

## Phytoremédiation : apport de la sélection *in vitro* pour l'obtention de Colza (*Brassica napus L.*) tolérant aux métaux toxiques.

### Phytoremediation: *in vitro* selection of Rapeseed (*Brassica napus L.*) tolerant of toxic metals.

Asma BEN GHAYYA<sup>1</sup>, Gilbert CHARLES<sup>2</sup>, Jeannette BEN HAMIDA<sup>1</sup>  
et Michel BRANCHARD<sup>2</sup>.

**Abstract:** Pollutants can be taken by plants and animals. Some of them, such as toxic heavy metals (Zn, Pb, Cd and Cu), are associated with health problems in plants, animals and men. Therefore, depollution of soils and other sources of these metals appears to be a key issue. For this purpose, a number of methods have been used for decades. Traditional remediations options for metals presence in soil often involve conventional civil engineering practices applied singly, in combination, or in a treatment train. These physical, chemical, and thermal processes lead to the physical removal of the metal from the site or the minimization of site exposure. These remediation options are coming under increasing criticism for their high costs, logistical problems, and an increasing degree of public dissatisfaction. Hence, it is necessary to develop new means for depollution of soils.

One way towards this objective is plant-based remediation. Phytoremediation is an emerging technology with considerable promise for restoring contaminated sites, based on the use of heavy metals consuming plants. In this respect, serious and immediate consideration should be given to this technology both in developing and developed countries because phytoremediation action is low cost effective and environmentally friendly.

Phytoremediation is believed, in certain situations, to demonstrate superior economic, technical, and environmental advantages over traditional physical, chemical, and thermal remediation techniques. Phytoremediation relies on main strategies for remediating metals including Phytoextraction, Phytodegradation, Phytostabilisation, Phytovolatilisation and Rhizofiltration. Phytoextraction resorts to metal-accumulating plants for extracting contaminants from soil, concentrating them in roots and aerial parts. The properties of these plants could thereafter be optimised using biotechnology.

Plant biotechnologies should be helpful for the production of variants or mutants for main factors controlling the uptake, transport and accumulation of pollutants in crop plants. The genotypes modified for heavy metal content (hyper or hypo accumulators) will provide a useful tool and lead to a better understanding of the mechanisms involved in this complex phenomenon. They should finally help to select interesting varieties for phytoremediation of polluted fields or for improved food safety.

In this respect, Rapeseed (*Brassica napus L.*) was shown to be able to accumulate substantial amounts of metals combined with high biomass. The aim of the project is to select hyperaccumulator plants by the technique of transversal Thin Cell Layers (tTCLs) cultivated *in vitro* in the presence of heavy metals. Rapeseed will be modified for heavy metal tolerance and accumulation through *in vitro* selection. A selective pressure applied during the neoformation process from transversal thin cell layers (tTCLs) will help to select tolerant cells and tissues. Toxic metals (Zn, Pb, Cd and Cu) will be added to the culture media in order to enhance genetic changes. Exerting a selective pressure during the regeneration process from tTCLs may help to select plants with exceptional zinc and lead tolerance and/or accumulating capacity. These regenerated plants submitted to abiotic stress will be further analysed for morphological, physiological and genetic characteristics.

Key words: Phytoremediation, Phytoextraction, heavy metals, hyperaccumulators plants, Biotechnology, selective pressure, *in vitro* culture, tTCLs, regeneration.

<sup>1</sup>Unité de Protéomie fonctionnelle et Biopréservation alimentaire (ISSBAT) (Tunisie).

<sup>2</sup>Laboratoire de Biotechnologie et Physiologie Végétales - ISAMOR/ESMISAB, Université de Bretagne Occidentale. Technopôle Brest-Iroise 29280 PLOUZANE (France).

**Résumé :** La majorité des polluants sont susceptibles d'être prélevés par les plantes, d'entrer dans la chaîne alimentaire et de provoquer des intoxications. On peut grouper ces polluants selon leur nature : physique, chimique et biologique. En particulier les métaux toxiques (Cd, Zn, Pb, Cu...) peuvent nuire à la santé des plantes, des animaux et de l'Homme.

La pollution métallique est devenue, depuis le développement industriel, une menace majeure pour la santé humaine et l'environnement. Le sol est une ressource naturelle essentielle. S'il est pollué, il peut porter atteinte à la vie humaine, en réduisant les récoltes et en contaminant les aliments et l'eau. Afin de préserver les personnes et l'environnement des nuisances et des risques possibles, il devient nécessaire de développer des technologies de dépollution des sols. Bien que les techniques physico-chimiques soient nombreuses et variées, elles nécessitent des équipements spéciaux et leurs coûts restent très élevés.

De plus, ces techniques perturbent profondément l'activité biologique et la structure physique des sols traités. Pour ces raisons, il est nécessaire de développer de nouvelles approches comme la phytoremédiation. La phytoremédiation est l'utilisation de plantes vertes pour éliminer, contenir, ou rendre moins toxiques les contaminants environnementaux. Cette technique peut faire l'objet de plusieurs stratégies, telles que : la phytoextraction, la phytodégradation, la phytostabilisation, la phytovolatilisation et la rhizofiltration. L'amélioration génétique des performances de plantes tolérantes ou accumulatrices des métaux toxiques et une meilleure connaissance des voies métaboliques impliquées sont nécessaires.

L'utilisation de la Biotechnologie s'avère une alternative intéressante pour améliorer l'efficacité de la phytoremédiation. Dans ce but, des génotypes de la famille de Brassicacées (le colza dans notre étude) tolérants aux métaux toxiques seront produits par la culture *in vitro* de Couches Cellulaires Minces transversales (CCMTs) couplée par un crible de sélection. La pression de sélection exercée durant la phase de néoformation *in vitro* doit permettre d'obtenir des plantes tolérantes, éventuellement hyperaccumulatrices qui seront étudiées physiologiquement, biochimiquement et génétiquement.

Mots-clés : Phytoremédiation, Phytoextraction, métaux toxiques, plantes hyperaccumulatrices, Biotechnologie, pression de sélection, culture *in vitro*, CCMTs, régénération.

## INTRODUCTION

Pollution, Environnement, Ecologie... ces termes relativement récents de notre vocabulaire (AFNOR 1994), font aujourd'hui grand bruit. Ils traduisent une réelle prise de conscience de notre société, toutes instances confondues, des risques et des dangers que le développement technologique de cette fin de deuxième millénaire fait courir au milieu naturel qui nous entoure, à notre cadre de vie, et, d'une façon plus générale, à notre planète terre. Le terme pollution désigne l'ensemble des rejets de composés toxiques que l'homme libère dans l'écosphère, mais aussi les substances qui sans être vraiment dangereuses pour les organismes exercent une influence perturbatrice sur l'environnement et conduisent à son altération. Les milieux considérés sont : l'air (la pollution atmosphérique), l'eau (la pollution des nappes souterraines, des cours d'eau, des lacs et des mers) et les sols (pollution souvent constituée d'anciens dépôts de déchets).

Les pollutions sont souvent dues à d'anciennes pratiques sommaires d'élimination des déchets, mais aussi à des fuites ou des épandages fortuits ou accidentels de produits chimiques. Selon l'origine des substances polluantes, on distingue :

- la pollution domestique qui provient des habitations ; elle est en général véhiculée par le réseau d'assainissement jusqu'à la station d'épuration (des germes fécaux, des fortes teneurs en matières organiques, des sels minéraux et des détergents).
- la pollution agricole provenant des fermes ou des cultures ; elle se caractérise par de fortes teneurs en sels minéraux (azote, phosphore, potassium) provenant des engrais, des purins et lisiers et aussi par la présence de produits chimiques de traitement (pesticides et herbicides).

- la pollution industrielle provenant des usines (tous les produits de l'activité humaine tels que :  
 les matières organiques et graisses (industries agro-alimentaires),  
 les hydrocarbures (raffineries), les produits chimiques divers (industries chimiques),  
 les matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs) et  
 les métaux (traitement de surface, métallurgie).

En fait, les activités humaines génèrent de nombreux déchets enrichis en métaux. Les trop fortes teneurs en métaux lourds diminuent la densité, la biodiversité et l'activité de la microflore et de la microfaune du sol. L'aération du sol devient moins bonne et la minéralisation de la matière organique, plus lente. A long terme, le fonctionnement de l'écosystème sol se réduit, ainsi que sa fertilité. La nutrition et le métabolisme des plantes sont perturbés. Certaines espèces végétales, non tolérantes, disparaissent ce qui entraîne des changements dans la composition des communautés végétales. Les animaux peuvent être contaminés par contact avec la peau, par inhalation de poussières toxiques et par ingestion d'eau et d'aliments pollués. La dispersion des métaux dans les sols constitue un danger pour la flore, la faune et l'homme, qui se situe au bout de chaîne alimentaire. Dans certaines zones très contaminées, le pâturage, les cultures fourragères ou destinées à l'alimentation humaine sont interdites. La pollution métallique des sols a donc d'importantes conséquences, tant environnementales, qu'économiques et sociales.

## LA POLLUTION

La pollution correspond donc à toute modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les critères de répartition des flux d'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. Ces modifications peuvent affecter l'homme directement ou au travers des ressources agricoles, en eau et autres produits biologiques (KINNE, 1968). Cette définition englobe en réalité toute action par laquelle l'homme dégrade la biosphère. Mais il faut prendre aussi en considération, en sus des polluants créés de façon artificielle par la civilisation moderne, ceux qui existent dans la nature et dont l'homme accroît la fréquence. Doivent être rangées dans ce groupe les aflatoxines, les diverses toxines bactériennes liées aux manipulations des aliments par l'industrie, la pollution microbiologique des eaux, etc. L'histoire des pollutions reflète fidèlement les progrès de la technologie. Pendant toute la période historique et jusqu'aux débuts de l'ère industrielle, qui se situe au XVIII<sup>e</sup> siècle en Europe, les pollutions restaient limitées. Il faut attendre la naissance de la grande industrie moderne, au milieu du siècle dernier, pour que la contamination de l'eau, de l'air et des sols devienne localement préoccupante aux alentours des installations minières ou métallurgiques et dans les grandes cités industrielles surpeuplées. Mais quelle que soit l'importance des problèmes de pollution qui se sont manifestés jusqu'à la seconde guerre mondiale, aucun d'entre eux n'a présenté le caractère angoissant que confère la technologie moderne. La croissance des émissions des foyers industriels et urbains de ces dernières décennies a engendré l'accumulation des déchets, la libération de substances nouvelles extraordinairement toxiques dans l'air, dans l'eau et essentiellement dans le sol.

### **Causes et principales sources de pollution de la biosphère**

L'immense majorité des nuisances propres à la civilisation industrielle provient de la perturbation du flux d'énergie naturel et de la rupture du cycle de la matière en produisant des quantités croissantes de déchets non biodégradables donc non recyclables. De nos jours, populations et pollution croissent de façon accélérée, tandis que le pouvoir autoépurateur varie en sens inverse. Il est certain que l'urbanisation accélérée intervient pour une part

prépondérante, de même que l'industrialisation anarchique, dans l'intensification des phénomènes de pollution. La conjonction de ces divers facteurs a provoqué au cours de ces dernières décennies un accroissement de la pollution dans les pays industrialisés. Aux Etats-Unis par exemple l'indice de pollution s'est élevé de 1000 % entre 1946 et 1970 tandis que la population n'a crû que de 46 % pendant la même période (RAMADE, 1979). Cette croissance de la pollution de l'écosphère est à la fois de nature quantitative et qualitative. On peut distinguer en définitive trois principales sources ou causes de contamination de l'écosphère dans la civilisation industrielle : la production de l'énergie (le charbon et le pétrole - les hydrocarbures fossiles) (Tab. 1), l'énergie nucléaire, les activités de l'industrie chimique et les activités agricoles (les engrais, les pesticides et la pollution des aliments). Pour chacune de ces causes fondamentales de pollution existent des sources situées en amont, au niveau de la fabrication et en aval, à celui de l'utilisation par le consommateur.

Tab. 1 : Principales causes de pollutions associées à l'usage des hydrocarbures.

<i>Activité</i>	<i>Cause de pollution</i>	<i>Milieu pollué</i>	<i>Nature des polluants</i>
Extraction	Fuite de puits « off Shore »	Océan	Pétrole brut
Transport	Accidents « dégazage »	Océan	Pétrole brut
Raffinage	Rejets d'effluents gazeux et liquides	Atmosphère Eaux Continentales Mers	Divers composés organiques SO <sub>2</sub> , mercaptans etc.
Utilisation	Combustions incomplètes	Atmosphère	SO <sub>2</sub> , oxydes d'azote, hydrocarbures

The principal causes of pollution associated with usage of hydrocarbures

On peut classer aussi la pollution selon la nature du milieu de réception des polluants; on distingue:

### *La Pollution de l'eau*

La pollution d'une rivière par un rejet inconsidéré de déchets est bien connue, parce que ses conséquences apparaissent sans tarder : mort des poissons et l'eutrophisation qui se manifeste par une prolifération des algues liée à l'enrichissement du milieu en éléments nutritifs. La pollution des eaux de mer par le déversement de déchets est moins visible, ce qui explique peut-être pourquoi l'immersion dans les grands fonds a longtemps été autorisée par certains états ; mais les conséquences négatives pour la flore et la faune marines sont bien réelles. Bien plus insidieuse encore est la dégradation de la qualité des eaux souterraines due à l'infiltration d'eaux polluées par des déchets, car elle peut toucher les nappes phréatiques qui contribuent à l'alimentation en eau destinée à la boisson. En fait, l'eau est le principal vecteur de pollution engendrée par les déchets abandonnés ou éliminés dans des conditions écologiquement peu satisfaisantes.

### *La Pollution de l'air*

Certains déchets sont susceptibles de polluer directement l'air s'ils dégagent un gaz toxique. Mais ils peuvent aussi participer indirectement à la pollution atmosphérique lorsque leur traitement par incinération est réalisé dans de mauvaises conditions, par exemple en cas de brûlage à l'air libre ou dans une installation dont le système d'épuration des fumées ne présente pas l'efficacité requise. Par ailleurs, le rejet sans traitement spécifique de produits qui



contiennent des chlorofluorocarbures (CFC) tels que les bombes aérosols ou les climatiseurs participe à la détérioration de la couche d'ozone qui nous protège en filtrant certains rayonnements ultraviolets nocifs.

### La Pollution des sols

A l'opposé de la pollution atmosphérique, qui, en dépit de son ubiquité, sévit avec le maximum d'intensité dans les zones urbaines et industrielles, la pollution des sols affecte, elle, de façon plus particulière, les zones rurales. Elle résulte de nombreuses causes, en particulier les retombées de polluants atmosphériques, provenant d'industries chimiques et métallurgiques, de l'usage de combustibles fossiles et, de plus en plus fréquemment, d'incinérateurs de déchets urbains et surtout de l'usage des produits chimiques en agriculture (Fig. 1).

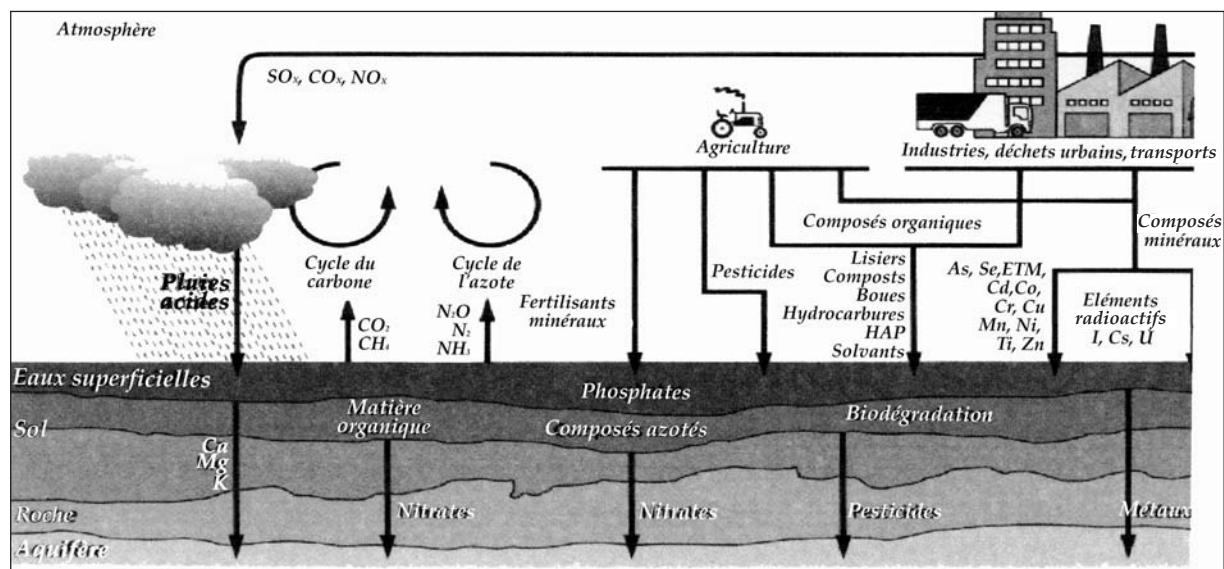


Fig. 1: Schéma général des flux de polluants des sols (ramade, 2005).

### Principaux problèmes spécifiques à certains métaux toxiques

**Plomb (Pb):** L'utilisation du Pb peut conduire à une exposition professionnelle. Certaines activités industrielles sont très exposées, entre-autres : la métallurgie du Pb, la fabrication d'accumulateurs et de radiateurs, la fabrication de pigments et peinture. Le Pb peut se retrouver dans l'environnement, notamment par des rejets autour des usines de traitement du Pb ou par la pollution automobile, ce qui contamine le sol, la végétation, les animaux et l'homme. La pénétration du Pb dans l'organisme est le plus souvent pulmonaire en milieu professionnel, mais elle peut aussi être digestive lors de la consommation de végétaux ou d'animaux contaminés. Dans l'organisme 90 % du Pb est stocké dans les os où sa demi-vie est d'environ 70 ans. Le reste est stocké dans les globules rouges, le foie, les reins et le cerveau. Le Pb n'est pas complètement éliminé par l'organisme ; c'est un toxique cumulatif.

**Cadmium (Cd):** Le Cd est un élément non essentiel à l'organisme. Les sels solubles du Cd sont toxiques, de même que les vapeurs de ce métal. Sous-produit de la métallurgie du Zn, le Cd est utilisé en électricité, en électronique, en galvanoplastie et surtout dans l'industrie des matières plastiques comme stabilisateur.

Toutes ces fabrications, ainsi que le rejet des déchets après usage, sont des sources de pollution de l'air, des sols et des eaux. Les engrais « superphosphatés » s'ils sont peu purifiés, apportent une dose importante de Cd dans les sols.

Le Cd est un puissant agent mutagène. Il se concentre dans le tube digestif, le foie, les reins, le cœur, les poumons, et les os où il entraîne une décalcification. Comme le Pb, le Cd provoque des dysfonctionnements graves du système rénal ainsi que du système nerveux central chez le fœtus et l'enfant.

**Zinc (Zn):** Le Zn est un oligo-élément, c'est-à-dire un élément indispensable en faible quantité. Le corps humain contient environ 2,5 kg de Zn, les plus fortes concentrations se retrouvent dans les yeux, les cheveux et les os. Dans le sang, 80% du Zn se retrouve dans les globules rouges. L'absorption du Zn a principalement lieu dans le duodénum. Le Zn a une importance considérable dans le métabolisme des protéines, des acides nucléiques et de la vitamine A. Des teneurs excessives en Zn peuvent être toxiques. Cette toxicité a été particulièrement étudiée sur la flore et la faune. Le Zn présente, cependant, peu d'effets toxiques sur la santé contrairement au Pb et au Cd.

### **Risques liés à la présence de métaux toxiques dans le sol**

Les données sur le risque pour la santé humaine consécutifs à une ingestion de Cd, Pb ou Hg ont été obtenues par le conseil supérieur d'Hygiène Publique de France (1996) cité par CHASSIN et al.(1997). Ces auteurs indiquent que pour le Pb, les principaux apports proviennent de la consommation des céréales, des légumes, des produits laitiers et des boissons pour des parts respectives d'environ 14, 22, 14 et 27 %. Les origines sont équivalentes pour le Cd. Ce dernier est présent naturellement dans certains sols à des teneurs allant de 1.4 à 22 mg Kg<sup>-1</sup>. Il peut par exemple être prélevé par des végétaux comme le radis en quantité suffisante pour représenter un risque pour la santé humaine (LUND *et al.*, 1981).

### **Cible des métaux toxiques**

Le sol est le principal réceptacle des métaux, c'est un lieu d'accumulation et de réserve des métaux. Les voies de dispersion de ceux-ci sont multiples. Les cibles sont l'homme et les écosystèmes. De nombreux travaux ont privilégié l'étude des risques de contamination de la chaîne alimentaire via les transferts sol-plante ; mais il faut également considérer les transferts sol-animal, sol-homme, sol- atmosphère ou sol-eau si on veut évaluer les principaux impacts de l'accumulation des métaux dans le sol à moyen et à long terme (CHASSIN & JUSTE, 1997). Les principaux scénarios d'exposition possibles pour l'homme sont l'absorption d'eau, l'inhalation de poussières ou encore l'ingestion de végétaux souillés ou ayant accumulé des métaux.

### **Réduction des risques**

Lorsqu'un diagnostic est établi et les risques écotoxicologiques et sanitaires évalués, et avant d'envisager une filière de décontamination, il conviendra de décider si des actions curatives de réhabilitation s'imposent ou non. Trop souvent l'objectif est d'atteindre un état environnemental de référence défini sur base des teneurs totales des métaux. En Europe, les objectifs de décontamination sont donnés par des directives qui indiquent des seuils de concentrations liés à la toxicité des métaux (CEC, 1986 ; AFNOR, 1985). Aux Etats-Unis, la notion de norme tend à être supplantée par l'estimation du risque en rapport avec l'utilisation ultérieure du sol. Ce n'est que la prise en compte de la mobilité et de la biodisponibilité des polluants qui permet d'évaluer le risque lié à la présence de métaux dans les sols. Dans un agrosystème donné, ces critères de mobilité et de biodisponibilité varient en fonction des caractéristiques physico-chimiques du sol comme la teneur en argile, en matière organique ou le pH. Si la pollution et la dangerosité d'un site sont établies et si toutes les conditions juridiques et financières sont réunies, on peut envisager une décontamination. Les principales voies de mise en sécurité ou de décontamination de sols pollués par les métaux vont être décrites et la décontamination de sols pollués par les métaux toxiques devient alors une nécessité (VARALLYAY *et al.*, 1993). En fait, différentes actions sont envisageables face à l'accroissement des surfaces polluées et au danger potentiel que celles-ci représentent. Des techniques permettent l'immobilisation des métaux par stabilisation. D'autres mettent en œuvre des procédés physico-chimiques ou des procédés biologiques. Dans cet article, on va s'intéresser aux techniques biologiques, en particulier à l'utilisation de plantes supérieures pour une phytodécontamination ou encore pour une phytoremédiation.

## LES METHODES BIOLOGIQUES

Les méthodes physico-chimiques de dépollution du sol présentent l'inconvénient d'être coûteuses et lourdes à mettre en œuvre. De plus, elles perturbent fortement l'activité biologique des sols et altèrent leur structure physique. Le besoin de nouvelles techniques économiquement compétitives et pouvant préserver les caractéristiques du sol s'est fait sentir et l'utilisation des biotechnologies s'est avérée être une alternative intéressante. Ces techniques font appel, soit à des micro-organismes et aux produits de leur métabolisme, soit à des végétaux supérieurs pour aboutir à la phytorestoration du milieu.

- Les techniques utilisant des micro-organismes

Les micro-organismes et les produits de leur métabolisme peuvent être des bioaccumulateurs de métaux et des agents de dissolution efficaces. Ces technologies nouvelles font appel aux qualités des champignons et des mycorhizes permettant l'augmentation de la capacité des plantes à capter de plus grandes quantités de contaminants des sols pollués. Cette approche semble prometteuse car les champignons mycorhiziens peuvent, à travers la symbiose qu'ils réalisent avec les plantes, multiplier par un facteur impressionnant le volume du sol décontaminé.

- Les techniques utilisant les végétaux ou la phytoremédiation

Les différents mécanismes de réponse des végétaux supérieurs à la présence de métaux dans le sol sont aujourd'hui exploités dans la réhabilitation des sols. Selon CUNNINGHAM & BERTI (1993), l'utilisation des plantes dans le traitement des eaux usées date de plus de 300 ans. Cependant, ce n'est que récemment que l'utilisation de plantes supérieures pour la réhabilitation des sols a pris son essor (BAKER et BROOKS, 1989 ; SALT *et al.*, 1995). Cette technique est basée essentiellement sur la notion de Tolérance aux polluants (métaux toxiques).

### Avantages et Stratégies de la phytoremédiation

Cette technologie nouvelle consiste à utiliser des plantes supérieures pour stabiliser, extraire ou dégrader des métaux toxiques dans les sols pollués. Les connaissances sur ce sujet sont encore parcellaires. Actuellement, il n'y a que peu d'expériences *in situ* mises en place de par le monde. Les métaux principalement étudiés sont le Cd, Zn, Pb et le Cu. La technique présente de nombreux avantages :

- Par comparaison avec les traitements physico-chimiques, la phytoremédiation montre un faible coût (se situe en moyenne entre 2 et 100 dollars par m<sup>3</sup>).
- Ce faible coût permet de traiter de grandes surfaces (elle génère des résidus riches en métaux recyclables et elle est applicable à un grand nombre des métaux toxiques et de radionucléides).
- Elle provoque une perturbation minimale de l'environnement et permet même de réinitier le cycle de dégradation de la matière organique là où la végétation avait disparu. La décontamination par les plantes présente aussi l'avantage de réduire l'érosion et le lessivage des sites, ce qui maintient le polluant à proximité de la plante (BERTI *et al.*, 1995).
- La phytoremédiation peut s'appliquer à une large gamme de métaux toxiques. En outre, pour un type de contaminant donné, comme les métaux, la sélectivité du végétal n'est pas stricte. Ainsi, certains *Thlaspi* venant de milieux calaminaires (riche en Zn, Pb, Cd) peuvent accumuler plus de 3% de Zn, 0,8% de Pb et 0,1% de Cd dans la matière sèche (BAKER & BROOKS, 1989).

Cette discipline se divise en plusieurs stratégies :

### ***La phytoextraction***

C'est une biotechnologie de décontamination des sols et des sédiments basée sur l'accumulation des polluants dans la partie aérienne des plantes. Les étapes majeures de ce processus sont les suivantes :

- Accumulation des polluants par les végétaux (= bioaccumulation).
- Fauche et exportation des végétaux (= biomasse contaminée). L'étape de la séparation du sol et des polluants jusqu'alors problématique est ainsi résolue.
- La biomasse contaminée est incinérée.
- Les cendres, appelées bio-minerais du fait de leur forte concentration en métaux, peuvent être réintroduites dans le cycle de production métallurgique ou confinées. Il a été estimé que *Thlaspi caerulescens* pouvait extraire 34 Kg/ha de Zn ; 0,16 Kg/ha de Cd ; 0,25 Kg/ha de Ni ; 0,22 Kg/ha de Pb ; 0,4Kg/ha de Cu et 0,27 Kg/ha de Cr.

Des expériences se sont déroulées sur des sites où la contamination en métaux lourds était due à l'application de boues d'épandage depuis 20 ans. Les analyses montrent que *Thlaspi caerulescens* a un taux d'extraction d'environ 150 g/ha et que *Arabidopsis halleri* a un taux d'extraction de 34 g/ha. Ainsi, ces deux espèces semblent capables d'extraire le cadmium accumulé dans les sols agricoles depuis des décennies, suite à l'utilisation d'engrais phosphorés (Mc GRATH & DUNHAM,1997).

### ***La rhizofiltration***

C'est une technique qui utilise des plantes terrestres capables de développer leur système racinaire dans des eaux polluées et d'y concentrer de grandes quantités de contaminants, par exemple des métaux lourds, du fait de leur forte biomasse racinaire (DUSHENKOV *et al.*, 1995). Les étapes majeures sont:

- L'installation d'espèces capables de développer leurs racines dans les eaux polluées.
- L'accumulation des polluants dans les racines:
  - (A)les racines sont exportées et stockées ou vendues.
  - (B) le volume d'eau est réduit grâce à l'évapotranspiration des plantes.

### ***La phytostabilisation***

C'est l'immobilisation in situ des métaux grâce à l'utilisation de plantes, avec ou sans amendements fertilisants et / ou stabilisants. Les principaux objectifs pour une phytostabilisation efficace sont :

- réduire la fraction métallique du sol facilement assimilée par les plantes,
- stabiliser la couverture végétale,
- limiter l'accumulation des métaux par les plantes.

### ***La phytovolatilisation***

Les métaux sont transférés du sol à la plante où ils sont stockés. En phytovolatilisation, les métaux stockés sont convertis en une forme volatile moins toxique et libérée dans l'atmosphère. Le sol est donc remédié et le polluant transféré de la lithosphère vers l'atmosphère sans besoin de faucher les plantes, ni de les brûler.

### **Pourquoi les biotechnologies ?**

Depuis une vingtaine d'année, l'identification et la réhabilitation des sols pollués par les métaux toxiques constituent des domaines d'activité en pleine expansion. La phytoremédiation consiste à utiliser des plantes résistantes aux métaux toxiques pour



éliminer, contenir ou rendre moins toxiques les contaminants environnementaux (CUNNINGHAM & BERTI, 1993; RASKIN *et al.*, 1994 ; SALT *et al.*, 1995 ; SCHNOOR *et al.*, 1995 et WENZEL *et al.*, 1999). Son utilisation pratique en Europe n'est encore qu'à ses débuts. Elle est basée sur les facultés de certaines plantes à bloquer, extraire, accumuler, transformer ou dégrader un polluant. Les plantes se développent en milieux contaminés (sols, boues résiduaires, sédiments, effluents liquides voire gazeux). Actuellement plus de 800 espèces susceptibles d'être utilisées pour dépolluer sont référencées (bases de données Phytorem et Phytopet) (Mc INTYRE, 2003). En Afrique du Nord, en particulier en Tunisie, la majorité des études réalisées se sont focalisées sur l'identification de la teneur des métaux dans les sols et les plantes tout en essayant de retrouver des plantes tolérantes et hyperaccumulatrices pour gérer les sols pollués. Récemment, des géologues en prospection de gisements ont démontré que les métaux sont absorbés préférentiellement par certaines plantes dans le Sud-Ouest de la Tunisie telles *Peganum harmala* et *Malva aegyptiaca* qui accumulent en quantités appréciables du Cd, Zn, Cr, Cu et Ni alors que *Atriplex* supporte des teneurs élevées en Zn (CHOKRI *et al.*, 2006). D'autres ont enregistré des teneurs relativement élevées en éléments polluants (Zn, Pb et Cd) dans la région de Boujaber, au Nord-Ouest de la Tunisie (SEBEI *et al.*, 2005). Mais l'amélioration génétique des performances des plantes hyperaccumulatrices n'est pas encore étudiée.

L'intérêt majeur de cette étude est porté sur la phytoextraction. Les espèces hyperaccumulatrices ont la particularité, en plus d'être tolérantes à un polluant, de pouvoir l'accumuler en grandes quantités dans leurs parties aériennes sans que cela affecte leur survie. Pour pouvoir être utilisée en phytoextraction, une espèce végétale doit donc être accumulatrice et avoir une biomasse importante. Malheureusement la plupart des espèces qui pourraient convenir sont petites et le plus souvent en forme de rosette. Pour exploiter de façon rentable et efficace le procédé de phytoextraction, il faudra soit créer des organismes génétiquement modifiés (OGM) à forte biomasse et hyperaccumulateurs, soit appliquer des techniques d'amélioration des plantes sur des espèces déjà tolérantes, éventuellement en combinaison avec un traitement mutagène.

L'application de cette méthode demande une technicité accrue qui s'appuie sur une connaissance approfondie des mécanismes de dépollution. A côté des mécanismes traditionnels, de type physico-chimique et / ou mécanique (qui ont le désavantage d'être très coûteux et lourds à appliquer), ceux faisant appel aux biotechnologies constituent une approche de plus en plus fiable, économiquement intéressante et dont la mise en œuvre concrète s'observe essentiellement aux Etats-Unis et au Canada, en particulier en ce qui concerne la phytoremédiation (RASKIN & ENSLEY, 2000 ; KAMAL *et al.*, 2004). Il s'agit d'un ensemble de techniques qui visent à exploiter la capacité de certaines plantes à tolérer ou à accumuler des métaux toxiques (CHANEY *et al.*, 1997).

### Apport des biotechnologies



Fig. 2 : Plante de Colza (*Brassica napus* L.) cultivé en serre.

Il est essentiel, pour mettre en œuvre la phytoextraction (WEI & ZHOU, 2006), de passer par une amélioration génétique des performances de plantes. La difficulté de la technique réside dans le choix des plantes, qui est fonction du type de sol, du type de polluant et de l'environnement climatique. Pour notre travail, nous avons fait le choix délibéré d'étudier deux ions métalliques, le zinc et le plomb. Des plantes de la famille des Brassicacées sont d'intéressants accumulateurs, en particulier *Thlaspi caerulescens* et *Brassica napus* (Colza). Le colza (Fig. 2) est une plante modèle pour la phytoremédiation : c'est pourquoi nous l'avons choisi pour notre étude. Cette plante est connue par son aptitude à extraire et à accumuler les métaux toxiques (MARICHIOL *et al.*, 2004). De par ses

propriétés génétiques, l'homologie des génomes, la proximité phylogénétique avec *Arabidopsis thaliana*, cette espèce contrairement à la plupart des plantes hyperaccumulatrices, a une biomasse élevée (Fig. 2). L'objectif de notre recherche est d'améliorer la phytoremédiation par différentes techniques biotechnologiques essentiellement la culture *in vitro* (approche non OGM) par l'application de la technique de couches cellulaires minces transversales (CCMts) couplée à un crible de sélection. Dans l'article, on va développer la néoformation *in vitro* à partir de CCMts en présence de métaux toxiques (Zn et Pb). La pression de sélection exercée par les métaux toxiques durant la culture *in vitro* de tissus doit permettre de régénérer des plantes tolérantes et éventuellement hyperaccumulatrices. Les plantes néoformées *in vitro* sont étudiées aux niveaux physiologiques, biochimiques et moléculaires. Les résultats obtenus pourront être extrapolés par la suite à divers polluants autres que les métaux toxiques et à d'autres espèces. Au minimum, cela servira de base à une recherche complémentaire. La recherche sera focalisée sur la détermination de gènes majeurs conférant une tolérance accrue au stress métallique.

## ETUDE SUR LE COLZA

### Matériel et méthodes

#### *Matériel végétal*

*Brassica napus* L. (Colza) a été choisi comme plante modèle pour diverses caractéristiques favorables : Brassicacées et génétiquement proches d'*Arabidopsis* (FOURMANN *et al.*, 2002), appartenant à la même famille que de nombreux accumulateurs de métaux toxiques (SALT *et al.*, 1995), et ayant en commun le génome de *Brassica rapa*. Cette plante contrairement à la plupart des plantes hyperaccumulatrices, a une biomasse élevée et présente de nombreuses variétés (SCHWITZGUEBEL *et al.*, 2002). De plus, elle se caractérise par l'absence de mycorhizes ce qui facilite les analyses biochimiques et génétiques (notamment l'identification des gènes qui contrôlent les caractères cibles). A côté de toutes ces caractéristiques génétiques, morphologiques et physiologiques elle peut être considérée comme un bon candidat pour la production de biocarburants.

Deux variétés de Colza ont été utilisées dans ce travail :

- *Brassica napus* var. Jumbo : fournie par Janssen-Weets (FHO-Emden EUTEC, Allemagne).
- *Brassica napus* var. Drakkar : fournie par l'INRAT : (Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie).

#### *Protocole expérimental*

Stérilisation des graines par l'hypochlorite de calcium ( $\text{CaCl}_2\text{O}_2$ ) (5% m/v) pendant 30 min puis rinçage de ces graines à l'eau distillée stérile 3 fois pendant 10 min. Les graines sont mises à germer en tubes à essai sur milieu MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) et les plantes sont repiquées toutes les quatre semaines. Des CCMts sont excisées transversalement à partir des hypocotyles et des pétioles et sont disposées dans des boîtes de Pétri sur milieu MS additionné de saccharose (3%) d'agar (0.65%), de 6-Benzylaminopurine (BAP) (3mg/l), d'Acide Naphtalène Acétique (ANA) (0,3 mg/l). Les sels métalliques ( $\text{ZnSO}_4$  et  $\text{PbNO}_3$ ) sont additionnés au milieu de culture, dissous dans un Tampon MES (Acide 2- (N-Morpholinoéthane sulfonique) (1mM ; pH 5,80 pour  $\text{PbNO}_3$  et pH 6 pour  $\text{ZnSO}_4$ ). Les boîtes, entourées par un film de cellophane sont déposées dans une chambre de culture qui se caractérise par une photopériode de 12 h, une température de 22°C et un éclaircissement de 40  $\mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

La technique des couches cellulaires minces transversales (CCMts) a été décrite pour la première fois par TRAN THANH VAN, 1973. Cet auteur a montré que des couches cellulaires minces longitudinales (CCMls) comprenant l'épiderme et 2 à 3 assises sous épidermiques, prélevées au niveau de la nervure centrale de *Nautilocalyx lynchei* L., et placées sur un milieu de culture bien défini, étaient capables de néoformer des bourgeons végétatifs. Par la suite, ce système cultural a été développé chez *Nicotiana tabacum* L., qui est devenu le modèle expérimental des couches cellulaires minces longitudinales : des explants constitués de 3 à 6 assises de cellules épidermiques, prélevés sur des hampes florales, peuvent former des boutons floraux directement sur l'épiderme des explants en 10 à 14 jours. Ce modèle expérimental a permis l'étude de la régulation de la différenciation cellulaire et organogénétique aux niveaux cytotologique, biochimique et moléculaire dès les premiers jours de mise en culture (TRAN THANH VAN, 1974). Depuis, ce système a été appliqué pour la régénération de nombreuses espèces végétales plus ou moins récalcitrantes comme *Beta vulgaris* (DETREZ *et al.*, 1988) et *Helianthus annuus* (PELISSIER *et al.*, 1990). Une variante de cette technique, celle des couches cellulaires minces transversales (CCMts), consistant à mettre en culture des explants obtenus par coupes transversales de différents organes et ne comportant que quelques assises cellulaires d'épaisseur, a permis d'induire la caulogenèse ou l'embryogenèse somatique chez des espèces végétales dicotylédones ou monocotylédones telles que *Lilium longiflorum* (NHUT *et al.*, 2002 a et b). Parmi les explants qui peuvent être cultivés en couches cellulaires minces on peut citer surtout les hypocotyles, les pétioles, les limbes foliaires et même les racines (TRAN THANH VAN *et al.*, 2000). La taille de ces couches cellulaires minces varie entre 0,3 et 0,5 mm. A partir de ces explants de taille négligeable des plantes peuvent être régénérées. C'est cette dernière technique qui a été mise en œuvre au cours de cette étude.

#### *Apports de la technique des CCMts pour la phytoextraction*

Pour fabriquer l'outil de découpage (la lame d'un scalpel ne permettant pas une découpe assez fine), les angles coupant d'une lame de rasoir sont prélevés et montés sur un mandrin qui sera stérilisé par autoclavage puis régulièrement désinfecté à l'alcool à 70° (sans passage à la flamme) au cours du découpage. Des CCMts de pétioles et d'hypocotyles (0,3- 0,5 mm), sont excisés à partir de plantes âgées de 15 jours (photo, 1 a, b et c) et sont déposés horizontalement sur la partie gélosée. La taille minuscule de ces explants, permet d'appliquer efficacement la pression de sélection en ajoutant les métaux toxiques dans le milieu de culture MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962). On peut sélectionner ainsi des plantes tolérantes ou accumulatrices des agents métalliques.

#### *Milieus de culture des CCMts en présence de Zinc et du Plomb*

Au laboratoire, des expérimentations ont déjà été effectuées sur la culture de *Buddleia davidii* en milieu contenant le zinc (SCHNEKENBURGER *et al.*, 2002). Les mêmes concentrations ont été utilisées pour *Brassica napus* L. Une seule combinaison hormonale (tableau 2) a été retenue et testée dans ce travail en présence de différentes doses du zinc et du plomb dans le but de néoformer in vitro de plantes tolérantes à ces éléments traces métalliques (CHARLES *et al.*, 2004) .

## RESULTATS ET DISCUSSION

### **Caulogenèse**

Les pétioles et les hypocotyles, après 10 à 12 jours de culture, initient des bourgeons en

Tableau 2 : Milieux de culture in vitro de CCMts contenant différentes doses de Zinc et du Plomb. In vitro culture media of tTCLs supplemented with several concentration of zinc and lead.

code	sel métallique	Concentrations en ( $\mu\text{M}$ )	Hormones en mg/l	
			ANA	BAP
M1	-	0	0.3	3
M2	ZnSO <sub>4</sub>	100	0.3	3
M3	ZnSO <sub>4</sub>	250	0.3	3
M4	ZnSO <sub>4</sub>	300	0.3	3
M5	ZnSO <sub>4</sub>	400	0.3	3
M6	ZnSO <sub>4</sub>	500	0.3	3
M7	ZnSO <sub>4</sub>	600	0.3	3
M8	ZnSO <sub>4</sub>	800	0.3	3
M9	ZnSO <sub>4</sub>	1000	0.3	3
M10	-	0	0.3	3
M11	PbNO <sub>3</sub>	250	0.3	3
M12	PbNO <sub>3</sub>	400	0.3	3
M13	PbNO <sub>3</sub>	500	0.3	3
M14	PbNO <sub>3</sub>	1000	0.3	3
M15	PbNO <sub>3</sub>	1500	0.3	3
M16	PbNO <sub>3</sub>	2000	0.3	3

présence de différentes doses de zinc (photo, 2 a et b) et du plomb (photo, 3 a et b). Ces derniers se forment directement sur l'explant. Les pourcentages de CCMts caulogènes varient avec la nature du milieu de culture (composition hormonale), la nature de l'explant, la variété étudiée mais aussi avec la concentration de la solution métallique du ZnSO<sub>4</sub> (Tableau 3) et du PbNO<sub>3</sub> (Tableau 4) additionnée au milieu MS. Les pourcentages d'explants caulogènes sont calculés après 2 semaines de culture. Les résultats sont comparés par le test de DUNCAN (5%) (Tableau 3 et 4). Les résultats ont été vérifiés statistiquement par l'analyse de variance à deux facteurs ANOVA (test de DUNCAN 5%).

Tab. 3 : Pourcentages de la caulogénèse selon l'origine de la CCMt et en fonction de la teneur en Zinc.

Géotypes	Teneur en Zn ( $\mu\text{M}$ )	Pourcentage de la caulogénèse selon l'origine de la CCMt	
		pétioles	hypocotyles
<i>Jumbo</i>	0	15a	46 a
	100	11a	<b>45 a</b>
	250	7b	35 a
	300	5b	27a
	400	5b	9b
	500	3b	5bc
	600	0c	3bc
	800	0c	3bc
<i>Drakkar</i>	1000	0,05 bc	1bc
	0	13a	34a
	100	9b	<b>33a</b>
	250	7b	15b
	300	3b	5bc
	400	3b	5bc
	500	0c	0c
	600	0c	0c
800	0c	0c	
1000	0c	0c	

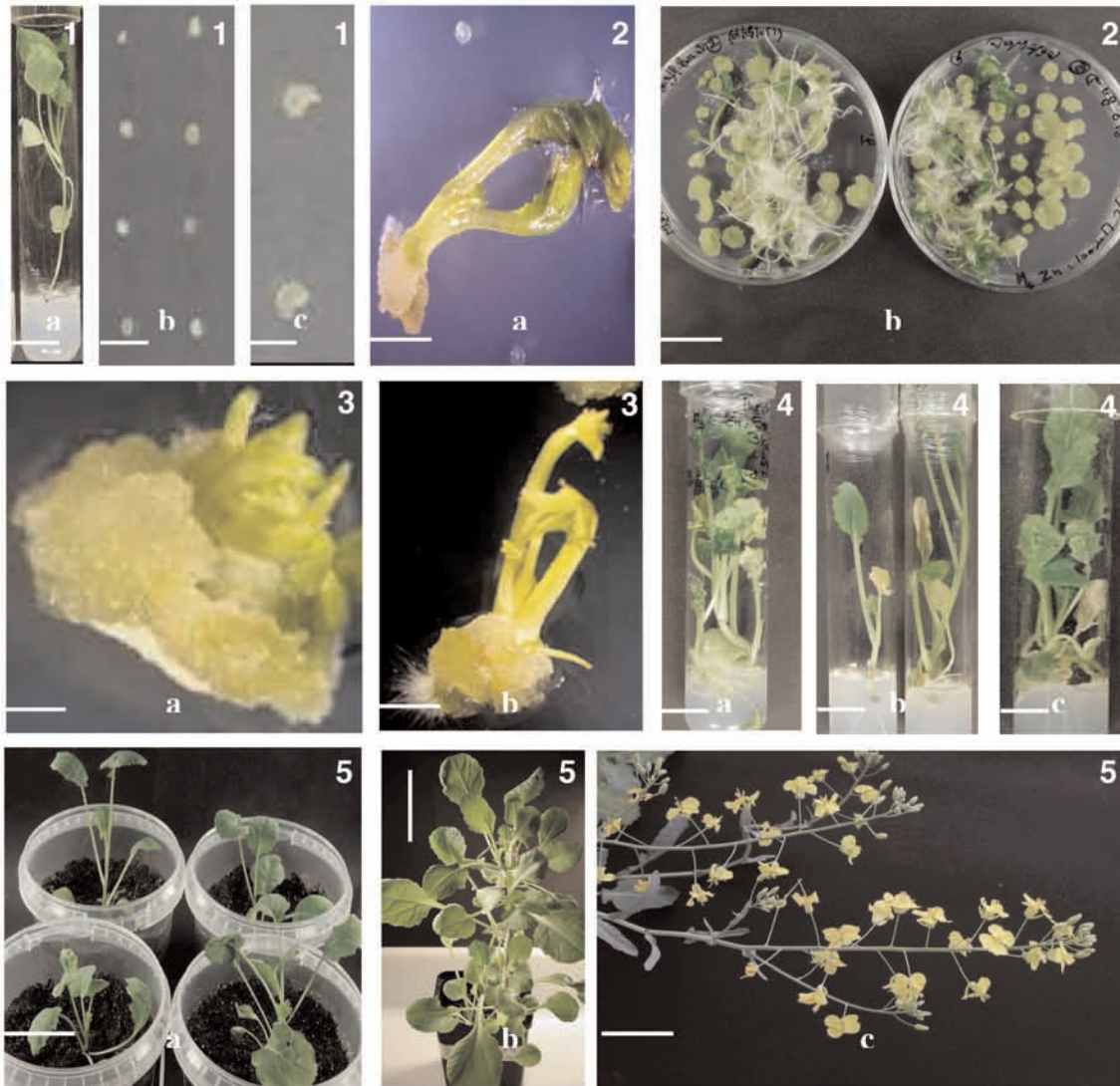
- L'analyse de la variance et la comparaison des moyennes ont été réalisées suivant les milieux et pour chaque type d'explant.

\* Les chiffres suivis des mêmes lettres ne sont pas significativement différents (test Duncan à 5 %).

Shoot regeneration frequency from tTCLs excised from tow different organ of Rapeseed seedlings (Jumbo and Drakkar) grown on MS medium containing various concentration of Zinc.

\* The results were calculated from tree replicated experiments, each with 50 tTCL explants. In each column, the values with different letters are significantly different (Duncan's test).





- 1.** (a) Plantes de *B. napus* var. Drakkar issues de germination (15 jours) (une barre : 2.5 cm). (b) couches Cellulaires minces transversales d'hypocotyles excisées à partir de germination (une barre : 1 cm). (c) Couches Cellulaires minces transversales de pétioles excisées à partir de germination (une barre : 0.5 cm).  
 (a) Fifteen day old seedlings of *B. napus* var. Drakkar (bar: 2.5 cm). (b) Fresh hypocotyl tTCLs (bar: 1 cm). (c) Fresh petiole tTCLs (bar: 0.5 cm).
- 2.** Régénération d'un bourgeon après 15 jours de culture en présence de 500  $\mu\text{M}$  de Zn à partir d'une CCMt d'hypocotyle chez Jumbo (une barre : 4 mm) (a). Régénération de bourgeons et de racines sur le milieu de culture en présence de 100  $\mu\text{M}$  de Zinc à partir d'une CCMt d'hypocotyle chez Drakkar (une barre : 5 mm) (b).  
 Regeneration of bud after 15 days of culture in the presence of 500  $\mu\text{M}$  of Zn from hypocotyl tTCLs of Jumbo (bar: 4 mm) (a). Regeneration of buds and roots after 15 days of culture in the presence of 100  $\mu\text{M}$  of Zn from hypocotyl tTCLs of Drakkar (bar: 5 mm) (b).
- 3.** Régénération d'un bourgeon après 15 jours de culture en présence de 1500  $\mu\text{M}$  de Pb à partir d'une CCMt d'hypocotyle chez Jumbo (une barre : 4 cm) (a) et chez Drakkar (une barre : 3,5 cm) (b).  
 Regeneration of bud after 15 days of culture in the presence of 1500  $\mu\text{M}$  of Pb from hypocotyl tTCL of Jumbo (bar: 4 cm) (a) and of Drakkar (bar: 3.5 cm) (b).
- 4.** Plantes néoformés issus de CCMt d'hypocotyles de deux variétés de colza enracinées sur le milieu MS 20. (a) : Enracinement de vitropousses issues de CCMt d'hypocotyle de Jumbo en présence de 500  $\mu\text{M}$  de Zn (une barre : 1.5 cm). (b) : Enracinement de vitropousses issues de CCMt d'hypocotyle de Drakkar en présence de 250  $\mu\text{M}$  de Zn (une barre : 2.5 cm). (c) : Enracinement de vitropousses issues de CCMt d'hypocotyle de Drakkar en présence de 1000  $\mu\text{M}$  de Pb (une barre : 1.5 cm).  
 Plantlets Regenerated from hypocotyls tTCLs of two varieties of Rapeseed with roots placed on "rooting" medium, MS 20.  
 (a): Rooted vitroshoots from hypocotyl tTCLs of Jumbo in the presence of 500  $\mu\text{M}$  of Zn (bar: 1.5 cm). (b): Rooted vitroshoots from hypocotyl tTCLs of Drakkar in the presence of 250  $\mu\text{M}$  of Pb (bar: 2.5 cm). (c): Rooted vitroshoots from hypocotyl tTCLs of Drakkar in the presence of 1000  $\mu\text{M}$  of Pb (bar: 1.5 cm).
- 5.** (a) : Plantes régénérées à partir de CCMt d'hypocotyle de Jumbo en présence de 500  $\mu\text{M}$  de Zn transférées en pots (développement de ces plantes deux semaines après sevrage) (une barre : 1 cm). (b) : Plantes régénérées à partir de CCMt d'hypocotyle de Drakkar en présence de 500  $\mu\text{M}$  de Zn repiquées en pots (développement de ces plantes deux mois après sevrage) (une barre : 4 cm). (c) : Floraison de ces plantes (inflorescence après 8 semaines en serre) (une barre : 3,5 cm) .  
 (a): Rooted vitroshoots regenerated from hypocotyl tTCLs of Jumbo in the presence of 500  $\mu\text{M}$  of Zn transferred in pots for two weeks of weaning (bar: 1 cm). (b): Rooted vitroshoots regenerated from hypocotyl tTCLs of Drakkar in the presence of 500  $\mu\text{M}$  of Zn transferred in pots for two months of weaning (bar: 4 cm). (c) Plant regenerated from hypocotyl tTCLs of Drakkar, flowering 8 weeks after transfer in pot (bar: 3.5cm).

- *Brassica napus var. Jumbo*

La concentration en Zinc et en Plomb intervient et influence l'initiation de bourgeons. On obtient les meilleurs résultats avec 100  $\mu\text{M}$  de Zinc (53 % du nombre total de bourgeons sont obtenus avec cette concentration). On obtient également deux bourgeons avec 500  $\mu\text{M}$  de Zinc (Tab. 3) en présence de 30 g/l de saccharose et avec des hypocotyles ainsi que deux bourgeons avec 1000  $\mu\text{M}$  (Tableau 3) de Zinc en présence de 30 g/l de saccharose et avec des hypocotyles. Pour le Plomb on a les meilleurs résultats avec 250  $\mu\text{M}$  (50 % du nombre total de bourgeons sont obtenus avec cette concentration). On obtient également quatre bourgeons avec 1000  $\mu\text{M}$  (tableau 4) en présence de 30 g/l de saccharose et avec des hypocotyles ainsi que un bourgeon avec 1500  $\mu\text{M}$  (Tableau 4). On peut dire que cette variété est tolérante au Zinc et au Plomb et elle permet la néoformation de bourgeons même à de fortes doses de ces éléments.

Tab. 4 : Pourcentages de la caulogénèse selon l'origine de la CCMt et en fonction de la teneur en Plomb.

Géotypes	Teneur en Pb ( $\mu\text{M}$ )	Pourcentage de la caulogénèse selon l'origine de la CCMt	
		pétioles	hypocotyles
<i>Jumbo</i>	0	13a	45a
	250	9b	<b>23a</b>
	400	7b	10b
	500	3c	10b
	1000	2c	4c
	1500	1c	1c
	2000	0d	0d
<i>Drakkar</i>	0	14a	35a
	250	11a	14a
	400	7b	6b
	500	5b	<b>10b</b>
	1000	2c	<b>4c</b>
	1500	0d	0d
	2000	0d	0d

- L'analyse de la variance et la comparaison des moyennes ont été réalisées suivant les milieux et pour chaque type d'explant.

\* Les chiffres suivis des mêmes lettres ne sont pas significativement différents (test Duncan à 5 %).

Shoot regeneration frequency from tTCLs excised from two different organs of Rapeseed seedlings (*Jumbo* and *Drakkar*) grown on MS medium containing various concentrations of Lead.

\* The results were calculated from three replicated experiments, each with 50 tTCL explants. In each column, the values with different letters are significantly different (Duncan's test).

- *Brassica napus var. Drakkar*

On a observé une influence de la concentration de Zinc et du Plomb avec une formation de bourgeons avec différentes doses. La concentration en Zinc et en Plomb intervient alors et on obtient un maximum de caulogénèse pour 100  $\mu\text{M}$  de Zinc (Tab. 3). On obtient aussi une régénération assez importante de bourgeons avec 250  $\mu\text{M}$  de Zinc en présence de 30 g/l de saccharose et avec les hypocotyles. On a pu constater que les CCMts issues des hypocotyles sont les plus réactifs. Pour le Plomb, on a les meilleurs résultats avec 250  $\mu\text{M}$  de Plomb (Tab. 4). On obtient une régénération importante de bourgeons avec 500  $\mu\text{M}$  de Plomb avec les hypocotyles. De même on a constaté que les hypocotyles sont les plus réactives.

Pour les deux variétés, la caulogénèse est meilleure avec les hypocotyles. La variété Jumbo est plus tolérante au Zinc et au Plomb puisqu'on obtient des bourgeons jusqu'au 1000  $\mu\text{M}$  de Zinc (Tab. 3) et jusqu'à 1500  $\mu\text{M}$  (Tab. 4) pour le Plomb, tandis que la caulogénèse s'arrête avec 250  $\mu\text{M}$  de Zinc (Tab. 3) et avec 1000  $\mu\text{M}$  du Plomb (Tab. 4) pour la variété Drakkar.

### **Enracinement des vitropousses**

Afin d'induire la formation des racines adventives sur les bourgeons néoformés, nous les avons prélevé au stade trois à quatre feuilles et transféré en tubes sur des milieux de MURASHIGE & SKOOG additionnés de 20 g/l de saccharose (MS20) sans addition de régulateurs de croissance. Les racines s'initient à la base des vitropousses (photo, 4a, b et c). Elles sont grêles et ramifiées et semblent, du moins morphologiquement, présenter une structure classique de racine. Après l'initiation de racines on assiste à une accélération de la formation des feuilles.

### **Acclimatation des plantes néoformées**

L'acclimatation des plantes néoformées constitue une étape primordiale avant leur transfert sous serre ou au champ. Pour assurer une bonne reprise des plantes on doit favoriser l'adaptation de ces néoformations aux nouvelles conditions environnantes. Le transfert s'est déroulé en plusieurs étapes :

- Les plantules enracinées sont d'abord sorties des tubes, lavées pour enlever l'agar puis sont mises dans des pots (photo, 5a et b).
- Ces pots sont couverts de bocaux en verre et placés dans une chambre climatisée à 20° C / 15°C (jour/ nuit) caractérisée par une photopériode de 10h/14h (j/n) pendant 10 jours, puis transférés dans les conditions ambiantes du laboratoire avant d'être transférés en serre.
- La floraison de plantes régénérées à partir de CCMts que ce soit en présence de Zinc qu'en présence de Plomb est obtenue après 6 semaines de Culture (fig.7c).

Les résultats obtenus ont montré que la variété Jumbo (45% de caulogénèse avec 100  $\mu\text{M}$  de Zinc et 23 % de caulogénèse avec 250  $\mu\text{M}$  de Plomb) est plus tolérante à la présence de Zinc et du Plomb que la variété Drakkar (33 % de caulogénèse avec 100  $\mu\text{M}$  de Zinc et 14 % de caulogénèse avec 250  $\mu\text{M}$  de Plomb) d'où la régénération *in vitro* par CCMts chez le Colza est plus favorisée chez la variété Jumbo que la variété Drakkar en présence de doses importantes de Zinc et de Plomb. De plus le milieu retenu pour ce travail est le milieu MS additionné de 3mg/l de BAP + 0,3 mg/l d'ANA et de 3% de saccharose, 0,65 % d'agar, quelle que soit la dose de Zinc ou du Plomb ajoutée.

## **CONCLUSION**

L'induction de la néoformation *in vitro* de plantes chez *B. napus* L. par CCMts, constitue une nouvelle voie rapide et efficace pour élaborer des stratégies d'amélioration variétale par des procédés biotechnologiques et dans le but d'obtenir des plantes néoformées accumulatrices de métaux toxiques utilisables pour la phytoremédiation. D'ailleurs, la technique des CCMts a permis d'observer rapidement la néoformation de bourgeons chez le Colza, y compris en présence de fortes doses de Zinc (jusqu'à 2000 $\mu\text{M}$ ) et de Plomb (jusqu'à 1500  $\mu\text{M}$ ).

Les résultats obtenus, lors de cette étude, indiquent que le choix des techniques de la culture *in vitro*, telles que les techniques de CCMts, va permettre, soit par la pression de



sélection ou par la mutagenèse, d'avoir une collection de plantes tolérantes aux métaux toxiques qui vont être des bons candidats pour la phytoremédiation. Les résultats obtenus, lors de cette étude, indiquent que la variété Jumbo est la plus tolérante au zinc et au plomb et donc que c'est elle qui peut être utilisée pour dépolluer les sols. De plus on a constaté que la caulogénèse est meilleure avec des CCMts issues d'hypocotyles quelle que soit la variété et la dose du zinc ou du plomb additionnée dans le milieu de culture.

Sur un autre plan, ce travail représente une première tentative d'étude du comportement *in vitro* des végétaux vis-à-vis des métaux toxiques d'une part et d'autre part, le choix du colza nous a semblé intéressant à tester, ce qui constitue un élargissement des possibilités d'analyses entreprises sur un modèle autre que *Thlaspi caerulescens*. Cette étude démontre aussi que le choix de l'espèce joue un rôle majeur pour améliorer la phytoextraction par voie biotechnologique et permet d'obtenir soit des variants soit des mutants résistants aux métaux toxiques sans passage par les manipulations de transformation génétiques qui sont plus lourdes et plus compliquées à mettre en place.

Les résultats obtenus doivent être optimisés dans le but d'améliorer le taux de néoformation par la technique de CCMts en présence de Zn et de Pb, éventuellement en combinaison avec un traitement mutagène. Les plantes néoformées sont sevrées, clonées et cultivées en présence de métaux toxiques. Par ailleurs, des analyses physiologiques et biochimiques sont actuellement en cours.

#### BIBLIOGRAPHIE

- AFNOR, 1985. Norme NFU 44041 Matières fertilisantes. Boues des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines.
- AFNOR, 1994. Dictionnaire de l'Environnement. Editions AFNOR, 306 p.
- BAKER, A. J. M., BROOK, R. R., 1989. Terrestrial Higher Plants which hyperaccumulate metallic Elements-A review of their distribution. *J. Ecol and Phytochemistry. Biorecovery*, 1: 81-126.
- BERTI W. R. et CUNNINGHAM, S. D., 1995. Sequentiel chemical extraction of trace elements : Development and use in remediating contaminated soils. *Conference on the biochemistry of trace elements*, Paris.
- CHANEY, R. L., MALIK, Y., M., LI, S., L., BROWN, E., P., BREWER, J., S., ANGLE, et BAKER, A., J., M., 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 279-284.
- CHARLES, G., BEN GHAYYA, A., et BRANCHARD, M., 2004. *In vitro* neoformation of *Brassica* species in the presence of heavy metals. *Cost Action 895 WG3*. Greenwich.
- CHASSIN, P. et JUSTE, C., 1997. Micropolluants minéraux et l'épandage des boues. Journées Techniques Ademe - EPANDAGE des boues résiduaires-Aspects sanitaires et Environnementaux, Paris.
- CHASSIN, P., MENCH, M. et BAIZE, D., 1997. Qualité des produits de végétaux récoltés et éléments traces - nécessité d'une base de données de références sol - plante ? Journées Techniques Ademe -EPANDAGE des boues résiduaires -Aspects sanitaires et Environnementaux, Paris.
- CHOKRI, A., HTIRA, A., ZARAI, N. ET ABDELJAOUAD, S., 2006. Impact des rejets des laveries de phosphate sur la concentration des métaux lourds dans les sols et les plantes du bassin minier de Gafsa-Metlaoui (Sud-Ouest de la Tunisie).
- CONSEIL DES COMMUNAUTES EUROPEENNES.1986. Directive du conseil du 12 Juin 1986 modifiée par la directive du 2 décembre 1988 relativement à la protection de l'environnement et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture. 86/278/CEE, J.O. des Communautés Européennes n°L 181/6.
- CUNNINGHAM, S. D. et BERTI, W. R., 1993. Remediation of contaminated soils with green plants : An overview. *In vitro cellular and Development Biology* : 207-212.
- DETREZ, C. et TETU, T., SANGWAN, R., S., et SANGWAN-NORREEL, B., S., 1988. Direct organogenesis from petiole and thin cell layer explants in sugar beet cultured *in vitro*. *J. Exp. Bot*, 39: 917-926.
- DUSHENKOV, V., KUMAR, N., P., B., A., MOTTO, H., RASKIN, I., 1995. Rhizofiltration : the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science and Technology*, 29: 1239-1245.



- FOURMANN, M., BARRET, P., FROGER, N., BARON, C., CHARLOT, F., DELOURNE, R., et BRUNEL, D., 2002. From *Arabidopsis thaliana* to *Brassica napus* : development of amplified consensus genetic markers. (ACGM) for construction of a gene map. *Theor. Appl. Genet*, 105: 1196-1206.
- KAMAL, M., GHALY, A., E., MAHMOUD, N., et CÔTE, R., 2004. Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environ Inter*, 29: 1029-1039.
- KINNE, O., 1968. International symposium « Biological and hydrographical problems of water pollution in the North Sea and adjacent waters » : Closing adress. Helgoländer Meeresunters, 33: 732-761.
- LUND, L., J., BETTY, E., F., PAGE, A., L., et ELIOTT, R., A., 1981. Occurrence of naturally high cadmium levels in soils and its accumulation by vegetation. *J. Environ. Qual*, 10(4): 551-556.
- MARICHIOL, L., ASSOLARI, S., SACCO, P., et ZERBI, G., 2004. Phytoextraction of Heavy Metals by Canola (*Brassica napus*) and Radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil. *Environmental Pollution*, 132: 21-27.
- MCGRATH, S., P., et DUNHAM, S., J., 1997. Potential phytoextraction of zinc and cadmium from soils using hyperaccumulator plant. Proceedings of 4th international conference on the biochemistry of trace elements, Berkeley. *Ann Arbor Press*.
- MCINTYRE, T., 2003. Phytoremediation of Heavy Metals from soils. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 78: 97-123.
- MURASHIGE, T., et SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- NHUT, D., T., HUONG, N., D., T., BUI, V., L., DA SILVA, J., T., FUKAI, S., et TANAKA, M., 2002a. The change in shoot regeneration potential of protocorm-like bodies derived from *Lilium longiflorum* young stem explant to medium volume, pH, light intensity and sucrose concentration pretreatment. *J. Hort. Sci. Biotechnol*, 77: 79-82.
- NHUT, D., T., BUI, V., L., et TRAN THANH VAN, K., 2002b. Somatic embryogenesis through pseudo-bulbet transverse thin cell layer of *Lilium longiflorum*. *Plant growth Reg*, 37: 193-198.
- PELISSIER, B., BOUCHEFRA, O., PEPIN, R., FREYSSINET, G. 1990. Production of isolated somatic embryos from sunflower thin call layers. *Plant Cell Rep*, 9: 47-50.
- RAMADE, F., 1979. Ecotoxicologie. Masson, 2ème édition.
- RAMADE, F., 2005. Eléments d'écologie : écologie appliquée. Paris, Dunod, 6ème édition.
- RASKIN, I., KUMAR, N., P., B., A., DUSHENKOV, S., et SALT, D., E., 1994. Bioconcentration of heavy metal by plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 285-290.
- RASKIN, I., ENSLEY, B., T., 2000. Phytoremediation of Toxic Metals - Using Plants to Clean Up the environment, Wiley Inter-Science Publication, New York, NY, p ix.
- SALT, D., E., M., BLAYLOCK, M., KUMAR, N., P., B., A., DUSHENKOV, V., ENSLEY, B., D., CHERT, I., RASKIN, I., 1995. Phytoremediation : A novel strategy for the removal of toxic metals from environment using plants. *Biotechnology*, 13: 468-474.
- SEBEL, A., CHAABANI, F. et OUERFELLI, M., K., 2006. Impacts of mining wastes on the soil land plants in the Boujaber area (NW. Tunisia) Chemical fractionation of heavy metals in soils. *Geo-Eco-Trop*, 29: 37-50.
- SCHNEKENBURGER, P., CHARLES, G., HOURMONT, A., et BRANCHARD, M., 2002. Zinc uptake by *Buddleia davidii* cultured *in vitro*. Effect on the growth and on polyamine content analysed as stress markers. *Cost Action 837. WG2 Workshop -Risk assessment and sustainable land management using plants in trace element-contaminated soil*.
- SCHNOOR, J., L., LICHT, L., A., MCCUTCHEON, S., C., WOLFE, N., L., et CARRIER, L., H., 1995. Phytoremediation : an emerging technology for contaminated soils. *Environ. Sci. Technol*, 29: 318-323.
- SCHWITZGUEBEL, J., P., VAN DER LELIE, BAKER, A., GLASS, D., et VANGRONSVELD J., 2002. Phytoremediation : European and American Trends. Successes, obstacles and needs. *J. soils and sediments*, 1: 1-9.
- TRAN THANH VAN, M., 1973. In vitro control of de novo flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissues. *Nature (Lond)*, 246: 44-45.
- TRAN THANH VAN, M., 1974. Methods of acceleration of growth and flowering in a few species of orchids. *Amer. Orchid Soc. Bull*, 43: 699-707.
- TRAN THANH VAN, K., et BUI, V., L., 2000. Current status of thin cell layer method for the induction of organogenesis or somatic embryogenesis. In: Somatic embryogenesis in woody plants, Vol 6. Mohan, SJ., GUPAT, PK., NEWTON, RJ. (ed). Kluwer Academic, Publishers, Dordrecht, pp. 51-92.

- VARALLYAY, G., SALOMONS, W., et CZIKOS, I., 1993. Long - term environmental risks for soils, groundwaters and sediments in the Danube catchment area : The Danube chemical time bombs project. *Land Dégradation and Rehabilitation*, 4 : 421-432.
- WEI, S. H., et ZHOU, Q., X., 2006. Phytoremediation of Cadmium-contaminated soils by *Rorippa globosa* Using Two-Phase Planting. *Environ Sci and Pollut Res* , 13 (3): 151-155.
- WENZEL, W. W., ADRIANO, D., C., et SMITH, R., 1999. Phytoremediation : a plant microbe - based remediation system. In :ADRIANO,DC *et al.*, editor. *Bioremediation of contaminated soils*. Agron. Monogr, vol 37. MADISON, WI : ASA, CSSA and SSSA, p 457-508.

