 1000 cellules.

5.1.4 - Analyse statistique

Les données sont analysées à l'aide des tests de Kolmogorov-Smirnov et Lilliefors, Kruskal-Wallis et U de Mann-Whitney (ces tests sont intégrés dans le logiciel « STATISTICA »). Le premier test permet de tester la normalité, le second permet de mettre en évidence une hétérogénéité au sein du groupe d'échantillons. Ce test est très bien adapté aux données ordinales (semi-quantitatives). S'il ressort de cette première analyse des différences, le test U de Mann-Whitney permettra d'identifier les échantillons présentant une différence significative par rapport au témoin.

5.2 - EVALUATION DES PC ET DU GLUTATHION

(méthode de Tang *et al.* (2000) modifiée par Courbot *et al.* (2004))

5.2.1 - Préparation des solutions

La solution d'ABD-F (Sigma, F-3639) 11,5 mM est réalisée par dissolution de 10 mg d'ABD-F dans 4 mL de DMF. Elle est conservée à l'abri de la lumière à -80°C .

La solution de TBP (Aldrich, T4/948-4) est préparée (dans un tube Eppendorff) avec 50 μL de TBP et 950 μL de DMF, puis mélangé au vortex.

La phase mobile A est un mélange TFA / eau (1:1000, v/v)

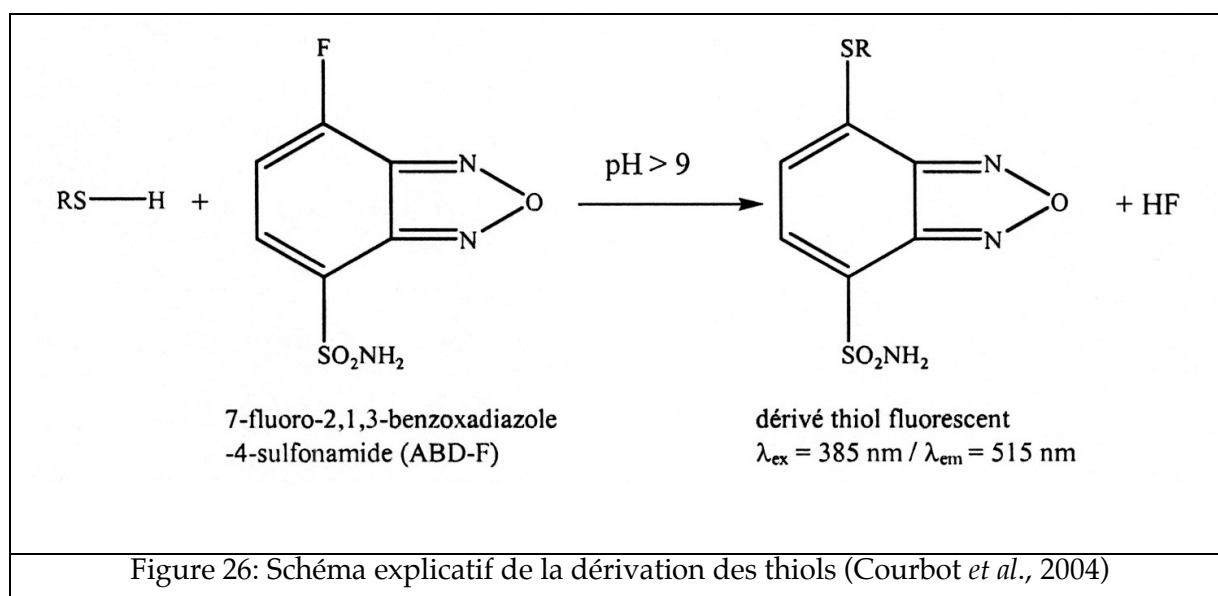
La phase mobile B est un mélange acétonitrile / TFA / eau (500:1:500, v/v/v)

Avant leur utilisation, les phases doivent être filtrées sur une membrane de type HPLV 0,20 μm (Millipore). Ensuite elles sont passées 5 minutes aux ultrasons pour les dégazer.

5.2.2 - Préparation des échantillons

Les différentes opérations doivent être réalisées aussi rapidement que possible, afin que les thiols présents dans les échantillons ne soient pas dégradés. De plus entre chaque étape, les tubes sont placés dans la glace fondante.

Les échantillons prélevés sont pesés (au moins 100 mg de matériel), puis placés dans des tubes Eppendorf. Ils sont alors mis au congélateur. La phase de prélèvement doit être



réalisée rapidement afin de bloquer, le plus vite possible, toutes les communications cellulaires.

Pour broyer le matériel végétal, les tubes sont plongés dans l'azote liquide, puis sont rajoutés les 10 mm de billes de verre (diamètre 1 mm). Le tout est écrasé à l'aide d'un piston adapté au tube.

On peut alors rajouter 1,2 mL de solution d'extraction. Celle-ci est composée de deux constituants :

- l'acide sulfosalicylique 5 % (SSA), qui évite l'oxydation des thiols ainsi que la précipitation des protéines
- le diéthylène triamine pentaacétique 5 mM (DTPA), qui sert à chélater les métaux afin d'éviter la dégradation des enzymes et de cations pouvant servir de cofacteur.

Les échantillons ainsi préparés sont passés au broyeur à bille (Retsch MM301) , pendant une durée de trois fois dix secondes (à 5000 tpm : tours par min) afin de limiter l'échauffement des molécules présentes dans les échantillons. Le broyat est récupéré dans des tubes Eppendorf qui sont centrifugés à 15000 g pendant 10 min à 2°C. Seul le surnageant est récupéré pour le dosage.

A ce niveau, et en fonction de la quantité de matériel végétal prélevée au départ, il est possible de faire des triplicats. Les échantillons peuvent être conservés plusieurs semaines à -80 °C, si l'on souhaite différer le dosage.

5.2.3 - Réduction et pré-dérivation des thiols

100 µL de l'échantillon (décongelé rapidement entre les doigts) sont prélevés et placés dans un tube Eppendorf dans lequel sont rajoutés 20 µL de NaOH (2M) et 270 µL de tampon borate. Une vérification du pH (qui doit être de 9) avant l'ajout de 50 µL de TBP (pour rendre le milieu réducteur) permet d'effectuer une première vérification du bon déroulement de l'expérimentation. Si le pH diffère de 9, il est possible de l'ajuster, mais il faudra alors tenir compte de ce nouveau facteur de dilution des composés dosés.

Avant de fermer le tube, un courant d'azote est introduit pour éviter la ré-oxydation du milieu et le tout est mélangé au vortex. Les échantillons ainsi préparés sont placés au bain-marie à 50°C pendant 5 minutes. Cette étape constitue la phase de réduction.

Pour la phase de dérivation, il faut rajouter 30 µL d'ABD-F (composé qui, par fluorescence, permettra de détecter les thiols) et mettre de nouveau au bain-marie à 50°C pendant 20 minutes (figure 26).

La réaction est bloquée en refroidissant rapidement l'échantillon dans de la glace fondante et en y ajoutant 70 µL d'HCl (1M). Après mélange au vortex le pH (≈ 1) est vérifié pour s'assurer du bon déroulement de la dérivation. Si se n'est pas bon, l'échantillon est préparé de nouveau.

5.2.4 - Dosage HPLC des thiols

Les échantillons ainsi traités sont placés dans des flacons pour injecteur automatique (Gilson) . Ils doivent être injectés dans un délai n'excédant pas 12 heures à 4°C. Pour le dosage, un volume de 20 µL de chaque échantillon est injecté dans le système HPLC, lequel a été préalablement réglé et équilibré :

- Température du plateau < 4°C
- Température de colonne = 40°C
- Débit phase mobile= 0,4 mL.min⁻¹
- $\lambda_{\text{excitation}} = 385\text{nm}$ / $\lambda_{\text{émission}} = 515\text{ nm}$
- Gain = 100 (largeur de fente : 40nm)
- Gradient utilisé (figure 27)

De 0 à 5 min : 20 % B

De 5 à 20 min : 20 à 40 % B

De 20 à 50 min : 40 à 100% B

De 50 à 55 min : 100 % B

De 55 à 60 min : 100 à 20 % B

De 60 à 80 min : 20 % B

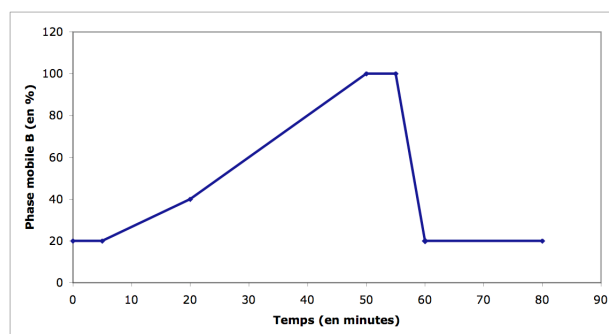


Figure 27 : Profil du gradient de phases

Cette méthode HPLC met en jeu le partage à polarité de phase inversée avec gradient d'élution eau-TFA / eau-TFA-acétonitrile couplée à une détection spectrofluorimétrique. La limite de quantification de la méthode est de 0,1 µmole et la variabilité est de 1 à 2 %.

Les thiols sont quantifiés grâce à des courbes de calibration (glutathion et PC₂) (annexe C). La PC₂ synthétique nous a été fournie par le C.A.B.E grâce à une collaboration avec l'institut F.A. Forel. Un standard PC est synthétisé *in vitro* comme décrit par Ruotolo *et al.* (2004) (annexe D).

5.2.5 - Analyse statistique

Les données sont analysées de la même manière que précédemment (§ 9.1.5)

5.3 - SYSTEMES ANTI-OXYDANT

5.3.1 - Préparation des échantillons

Les broyats des échantillons sont préparés de la même manière que pour le dosage des thiols (cf § 9.2.2).

5.3.2 - Protocoles

Les méthodes utilisées ont été optimisées au laboratoire par Marc Dazy (thèse en cours) en ce qui concerne les conditions de pH et de Km avant d'être utilisées. Les références des produits et du matériel utilisés se trouvent en annexe B.

5.3.2.1 - Superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

L'activité de la superoxyde dismutase est mesurée par la méthode de Qiu-Fang *et al.* (2005). En présence de SOD, la réduction photochimique du nitro blue tetrazolium en (NBT) est inhibée et le niveau d'inhibition est utilisé pour quantifier l'activité enzymatique. Le milieu réactionnel comprend 0,1mM d'EDTA, 13 mM de méthionine, 60 μ M de riboflavine, 2,25 mM NBT et 100 μ L d'échantillon. Puis il est complété à un volume final de 1mL par l'ajout de tampon phosphate - potassium 125 mM (pH 7,8) contenant 3 mM MgSO₄, 3 mM EDTA et 2% polyvinyl polypyrrolidone (PVPP).

Le milieu réactionnel est laissé 15 minutes à la lumière puis la réaction est stoppée en plaçant les échantillons à l'obscurité. Un témoin réactionnel est réalisé dans lequel l'extrait végétal est remplacé par un volume égal de tampon phosphate - potassium 125 mM (pH 7,8) contenant 3 mM MgSO₄, 3 mM EDTA et 2% polyvinyl polypyrrolidone (PVPP). Les expériences sont menées à température ambiante et la réaction est mesurée par spectrophotométrie à 560 nm. Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme réduisant de 50 % l'absorbance à 560 nm du tube témoin.

5.3.2.2 - Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

L'activité de la catalase est déterminée suivant la méthode de Chaoui *et al.* (1997). La disparition d'H₂O₂ est évaluée en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm (coefficient d'extinction : 36,6 mM⁻¹cm⁻¹) du milieu réactionnel composé de H₂O₂ 10 mM

(volume final) et de 100 μL d'échantillon complété à 1 mL de volume final par l'ajout de tampon phosphate - potassium 125 mM (pH 7,0).

5.3.2.3 - Guaiacol peroxydase (GPX, EC 1.11.1.7)

L'activité Guaiacol peroxydase est étudiée suivant la méthode de Sashwati Roy *et al.* (1996). Le milieu réactionnel est composé de 100 μL d'échantillon, 3,4 mM de guaiacol comme substrat, 10 mM H_2O_2 et le volume final est complété à 1 mL par l'ajout de tampon phosphate - potassium 125 mM (pH 7,0). L'augmentation de l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 470 nm. L'activité enzymatique est calculée en utilisant le coefficient d'extinction de l'ascorbate ($26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5.3.2.4 - Ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11)

L'activité de l'Ascorbate peroxydase est déterminée suivant la méthode de Garcia-Limones *et al.* (2002). Le milieu réactionnel se compose de 0,5 mM d'ascorbate, 10 mM d' H_2O_2 , 1 mM d'EDTA et 100 μL d'échantillon, le tout complété à 1 mL de volume final par l'ajout de tampon phosphate - potassium 125 mM (pH 7,0). L'oxydation de l'ascorbate est mesurée grâce à l'augmentation de l'absorbance à 290 nm. L'activité enzymatique est calculée en utilisant le coefficient d'extinction de l'ascorbate : $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.3.2.5 - Glutathion réductase (GR, EC 1.6.4.2)

L'activité Glutathion réductase est étudiée suivant la méthode de Garcia-Limones *et al.* (2002). Le milieu réactionnel est composé de 100 μL d'échantillon, 6 mM de NADPH, 5 mM de glutathion oxydé. Puis, il est complété à un volume final de 1 mL par l'ajout de tampon phosphate - potassium 125 mM (pH 7,8). L'oxydation du NADPH est déterminée par la diminution de son absorbance à 340 nm (coefficient d'extinction : $6.2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5.3.2.6 - La peroxydation lipidique

Le degré de peroxydation lipidique est évalué suivant la méthode d'Aravind et Prasad (2003). 900 μL d'une solution de TBA 0.5 % / TCA 20 % (p/v) sont ajoutés à 100 μL d'échantillon. L'homogénat est placé à 95°C pendant 30 min et la réaction est stoppée en le

plaçant dans la glace. L'absorbance non spécifique à 600 nm est soustraite à celle obtenue à 532 nm. Le niveau de MDA est calculé grâce au coefficient d'extinction $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.3.3 - Analyse statistique

Les données sont analysées de la même manière que précédemment (§ 9.1.5).

RESULTATS

1 - ETUDE DES MECANISMES D'ACTION DU CADMIUM

Une série d'expérimentations a été menée sur *Vicia faba*, afin d'étudier la génotoxicité, l'induction de phytochélatines et de composés impliqués dans le stress oxydant. Dans un premier temps, les expositions ont été réalisées en phase liquide qui assure une forte biodisponibilité du cadmium. Dans un deuxième temps, les expositions ont été faites en phase solide, afin de confronter ces premiers résultats à des conditions plus représentatives de celles rencontrées dans le cadre de la problématique des sols contaminés.

1.1 - ETUDES REALISEES EN PHASE LIQUIDE

1.1.1 - Génotoxicité du CdCl₂ (Test *Vicia* micronoyaux)

Deux paramètres ont été étudiés : le temps d'exposition et la concentration en cadmium. Les temps d'exposition choisis sont de 30h, 39h et 48h. Pour les expositions supérieures à 30 heures, le renouvellement du milieu est nécessaire afin d'apporter tous les éléments nutritifs assurant le développement normal du végétal. De plus cela permet de restaurer la concentration nominale initiale. Le changement du milieu assure également le renouvellement des éléments nutritifs dont les végétaux ont besoin, afin d'éviter l'apparition de carences qui pourraient interférer avec le (ou les) effet(s) du polluant. Suite à des expériences préliminaires, différentes concentrations de CdCl₂ ont été testées : $5 \cdot 10^{-8}$; $7,5 \cdot 10^{-8}$; 10^{-7} ; $2,5 \cdot 10^{-7}$; $5 \cdot 10^{-7}$; et $7,5 \cdot 10^{-7}$ M. Afin d'obtenir ces solutions, des dilutions sont effectuées à partir d'une solution mère de concentration $5 \cdot 10^{-2}$ M de CdCl₂ ($183,316 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) diluée dans du milieu de Hoagland.

Les résultats obtenus lors des trois périodes d'exposition montrent que, généralement, les témoins ne présentent aucun micronoyau. Cependant il est possible que des micronoyaux se forment, ce qui constitue le taux spontané de micronoyaux qui est en général très faible, compris entre 0 et 1 MCN/1000 cellules.

Concentration de CdCl ₂ (en Molaire)	Indice mitotique (en %)		Taux de micronoyaux (en ‰)	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Témoin	5,58	0,78	0,00	0,00
5.10 ⁻⁸	5,75	0,44	0,00	0,00
7,5.10 ⁻⁸	5,72	0,52	0,30	0,34
10 ⁻⁷	5,67	0,50	0,98*	0,24
2,5.10 ⁻⁷	5,88	0,36	1,52*	0,78
5.10 ⁻⁷	5,14	0,78	1,51*	0,42

Tableau VIII : Test des micronoyaux sur les racines de *Vicia faba*. Durée d'exposition 30 heures. * : valeur statistiquement différente par rapport au témoin, (p<0,05 ; n=9).

Concentration de CdCl ₂ (en Molaire)	Indice mitotique (en %)		Taux de micronoyaux (en ‰)	
	Moyenne	Ecart-type	Moyenne	Ecart-type
Témoin	5,36	0,60	0,00	0,00
7,5.10 ⁻⁸	4,70	0,38	0,87*	0,22
10 ⁻⁷	4,88	0,12	1,30*	0,22
2,5.10 ⁻⁷	4,14*	0,24	2,68*	0,55
5.10 ⁻⁷	2,06*	0,23	0,80*	0,25
7,5.10 ⁻⁷	1,79*	0,61	0,22	0,00

Tableau IX : Test des micronoyaux sur les racines de *Vicia faba*. Durée d'exposition 39 heures. * : valeur statistiquement différente par rapport au témoin, (p<0,05 ; n=9).

Pour chacune de ces expositions, le taux de micronoyaux augmente jusqu'à un maximum, appelé pic de génotoxicité, puis diminue avec l'augmentation de la concentration en cadmium. Durant ces deux phases, l'indice mitotique, indicateur du bon fonctionnement de la division mitotique dans les cellules racinaires, diminue de façon monotone. Cette diminution de l'indice mitotique démontre l'existence d'un effet cytotoxique qui explique la chute du nombre de micronoyaux observés après le pic de génotoxicité. Nous retrouvons alors la courbe classique concentration – effet (courbe en cloche) déjà observée par Cotelle (1999) et aussi dans de nombreuses autres études génotoxiques.

Lorsque le temps d'exposition est prolongé, la première concentration testée où est observé un effet statistiquement significatif par rapport au témoin (i.e. LOEC⁸) diminue. Elle est de 10^{-7} M de CdCl₂ (11,2 µg/L) pour 30h d'exposition, $7,5 \cdot 10^{-8}$ M (8,4 µg/L) pour 39h et 48h). D'autre part, le taux de micronoyaux augmente significativement en fonction du temps. C'est ainsi que pour une concentration de $2,5 \cdot 10^{-7}$ M en CdCl₂, qui correspond au pic de génotoxicité (Tableaux VIII, IX; et X), la quantité de micronoyaux est de $1,52 \pm 0,78$, $2,68 \pm 0,55$ et $9,42 \pm 0,13$ ‰ pour des temps d'exposition respectifs de 30, 39 et 48 heures.

Concentration de Molaire de CdCl ₂	Indice mitotique (en %)		Fact. d'inhib.	Taux de micronoyaux (en ‰)		Fact. d'induc.
	Moyenne	Ecart-type		Moyenne	Ecart-type	
Témoin	5,73	0,22	0,00	0,51	0,33	00,00
$7,5 \cdot 10^{-8}$	5,60	0,43	1,02	3,55*	0,66	6,96
10^{-7}	4,67*	0,09	1,23	4,86*	0,25	10,80
$2,5 \cdot 10^{-7}$	3,30*	0,05	1,72	9,42*	0,13	18,47
$5 \cdot 10^{-7}$	2,54*	0,17	2,26	7,39*	0,43	14,49
$7,5 \cdot 10^{-7}$	2,01*	0,01	2,68	3,55*	1,24	6,96

Tableau X : Test des micronoyaux sur les racines de *Vicia faba*. Durée d'exposition 48 heures.

Fact. d'inhib. : facteur d'inhibition. **Fact. d'induc.** : facteur d'induction

* : valeur statistiquement différente par rapport au témoin, (p<0,05 ; n=9).

Parallèlement il y a diminution de l'indice mitotique lorsque le temps d'exposition augmente (au pic de génotoxicité, il est de $5,88 \pm 0,36$; $4,14 \pm 0,24$ puis $3,30 \pm 0,05$ % pour respectivement 30, 39 et 48 heures d'exposition.

⁸ Lowest Observed Effect Concentration (plus faible concentration induisant un effet)

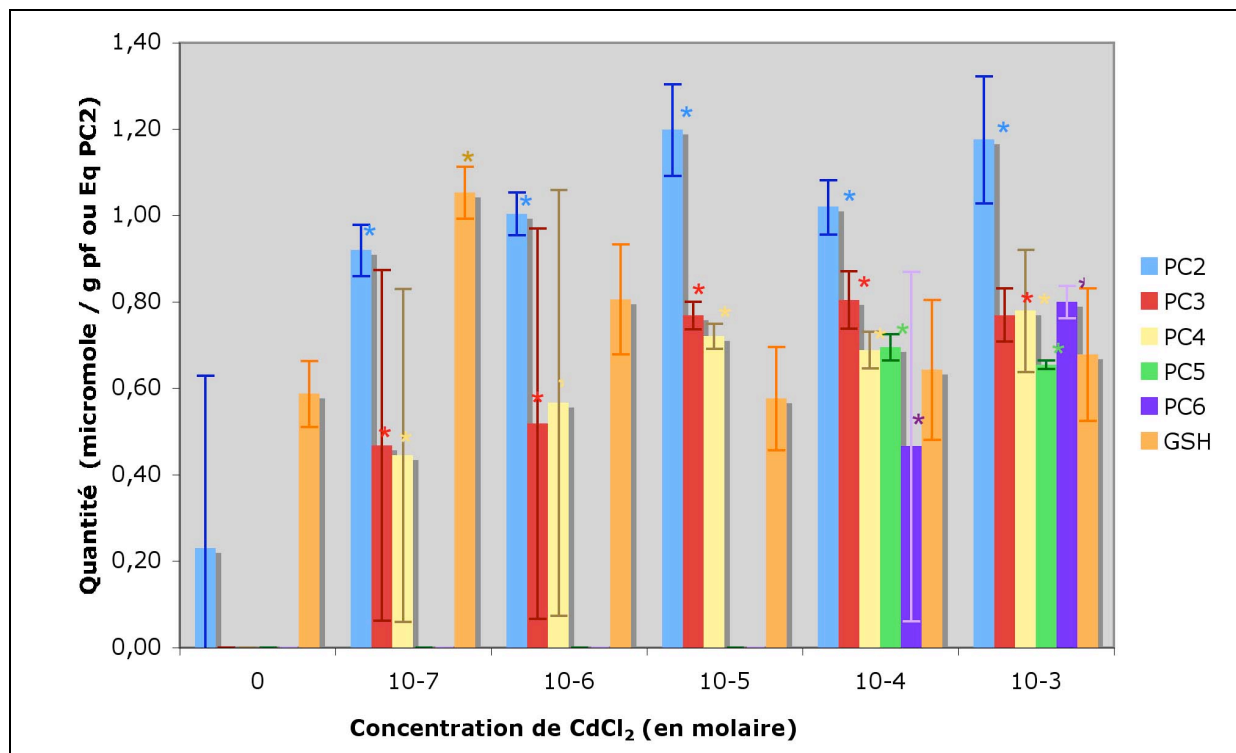


Figure 28 : Effet de la concentration en CdCl₂ du milieu sur l'induction des PC dans les racines (Organismes de 9 jours).

* : valeur statistiquement différente du témoin, (p<0,05 ; n=3).

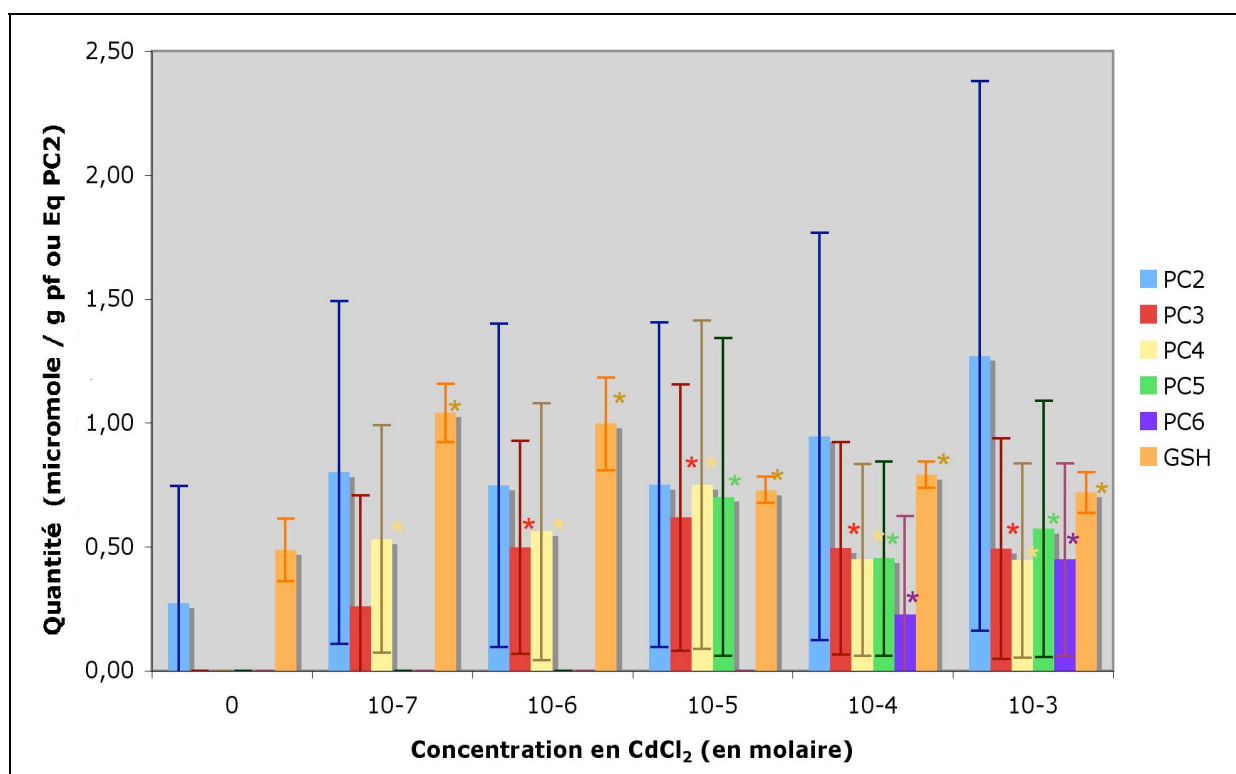


Figure 29 : Effet de la concentration en CdCl₂ du milieu sur l'induction des PC dans les feuilles (Organismes de 9 jours)..

* : valeur statistiquement différente du témoin, (p<0,05 ; n=3).

Pour le temps d'exposition de 48h, les facteurs d'induction sont très importants : notons par exemple un facteur d'induction de 18 pour le pic de génotoxicité. Enfin, tous les micronoyaux observés n'avaient pas la même apparence (cf figure 25) : en effet, nous avons observé des micronoyaux bien séparés du noyau principal et des micronoyaux « atypiques » liés au noyau, très caractéristiques des métaux lourds (plomb, cadmium, etc...).

Le cadmium a un effet génotoxique dans les cellules racinaires de Vicia faba, avec une courbe concentration-effet en cloche et des micronoyaux « atypiques » caractéristiques des métaux lourds. Lorsque le temps d'exposition augmente, la LOEC diminue et le facteur d'induction augmente considérablement. Les concentrations génotoxiques à 48h d'exposition sont comprises entre $7,5 \cdot 10^{-8}$ et $7,5 \cdot 10^{-7}$ M de CdCl_2 avec un pic de génotoxicité à $2,5 \cdot 10^{-7}$ M

1.1.2 - Etude de l'induction des phytochélatines (PC)

Cette étude a été menée selon trois axes. Dans un premier temps, seule la concentration en CdCl_2 dans le milieu a été prise en compte. Cette expérience nous a permis de choisir une concentration de polluant pertinente pour la suite de l'étude. En effet, il fallait trouver une concentration suffisamment élevée pour induire une synthèse de phytochélatines, mais assez faible pour rester proche des concentrations trouvées dans les cas de pollutions avérées. Puis, nous avons pris en compte l'effet de l'âge des organismes exposés et enfin l'effet du temps d'exposition.

Lors de cette étude, les préparatifs sont quasi identiques à ceux utilisés lors du test *Vicia faba* - micronoyaux. Les solutions (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} et 10^{-3}) sont préparées à partir de la solution mère (10^{-3} M de CdCl_2) et la solution de dilution demeure le milieu de Hoagland. Les résultats obtenus seront exprimés en $\mu\text{moles PC}_2 / \text{g}$ de poids frais ou en $\mu\text{moles équivalent PC}_2 / \text{g}$ de poids frais.

1.1.2.1 - Effet de la concentration en CdCl_2

Les jeunes plantules, dont les racines secondaires ont atteint 1 à 3 cm, sont exposées pendant 48 heures aux diverses concentrations en CdCl_2 : 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} M. Cette expérience nous a permis de préciser les quantités de produits thiolés mesurés dans les racines (figure 28) et dans les feuilles (figure 29), exposées à une large gamme de concentrations en CdCl_2 .

La figure 28 montre que la quantité de GSH a tendance à augmenter puis à diminuer avec l'augmentation de la concentration en CdCl_2 , passant par un maximum de $1,05 \mu\text{M GSH} / \text{g}$ de poids frais pour 10^{-7} M (soit $11,24 \text{mg} / \text{L}$ de CdCl_2).

Il faut noter que PC₂ est déjà présente chez le témoin en quantité relativement faible : 0,23 µM / g de poids frais. Cette quantité augmente progressivement jusqu'à atteindre un plateau aux environs de 1,20 µM / g de poids frais (cela pour 10⁻⁵ M soit 1,127 mg/L).

La quantité de PC diffère en fonction du degré de polymérisation de celles-ci (figure 28). Leurs quantités augmentent et sont statistiquement significatives dès 10⁻⁷ M pour PC₂, PC₃ et PC₄ et à partir de 10⁻⁴ M pour PC₅ et PC₆.

Dans les jeunes parties aériennes (figure 29), le dosage de tous les composés thiolés ne permet guère une analyse pertinente à cause des écarts-types trop importants. Ceci est dû au fait que les parties aériennes sont très hétérogènes et qu'il aurait fallu séparer les différentes feuilles (cf. § 1.1.2.2). Cependant, la présence du glutathion et des phytochélatines dans les feuilles après 48 heures d'exposition au cadmium tend à suivre le même profil que celui obtenu au niveau racinaire avec la présence de PC₂ chez le témoin, l'apparition de PC₃ et PC₄ dès 10⁻⁷ M, PC₅ à partir de 10⁻⁵ M (au lieu de 10⁻⁴ M dans les racines) et PC₆ dès 10⁻⁴ M de CdCl₂.

Cette expérience tend à montrer que l'exposition au CdCl₂ induit la synthèse de phytochélatines (avec 2 ≤ n ≤ 6). Parallèlement, la chute de la quantité de GSH au niveau racinaire pourrait être liée à l'augmentation de la concentration du milieu en CdCl₂. Il est intéressant de noter que pour la concentration la plus élevée en CdCl₂, 10⁻³ M (soit 112,4 mg/L), les quantités induites de PC 3 à 6 sont comprises entre 0,65 et 0,80 µM / g de poids frais dans les racines alors qu'elles ne sont comprises qu'entre 0,5 et 0,6 µM / g de poids frais dans les feuilles, qui théoriquement représentent l'ensemble des lieux de stockage des PC.

Au vu de l'induction des phytochélatines par le CdCl₂, nous avons choisi la concentration de 10⁻⁵ M, pour les expositions plus longues ainsi que le test de germination lors des expérimentations présentées ultérieurement.

1.1.2.2 - Effet de l'âge des plantules

Pour cette expérience, nous avons utilisé des plantules âgées de 18 jours que nous avons laissé pousser dans le milieu de Hoagland avant exposition. Ainsi les organismes utilisés possèdent un développement plus avancé permettant la distinction des différents étages foliaires.

Puis les plantules ont été exposées pendant 48 heures aux diverses concentrations de CdCl₂ : 10⁻⁷ ; 10⁻⁶ ; 10⁻⁵ ; 10⁻⁴ ; 10⁻³ M.

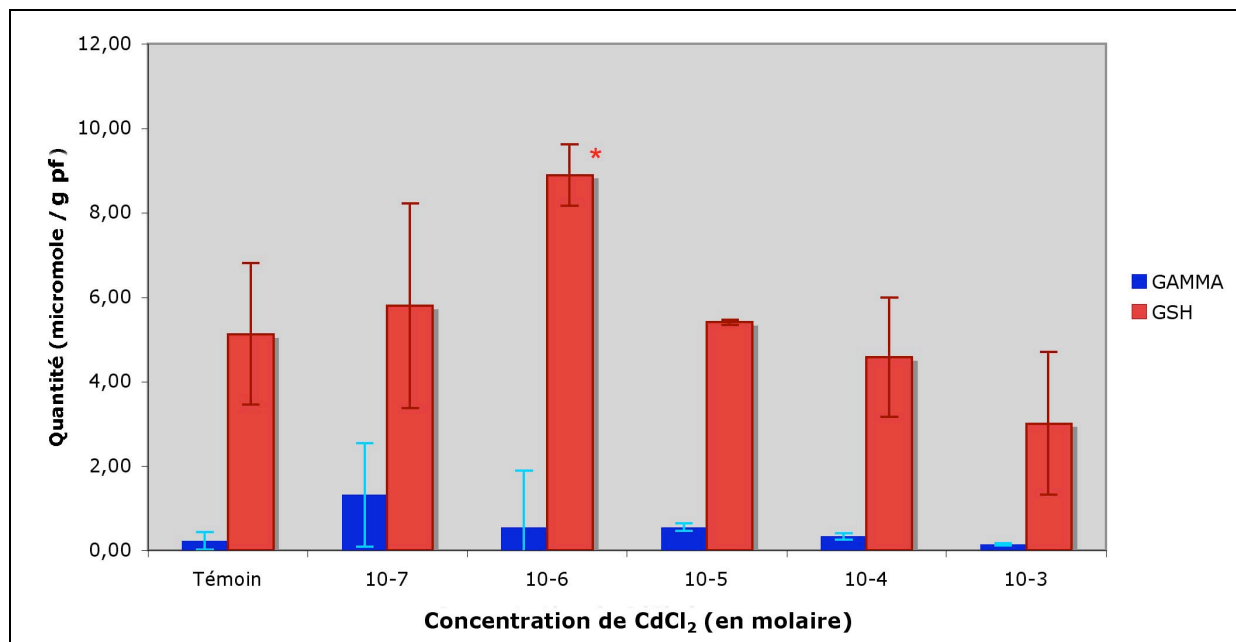


Figure 30 : Effet de la concentration en CdCl₂ du milieu sur les quantités de γ -Glu-Cys et de GSH dans les racines (Organismes de 18 jours)..
* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n = 3$).

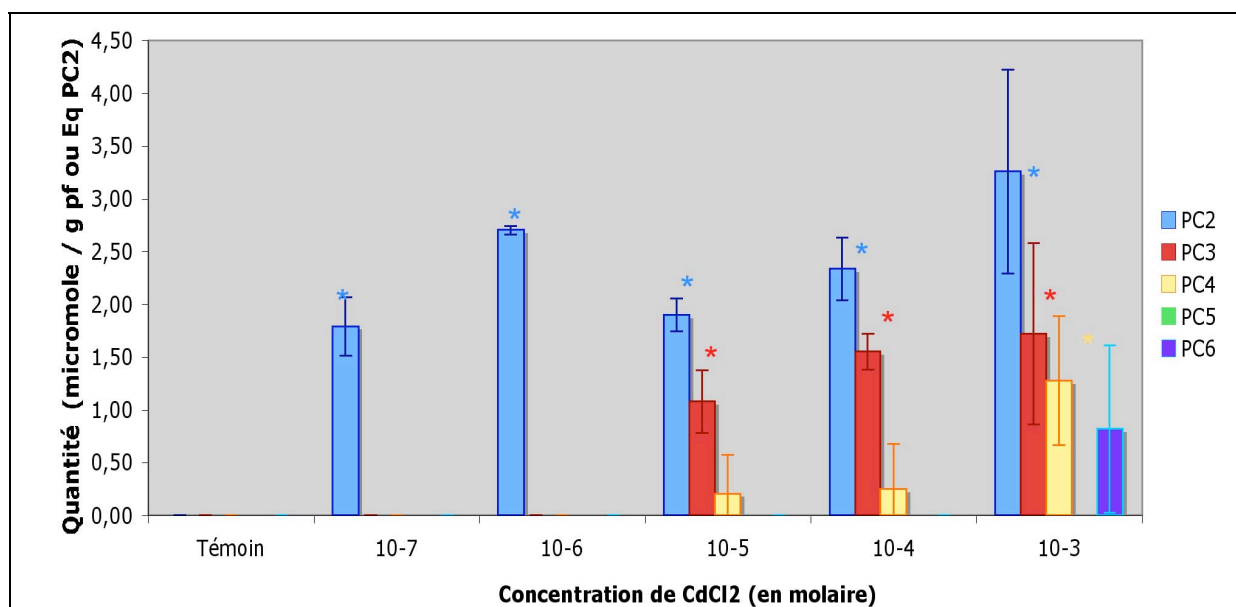


Figure 31 : Effet de la concentration en CdCl₂ du milieu sur l'induction des PC dans les racines (Organismes de 18 jours)..
* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n = 3$).

• Réponse racinaire

Les quantités de γ -Glu-Cys et de GSH augmentent dans un premier temps, et atteignent respectivement la valeur de 1,32 μM (pour 10^{-7} M soit 11,24 mg/L) et 8,89 μM , seule donnée statistiquement significative par rapport au témoin (pour 10^{-6} M soit 112,4 mg/L). Puis ces quantités diminuent avec l'augmentation de la concentration en CdCl_2 (figure 30). Si l'on compare les résultats du GSH dosé dans les plantules de 18 jours (figure 30) avec ceux de la figure 28 (organismes âgés de 9 jours), il est intéressant de noter que les profils sont identiques et que les quantités de GSH augmentent avec l'âge des organismes : pour la concentration de CdCl_2 de 10^{-7} M, on passe de 1,05 μM / g de poids frais (9 jours) à 8,89 μM / g de poids frais (18 jours).

En ce qui concerne les PC (figure 31), la première à être induite est la PC_2 . La quantité induite augmente jusqu'à 2,70 μM (pour 10^{-6} M soit 112,4 mg/L). A 10^{-5} M, la quantité chute à 1,90 μM . A cette même concentration de polluant, sont induites les PC_3 (1,08 μM équivalent PC_2) et PC_4 (0,21 μM équivalent PC_2). Avec la concentration croissante du milieu en cadmium, la variété des PC augmente jusqu'à PC_6 (pour 10^{-3} M) ; il en est de même pour leurs quantités respectives. La comparaison de ces résultats obtenus sur des organismes de 18 jours avec ceux obtenus sur des organismes de 9 jours (figure 29) montre que les quantités des PC_2 , PC_3 , PC_4 sont statistiquement significativement différentes du témoin de 10^{-7} à 10^{-3} M chez les organismes de 9 jours. Chez les organismes de 18 jours, les quantités de PC_2 restent significatives sur toute la gamme de concentrations, PC_3 et PC_4 n'apparaissent qu'à partir de la concentration de 10^{-5} M. Les PC_3 sont statistiquement significativement différentes du témoin dès leur synthèse alors que les PC_4 ne le sont qu'à la plus forte concentration. Les PC_5 semblent absentes chez les organismes « âgés » alors qu'elles apparaissent de manière significative dès 10^{-4} M chez les organismes « jeunes ». Quant aux PC_6 , elles apparaissent de manière non significative à 10^{-3} M chez les organismes « âgés » alors qu'elles apparaissent de manière significative dès 10^{-4} M chez les organismes « jeunes ». Comme nous l'avons souligné pour le GSH, les PC, lorsqu'elles sont induites de manière significative, sont présentes en plus grande quantité lorsque les organismes sont plus âgés.

• Réponse foliaire

Dans les feuilles de premier rang (première feuille de l'épicotyle), on note une grande quantité de GSH (environ 9 μM) chez le témoin (figure 32). Cette quantité diminue significativement avec l'augmentation de la concentration en cadmium du milieu. Cette observation n'avait pas été faite chez les organismes plus jeunes (cf figure 28) où le GSH était en faible quantité chez le témoin et augmentait avec la concentration en cadmium.

La quantité de γ -Glu-Cys, quant à elle, est pratiquement nulle chez le témoin et à la concentration de 10^{-7} M de CdCl_2 , puis augmente significativement à partir de 10^{-6} M avec la concentration en cadmium.

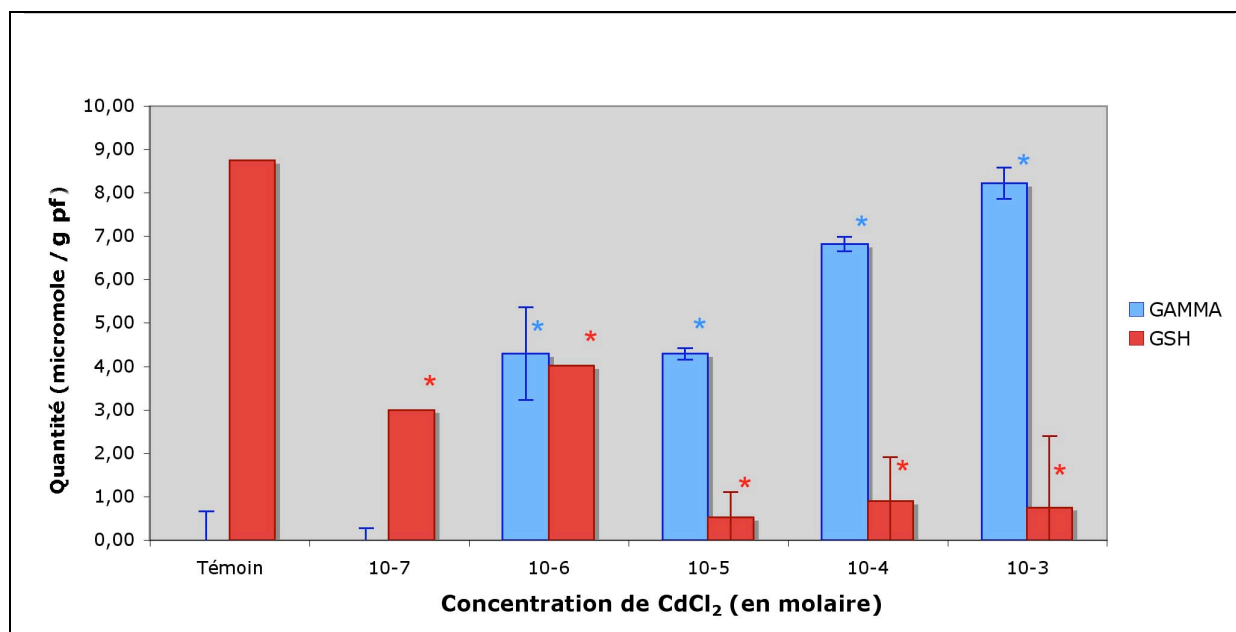


Figure 32 : Effet de la concentration en CdCl_2 du milieu sur les quantités de γ -Glu-Cys et de GSH dans les feuilles de rang 1.

* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

Les PC foliaires voient leur quantité et leur variété augmenter avec la concentration en cadmium (figure 33). PC_2 est significativement induite dès 10^{-7} M, et les PC_3 à PC_6 à partir de 10^{-5} M. La même tendance était observée chez les organismes plus jeunes.

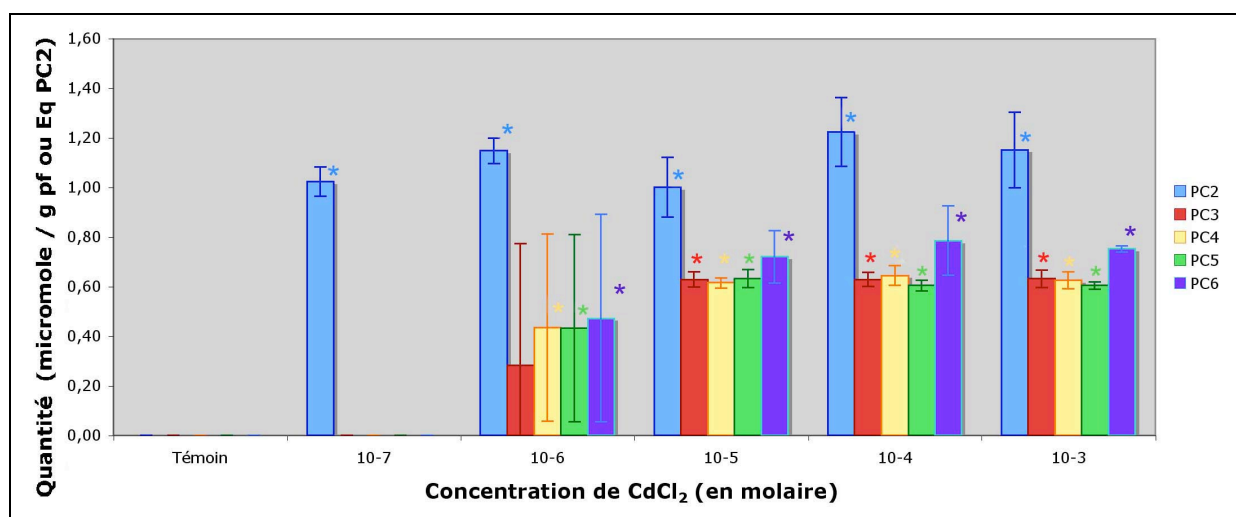


Figure 33 : Effet de la concentration en CdCl_2 du milieu sur l'induction des PC dans les feuilles de rang 1.

* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

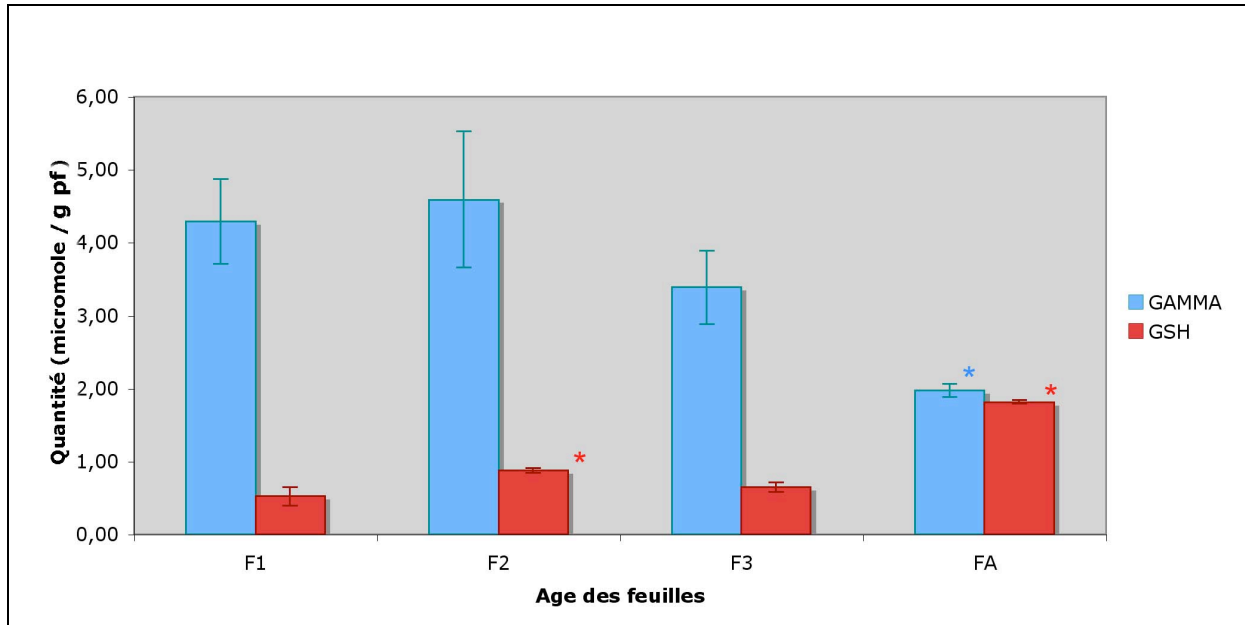


Figure 34 : Effet de la concentration en CdCl_2 du milieu sur les quantités de γ -Glu-Cys et de GSH dans les feuilles (Organismes de 18 jours, exposés à 10^{-5} M).
 * : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

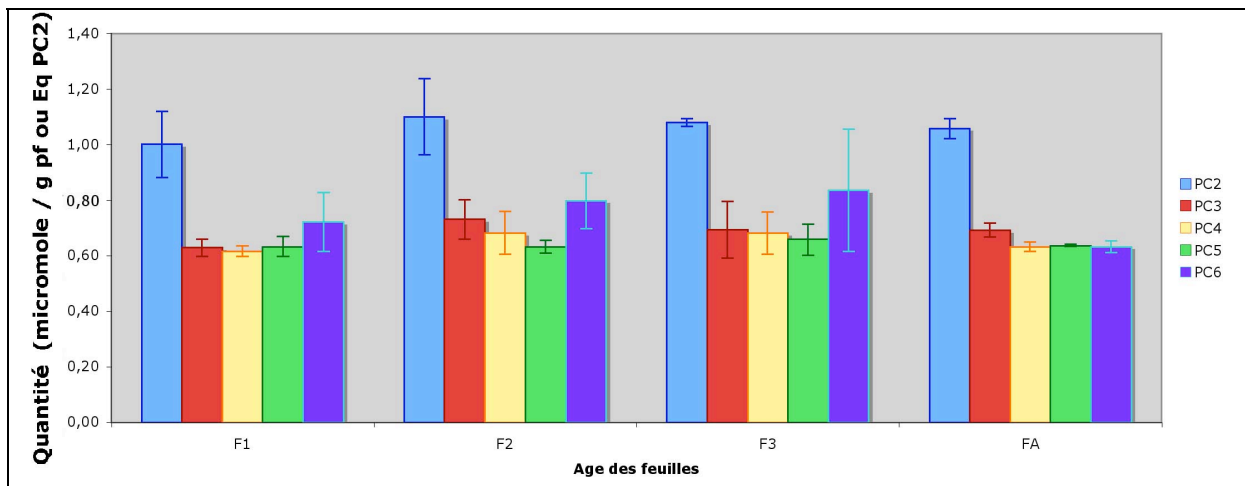


Figure 35 : Effet de la concentration en CdCl_2 du milieu sur l'induction des PC dans les feuilles (Organismes de 18 jours, exposés à 10^{-5} M).
 * : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

La figure 34 montre que la quantité de GSH tend à augmenter avec l'étagement foliaire, pour atteindre la valeur de $1,81 \mu\text{M}$ au niveau de l'apex. La quantité de $\gamma\text{-Glu-Cys}$ varie inversement à la quantité de GSH.

Enfin, la quantité de phytochélatines (figure 35) ne semble pas varier de manière significative entre les différents rangs foliaires.

1.1.2.3 - Répartition entre PC de faible poids moléculaire (LMW) et de haut poids moléculaire (HMW).

Dans la littérature, les PC sont traditionnellement classées en deux catégories : celles de faible poids moléculaire (LMW) et celles de haut poids moléculaire (HMW). Dans cette étude, nous avons défini les PC_2 , PC_3 et PC_4 comme des LMW alors que les PC_5 et PC_6 sont des HMW.

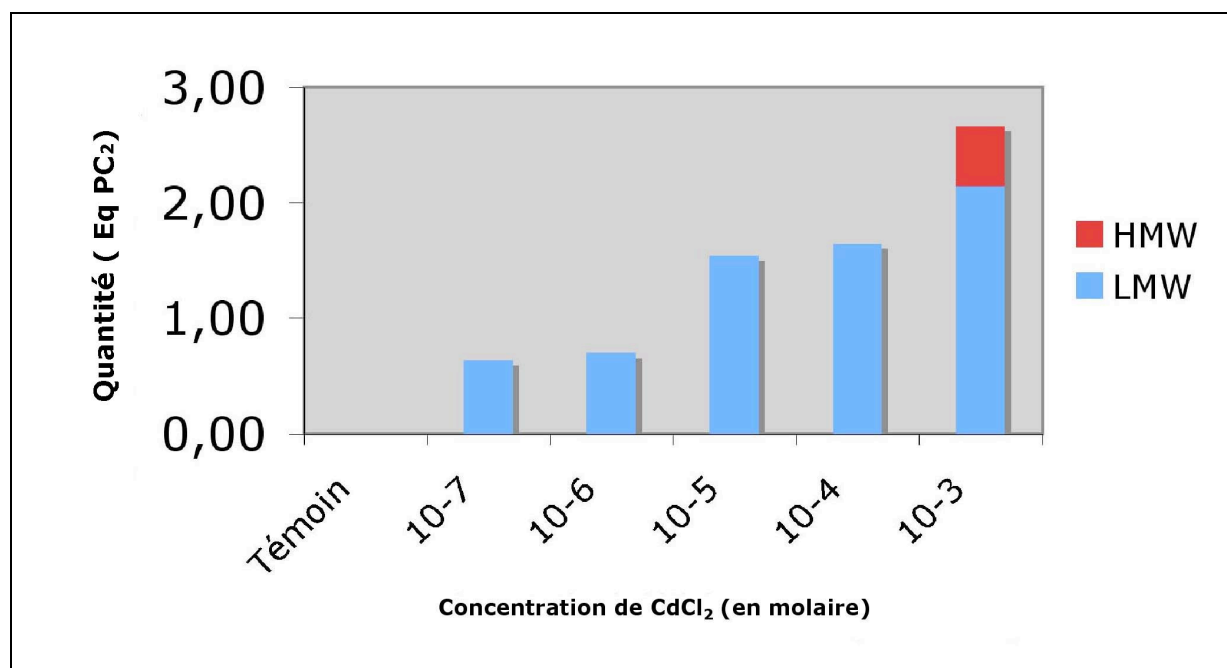


Figure 36 : Proportion de PC LMW/HMW dans les racines des organismes de 18 jours en fonction de la concentration en CdCl_2

Dans les racines des organismes de 18 jours (figure 36) la quantité de PC augmente avec la concentration en cadmium. Les PC HMW ne sont présentes que pour la plus forte concentration (10^{-3} M). A cette concentration, elles ne représentent qu'environ 1/5 de la quantité totale des phytochélatines induites.

Au niveau des feuilles, la quantité totale de PC augmente jusqu'à 10^{-6} M puis diminue avec la concentration croissante de CdCl_2 dans le milieu (figure 37). Il en est de même pour la quantité de LMW. Cette diminution peut s'expliquer par la présence de phytochélatines HMW dès 10^{-6} M.

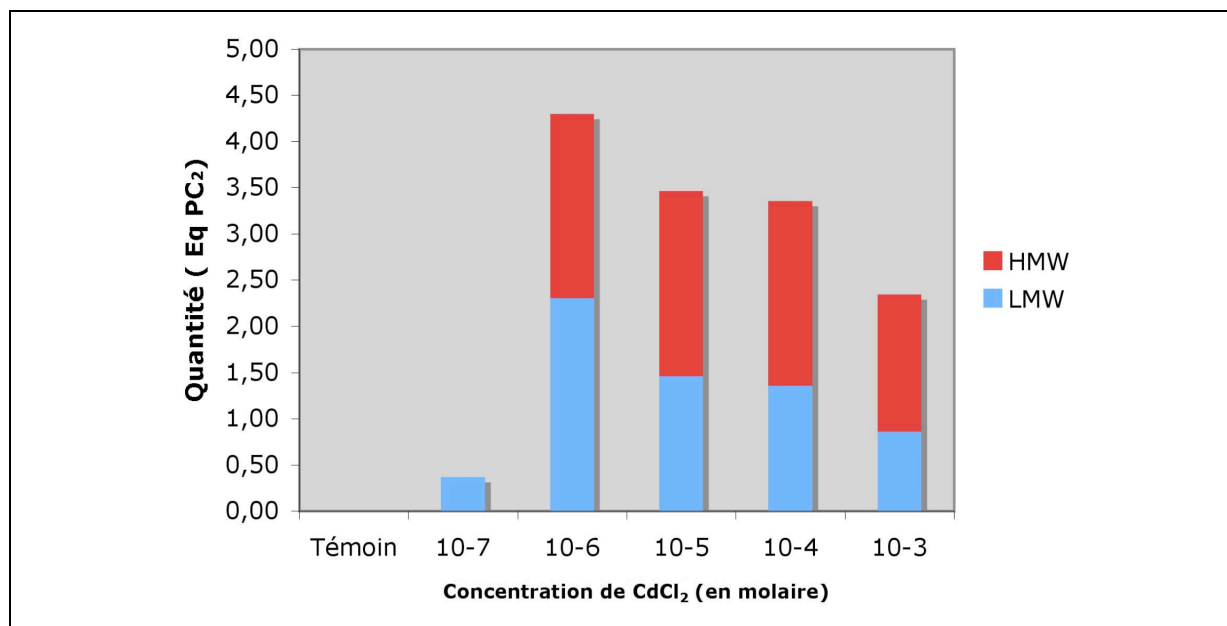


Figure 37 : Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles en fonction de la concentration en chlorure de cadmium (Organismes de 18 Jours, n=3).

La figure 38 permet de constater que seules les LMW sont présentes dans les racines, bien qu'elles soient plus abondantes dans les feuilles. Les HMW, quant à elles, ne sont présentes que dans les feuilles.

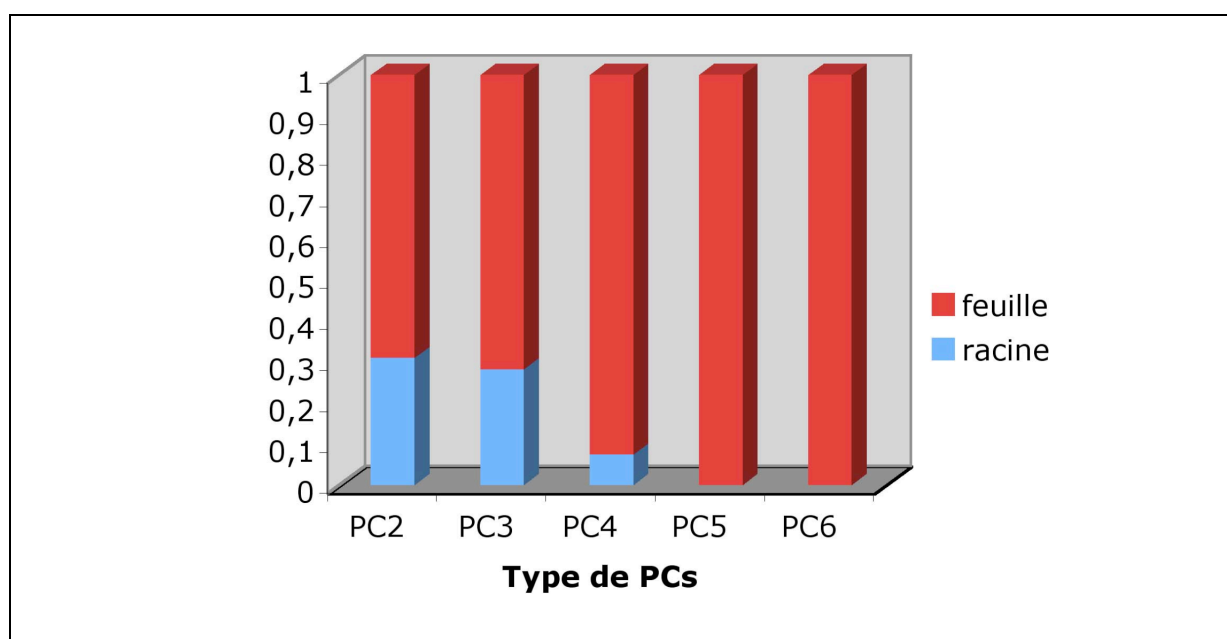


Figure 38 : Rapports PC racines/feuilles à 10^{-5} M de CdCl_2 (Organismes de 18 jours, n=3).

1.1.2.4 - Induction des PC aux différents niveaux de la plante

Pour approfondir le mode d'induction des PC selon le rang foliaire, ainsi que les réponses racines/feuilles différentes observées précédemment, nous avons exposé des plantules âgées de 18 jours à 10^{-7} ; 10^{-6} ; 10^{-5} ; 10^{-4} ; 10^{-3} M de CdCl_2 . Le milieu de Hoagland demeure le milieu de dilution. Le temps d'exposition est de 48 heures.

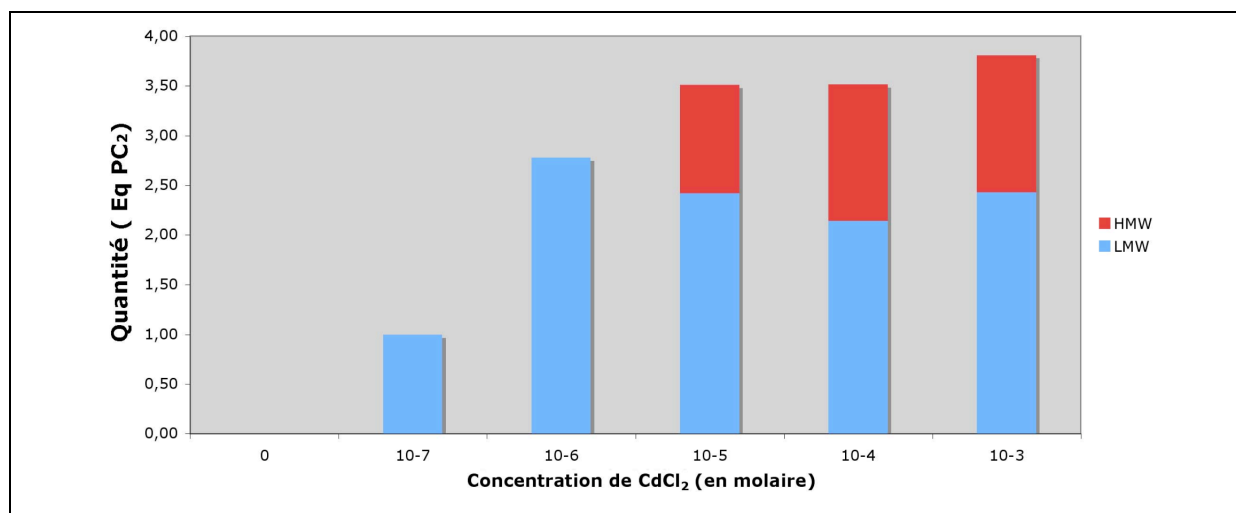


Figure 39 : Proportion de PC LMW/HMW dans les racines en fonction de la concentration en CdCl_2 (Organismes de 18 jours, n=3).

Dans les racines, la quantité des PC augmente avec la concentration en cadmium. On y trouve plus de LMW que de HMW (figure 39). Dans les feuilles, les HMW sont induites dès 10^{-6} M (figure 40), alors qu'au niveau racinaire, elles le sont à une concentration plus forte de 10^{-5} M. Avec l'augmentation en Cd, la proportion des LMW dans les feuilles diminue au profit des HMW pour la gamme de concentrations comprise entre 10^{-6} et 10^{-3} M.

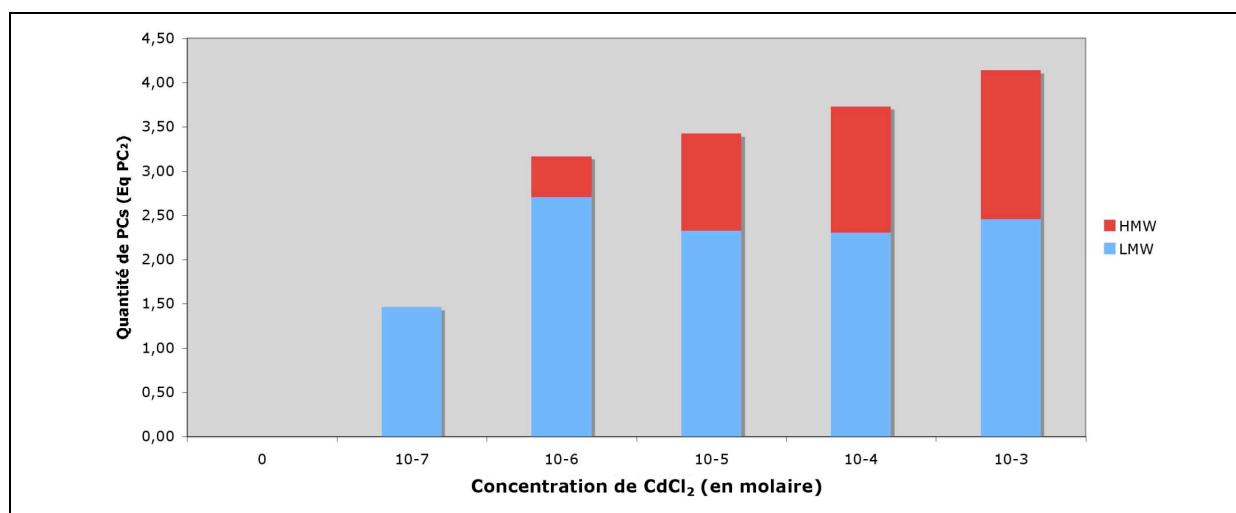


Figure 40 : Proportion de PC LMW/HMW dans les feuilles en fonction de la concentration en CdCl_2 (Organismes de 18 jours, n=3).

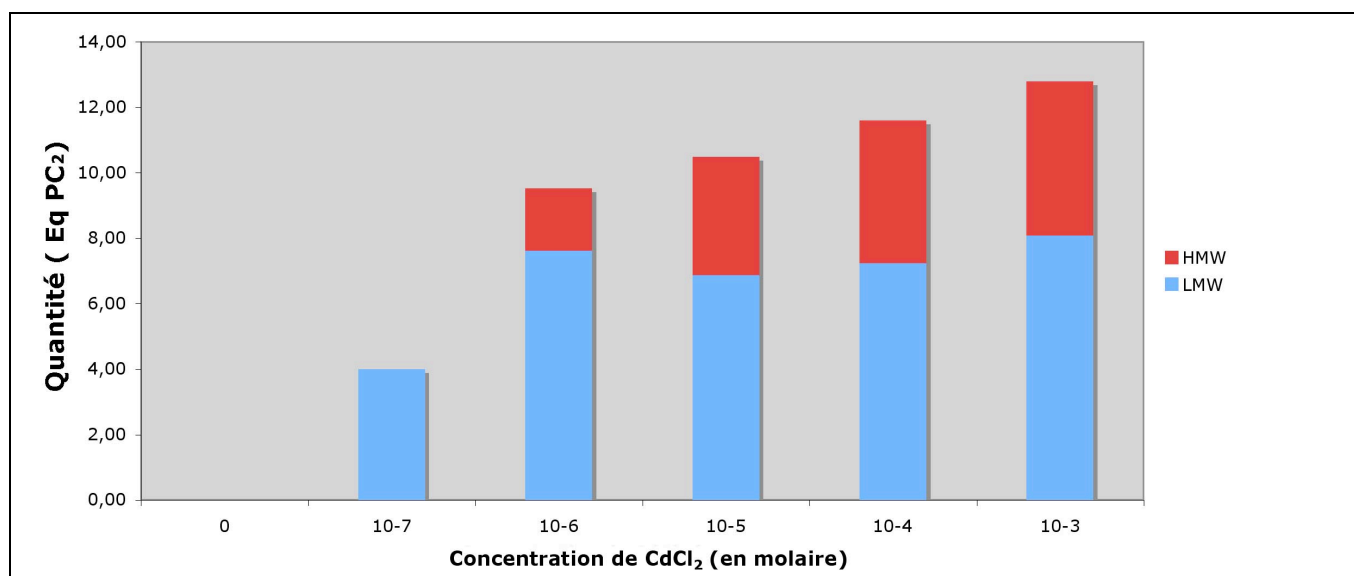


Figure 41 : Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 1 en fonction de la concentration en chlorure de cadmium (organismes de 18 jours, n=3).

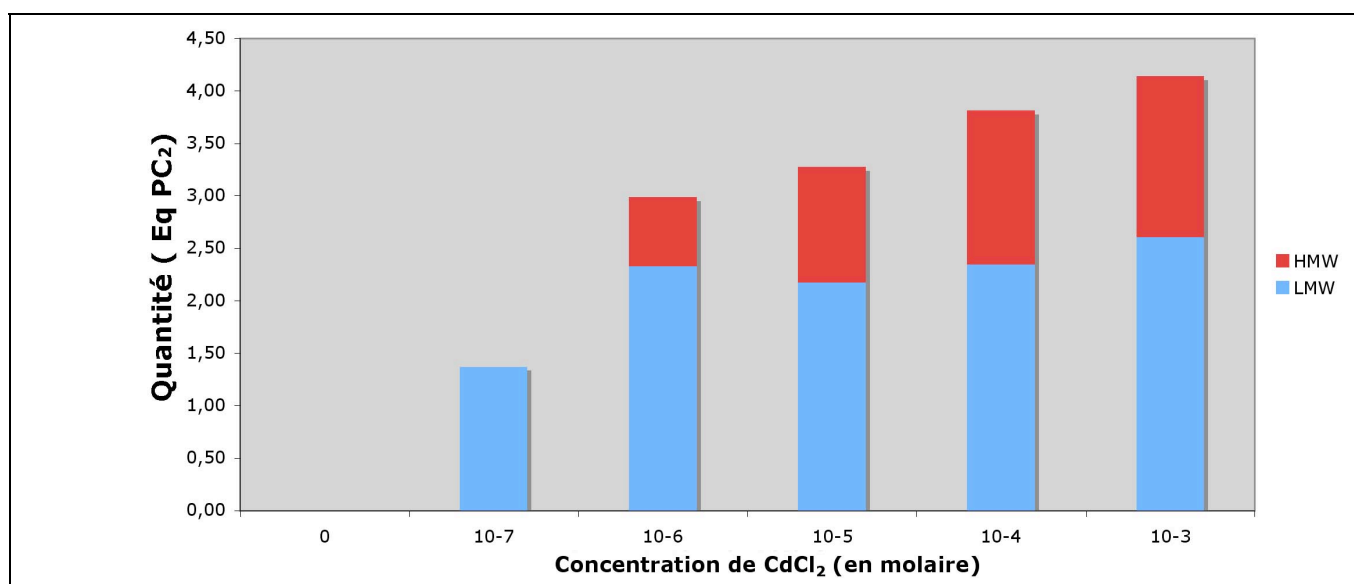


Figure 42 : Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 2 en fonction de la concentration en chlorure de cadmium (organismes de 18 jours, n=3).

Au niveau foliaire, les PC sont induites selon la même distribution quel que soit le rang foliaire : 1^{er}, 2^{ème} et apex (respectivement figures 41, 42 et 43). En revanche, il est intéressant de noter que les quantités de PC sont plus importantes dans le 1^{er} rang foliaire (environ 3 fois plus de PC dans les feuilles de rang 1 que dans les feuilles de rang 2 et de l'apex).

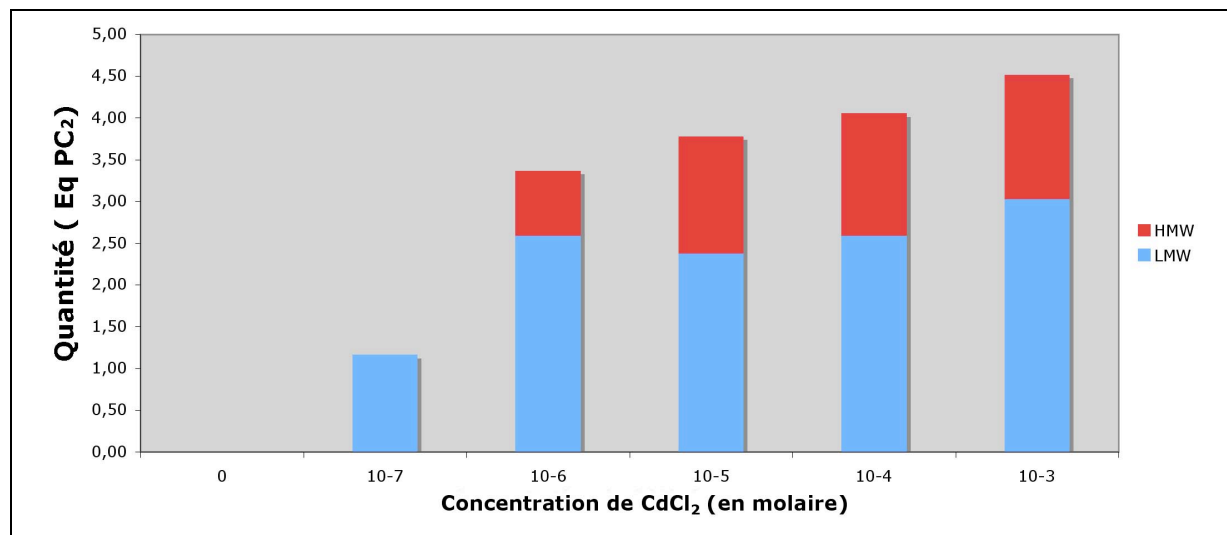


Figure 43: Proportion de PC LMW/HMW dans l'apex en fonction de la concentration en CdCl₂

Le détail de la répartition des PC dans les racines et les différents rangs foliaires de cette expérimentation se trouve en annexe E.

1.1.2.5 - Effet du CdCl₂ pendant la germination

Cette expérimentation a été entreprise pour savoir si le cadmium pouvait jouer un rôle sur l'induction des phytochélatines pendant la germination. Et si oui, s'il joue le même rôle à toutes les étapes expérimentales de la germination. La germination comporte deux phases (l'imbibition et la pousse de la racine primaire dans le coton). Quatre lots de fèves ont été constitués, chacun étant soumis à un traitement différent. Le traitement au cadmium s'est fait à la concentration de 10⁻⁵ M et noté Cd, le traitement normal à l'eau distillée est noté N.

La quantité de GSH est plus importante dans les cotylédons que dans les racines. Lorsqu'un lot de fèves est soumis à un traitement cadmié, on observe une diminution significative de la quantité de GSH dans les cotylédons, jusqu'à environ 0,85 µM / g de poids frais (figure 44), alors qu'il ne semble y avoir aucun effet sur la quantité de GSH racinaire. De plus, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les diminutions de la quantité de GSH dans les cotylédons en fonction des traitements imposés.

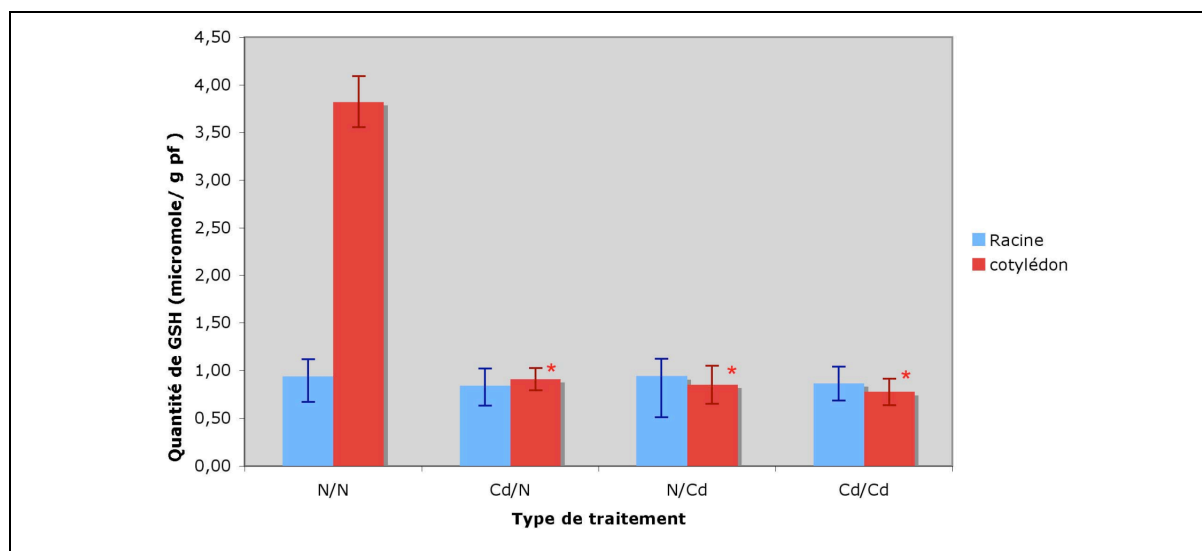


Figure 44 : Quantité de GSH chez les individus en fonction de l'environnement de germination.

* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

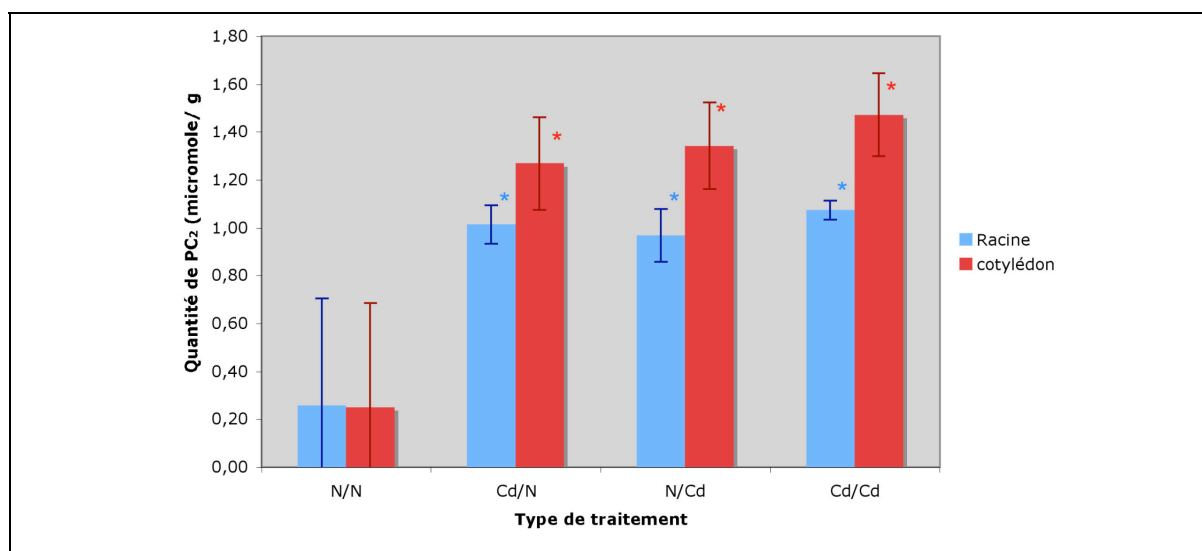


Figure 45 : Quantité de PC₂ chez les individus en fonction de l'environnement de germination.

* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

Une augmentation significative de la quantité de PC₂ jusqu'à 1,34 μM / g de poids frais (figure 45) est mise en évidence, aussi bien dans les racines que dans les cotylédons. Il n'y a pas de différence significative de l'induction de PC₂ en fonction du traitement au cadmium.

1.1.2.6 - Cinétique d'induction des PC

Ces essais ont été menés à la fois sur des organismes de 9 jours et de 18 jours. La concentration en CdCl_2 choisie est de 10^{-5} M.

1.1.2.6.1 - Cinétique des PC sur 10 jours

- Organismes âgés de 9 jours :

Le dosage des PC_2 a été réalisé pendant 10 jours (un témoin a été effectué tous les jours afin de confirmer l'absence de PC_2 durant cette période) :

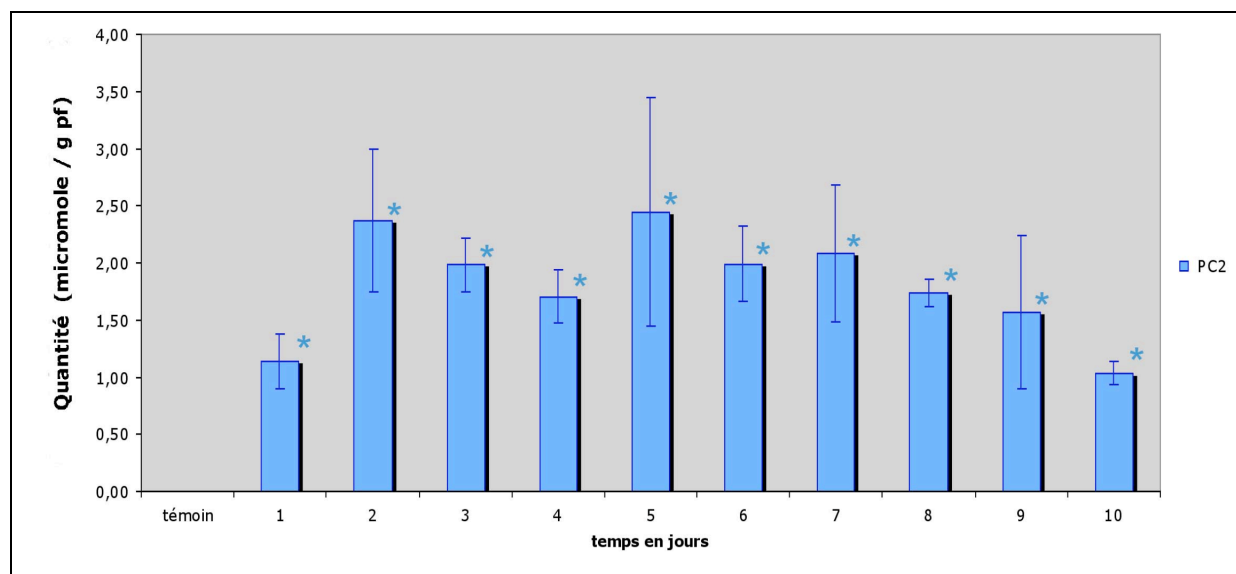


Figure 46 : PC_2 induites à 10^{-5} M dans les racines de *Vicia faba* en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

Chez les organismes exposés, seules les PC_2 sont présentes dans les parties racinaires (figure 46). La significativité statistique des résultats montre une augmentation de la quantité de PC_2 les premières 48 heures. Puis malgré une exposition constante au cadmium (et le renouvellement du milieu toutes les 48h), la quantité de PC_2 reste assez stable avec une tendance à diminuer lors des derniers jours d'exposition. Les résultats des parties foliaires sont inexploitable du fait de leurs écarts-types trop importants.

• Organismes âgés de 18 jours

La même expérience a été réalisée avec des plantules de 18 jours. Celle-ci a été menée de la même façon et en même temps que l'expérience précédente (figures 47 à 50).

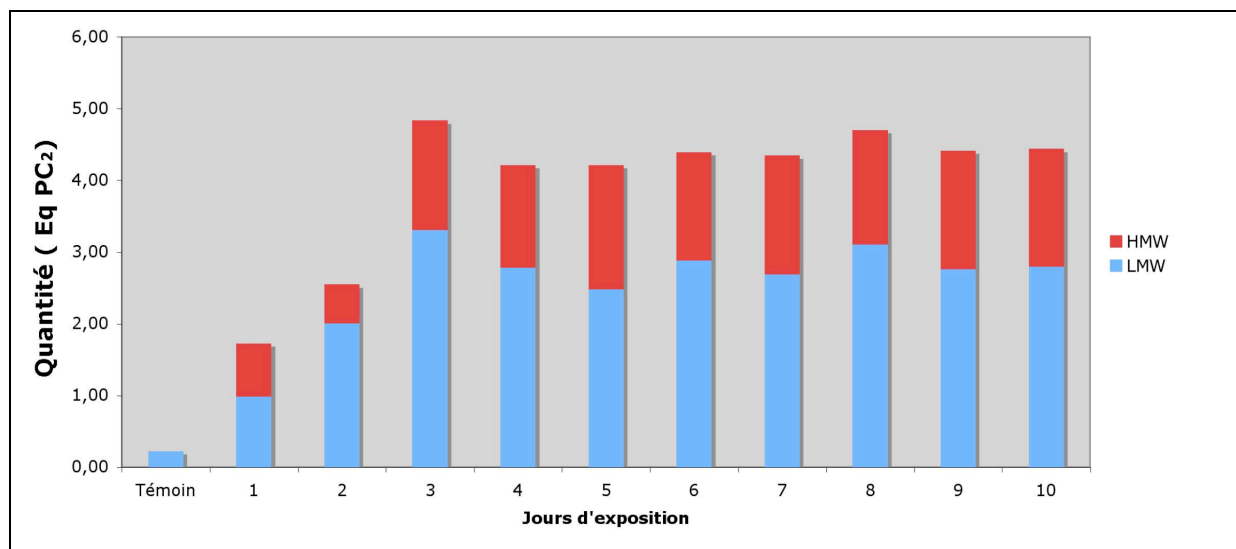


Figure 47 : Proportion PC LMW/HMW dans les racines en fonction du temps d'exposition à un solution de 10^{-5} M de chlorure de cadmium (n=3).

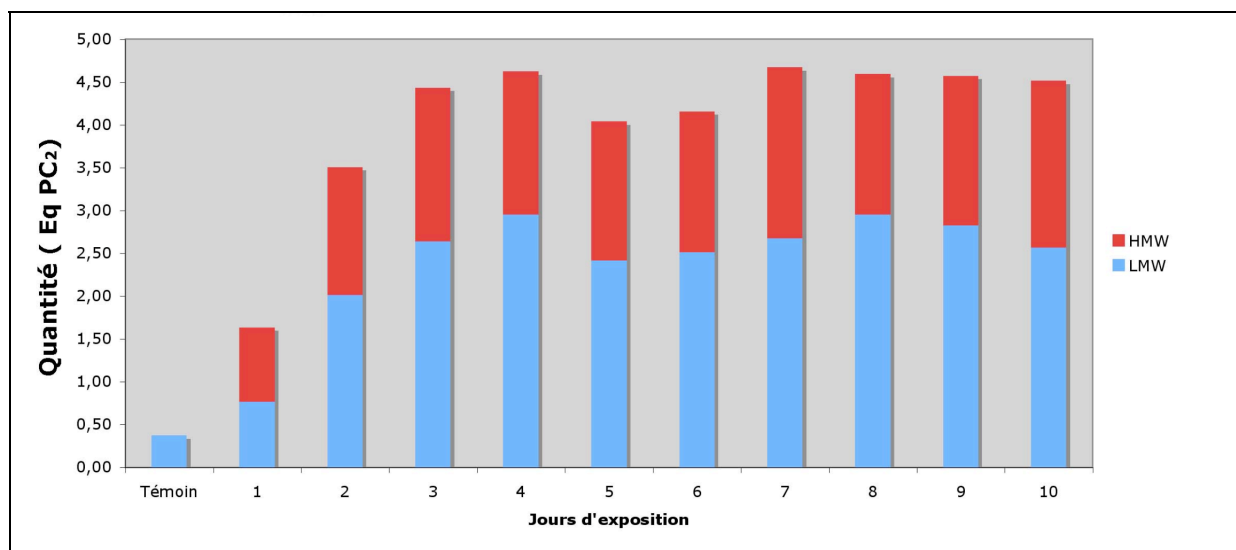


Figure 48 : Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps d'exposition à un solution de 10^{-5} M de chlorure de cadmium (n=3)

Les rapports LMW/HMW varient différemment dans l'ensemble des compartiments. Dans les racines (figure 47), il y a une très forte augmentation des quantités de LMW et HMW les trois premiers jours d'exposition. Les jours suivants, les rapports LMW/HMW sont assez stables ainsi que la quantité globale de phytochélatines. La tendance est identique au sein des feuilles de rang 1 (figure 48). Dans les feuilles de rang 2 (figure 49),

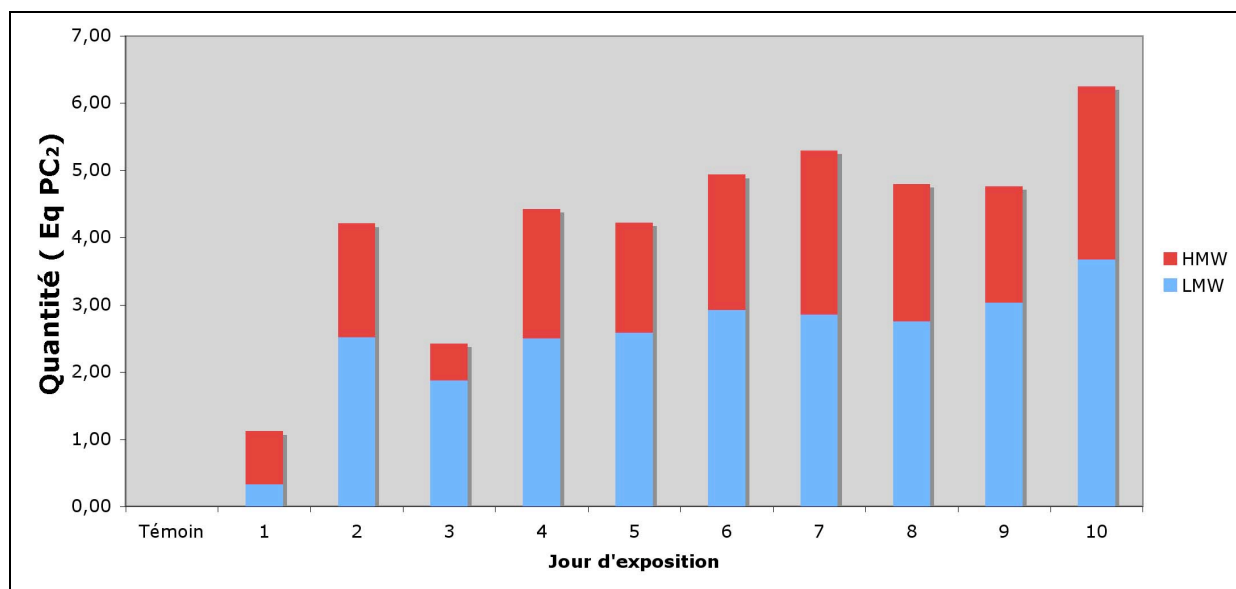


Figure 49 : Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps d'exposition à un solution de 10^{-5} M de chlorure de cadmium (n=3).

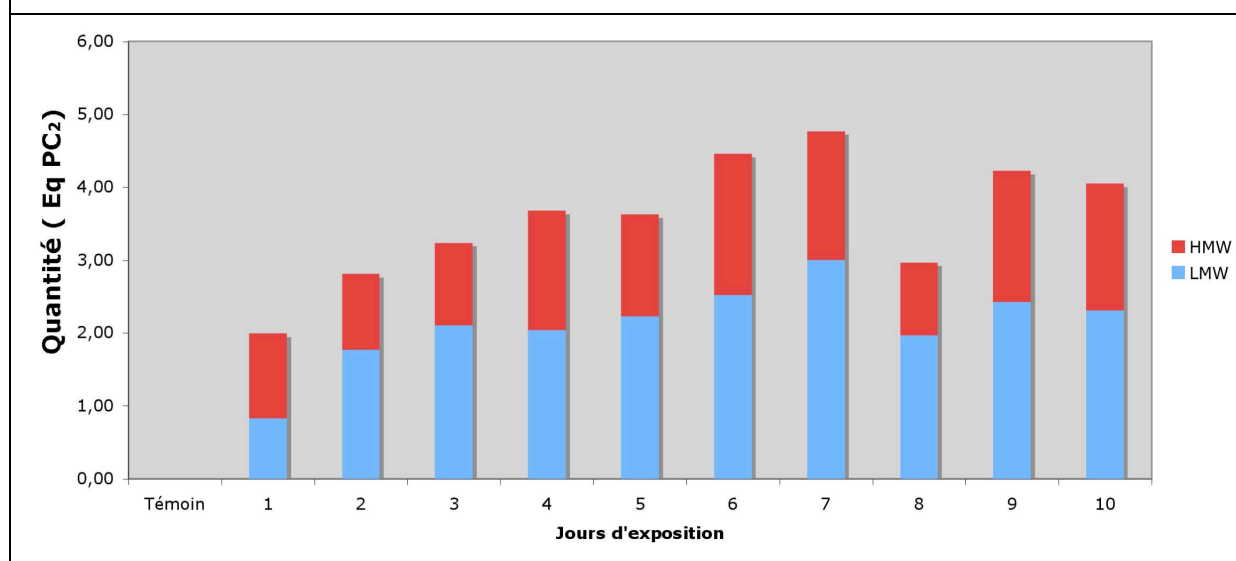


Figure 50 : Proportion PC LMW/HMW dans l'apex en fonction du temps d'exposition à un solution de 10^{-5} M de chlorure de cadmium (n=3).

la tendance est à l'augmentation tout au long de la durée de l'exposition. En revanche, le dernier jour, la quantité totale des PC est nettement plus importante que les autres jours et atteint une valeur supérieure à 6 Eq PC₂. Au niveau de l'apex (figure 50) il y a une augmentation des quantités totales de PC jusqu'au septième jour, puis une légère diminution les jours suivants.

Le détail de la répartition des différentes PC au cours de la cinétique d'induction se trouve en annexe F.

1.1.2.6.2 - Comportement des PC après une exposition de 48 heures au cadmium

Pour ce test, des organismes âgés de 18 jours sont exposés à 10⁻⁵ M de CdCl₂ pendant les premières 48 heures, puis replacés en milieu non contaminé. Le suivi des PC a été réalisé sur 10 jours comme précédemment. Les prélèvements ont été effectués toutes les 24 heures.

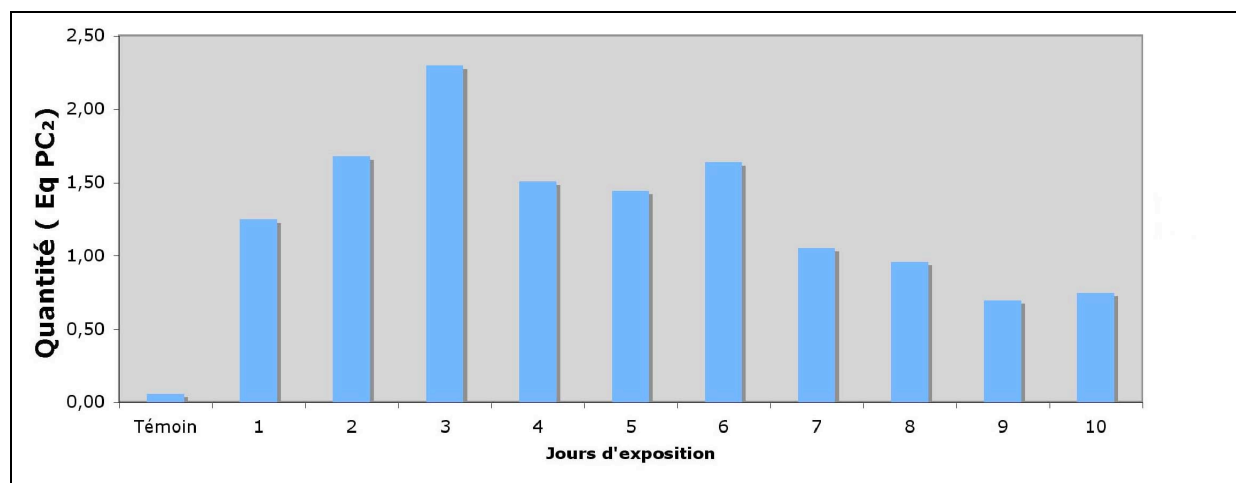


Figure 51 : PC₂ dans les racines en fonction du temps

Les figures 51 à 54 montrent une augmentation de la quantité des LMW durant les trois premiers jours et une tendance à la diminution de ces quantités jusqu'à la fin de l'expérience, que ce soit dans les racines, ou dans les différents rangs foliaires. Dans l'apex (figure 54), il y a plus de LMW que dans les autres compartiments les trois premiers jours. Puis la même tendance à la diminution est observée les jours suivants, avec une forte diminution les deux derniers jours.

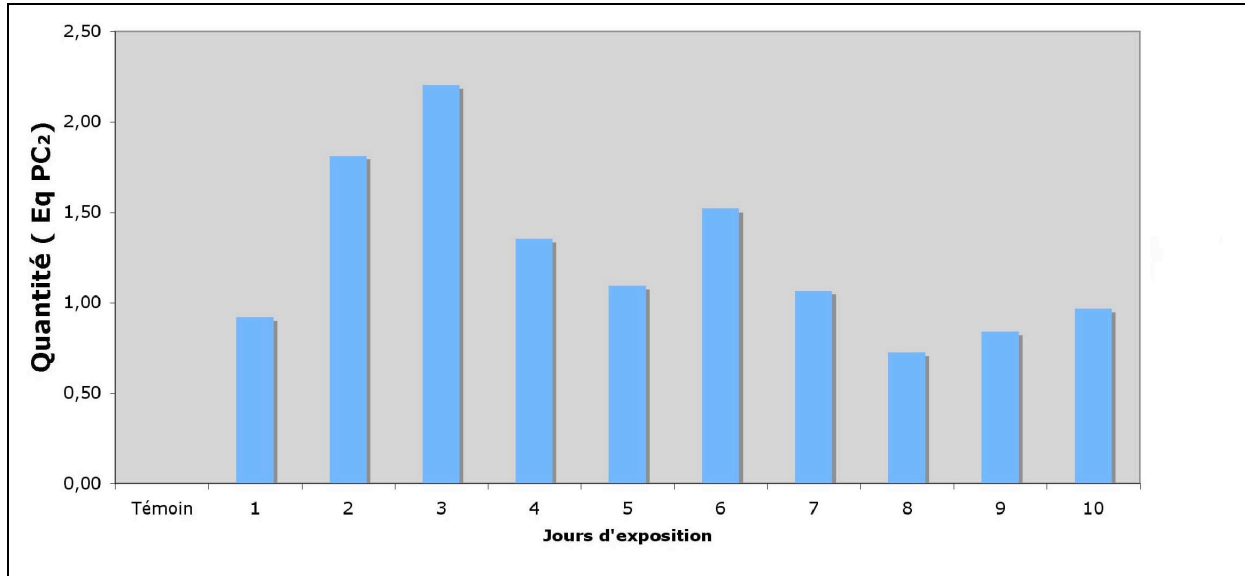


Figure 52 : PC₂ LMW/HMW dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps

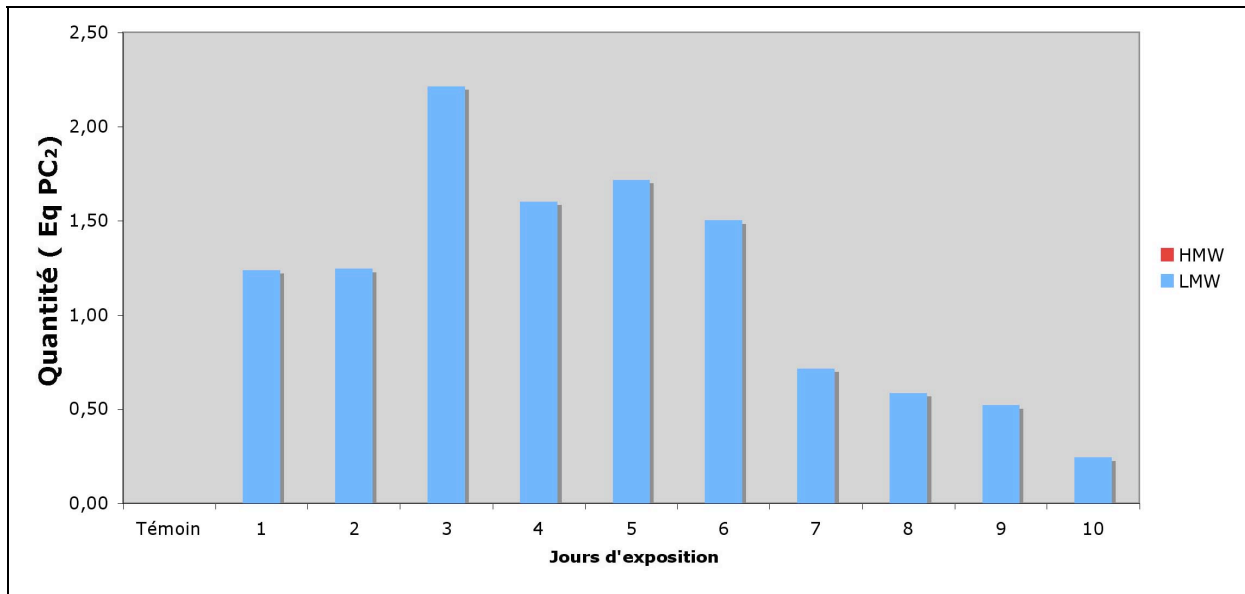


Figure 53 : PC₂ LMW/HMW dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps (n=3)

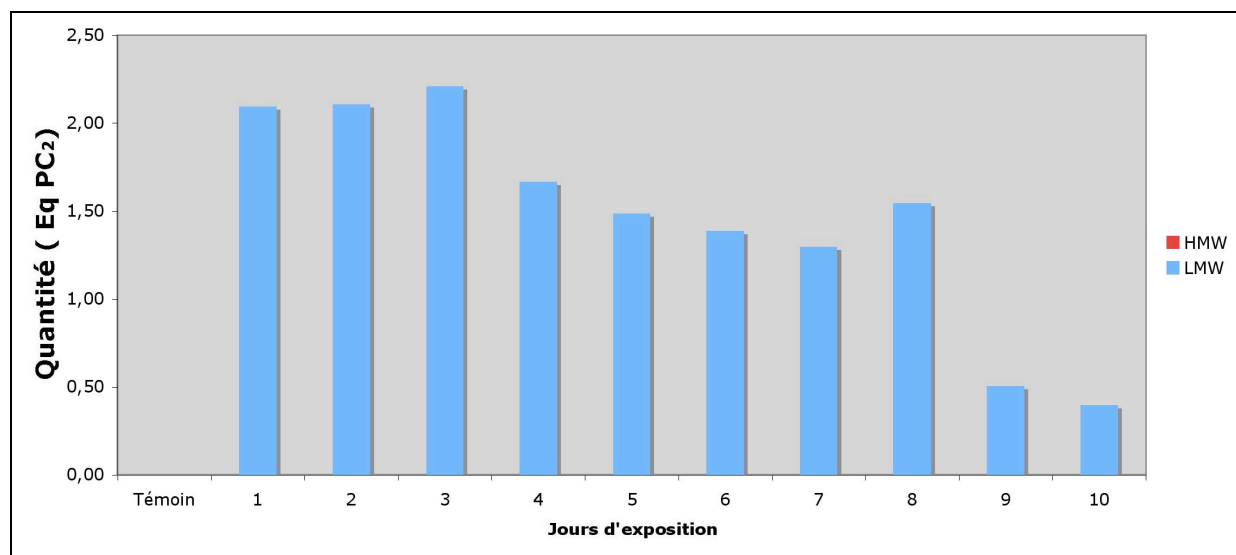


Figure 54 : Proportion PC LMW/HMW dans l'apex en fonction du temps (n=3)

Le détail de la répartition des différentes PC au cours de la cinétique d'induction se trouve en annexe G.

L'augmentation des valeurs de PC₂ est, d'un point de vue statistique, significativement différente du témoin les trois premiers jours d'exposition. La diminution significative de ces valeurs coïncide avec l'apparition des PC₃.

Notons la présence de PC HMW lorsque les plantules sont exposées pendant les 10 jours (chapitre précédent), alors que nous n'en avons pas détectées lors de cette expérience renouvelée avec une exposition de 48h. Afin de comprendre les mécanismes d'action du cadmium pendant ces premières 48h, de nouvelles expérimentations ont été menées.

1.1.2.6.3 - Rapidité de l'induction des PC

Deux expérimentations ont été réalisées conjointement, sur deux lots de plantules âgées de 18 jours, exposés respectivement à 10^{-5} et 10^{-3} M de CdCl₂. Des prélèvements ont été faits après 1, 3, 6, 12, 24 et 48 heures d'exposition

- Exposition à 10^{-5} M de CdCl₂

Dans les quatre compartiments distincts de la plante (figures 55 à 58), les PC LMW sont présentes dès la première heure d'exposition. La quantité de LMW est assez stable dans les compartiments pendant les 6 premières heures, puis elle augmente entre 12 et 24 heures

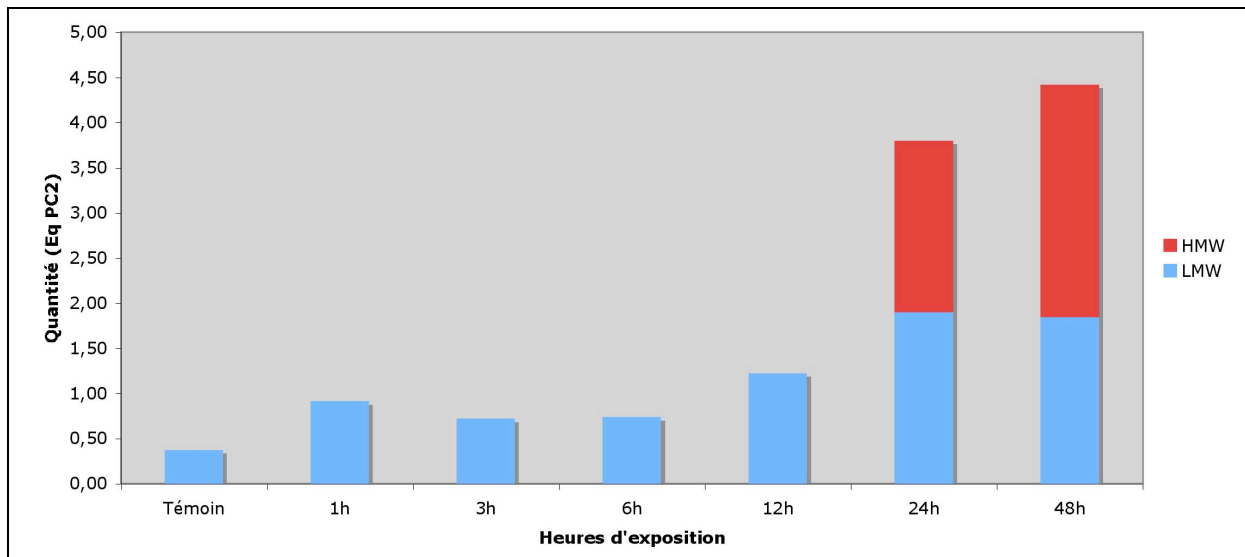


Figure 56 : Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps (n=3), exposition à 10^{-5} M de CdCl_2 .

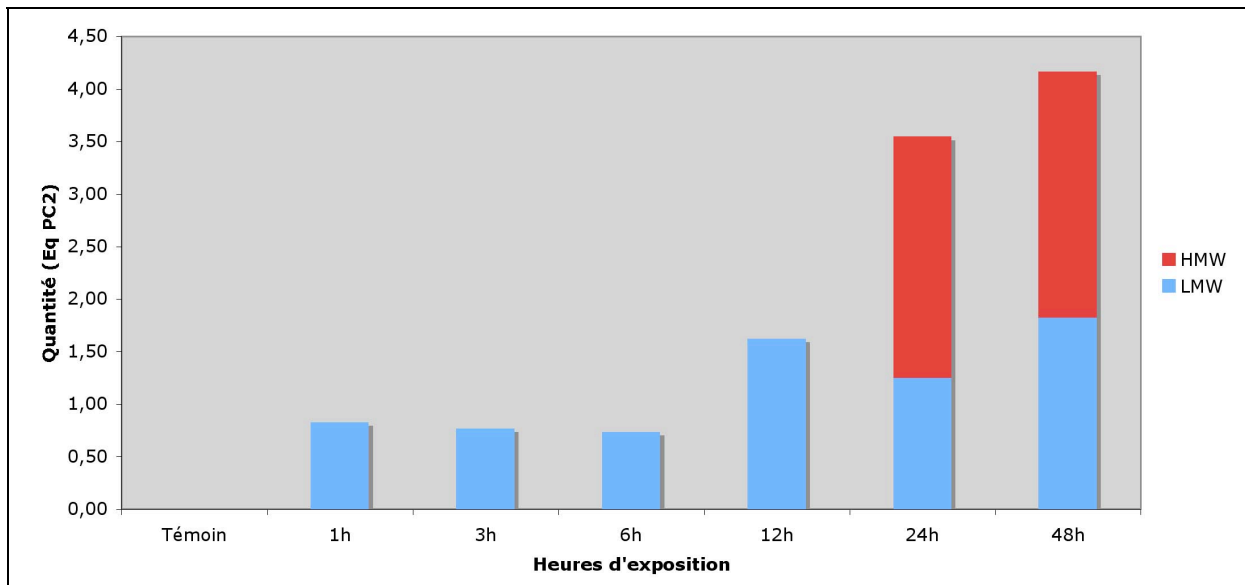


Figure 57 : Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps (n=3), exposition à 10^{-5} M de CdCl_2 .

de traitement. Les HMW au contraire, n'apparaissent que plus tardivement, à partir de 24 heures. Les quantités de HMW sont plus importantes dans les parties aériennes (figures 56 à 58), atteignant des valeurs proches de 4 μ moles / g p.f. que dans les parties souterraines (figure 55). Une diminution des HMW est notée uniquement dans les racines au cours des dernières 24 heures.

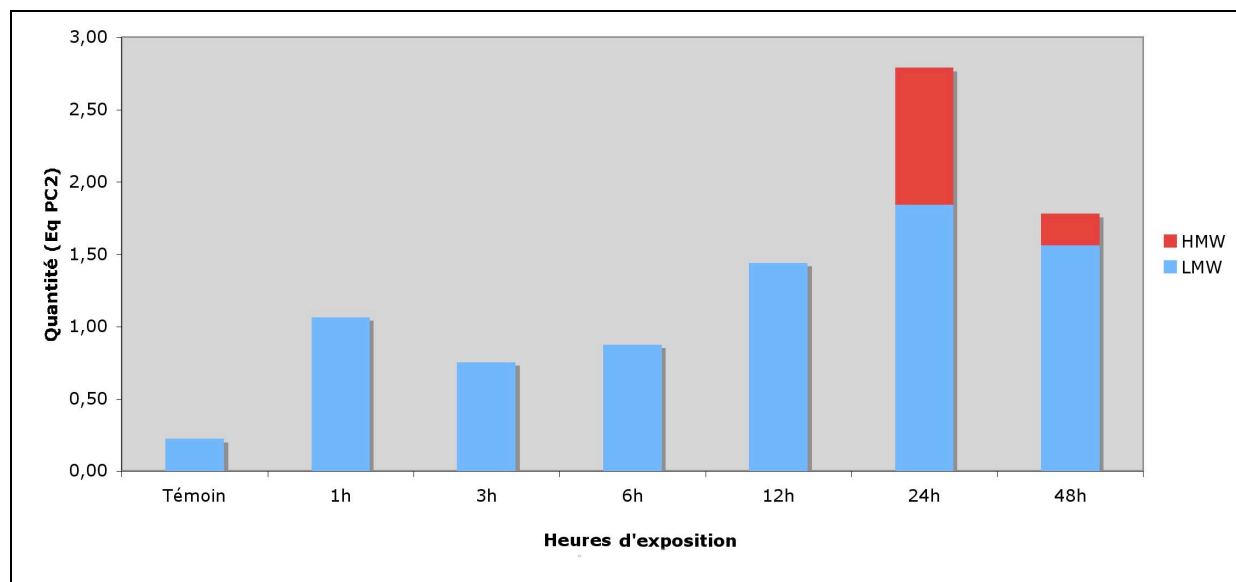


Figure 55 : Proportion de PC LMW/HMW dans les racines en fonction du temps (n=3).

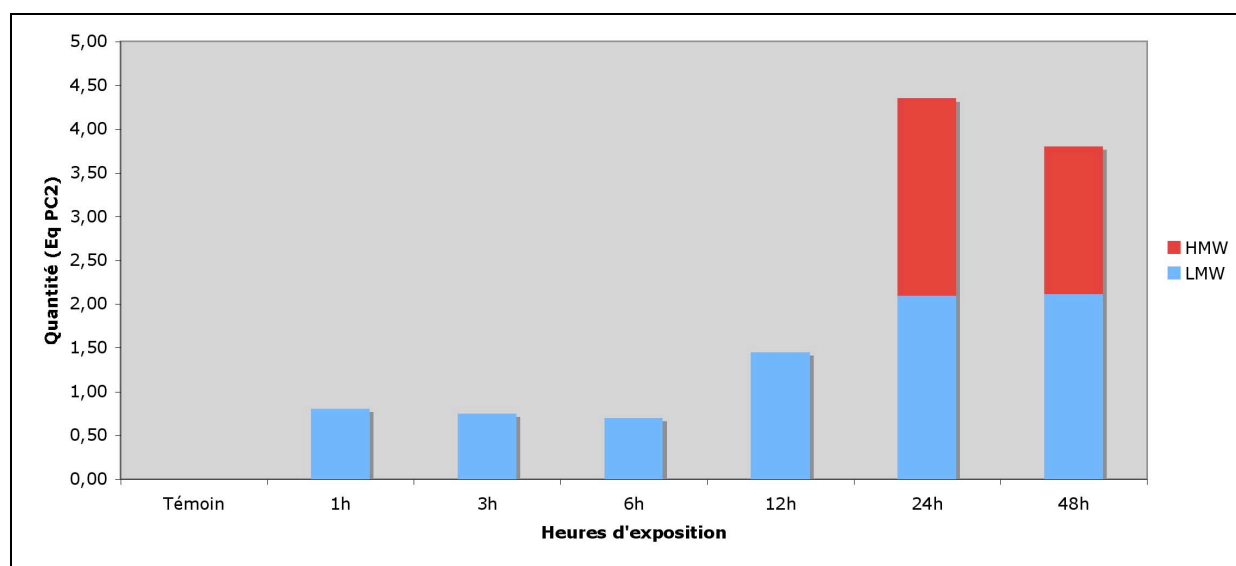


Figure 58 : Proportion de PC LMW/HMW dans l'apex en fonction du temps (n=3).

Le détail de la répartition des différentes PC au cours de la cinétique d'induction se trouve en annexe H. Les premières phytochélatines, présentes dès la première heure

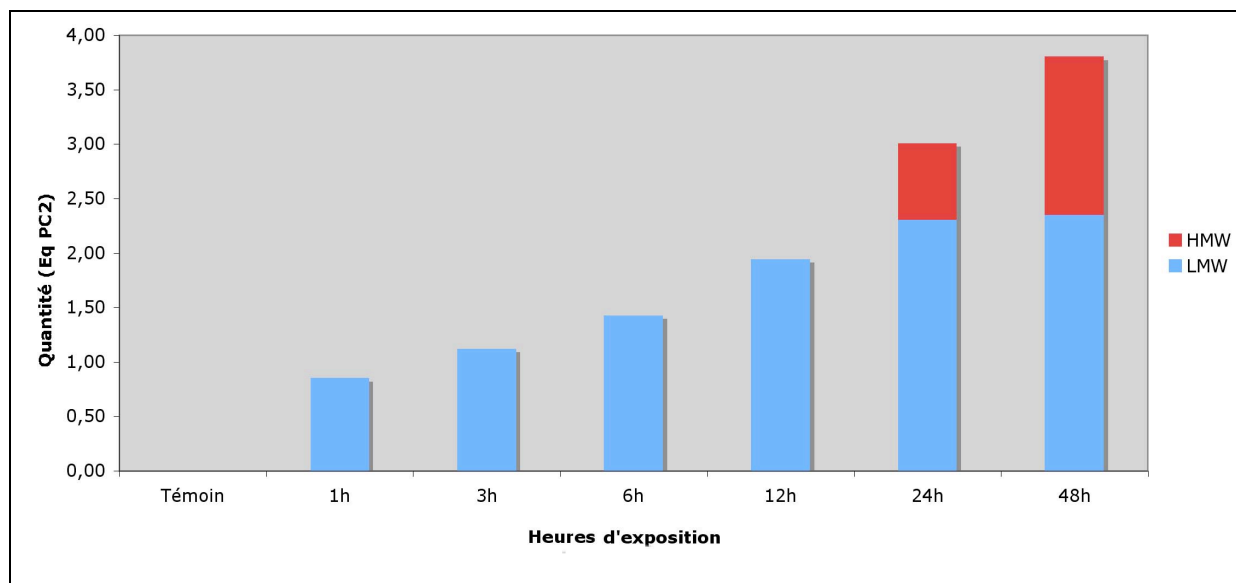


Figure 59 : Proportion PC LMW/HMW dans les racines en fonction du temps (n=3), exposition à 10^{-5} M de CdCl_2 .

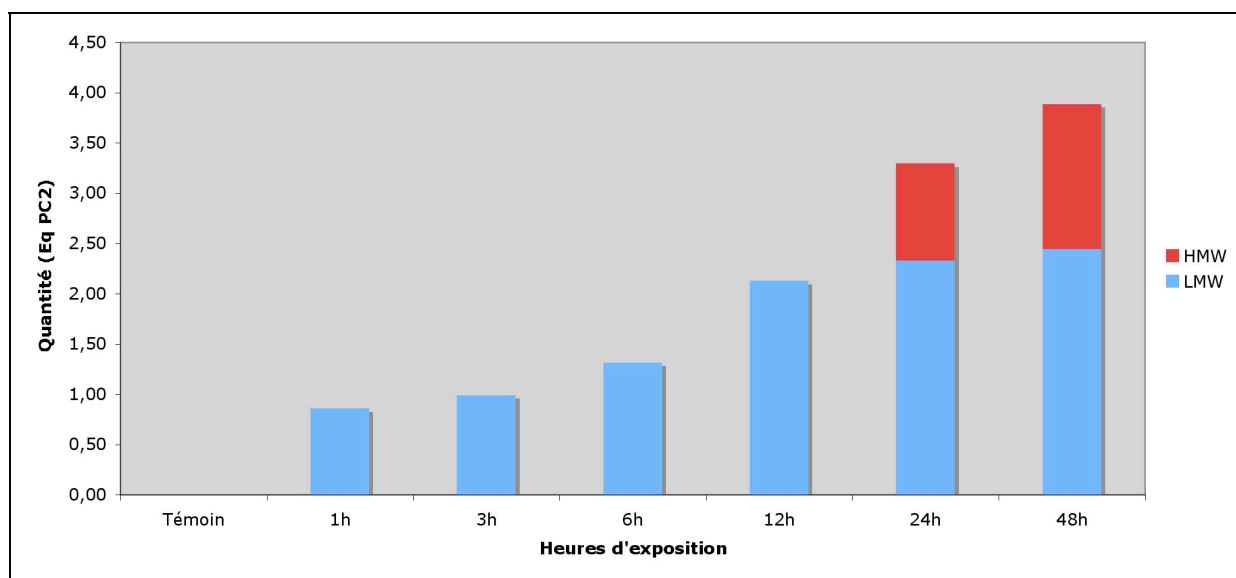


Figure 60 : Proportion PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps (n=3), exposition à 10^{-5} M de CdCl_2 .

d'exposition, de manière statistiquement significative, sont les PC₂. C'est le cas dans l'ensemble des compartiments (annexes H1 à H2). Puis à 12 heures PC₃ apparaît dans tous les compartiments de manière statistiquement significative. Dans les racines (annexe H1), les PC₄ et PC₆ apparaissent de manière statistiquement significative, alors que PC₅ ne l'est pas. Au niveau foliaire, toutes les PC ne sont présentes que dans les feuilles de rang 2 à 48 heures d'exposition. Jusqu'à 48h d'exposition, quel que soit le compartiment, la présence de PC n'est pas toujours statistiquement significativement différente du témoin, ce qui met en évidence une variabilité individuelle de ce mécanisme d'action dont il faut tenir compte.

- Exposition à 10⁻³ M de CdCl₂

Dans les différents compartiments de la plante (figures 59 à 62), les LMW sont présentes dès la première heure d'exposition, à l'exception de l'apex, où les LMW n'apparaissent qu'à la troisième heure. Pendant les 24 premières heures d'exposition, la quantité de LMW augmente dans les quatre compartiments, puis elle reste assez stable entre 24 et 48 heures de traitement. Les HMW au contraire, n'apparaissent que plus tardivement (à partir de 24 heures), à tous les niveaux de la plante. Les quantités de HMW sont plus importantes à 48 heures d'exposition, atteignant des valeurs proches de 4 µmoles / g p.f. Cependant, cette quantité reste légèrement plus faible dans les parties souterraines (comme démontré précédemment avec une concentration plus faible de cadmium).

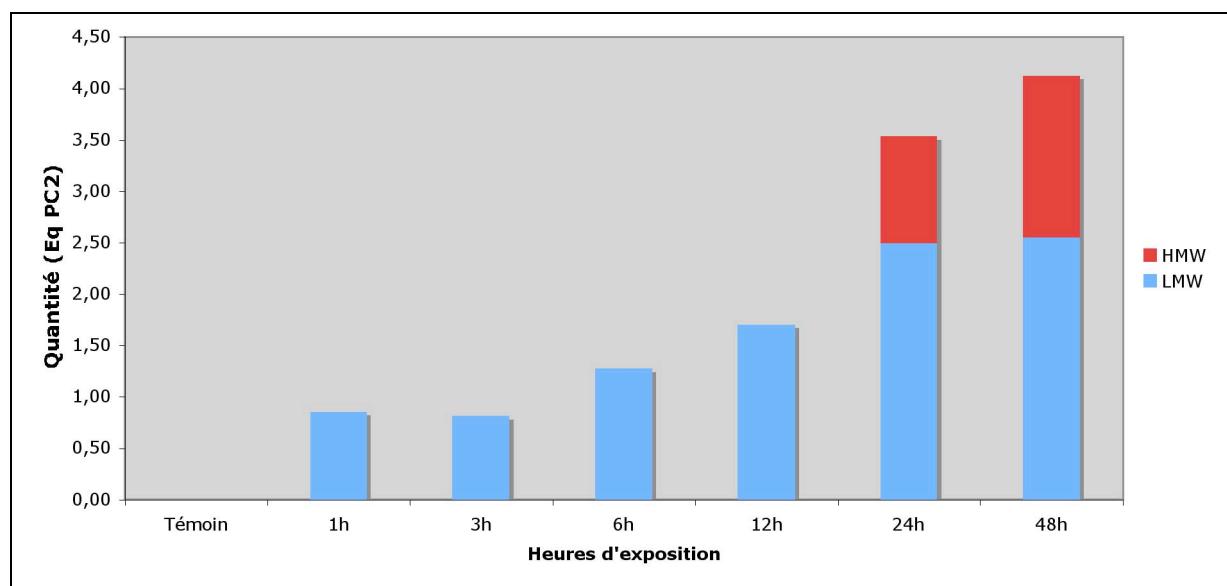


Figure 61 : Proportion de PC LMW/HMW dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps (n=3).

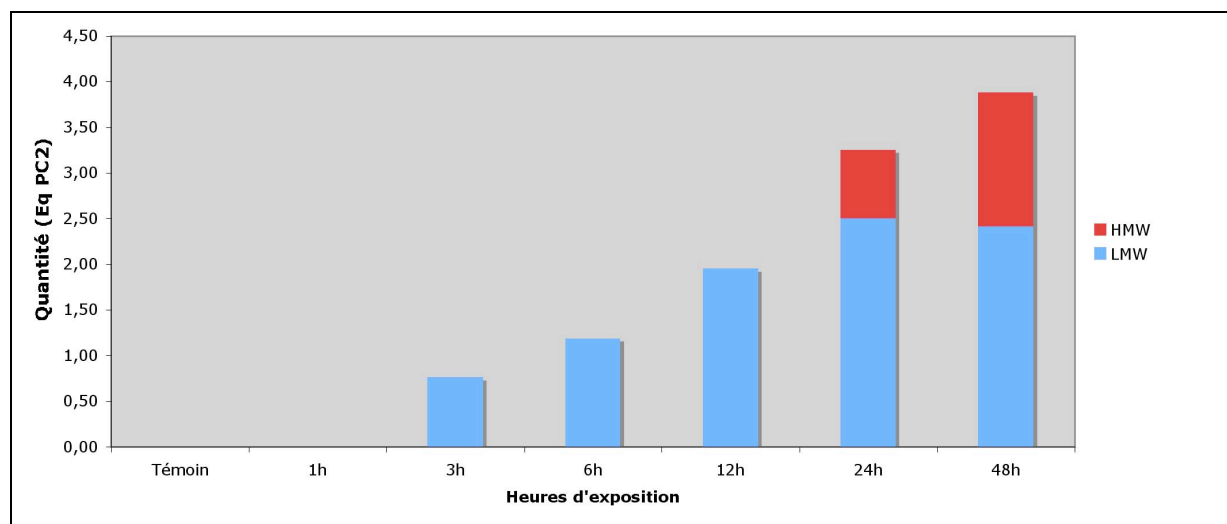


Figure 62 : Proportion de PC LMW/HMW dans l'apex en fonction du temps (n=3).

Le détail de la répartition des différentes PC au cours de la cinétique d'induction se trouve en annexe I. Dès la première heure d'exposition, les PC₂ sont présentes de manière statistiquement significative dans l'ensemble des compartiments (annexes I 1 à 3) sauf dans l'apex (annexe I 4), où elles le seront plus tardivement (pour trois heures d'exposition). L'apparition de PC₃ est plus précoce dans les racines (annexe I 1) et les feuilles de rang 1 (annexe I 2), bien qu'elle ne soit pas significative. En revanche pour le temps d'exposition de six heures, cette présence est significative dans tous les compartiments (annexes I 1 à 4). La présence de PC devient significative après douze heures d'exposition (annexes I 1, 2 et 4), sauf pour les feuilles de rang 2 où elle le sera pour un temps d'exposition plus long (24 heures ; annexe I 3). A 24 heures d'exposition tous les compartiments possèdent des PC 2 à 6. Au bout de 48 heures d'exposition, la synthèse des PC (2 à 6) est statistiquement significative dans tous les compartiments considérés. A la fin de l'expérience, quasiment la même quantité de PC est présente à tous les niveaux (environ 0,70 $\mu\text{M}/\text{g p.f.}$), sauf pour PC₂ qui est présente en plus grande quantité dans les parties foliaires (environ 0,95 $\mu\text{M}/\text{g p.f.}$; annexes I 1 à I 4).

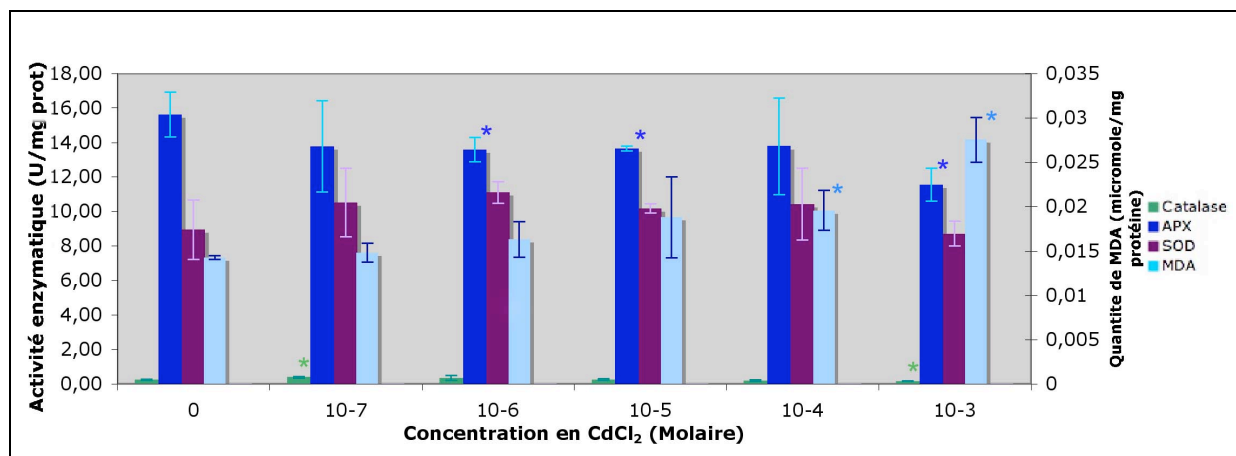


Figure 63 : Effet de la concentration en CdCl₂ sur quatre biomarqueurs mesurés sur les racines (Organismes de 9 jours ; U : 1 μmole min⁻¹)

* : valeur statistiquement différente du témoin, (p < 0,05 ; n = 3).

Plus le cadmium est présent en grande quantité, plus les phytochélatines seront induites en grande quantité et plus leur degré de polymérisation sera élevé : que ce soit dans les racines ou dans les feuilles des plantules exposées pendant 48h, nous observons l'apparition des PC₂, PC₃ et PC₄ (LMW) dès 10⁻⁷ M puis des PC₅ et PC₆ (HMW) entre 10⁻⁵ M et 10⁻⁴ M de CdCl₂, accompagnée de la diminution de la quantité de GSH. Avec l'augmentation de la concentration en cadmium, la quantité de LMW a tendance à chuter au profit des HMW. Lorsque les organismes sont plus âgés (18 jours), il faut des concentrations de cadmium plus élevées pour induire les phytochélatines dans les racines (à l'exception des PC₂ qui sont toujours induites à partir de 10⁻⁷ M). Cependant, lorsque les PC sont induites, elles le sont à des concentrations plus élevées que chez les organismes plus jeunes (9 jours). En revanche, l'âge des organismes ne semble pas modifier l'induction des PC dans les feuilles (qui sont d'ailleurs en quantités 3 fois plus importantes dans les feuilles de rang 1 que dans les feuilles de rang 2 et de l'apex). Notons que chez les organismes « âgés », l'induction des PC présente moins de variabilité individuelle que chez les organismes plus jeunes. Lors de l'exposition de plantules à 10⁻⁵ M de CdCl₂ pendant 48h, les PC LMW (notamment les PC₂) sont induites progressivement dès la première heure jusqu'au 3^{ème} jour puis leur quantité diminue les jours suivants, et ceci aussi bien dans les parties aériennes que souterraines. L'induction de PC de degré plus élevé semble plus tardive dans les racines (24 h) et dans les feuilles de rang 2 (48 h).

1.1.3 - Etude des enzymes du stress oxydant

Conjointement à l'étude de l'induction des phytochélatines, des mesures de l'activité des enzymes du stress oxydant ont été effectuées sur les mêmes organismes lors des deux expositions précédemment décrites. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Marc Dazy (thèse en cours au LIEBE). Il s'agit de l'exposition de 48h des jeunes plantules à la gamme de concentrations en CdCl₂ allant de 10⁻⁷ à 10⁻³ M et de la cinétique d'exposition de plantules âgées de 18 jours à 10⁻⁵ M menée sur 48 heures avec des prélèvements après 1, 3, 6, 12, 24 et 48 h d'exposition.

1.1.3.1 - Effet de la concentration en cadmium

Au niveau racinaire (figure 63), la quantité de MDA (malondialdéhyde, indicateur de la peroxydation lipidique membranaire) augmente légèrement (0,01 à 0,03 µmole/mg de protéine, de 10⁻⁷ à 10⁻³ M) de façon significative dès 10⁻⁴ M. L'activité de l'APX (ascorbate peroxydase) diminue tout au long de l'exposition, passant de 15,62 à 11,53 U/mg de protéine pour la gamme de concentrations utilisées avec des valeurs significativement différentes, d'un point de vue statistique, du témoin à partir de 10⁻⁶ M. En ce qui concerne les activités de

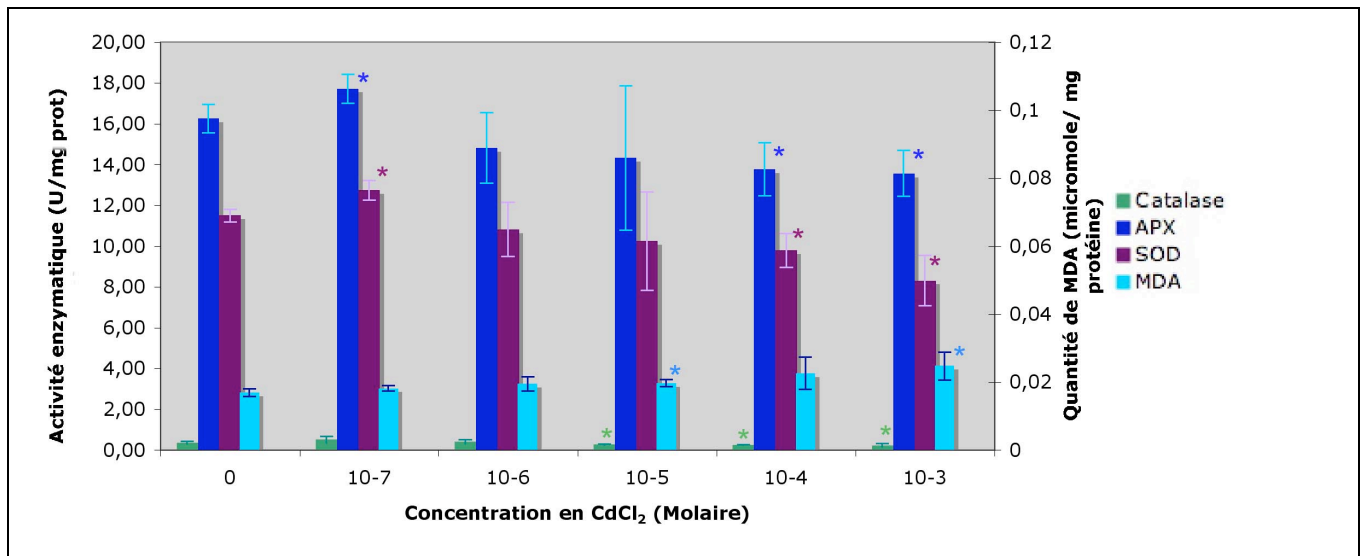


Figure 64 : Effet de la concentration en CdCl₂ sur l'activité enzymatique des enzymes du stress oxydant des feuilles (Organismes de 9 jours ; U : 1µmole min⁻¹)

* : valeur statistiquement différente du témoin, (p<0,05 ; n=3).

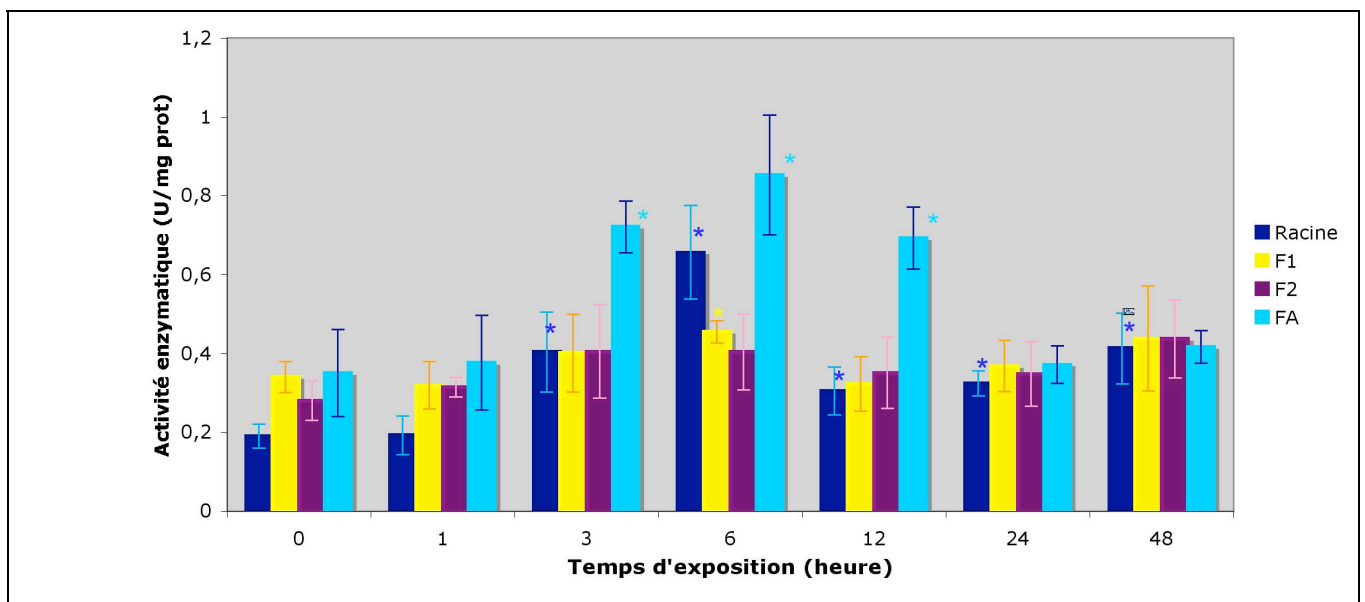


Figure 65 : Activité de la catalase en fonction du temps et du compartiment (Organisme de 18 jours ; U : 1µmole min⁻¹)

* : valeur statistiquement différente du témoin, (p<0,05 ; n=3).

la CAT (catalase) et de la SOD (superoxyde dismutase), peu ou pas d'effet significatif est noté dans la gamme de concentrations testées.

Au niveau foliaire (figure 64), l'APX et la SOD suivent le même type de schéma : une augmentation à 10^{-7} M (avec des valeurs respectives de 17,73 et 12,75 U/mg de protéine) puis une diminution (significative à partir de 10^{-4} M). L'activité de la catalase et la quantité de MDA varient peu mais de façon tout de même significative à partir de 10^{-5} M.

1.1.3.2 - Cinétique d'induction des enzymes du stress oxydant à 10^{-5} M de CdCl_2

Les organismes (âgés de 18 jours) ont été exposés au cadmium pendant 48h et les biomarqueurs du stress oxydant ont été mesurés pendant cette période. La catalase (figure 65) a une activité qui est globalement croissante, que ce soit dans les parties aériennes ou souterraines, jusqu'à un temps d'exposition de 6 heures. Puis son activité diminue jusqu'à 24 heures, ce qui pourrait être dû à une toxicité trop élevée. Entre 24 et 48 heures, l'activité augmente légèrement. Cela pourrait traduire une adaptation de l'enzyme à la toxicité ou une diminution de la toxicité, permettant une reprise de l'activité enzymatique.

Les activités globales de l'APX (figure 66) et de la SOD (figure 67) sont maximales dans les parties aériennes après 6 heures d'exposition, puis elles diminuent jusqu'à la fin de l'expérience. Le pic d'activité dans les racines est observé à 12h d'exposition.

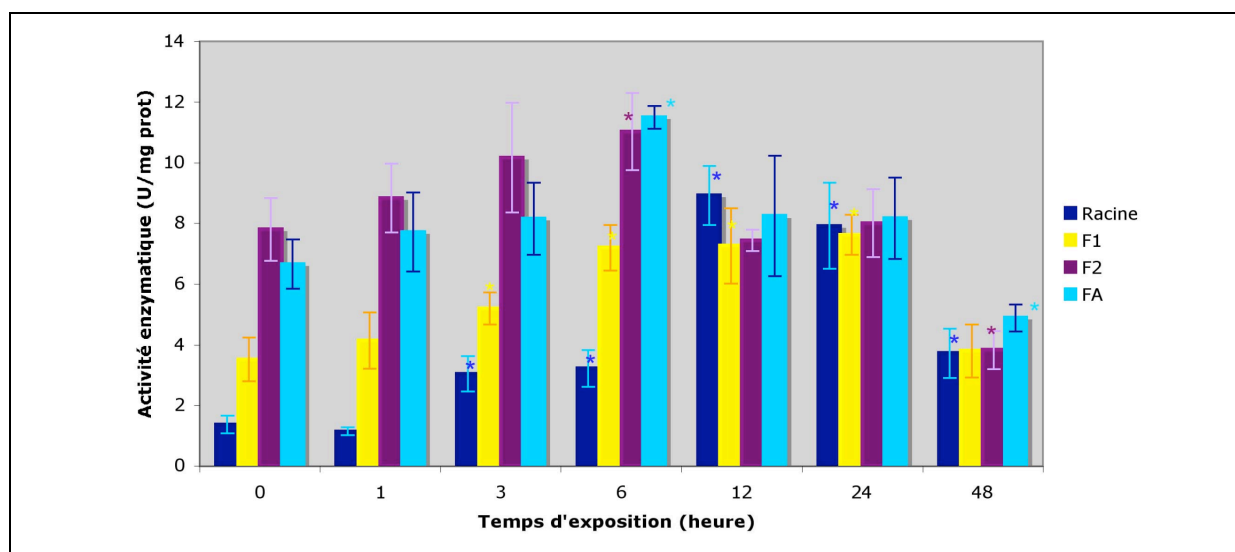


Figure 66 : Activité de l'APX en fonction du temps et du compartiment (Organismes de 18 jours ; U : $1\mu\text{mole min}^{-1}$)

* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

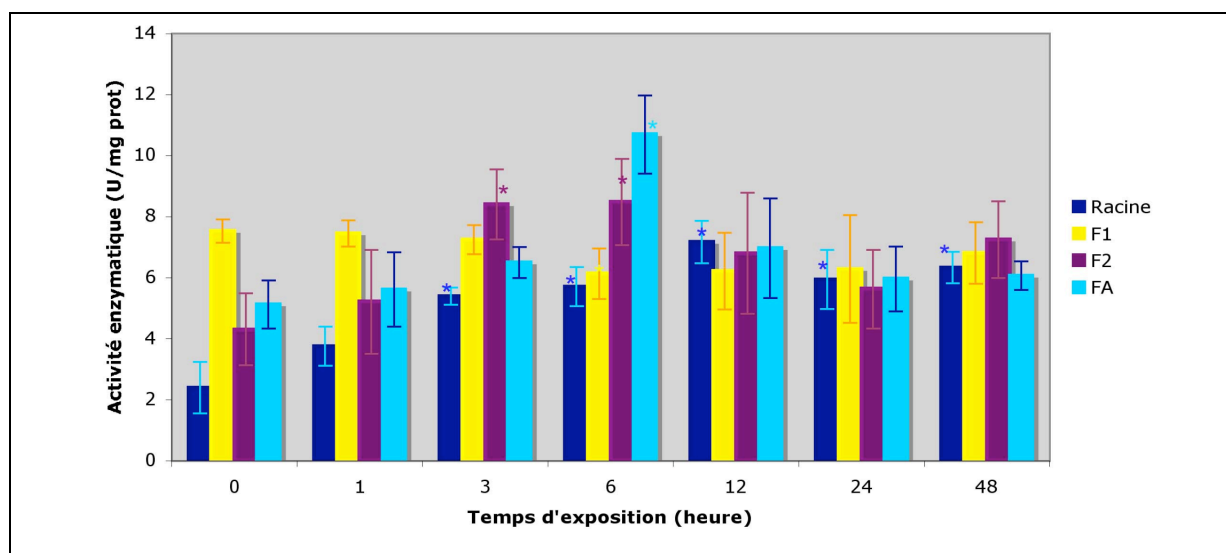


Figure 67 : Activité de la SOD en fonction du temps et du compartiment (U : 1 μ mole min⁻¹)

* : valeur statistiquement différente du témoin, (p<0,05 ; n=3).

La quantité de MDA (figure 68) présente un maximum dans les racines à 1 heure d'exposition, dans les feuilles de rang 1 à 3 heures, dans celles de rang 2 à 6 heures et au niveau de l'apex à 24 heures.

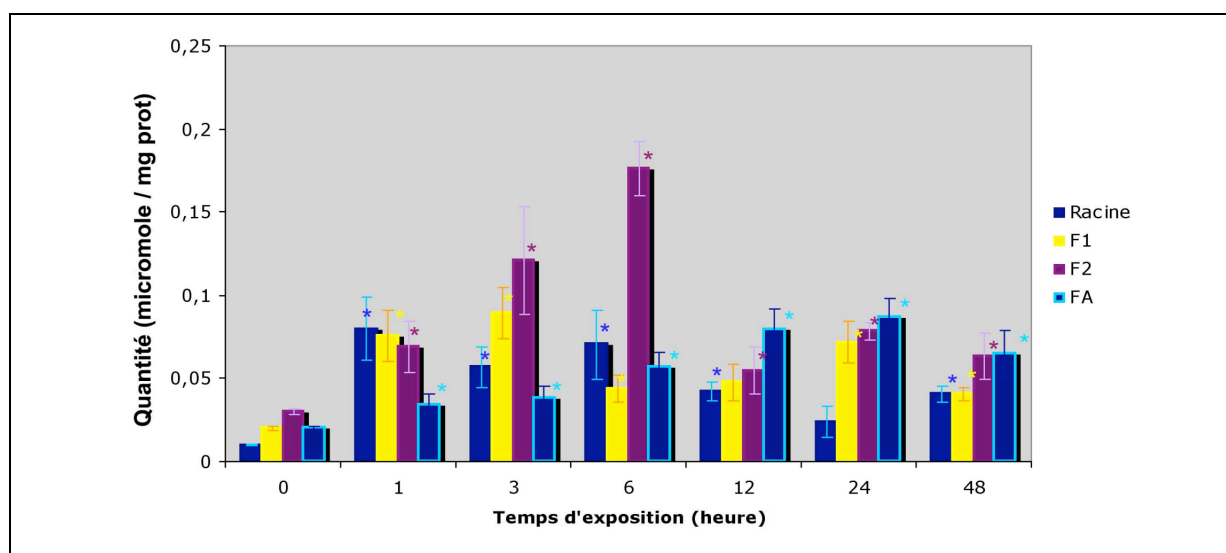


Figure 68 : Quantité de MDA produite en fonction du temps et du compartiment

* : valeur statistiquement différente du témoin, (p<0,05 ; n=3).

Au niveau racinaire, la quantité de MDA (malondialdéhyde, indicateur de la peroxydation lipidique membranaire) augmente dès 10^{-4} M de CdCl_2 . L'activité de l'APX (ascorbate peroxydase) diminue à partir de 10^{-6} M. En ce qui concerne les activités de la CAT (catalase) et de la SOD (superoxyde dismutase), peu ou pas d'effet significatif est noté dans la gamme de concentrations testées. Au niveau foliaire, l'APX et la SOD sont induites à partir de 10^{-7} M puis diminuent à partir de 10^{-4} M. L'activité de la catalase et la quantité de MDA varient peu mais de façon tout de même significative à partir de 10^{-5} M. Lors de l'exposition de plantules à 10^{-5} M de CdCl_2 pendant 48h, la catalase a une activité globale croissante, que ce soit dans les parties aériennes ou souterraines ; les activités globales de l'APX et de la SOD sont maximales dans les parties aériennes à 6 heures d'exposition, et dans les racines à 12h, puis elles diminuent jusqu'à la fin de l'expérience. La quantité de MDA formée présente un maximum dans les racines à 1 heure d'exposition, dans les feuilles de rang 1 à 3 heures, dans celles de rang 2 à 6 heures et au niveau de l'apex à 24 heures.

1.2 - ETUDES REALISEES EN PHASE SOLIDE

Ces expérimentations ont été menées sur des sols artificiellement contaminés avec du cadmium afin de (i) permettre la normalisation d'une méthode de détermination de la fréquence de micronoyaux en phase solide⁹, (ii) étudier si les mécanismes de défense de la plante sont différents en phase solide par rapport à la phase liquide.

Plusieurs sols ont été utilisés, trois sols standards allemands (LUF 2.2 ; 2.3 ; 3A) et un sol (AS) caractérisé par RITTMO. Des tests préliminaires ont permis de fixer les conditions d'exposition (humidité, temps d'exposition, et.) et la gamme de concentrations en CdCl_2 (41,7 à 125 mg/Kg de sol (poids frais), à l'aide de solutions dont les concentrations allaient de 200 à 600 mg/L, avec des pas de 50). Les mêmes biomarqueurs ont été déterminés : génotoxicité, stress oxydant et PC.

⁹ Rappelons que la méthode en phase liquide est normalisée au niveau AFNOR et bientôt au niveau ISO

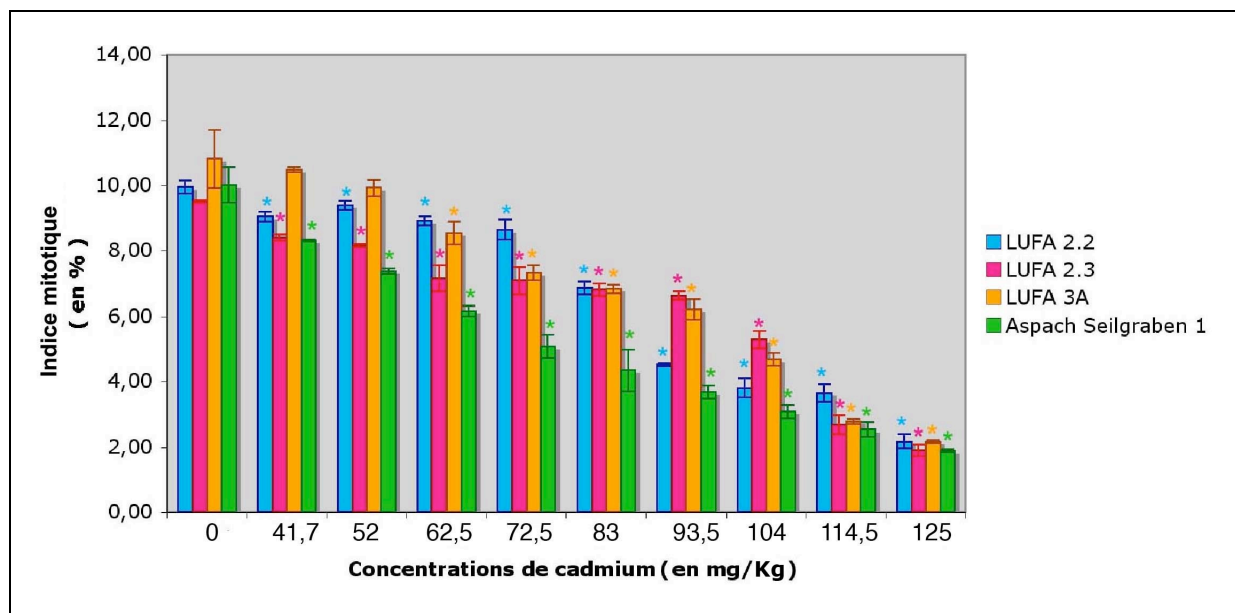


Figure 69 : Pourcentages de mitoses en fonction de la concentration en CdCl_2 pour les différents types de sols.

* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

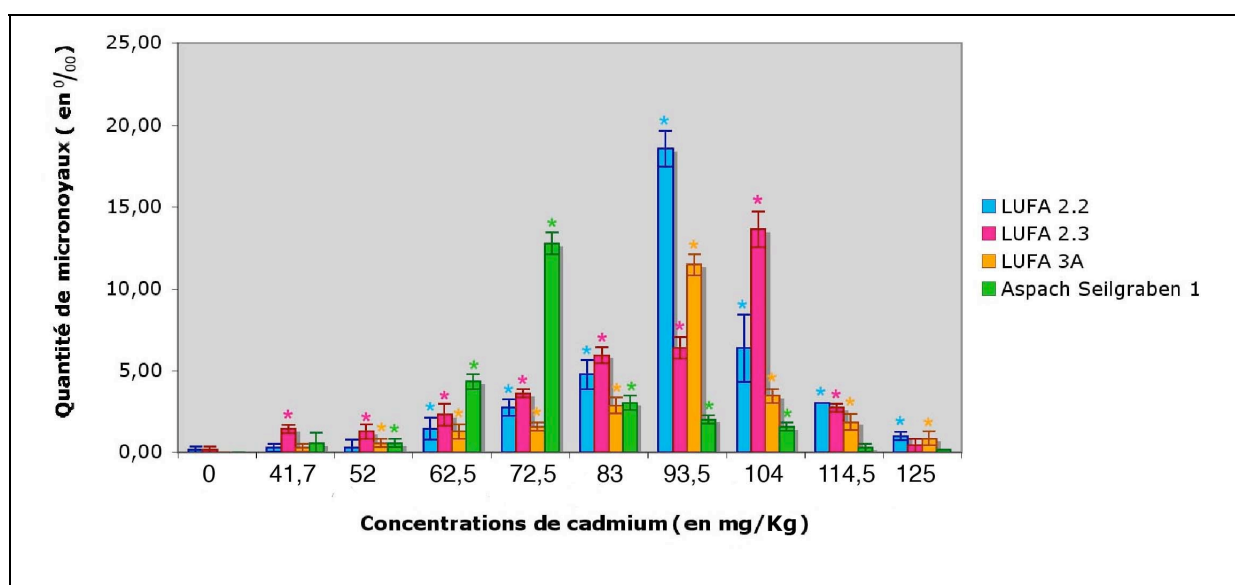


Figure 70 : Fréquences de micronoyaux en fonction de la concentration en CdCl_2 pour les différents types de sols.

* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

1.2.1 - Résultats du test *Vicia*-micronoyaux

Les graines avec leur racine primaire ont été mises dans les sols avec les différentes concentrations en cadmium afin de laisser pousser les racines secondaires en contact avec le polluant testé. La durée d'exposition était de 5 jours.

Pour l'ensemble des sols testés, nous observons une diminution progressive de l'indice mitotique (figure 69) tout au long de l'expérience (de 10% à environ 2% pour 125 mg/Kg de sol). La première concentration donnant un effet statistiquement significatif par rapport au témoin est 41,7 mg/Kg pour les sols LUFA 2.2, 2.3 et AS et 62,5 mg/Kg pour le sol LUFA 3A.

Les fréquences de micronoyaux dans les cellules racinaires présentent des maxima à des concentrations différentes en fonction des sols (figure 70). Les sols LUFA 2.2 et 3A présentent un pic génotoxique à la concentration de 93,5 mg/Kg, le sol LUFA 2.3 à 104 mg/Kg, le sol AS à 72,5 mg/Kg. Ces pics de génotoxicité ne présentent pas tous une fréquence de micronoyaux équivalente. La fréquence la plus élevée est de $18,55 \pm 1,09$ ‰ pour le sol LUFA 2.2, la plus faible est de $11,45 \pm 0,66$ ‰ pour le sol LUFA 3A.

Lorsque Vicia faba est exposée au cadmium en phase solide, la fréquence de micronoyaux est augmentée dans une gamme entre 62,5 et 104 mg/kg sol pour les 4 types de sols utilisés. Les caractéristiques physico-chimiques des sols influent sur la biodisponibilité du cadmium puisque le pic de génotoxicité ainsi que le facteur d'induction sont différents selon la nature du sol utilisé.

1.2.2 - Etude du stress oxydant

Les conditions d'exposition étaient identiques à celles décrites précédemment (organismes de 9 jours, sol LUFA 2.2) et les biomarqueurs du stress oxydant déterminé dans les racines.

Les activités de la GR et de la GPX augmentent de façon significative jusqu'à la concentration de 72,5 mg/Kg de sol puis, pour les concentrations supérieures, elles diminuent (figure 71). La CAT et la SOD présentent une activité quasi constante du témoin jusqu'à 83 mg/Kg de sol puis, à de plus fortes concentrations, elles diminuent de façon significative.

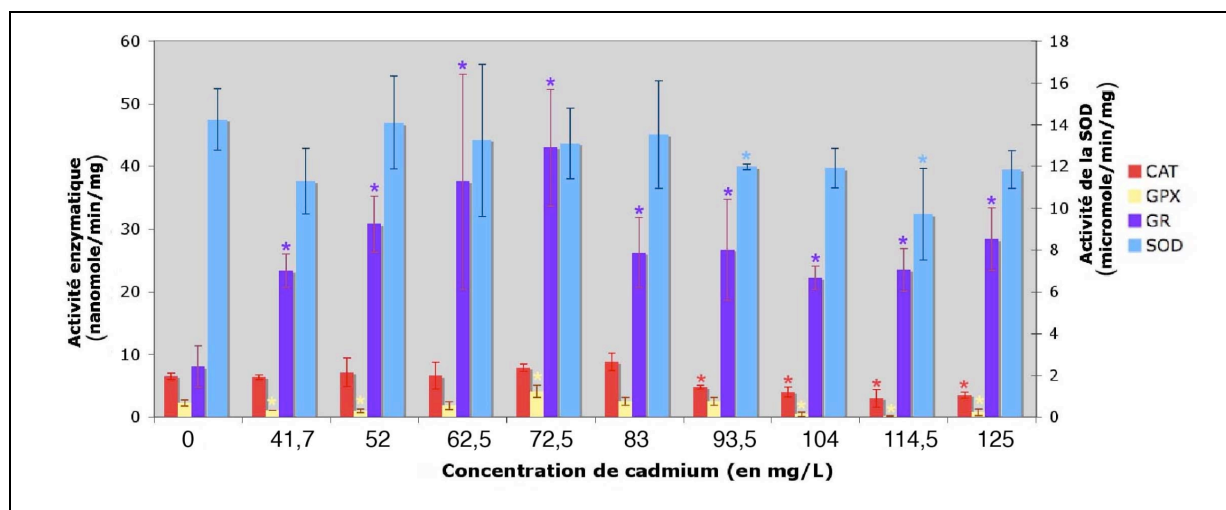


Figure 71 : Activité enzymatique des différentes enzymes du stress oxydant en fonction de la concentration en CdCl₂ (LUFA 2.2).

* : valeur statistiquement différente du témoin, (p<0,05 ; n=3).

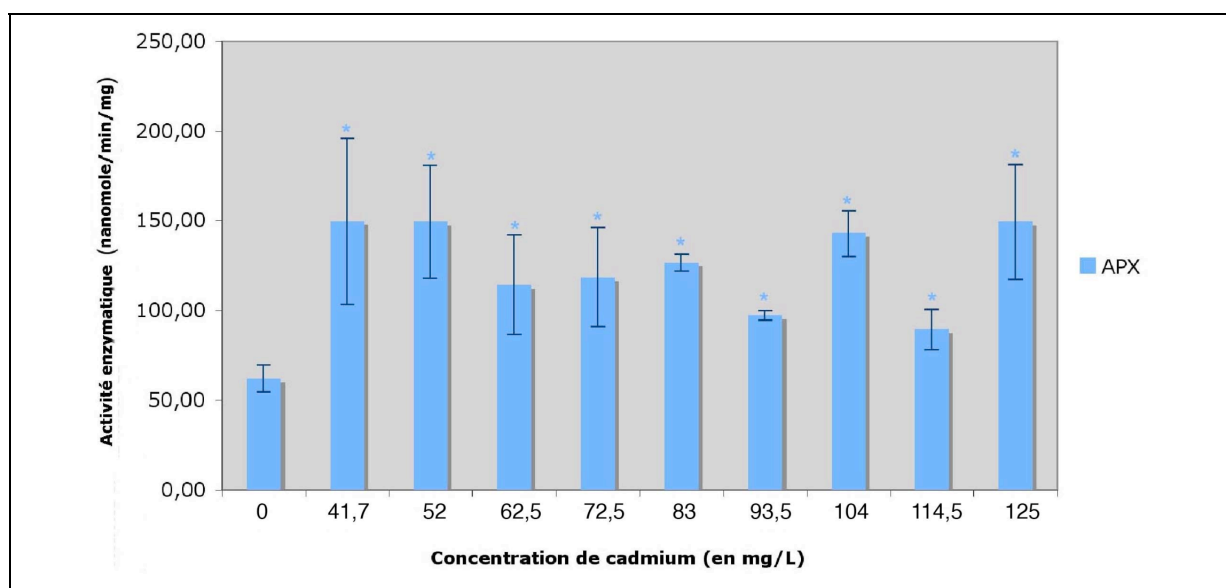


Figure 72 : Activité enzymatique de l'APX en fonction de la concentration en CdCl₂ (LUFA 2.2).

* : valeur statistiquement différente du témoin, (p<0,05 ; n=3).

L'activité de l'APX (figure 72) est augmentée de façon statistiquement significative par rapport au témoin dans toute la gamme de concentrations testées.

Au niveau racinaire, APX, GR et GPX sont induites entre 41,7 et 125 mg CdCl₂/kg sol. La catalase et la SOD voient leur activité diminuer à partir de 93,5 mg/Kg de sol.

1.2.3 - Induction des PC

1.2.3.1 - Test avec la gamme contenant le pic génotoxique

Pour la même gamme de concentrations que pour les deux études précédentes, seules des PC₂ sont synthétisées, mais elles le sont de manière très erratique avec des écarts-types assez importants (données non présentées). Il semblerait qu'à ces concentrations, la quantité de métal présente dans l'organisme ne soit pas assez importante pour induire une synthèse homogène.

1.2.3.2 - Test avec une gamme comprise entre 0,5 et 1,5 g Cd/Kg de sol

Ce test a été réalisé en parallèle sur des organismes jeunes et âgés. Les organismes jeunes ont été exposés de la même façon que précédemment (5 jours d'exposition à partir du 4^{ème} jour). Pour les organismes âgés, les graines avec leur racine primaire ont été mises dans le sol LUFA 2.2 afin de laisser pousser les racines secondaires pendant 8 jours (arrosées avec de l'eau déminéralisée). L'exposition au cadmium est de 5 jours à partir du 13^{ème} jour. La gamme de concentrations est testée avec des pas de 0,25.

- Cas des organismes jeunes :

Les données obtenues au niveau foliaire ne sont pas présentées du fait des trop grands écarts-types qui rendent le jeu de données inexploitable.

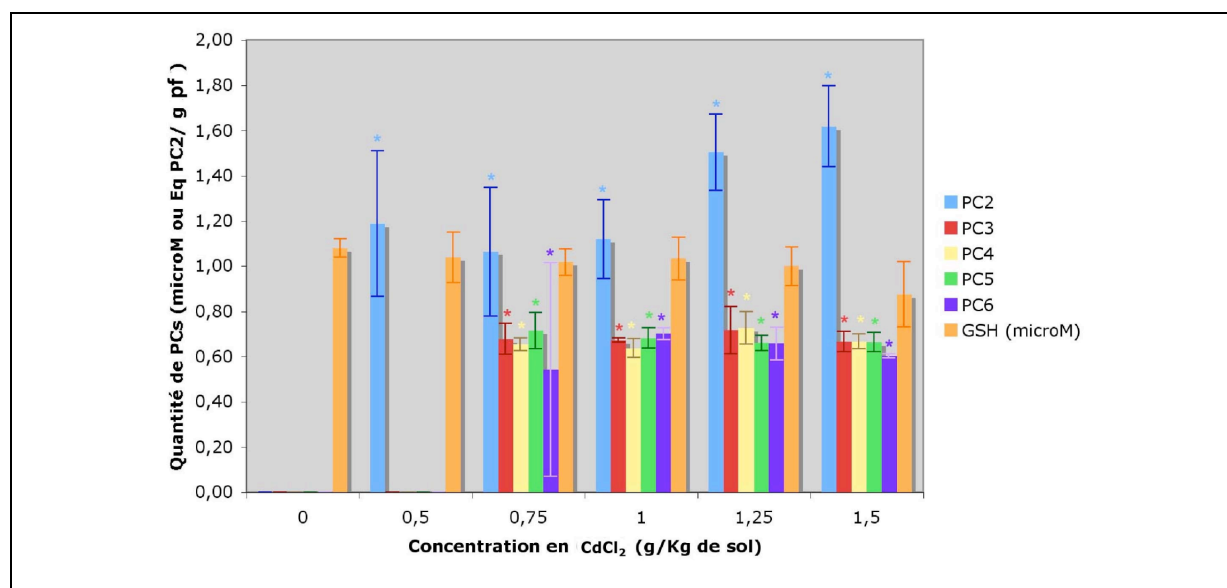


Figure 73 : Induction des PC dans les racines d'organismes jeunes en fonction de la concentration en CdCl₂ (LUFA 2.2)

* : valeur statistiquement différente du témoin, (p<0,05 ; n=3).

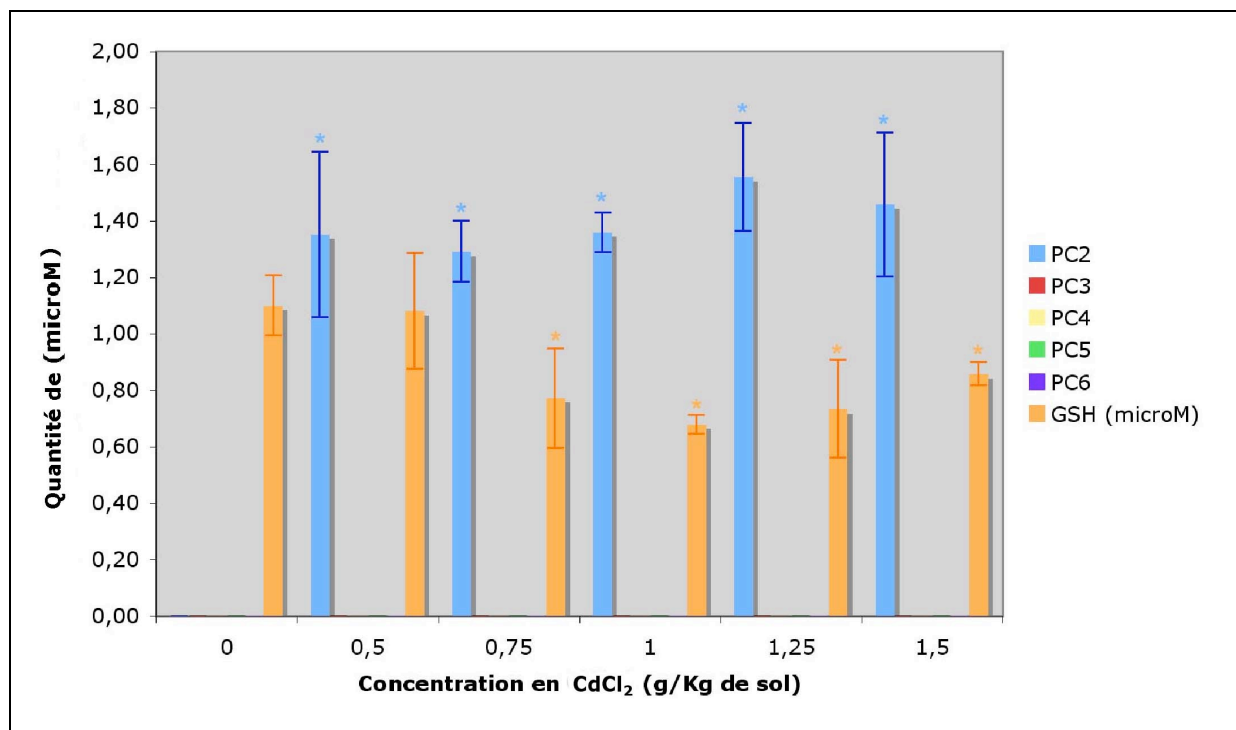


Figure 74 : Induction des PCs dans les racines d'organismes de 18 Jours en fonction de la concentration en CdCl₂ (LUFA 2.2).

* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

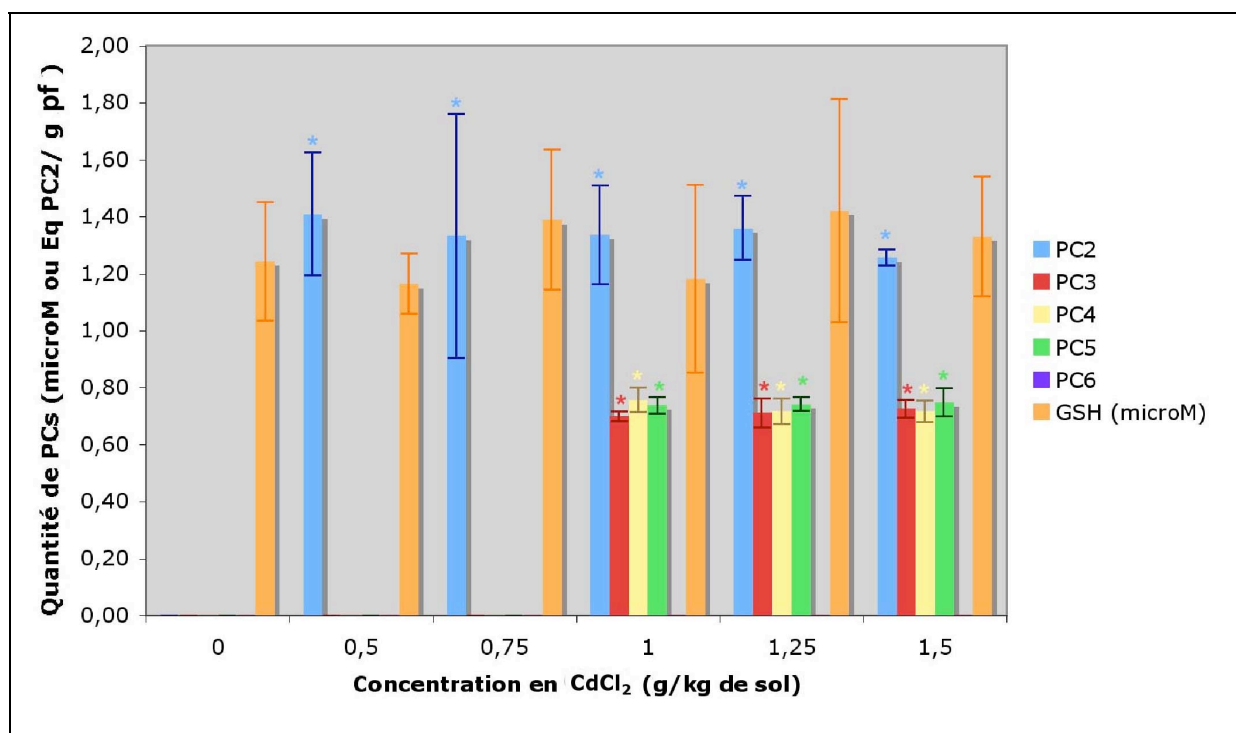


Figure 75 : Induction des PCs dans les feuilles d'organismes de 18 jours en fonction de la concentration en CdCl₂ (LUFA 2.2).

* : valeur statistiquement différente du témoin, ($p < 0,05$; $n=3$).

Au niveau racinaire (figure 73), la quantité de GSH reste quasi constante avec l'augmentation de la concentration. Seule PC₂ est présente à la plus faible concentration (0,5 g/kg sol). Les PC 3 à 6 sont présentes de façon significative dès 0,75 g/kg de sol. Pour les concentrations plus fortes, la quantité de PC₂ augmente alors que celles de PC 3 à 6 restent constantes.

- Cas des organismes âgés

Dans les racines (figure 74), la quantité de GSH diminue significativement à partir de 0,75 g/Kg de sol. La seule PC présente est la PC₂ à des concentrations statistiquement différentes du témoin pour toute la gamme de concentrations.

Dans les feuilles (figure 75), la quantité de GSH reste assez constante chez le témoin et ce, quelle que soit la concentration en cadmium. PC₂ est présente dès 0,5 g/Kg de sol. Sa quantité est en moyenne de $1,30 \pm 0,20$ mM et statistiquement différente du témoin quelle que soit la concentration en cadmium. PC 3 à 5 apparaissent significativement dès 1 g/Kg de sol, dans les mêmes proportions, mais elles restent en quantité inférieure à PC₂. Il n'y a pas de synthèse de PC₆. Notons que, lors de cette expérience, les concentrations en CdCl₂ ont été tellement importantes que la croissance a été inhibée. Elles n'ont pas permis de distinguer les différents rangs foliaires comme précédemment.

En milieu solide, l'induction de phytochélatines nécessite de plus fortes concentrations en cadmium, comparativement à la concentration induisant un pic de génotoxicité. De la même façon qu'en phase liquide, jusqu'à 1g CdCl₂/kg sol, plus le cadmium est présent en grande quantité, plus les PC seront induites en grande quantité et plus leur degré de polymérisation est élevé dans les racines des jeunes organismes. Nous observons l'apparition des PC₂ à partir de 0,5 g/kg de sol, des PC₃ à PC₆ dès 0,75 g/kg sol. Lorsque les organismes sont plus âgés (18 jours), seules les PC₂ sont induites dans les racines, alors qu'on retrouve les PC₃ à PC₅ dans les feuilles à partir de 1g CdCl₂/kg sol.

1.2.4 - Essai à long terme en phase solide.

Le but de cette expérience était de mettre en évidence d'éventuels effets morphologiques sur *Vicia faba* exposé pendant 4 mois à une concentration génotoxique de cadmium. Pour ce faire, nous avons choisi une concentration pour laquelle les effets génotoxiques étaient avérés, celle du pic de génotoxicité obtenu avec le sol LUFA 2.2, à savoir . Cette concentration présente aussi l'avantage d'être une concentration viable pour la plante, et de présenter un minimum pour les mécanismes de défense étudiés précédemment.

Le test a duré 4 mois (de Février à Juin 2006). Les pots utilisés étaient de plus gros volume (3 Kg de sol). Les lots exposés et témoins ont été placés à 85 % de la capacité de rétention en



Témoins (n=3)	Exposés (n=3)
Nombre total de fruits : 7	Nombre total de fruits : 0
	

Tableau XII : Résultats du test à long terme en phase solide : effets d'une concentration de 93,6 mg Cd/Kg de sol sur la production de fruits

eau du sol. Puis les pots ont été placés sous serre, pour être au plus proche des conditions de terrain. Deux fois par semaine, les pots ont été pesés pour maintenir les sols à 85 % de leur capacité de rétention.



Témoins (n=3)	Exposés (n=3)
Nombre total de fleurs : 18	Nombre total de fleurs : 15
	

Tableau XI : Résultats du test à long terme en phase solide : effets d'une concentration de 93,6 mg Cd/Kg de sol sur la floraison

Au bout de 3 mois, nous n'avons pas constaté de différence en ce qui concerne la floraison des plants entre les témoins et les exposés (Tableau XI). En revanche, quelques semaines plus tard, l'ensemble des plants témoins a donné un nombre total de 7 fruits, alors qu'aucune fleur n'a donné de fruit dans les plants exposés. L'aspect morphologique des plants exposés ne semblait pas affecté, en terme de croissance ou de biomasse (Tableau XII).

L'exposition de Vicia faba à une concentration génotoxique de cadmium semble avoir un effet sur la production de fruits à long terme, mais pas sur la croissance, ni sur la production de fleurs.

2 - APPLICATION DU TEST VICIA-MCN A DES MATRICES COMPLEXES LIQUIDES ET SOLIDES

Cette étude a été réalisée dans le cadre du programme GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles) ayant pour thème l'évaluation de l'efficacité de technologies innovantes de remédiation et de stratégies de requalification des friches (Annexe J1). L'ANR ECCO « Ecosphère continentale. Risques environnementaux » coordonnée par le LIMOS (CNRS UMR 7137) prévoyait qu'au sein du laboratoire, une batterie de tests (dont le test *Vicia* en phase solide et liquide) soit utilisée pour caractériser la (géo)toxicité des sols, de leurs lixiviats ainsi que des percolats obtenus après divers traitements et à différents temps de sols dits de Neuves-Maisons (NM) non traités ou thermodésorbés. Par ailleurs, des essais sur différentes matrices complexes solides (sédiments) ont aussi été réalisés afin de tester la faisabilité du test et d'en cerner ses contraintes.

2.1 - LIXIVIATS MULTI CONTAMINES (GISFI)

Les lixiviats des sols non traités de Neuves-Maisons ont été obtenus à des dates différentes entre Octobre 2005 et juillet 2006. Ils ont été testés à l'état brut ou filtré à 0,7 μm (après une conservation d'une durée maximale de 24 h à la température de 4 °C). Notre contribution à ce programme concernait la réalisation du test *Vicia*-micronoyaux en phase liquide avec une durée d'exposition de 39 heures. Au critère de génotoxicité (fréquence de micronoyaux) a été ajouté le critère de toxicité portant sur l'élongation racinaire (Tableau XIII).

Date	Octobre 2005					
Type de sol	NM2A	NM1D	NMD2			
Traitement	Filtré	Brut	Brut			
Elongation racinaire	Négatif	75 %	Négatif			
MNX LOEC	50 %	12,5 %	25 %			
Date	Mars 2006					
Type de sol	NMDT					
Traitement	Brute					
Elongation racinaire	75 %					
MNX LOEC	12,5 %					
Date	Juillet 2006					
Type de sol	NM1	NM2	NM3	DT1	DT2	DT3
Traitement	Filtré	Filtré	Filtré	Filtré	Filtré	Filtré
Elongation racinaire	Négatif	50 %	Négatif	50 %	Négatif	Négatif
MNX LOEC	25 %	25 %	50 %	50 %	50 %	50 %

Tableau XIII : Résultats sur lixiviats GISFI (Données brutes en annexe K)

Type de traitement	Témoin Labo	Thlaspi	Medicago Sativa	Vég. Spon.	Medicago Sativa Myco	Terre désorbée	Terre nue
Date	Avril 2006						
MNX LOEC	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
Date	Mai 2006						
Elongation racinaire	négatif	négatif	Positif	négatif	Positif	négatif	négatif
MNX LOEC	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
Date	Septembre 2006						
Elongation racinaire	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
MNX LOEC	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif

Tableau XIV : Résultats sur percolats GISFI

Les deux lixiviats des sols de Neuves-Maisons non traités obtenus en octobre 2005 présentent peu (LOEC = 75% pour NM1D) ou pas de toxicité (NM2D), mais par contre une génotoxicité plus importante (LOEC = 12,5% et 25% pour NM1D et NM2D respectivement) avec des facteurs d'induction élevés. Le lixiviat NM2D a été testé à l'état brut (NM2D) et à l'état filtré (NM2A) : lorsqu'il est filtré, ce lixiviat présente une génotoxicité moins importante (LOEC = 50% pour NM2A) avec un facteur d'induction beaucoup plus faible. Le lixiviat du sol Neuves-Maisons thermodésorbé (NMDT obtenu en mars 2006) ne présente pas moins d'effets toxique ou génotoxique (LOEC de 75% pour l'élongation racinaire et de 12,5% pour la fréquence de micronoyaux).

Les lixiviats obtenus en juillet 2006 (tous filtrés) sur les sols non traités (NM1, 2 et 3) présentent peu (LOEC = 50% pour NM2) ou pas de toxicité (NM1 et NM3) et une génotoxicité (LOEC = 25% pour NM1 et NM2, et 50% pour NM3) avec des facteurs d'induction faibles. Enfin, les lixiviats des sols thermodésorbés présentent aussi une faible toxicité (LOEC = 50% pour DT1, pas d'effet toxique pour DT2 et DT3). La génotoxicité de ces sols est légèrement atténuée puisque la LOEC est de 50% pour tous les lixiviats (DT 1, 2 et 3).

Si l'on compare la génotoxicité des sols en fonction du temps, il semblerait que la diminution de celle-ci soit liée à un effet temps/thermodésorbition. En effet, la génotoxicité diminue de moitié pour les sols non traités en environ 10 mois, alors qu'il n'en faut que 5 pour les sols thermodésorbés. La diminution de la génotoxicité des sols semble donc être accélérée avec le temps pour les sols thermodésorbés par rapport aux sols non traités.

2.2 - PERCOLATS MULTI CONTAMINES (GISFI)

Les percolats ont été obtenus entre avril et septembre 2006. Ils ont été décantés et conservés 24 h à la température de 4 °C. Les critères utilisés sont l'élongation racinaire et la fréquence de micronoyaux déterminés sur *Vicia faba* en phase liquide avec une durée d'exposition de 39 heures (mêmes conditions d'exposition que pour les lixiviats).

Les essais sur les percolats ne mettent en évidence aucun effet génotoxique, quel que soit le prélèvement (Tableau XIV). Seuls des effets sur l'élongation racinaire de *V. faba* ont été observés : celle-ci est diminuée de façon significative pour les percolats 2 (prélevés en mai 2006) des lots « *Medicago sativa* » et « *Medicago sativa* mycorhizée ».

L'absence d'effet génotoxique des percolats, alors qu'un effet notable avait été observé sur les lixiviats, peut être dû à un effet temps. En effet, quasiment un an s'est écoulé entre les prélèvements de lixiviats et ceux des percolats. Durant cette période, les sols sur site

ont subi les intempéries. Les métaux éventuellement présents ont pu être drainés par les eaux de pluie. (Données brutes en annexe L)

2.3 - ESSAIS EN PHASE SOLIDE SUR DES SEDIMENTS

Le sol de dilution utilisé est le sol LUFA 2.2 (considéré ici comme un sol de référence). Les concentrations en sédiment sont données en (masse:masse). Le test est effectué à 85 % de la capacité de rétention, et la durée d'exposition est de 5 jours.

L'analyse est menée sur 3 graines par concentration et 2 racines/graine pour MCN (=6000 cellules)

2.3.1 - Vosges du nord

Cette première étude concerne des sédiments de deux étangs artificiels (Annexes J3 et J4) (Baerenthal ; Erbsenthal) situés dans les Vosges du Nord (annexe J2), au cœur du Parc Naturel Régional des Vosges du Nord et intégrés à la Réserve Mondiale de Biosphère classée par l'UNESCO.

Concentration	Témoin	5%	10%	25%	50%
Indice mitotique (%)	11,55	11,67	10,20*	6,93*	6,49*
Ecart-type	0,62	0,63	0,23	0,20	0,23
MNX (‰)	0,00	0,00	0,00	1,74*	3,04*
Ecart-type	0,00	0,00	0,00	0,55	1,20

* : statistiquement différente du témoin.

Tableau XV : Résultats du test *Vicia*-micronoyaux (Sédiment Baerenthal)

Concentration	Témoin	5%	10%	25%	50%
Indice mitotique (%)	11,55	11,67	10,19*	10,32*	9,22*
Ecart-type	0,62	0,33	0,43	0,42	0,61
MNX (‰)	0,00	0,29	0,58	0,43	1,01*
Ecart-type	0,00	0,45	0,45	0,48	0,85

* : statistiquement différente du témoin.

Tableau XVI : Résultats du test *Vicia*-micronoyaux (Sédiment Erbsenthal)

Les deux sédiments ne présentent pas de pic de génotoxicité. Malheureusement, la quantité de sédiment prélevée n'a pas permis de tester une gamme de concentration plus

Métal	Concentration ($\mu\text{g/g}$ de poids sec)	Concentration ($\mu\text{g/g}$ de poids sec)
	Sédiment de Baerenthal	Sédiment d'Erbsenthal
Fe	36.620 \pm 1.210	9.130 \pm 290
Mn	640 \pm 0	120 \pm 0
Zn	350 \pm 0	230 \pm 10
Pb	120 \pm 0	70 \pm 0
Ni	55,40 \pm 1,25	32,27 \pm 0,82
Cr	31,20 \pm 0,14	7 \pm 0,30
Cd	2,71 \pm 1,98	2,18 \pm 0,18

Tableau XVII : Concentration de certains métaux dans les sédiments de l'étang de Baerenthal et d'Erbsenthal

Les trois sites de prélèvement présentent des LOEC à 25 % (tableaux XIX à XXI). Cependant les stations 2 et 3 présentent un pic de génotoxicité à 75 % de mélange avec des valeurs respectives de 8,70 et 6,52 ‰.

Au vu des dosages des métaux (tableau XVIII), plus de la moitié d'entre eux sont des substances génotoxiques reconnues ou potentielles.

Les résultats obtenus mettent en évidence un effet des apports du Metzange sur le Veymerange (fréquence en micronoyaux plus élevés en station 2). La station 3 permet de mettre en évidence le rôle de la topographie du cours d'eau. En effet à ce niveau, le cours d'eau est plus large et le débit plus important, ce qui facilite la dispersion des éléments et en limite le dépôt. Ces facteurs pourraient être à l'origine de la fréquence de micronoyaux plus faible en station 3 qu'en station 2.

Le test Vicia faba-micronoyaux apparaît comme un outil de bioévaluation utile à la caractérisation des matrices complexes, aussi bien en phase liquide (dans le cadre du programme GISFI en complément d'autres tests d'écotoxicité) qu'en phase solide (étude sur les sédiments d'étang ou de rivière).

Station 1	0 %	25 %	50 %	75 %	100 %
mitose	10,06	7,26*	6,51*	6,03*	5,88*
E-T	0,27	0,16	0,24	0,21	0,41
MNX	0,00	1,88*	4,06*	6,38*	6,52*
E-T	0,00	0,25	0,66	0,66	0,43

* : significativement différent du témoin. (p.s./LUFA 2.2).

Tableau XIX : Résultat Test *Vicia*-micronoyaux (Station 1 du ruisseau de Veymerange)

Station 2	0 %	25 %	50 %	75 %	100 %
mitose	10,06	6,87*	6,22*	5,54*	4,46*
E-T	0,27	0,08	0,16	0,46	0,52
MNX	0,00	3,91*	5,36*	8,70*	4,49*
E-T	0,00	0,87	0,50	1,15	0,50

* : significativement différent du témoin. (p.s./LUFA 2.2).

Tableau XX : Résultat Test *Vicia*-micronoyaux (Station 2 du ruisseau de Veymerange)

Station 3	0 %	25 %	50 %	75 %	100 %
mitose	10,06	10,78	9,83	5,36*	1,03*
E-T	0,27	0,04	0,19	0,28	0,07
MNX	0,00	1,30*	3,04*	6,52*	0,29
E-T	0,00	0,43	0,43	0,00	0,25

* : significativement différent du témoin. (p.s./LUFA 2.2).

Tableau XXI : Résultat Test *Vicia*-micronoyaux (Station 3 du ruisseau de Veymerange)

DISCUSSION

Le test *Vicia faba* MNX (réalisé sur phase aqueuse) nous a permis de mettre en évidence l'effet génotoxique du cadmium dès la concentration de $7,5 \cdot 10^{-8}$ M ($8,4 \mu\text{g/L}$). Il avait déjà été trouvé comme le test le plus sensible parmi différents tests génotoxiques pour des extraits aqueux de différentes matrices multicontaminées (Cotelle, 1999). De même, Steinkellner *et al.* (1998) avaient montré que le test *Vicia faba* MNX (pour une exposition de 2 heures suivie d'une période de récupération de 36 heures) présentait une sensibilité deux fois plus importante par rapport au test *Allium cepa* MNX.

Nous avons montré que le nombre de micronoyaux augmente de façon statistiquement significative, après 48 heures d'exposition, de $7,5 \cdot 10^{-8}$ M à $7,5 \cdot 10^{-7}$ M CdCl_2 , avec un pic de génotoxicité (9,42 MNX/1000 cellules) à $2,5 \cdot 10^{-7}$ M ($28 \mu\text{g/L}$). A cet égard, il faut souligner que Steinkellner *et al.* (1998) avaient obtenu un maximum de 7,5 MNX/1000 cellules à une exposition beaucoup plus importante (100 mM, $11,24 \text{ mg/L}$) pendant une durée d'exposition beaucoup plus courte (2 heures, suivies d'un temps de récupération de 36 heures). Steinkellner *et al.* (1998) ont également observé une augmentation du nombre de micronoyaux chez *Vicia faba*, entre 50 et 100 mM (toujours pour un temps d'exposition de 2h suivi de 36h de récupération). Dans ces conditions, ces auteurs ont obtenu un maximum 0,0079 % MNX/mM CdCl_2 , alors que nous avons trouvé 608, 1072 et 3768 % MNX/mM CdCl_2 pour respectivement 30, 39 et 48 heures d'exposition. Le temps d'exposition joue donc un rôle important et constitue un paramètre d'optimisation de la sensibilité. Le temps d'exposition s'avère être aussi un paramètre qui influence la valeur de la LOEC, autrement dit du seuil de détection des effets génotoxiques. En effet, lorsque la durée d'exposition est de 39 et 48 heures, la LOEC est de $7,5 \cdot 10^{-8}$ M alors qu'elle est seulement de 10^{-7} M CdCl_2 pour 30 heures d'exposition. De plus, il y a une augmentation de la fréquence de micronoyaux avec la durée d'exposition : $1,52 \pm 0,78$; $2,68 \pm 0,55$ et $9,42 \pm 0,13$ MNX/1000 cellules pour respectivement 30, 39 et 48 heures, qui va de pair avec une diminution du coefficient de variation.

Pour les concentrations en CdCl_2 supérieures à $2,5 \cdot 10^{-7}$ M, le taux de micronoyaux diminue, ce qui est couramment constaté (Cotelle *et al.*, 1999). Cette courbe concentration-effet est classique en génotoxicité. Elle s'explique par le fait que de fortes concentrations en polluant sont cytotoxiques, ce qui ne permet plus de visualiser les micronoyaux. Ceci est confirmé par une baisse de l'indice mitotique, parfois avec un certain décalage.

Il est important de signaler que la grande majorité des micronoyaux induits par le cadmium sont des micronoyaux « atypiques », c'est-à-dire liés au noyau principal. Ils sont

caractéristiques des métaux lourds. Ce type de micronoyaux a, depuis longtemps, été décrit dans la littérature : notamment Liu *et al.* (1992) qui les avaient observés dans les cellules racinaires d'*Allium cepa* (oignon) exposées au Cr^{3+} . Un autre exemple a aussi été mentionné pour le plomb (Liu *et al.*, 1994).

Les travaux de Grill *et al.*(1986) sur les Fabacées exposées à 20 μM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ pendant 4 jours, avaient mis en évidence l'induction de PC dont le degré de polymérisation était compris entre 2 et 7. Notre étude a permis de déterminer les quantités de GSH, $\gamma\text{-GC}$, PC_2 à PC_6 présentes chez *Vicia faba*. De fait, nous n'avons jamais identifié dans nos travaux de PC_7 .

L'évolution des concentrations de GSH en fonction des concentrations de cadmium, chez des organismes exposés pendant une période relativement courte (i.e. 48 heures), est pluriphasique. En effet, à la plus faible concentration de cadmium (10^{-7} M; 11,2 $\mu\text{g/L}$), le GSH augmente puis diminue pour se stabiliser autour d'une quantité minimale de 1 μmole (cf. figure 28). Mise à part la phase d'augmentation, le profil de réponse à l'exposition au cadmium est comparable à celui observé par Mendoza-Còzatl et Moreno-Sánchez (2006) sur le tabac (*Nicotiana tabacum*). La déplétion de GSH est classique et a également été observée sur des cellules de *Datura innoxia* exposées à 200 μM de CdCl_2 pendant 48 heures (Delhaize *et al.*, 1989) et sur des cellules de *Rauwolfia serpentina* exposées à 250 μM de CdSO_4 pendant 4 jours (Grill *et al.*, 1985). Le fait que tous ces auteurs n'observent pas d'augmentation de la quantité de GSH semble lié au fait que les concentrations testées étaient trop élevées pour observer cette première phase.

Pour les concentrations de CdCl_2 supérieures à 10^{-6} M, la déplétion de GSH s'accompagne d'une synthèse de PC (Xiang et Olivier, 1998). Toutefois, nous n'avons observé qu'une augmentation nette des PC_2 et des PC_6 en fonction de l'augmentation des concentrations de cadmium. Cette augmentation spécifique des PC_2 et PC_6 n'a jamais été observée dans la littérature (Matsumoto *et al.*, 2004). Toutefois, il faut souligner que les PC_2 ont des coefficients de variation faibles (compris entre 5 et 13 %) alors que pour les PC_3 , PC_4 et PC_5 , les coefficients de variation sont beaucoup plus importants, ce qui nuit à l'établissement d'une relation avec la concentration de cadmium.

Il est à noter que Grill *et al.* (1987) ont obtenu en faisant varier, non pas la concentration de cadmium mais le temps d'exposition (entre 0 et 9 heures), un profil d'induction des PC similaire à celui observé dans le présent travail. En effet, après exposition à 0,2 mM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ d'une culture cellulaire de *Rauwolfia serpentina*, les PC y apparaissent dans l'ordre croissant de leurs degrés de polymérisation (PC_2 , PC_3 , PC_4 et PC_5 respectivement à 30, 60, 90 et 150 min). En outre, cette induction de PC était accompagnée d'une diminution

de GSH. Cette observation nous incite à faire l'hypothèse que les effets observés sont fonction du temps d'exposition et de la concentration de cadmium, ce qui rejoint la loi de Haber (1924) qui stipule que les effets sont fonction du produit de la concentration (C) et du temps d'exposition (T), soit :

$$\text{Effet} = f(C \times T)$$

Pour les concentrations en cadmium comprises entre 10^{-7} et 10^{-5} M, les quantités de PC₂ sont supérieures à celles des autres PC (PC 3 à 6). Pour les concentrations de 10^{-4} et 10^{-3} M, il y a synthèse de PC de haut poids moléculaire (PC 5 et 6). Cette observation peut s'expliquer par la nécessité, pour la plante, de complexer davantage de cadmium. Une étude de Stolt *et al.* (2003) a montré des résultats similaires sur le blé (*Triticum aestivum* et *Triticum turgidum* var. *durum*) exposé à deux concentrations de CdCl₂ (1 et 30 µM) pour une seule durée d'exposition de 12 jours. En effet, les PC₄ n'ont été induites que pour l'exposition des différentes espèces de blé à la plus forte concentration (30 µM de CdCl₂).

Nos résultats montrent que, jusqu'à la concentration de 10^{-5} M (1,12 g/l), la synthèse d'une PC d'ordre plus élevé nécessite l'augmentation de la quantité de l'ensemble des PC d'ordre inférieur. Toutefois, une fois que toutes les PC (2 à 6) sont synthétisées, un équilibre dynamique semble s'installer entre les divers types de PC. De même, Hu *et al.* (2001) avaient observé un transfert des PC de faible poids moléculaire (LMW) vers les PC de haut poids moléculaire (HMW) chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* en les exposant 3 jours à 100 µM de CdCl₂. Cette interrelation des PC avait aussi été clairement mise en évidence, *in vitro*, par Grill *et al.* (1989). A l'aide de PCS purifiée provenant d'une culture cellulaire de *Silene cucubalus* placées dans un milieu de culture contenant 0,6 mM de PC₂ et exempt de GSH, ces auteurs avaient mis en évidence une synthèse de PC (3 et 4) après avoir attendu 15 min avant d'ajouter 35 nmoles de Cd(NO₃)₂. Suite à cet ajout de Cd(NO₃)₂, la quantité de PC₂ du milieu avait chuté et, parallèlement, les PC₃ avaient été synthétisées. Cette tendance se poursuit tout au long des 120 minutes de l'expérience, avec ensuite synthèse de PC₄, 30 minutes après l'ajout de Cd(NO₃)₂.

L'expérimentation sur des individus plus âgés (figures 30 à 33) permet de mettre en avant un comportement différent pour la synthèse des PC selon le tissu analysé. Au niveau racinaire, les profils de synthèse restent quasiment identiques à ceux observés pour les individus plus jeunes : il y a d'abord une augmentation de la quantité de GSH puis une déplétion de GSH, accompagnée de la synthèse de PC, qui voient leurs quantités respectives et le degré de polymérisation augmenter avec la concentration croissante en cadmium. Toutefois un décalage de cette réponse est observé vers les plus fortes concentrations. La

déplétion en GSH ne se fait plus à 10^{-6} M mais à 10^{-5} M de CdCl_2 . La synthèse de PC_2 et PC_3 a lieu non pas à 10^{-7} M mais à 10^{-5} M de CdCl_2 . C'est à la plus forte concentration (10^{-3} M) que PC_6 commence à être présente, alors que PC_5 n'est pas détectée. Au niveau foliaire, la déplétion du GSH se fait à partir de 10^{-5} M. Dès 10^{-7} M de CdCl_2 la quantité de PC_2 est statistiquement significative par rapport au témoin. Toutes les PC (2 à 6) sont présentes de manière significative dès 10^{-6} M de CdCl_2 . De 10^{-5} M à 10^{-3} M, les quantités respectives de PC varient peu, si ce n'est la quantité de PC_6 qui passe de 0,70 à 0,80 Eq PC_2 . Le rôle que tiennent les PC HMW vis-à-vis de la résistance aux métaux avait déjà été mis en évidence par Speiser *et al.* (1992), à l'aide d'expositions de 7 jours de cultures de cellules de moutarde brune (*Brassica juncea*) exposées à 100 μM de CdCl_2 et de tomate (*Lycopersicon esculentum*) exposées à 500 μM de CdCl_2 . La comparaison des rapports PC LMW / PC HMW confirme cette tendance. En effet, que ce soit avec l'augmentation de la concentration en CdCl_2 du milieu, ou avec l'augmentation du temps d'exposition au cadmium, la quantité de PC HMW augmente, traduisant sa plus grande capacité à chélater les métaux.

Les expérimentations sur individus âgés ont mis en évidence une présence majoritaire des PC LMW dans les racines alors que les PC HMW sont présentes majoritairement dans les feuilles. Quelle que soit la partie végétale considérée, la quantité totale de PC croît avec l'augmentation de la concentration en cadmium. Cependant cette observation s'accompagne d'une répartition différente des PC. En effet, avec l'augmentation de la quantité totale des PC, est observée la diminution des PC LMW au profit des PC HMW.

Tous calculs faits, nous avons observé que pour une exposition à 10^{-5}M , 80 % des PC induites se trouvent dans les feuilles des organismes âgés de 18 jours. Si l'on suppose que la répartition des PC est comparable à celle du cadmium, nos résultats ne sont pas cohérents avec ceux de Page *et al.* (2006) qui ont mis en évidence une forte rétention du cadmium (80 %) dans les racines de *Lupinus albus* d'âges différents (1 à 28 jours). Souza et Rauser (2003) ont obtenu des résultats similaires sur le radis *Raphanus sativus* et le maïs *Zea mays*, où respectivement 69 % et 88 % du cadmium était présent dans les racines. Par contre, des résultats conformes à ceux de la présente étude ont été obtenus par Keltjens et Van Beusichem (1998) sur *Zea mays L.* exposé pendant 15 jours à 3,75 μM de Cd. Dès le 5^{ème} jour d'exposition, la quantité de PC devient plus importante dans les feuilles que dans les racines avec respectivement 7,2 moles de PC / mole de Cd contre 5,8 moles de PC / mole de Cd. Au 13^{ème} jour, cet écart est plus important avec 4,5 moles de PC / mole de Cd dans les feuilles contre 2,1 moles de PC / mole de Cd dans les racines. La diminution de la quantité globale de PC observée chez ces auteurs peut s'expliquer par le passage des PC LMW vers les HMW. Des résultats similaires ont été mis en évidence chez une plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens* âgée de six mois, exposée à 50 ou 100 μM de CdSO_4 (Ma *et al.*, 2005). Plus

précisément, 65 à 70 % du cadmium total contenu au niveau des feuilles se trouve dans les tissus du mésophylle et 91% de ce cadmium est localisé dans les vacuoles. *A contrario*, certaines espèces, comme *Euglena gracilis*, ont pour stratégie l'accumulation de cadmium dans les chloroplastes (Mendoza-Còzatl et Moreno-Sánchez, 2005).

Ces résultats contradictoires semblent montrer que les plantes peuvent avoir différentes stratégies quant à la répartition racines/feuilles des PC (et donc du cadmium chélaté par ces dernières).

Nos résultats nous ont permis de mettre en évidence le caractère précoce de l'induction des PC dans la vie de *Vicia faba*. Considérant les deux phases expérimentales de la germination (imbibition, pousse des racines primaires), une exposition à 10^{-5} M de CdCl_2 pendant l'une ou l'autre induit une différence de réponse par rapport au témoin. Cette différence se fait principalement au niveau des cotylédons, où la quantité de GSH est environ trois fois moins élevée dans les lots traités que dans les lots témoins et la quantité de PC_2 présente est environ 6 à 7 fois plus grande dans les lots exposés que dans les lots témoins. Au niveau racinaire, seule la quantité de PC_2 diminue : celle-ci est environ 5 fois plus grande dans les lots exposés que dans les lots témoins (En comparant les divers traitements entre eux, aucune autre différence significative n'est observée).

La quantité de PC_2 plus importante au niveau des cotylédons peut être mise en relation avec le fait que c'est le lieu où le métabolisme est le plus important, à ce moment de la vie du végétal. La forte présence de PC_2 permettrait ainsi à la plante de se prémunir des conséquences néfastes que pourrait avoir le cadmium lors de cette période très importante pour le développement de la plante. Le fait que seule la PC_2 soit induite peut être expliqué par le fait que la plante va mobiliser l'énergie minimale nécessaire à sa protection vis-à-vis du métal. De plus à ce stade, la plante ne présente pas de compartiment dit « de stockage » où le métabolisme est moindre et où le cadmium serait susceptible de causer moins de dégâts.

L'âge des plantules joue également un rôle dans la réponse de *Vicia faba*. En effet dans les racines de plantules âgées de 9 jours, exposées à 10^{-5} M de CdCl_2 pendant une durée de 10 jours, seules les PC_2 sont induites, et la quantité semble diminuer avec le temps. Pour les plantules de 18 jours. Dès le troisième jour, toutes les PC racinaires sont induites et leurs quantités respectives restent stables tout au long de l'expérience. Au niveau foliaire il faudra attendre 24 heures de plus pour trouver toutes les PC. Cependant, contrairement à ce qui a été observé dans les racines, au fil du temps, les quantités de PC_2 et de PC_6 tendent à augmenter pour atteindre une quantité deux fois plus importante au dernier jour qu'au 3^{ème}.

De telles quantités ne font que confirmer la stratégie de la plante à détoxifier le cadmium en le stockant au niveau foliaire. La forte présence de PC₂ reste néanmoins problématique. Cependant elle peut être justifiée, par une possible utilisation lors du transport du cadmium soluble chélaté (Vögeli-Lange et Wagner, 1990 ; 1996). Les PC 3 à 5 ne joueraient alors qu'un rôle d'intermédiaires, primordial à l'obtention de la quantité nécessaire de PC₆. Ces résultats sur individus âgés semblent être en contradiction avec les résultats obtenus sur *Zea mays L.* par Keltjens et Van Beusichem (1998), précédemment cités, où les auteurs mettaient en évidence une diminution de la quantité totale des PC avec le temps d'exposition. Une fois de plus, cet exemple met en évidence la complexité du phénomène de résistance aux métaux chez les végétaux. Un même mécanisme semble ainsi se dérouler de manière différente, non seulement en fonction des différentes espèces végétales, mais aussi au sein d'une même espèce en fonction de son niveau de développement.

Les feuilles les plus anciennes (dites de rang 1) présentent une quantité maximale de PC dès le troisième jour, alors qu'il faudra attendre le septième jour pour les feuilles dites de rang 2 et l'apex. Fort logiquement le stockage des métallos-complexes se fait chronologiquement c'est-à-dire dans les tissus qui se développent en premier. Lorsque l'exposition s'interrompt après 48 heures, seules des LMW sont induites (PC₂ et PC₃). Les trois premiers jours, seule PC₂ est induite en quantité plus importante chaque jour. Bien que l'exposition ait été arrêtée le deuxième jour, la quantité maximale de PC₂ induite est constatée le troisième jour et ce, quelle que soit la partie végétale considérée. Puis, la quantité de PC₂ diminue avec l'apparition de PC₃ et avec le temps. Cependant, il est à noter que les quantités de PC₃ induites présentent de grands écarts-types. Des profils similaires avaient été observés dans les racines de *Silene vulgaris* exposées entre 24 et 30 heures à 180 µM de cadmium. Les quantités maximales de PC (PC 2 à 4) induites étaient obtenues 48 heures après la fin de l'exposition (Knecht *et al.*, 1995). Cette diminution des PC après arrêt de l'exposition semble générale et a été observée par d'autres équipes de recherche, par exemple par Morelli et Scarano (2001) sur une culture cellulaire de *Phaeodactylum tricornutum* exposée 8 heures à 10 µM de Cd : 25 heures après l'exposition 65 à 70 % des PC avaient été dégradées. Kneer et Zenk (1997) avaient observé la même réaction sur des cultures cellulaires de *Rauvolfia serpentina* et *Silene cucubalus* après un traitement de 4 jours avec 200 µM de Cd(NO₃)₂. Mais, dans ce cas, la réponse est plus tardive car la dégradation ne se fait qu'à partir du 7^{ème} jour après la fin de l'exposition. Des réponses tardives ont également été mises en évidence par Knecht *et al.* (1995) sur des populations dites sensibles et tolérantes de *Silene vulgaris*. Ces végétaux ont poussé respectivement, pendant 14 jours sur un milieu de culture contenant 1 et 90 µM de CdSO₄, puis ont été respectivement exposés un jour à 30 et 180 µM. Dans les deux cas, une dégradation des PC a été observée 48 heures après la fin de l'exposition, et ce jusqu'à la fin de l'expérience (9 jours). Zenk (1996) a aussi mis en avant

cette dégradation avec une culture cellulaire de *Rauwolfia serpentina* exposée 3 jours à 200 μM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, six jours après la fin de l'exposition. Pendant les 10 jours que dure la dégradation la quantité totale de PC diminuera d'un facteur 10 pour atteindre la concentration finale de 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Une question se pose alors : que devient le cadmium incorporé par les végétaux après la déstructuration des PC ? Deux alternatives se présentent. La littérature scientifique ne manque pas d'exemples, mettant en évidence la prise en charge des ions métalliques non essentiels présents dans l'organisme par des molécules autres que les PC. Le plus souvent ces chélateurs sont des acides organiques et des acides aminés (Clemens, 2001). Suivant les espèces, les complexes peuvent soit aider à l'exclusion (Lindberg, 1990) soit prendre le relais des PC dégradées et assurer le maintien de la séquestration vacuolaire (Lichtenberger et Neumann, 1997) soit aider au transport et à l'accumulation du métal dans les trichomes (Clemens *et al.*, 2002).

De plus, cette dégradation joue un rôle énergétique non négligeable, en restituant une partie du GSH cytosolaire. Cette restitution d'une partie du GSH mobilisé pour la synthèse des PC a été mise en évidence par Grill *et al.* (1989) avec une culture cellulaire de *Silene cucubalus* (cf. expérience déjà présentée) ou encore par Morelli et Scarano (2001) avec *Phaeodactylum tricornutum* (cf. expérience précédemment citée).

La rapidité avec laquelle les PC sont induites ne semble pas être fonction de la concentration de cadmium. En effet, que les plantules (de 18 jours) de *Vicia faba* soient exposées à 10^{-5} ou à 10^{-3} M, il faudra moins d'une heure pour induire des PC à tous les niveaux. Cependant, cette concentration affecte la diversité des PC ainsi que leurs quantités respectives. Ainsi, à 10^{-5} M, il est difficile de retrouver toutes les catégories de PC pouvant être induites chez *Vicia faba*, alors qu'à 10^{-3} M, après une exposition de 24 heures, toutes les PC (de 2 à 6) sont synthétisées dans tous les compartiments étudiés. La stratégie est identique à tous les niveaux : jusqu'à 12 heures d'exposition à 10^{-3} M, il y a augmentation de la quantité des PC de faible poids moléculaire, puis leur quantité reste constante à 24 et 48 heures, mais la quantité de PC de haut poids moléculaire augmente avec le temps d'exposition.

Ces diverses analyses permettent de mettre en avant la différence de sensibilité entre l'apparition d'effets génotoxiques et l'induction des PC chez *Vicia faba*. Ainsi, contre toute attente, l'induction de PC n'a lieu que pour des concentrations d'au moins 10^{-7} M (11,2 $\mu\text{g Cd/L}$). La présence de micronoyaux dans les cellules méristématiques est, quant à elle, significative dès $7,5 \cdot 10^{-8}$ M, traduisant ainsi des dégâts au niveau nucléaire de façon très

précoce. Le biomarqueur induction de PC semble donc moins sensible que ne l'est la présence significative de micronoyaux. Cela soulève une question : pourquoi le végétal attend-il que le cadmium occasionne des dégâts au niveau du noyau pour activer ce système de défense ou bien s'agit-il d'un simple artefact dû simplement aux limites de détection analytique ?

Le cadmium est aussi, de manière indirecte, responsable d'un stress oxydant (Garnier *et al.*, 2006). Cela a été mis en évidence dès le stade le plus précoce du développement des végétaux, avec des graines d'*Arabidopsis thaliana* exposées à 300 et 500 μM de CdCl_2 pendant 21 jours (Cho et Seo, 2005). Ce stress se traduit par la présence d'une quantité importante d' H_2O_2 ainsi que par une forte peroxydation lipidique. Les auteurs ont également mis en évidence une diminution des activités de la SOD et de la catalase, et une augmentation de l'APX avec les concentrations croissantes en cadmium.

Chez les plantules de 18 jours de *Vicia faba* exposées 48 heures à des concentrations de CdCl_2 allant de 10^{-7} à 10^{-3} M, les dommages membranaires (racinaire et foliaire) sont moins importants que ceux observés chez *Arabidopsis thaliana* (Cho et Seo, 2005). Les activités enzymatiques observées tendent à diminuer à de fortes concentrations en cadmium. Seule l'évolution de l'activité de l'APX diffère : elle augmente chez *Arabidopsis thaliana* alors qu'elle diminue chez *Vicia faba*. En terme d'activité, il semblerait que *Vicia faba* soit moins affectée par le cadmium qu'*Arabidopsis thaliana*, car, à la plus forte concentration, les dommages lipidiques sont 400 fois plus faibles. De même, les activités de la catalase et de la SOD sont plus faibles que celles qui sont observées chez *Arabidopsis thaliana*, avec respectivement une activité de 2 et 1600 fois inférieure. Par contre, l'activité de l'APX est 30 fois plus élevée chez *Vicia faba*. Si l'on compare ces résultats à l'étude réalisée par Cordova Rosa *et al.* (2003) sur *Vicia faba* exposée à une gamme de concentrations de 2 à 2000 μM CdCl_2 , les activités enzymatiques sont plus élevées (facteur : 100) sauf pour la catalase, qui est plus faible dans les racines. Toutes les activités sont plus élevées dans les feuilles : c'est le cas pour l'APX, la SOD et la catalase avec des facteurs respectifs de 100, 50 et 5.

Les tendances constatées dans les racines sont identiques, mais les effets ne sont pas observés aux mêmes concentrations. Nous observons un pic d'activité de la SOD à 10^{-6} M alors que Cordova Rosa *et al.* (2003) le mettent en évidence à $2 \cdot 10^{-5}$ M, puis dans les deux cas, les activités SOD et catalase diminuent avec l'augmentation de la concentration en CdCl_2 .

Au niveau foliaire, nous observons une chute des activités avec l'augmentation de la concentration en CdCl_2 , alors que Cordova Rosa *et al.* (2003) n'observent pas de variation des activités. Ces différences pourraient être dues à la période de récupération de 24 heures, choisie par les auteurs. Elles peuvent aussi provenir de la variabilité individuelle due aux

différents lots dont proviennent les graines. En effet, les auteurs montrent un pic de génotoxicité (micronoyaux) à 2.10^{-4} M CdCl_2 , ce qui laisse penser que les graines utilisées seraient moins sensibles au cadmium.

Le suivi des activités enzymatiques sur les premières 48 heures d'exposition à 10^{-5} M est intéressant à plusieurs titres. Tout d'abord la quantité de MDA montre que les dégâts membranaires apparaissent dès les premiers instants de l'exposition dans les racines. Par ailleurs, cette analyse permet aussi de suivre l'évolution du cadmium au sein de l'organisme, des racines vers les feuilles. En effet, la quantité maximale de MDA, dont la valeur varie en fonction du compartiment considéré, est successivement observée dans les différents compartiments du végétal : d'abord dans les parties racinaires (après 1 heure d'exposition), ensuite dans les feuilles de rang 1 (après 3 heures d'exposition), puis dans les feuilles de rang 2 (après 6 heures d'exposition) enfin dans l'apex (à 24 heures d'exposition). Cette succession a été précédemment décrite par Clemens *et al.* (2002). Les activités de la catalase sont identiques dans les parties racinaires et aériennes. Par contre, celles de l'APX et de la SOD présentent un décalage vers un temps d'exposition plus important (six heures) dans les racines. Il semble intéressant de comparer les résultats d'activités enzymatiques aux résultats de l'induction des PC. En effet, cette diminution des activités enzymatiques correspond aux temps d'exposition auxquels toutes les PC sont induites. Cette expérience tend à montrer l'imbrication entre ces deux mécanismes de résistance aux métaux.

Ainsi, pour qu'il y ait une induction efficace des PC, il semblerait qu'une quantité importante de cadmium atteigne le noyau. Il n'est pas exclu que d'autres signaux provenant de l'inhibition d'autres mécanismes de défense, comme l'inhibition des activités enzymatiques liées au stress oxydant, puissent venir renforcer cette première information.

Néanmoins, la réponse à l'exposition au CdCl_2 de *Vicia faba*, semble se décomposer en trois phases. Une phase de génotoxicité, où le maximum de micronoyaux est obtenu à $2,5.10^{-7}$ M ; une phase de tolérance qui présente néanmoins un stress où les enzymes du stress oxydant sont en pleine activité et où débute l'induction des PC (zone comprise entre 10^{-7} et 10^{-6} M) ; enfin une dernière phase où l'induction des PC est plus importante à partir de 10^{-5} M. Lors de cette troisième phase, l'induction des PC présente une variabilité moins importante que celle observée lors de la phase deux. Cette organisation peut s'expliquer, car l'induction de PC est plus coûteuse du point de vue du métabolisme (à cause de la mobilisation des acides aminés et du soufre qu'il nécessite).

Lors des expérimentations en phase solide, quatre sols caractérisés ont été choisis. Une analyse en composantes principales (ACP) avec les caractéristiques connues des sols

(Carbone organique total, CEC, pH, capacité de rétention en eau, granulométrie : particules < à 0,02 mm) permet de classer ces sols. Seuls trois critères apparaissent primordiaux (Carbone Organique Total, granulométrie et la CEC). L'axe 1 (Carbone Organique total, granulométrie) explique 69,5% de l'information, l'axe 2 (CEC) 28%.

Il a été décidé de développer une nouvelle analyse en composantes principales, prenant en compte, en outre, la génotoxicité du CdCl₂ sur *Vicia faba*. Elle conduit à un autre regroupement des sols. Les LOEC obtenues classent les sols en trois groupes. Le premier, le plus génotoxique (LOEC = 41,7 mg de CdCl₂ Kg⁻¹ de sol) ne comporte qu'un seul sol (LUFA 2.3). Le second comprend les deux sols : LUFA 3A et Aspach Seilgraben 1 (LOEC : 52 mg de CdCl₂ Kg⁻¹ de sol). Le dernier sol LUFA 2.2 présente une LOEC à 62 mg de CdCl₂ Kg⁻¹ de sol.

Pourtant, si l'on tient compte des facteurs d'induction, un autre regroupement de sol est observé. En effet, le LUFA 2.2 présente le plus grand pic de génotoxicité pour une concentration de 93,5 mg de CdCl₂ Kg⁻¹ de sol. Le LUFA 3A, malgré ses différences physico-chimiques, présente un pic génotoxique à la même concentration. La quantité de MNX est nettement plus faible (facteur 0,5), conférant un pouvoir génotoxique plus faible, qui serait lié à une quantité de fines particules plus importante, ce qui rendrait le cadmium moins biodisponible. Le sol LUFA 2.3 présente un pic génotoxique à la concentration de 104 mg de CdCl₂ Kg⁻¹ de sol, traduisant une moindre biodisponibilité du métal. Ceci peut s'expliquer malgré une diminution de la CEC par une quantité plus élevée de fines particules. La capacité d'échange cationique est affectée par d'autres facteurs du sol qui ne sont pas pris en compte dans cette analyse. Ainsi, la diminution du potentiel génotoxique du sol pourrait être également lié à la nature même de l'argile présente dans les sols, au rapport carbone/ azote, ainsi que la richesse en éléments nutritifs. De plus, la quantité de MNX, pour ce sol, est plus faible (facteur 0,25). Le sol Aspach Seilgraben1, qui était initialement décrit comme étant le sol le plus proche du LUFA 2.2 répond à une concentration plus faible en CdCl₂ (72,5 mg Kg⁻¹ de sol) mais présente une quantité de MNX nettement plus faible (facteur 0,3). La dernière ACP intégrant les données de génotoxicité permet d'expliquer partiellement la formation des MNX (Annexe M). Suivant les axes 1 et 2, la formation des MNX est expliquée pour 30 % par la concentration en cadmium élevée et la teneur en carbone organique faible et pour 26 % par une CEC faible. Suivant les axes 1 et 3, les MNX sont liés à la granulométrie (faible quantité de fines particules) pour 30 % et par une CEC faible pour 21 %. Ainsi l'information n'explique l'effet génotoxique du cadmium qu'à hauteur de 51 à 56 %. Les 50 % restant sont liés à d'autres facteurs.

Il faut ajouter que la LOEC (MNX) ne semble pas suffire pour caractériser la réponse génotoxique des sols, car les facteurs d'induction des MNX semblent tenir compte d'autres

caractéristiques des sols, qui influent sur la biodisponibilité des métaux. Ces premiers résultats, en phase solide, constituent une phase exploratoire et demandent à être confirmés.

La même gamme de concentrations a été testée sur les activités des enzymes du stress oxydant ainsi que sur l'induction des PC chez *Vicia faba* intoxiquée dans le sol LUFA 2.2. Alors que l'induction des PC n'est que partielle, le niveau des activités enzymatiques traduit l'existence d'un stress lié au cadmium. Les enzymes montrent des sensibilités différentes. L'activité de l'APX est la première à chuter dès 62,5 mg de $\text{CdCl}_2 \text{ Kg}^{-1}$ de sol, suivie des activités de la GPX et de la GR à 83 mg de $\text{CdCl}_2 \text{ Kg}^{-1}$ et enfin de la chute des activités de la catalase ainsi que de la SOD à 93,5 mg de $\text{CdCl}_2 \text{ Kg}^{-1}$. L'induction des PC n'est clairement établie qu'à des concentrations en CdCl_2 plus élevées (à partir de 750 mg Kg^{-1} de sol). Les résultats avec ces expositions en milieu solide confirment ceux obtenus en milieu liquide, permettant de proposer ainsi une succession de divers effets, suite à une exposition au cadmium (figure 76).

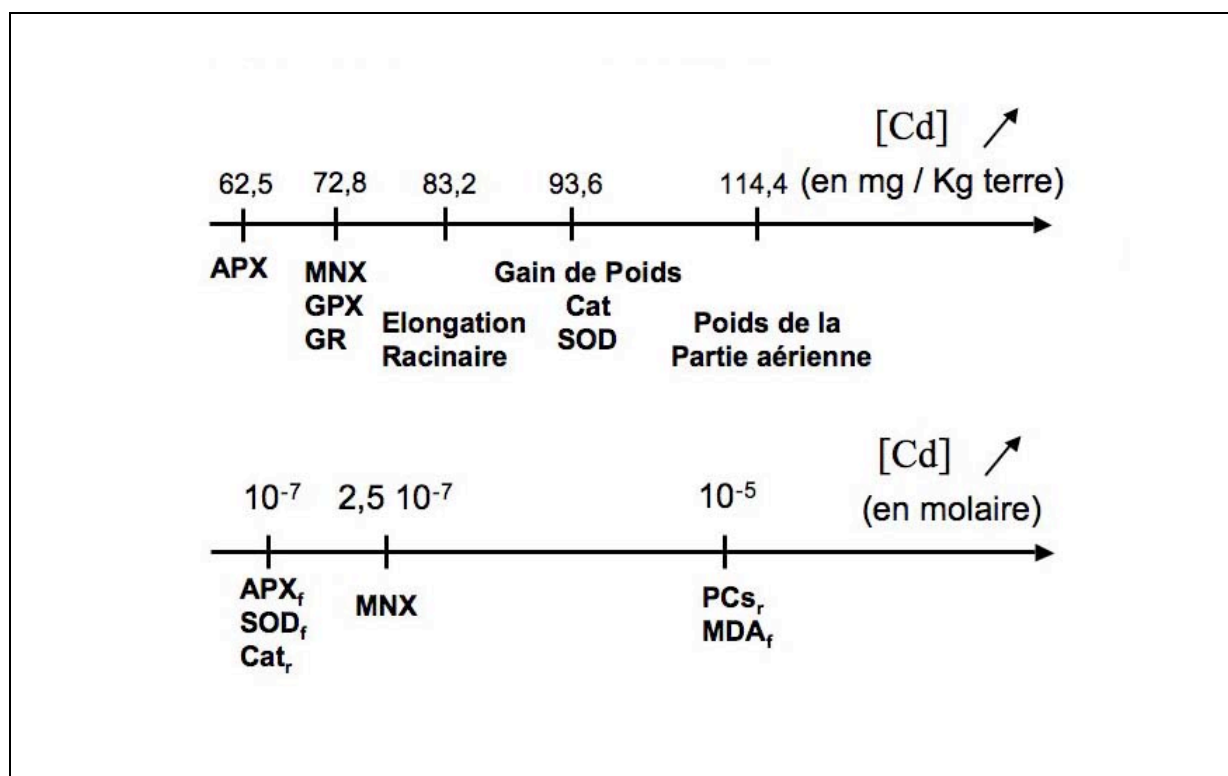


Figure 76 : Echelles de sensibilité des biomarqueurs étudiés. MNX : micronoyaux, APX : Ascorbate peroxydase, GPX : Guaiacol peroxydase, GR : Glutathion réductase, Cat : catalase, SOD : Superoxyde dismutase, MDA : malondialdéhyde, PC : Phytochélatines, r : racinaire, f : foliaire, Cd : Cadmium.

Une intoxication à long terme à la concentration de 93,5 mg de $\text{CdCl}_2 \text{ Kg}^{-1}$ de sol (pic génotoxique avec le sol LUFA 2.2) a des conséquences sur le développement de ces

individus. En effet, quatre mois après l'exposition, les individus exposés ne semblent pas fertiles, faute de présence de fruit, contrairement au lot témoin. Ces résultats vont dans le sens de travaux réalisés (en milieu liquide) sur plusieurs espèces *Vicia angustifolia*, *Vicia tetrasperma*, *Pisum sativum*, *Medicago hispida* et *Plantago depressa* (Xiong *et al.*, 2001). Cette équipe a ainsi mis en évidence, *in vitro* chez l'ensemble des espèces testées, une inhibition de la germination du pollen par 2,51 µg/mL de cadmium ainsi qu'une inhibition de la croissance du tube pollinique par 1,58 µg/mL de cadmium après une exposition de deux heures. Les espèces de *Vicia* utilisées par cette équipe montrent une plus grande sensibilité, puisque deux heures d'exposition à 0,01 µg/mL de cadmium ont suffi à inhiber à la fois la germination du pollen et la croissance du tube pollinique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au regard de l'ensemble des tests *Vicia faba*-micronoyaux réalisés tout au long de ces travaux, ce test apparaît comme un outil de bioévaluation utile à la caractérisation des matrices complexes, aussi bien en phase liquide qu'en phase solide.

Cependant, il convient de garder à l'esprit les variations qui peuvent intervenir lors du test. Dans la norme AFNOR T90-327 (2004), les résultats obtenus par différents laboratoires à l'occasion d'un test d'intercalibration, montrent une variabilité importante de l'indice mitotique et du facteur d'induction des micronoyaux. Cette variabilité se vérifie aussi bien entre les tests réalisés au sein du même laboratoire (pour une concentration de $2,5 \cdot 10^{-7}$ M, MNX = $39,33 \pm 10,01$ %) qu'entre ceux effectués dans les différents laboratoires (pour une concentration de $2,5 \cdot 10^{-7}$ M, l'indice mitotique varie de $70,33 \pm 19,47$ % à $15,33 \pm 5,20$ %). Cette variabilité peut être imputable à l'identification, par l'expérimentateur, des diverses formes de mitoses ou d'aberrations chromosomiques (biais de lecture). De plus, le matériel biologique utilisé provient de lots différents et cela peut donc influencer sur la variabilité intra spécifique (biais biologique). Ceci étant, les pics de génotoxicité correspondent tous à la même concentration de $2,5 \cdot 10^{-7}$ M de CdCl₂. Cela démontre bien la reproductibilité du test (Sang et Li, 2004).

Les résultats des tests réalisés avec les divers sols standardisés nous montre qu'il ne faut pas seulement tenir compte de la LOEC ou du facteur d'induction des micronoyaux. Il convient aussi de prendre en compte le pic de génotoxicité ainsi que la valeur du facteur d'induction correspondant afin de tirer les conclusions au plus juste.

De plus, il convient de prendre en compte d'autres facteurs du sol, tels que la granulométrie, le pourcentage d'argile. Il serait également intéressant de faire la distinction entre le pourcentage d'acide humique (peu mobile) et celui d'acide fulvique (très mobile et responsable de la podzolisation).

En ce qui concerne l'induction des PC, l'étude pourrait être affinée par un suivi de la quantité de cadmium présente dans les divers compartiments, parallèlement au suivi de l'induction des PC. Cette étude pourrait être entreprise par exemple, par un dosage du cadmium présent sur les mêmes individus à l'aide du radioisotope ^{109}Cd . Une étude sur le suivi de l'incorporation du soufre au sein de l'organisme combiné au pouvoir chélateur des PC permettrait d'approfondir l'étude du mécanisme permettant le passage des PC LMW aux PC HMW. Cette expérience pourrait être effectuée à l'aide du radioisotope ^{35}S .

Ces études intégrant les marqueurs radioactifs pourraient être décomposées en deux parties. La première se déroulant *in vitro*, à l'aide de la PC d'*Arabidopsis thaliana* obtenue à partir du bioétalon. Cela pourra aider à l'interprétation des résultats obtenus *in vivo*, sur *Vicia faba* dans une seconde partie.

Ces études complémentaires pourraient conduire à de nouvelles applications, à un test micronoyaux en phase solide qui nécessiterait moins de temps et une infrastructure moins importante afin de vérifier l'état d'un sol. *Vicia faba* présente les caractéristiques d'un bon outils potentiel de terrain. En effet, cette espèce possède une aire de répartition géographique étendue, et sa culture est maîtrisée depuis longtemps.

De plus, lors de son développement, *Vicia* présente une biomasse assez importante et il semblerait qu'elle accumule le cadmium incorporé dans ses parties aériennes, ce qui constitue des facteurs principaux pour une éventuelle utilisation en phytoremédiation.

Ces études complémentaires permettraient de vérifier si *Vicia faba* présente un intérêt pour les équipes de recherche travaillant dans ce domaine par rapport aux outils déjà existants.

LISTE BIBLIOGRAPHIQUE

- ABRAHAMSON S.L., SPEISER D.M. AND OW D.W., 1992.** A gel electrophoresis assay for phytochelatin. *Anal. Biochem.*, **200**, 239-243.
- ADAM L. AND WALDEMAR S., 1998.** The effect of salinity on toxic influence of heavy metals towards planktonic green algae. *Biologia* **53**, 547-555.
- ADRIANO D.C., 1992.** Biogeochemistry of Trace Metals. (Publishes by Lewis), Boca Raton.
- ADRIANO D.C.** Trace elements in Terrestrial Environments. Springer, Heidelberg, Berlin, 2001.
- AFNOR NF T90-327, 2004.** Qualité du sol. Evaluation des effets génotoxiques sur végétaux supérieurs. Evaluation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les racines secondaires de *Vicia faba*. Paris : AFNOR, 13 p
- ALLOWAY B.J. AND JACKSON A.P., 1991.** The behaviour of heavy metals in sewage sludge-amended soils. *Sci. total environ.*, **100**, 151-176.
- ALSCHER R.G., DONAHUE J.L. AND CRAMER C.L., 1997.** Reactive oxygen species and antioxidants : relationships in green cells. *Physiol. Plant.*, **100**, 224-233.
- ALSCHER R.G., ERTURK N. AND HEATH L.S., 2002.** Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.*, **53**, 1331-1341.
- ARAVIND P. AND PRASAD M.N.V., 2003.** Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiology and Biochemistry*, **41**, 391-397.
- ASADA K., 1994.** Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In : Foyer C.H. and Mullineaux P.M., (Eds), *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, CRC press, Boca raton, 77-104.

- BABICH H. AND STOTZKY G.C.** Influence of chemical speciation on the toxicity of heavy metals to the microbiota. Nriaga J.O. (Eds) *Aquatic Toxicologie*. John Wiley and Sons, New York, 1983, 1-46.
- BACKER A.J.M., EWART K., HENDRY G.A.F., THORPE P.C. AND WALKER P.L.,** 1990. The evolutionary basis of cadmium tolerance in higher plants. In : 4th International Conference on Environmental Contamination. October 1990, Barcelona, Spain, 23-29.
- BARROW N.J. AND COX V.C.,** 1992. The effects of pH and chloride concentration on mercury adsorption II: by a soil. *J. Soil Sci.*, **43**, 305–312.
- BEA W. AND MEHRA R.K.,** 1997. Metal-binding characteristics of a phytochelatin analog (Glu-Cys)₂Gly. *J. Inorg. Biochem.*, **68**, 201-210.
- BISHNOI N.R., SHEORAN I.S. AND SINGH R.,** 1999. Influence of cadmium and nickel on photosynthesis and water relations in wheat leaves of different insertion level. *Photosynthetica*, **28**, 473-479
- BRADL H.B.** Sources and origins of heavy metals. Bradl H.B. (Eds). In: Heavy metals in the environment : Origin, interaction and remediation. Elsevier, 2005, 1-25.
- BRADL H.B., KIM C., KRRAMAR U. AND STÜBEN D.** Interactions of heavy metals. Bradl H.B. (Eds). In: Heavy metals in the environment : Origin, interaction and remediation. Elsevier, 2005, 28-147.
- BROWN D.H. AND SLINGSBY D.R.,** 1972. The cellular localisation of lead and potassium in the lichen *Cladonia rangiformis* L. Hoffm, *New Phytol.*, **71**, 297-305
- BUENO P. AND DEL RIO L.A.,** 1992. Purification and properties of glyoxisomal cuprozinic superoxide. *Plant physiol.*, **98**, 331-336.
- CAILLE N., VAULEONB C., LEYVAL C., MOREL J.L.,** 2005. Metal transfer to plants grown on a dredged sediment: use of radioactive isotope ²⁰³Hg and titanium. *Sc. of Tot. Env.*, **341**, 227– 239.

- CAMPBELL W.H., 1999. Nitrate reductase structure, fonction and regulation : bridging the gap between biochemistry and physiologi. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 277-303.
- CARLSON C. AND ADRIANO D.C., 1993. Environmental impacts of coal combustion residues. *J. Environ. Qual.*, **22**, 227-247.
- CHANG L.W. Toxicology of metals. CRC Press, Boca Raton, FL, 1996.
- CHAOUI A., MAZHOUDI S., HABIB GHORBAL M. AND EL FERJANI E., 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) . *Plant Science*, **127**, 139-147.
- CHEN J. AND GOLDSBROUGH P.B., 1994. Increased activity of γ -glutamylcysteine synthetase from tomato cells selected for cadmium tolerance. *Plant Physiol.*, **106**, 233-239.
- CHEN, T.B., HUANG, Z.C., HUANG, Y.Y., XIE, H AND LIAO, X.Y., 2003. Cellular distribution of arsenic and other elements in hyperaccumulator *Pteris nervosa* and their relations to arsenic accumulation. *Chin. Sci. Bull.* **48**, 1586–1591.
- CHEN J. ZHOU J. AND GOLDSBROUGHT P.B., 1997. Characterization of phytochelatin synthase from tomato. *Physiol. Plant*, **101**, 165-172.
- CHO U.H. AND SEO N.H., 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sc.*, **168**, 113-120.
- CHRISTENSEN T.H., 1984. Cadmium soil sorption at low concentrations: I. Effect of time, cadmium load, pH, and calcium. *Water Air Soil Pollut.*, **21**, 105-114.
- CHRISTIE N.T. AND COSTA M., 1984. *In vitro* assessment of the toxicity of metal compounds. IV. Deposition of metals in cells : Interactions with membranes, glutathione, metallothionein and DNA. *Biol. Trace elem. Res.*, **6**, 139-158

- CHUGH L.K. AND SAWHNEY S.K.**, 1999. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in the presence of cadmium. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**, 297-303.
- CLEARY D., THORNTON I., BROWN N. KANZANTIS G., DELVES T. AND WASHINGTON S.**, 1994. Mercury in Brazil. *Nature*, **369**, 613
- CLEMENS S.**, 2001. Molecular mechanisms of plant tolerance and homeostasis. *Planta*, **212**, 475-486.
- CLEMENS S., KIM E.J., NEUMANN D. AND SCHROEDER G.I.**, 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthesis from plants and yeast. *EMBO. J.*, **18** , 3325-3333.
- CLEMENS S., PALAMGREN M.G. AND KRÄMER U.**, 2002. A long way ahead : understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in plant Sc.*, **7**, 309-315.
- CLEMENS S., SCHROEDER J. AND DEGENKOLD T.**, 2001. *Caenorhabditis elegans* expresses a functional phytochelatin synthase. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3640-3643.
- CLIVE D., SPECTOR J.F.S.** Comparative chemical mutagenesis: an overview. In : Proceedings of comparative chemical mutagenesis workshop, De Serres F.J. (Eds.), National Institute for Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 1978.
- COBBETT C.S.**, 2000a. Phytochelatins and their roles in heavy metals detoxication. *Plant physiol.*, **123**, 825-832.
- COBBETT C.S.**, 2000b. Phytochelatins biosynthesis and function in heavy metal detoxication. *Curr. Opin. Plant Physiol.*, **3**, 211-216.
- COBBETT C.S. AND GOLDSBROUGH P.B.**, 2000. Mechanisms of metal resistance: Phytochelatins and metallothioneins. In phyto remediation of toxic metals: using Plants to clean up the environment. Raskin I. and Ensley B.D. (Ed), Wiley J. and sons, inc., **14**, 247-269

- COBBETT C.S., MAY M.J. HOWDEN R. AND ROLLS B.,** 1998. The glutathione deficient, cadmium-sensitive mutant, *cad2-1*, of *Arabidopsis thaliana* is deficient in γ -glutamylcysteine synthase. *Plant J.*, **16**, 73-78.
- CONSTANTIN M.J. AND NILAN R.A.,** 1982. Chromosome aberration assays in barley (*Hordeum vulgare*) - A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, **99**, 13-36.
- CONSTANTIN M.J. AND OWENS E.T.,** 1982. Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays. *Mutat. Res.*, **99**, 1-12.
- CONTE C., MUTTI I., PUGLISI P., FERRARINI A., REGINA G., MAESTRI E. AND MARMIROLI N.,** 1998. DNA fingerprinting analysis by PCR-based method monitoring of genotoxic effects of heavy metals pollution. *Chemosphere* **37**, 2739-2749.
- CORDOVA ROSA E., VALGAS C. SOUZA-SIERRA M.M., CORREA A.X.R. AND RADETSKI C.M.,** 2003. Biomass growth, micronucleus induction, and antioxidant stress enzyme responses in *Vicia Faba* exposed to cadmium in solution. *Env. Toxicol. Chem.*, **22**, 645-649.
- COSSU C., DOYOTTE A., JACQUIN M.C., VASSEUR P.** Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène, dans « Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux », Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (Eds), Masson, Paris, 1997, 125-145.
- COTELLE S.,** 1999. Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide de plantes supérieures. *Thèse*, Université de Metz-U.F.R. Sci. F.A.
- COTELLE S. MASFARAUF J.F. AND FERARD J.F.,** 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the allium / *Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus. *Mutat. Res.*, **426**, 167-171.

- COURBOT M., DIEZ L., RUOTOLO R., CHALOT M. AND LEROY P., 2004. Cadmium-Responsive Thiols in the Ectomycorrhizal Fungus *Paxillus involutus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 7413-7417.
- COWAN C.E., ZACHARA J.M. AND RESCH C.T., 1991. Cadmium adsorption on iron oxides in the presence of alkaline-earth element. *Environ. Sci. Technol.*, **25**, 437-446
- DARBY D.A., ADAMS D.D. ET NIVENS W.T., 1986. In « Sediment and Water Interaction » (Ed. P.G.Sly.), Springer, Heidelberg, Berlin, 343-351.
- DAVIS J.A. AND LECKIE J.O., 1980. Surface ionization and complexation at the oxide / water interface. III. Adsorption of anions. *J. Coll. Interf. Sci.*, **74**, 32-43.
- DE FILIPPIS L.F., 1979. The effect of heavy metals compounds on the permeability of *Chlorella* cells. *Z. Pflanzphysiol.*, **79**, 39-49
- DE FILIPPIS L.F. AND ZIEGLER R., 1993. Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photozynthetic carbon reduction cycle of *Euglena*. *J. Plant Physiol.*, **142**, 167-172
- DE FLORA S., VIGANO L., D'AGOSTINI F., CAMOIRANO A., BAGNASCO M., BENNICELLI C., MELODIA F. AND ARILLO A., 1993. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutat. Res.*, **319**, 167-177.
- DEGRASSI F. AND RIZZONI M., 1982. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. *Mutat. Res.*, **97**, 19-33.
- DE KNECHT J.A., VAN BAREN N., TEN BOOKUM W.T., WONG FONG SANG H.W., KOEVOETS P.L.M., SCHAT H. AND VERKLEIJ J.A.C., 1995. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Sci.*, **106**, 9-18.

- DELHAIZE E., JACKSON P.J., LUJAN L.D. AND ROBINSON N.J., 1989. Poly(γ -glutamylcysteinyl)glycine synthesis in *Datura innoxia* and binding with cadmium. *Plant Physiol.*, **89**, 700-706.
- DE MARCO A., DE SALVIA R., POLANI S., RICORDY R., SORRENTI F., PERTICONE P., COZZI R., D'AMBROSIO C., DE SIMONE C., GUIDOTTI M., ALBANESI A.T., DURANTI B.G., FESTA B.F., GENSABELLA B.G. AND OWCZAREK B.M., 2000. Evaluation of Genotoxic and Cytotoxic Properties of Pesticides Employed in Italian Agricultural Practices. *Env. Res. Section A*, **83**, 311-321.
- DERAM A., DENAYER F.O., PETIT D. AND VAN HALUWYN C., 2006. Seasonal variations of cadmium and zinc in *Arrhenatherum elatius*, a perennial grass species from highly contaminated soils. *Env. Poll.*, **140**, 62-70.
- DE SIMONE C., PICCOLO A., DE MARCO A. AND RINALDI C., 1995. Antimutagenic activity of soil humic extracts on *Vicia faba*. *Fresen. Environ. Bull.* **4**, 725-730.
- DE VOS C.H.G., SCHAT H., DEWAAL M., YUIJIS R. ET ERNST W.H.O., 1991. Increased resistance to copper-induced damage of the root cell plasmalemma in copper tolerant *Silene cucubalus*. *Physiol. Plant.*, **82**, 523-533
- DE VOS C.H.R., VOOIJS H., SCHAT H. AND ERNST W.H.O., 1989. Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Saline cucubalus*. *J. Plant Physiol.*, **135**, 165-169
- DOMINGUEZ-SOLIS J.R. GUTIERREZ-ALCALA G., ROMERO L.C. AND GOTOR C., 2001. Cytosolic *O*-acetylserine(thiol)lyase gene regulated by heavy metals and can function in metal tolerance. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9297-9302.
- DRUMM-HERREL H., GERHÄUßER U. AND MOHR H., 1989. Differential regulation by phytochrome of the appearance of plastidic and cytoplasmatic isoforms of glutathione reductase in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. *Planta* **178**, 103-109.

- DRYANOVSKA O.A.**, 1987. *Tradescantia paludosa* as a plant test system for mutagenicity of lead ions. *Bulg. Aca. Sci. Bull.*, **40**, 113-116.
- DUAN C., HU B., GUO T., LUO M., XU X., CHANG X., WEN C., MENG L., YANG L. AND WANG H.**, 2000. Changes of reliability and efficiency of micronucleus bioassay in *Vicia faba* after exposure to metal contamination for several generations. *Env. and Exp. Bot.*, **44**, 83–92.
- DUAN C., HU B., JIANGX.H., WEN C.H., WANG Z. AND WANG Y.X.**, 1999. Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.*, **426**, 121–125.
- EDWARDS E. RAWSTHORNE S. AND MULLINEAUX P.**, 1990. Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**, 278-284
- ELLIOTT H.A. AND DENNENY C.M.**, 1982. Soil adsorption of cadmium from solutions containing organic ligands. *J. Environ. Qual.*, **11**, 658-663.
- ENNEVER F.K., ANDREANO G. AND ROSENKRANZ H.S.**, 1988. The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. *Mutat. Res.*, **205**, 99-105.
- ERNST W.H.O.** Biochemical aspects of cadmium in plants, in J.O. Nriagu (ed.), *Cadmium in the environment, Part I, Ecological Cycling*. John Wiley and sons, New-York, 1980, 639-653.
- FENECH M.**, 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat. Res.*, **392**, 11-18.
- FENG S., WANG X., WEI G., PENG P., YANG Y. AND CAO Z.**, 2007. Leachates of municipal solid waste incineration bottom ash from Macao: Heavy metal concentrations and genotoxicity. *Chem.*, **67**, 1133–1137.

- FERRETTI M., GHISI L., MERLO F., DALLA VECCHIA F. AND PASSERA C., 1993.** Effect of cadmium on photosynthesis and enzymes of photosynthetic sulphate and nitrate assimilation pathways in maize (*Zea Mays L.*). *Photosynthetica*, **29**, 49-54
- FIELDER M.A. AND GERHARDT K.E., 1998.** Apparent differences in the posttranslational modification of peroxidase between flax genotrophs and genotypes and between normal and stress-induced isozymes. *Int. j. plant sci.*, **159**, 504 – 512.
- FISKESJÖ G.** Allium Test. In: In vitro toxicity testing protocols, edited by O'Hare S, Atterwill CK. Humana Press, Totowa, New Jersey, 1995, 119-127.
- FODOR F., SARVARI E., LANG F., SZIGETI Z. AND CSEH E., 1996.** Effects of Pb and Cd on cucumber depending on the Fe-complex in the culture solution. *J. Plant Physiol.*, **148**, 434-439
- FOYER C.H.** Oxygen metabolism and electron transport in photosynthesis, in I. Scandaliov (Ed.), *Molecular Biology of Free Radical Scavenging System*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York, 1997, 587-621
- FOYER C.H. AND HALLIWELL B., 1976.** The presence of glutathion and glutathione reductase in chloroplasts : a propose role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, **133**, 21-25.
- FOYER C.H. AND HARBINSON J.** The photosynthetic electron transport system : efficiency and control. In : Foyer C.H. and Quick W.P., (Eds), *A molecular approach to primary metabolism in higher plants*, Taylor and Francis, London, UK, 1997, 3-39.
- FOLEY R.C. AND SINGH K.B., 1994.** Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene : expression in foliar trichomes. *Plant Molecular Biology*, **26**, 435-444.

- FRENDO P., GALLESINI D., TURNBULL R., VAN DE SYPE G., HEROUART D. AND PUPPO A., 1999. Localization of glutathione and homogluthathione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in thier synthesis. *Plant J.*, **17**, 215-219.
- FRIDOVICH I, 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases, *Ann. Rev. Biochem.*, **64**, 97-112.
- FRIEDERICH M., KNEER R. AND ZENK M., 1998. Enzymatic synthesis of phytochelatin in gram quantites. *Phytochemistry*, **49**, 2323-2329.
- GADALLAH M.A.A., 1995. Effects of cadmium and kinetin on chlorophyll content, saccharides and dry matter accumulation in sunflower plants. *Biol. Plant.*, **37**, 233-240
- GAGNON C., VAILLANCOURT G. AND PAZDERNIK L., 1998. Influence of water hardness on accumulation and elimination of cadmium in two aquatic mosses under laboratory conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 12-20
- GALSOMIES L., AYRAULT S., CARROT F., DESCHAMPS C. AND LETROUIT-GALINOU M. A., 2003. Interspecies calibration in mosses at regional scale—heavy metal and trace elements results from Ile-de-France. *Atm. Env.*, **37**, 241-251.
- GARCIA-LIMONES C., HERVAS A., NAVAS-CORTES J.A., JIMÉNEZ-DIAZ R., AND TENA, M., 2002. Induction of an antioxydant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp.ciceris. *Physiological and Molecular Plant pathology* **61**, 325-337.
- GARCIA-SANCHEZ A., ALASTUEY A. AND QUEROL X., 1999. Heavy metal adsorption by different minerals: application to the remediation of polluted soils. *The Science of The Total Environment*, **242**, 179-188.

- GARNIER L., SIMON-PLAS F., THULEEAU P., AGNEL J.P., BLEIN J.P. RANJEVA R. AND MONTILLET J.L.,** 2006. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant, Cell and Env.*, **29**, 1956-1969.
- GEBHART E. AND ROSSMAN T.G.** Mutagenicity, carcinogenicity and tetragenicity, in E. Merian (Eds.), *Metals and Their Compounds in the Environment. Occurrence, Analysis and Biological Relevance*, Weiheim : VCH Verlagsgesellschaft, 1991, 617-640.
- GEKELER W., GRILL E., WINNACKER E.L. AND ZENK M.H.,** 1989. Survey of the plant kingdom for the ability to bind heavy metals through phytochelatin. *Z., Naturforsch.*, **44c**, 361-369.
- GICHNER T., BADAYEV S.A., DEMCHENKO S.I., RELICHOVA J., SANDHU S.S., USMANOV P.D., USMANOVA O., VELEMINSKY J.,** 1994. *Arabidopsis* assay for mutagenicity. *Mutat. Res.*, **310**, 249-256.
- GODET F., VASSEUR P., BABUT M.,** 1993. Essais de génotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'environnement hydrique. *Revue des Sciences de l'Eau*, **6**, 285-314.
- GOMBERT S., RAUSCH DE TRAUBENBERG C., LOSNO R., LEBLOND S., COLIN J. L AND COSSA D.,** 2004. Biomonitoring of Element Deposition Using Mosses in the 2000 French Survey: Identifying Sources and Spatial Trends. *J. Atoms. Chem.*, **49**, 1-24.
- GOPALAN H.N.B.,** 1999. Ecosystem health and human well being: the mission of the international programme on plant bioassays. *Mutat. Res.*, **426**, 99-102.
- GRABOWSKI J., KE-CHENG H., BAKER P.R. AND BOMMAN C.H.,** 1997. Fluorogenic compound hydrolysis as a measure of toxicity-induced cytoplasmic viscosity and pH. *Environ. Pollut.*, **98**, 1-5.

- GRACE N.D., ROUNCE J.R. AND LEE J., 1993. Intake and excretion of cadmium in sheep fed fresh herbage. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, **53**, 251-253.
- GRANT W.F., 1982a. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutation Research*, **99**, 273-291.
- GRANT W.F. Cytogenetic studies of agricultural chemicals in plants. In: Genetic toxicology: An agricultural perspective, edited by Fleck RA, Hollaender A. Plenum Press, New York, 1982b, 353-378.
- GRANT W.F. Plants as detectors of atmospheric mutagens. In: Handbook of hazardous materials, Anonymous Academic Press, 1993, 591-609.
- GRANT W.F., 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.*, **310**, 175-185.
- GRANT W.F., ZINOV'EVA-STAEVITCH A.E., ZURA K.D. Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens. In: Short-term tests for chemical carcinogens, edited by Stich HF, San RHC. Springer-Verlag, New York, 1981, 200-216.
- GREGER M. AND OGREN E., 1991. Direct and indirect effects of Cd²⁺ on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.*, **83**, 129-135
- GRIES G.E. AND WAGNER G.J., 1998. Association of nickel versus transport of cadmium and calcium in tonoplast vesicles of oat roots. *Planta*, **204**, 390-396.
- GRIFFITH O.W. AND MEISTER A., 1979. Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.*, **25**, 7558-7560.

- GRILL E., GEKELER W., WINNACKER E.L. AND ZENK M.H., 1986. Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS Lett.*, **205**, 7558-7560.
- GRILL E., LÖFFLER S., WINNACKER E.L. AND ZENK M.H., 1989. Phytochelatins, the heavy metal-binding peptides of plants, are synthesised from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.*, **86**, 6838-6842.
- GRILL E., THUMANN J., WINNACKER E.L. AND ZENK M.H., 1985. Induction of heavy metal binding phytochelatins by inoculation of cells cultures in standarts media. *Plan Cell Rep.*, **7**, 375-378.
- GRILL E., WINNACKER E.L. AND ZENK M.H., 1985. Phytochelatins ; The principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science*, **230**, 674-676.
- GRILL E., WINNACKER E.L. AND ZENK M.H., 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 439-443.
- GUERIN C., 1999. Essai micronoyau sur cellules méristématiques de pousses et racines d'orge (*Hordeum vulgare* L.) adapté à l'évaluation directe du potentiel génotoxique de sols pollués : mise au point et validation. *Thèse*, Université de Paris 7.
- GUSSARSSON M., 1994. Cadmium induced alterations in nutrient composition and growth of *Betula pendula* seedlings : the significance of fine roots as a primary target for cadmium toxicity. *J. Plant. Nutr.*, **17**, 2151-2163
- HA S.B., SMITH A.P., HOWDEN R., DIETRICH W.M., BUGG S. O'CONNEL M.J., GOLDSBROUGH P.B. AND COBBETT C.S., 1999. Phytochelatine synthase genes from *Arabidopsis* and a yeast *Schisosaccharomyces pombe*. *Plant Cell.*, **11**, 1153-1163.

- HAAG-KERWER A., SCHÄFER H.J., HEISS S., WALTER C. AND RAUSCH D., 1999. Cadmium exposure in *Brassica Juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on the photosynthesis. *J. Exp. Bot.*, **341**, 1827-1835.
- HABER, F., 1924. Zur geschichte des gaskrieges (On the history of gas warfare). In Miller F.J., Schlosser P.M. and Janszen D.B., 2000. Haber's rule: a special case in a family of curves relating concentration and duration of exposure to a fixed level of response for a given endpoint. *Toxicology* **149**, 21-34.
- HAGLUND K., BJORKLUND M., GUNNARE S., SANDBERG A., OLANDER V. AND PEDERSEN M., 1996. New method for toxicity assessment in marine and brackish environments using the macroalga *Gracilaria tenuistipitata* (Gracilariales, Rhodophyta), *Hydrobiol.*, **326**, 317-325.
- HALIM M., CONTE P. AND PICCOLO A., 2003. Potential availability of heavy metals to phytoextraction from contaminated soils induced by exogenous humic substances. *Chemosphere*, **52**, 265-275.
- HALL J.L., 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany*, **53**, 1-11.
- HALLIWELL B. AND GUTTERIDGE J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.*, **219**, 1-14.
- HEDDLE J.A., HITE M., KIRKHART B., MAVOURNIN K., MACGREGOR J.T., NEWELL G.W. AND SALAMONE M.F., 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity - A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, **61**, 118-127
- HEISS S., SCHÄFER H.J., HAAG-KERWER, A. AND RAUSCH T., 1999. Cloning sulfite assimilation genes of *Brassica juncea* L.: cadmium differentially affects the expression of a putative low-affinity sulfate transporter and isoforms of ATP sulfurylase and APS reductase. *Plant Mol. Biol.*, **39**, 847-857.

- HELL R., 1997. Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta*, **202**, 138-148.
- HERSCHBACH C. AND RENNENBERG H., 1994. Influence of glutathione (GSH) on the uptake of sulfate and sulfate transport in tobacco plants. *J. Exp. Bot.*, **45**, 1069-1076.
- HESSE H., LIPKE J., ALTMANN T. AND HÖFGEN R., 1999. Molecular cloning and expression analyses of mitochondrial and plastidic isoforms of cysteine synthase (O-acetylserine (thiol)lyase) from *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, **16**, 113-131.
- HILLMAN J.P., HILL J., MORGAN J.E., AND WILKINSON J.M., 2003. Recycling of sewage sludge to grassland: a review of the legislation to control of the localization and accumulation of potential toxic metals in grazing systems. *Grass and Forage Science*, **58**, 101-111.
- HIRSCH, D. AND A. BANIN., 1990. Cadmium speciation in soil solution. *J. Environ. Qual.*, **19**, 366-372.
- HOAGLAND D.R. AND ARNON D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil, Univ. Calif. Agric. Exp. Stn., Berkeley, CA, Circular No. **347**, 1-39.
- HOLM P.E., ANDERSEN B.B.H. AND CHRISTENSEN T.H., 1996. Cadmium solubility in aerobic soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **60**, 775-780.
- HOWDEN R., ANDERSEN C.R., GOLDSBROUGH P.B. AND COBBETT C.S., 1995a. A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **107**, 1067-1073.
- HOWDEN R., GOLDSBROUGH P.B., ANDERSEN C.R. AND COBBETT C.S., 1995b. Cadmium-sensitive, *cad1* mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.*, **107**, 1059-1066.
- HU S., LAU K.W.K., AND WU M., 2001. Cadmium sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Sc.*, **161**, 987-996.

- HUNTER T.C. AND MEHRA R.K., 1998. A role for *HEM2* in cadmium tolerance. *J. Inorg. Biochem.*, **69**, 293-303.
- HUSAINI Y., RAI L.C. AND MALLICK N., 1996. Impact of aluminium, fluoride and fluoroaluminate complex on ATPase activity of *Nostoc linckia* and *Chlorella vulgaris*. *Biometals*, **9**, 277-283.
- INZE D. AND VAN MONTAGU M., 1995. Oxidative stress in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **6**, 153-158.
- ISO 11274, 1998. Qualité du sol -- Détermination de la caractéristique de la rétention en eau -- Méthodes de laboratoire.
- JACKSON P.J., UNKEFER P.J., DELHAIZE E. AND ROBINSON N.J. Mechanisms of trace metal tolerance in plants. In : F. Katterman (Ed) *Environmental injury to plants*, Academic Press, Inc San Diego, New York. 1990.
- JAIN K., SINGH J., CHAUHAN L.K.S., MURTHY R.C. AND GUPTA S.K., 2004. Modulation of flyash-induced genotoxicity in *Vicia faba* by vermicomposting. *Ecotox. and Env. Saf.*, **59**, 89-94.
- JAYLET A., DEPARIS P., FERRIER V., GRINFELD S. AND SIBOULET R.A., 1986. new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water. *Mutat. Res.*, **164**, 245 -257.
- JENNETTE K.W., 1981. The role of metals in carcinogenesis: biochemistry and metabolism. *Env. Health Perspec.*, **40**, 223-252.
- JHA A.M. AND SINGH A.C., 1994. Clastogenicity of lanthanides - induction of micronuclei in root tips of *Vicia faba*. *Mutat. Res.*, **322**, 169-172.
- JUNG-HO S., JONG-WON Y. AND DONG-SEOG K., 1998. Effect of température on the accumulation of Pb^{2+} in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Technol.*, **8**, 412-415.

- JI Q., YANG H. AND ZHANG X., 1999. *Vicia* root-micronuclei assays on the clastogenicity of water samples from the Kui River near Xuzhou city, People's Republic of China. *Mutat. Res.*, **426**, 133–135.
- KABATA PENDIAS A. AND PENDIAS H. Trace elements in soils and plants. Pendias (Ed). CRC press, 2001, 413.
- KAIRONG C, GENSHENG X., XINMIN L., GENGMEI X. ET YAFU W., 1999. Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Science* **146**, 9-16.
- KANAYA N., GILL B.S., GROVER I.S., MURIN A., OSIECKA R., SANDHU S.S. AND ANDERSSON H.C., 1994. *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutat. Res.*, **310**, 231-247.
- KANAZAWA S., SANO S., KOSHIBA T., AND USHIMARU T., 2000. Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark-induced senescence *Physiol. Plant.* **109**, 211–216.
- KANEMATSU S. AND ASADA K., 1990. Characteristic Amino Acid Sequences of Chloroplast and Cytosol Isozymes of CuZn-Superoxide Dismutase in Spinach, Rice and Horsetail. *Plant and Cell Physiology*, **31**, 99-112.
- KELLY M. Mining and the Freshwater Environment, BP Elsevier Applied Science, London, 1988.
- KELTJENS W.S. AND VAN BEUSICHEM M.L., 1998. Phytochelatins as biomarkers for heavy metal toxicity in Maize : Single metal effects of copper and cadmium. *J. Plant Nutr.*, **21**, 635-648.
- KESSLER A. AND BRAND M.D., 1994a. Effects of cadmium on the control and internal regulation of oxidative phosphorylation in potato tuber mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **225**, 907-922.

- KESSLER A. AND BRAND M.D., 1994b. Quantitative determination of the regulation of oxidative phosphorylation by cadmium in potato tuber mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **225**, 923-935.
- KHAN D.H. AND FRANKLAND B., 1983. Effects of cadmium and lead on radish plants with particular reference to movement of metals through soil profile and plant. *Plant Soil*- **70**, 335-345.
- KINNIBURGH D.G. AND JACKSON M.L., 1978. Adsorption of Hg(II) by iron hydrous oxide gel. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **42**, 45-47.
- KIRSCH-VOLDERS M., 1997. Towards a validation of the micronucleus test, *Mutat. Res.*, **392**, 1-4.
- KITAGAWA, Y., TANAKA, N., HATA, Y., KUSUNOKI, M., KATSUBE, Y., ASADA, K., AIBARA, S. AND MORITA, Y., 1991. Three-dimensional structure of Cu,Zn superoxide dismutase from spinach at 2Å resolution. *J. Biochem.*, **109**, 477-485.
- KLAPHECK S., 1988. Homogluthatione : isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol. Plant.*, **74**, 727-732.
- KLAPHECK S., FLIEGNER W. AND ZIMMER I., 1994. Hydroxymethyl-phytochelatins [(γ -GLU-CYS)_N-Ser] are metal induced peptides of the *Poaceae*. *Plant Physiol.*, **104**, 1325-1332.
- KLAPHECK S., SCHLUNZ S. AND BERGMANN L., 1995. Synthesis of phytochelatins and homo-phytochelatins in *Pisum sativum* L.. *Plant Physiol.*, **107**, 515-521.
- KNASMULLER S., GOTTMANN E., STEINKELLNER H., FOMIN A., PICKL C., PASCHKE A., GOD R., AND KUNDI M., 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.*, **420**, 34-48.

- KNECHT J.A., VAN BAREN N., TEN BOOKUM W.M., WON FONGG SANG H.W., KOEVOETS P.L.M., SCHAT H. AND VERKLEIJ J.A.C., 1995. Synthesis and degradation of phytochelatins in cadmium-sensitive and cadmium-tolerrant *Silene vulgaris*. *Plant Sc.*, **106**, 9-18.
- KNEER R. AND ZENK M.H., 1992. Phytochelatins protect plant enzymes from heavy metal poisoning. *Phytochemistry*, **31**, 2663-2667.
- KNEER R. AND ZENK M.H., 1997. The formation of Cd-phytochelatins complexes in plant cell cultures. *Phytochemistry*, **44**, 69-74.
- KOTRBA P., MACEK T. AND RUML T., 1999. Heavy metal binding peptides and proteins in plants. *A review. Collection. Czec. Chem. Commun.*, **64**, 1057-1086.
- KRÄMER U., GRIME G.W., SMITH J.A.C., HAWES C.R. AND BAKER A.J.M., 1997. MicroPIXE as a technique for studying nickel localization in leaves of hyper accumulator plant *Alyssum lesbiacum*. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B.*, **130**, 346-350
- KRAUSKOPF K.B. Introduction to Geochemistry. Ed McGraw-Hill, New-York, 1979.
- KRAUTER P.W., ANDERSON S.L., HARRISON F.L., 1987. Radiation-induced micronuclei in peripheral erythrocytes of *Rana catesbeiana*: an aquatic animal model for in vivo genotoxicity studies. *Environ. Molec. Mutagen.*, **10**, 285 –291.
- KROTZ R.M., EVANGELOUO B.P. AND WAGNER G.J., 1989. Relationships between cadmium, zinc, Cd-binding peptide, and organic acid in tobacco suspension cells. *Plant Physiol.*, **91**, 780-787.
- KUBOTA H., SATO K., YAMADA T. AND MAITANI T., 1995. Phytochelatins (class III metallothioneins) and their deglycyl peptides induced by cadmium in normal root cultures of *Rubia tinctorum* L.. *Plant Sci.*, **106**, 157-166.
- KUBOTA H., SATO K., YAMADA T. AND MAITANI T., 2000. Phytochelatins homologs induced in hairy roots of *horsradish*. *Phytochemistry*, **53**, 239-245.

- KUNERT, K.J. AND FOYER C.H. Thiol/disulphide exchange in plants. In De Kok L.J. (ed.), Sulfur nutrition and assimilation in higher plants, The Hague, The Netherlands :SPB Acad. Publishing, 1993, 139-151.
- KÜPPER H., KÜPPER F. AND SPILLER M., 1996. Environmental relevance of heavy-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J. Exp. Bot.*, **47**, 259-266
- KÜPPER H., KÜPPER F. AND SPILLER M., 1998. *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynth. Res.*, **58**, 123-133
- KWIATOWSKI J., SAFIANOWSKA A. AND KANIUGA Z., 1985. Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from tomato leaves, *Lycopersicon esculentum*. *European Journal of Biochemistry*, **146**, 459-466.
- LACERDA D., MALM O., GUIMARAES J.R.D., SALOMONS W. AND WILKEN R.-D., Salomons W. and Stigliani W.M (Ed). Biogeochemistry of Pollutants in Soils and Sediments. Springer, Berlin, 1994, 213-245.
- LAGRIFFOUL A., MACQUOT B. MECH M AND VANGRONSFELD J., 1998. Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.). *Plant Soil*, **200**, 241-250.
- LANDBERG T. AND GREGER M., 2002. Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *J. Plant Physiol.*, **159**, 69-75.
- LANG F., SARVARI E., FODOR F. AND CSEH E. Effects of heavy metals on the photosynthetic apparatus in cucumber, in P. Mathis (Ed), *From Light to Biosphere*, Vol IV., Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 1995, 533-536.
- LARSON R.A., 1995. Plant defenses against oxidative stress. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, **29**, 175-186.

- LAOUEDJ A., 1994. La culture cellulaire végétale en écotoxicologie : conception d'un modèle expérimental ; application à la phytotoxicité et la génotoxicité potentielles de xénobiotiques. *Thèse de l'Université de Strasbourg*.
- LEE S. AND LEUSTEK T., 1999. The affect of cadmium on sulfate assimilation enzymes in *Brassica juncea*. *Plant Sci.*, **141**, 201-207.
- LEGRET M. DIVET L. AND JUSTE C., 1988. Movement and speciation of heavy metals in a soil amended with sewage sludge containing large amount of Cd and Ni. *Water Research*, **22**, 953-959.
- LEOPOLD I., GÜNTHER D., SCHMIDT J. AND NEUMANN D., 1999. Phytochelatin and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, **50**, 1323-1328.
- LEUSTEK T., 1996. Molecular genetics of sulfate assimilation in plants. *Physiol. Plant.*, **97**, 411-419.
- LEUSTEK T., MARTIN M.N., BICK J.A. AND DAVIES J., 2000. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **51**, 141-165.
- LEUSTEK T. AND SAITO K., 1999. Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol.*, **120**, 637-643.
- LI Z.S., LU Y.P. ZHEN R.G., SZCZYPKA M., THIELE D.J. AND REA P.A., 1997. A new pathway for vacuolar sequestration in *Saccharomyces cerevisiae* ; YCF1-catalysed transport of bis(glutathionato) cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 42-47.
- LICHTENBERGER O. AND NEUMANN D., 1997. Analytical electron microscopy as a powerful tool in plant cell biology : exemples using electron energy loss spectroscopy and X-ray micro analysis. *Eur. J. Cell. Biol.*, **73**, 378-386.
- LICHTENTHALER H.K., 1996. Vegetation stress : an introduction to the stress concept in plants. *Plant Physiol.*, **148**, 4-14.

- LINDBERG S., 1990. Aluminium interaction with K^+ ($^{86}Rb^+$) and $^{45}Ca^{2+}$ fluxes in three cultivars of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Physiol. Plant.*, **79**, 275-282.
- LIU D., JIANG W. AND LI M., 1992. Effect of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas*, **117**, 23-29.
- LIU D., JIANG W., WANG W., ZHAO F. AND LU C., 1994. Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. *Environmental Pollution*, **86**, 1-4.
- LOEFFLER S., HOCHBERGER A., GRILL E., WINNACKER E.L. AND ZENK M.H., 1989. Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction product. *FEBS Lett.*, **258**, 42-46.
- MA J.F. UENO D., ZHAO F.J. AND MCGRATH S.P., 2005. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta*, **220**, 731-736.
- MA T.H., 1982. *Vicia* cytogenetic tests for environmental mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, **99**, 257-271.
- MA T.H., 1995. Application of simple and efficient plant bioassays for detection of ecotoxicity, dans les actes du colloque « Ecotoxicology of Air Compartment », 13-15 Sept. 95, Rouen, France, 157-163.
- MA T.H., 1999. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mutat. Res.*, **426**, 103-106.
- MA T.H., CABRERA G.L., CEBULSKA-WASILEWSKA A., CHEN R., LOARCA F., VANDENBERG A.L. AND SALAMONE M.F., 1994b. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutat. Res.*, **310**, 211-220.

- MA T.H., CABRERA G.L., CHEN R., GILL B.S., SANDHU S.S., VANDENBERG A.L. AND SALAMONE M.F., 1994a. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutat. Res.*, **310**, 221-230.
- MA T.H., XU Z.D., XU C.G., MCCONNELL H., RABAGO E.V., ARREOLA G.A. AND ZHANG H.G., 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat. Res.*, **334**, 185-195.
- MAITANI T., KUBOTA H., SATO K. AND YAMADA T., 1996. The composition of metals bound to class III metallothioneins (phytochelatin and dits deglycyl peptide) induced by various metals in roots cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.*, **110**, 1145-1150.
- MALIK D., SHEORAN I.S. AND SINGH R., 1992. Carbon metabolism in leaves of cadmium treated wheat seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, **30**, 223-229.
- MALLICK N. AND MOHN F.H., 2001. Heavy metal toxicity on chlorophyll fluorescence characteristics of the green microalga. *Scenedesmus obliquus*. In : CHALOUB R.M., DE MAGALHÃES C.C.P., DOS SANTOS C.P., 2005. Early toxic effects of zinc on PSII of *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae). *J. of Physiol.*, **41**, 1162–1168.
- MALLICK N. AND RAI L.C., 1989. Response of *Anabaena doliolum* to bimetallic combinations of Cu, Ni and Fe with special reference to sequential addition. *J. Appl. Phycol.*, **1**, 301-306.
- MALLICK N. AND RAI L.C., 1992. Metal-induced inhibition of photosynthesis, photosynthetic electron transport chain and ATP content of *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris* : Interaction with exogenous ATP. *Biomed. Environ.Sci.*, **5**, 241-250.
- MALLICK N. AND RAI L.C. Physiological responses of non-vascular plants to heavy metals. In : Prasad M.N.V. and Strzalka (Ed), *Physiology and biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants*, 2002, 111-147.

- MARSCHNER H, Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, Harcourt Brace and Company (second edition, third printing), Londres, 1998, pp 889. In : CAILLE N., VAULEONB C., LEYVAL C., MOREL J.L., 2005. Metal transfer to plants grown on a dredged sediment: use of radioactive isotope ^{203}Hg and titanium. *Sc. of Tot. Env.*, **341**, 227– 239.
- MARZIN D., 1998. Méthodologie, interprétation et stratégie des tests de mutagénèse «Les essais d'écotoxicité et de cancérogénicité des molécules chimiques», 18-22 Mars 98, Metz, France.
- MATSUMOTO S., SHIRAKI K. TSUJI N., HIRATA K. MIYAMOTO K. AND TAKAGI M., 2004. Functional analysis of phytochelatin synthase from *Arabidopsis thaliana* and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Sc. and Tech. of Adv. Mat.*, **5**, 377-381.
- MAY M.J., VERNOUX T., LEAVER C., VAN MONTAGUE M. AND INZE D., 1998. Glutathione homeostasis in plants : implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.*, **49**, 649-667.
- MAYER A.M., STAPLES R.C. AND GIL-AD N.L., 2001. Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* **58**, 33-41.
- MC BRIDE M.B., 1980. Chemisorption of Cd^{2+} on calcite surface. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **44**, 26-28.
- MC CORD J.M. AND FRIDOVICH I., 1969. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 – 6055.
- MC LAUGHLIN M.J. AND TILLER K.G., 1994. Chloro-complexation of cadmium in soil solutions. *Trans. 15th World Congress Soil Science*, **36**, 195.
- MEHRA R.K., TARBET E.B., GRAY W.R. AND WINGE D.R., 1988. Metal specific synthesis of two metallothioneins and γ glutamyl peptides in *Candida glabrata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 8815- 8819.

- MEHRA R.K., KODATI R. AND ABDULLAH R.,** 1995. Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**, 730-736.
- MEHRA R.K., MICLAT J., KODATI R. ABDULLAH R. HUNTER T.C. AND MULCHANDANI P.,** 1996. Optical spectroscopic and reverse phase HPLC analyses of Hg (II) binding to phytochelatins. *Biochem. J.*, **314**, 73-82.
- MENDOZA-COZATL D.G. AND MORENO-SANCHEZ R.,,** 2005. Cd²⁺ transport and storage in the chloroplast of *Euglena gracilis*. *Bioch. Bioph. Acta*, **1706**, 88-97.
- MENDOZA-COZATL D.G. AND MORENO-SANCHEZ R.,** 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis undeer cadmium stress. Pathway modelingg for plants. *J. Theor. Biol.*, **238**, 919-936.
- MENG L., DE-YONG T., WANG H.X., DUAN P.S. AND GAO S.Y.,** 1998. Study of the response of wheat of lead, cadmium and zinc. *J. Environ. Sci.*, **10**, 238-244.
- MERSCH J., BEAUVAIS M.N.,** 1997. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutat. Res.*, **393**, 141-149.
- MEUWLY P., THIBAUT P. AND RAUSER W.E.,** 1993. γ Glutamylcysteinyl-glutamic acid – a new homologue of glutathione in maize seedlings exposed to cadmium. *FEBS Lett.*, **336**, 472-476.
- MIAO M., FU R., YANG D. AND ZHENG L.,** 1999. *Vicia* root micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing River in Shandong Province of the People’s Republic of China. *Mutat. Res.*, **426**, 143–145.
- MINISSI S. AND LOMBI E.,** 1997. Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutat. Res-Genet. Toxicol. E.M.*, **393**,17-21.

- MITTLER R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Plant Science* **7**, 405-410.
- MITTLER R. AND ZILINKAS B.A., 1992. Molecular cloning and characterisation of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 21802-21807.
- MIYAKE C. AND ASADA K., 1992. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product, monodehydroxyascorbate radicals, in thylakoids. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 541-553.
- MORELLI E. AND SCARANO G., 2001. Synthesis and stability of phytochelatin induced by cadmium and lead in marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Environ. Res.*, **52**, 383-395.
- NAGALAKSHMI N. AND PRASAD M.N.V., 1998. Copper-induced oxidative stress in *Scenedesmus bijugatus*-protective role of free radical scavengers. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, **61**, 623-628.
- NAGALAKSHMI N. AND PRASAD M.N.V., 2001. Responses of glutathione cycle enzymes and glutathione metabolism to copper stress in *Scenedesmus bijugatus*. *Plant Sci.*, **160**, 291-299.
- NAGUIB M.I., HAMED A.A. AND AL-WAKEEL S.A., 1982. Effect of cadmium on growth criteria of some crop plants. *Egypt. J. Bot.*, **25**, 1-12.
- NAKAZAWA R. AND TAKENAGA H., 1998. Interaction between cadmium and several heavy metals in the activation of the catalytic activity of phytochelatin synthase. *Soil Sci. Plant Nutr.*, **44**, 265-268.
- NEUMANN D., ZUR NIEDEN U., LICHTENBERGER O. AND LEOPOLD I., 1995. How does *Armeria maritima* tolerate high heavy metal concentrations? *J. Plant Physiol.*, **146**, 704-717.

- NILAN R.A.**, 1978. Potential of plant genetic systems for monitoring and screening mutagens. *Environmental Health Perspectives*, **27**, 181-196.
- NOCI-CHARISSOU A-M.**,2002. Etude des dommages oxydatifs chez *Unio tumidus* pour le biomonitoring des eaux douces et des relations entre la 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine et le malondialdéhyde. *Thèse*, Université de Metz-U.F.R. Sci. F.A.
- NOCTOR G., ARISI A.C.M., JOUANIN L., KUNERT K.J., RENNENBERG H. AND FOYER C.H.**, 1998. Glutathione biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in tranformed plants. *J. Exp. Bot.*, **49**, 623-647.
- ORTIZ D.F., KREPPPEL L., SPEISER D.M. SCHEEL G. McDONALD G. AND OW D.W.**, 1992. Heavy-metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO J.*, **11**, 3491-3499.
- ORTIZ D.F., RUSCITTI T., MCCUE K.F. AND OW D.W.**, 1995. Transport of metal-binding peptides by *HMT1*, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.*, **270**, 4721-4728.
- ÖSTERAS A.H., EKVALL L. AND GREGER M.**, 2000. Sensivity to, and accumulation of cadmium in *Betula pendula*, *Picea abies* and *Pinus sylvestris* seedlings from different regions in Sweden. *Can. J. Bot.*, **78**, 1440-1449.
- OVERNELL J.**, 1975. The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Biol.*, **29**, 99-103.
- OW D.W.**, 1996. Heavy metal tolerance genes : prospective tools for bioremediations. *Res. Conserv. Recycl.*, **18**, 135-149.
- PAGE V., WEISSKOPF L. AND FELLER U.**, 2006. Heavy metals in white Lupin : uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytol.*, **171**, 329-341.

- PALMA J.M., SANDALIO L.M. AND DEL RIO L.A., 1986. Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplasts: a reappraisal of a controverted cellular localization. *J. plant physiol.*, **125**, 427-439.
- PAREKH D. PURANIK R.M. AND SRIVASTAVA H.S., 1990. Inhibition of chlorophyll biosynthesis by cadmium in greening maize leaf segments. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **186**, 239-242.
- PEAKALL, D AND BURGER, J., 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotox. and Env. Saf.*, **56**, 110-117.
- PEERL-TREVES E., ABU-ABIED N., MAGAL N. GALUN E. AND ZAMIR D., 1990. Genetic mapping tomato cDNA clones encoding the chloroplastic and the cytosolic isoenzymes of superoxide dismutase. *Biochem. Genet.*, **28**, 543-552.
- PICKERING I.J., PRINCE R.C., GEORGE G.N., RAUSER W.E., WICKRAMASINGE W.A., WATSON A.A., DAMERON C.T., DANCE I.G., FIRLIE D.P. AND SALT D.E., 1999. X-ray adsorption spectrometry of cadmium phytochelatiin and model systems. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1429**, 351-364.
- PIECHALAK A., TOMASZEWSKA B., BARALKIEWICZ D. AND MALECKA A., 2002. Accumulation and detoxication of lead ions in legumes. *Phytochemistry*, **60**, 153-162.
- PIETILANIEN K., 1975. Synergistic and antagonistic effects of lead and cadmium on aquatic primary production, in *International Conference on Heavy Metals in the Environment. Symposium Proceedings Vol II*, Toronto, Canada, 861-873.
- PIGNATA M.L., GUDIN G.L., WANNAZA E.D., PLA R.R., GONZA LEZA C.M., CARRERASA H.A. AND ORELLANAC L., 2002. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaris* as a biomonitor. *Env. Poll.*, **120**, 59-68.

- PIGNOCCHI C. AND FOYER C.H.**, 2003. Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling. *Plant Biology*, **6**, 379-389.
- PILON-SMITH E.A.H., HWANG S., LYTLE C.M., ZHU Y.L., TAY J.C., BRAVO R.C. CHEN Y., LEUSTEK T. AND TERRY N.**, 1999. Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction and tolerance. *Plant Physiol.*, **119**, 123- 132.
- PLEWA M.J.**, 1982. Specific-locus mutation assays in *Zea mays*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, **99**, 317-337.
- PLEWA M.J., AND WAGNER E.D.**, 1993. Activation of promutagens by green plants. *Annu. Rev. Genet.*, **27**, 93-113.
- PODSEDEK A.**, 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables. *Food Science and Technology*, **40**, 1-11.
- PRASAD M.N.V.** Metallothioneins and metal binding complexes in plants. In, *Heavy Metal Stress in Plants : From Molecules to Ecosystems*, M.N.V. Prasad and J. Hagemeyer (Ed), Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New-York, 1999, 51-72.
- PRASAD M.N.V.** Metal in the environment – Analysis by biodiversity. Prasad M.N.V. (Ed), Dekker M. Inc. New York, 2001.
- PRASAD M.N.V., DREJ K., SKAWINSKA A. AND STRZALKA K.**, 1998. Toxicity of cadmium and copper in *Chlamydomonas reinhardtii* wild type (WT2137) and cell wall deficient mutant strain (CW15). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **60**, 306-311.
- PRASAD M.N.V., SINGH J.B., RAI L.C. AND KUMAR H.D.**, 1991. Metal-induced inhibition of photosynthetic electron transport chain of the cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **82**, 95-100.
- PREER J.R. AND ROSEN W.G.**, 1977. Trace Subs. Environ. Health, **11**, 399. In : BRADL H.B. Sources and origins of heavy metals. Bradl H.B. (Eds). In: Heavy metals in the environment : Origin, interaction and remediation. Elsevier, 2005, 1-25.

- QIU-FANG Z., YUAN-YUAN L., CAI-HONG P., CONG-MING L. AND BAO-SHAN W., 2005. NaCl enhances thylakoid-bound SOD activity in the leaves of *C₃* halophyte *Suaeda salsa* L. *Plant Science*, **168**, 423-430.
- RACHLIN J.W., JENSEN T.E. AND WARKENTINE B., 1984. The toxicological response of the alga *Anabaena flosaquae* (Cyanophyceae) to cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 143-151.
- RACHLIN J.W., JENSEN T.E., BAXTER M. AND JANI V., 1982. Utilization of morphometric analysis in evaluating response of *Plectonema boryanum* (Cyanophyceae) to exposure to eight heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **11**, 323-333.
- RADETSKI C., 1996. Intérêt de l'utilisation de quelques enzymes du stress oxydant chez les végétaux : relations avec les tests de phytotoxicité et de phytogénotoxicité. *Thèse*, Université de Metz-U.F.R. Sci. F.A.
- RAI L.C., JENSEN T.E. AND RACHLIN J.W., 1990. A morphometric and x-ray energy dispersive analysis approach to monitoring pH altered Cd toxicity in *Anabaena flos-aquae*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **19**, 479-487.
- RAI P.K., MALLICK N. AND RAI L.C., 1994. Effect of Ni on certain physiological and biochemical processes of an acid tolerant *Chlorella vulgaris*. *Biometals*, **7**, 193-200.
- RAI L.C., SINGH A.K. AND MALLICK N., 1991. Studies on photosynthesis, the associated electron transport system and some physiological variables of *Chlorella vulgaris* under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.*, **137**, 419-424.
- RAUSER W.E., 1995. Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis, biosynthesis and function. *Plant Physiol.*, **109**, 1141-1149.
- RAUSER W.E., 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Biophys.*, **31**, 19-48.
- RAUSER W.E., 2000. Roots of maize seedling retain most of their cadmium through two complexes. *J. Plant Physiol.*, **156**, 545-551.

- RAUSER W.E., SCHUPP R. AND RENNENBERG H.,**1991. Cystein, γ -glutamyl-cystein, and glutathione levles in maize seedlings. Distribution and translocation in normal and cadmium-exposed plants. *Plant Physiol.*, **97**, 128-138.
- RAVINDRA K., BENCS L. ET VAN GRIEKEN R.,** 2004. Platinum group elements in the environment and their health risk. *Sci. Total Environ.*, **318**, 1-43.
- REA P.A., LI Z.S., LU Y.P. DROZDOWICZ Y. AND MARTINOIA E.,** 1998. From vascular GS-X pumps to multispecific ABC transporters . *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **49**, 727-760.
- REDDY G.N. AND PRASAD M.N.V.,** 1992a. Characterization of cadmium binding protein from *Scenedesmus quadricauda* and toxicity reversal by phyto-chelatin constituting amino acids and citrate. *J. Plant. Physiol.*, **140**, 156-162.
- REDDY G.N. AND PRASAD M.N.V.,** 1992b. Cadmin-induced potassium efflux from *Scenedesmus quadricauda*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **49**, 600-605.
- REDDY G.N. AND PRASAD M.N.V.,** 1994. Cadmium toxicity to *Scenedsmus quadricauda* proteins and protein phosphorrylation changes. *Biochem. Arch.* **10**, 185-188.
- REDEI G.P.,** 1982. Mutagen assay with Arabidopsis - A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, **99**, 243-255.
- REESE R.N. AND WAGNER G.J.,** 1987. Effect of buthionine sulfoximine on Cd-binding peptide levels in suspension-cultured tobacco cells traited with Cd, Zn or Cu. *Plant Physiol.*, **84**, 574-577.
- RENNENBERG H. AND BRUNOLD C.,** 1994. Significance of glutathion metabolism in plants under stress. *Press Bot.*, **55**, 142-153.
- RIEGER R., MICHAELIS A. AND GREEN M.** A glossary of genetics and cytogenetics, 3rd Eds., Allen and Unwin, London, 1968, 507.

- RÜEGSEGGER A. AND BRUNOLD C., 1992. Effect of cadmium on γ -glutamylcysteine synthesis in maize seedling. *Plant Physiol.*, **99**, 428-433.
- RÜEGSEGGER A., SCHMUTZ D. AND BRUNOLD C., 1990. Regulation of glutathione synthesis by cadmium in *Pisum sativum* L.. *Plant Physiol.*, **93**, 1579-1584.
- RUOTOLO R., PERACCHI A., BOLCHI A., INFUSINI G., AMORESANO A. AND OTTONELLO S., 2004. Domain organization of phytochelatin synthase: functional properties of truncated enzyme species identified by limited proteolysis. *J. Biol. Chem.* **279**, 14686-14693.
- SALT D.E., PICKERING I.J., PRINCE R.C. GLEBA D., DUSHENKOV S., SMITH R.D. AND RASKIN I., 1997. Metal accumulation by aquacultured seedling of Indian Mustard. *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 1636-1644.
- SALT D.E., PRINCE R.C., PICKERING I.J. RASKIN I., 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiol.*, **109**, 1427-1433.
- SALT D.E. AND RAUSER W.E., 1995. MgATP-dependant transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.*, **107**, 1293-1301.
- SALT D.E. AND WAGNER G.J., 1993. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots : evidence for a $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport activity. *J. Biol. Chem.*, **268**, 12297-12302.
- SALVETAT R., JUNEAU P. AND POPOVIC R., 1998. Measurement of chlorophyll fluorescence by synchronous detection analytical approach for the accurate determination of photosynthesis parameters for whole plants. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 2640-2645.
- SANDALIO L.M. AND DEL RIO L.A., 1988. Intraorganellar Distribution of Superoxide Dismutase in Plant Peroxisomes (Glyoxysomes and Leaf Peroxisomes). *Plant Physiol.*, **88**, 1215-1218.

- SANDERMANN H., JR., 1994. Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. *Pharmacogenetics*, **4**, 225-241.
- SANDHU S.S., DE SERRES F.J., GOPALAN H.N.B., GRANT W.F., VELEMINSKY J. AND BECKING G.C., 1991. Status report of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on plant test systems. *Mutat. Res.*, **257**, 19-25.
- SANG N. AND LI G., 2004. Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. *Mutat. Res.*, **560**, 159-165.
- SANITA DI TOPPI L. AND GABBRIELLI R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.*, **41**, 105-130.
- SANITA DI TOPPI L., LAMBARDI M., PECCHIONI N., PAZZAGLI L. DURANTE M. AND GABBRIELLI R., 1999. Effects of cadmium stress on hairy roots of *Daucus carota*. *J. Plant Physiol.*, **154**, 385-391.
- SANTILLAN-MEDRANO J. AND JURINAK J.J., 1975. The chemistry of Lead and cadmium in soil: Solid phase formation. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **39**, 851-856.
- SARKAR D., ESSINGTON M.E. AND MISTRA K.C., 1999. Adsorption of Mercury(II) by Variable Charge Surfaces of Quartz and Gibbsite. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **63**, 1626-1636.
- SASHWATI ROY, CHANDAN K. SEN AND OSMO HÄNNINEN., 1996. Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons using CEmoss bags : Bioaccumulation and responses of antioxidant enzymes in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere*, **32**, 2305-2315.
- SCHÄFER H.J., GREINER S., RAUSCH T. AND HAAG-KERWER A., 1997. In Seedlings of heavy metal accumulator *Brassica juncea* Cu²⁺ differentially affects transcript amount for γ -glutamylcysteine synthetase (γ -ECS) and metallothionein (MTII). *FEBS Lett.*, **404**, 216-220.

- SCHÄFER H.J., HAAG-KERWER A. AND RAUSCH T., 1998.** cDNA cloning and expression analysis of genes encoding GSH synthesis in roots of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* L.: evidence for Cd induction of a putative mitochondrial γ -glutamylcysteine synthase isoform. *Plant Mol. Biol.*, **37**, 87-97.
- SHELLER H.V., HUANG B., HATCH E. AND GOLDSBROUGH P.B., 1987.** Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells. *Plant Physiol.*, **85**, 1031-1035.
- SCHINKEL H., STRELLER S. AND WINGSLE G., 1998.** Multiple forms of extracellular-superoxide dismutase in needles, stem tissues and seedlings of Scots pine. *J. Exp. Bot.*, **49**, 931-936.
- SCHLEGEL H., GODBOLD D.L. AND HUTTERMANN A., 1987.** Whole plant aspects of heavy metal induced changes in CO₂ uptake and water relations of spruce (*Picea Abies*) seedlings. *Physiol. Plant.*, **69**, 265-270.
- SCHNEIDER S. AND BERGMANN L., 1995.** Regulation of glutathione synthesis in suspension cultures of parsley and tobacco. *Bot. Acta.*, **108**, 34-40.
- SENESI G.S., BALDASSARRE G. SENESE N. AND RADINA B., 1999.** Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere* **39**, 343-377.
- SHAW B.P. AND ROUT N.P., 1998.** Age-dependent responses of *Phaeolus aureus* Roxb. To inorganic salts of mercury and cadmium. *Acta Physiol. Plant.*, **20**, 85-90.
- SIEDLECKA A. AND KRUPA Z., 1997.** Cd/Fe interaction in higher plants – its consequences for the photosynthetic apparatus. *Phytosynthetica*, **36**, 321-331.
- SIEGEL F.R.** Environmental Geochemistry of Potentially Toxic Metals. Eds. Springer, Heidelberg, Berlin, 2002.
- SIES H.** Oxidative stress : introduction. In H. Sies (Ed), Oxidative stress, oxidants and antioxidants. Aca. Press, San Diego, 1991, I-XV.

- SKOZYNSKA-POLIT E. AND BAZYNSKI T.,** 1995. Photochemical activity of primary leaves in cadmium stressed *Phaseolus coccineus* depends on their growth stages. *Acta Soc. Bot. Pol.*, **64**, 273-279.
- SOUZA J.F. AND RAUSER W.E.,** 2003. Maize and radish sequester excess cadmium and zinc in different ways. *Plant Sc.*, **165**, 1009-1022.
- SPARROW A.,** 1951. Radiation sensitivity of cells during mitotic and meiotic cycles with emphasis on possible cytochemical changes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **61**, 1508-1540.
- SPARROW A., MOSES M.J. AND DUBOW R.J.,** 1952. Relationships between ionizing radiation, chromosome breakage and certain other nuclear disturbances. *Exp. Cell Research, Suppl.* **2**, 245-267.
- SPARROW A.H., UNDERBRINK A.G. AND ROSSI H.H.,** 1972. Mutations induced in *Tradescantia* by small doses of X-rays and neutrons: Analysis of dose-response curves. *Science*, **176**, 916-918.
- SPEISER J.L., ABRAHAMSON S.L., BANUELOS G. AND OW D.W.,** 1992. *Brassica juncea* produces a phytochelatin cadmium sulfide complex. *Plant Physiol.*, **99**, 817-821.
- STARK B.A.,** 1988. Effects on Grazing Animals of Ingestion of Inorganic and Organic Materials Contained in Sewage Sludge. Report PRU 1691-M. Medmenham: Water Research Centre. In : HILLMAN J.P., HILL J., MORGAN J.E., AND WILKINSON J.M., 2003. Recycling of sewage sludge to grassland: a review of the legislation to control of the localization and accumulation of potential toxic metals in grazing systems. *Grass and Forage Science*, **58**, 101-111.
- STEFFENS J.C., HUNT D.F. AND WILLIAMS B.G.,** 1986. Accumulation of non-protein metal-binding polypeptides (γ -glutamyl-cysteinyl)_n-glycine in selected cadmium-resistant tomato cells. *J. Biol. Chem.*, **261**, 13879-13882.

- STEINKELLNER H., MUN-SIK K., HELMA C., ECKER S., MA T.H., HORAK O., KUNDI M., KNASMÜLLER S., 1998. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.*, **31**, 183-191.
- STERCKEMAN T., DOUAY F. PROIX N., FOURRIER H. AND PERDRIX E., 2002. Assessment of the Contamination of Cultivated Soils by Eighteen Trace Elements Around Smelters in the North of France. *Water, Air and Soil Pollution*, **135**, 173-194.
- STOLT J.P., SNELLER F.E.C., BRYNGELSSON T., LUNDBORG T. AND SCHAT H., 2003. Phytochélatin and cadmium accumulation in wheat. *Env. Exp. Bot.*, **49**, 21-28.
- STRASDEIT H., DUHME A.K., KNEER R. ZENK M.H., HERMES C. AND NOLTING H.F., 1991. Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectrometry. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **16**, 1129-1130.
- STRATTON G.W. AND CORKE C.T., 1979. The effect of mercuric, cadmium and nickel ion combinations on a blue-green alga. *Chemosphere*, **8**, 731-740.
- TAKAHASHI H. AND SAITO K., 1996. Subcellular localization of spinach cysteine synthase isoforms and regulation of their gene expression by nitrogen and sulfur. *Plant Physiol.*, **112**, 273-280.
- TAKIJIMA Y. AND KATSUMI F., 1973. Cadmium contamination of soil and rice plants caused by zinc. *Mining. Soil Sci. Plant Nutr.*, **19**, 29-38.
- TANG D., WEN L.S. AND SANTSHI P.H., 2000. Analysis of biogenic thiols in natural water samples by high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection with ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate. *Analytica Chimica Acta*, **408**, 299-307.
- TARHANEN S., 1998. Ultrastructural responses of the lichen *Bryoria fuscescens* to stimulates acid rain and heavy metal deposition. *Annals of Bot.*, **82**, 735-746.
- TAYLOR S.R. AND MCLENNAN S.M., 1995. The geochemical evolution of the continental crust. *Rev. Geophys.*, **33**, 241-265.

- THOMAS R.M. AND SINGH V.P., 1996. Reduction of cadmium-influenced inhibition of chlorophyll and carotenoid accumulation in *Cucumis sativus* L. by uniconazole (S.3307). *Phytosynthetica*, **32**, 145-148.
- THOMINE S, WANG R., WARD J.M. CRAWFOR N.M. AND SCHROEDER J., 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to N ramp genes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **97**, 4991-4996.
- THUMANN J., GRILL E., WINNACKER E.L. AND ZENK M., 1991. Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Lett.*, **284**, 66-69.
- TIAN M., GU Q. AND ZHU M., 2003. The involvement of hydrogen peroxide and antioxidant enzymes in the process of shoot organogenesis of strawberry callus. *Plant Science* **165**, 701-707.
- TOMASZEWSKA B., TUKENDORF A. AND BARALKIEWICZ D., 1996. The synthesis of phytochelatin in lupin roots treated with lead ions. *Sci. Legumes*, **3**, 206-217.
- TREBACZ K., SIMONIS W. AND SCHON K.G. 1994. Cytoplasmic Ca²⁺, K⁺, Cl⁻ and NO₃⁻ activities in the liverwort *Conocephalum conicum*L., at rest and during action potentials. *Plant Physiol.*, **106**, 1073-1084.
- TUKENDORF A. AND RAUSER W.E., 1990. Changes in glutathione and phytochelatin in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Sci.*, **70**,155-166.
- VAN ASSCHE F. AND CLIJISTERS H., 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell. Environ.*, **13**, 195-206.
- VAN BREUSEGEM F., VRANOVA E., DAT J.F., AND INZÉ D., 2001. The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* **161**, 405-414.
- VANDE WEGHE J.G. AND OW D.W., 1999. A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13250-13257.

- VANGRONSVELD J., MOCQUOT B., MENCH M. AND CLIJSTERS H. Biomarqueurs du stress oxydant chez les végétaux, dans « Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux », Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (Ed), Masson, Paris, 1997.
- VAN'T HOF J. AND SCHAIRER L.A., 1982. *Tradescantia* assay system for gaseous mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program., *Mutation Research*, **99**, 303-315.
- VASSILEV A., BEROVA M. AND ZLATEV Z., 1998. Influence of Cd²⁺ on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. *Biol. Plant.*, **41**, 601-606.
- VATAMANIUK, O.K., MARI S., LU Y.P. AND REA P.A., 1999. *AtPCS1*, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis* : isolation and in vitro reconstitution. *Proc. Natl.Aca. Sci. USA.*, **96**, 7110-7115.
- VATAMANIUK O.K., MARI S., LU Y.P. AND REA P.A., 2000. Mechanism of heavy metal activation of phytochelatin (PC) synthase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31451-31459.
- VELEMINSKY J AND GICHNER T., 1988. Mutagenic activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. *Mutat. Res.*, **197**, 221-242.
- VERKLEIJ J.A.C., KOEVOETS P., VAN'T RIET J., BARK R., MIJDAM Y. AND ERNST W.H.O., 1990. Poly(γ -glutamylcysteinyl)-glycines or phytochelatins and their role in cadmium tolerance of *Silene vulgaris*. *Plant Cell Environ.*, **13**, 913-921.
- VIG B.K., 1982. Soybean (*Glycine max* L. Merrill) as a short-term assay for study of environmental mutagens, A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research*, **99**,339-347.
- VIGERUST E. AND SELMER-OLSEN A.R. Basis for metal limits relevant to sludge utilisation. In: Davis R.D., Haeni H., and L'Hermite P. (Ed) Factors Influencing Sludge Utilisation in Europe. Elsevier Applied Science Publishers Ltd, 1986.

- VILLALOBOS-PIETRINI R., GOMEZ-ARROYO S., FLORES-MARQUEZ A.R. AND CISNEROS A., 1986. *Tradescantia*-micronucleus test on potassium dichromate. *Contam. Ambient.*, **2**, 63-70.
- VÖGELI LANGE R. AND WAGNER G.J., 1990. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. *Plant Physiol.*, **92**, 1086-1093.
- VÖGELI LANGE R. AND WAGNER G.J., 1996. Relationship between cadmium, glutathione and cadmium-binding peptides (phytochelatins) in leaves of intact tobacco seedlings. *Plant Sci.*, **114**, 11-18.
- WASEL Y., KAFKANI U. AND ESHEL A. Plant Roots : The Hidden Half. (Eds) Marcel Dekker, New-York, 1991.
- WANG W., 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air and Soil Pollution*, **59**, 381-400.
- WANG H., 1999. Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia* root-micronucleus assay. *Mutat. Res.*, **426**, 147-149.
- WEIGEL H.J., 1985. Inhibition of photosynthetic reactions of isolated intact chloroplasts by cadmium. *J. Plant Physiol.*, **119**, 179-189.
- WILKINSON J.M., HILL, J. AND LIVESEY C.T., 2001. Accumulation of potentially toxic elements in the body tissues of sheep grazed on grassland given repeated applications of sewage sludge. *Animal Science*, **72**, 179-190.
- WILKINSON J.M., HILL J. AND HILLMAN J.P., 2003. The accumulation of potentially toxic metals in edible body tissues of lambs after a single application of sewage sludge. *Water Research*, **37**, 128-138.
- WILLEKENS H. INZE D., VAN MONTAGU M. AND VAN CAMP W., 1995. Catalases in plants. *Mol.Breeding*, **1**, 207-228.

- XIANG C. AND OLIVIER D.J., 1998. Glutathione metabolic genes coordinatly respond to heavy meatls and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, **10**, 1539-1550.
- XIONG Z.T. AND PENG Y.H., 2001. Response of pollen germination and tube growth to cadmium with special refernce to low concentration exposure. *Ecotox. Env. Saf.*, **48**, 51-55.
- YOSHIMURA E., KAZUTOSHI K., SATOSHI K.M. AND YAMASAKI S., 1998. Accumulation of metals and cellular distribution of aluminum in the liverwort *Scaparia undulata* in acidic and neutral streams in Japan. *J. Environ. Sci. Health*, **33**, 671-680.
- YU B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxidative species. *Physiol. Rev.*, **74**, 139-162.
- ZENK M.H., 1996. Heavy metal detoxification in higher plants : a review, *Gene*, **179**,21-30.
- ZHANG G. AND TAYLOR G.J., 1990. Kinetics of aluminum uptake in *Triticum aestivum* L. Identity of the linear phase of aluminum uptake by excised roots of aluminum-tolerant and aluminum-sensitive cultivars. *Plant Physiol.*, **94**, 577-584.
- ZHU Y.L., PILON-SMITH E.A.H., JOUANIN L. AND TERRY N., 1999. Overexpression of glutathion synthetase in Indian msutard enhances cadmium accumulation and tolerance. *Plant Physiol.*, **119**, 73-79.
- ZUPANCIC N., 1999. Lead contamination in the roadside soils of Slovenia. *Environnmental geochemistry and health*, **21**, 37-50.

Annexes

ANNEXE A

Sols standards utilisés

N° Standard	LUFA 2.2	LUFA 2.3	LUFA 3A	Aspach
C. Org. (%)	2,29 ± 0,14	1,02 ± 0,2	2,2 ± 0,1	2,1
Granulométrie < 0,02 mm (%)	15,5 ± 2,4	21,0 ± 2,5	37,3 ± 3,6	15,6
pH (0,01 M CaCl ₂)	5,7 ± 0,3	6,3 ± 1,8	7,1 ± 0,3	6,2
C.E.C. (mval / 100g)	11 ± 1	9 ± 2	19 ± 5	12,3
Capacité Ret. Eau (mL/100 g sol)	34,7	42,8	39,7	48

Tableau : Caractéristiques des sols standards

ANNEXE B

Références des produits et du matériel

1) Test *Vicia faba* Micronoyaux

Acide acétique glacial	A-6283	Sigma
HCl	1.00313	Merck
Orcéine	O-7380	Sigma
Lames 76x22	05.633.922	Prolabo
Lamelles 16x16	05.640.163	Prolabo

2) Dosage des activités des enzymes du Stress oxydant

Cuve spectrophotométrie UV 1,5 mL	Cat N° 7591 50	Brand
Cuve spectrophotométrie visible 1,5 mL	Cat N° 7591 15	Brand
NBT	N-5514	Sigma
H ₂ O ₂	95313	Fluka
PVPP	Cat 13,229-2	Sigma
Guaiacol	G5502	Sigma
Ascorbate	A5960	Sigma
NADPH	N1630	Sigma
GSSG	G-6654	Sigma
TBA	T5500	Sigma
TCA	T-9159	Sigma
Riboflavine	N° R-4500	Sigma
L-méthionine	M9625	Sigma
EDTA	Cat 25,235-2	Sigma

Annexe C

Gamme étalon pour le dosage des phytochélatines

Préparation des solution mères

L'extraction étant réalisée dans SSA 5% + DTPA 5 mM (5g SSA Di-hydraté ($M_r= 254,21$) pour 100 mL d'eau ultra pure + 0,197 g DTPA ($M_r= 393,35$)), Ce sera la matrice adoptée pour la gamme.

PC₂ : 0,1 M (synthétisée)

GSH : 0,1 M (pour 1 mL peser 30,7 mg de GSH ($M_r= 307,3$), aliquoter à 100 μ L à -80°C.

γ -GC : 0,1 M (pour 1 mL peser 25 mg de γ -GC ($M_r= 250,3$), aliquoter à 100 μ L à -80°C.

Cys : 0,1 M (pour 1 mL peser 12,1 mg de Cys ($M_r=121,2$), aliquoter à 100 μ L à -80°C.

Points de gamme

Diluer en cascade les quatres solutions mères : 0,1 M \rightarrow 0,01 \rightarrow 0,001 \rightarrow 0,0001 ; puis suivre le tableau.

	2,5 μ M	5 μ M	10 μ M	30 μ M	50 μ M
PC₂	12,5 μ L de 0,0001 M	25 μ L de 0,0001 M	50 μ L de 0,0001 M	150 μ L de 0,0001 M	25 μ L de 0,001 M
GSH	12,5 μ L de 0,0001 M	25 μ L de 0,0001 M	50 μ L de 0,0001 M	150 μ L de 0,0001 M	25 μ L de 0,001 M
γ-GC	12,5 μ L de 0,0001 M	25 μ L de 0,0001 M	50 μ L de 0,0001 M	150 μ L de 0,0001 M	25 μ L de 0,001 M
Cys	12,5 μ L de 0,0001 M	25 μ L de 0,0001 M	50 μ L de 0,0001 M	150 μ L de 0,0001 M	25 μ L de 0,001 M
SSA + DTPA	QSP 500 μ L	QSP 500 μ L	QSP 500 μ L	QSP 500 μ L	QSP 500 μ L
	462,5 μ L	425 μ L	350 μ L	50 μ L	425 μ L

Annexe D

Obtention d'un bio-étalon phytochélatine

Etape 1 : Croissance bactérienne et synthèse de PCS (Chez la colonie ara8-pET28b-BL21)

Ces bactéries sont génétiquement modifiées. Ainsi elles sont capables de synthétiser une phytochélatine synthase (provenant d'*Arabidopsis thaliana*), marquée par une queue poly histidine (6 histidines), laquelle est sous l'influence d'un promoteur IPTG.

A partir d'un étalement sur boîte.

- Le soir mettre dans un erlen 30 ml de milieu LB, avec la souche et de la Kanamicine (anti-biotique à 10 µg/mL). Laisser en agitation Over night à 37°C.
- Le lendemain prendre 1mL de la solution over night les mettre dans 100 mL de milieu LB avec la Kanamicine. Lorsque la DO atteint la valeur de 0,6, ajouter l'IPTG (concentration finale de 1mM). Laisser incubé 4h30 à 30 °C.
- Faire 2 tubes de 50 ml et centrifuger à 7000g pendant 10 min à 4 °C.
- Laver en re-suspendant les culots dans 30 mL d'eau physiologique (NaCl à 1%). Centrifuger de nouveau.
- Faire à nouveau un lavage et rassembler 2 culots dans un même tube, en re-suspendant toujours dans 30 mL.
- Les culots peuvent être conservés à 80°C.

Etape 2 : Purification de la PCS sur colonne en conditions natives

Le kit utilisé provient de chez QUIAGEN. Il s'agit du Kit « Ni-NTA Spin Kit », permettant de séparer des protéines comportant une queue poly histidine.

- Dégeler les cellules 15 min et les re-suspendre dans 1 mL de tampon de lyse.
- Lyser les cellules au broyeur à billes (1mm) avec deux périodes d'agitation de 30 sec suivit de 30 sec de repos. Le matériel ainsi que les échantillons sont placés sur la glace.
- Centrifuger 10 min à 4°C à 7000 g .
- Equilibrer la colonne avec 600 µL de tampon de lyse. Centrifuger 2 min à 700 g.

- Charger les 600 μL de lysa contenant la protéine dans la colonne. Centrifuger 2 min à 700 g et collecter le liquide passé au travers de la colonne.
- Nettoyer la colonne 2 fois avec 600 μL de tampon de lavage. Centrifuger 2 min à 700 g
- Eluer la protéine (PCS) 2 fois avec 200 μL de tampon d'éluat. Centrifuger 2 min à 700 g et collecter l'éluat.

Tampon de lyse

Pour l'équilibrage de la colonne : 600 μL de solution :

Solution mère	60 μL
Imidazole 10 mM	6 μL
H ₂ O milliQ	534 μL

Tampon de lavage

Pour 1,2 mL de solution :

Solution mère	120 μL
Imidazole 20 mM	24 μL
H ₂ O milliQ	1056 μL

Tampon d'éluat

Pour 400 μL de solution :

Solution mère	40 μL
Imidazole 250 mM	100 μL
H ₂ O milliQ	260 μL

Essais de bio-synthèse des phytochélatines

Cet essai est mené à partir de la fraction purifiée de protéine. La quantité de PCS utilisée est de 100 μL de l'éluat.

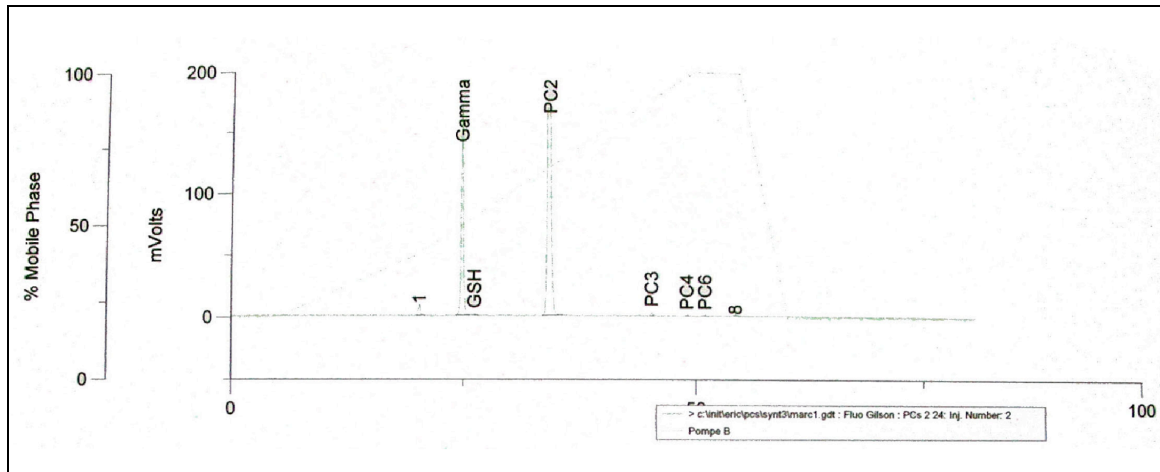
Synthèse des phytochélatines

Préparer une solution dont le volume final est de 250 μL :

- Glutathion 6,6 mM
- β mercaptoéthanol 10 mM

- Hepes (pH = 8) 200 mM
- PCS 100µL de l'élua
- Métal 200 µM

- Durée d'incubation : 24 heures à 35 °C
- Précipitation des protéines par l'ajout de 20 µL d'acide Trifluoroacétique à 50 %.



Nom des pics	Temps de rétention	Aire
Gamma	24.90	4776596
GSH	26.26	33947
PC2	34.06	9314712
PC3	45.29	76037
PC4	49,08	11122
PC5	49,98	
PC6	51,05	14187
PC7 ?	54,34	20326

Figure: Profil de l'étalon biosynthétisé et tableau des temps de rétention des molécules

La bio synthèse de l'étalon PCs donne, en fonction des essais des quantités de produit variables. Ici il y a une forte quantité de PC₂, mais PC₅ est absente au profit de la présence de PC₇. D'autres essais montrent moins de PC₂ et plus de PC 3 à 6. Ils ne présentent pas de PC₇. Cependant entre les étalons, les temps de rétention sont constants.

ANNEXE E

Induction PCs : comparatif racines, feuilles

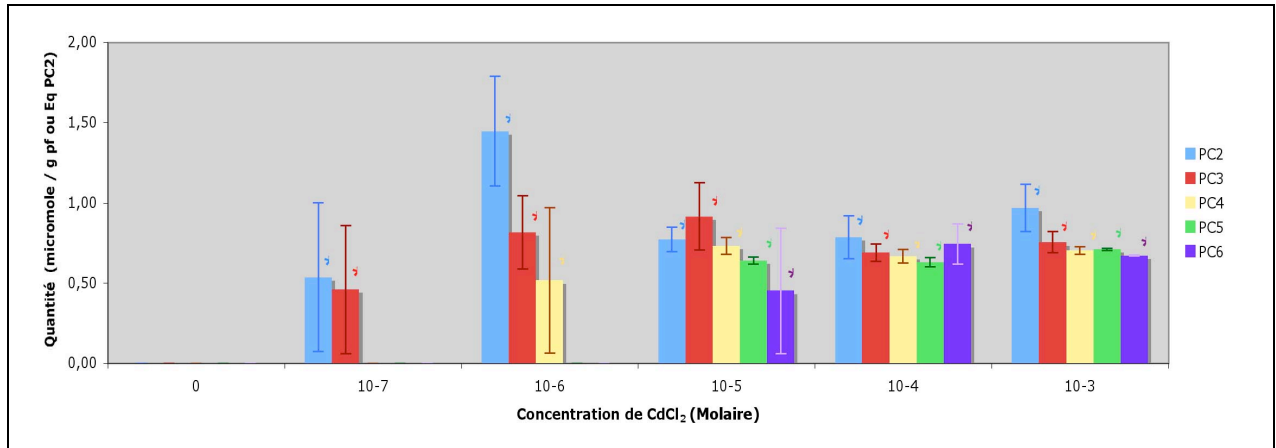


Figure 1 : Effet de la concentration en CdCl₂ du milieu sur l'induction des PC dans les racines.

* : valeur statistiquement différente du témoin (n=3 ; p<0,05).

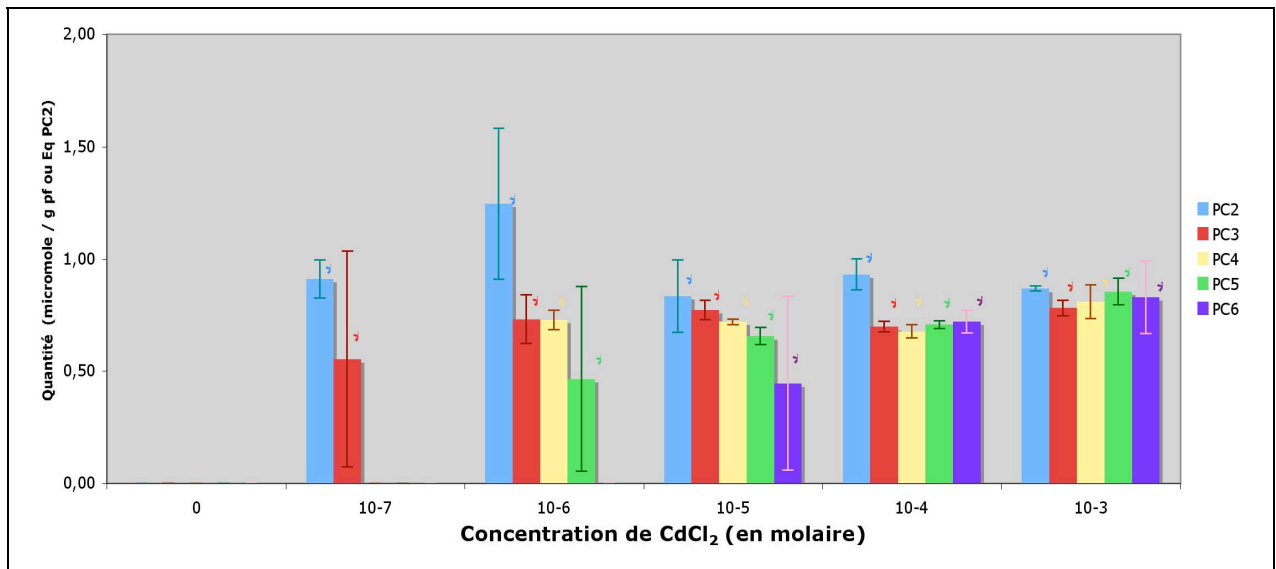


Figure 2 : Effet de la concentration en CdCl₂ du milieu sur l'induction des PC dans les feuilles de rang 1.

* : valeur statistiquement différente du témoin (n=3 ; p<0,05).

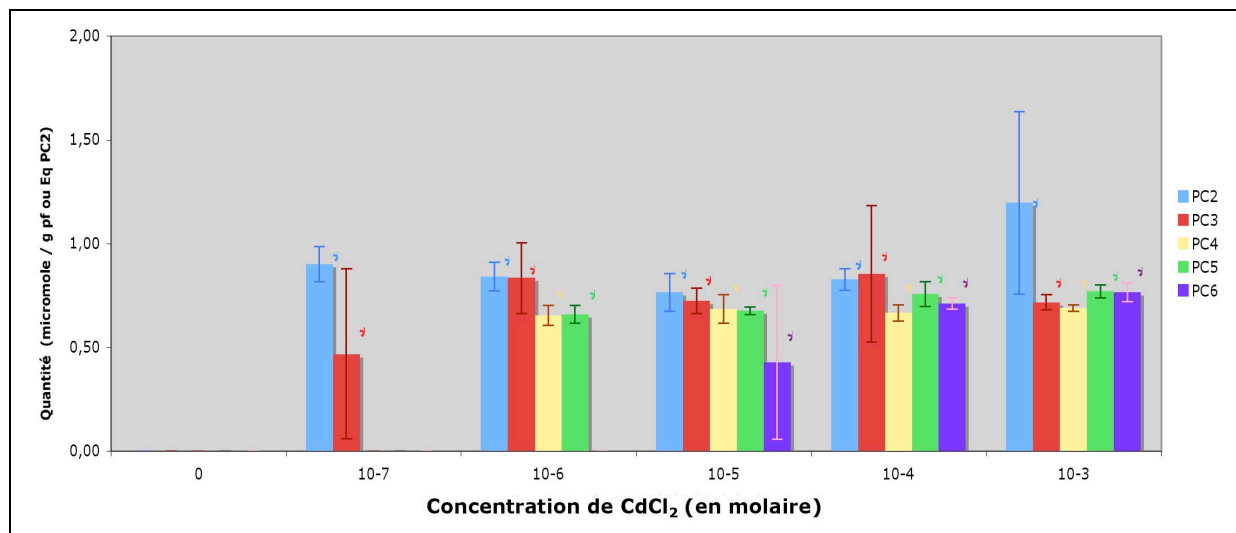


Figure 3 : Effet de la concentration en CdCl₂ du milieu sur l'induction des PC dans les feuilles de rang 2.

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

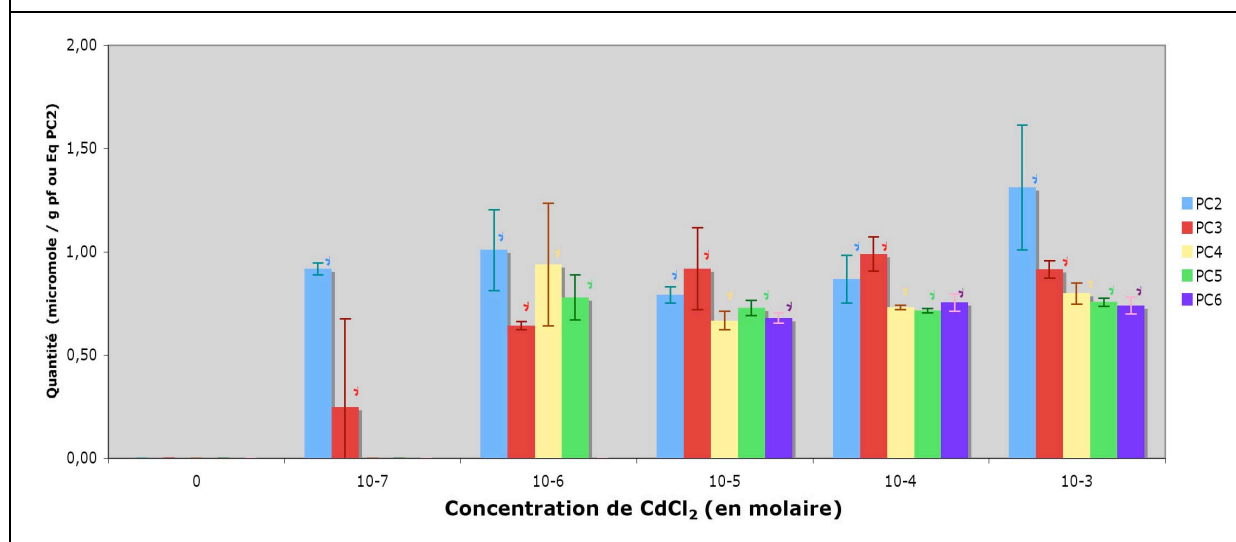


Figure 4 : Effet de la concentration en CdCl₂ du milieu sur l'induction des PC dans les feuilles de l'apex.

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

ANNEXE F

Stabilité des PCs sur 10 jours

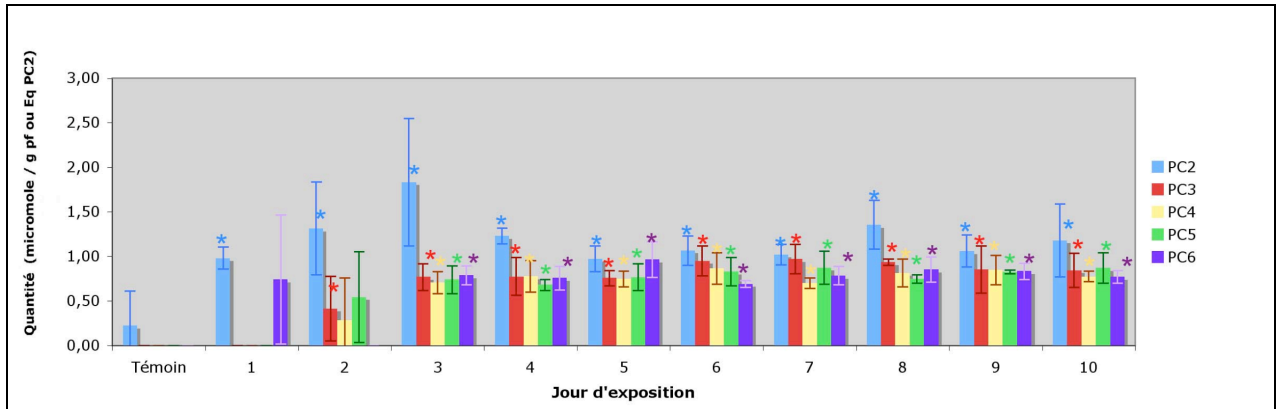


Figure 1 : PC induites à 10^{-5} M dans les racines de *Vicia faba* en fonction du temps
* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

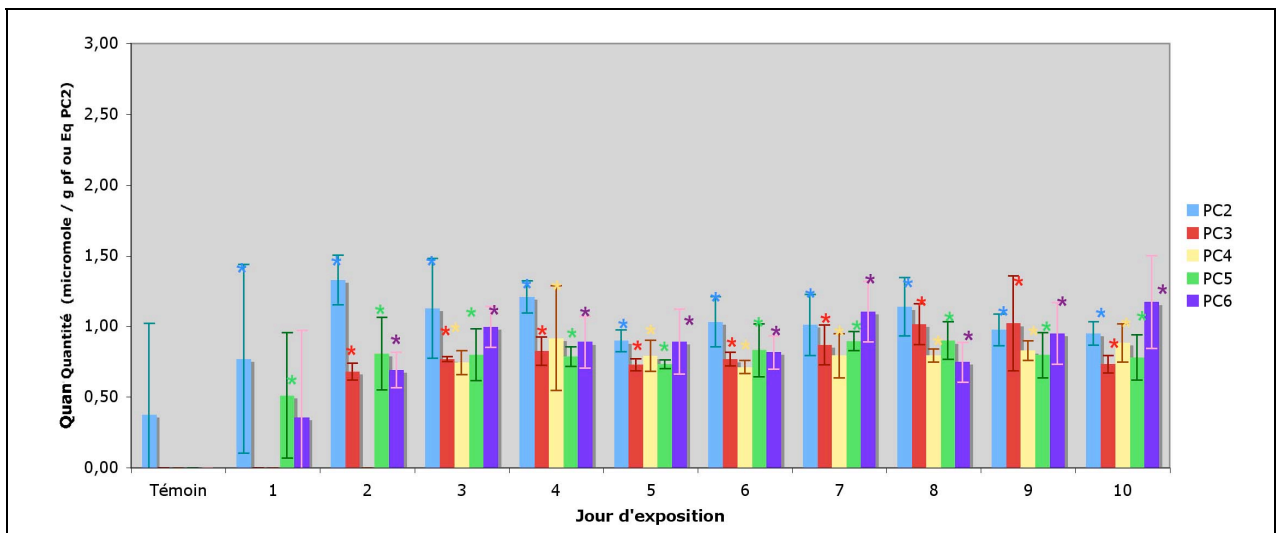


Figure 2 : PC induites à 10^{-5} M dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps
* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

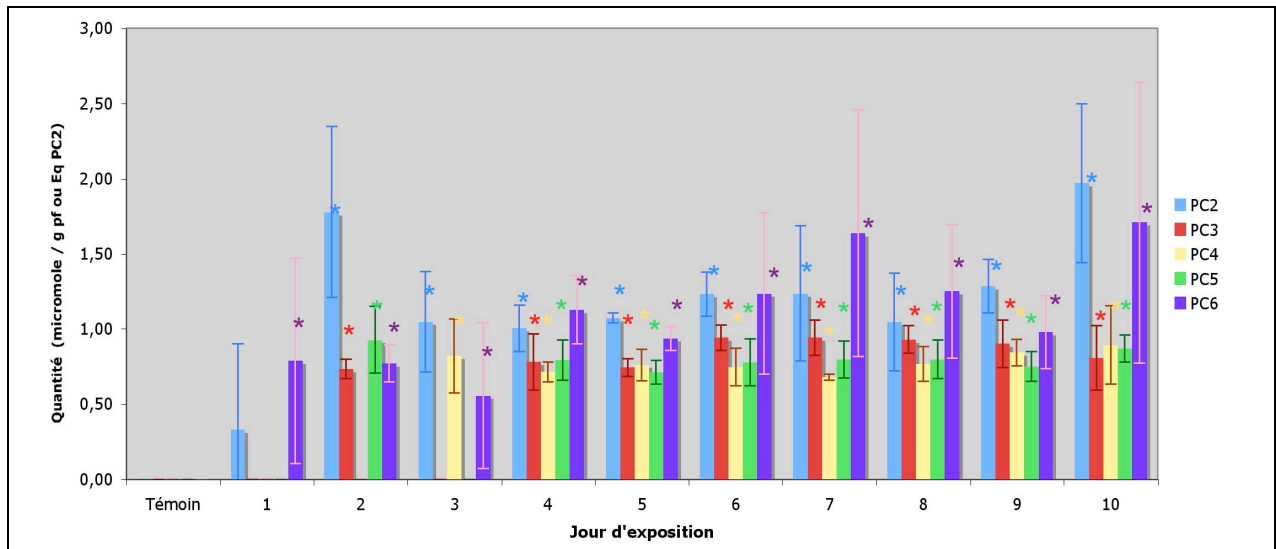


Figure 3 : PC induites à 10^{-5} M dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps
 * : valeur statistiquement différente du témoin (n=3 ; p<0,05).

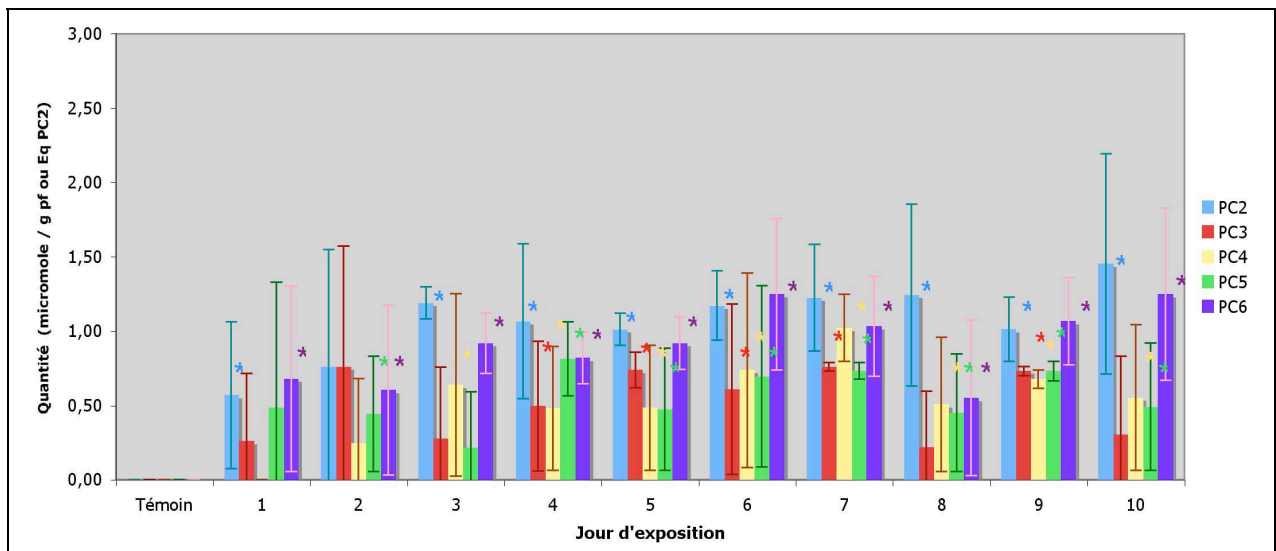


Figure 4 : PC induites à 10^{-5} M dans l'apex en fonction du temps
 * : valeur statistiquement différente du témoin (n=3 ; p<0,05).

ANNEXE G

Comportement des PCs après une exposition de 48 heures au cadmium

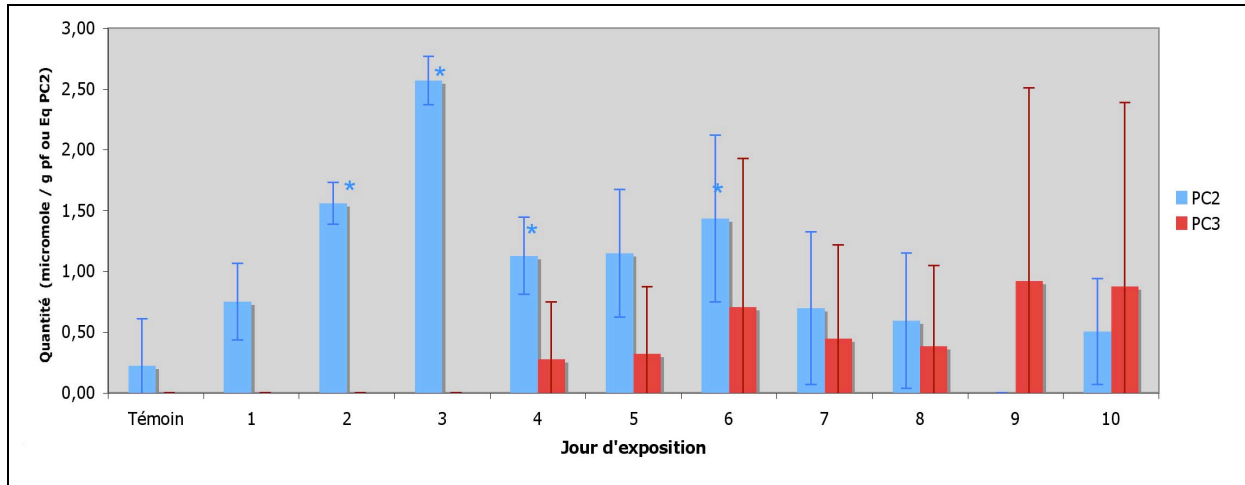


Figure 1 : PC induites à 10^{-5} M après 48 heures d'exposition dans les racines en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

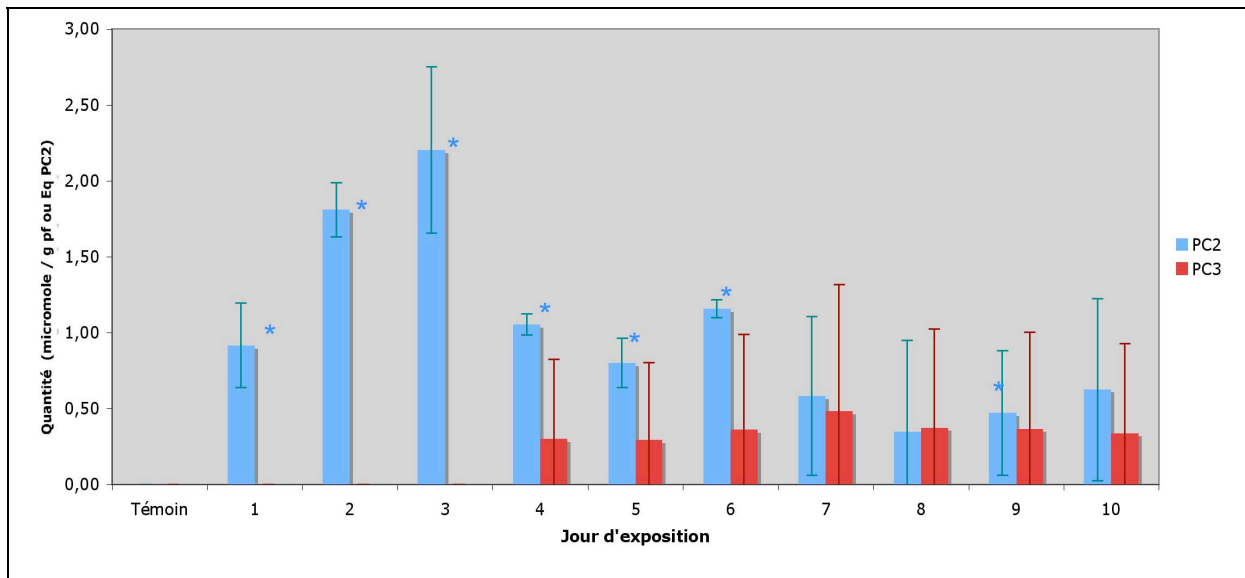


Figure 2 : PC induites à 10^{-5} M après 48 heures d'exposition dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

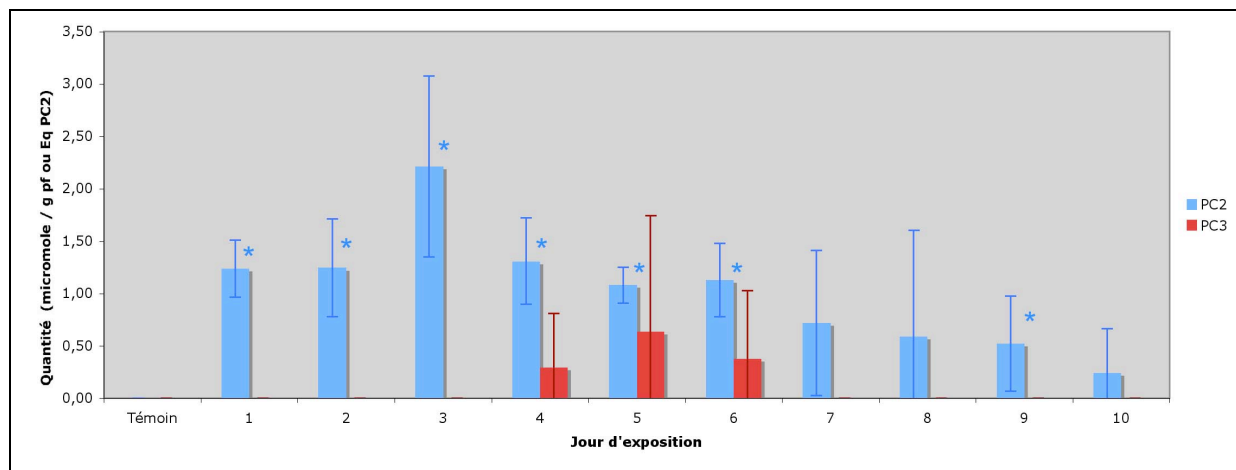


Figure 3 : PC induites à 10⁻⁵ M après 48 heures d'exposition dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

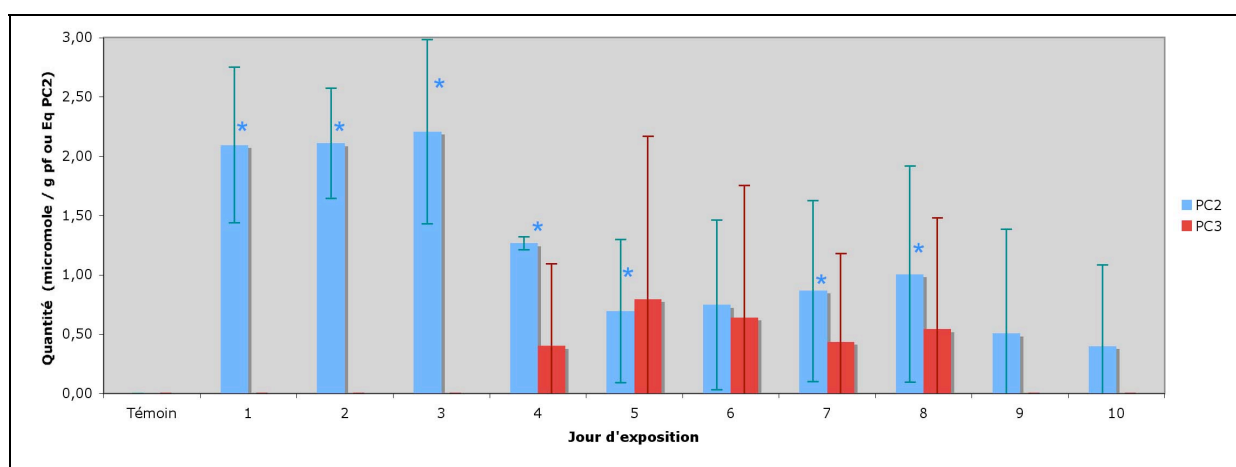


Figure 4 : PC induites à 10⁻⁵ M après 48 heures d'exposition dans l'apex en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

ANNEXE H

Rapidité de l'induction des PCs (Exposition à 10^{-5} M de cadmium)

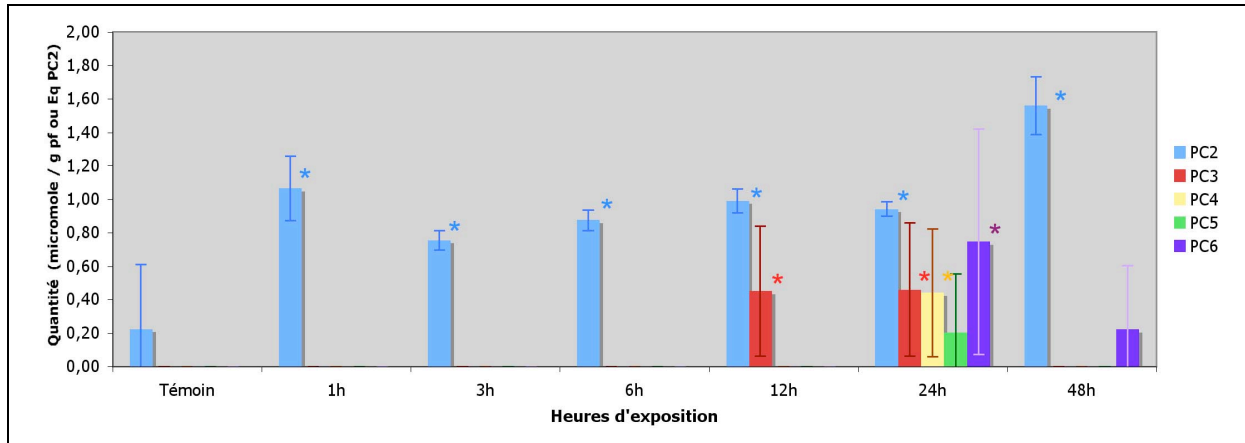


Figure 1 : PC induites à 10^{-5} M pendant 48 heures d'exposition dans les racines en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

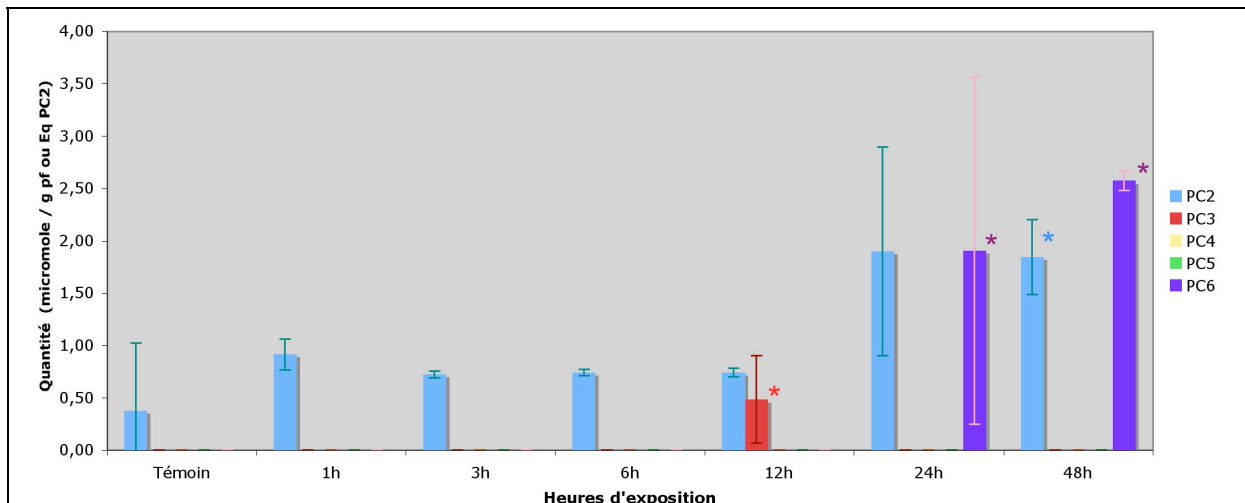


Figure 2 : PC induites à 10^{-5} M pendant 48 heures d'exposition dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

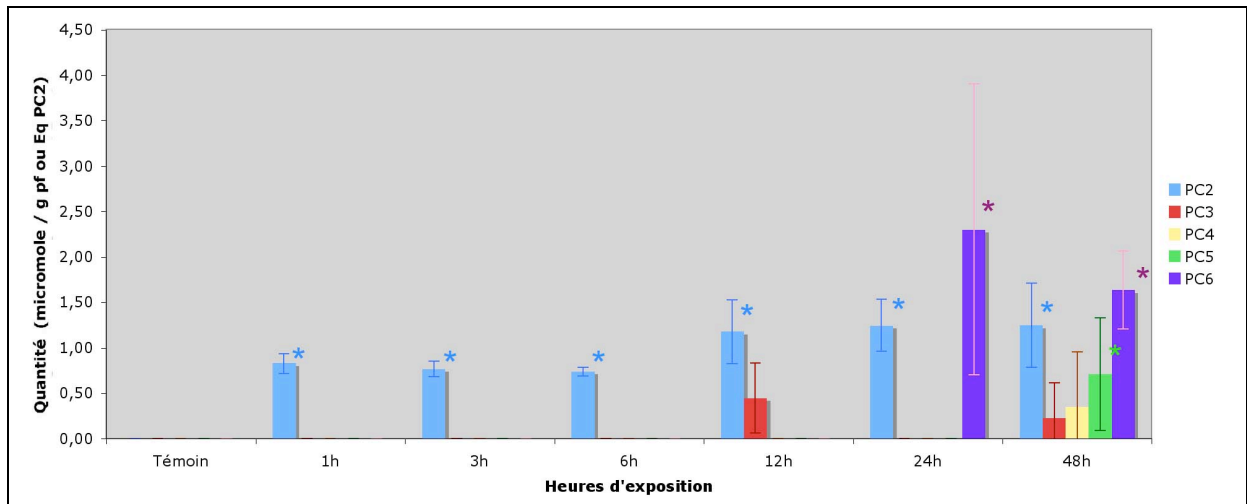


Figure 3 : PC induites à 10^{-3} M pendant 48 heures d'exposition dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

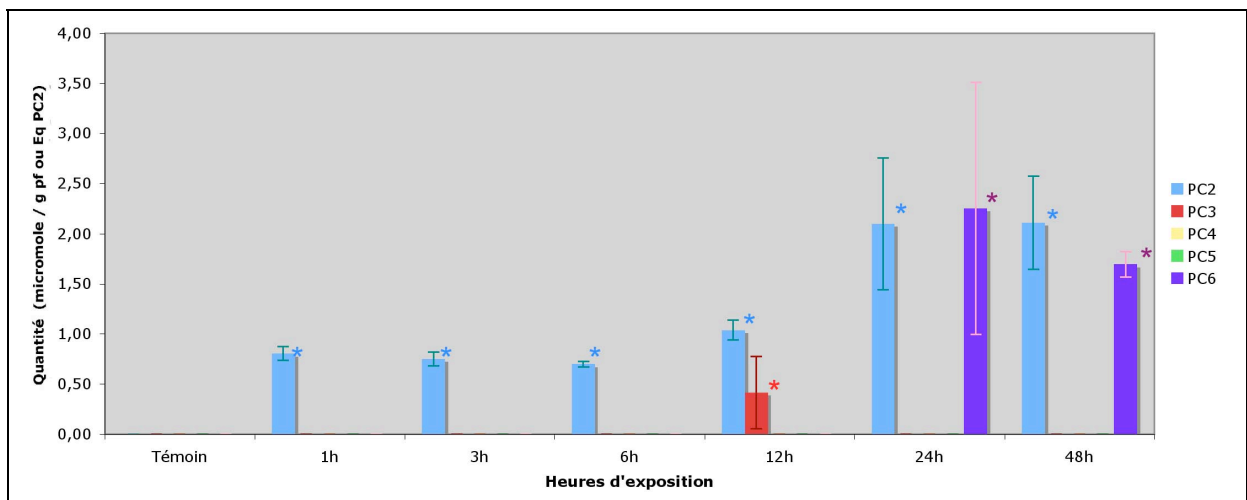


Figure 4 : PC induites à 10^{-5} M pendant 48 heures d'exposition dans l'apex en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

ANNEXE I

Rapidité de l'induction des PCs (Exposition à 10^{-3} M de cadmium)

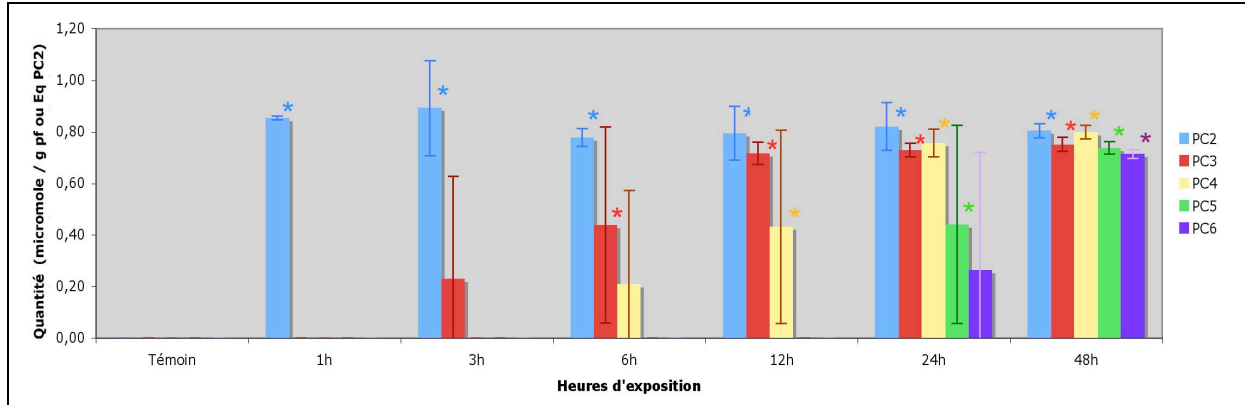


Figure 1 : PC induites à 10^{-3} M pendant 48 heures d'exposition dans les racines en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

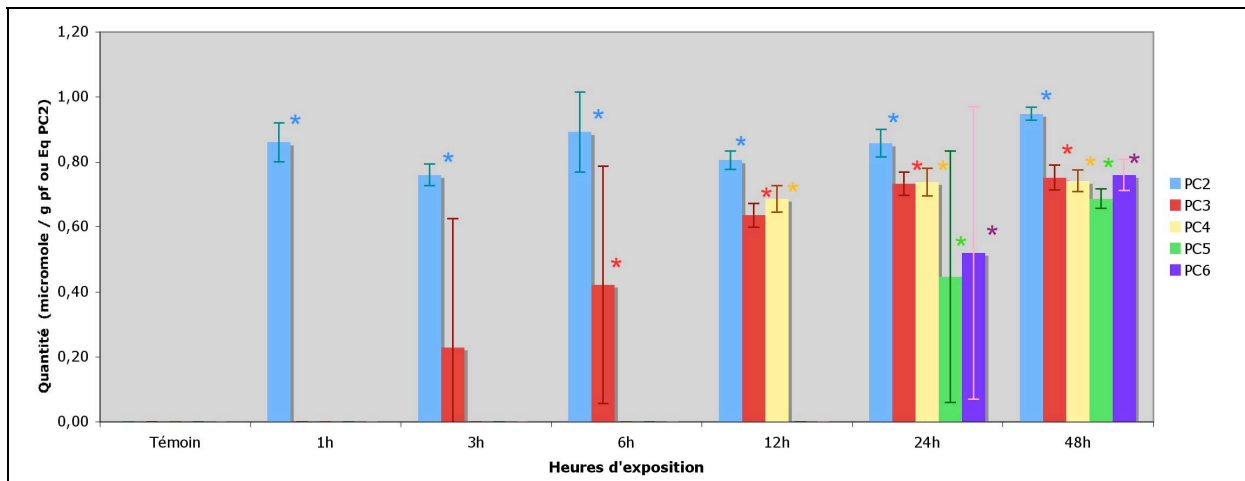


Figure 2 : PC induites à 10^{-3} M pendant 48 heures d'exposition dans les feuilles de rang 1 en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

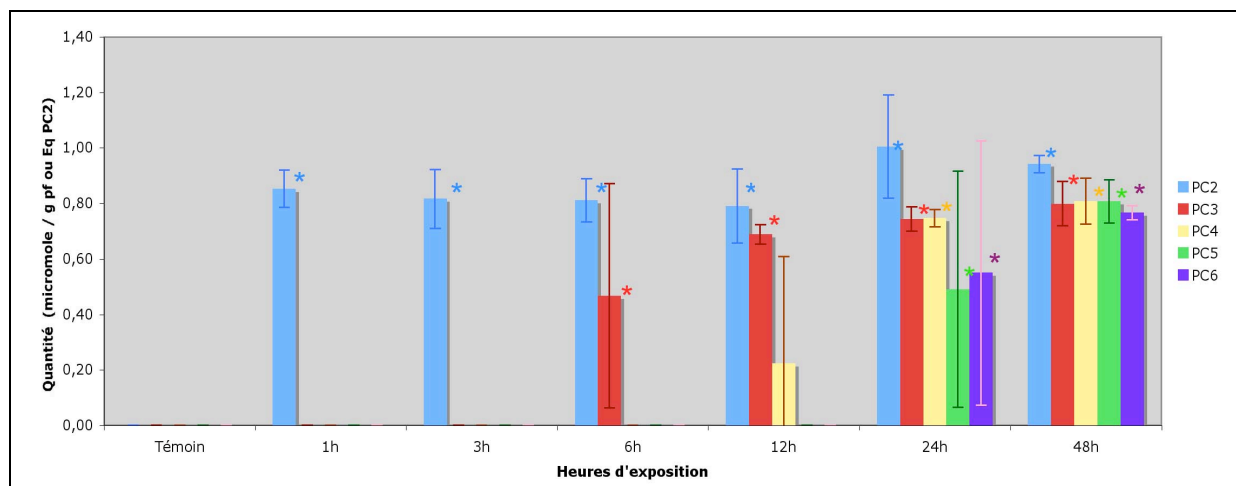


Figure 3 : PC induites à 10^{-3} M pendant 48 heures d'exposition dans les feuilles de rang 2 en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

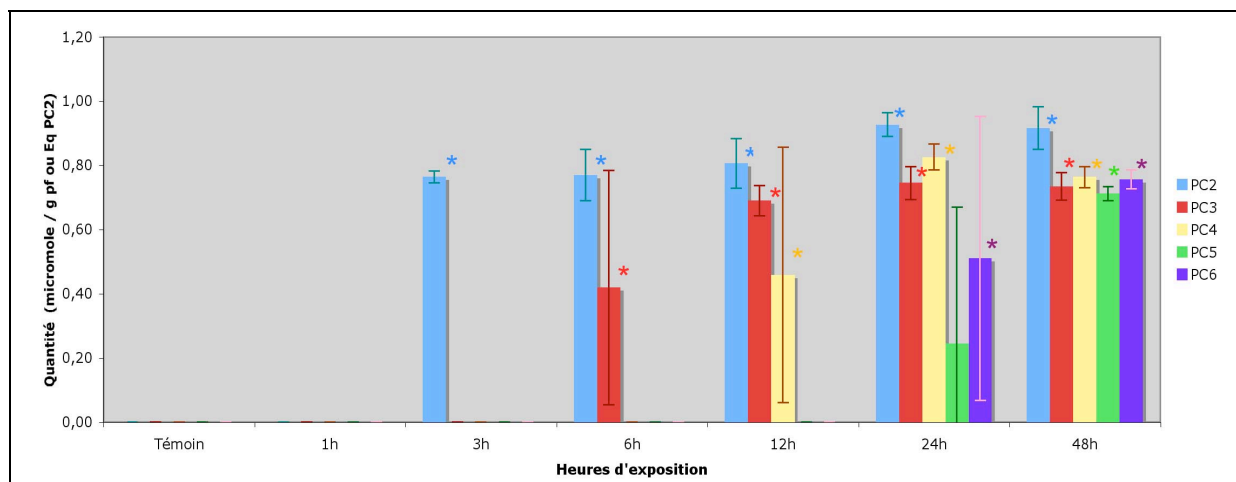


Figure 4 : PC induites à 10^{-3} M pendant 48 heures d'exposition dans l'apex en fonction du temps

* : valeur statistiquement différente du témoin, (n=3 ; p<0,05).

ANNEXE J

Présentation des sites

1) Le site du GISFI



Figure 1: Vue des parcelles

2) Les sites des Vosges



Figure 2: Situation géographique du Parc Naturel Régional des Vosges du Nord

➤ Etang de Baerenthal

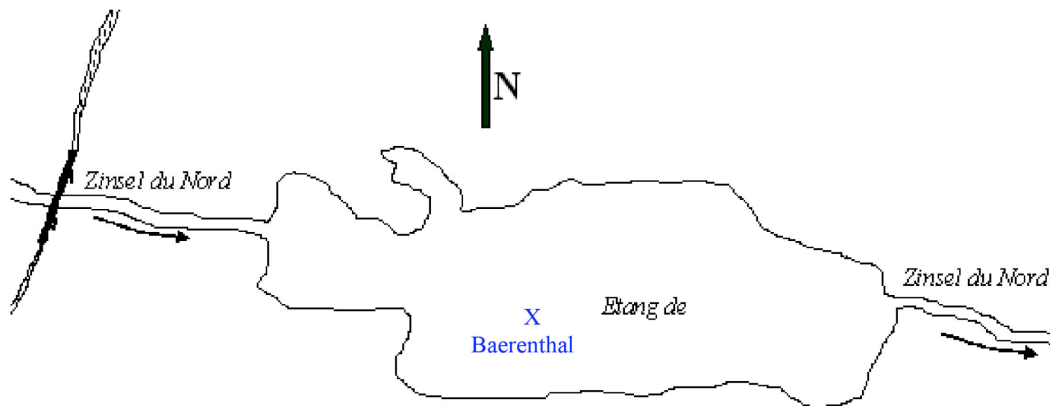


Figure 3 : Repérage du lieu de prélèvement de l'étang de Baerenthal

➤ Etang d'Erbsenthal

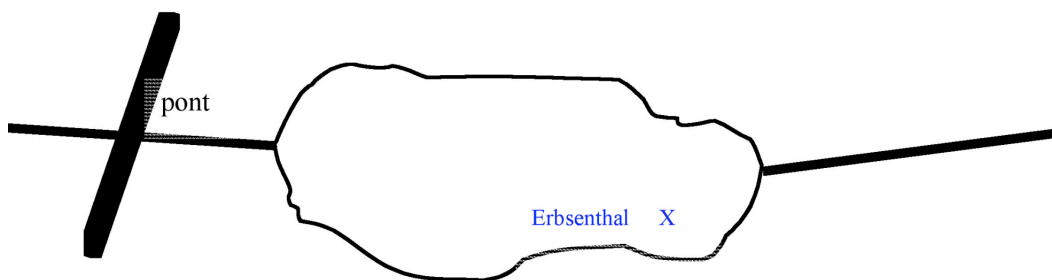


Figure 4: Repérage du lieu de prélèvement au niveau de l'étang d'Erbsenthal

3) Le site de Veymérage

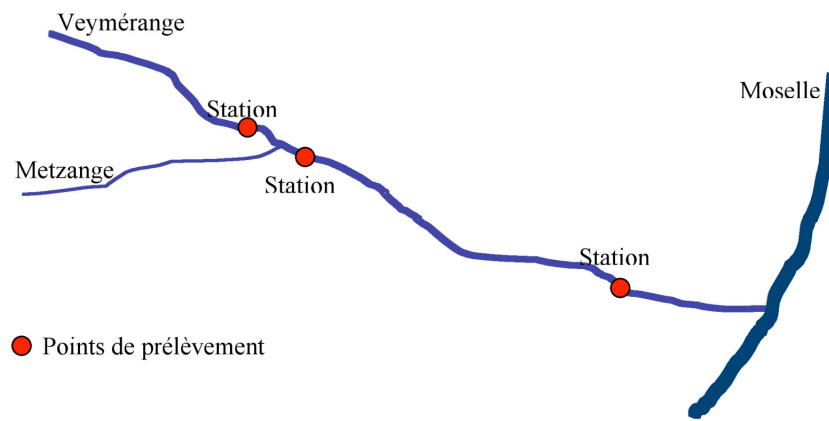


Figure 5 : Localisation des points de prélèvement sur le ruisseau du Veymérage

ANNEXE K

Résultats GISFI (Lixiviats)

Sol NM2 A (26 octobre 2005) :

NM2A				
Concentration (%)	Témoin	3,125	6,25	12,5
Moyenne ± Ecart type (cm)	1,06 ± 0,35	1,97 ± 0,45 *	1,89 ± 0,58	2,07 ± 0,64 *

Concentration (%)	25	50	75	100
Moyenne ± Ecart type (cm)	2,03 ± 0,51 *	1,32 ± 0,16	1,14 ± 0,14	1,58 ± 0,44

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 1 : résultats de l'élongation racinaire

Concentration	Témoin	50 %	75 %	100 %
Mitose (%)	10,57	10,16	11,28	9,00*
E-T	0,14	0,47	4,18	0,34
MNX (‰)	0,00	1,30*	2,61*	3,62*
E-T	0,00	0,43	0,75	2,54

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 2 : résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Sol NM1 D (26 octobre 2005) :

NM1D				
Concentration (%)	Témoin	12,5	25	50
Moyenne ± Ecart type (cm)	24,11 ± 2,09	20,89 ± 2,52	23,22 ± 4,52	25,78 ± 2,05

Concentration (%)	75	100
Moyenne ± Ecart type (cm)	17,00 ± 4,47 *	16,56 ± 3,50 *

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 3 : résultats de l'élongation racinaire

Concentration	Témoin	12,5 %	25 %	50 %	75 %	100 %
Mitose (%)	12,56	13,33	10,94*	7,45*	6,02*	4,03*
E-T	0,57	0,78	0,67	0,58	0,39	0,20
MNX (‰)	0,00	0,72*	1,59*	8,40*	17,39*	2,17*
E-T	0,00	0,50	0,66	1,40	7,97	1,15

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 4 : résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Sol NM2 D (26 octobre 2005) :

NM2D				
Concentration (%)	Témoin	12,5	25	50
Moyenne ± Ecart type (cm)	24,11 ± 2,09	25,11 ± 5,21	25,78 ± 3,23	3,67 ± 4,12

Concentration (%)	75	100
Moyenne ± Ecart type (cm)	24,67 ± 6,48	22,56 ± 5,34

Aucune différence significative (n=6 ; p<0,05)

Tableau 5 : résultats de l'élongation racinaire

Concentration	Témoin	12,5 %	25 %	50 %	75 %	100 %
Mitose (%)	12,56	10,08*	8,97*	6,05*	5,18*	3,15*
E-T	0,57	0,30	0,11	0,45	0,10	0,24
MNX (‰)	0,00	0,14	1,02*	8,70*	14,3*	1,74*
E-T	0,00	0,25	0,66	0,87	1,99	0,43

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 6 : résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Sol NM DT (mars 2006) :

Concentration (%)	Témoin	50	75	100
Moyenne ± Ecart type (mm)	24,22 ± 2,11	26,44 ± 5,10	13,56 ± 2,51*	13,44 ± 1,42*

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 7: résultats de l'élongation racinaire

Concentration	Témoin	12,5 %	25 %	50 %	75 %	100 %
Mitose (%)	14,77	11,65*	11,66*	8,68*	7,31*	6,55*
E-T	1,67	0,31	0,92	0,32	0,36	0,16
MNX (‰)	0,14	1,01*	0,91*	4,05*	8,98*	7,82*
E-T	0,25	0,66	0,75	0,66	2,05	0,43

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 8 : résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Sol NM1 (Juillet 2006) :

Concentration (%)	Témoin	25	50	100
Moyenne ± Ecart type (mm)	20,8 ± 7,8	27,3 ± 3,1	22,7 ± 2,5	28,0 ± 8,7

Aucune différence significative (n=6 ; p<0,05)

Tableau 9: résultats de l'élongation racinaire

Concentration	Témoin	25 %	50 %	100 %
Indice mitotique (%)	12,11	10,96*	7,43*	7,16*
Ecart-type	0,17	0,23	0,39	0,17
Micronoyaux (‰)	0,14	0,87*	3,33*	4,05*
Ecart-type	0,25	0,43	0,25	0,25

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 10 : résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Sol NM2 (Juillet 2006) :

Concentration (%)	Témoin	25	50	100
Moyenne ± Ecart type (mm)	20,8 ± 7,8	25,7 ± 6,4	39,7 ± 1,5*	33,0 ± 1,0*

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 11 : résultats de l'élongation racinaire

Concentration	Témoin	25 %	50 %	100 %
Indice mitotique (%)	12,11	11,43	7,47*	7,00*
Ecart-type	0,17	0,72	0,19	0,17
Micronoyaux (⁰ / ₀₀)	0,14	0,72*	2,03*	2,17*
Ecart-type	0,25	0,25	0,25	0,25

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 12 : résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Sol NM3 (Juillet 2006) :

Concentration (%)	Témoin	25	50	100
Moyenne ± Ecart type (mm)	20,8 ± 7,8	30,0 ± 3,6	30,0 ± 7,6	29,7 ± 2,5

Aucune différence significative (n=6 ; p<0,05)

Tableau 13 : résultats de l'élongation racinaire

Concentration	Témoin	25 %	50 %	100 %
Indice mitotique (%)	12,11	10,74*	8,75*	6,87*
Ecart-type	0,17	0,14	0,05	0,19
Micronoyaux (⁰ / ₀₀)	0,14	0,14	1,59*	2,61*
Ecart-type	0,25	0,25	0,25	0,75

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 14: résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Sol DT1 (Juillet 2006) :

Concentration (%)	Témoin	25	50	100
Moyenne ± Ecart type (mm)	20,8 ± 7,8	24,0 ± 2,7	42,7 ± 3,5*	27,3 ± 0,6

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 15 : résultats de l'élongation racinaire

Concentration	Témoin	25 %	50 %	100 %
Indice mitotique (%)	12,11	10,73*	9,34*	6,42*
Ecart-type	0,17	0,11	0,07	0,05
Micronoyaux (⁰ / ₀₀)	0,14	0,14	1,45*	3,91*
Ecart-type	0,25	0,25	0,66	0,43

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 16: résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Sol DT1I (Juillet 2006) :

Concentration (%)	Témoin	25	50	100
Moyenne ± Ecart type (mm)	20,8 ± 7,8	23,33 ± 9,0	18,7 ± 1,2	25,7 ± 0,6

Aucune différence significative (n=6 ; p<0,05)

Tableau 17 : résultats de l'élongation racinaire

Concentration	Témoin	25 %	50 %	100 %
Indice mitotique (%)	12,11	11,59	7,67*	6,69*
Ecart-type	0,17	0,39	0,50	0,17
Micronoyaux (⁰/₀₀)	0,14	0,14	1,44*	3,77*
Ecart-type	0,25	0,25	0,25	0,25

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 18: résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Sol DT1II (Juillet 2006) :

Concentration (%)	Témoin	25	50	100
Moyenne ± Ecart type (mm)	20,8 ± 7,8	30,0 ± 2,7	30,7 ± 1,2*	32,0 ± 5,3

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 19 : résultats de l'élongation racinaire

Concentration	Témoin	25 %	50 %	100 %
Indice mitotique (%)	12,11	11,59	7,67*	6,44*
Ecart-type	0,17	0,15	0,50	0,24
Micronoyaux (⁰/₀₀)	0,14	0,14	1,44*	3,77*
Ecart-type	0,25	0,25	0,25	0,25

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; p<0,05)

Tableau 20: résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

ANNEXE L

Résultats GISFI (Percolats)

Percolat 1 (Avril 2006) :

Origine des percolats	Témoin Labo	Thlaspi	Medicago Saliva	Vég. Spon.	Medicago Saliva Myco	Terre désorbée	Terre nue
Indice mitotique (%)	12,24	11,33	10,79	11,42	11,14	11,20	10,87
Ecart-type	0,69	0,90	0,60	0,60	0,70	0,77	0,81
Micronoyaux (‰)	0,00	0,02	0,02	0,02	0,02	0,00	0,00
Ecart-type	0,00	0,04	0,04	0,04	0,07	0,00	0,00

Aucune différence significative (n=6 ; P<0,05)

Tableau 1 : résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Percolat 2 (Mai 2006) :

Concentration (%)	Témoin Lab	Thlaspi	Medicago Saliva	Veg spon
Moyenne ± Ecart type (mm)	48,67 ± 5,51	30,75 ± 13,65	28,75 ± 10,72*	33,50 ± 13,18

Concentration (%)	Medicago Saliva Myco	Terre désorbée •	Terre nue
Moyenne ± Ecart type (mm)	29,50 ± 7,00 *	0,00 ± 0,00	38,50 ± 10,34

* : significativement différent du témoin. (n=6 ; P<0,05)

• : aucun échantillon

Tableau 2 : résultats de l'élongation racinaire

Origine des percolats	Témoin Lab	Thlaspi	Medicago Saliva	Veg spon	Medicago Saliva Myco	Terre • désorbée	Terre nue
Indice mitotique (%)	14,30	13,85	14,18	13,67	12,15	0,00	13,08
Ecart-type	0,29	0,89	0,76	0,30	0,69	0,00	0,56
Micronoyaux (‰)	0,00	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00
Ecart-type	0,00	0,03	0,04	0,00	0,03	0,00	0,00

Aucune différence significative (n=6 ; P<0,05)

• : aucun échantillon

Tableau 3 : résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

Percolat 3 (Septembre 2006) :

Concentration (%)	Témoin Lab	Thlaspi	Medicago Saliva	Veg spon
-------------------	------------	---------	-----------------	----------

Moyenne ± Ecart type (mm)	26,67 ± 5,51	24,50 ± 8,10	16,75 ± 9,81	21,25 ± 5,85
----------------------------------	--------------	--------------	--------------	--------------

Concentration (%)	Medicago Saliva Myco	Terre désorbée •	Terre nue
Moyenne ± Ecart type (mm)	19,00 ± 9,29	0,00 ± 0,00	18,75 ± 12,53

Aucune différence significative (n=6 ; P<0,05)

• : aucun échantillon

Tableau 4 : résultats de l'élongation racinaire

Origine des percolats	Témoin Lab	Thlaspi	Medicago Saliva	Veg spon	Medicago Saliva Myco	Terre • désorbée	Terre nue
Indice mitotique (%)	14,30	13,85	14,18	13,67	12,15	0,00	13,08
Ecart-type	0,29	0,89	0,76	0,30	0,69	0,00	0,56
Micronoyaux (‰)	0,00	0,01	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00
Ecart-type	0,00	0,03	0,04	0,00	0,03	0,00	0,00

Aucune différence significative (n=6 ; P<0,05)

• : aucun échantillon

Tableau 5 : résultats de l'effet génotoxique (Micronoyaux)

ANNEXE M

Etude ACP des données sols

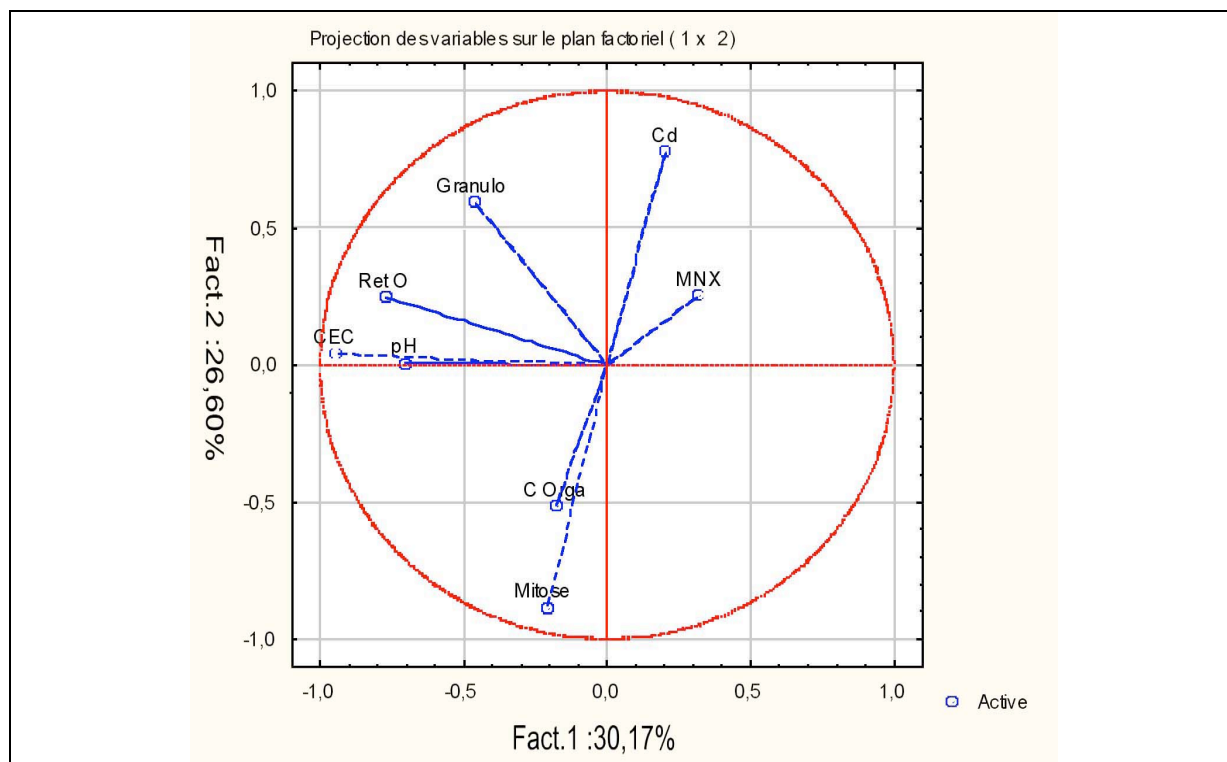


Figure 1 : Présentation suivant les Axes 1 et 2

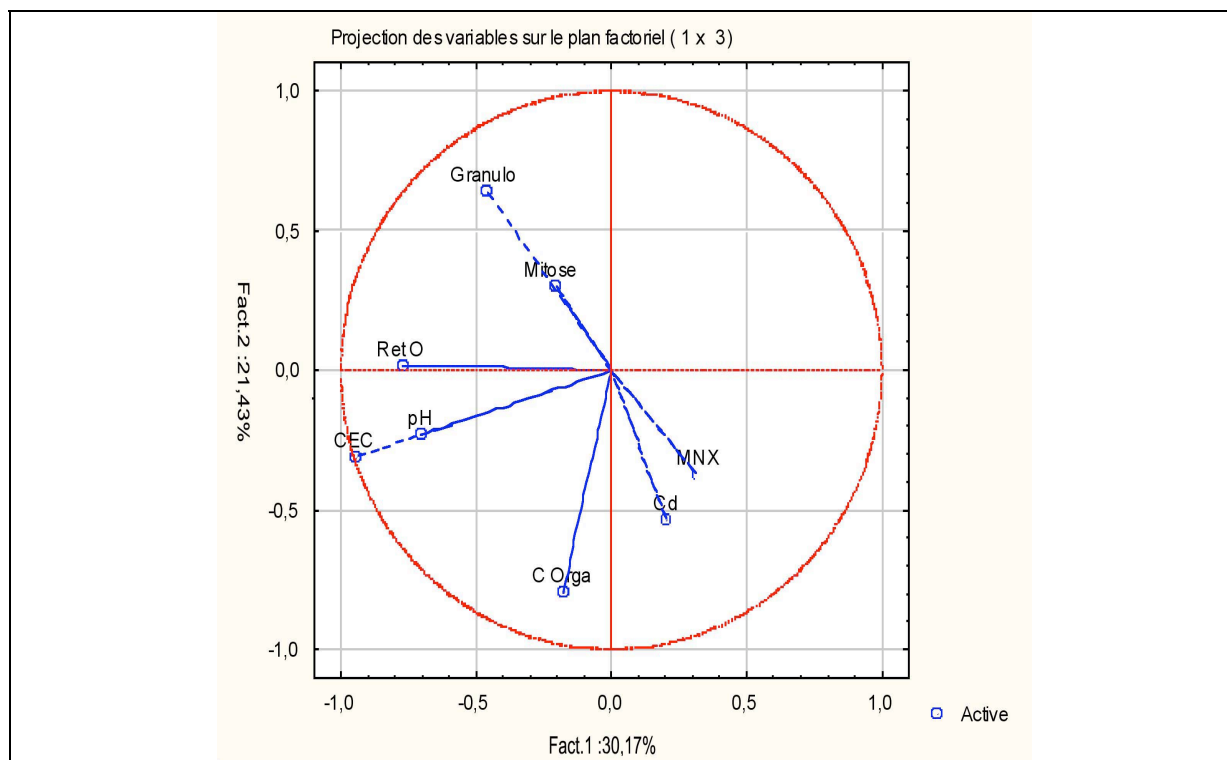


Figure 2 : Présentation suivant les Axes 1 et 3

Les plantes supérieures possèdent des mécanismes de défense leur permettant de supporter le manque de nutriments ainsi que la présence de polluants. Ces travaux, menés à la fois en milieu hydroponique et solide, ont permis d'étudier les relations entre génotoxicité et activation de certains mécanismes de défense, vis-à-vis du cadmium chez *Vicia faba* (fève). L'augmentation de la fréquence des micronoyaux (sélectionnée en tant que biomarqueur de génotoxicité), l'induction des phytochélatines, ainsi que l'activité d'enzymes du stress oxydant (i.e. superoxyde dismutase, ascorbate peroxydase, guaiacol peroxydase, catalase, glutathion réductase) et la quantité de malondialdéhyde (MDA), indicateur de peroxydation lipidique, ont été analysées. Afin d'étudier tous ces biomarqueurs, une gamme de concentrations en chlorure de cadmium (CdCl_2) proche des concentrations retrouvées lors de pollutions environnementales a été choisie.

Dans l'ordre, en partant des concentrations les plus faibles, le premier biomarqueur d'exposition observé, en milieu hydroponique, est l'augmentation de la fréquence des micronoyaux ($\text{LOEC} = 7,5 \cdot 10^{-8} \text{ M CdCl}_2$), suivie de la diminution des activités enzymatiques (APX, SOD, CAT à 10^{-7} M ; MDA à 10^{-5} M). Bien qu'induites dès 10^{-7} M , la présence de l'ensemble des phytochélatines (PC) ne sera réellement établie qu'à partir de 10^{-5} M . La réponse de ces biomarqueurs d'exposition au cadmium dépend du temps et de la concentration. Les tissus jouent, eux aussi, un rôle dans l'induction des PC et dans les niveaux d'activités enzymatiques.

Le test *V. faba* micronoyaux a été effectué en exposition directe en milieu solide, ainsi qu'avec des lixiviats provenant de sols multicontaminés. Les résultats obtenus suggèrent que l'induction des PC, observée à des niveaux de stress plus élevés, est en relation avec l'inactivation des autres mécanismes de tolérance étudiés. Elle est aussi associée au coût métabolique qu'elle engendre. Les résultats montrent enfin que le test *V. faba* micronoyaux en phase solide pourrait être efficace dans le cas d'études *in situ* de sols contaminés.

Mots clés : *Vicia faba* ; cadmium ; micronoyaux ; phytochélatines ; enzymes du stress oxydant ; biomarqueurs

Higher plants demonstrate defence mechanisms whereby they are able to respond to both nutrient deficiencies and toxicants. In this work, cadmium genotoxicity and quantitative relationships between different hierarchical endpoints in *Vicia faba* (broad bean) cultivated in both contaminated environment (i.e. hydroponical and soils) were studied.

Increases of micronucleus (MN) frequencies (genotoxicity endpoint), phytochelatin induction and antioxidative enzyme activities (i.e. superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, catalase, glutathione reductase) and malondialdehyde (MDA), indicator of lipid peroxidation, were analysed. To study the process of stress adaptation in *Vicia faba* plants, different realistic CdCl_2 concentrations were employed.

In hydroponic culture, the increase of micronucleus frequency was the first cadmium exposure effect that appeared ($\text{LOEC}: 7,5 \cdot 10^{-8} \text{ M CdCl}_2$). Then decreases of antioxidative enzymes activities were observed (APX, SOD, CAT at 10^{-7} M ; MDA for 10^{-5} M). Phytochelatin induction was detected from 10^{-7} M , but it was more effective from 10^{-5} M . A time-concentration dependent response of cadmium was observed, for these cadmium exposure indicators. A tissue dependent response of cadmium was observed for enzymes activities and phytochelatin induction too.

The micronuclei bioassay was also tested with *V. faba* plants directly exposed in cadmium polluted soils and on leachates from multi contaminated soils. Our results suggest that the synthesis of phytochelatin, observed in higher degrees of stress, was related to the inactivation of other tolerance mechanisms and that it was associated with the metabolic cost of these mechanisms. The results also show that *V. faba* micronuclei bioassay would be efficient for *in situ* studies of contaminated soils.

Keywords: *Vicia faba* ; cadmium ; micronuclei ; phytochelatin ; antioxidative enzyme activity ; hydroponic; soils.
