

**UNIVERSITÉ SAÂD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des Sciences de l'Ingénieur**

**THÈSE DE DOCTORAT**

en Chimie Industrielle

ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DE TROIS MÉTAUX LOURDS (CUIVRE, CADMIUM  
ET ZINC) ET D'UN FONGICIDE (DIMÉTHOMORPHE) SUR UNE PLANTE  
AQUATIQUE : PERSPECTIVES D'UTILISATION EN PHYTOREMÉDIATION

Par

**Smain MEGATELI**

Devant le Jury composé de :

A. AOUABED	Professeur, USDB	Président
M. COUDERCHET	Professeur, U. de Reims (France)	Examineur
N. BELHANECHÉ	Professeur, ENP, Alger	Examinatrice
D. ACHOUR	Professeur, U. de Chlef	Examineur
A. BADIS	Maître de conférences, USDB	Examineur
S. SEMSARI	Professeur, USDB	Rapporteur

Blida, 26 juin 2010

## RÉSUMÉ

Les travaux présentés dans cette thèse ont pour objectifs l'étude de la toxicité des métaux lourds (cadmium, cuivre, zinc) vis à vis des plantes aquatique flottantes, les lentilles d'eau (*Lemna minor* et *Lemna gibba*) et les possibilités de d'utilisation des ces plantes pour remédier à cette contamination. Des paramètres d'évaluation de la toxicité ainsi que quelques biomarqueurs ont été utilisés pour déterminer les effets de ces éléments sur ces organismes végétaux.

Nous avons montré à travers les résultats de la première partie de ce travail que le cuivre et le cadmium sont les plus toxiques. Des réductions importantes de la croissance et de la teneur en chlorophylle ont été enregistrées à faibles concentrations. Cette toxicité a réduit significativement les capacités de l'absorption de l'azote et du phosphore par la plante.

Par ailleurs, l'ensemble des tests réalisés, au cours de la deuxième partie, ont montré que ces trois métaux lourds affectent la croissance, l'indice de stress et la quantité de la proline de la lentille d'eau *L. gibba*. Après 04 jours de traitement, une concentration de  $10^{-3}$  à  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> de cadmium inhibe la croissance de 25 à 100%, réduit l'indice de stress de 35% et de 89% et induit des augmentations de la quantité de la proline de 44 à 567%. Dans les mêmes conditions, une concentration de  $10^{-4}$  à  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> de cuivre inhibe la croissance de 36 à 75%, réduit l'indice de stress de 19% à 81% et provoque des augmentations de la proline de 67 à 288%. Des concentrations comparables de zinc n'induit aucun effet. Cependant, des concentrations élevées (4, 30 et 50 mg L<sup>-1</sup>) inhibent la croissance de 50 à 79%. Des concentrations de 0,1 et 30 mg L<sup>-1</sup>, induisent de faibles réductions de l'indice de stress (3,8 à 22%) et des augmentations de la proline de 144 et 177%. Le suivi de la concentration des métaux lourds dans les milieux de culture montre que la lentille d'eau *L. gibba* est capable d'accumuler ces polluants. Ainsi, l'élimination du cuivre et du zinc peut être réalisée en 2 phases et est rapide durant les 2 premiers jours d'expérimentation (supérieur à 60%).

La rétention du cadmium est linéaire et dépend de la concentration initiale. Des taux d'élimination de 90% ont été enregistrés après 6 et 8 jours de culture en présence de  $10^{-1}$  et  $10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup> de cadmium.

La présence simultanée des métaux lourds et d'autres produits tels que les pesticides dans le milieu représente un accroissement du risque écotoxicologique potentiel par rapport à une contamination unique. L'effet de la coexistence, du cuivre et du diméthomorphe, 02 fongicides largement utilisés en viticulture pour le contrôle des maladies fongiques, sur leur toxicité et leur élimination par la lentille d'eau *L. minor* a été examiné. Le cuivre s'est avéré le plus toxique en réduisant significativement la croissance de la plante (l'inhibition maximale observée est de 90 % en présence de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre). Le diméthomorphe (pur DMM<sup>P</sup> ou formulé DMM<sup>F</sup>) affecte légèrement la croissance (inhibition inférieure à 45% en présence de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) après 168 h. Lorsque les deux contaminants sont mélangés, une synergie a été observée après 96 h d'exposition au cuivre et au DMM<sup>F</sup>. Après 168 h, l'effet s'atténue et l'interaction se transforme en simple additivité.

Le mélange cuivre/diméthomorphe pur a induit une additivité d'effet des deux contaminants après 96 et 168 h de traitement, respectivement. L'élimination du cuivre par la lentille d'eau dépend de la concentration en DMM<sup>F</sup>. Par exemple, en présence de 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de DMM<sup>F</sup>, la rétention du cuivre passe de 36 à 41%. L'élimination du diméthomorphe varie entre 10 et 40 % après 96h. Cette dépuración diminue en présence du cuivre et semble être due à la toxicité du métal.

### **Mots clés**

Métaux lourds, pollution, toxicité, lentille d'eau, biomarqueurs, phytoremédiation

## الملخص

الأعمال المنجزة و المعروضة في هذه الأطروحة غايتها الرئيسية تتمثل في دراسة الآثار التسممية لبعض المعادن الثقيلة (النحاس، الكاديوم، الزنك) على نوع من النباتات المائية (ليمنا مينور و ليمنا جيبا) من ناحية و إمكانيات استعمال هذا النوع من النباتات المعروفة بفعاليتها في الاختبارات الايكوتوكسكولوجية للتقليل أو التخلص من هذه العناصر السامة .

من أجل هذا تم استعمال عدة عوامل و خصائص لتقييم الآثار التسممية لهذه المركبات (نسبة النمو، نسبة إعاقة النمو، كمية اليخضور، كمية البرولين، معامل الإكتئاب الفيزيولوجي، الخ).

الجانب الثاني و المتمثل في تقييم قدرة امتصاص هذه النباتات للمعادن الثقيلة كالنحاس، الكاديوم و الزنك اخذ قسطاً كبيراً من الاهتمام

نتائج الجرع الأول من هذا العمل أظهرت بان النحاس و الكاديوم هما العنصران الأكثر تأثيراً على النبات المستعمل و لو بتركيز ضعيفة عكس الزنك المتميز بالتأثير عند تراكيز مرتفعة (10مغ/ل). تم تسجيل انخفاضات معتبرة في نسبة النمو و اليخضور مع نسبة امتصاص الفسفور . و الأزوت انخفضت بوجود الكاديوم و النحاس

نتائج الجزء الثاني أكدت الأثر التسممي لهذه العناصر على نبتة ليمنا جيبا بعد أربعة أيام من زرعها في وسط مائي اصطناعي ملوث بتركيز مختلفة من النحاس و الكاديوم بحيث أننا سجلنا ارتفاعاً في نسبة إعاقة النمو و انخفاضاً في معامل الإكتئاب مع ارتفاع محسوس لنسبة البرولين . رغم هذا التأثير الكبير تم تسجيل نسبة امتصاص عالية لهذه المعادن (60 الى 90 %) مما يجعل من هذه النباتات مادة بيولوجية مهمة و فعالة للتخلص من هذه المكونات

نتائج الجزء الثالث أثبتت أن تواجد النحاس كمعدن ثقيل ضروري و سام في نفس الوقت مع مركب عضوي آخر "من فصيلة المبيدات" يزيد من درجة تسممه و يؤثر على قدرة ليمنا مينور . من امتصاصهما

كلمات مفاتيح : معادن ثقيلة، التلوث، التسمم، النباتات المائية، بيوماركر، فيتوروميديا

## ABSTRACT

In this work we investigated the toxicity of heavy metals (copper, cadmium and zinc) for the floating macrophytes (*Lemna minor* and *Lemna gibba*) and their removal by these plants. Results of the first part of this investigation showed alteration of biomass, protein and pigments of aquatic plant tested particularly with copper and cadmium. The presences of these metals in medium growth reduce the removal capacity of phosphorus and nitrogen. The effects of cadmium, copper, and zinc on the aquatic plant *L. gibba* were determined under controlled conditions, in parallel their removal from the growth medium was followed. The results showed that the three heavy metals affect growth, a physiological stress index, and the contents of proline. After 4 days  $10^{-3}$ - $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> Cd inhibited growth by 25-100%, reduced D665/D665a by 35 to 89% and increased proline content by 44- 567%. Under the same conditions,  $10^{-4}$  to  $10^{-1}$  µg L<sup>-1</sup> Cu inhibited growth and D665 / D665a by 36-75% and 19-81% and proline content increased by 67-288%. Comparable concentrations of Zn had little effect. However, higher concentrations (4, 30, and 50 mg L<sup>-1</sup>) inhibited growth by 50-79%. Also, 0.1 and 30 mg L<sup>-1</sup> induced a small reduction of D665/D665a (3.8 and 22%) and proline accumulation (144 and 177%). Monitoring metal concentration in the medium showed that *L. gibba* was able to remove metals from the medium. Zn and Cu removal was biphasic, it was rapid during the first 2 days (> 60% reduction) and slow (10-20%) during the following 8 days. For Cd, removal was linear and depended on the initial concentration. It reached approximately 90% after 6 or 8 days for initial concentrations of  $10^{-1}$  and  $10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup>, respectively. The toxicity of copper and dimethomorph alone and in combination, was assessed by growth inhibition of *L. minor* cultures after 96 and 168 h. Copper had a severe impact on growth (maximum inhibition: 90% at 1000 µg L<sup>-1</sup>) while dimethomorph (as pure ingredient DMM<sup>P</sup> or formulated as Forum<sup>®</sup> DMM<sup>F</sup>) did not (inhibition < 45% at 1000 µg L<sup>-1</sup>) after 168 h of treatment. When both chemicals were combined, a synergistic effect was detected after 96 h of exposure to copper and DMM<sup>F</sup>.

However, this interaction tented toward additivity after 168 h, respectively. Additivity was also observed when DMM<sup>P</sup> replaced DMM<sup>F</sup> in the mixture of copper and dimethomorph at 96 and 168 h.

The removal of copper depended on DMM<sup>F</sup> concentration. For example, with 250 µg L<sup>-1</sup> of DMM<sup>F</sup>, removal of copper increased from 36 to 41%.

Depuration of DMM<sup>F</sup> by *L. minor* varied between 10 and 40% after 96 h. This depuration decreased in the presence of copper possibly due to the metal toxicity.

### **Keywords**

Heavy metals, pollution, toxicity, duckweed, biomarkers, phytoremediation

## REMERCIEMENTS

Cette thèse est le fruit de la collaboration de nombreuses personnes, travaillant dans différents départements et différentes Universités.

L'aboutissement de ce travail a été possible grâce au financement par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique à travers le programme de formation en partenariat avec la France (BAF) destiné aux enseignants préparant une thèse de Doctorat. Je tiens à témoigner à tous ses acteurs de toute ma gratitude pour leur aide.

J'exprime tout ma reconnaissance à Madame le Professeur Saida SEMSARI pour m'avoir supervisé directement. Tout en me laissant une grande liberté pour gérer mon projet, elle a toujours été présente et disponible quand cela s'avérait nécessaire.

Je Remercie vivement le Professeur Michel COUDERCHET pour m'avoir accueilli au sein de son groupe et donné l'opportunité de mener non seulement une recherche m'ayant permis d'acquérir des connaissances dans le domaine d'écotoxicologie, pesticides et de la phytoremédiation, mais aussi de mettre en valeur les travaux réalisés en Algérie. J'ai beaucoup apprécié la confiance qu'il m'a témoignée et son soutien tout le long de ces 18 mois de thèse.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à Monsieur Ali AOUABED, Professeur à l'université de Blida, de l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Que Monsieur Djilali ACHOUR, Professeur à l'Université de Chlef, sache que je le remercie très vivement d'avoir accepté de participer à ce jury et de l'intérêt qu'il a manifesté pour mon travail. Connaissant son implication dans les domaines de l'environnement et des pollutions du milieu aquatique nous tenions tout particulièrement à recueillir son avis.

Je suis très particulièrement redevable à Madame Naïma BELHANECHÉ, Professeur à l'Ecole National Polytechnique, de l'honneur qu'elle m'a fait en consentant à juger mon travail. En raison de ses compétences en matière d'environnement, son avis m'est des plus précieux.

Je remercie chaleureusement Monsieur Abdelmalek BADIS, Maître de Conférences à l'université de Blida, d'avoir accepté d'être parmi les examinateurs de cette thèse. En raison de ses qualités humaines, de ses vastes connaissances de la biochimie et de son goût marqué pour les problèmes environnementaux l'appréciation qu'il portera à mon travail sera très enrichissante.

Je remercie très chaleureusement, Monsieur AZIZ aziz et Mme AZIZ Trostel Patricia, Maîtres de Conférences, Membres de l'équipe du Laboratoire des Plantes, Pesticides et Développement Durable de l'Université de Reims pour leur accueils et soutiens depuis mon arrivée au sein de l'équipe.

Monsieur Alain GEFFAR, Maître de Conférences (HDR), Membre de l'Equipe du Laboratoire d'Ecotoxicologie à l'Université de Reims, pour m'avoir donné de précieux conseils pour le dosage du cuivre et sans oublier Lorrence qui ma aidé à faire toutes les analyses en question.

Tous les collaborateurs de l'université de Reims (France) qui m'ont accueilli chaleureusement.

Je dédie cette thèse aux personnes qui comptent beaucoup dans ma vie:

À ma femme, ton amour a été le plus beau des soutiens. J'espère pouvoir t'épauler autant que tu l'as fait pour moi dans les semaines à venir.

À ma petite Fatima, j'espère que cette thèse te donnera la force et le courage nécessaires pour affronter les années de tes études.

À mon petit Zakaria, tes résultats scolaires durant mon absence m'ont donné de la force pour aller en avant.

À mon amour Ishak, que j'espère lui récupérer ce qu'il a perdu à cause de moi !!.

À la mémoire de ma mère.

À toute la famille pour la précieuse solidarité manifestée durant les dix huit mois de formation en France.



## TABLE DES MATIERES

RÉSUMÉ	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	14
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
CHAPITRE 01	17
LES MÉTAUX TRACES DANS L'ENVIRONNEMENT	
1.1. Introduction	17
1.2. Définitions, origine et importance des métaux	17
1.3. Comportement, distribution et devenir de Cd, Cu et Zn dans l'environnement aquatique	22
1.4. Effets de la pollution métallique sur les organismes aquatiques	25
1.5. Les métaux lourds et les plantes des sites contaminés	27
1.5.1. Introduction	27
1.5.2. Toxicité des métaux lourds vis-à-vis des plantes	28
CHAPITRE 02	31
LES LENTILLES D'EAU, L'ÉCOTOXICOLOGIE ET LA PHYREMÉDIATION	
2.1. Introduction	31
2.2. Essais écotoxicologiques moyennant les <i>Lemna</i>	33
2.2.1. Condition de réalisation des tests	33
2.2.2. Biomarqueurs et analyse de la phytotoxicité	34
2.2.3. Intérêt du test <i>Lemna</i>	35
2.3. Plantes aquatiques et phytoremédiation	36

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

## CHAPITRE 03 39

EFFETS DU CUIVRE, CADMIUM ET ZINC SUR LA TENEUR EN PROTÉINES  
ET PIGMENTS DE LA LENTILLE D'EAU ET EVALUATION DE LA CAPACITÉ  
D'ABSORPTION DE L'AZOTE ET DU PHOSPHORE

3.1. Introduction	39
3.2. Matériels et méthodes	40
3.2.1. Échantillonnage de la plante	40
3.2.2. Milieu de culture	41
3.2.3. Matériel végétal	41
3.2.4. Concentrations en métal testées	41
3.3. Paramètres de phytotoxicité	42
3.4. Mesure de la capacité de biosorption du phosphore et de l'azote	43
3.7. Analyse statistique	44
3.8. Résultats	45
3.8.1. Effets sur la biomasse	45
3.8.2. Effets sur les pigments	48
3.8.3. Effets sur la teneur en protéines	54
3.8.4. Capacité d'absorption du phosphore et azote	59
3.9. Discussion	63
3.10. Conclusion	66

CHAPITRE 04	67
ETUDE DE LA TOXICITÉ ET DE LA RETENTION DU CUIVRE, DU CADMIUM ET DU ZINC SUR LA LENTILLE D'EAU « <i>Lemna gibba</i> »	
4.1. Introduction	67
4.2. Matériels et méthodes	68
4.2.1. Matériel végétal	68
4.2.2. Conditions de culture	68
4.2.3. Métaux lourds	68
4.2.4. Paramètres de mesure de la toxicité	69
4.2.5. Taux de rétention des métaux lourds	71
4.2.6. Analyse statistique	71
4.3. Résultats	72
4.4. Conclusion	83
CHAPITRE 05	84
EFFETS DE L'ASSOCIATION DU CUIVRE ET DU DIMÉTHOMORPHE SUR LEUR TOXICITÉ ET LEUR ÉLIMINATION PAR LA LENTILLE D'EAU <i>Lemna minor</i>	
5.1. Introduction	84
5.2. Matériels et méthodes	86
5.2.1. Produits testés	86
5.2.2. Concentrations choisies	88
5.2.3. Mode de contamination et culture	89
5.2.4. Mesure de la toxicité	89
5.2.5. Combinaison du cuivre et diméthomorphe	89
5.2.6. Suivi des concentrations en contaminants	90
5.2.7. Élimination du cuivre et diméthomorphe	91
5.2.8. Analyse statistique des résultats	92
5.3. Résultats et discussion	92
5.4. Conclusion	107
CONCLUSION GENERALE	108
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	123

## LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Diagramme conceptionnel illustrant les différentes voies de transfert des métaux entre différents environnements	18
Figure 1.2	Toxicité des métaux lourds dans les plantes	29
Figure 2.1	Lentilles d'eau ( <i>Lemna minor</i> et <i>Lemna gibba</i> )	32
Figure 3.1	Sites de prélèvements de la lentille d'eau	40
Figure 3.2	Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines	43
Figure 3.3	Courbe d'étalonnage pour le dosage du phosphore	44
Figure 3.4	Évolution de la biomasse dans le milieu de culture sans métaux lourds	45
Figure 3.5	Inhibitions de la biomasse en présence du cuivre	46
Figure 3.6	Inhibitions de la biomasse en présence du cadmium	47
Figure 3.7	Inhibitions de la biomasse en présence du zinc	48
Figure 3.8	Teneurs en chlorophylle totale en présence du cuivre	49
Figure 3.9	Teneurs en chlorophylle totale en présence du cadmium	50
Figure 3.10	Teneurs en chlorophylle totale en présence du zinc	51
Figure 3.11	Effets du cuivre sur les teneurs en chlorophylle totale, chlorophylle a et chlorophylle b et le rapport Chla/Chlb après 8 jours	52
Figure 3.12	Effets du cadmium sur les teneurs en chlorophylle totale, chlorophylle a et chlorophylle b et le rapport Chla/Chlb après 8 jours	53
Figure 3.13	Effets du zinc sur les teneurs en chlorophylle totale, chlorophylle a et chlorophylle b et le rapport Chla/Chlb après 8 jours	54
Figure 3.14	Teneurs en protéines de la lentille d'eau <i>L. gibba</i> en présence du (a) Cuivre ; (b) : Cadmium et (c) Zinc	56
Figure 3.15	Teneurs en protéines de la lentille d'eau <i>L. minor</i> en présence du (a) Cuivre ; (b) : Cadmium et (c) Zinc	58
Figure 3.16	Evolution de la teneur en phosphore des milieux de cultures en présence du : (a) cuivre (b) cadmium et (c) zinc	59
Figure 3.17	Taux de réduction de l'azote en fonction de temps à différentes concentrations en zinc	61

Figure 3.18	Taux de réduction de l'azote en fonction de temps à différentes concentrations en cuivre et en cadmium	62
Figure 4.1	Courbe d'étalonnage de la proline	71
Figure 4.2	Evolution de la croissance en fonction de temps	73
Figure 4.3	Evolution de l'indice de stress ( $DO_{665}/D_{O665a}$ ) en fonction de temps	74
Figure 4.4	Teneurs en proline en fonction de temps	76
Figure 4.5	Taux de rétention en fonction de temps	77
Figure 5.1	Représentation de la molécule du diméthomorphe	87
Figure 5.2	Courbe d'étalonnage pour le dosage du cuivre	91
Figure 5.3	Evolution de la concentration en diméthomorphe en fonction de temps dans les milieux de culture sans plante	91
Figure 5.4	Inhibitions de la croissance après 96 et 168 h d'exposition au cuivre et au diméthomorphe	93
Figure 5.5	Pourcentages d'élimination du cuivre et du diméthomorphe (formulé et pur) des milieux de culture de la lentille d'eau <i>L.minor</i> à 96 et 168 h	97
Figure 5.6	Effet du diméthomorphe ( $DMM^F$ ) sur l'élimination du cuivre après 96 et 168 h	98
Figure 5.7	Effet du cuivre sur l'élimination de diméthomorphe ( $DMM^F$ ) après 96 et 168 h	101
Figure 5.8	Effet du cuivre sur l'élimination de diméthomorphe pur ( $DMM^P$ ) après 96 h et 168 h	102
Tableau 1.1	Rapport en éléments traces métalliques des sources anthropiques et naturelles dans l'environnement en tonnes/an	19
Tableau 1.2	Quelques caractéristiques physico-chimiques des métaux	20
Tableau 1.3	Classification de quelques métaux lourds selon leur densité et leur toxicité	21
Tableau 1.4	Quelques espèces chimiques du cadmium dans les eaux naturelles en fonction de leurs tailles	22
Tableau 5.1	Propriétés élémentaires du diméthomorphe	87

Tableau 5.2	Croissance (%) de la lentille d'eau <i>L. minor</i> exposée à différentes concentrations en cuivre	89
Tableau 5.3	Croissance (%) de la lentille d'eau <i>L. minor</i> exposée à différentes concentrations en diméthomorphe	92
Tableau 5.4	Inhibitions de la croissance (%) et rapports d'inhibition (RI) par les mélanges binaires de cuivre et de diméthomorphe forum après 96 h	95
Tableau 5.5	Inhibitions de la croissance (%) et rapports d'inhibition (RI) par les mélanges binaires de cuivre et de diméthomorphe pur après 96h	95
Tableau 5.6	Inhibitions de la croissance (%) et rapports d'inhibition (RI) par les mélanges binaires de cuivre et de diméthomorphe forum après 168 h	96
Tableau 5.7	Inhibitions de la croissance (%) et rapports d'inhibition (RI) par les mélanges binaires de cuivre et de diméthomorphe pur après 168 h	96
Tableau 5.8	Évolution du pH des milieux de culture sans et avec plante	99

## INTRODUCTION

Face aux pollutions massives qui dégradent l'environnement, la préservation de sa qualité est l'un des problèmes les plus préoccupants de l'époque actuelle. Le compartiment aquatique a été longtemps, et est bien souvent, le réceptacle final des rejets de pollutions d'origine anthropique. Il révèle des taux élevés en polluants supérieurs aux charges naturelles et est l'objet de programmes de surveillances qui cherchent à quantifier et à prévenir l'impact des pollutions [1].

Parmi ces produits polluants, les métaux lourds, du fait de leur stabilité et de leur persistance dans l'environnement, sont propices au transport et à l'accumulation dans certains compartiments de l'environnement. L'eau qu'elle soit de surface ou souterraine, est dans la plupart des cas le réceptacle final de ces produits potentiellement toxiques, des déchets solides domestiques et industriels, et les eaux de ruissellement agricoles [2]. En Algérie, les métaux traces, dans les eaux de surface et les eaux de mer, ont pour origines différentes activités industrielles : activités métallurgiques, les tanneries et les papeteries (Cd, Zn, Cu, Hg, Cr et Ni), les eaux usées (Zn, Cu, Cd, Pb et Ni), l'agriculture par usage abusif des pesticides (Cu, Zn et Hg) [3 - 5].

La surveillance des écosystèmes aquatiques est exercée depuis plusieurs années afin d'éviter les conséquences parfois graves de la pollution. Cependant, la qualité du milieu aquatique ne peut être évaluée par une simple analyse qualitative et quantitative des molécules présentes dans les eaux car elle ne donne qu'une image instantanée de la qualité de l'eau. En effet, ces mesures ne permettent pas d'évaluer l'impact des différentes substances sur les organismes peuplant l'écosystème aquatique. C'est pour cette raison que l'une des meilleures façons d'évaluer la qualité globale d'un milieu, consiste à recourir aux organismes qui le peuplent. À l'heure actuelle, deux approches complémentaires, basées sur l'étude des organismes vivants, sont utilisées : les « bioindicateurs » et les « biomarqueurs ». Les bioindicateurs concernent la recherche de certaines espèces ou groupe d'espèces qui renseignent, par leur présence (ou leur absence) et/ou leur abondance, sur la qualité des milieux.

Parmi ces bioindicateurs, les lentilles d'eau (végétaux qui colonisent la surface des eaux stagnantes de qualité médiocre) sont considérées.

Les biomarqueurs regroupent les paramètres biologiques, biochimiques, cellulaires ou physiologiques mesurés au sein d'individus provenant du milieu naturel. Le changement d'un de ces paramètres révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance à caractère polluant [6,7].

L'usage de marqueurs biologiques (ou biomarqueurs) s'est développé depuis quelques années, dans les études de toxicité, parfois de manière normalisée [8]. Parmi les organismes utilisés dans les tests de toxicité, la lentille d'eau (*L. minor*), organisme végétal représentatif du milieu aquatique d'eau douce des régions tempérées est recommandée [9-12]. Cette lentille d'eau a manifesté de fortes accumulations de métaux lourds dans leurs tissus ce qui a suggéré son utilisation pour l'évaluation et la surveillance des métaux dans l'eau [13-17].

Dans le cadre des activités de recherches initiées par le Professeur Semsari en 1986 et qui visent à mettre en place des techniques de contrôle de la toxicité de certains produits chimiques en particulier les métaux lourds, les objectifs de cette recherche consistent en l'examen de la toxicité de trois métaux lourds (cuivre, cadmium et zinc) sur les lentilles d'eau *L. gibba* et *L. minor* ainsi que l'étude des possibilités d'utilisation de ces espèces pour l'élimination de ces métaux. En raison de l'importance des phénomènes d'interactions entre les polluants, l'effet d'association d'un métal et d'un pesticide sur leur toxicité et leur élimination par *L. minor* a été examiné.

La première partie de cette thèse sera consacrée à une revue bibliographique qui présentera des concepts de bases relatifs à certains métaux lourds (Cu, Cd et Zn) et à leurs effets.

Les différentes approches expérimentales et les résultats de chaque partie seront présentés en trois chapitres qui composent la deuxième partie de cette thèse :

- L'effet du cuivre, cadmium et zinc sur la teneur en protéines et pigments (chlorophylle totale), la consommation de l'azote et le phosphore par la lentille d'eau (*L. gibba*).



- La toxicité du cuivre, cadmium et zinc sur la lentille d'eau (*L. gibba*) et possibilités d'utilisation de l'indice de stress et la proline comme un biomarqueur de stress. Les capacités de rétention des trois métaux par *L. gibba*.
- L'effet de l'association du cuivre et du diméthomorphe (fongicide) afin d'envisager les éventuelles interactions (synergie, additivité ou antagonisme) et son effet sur leur élimination par la lentille d'eau *L. minor*.

## CHAPITRE 01

### LES MÉTAUX TRACES DANS L'ENVIRONNEMENT

#### 1.1. Introduction

Ce chapitre est consacré à une revue bibliographique qui présentera successivement des concepts de base relatifs aux métaux traces et à leurs effets sur l'environnement.

De part l'objet principal de l'étude, il est nécessaire de présenter la problématique générale des métaux traces dans l'environnement et leur spécificité dans les cycles biogéochimiques des éléments. Dans ce contexte, bien que nombreux sont les métaux toxiques, l'étude est orientée vers le cuivre, le cadmium et le zinc qui ont des comportements chimiques et des effets biologiques différents.

#### 1.2. Définitions, origine et importance des métaux

Les éléments traces métalliques (ETM), sont des éléments dont la concentration dans la croûte terrestre est inférieure à 1 g/Kg. Cette définition est aujourd'hui utilisée à la place du terme « métaux lourds » (métaux qui possèdent des masses volumiques supérieures ou égales à 5 g/cm<sup>3</sup>), celle-ci étant une appellation courante qui n'a ni fondement scientifique, ni application juridique [18]. À ces éléments métalliques sont associés souvent les métalloïdes comme l'arsenic ou le sélénium. La caractérisation des risques liés aux métaux traces nécessite une prise en compte de certains paramètres qui leur sont spécifiques.

Une classification chimique de l'ensemble des métaux a été proposée [19,20]. Les métaux sont répartis en trois classes : la classe A, la classe B et la classe intermédiaire ou éléments de transition.

Les exploitations des métaux sont très diversifiées, depuis les additifs de plomb dans les carburants jusqu'aux sels d'argent de l'industrie photographique, au nickel ou au cadmium des batteries d'accumulateurs, au zinc des gouttières ou au chrome des aciers inoxydables, au cuivre de l'industrie électrique ou à l'arsenic des produits phytosanitaires.

Les sources de contamination sont par conséquent aussi multiples. Durant toutes les phases d'élaboration, d'utilisation et/ou de recyclage de ces produits, des métaux sont rejetés dans l'environnement, soit directement dans les eaux continentales ou marines, soit dans l'atmosphère transportés par les vents, associés aux aérosols avant de se déposer par voie sèche ou humide à la surface de la terre ou des océans [21]. Le flux des éléments traces métalliques dans l'environnement peut également provenir des sources naturelles (de l'érosion des roches, des sols et les émissions volcaniques) ou des activités anthropogéniques (industries, transport, agriculture) [9,22].

Le mouvement des métaux traces et métalloïdes entre le sol, les plantes, l'eau et même l'atmosphère fait partie d'un complexe processus biogéochimique dans la nature et est affectée par plusieurs facteurs qui sont à la fois naturels et anthropiques [23]. Le parcours biogéochimique des métaux à partir de ces sources naturelles et anthropiques dans l'atmosphère, systèmes terrestres et aquatiques ainsi que l'éventuel transfert trophique dans les milieux de l'environnement et l'Homme est présenté dans la Figure 1.1.

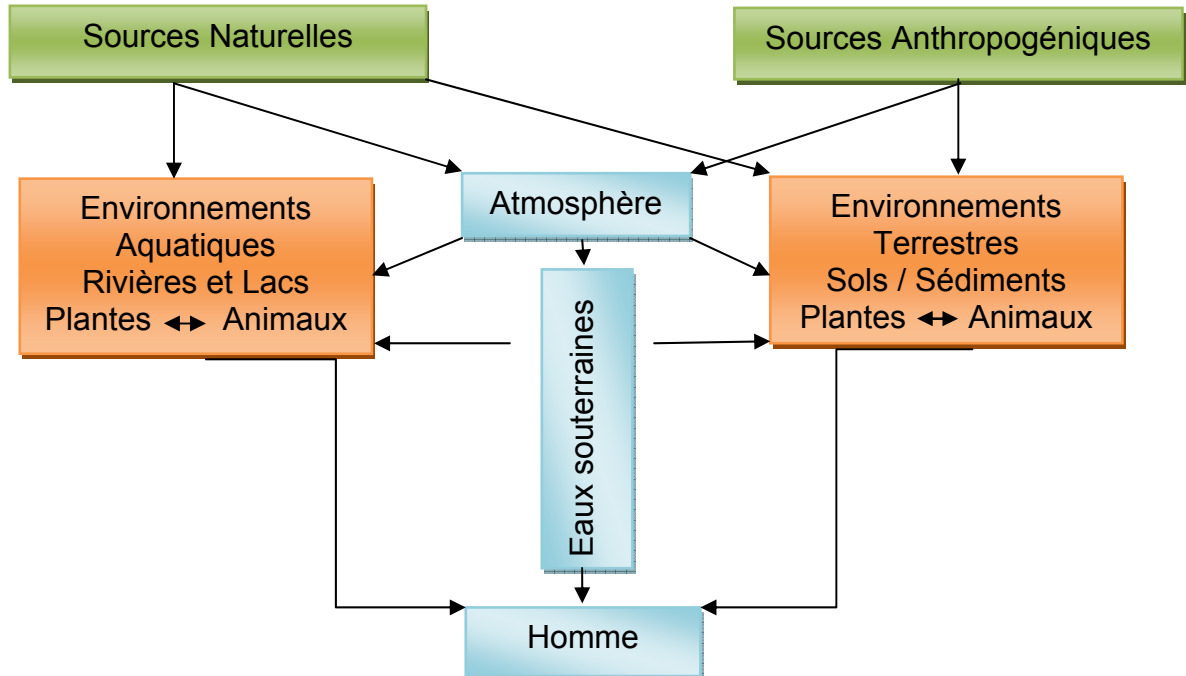


Figure 1.1. Diagramme conceptionnel illustrant les différentes voies de transfert des métaux entre les différents compartiments de l'environnement [23].

La part la plus importante de pollution par les métaux traces est apportée par les sources anthropogéniques (Tableau 1.1). Les rapports en éléments traces métalliques des sources anthropiques et naturelles sont tous supérieurs à 1 donc le risque de contamination des cycles biogéochimiques par les activités humaines est très grand. La conséquence de celles-ci est marquée par une augmentation de la concentration en métaux dans les sédiments des rivières et des lacs (liée à leur faible solubilité aux pH habituels des eaux 5 à 9).

Tableau 1.1. Rapport en éléments traces métalliques des sources anthropiques et naturelles dans l'environnement en tonnes/an [24].

Eléments	Flux Anthropiques (A)	Flux Naturel (B)	Facteur d'enrichissement Anthropogénique (AEF) (A)/ (B)
As	150	90	1,7
Cd	43	4,5	9,6
Cr	7810	810	9,6
Cu	9162	375	24,4
Pb	3665	180	20,4
Hg	17,8	0,9	19,8
Ni	1134	255	4,4
Zn	7467	540	13,8

Leur mobilité et leur transfert dans les différents compartiments de l'environnement est fonction des propriétés chimiques intrinsèques de chaque métal (Tableau 1.2). En particulier, il est important de considérer leur solubilité dans l'eau et surtout le coefficient de partage du métal entre l'eau et les particules ce qui est déterminant à la fois dans le devenir, le transport et les interactions avec les autres compartiments des écosystèmes.

Tableau 1.2. Quelques caractéristiques physico-chimiques des métaux [25,26].

Elément	Solubilité à 20 °C (g L <sup>-1</sup> )	Coefficient de partage eau/particules	
		Log K <sub>p</sub>	Type de milieu
Manganèse	0 à 3800	3,20 – 7,09 3,90	MES Mer MES Rivière
Fer	0 à 1600	-	MES Rivière
Cuivre		4,03 à 5,10	MES Rivière
Zinc	220 (ZnSO <sub>4</sub> )	4,86	MES Rivière
Cadmium	5 (CdO)	3,70 – 5,80	MES Rivière

Les rejets de métaux lourds toxiques dans l'environnement représentent un sérieux problème de pollution affectant la qualité des eaux et des sols, d'où le danger direct pour la santé humaine. Du fait de leur stabilité et de leur persistance dans l'environnement, les métaux lourds sont propices au transport et à l'accumulation dans certains compartiments de l'environnement et peuvent engendrer des effets sur les organismes vivants. En outre, certains éléments, comme le Zn, le Cu, le Mn et le Fe, sont indispensables aux organismes vivants mais peuvent devenir toxique à des doses importantes. D'autres métaux tels que, le Pb, le Hg et le Cd, ne sont pas indispensables aux processus métaboliques mais ils perturbent souvent le cours normal de ceux-ci, même à l'état de trace (tableau 1.3). À l'exception de faibles doses tolérables, de tels métaux ont souvent un effet toxique.

Tableau 1.3. Classification de quelques métaux lourds selon leur densité et leur toxicité [27].

Métal	Plantes	Animaux	Densité
Pt	T		21,4
Hg	T	T	13,59
Pb	T	T	11,34
Mo	E	E T	10,2
Cu	E T	E T	8,92
Ni	T	E	8,90
Co		E	8,90
Cd	T	T	8,65
Fe	E	E	7,86
Sn		E	7,28
Cr		E	7,20
Mn	E T	E	7,20
Zn	E T	E	7,14
V	E	E	5,96

\* T : toxique ; E : essentiel.

Certains éléments essentiels, de transition, comme le fer, le manganèse, le molybdène, le cuivre, le zinc et le nickel sont considérés comme des micronutriments par rapport à la faible quantité demandée par les plantes [28]. Autres éléments de transition comme l'argent, l'or et le cobalt et les éléments de non transition tels que l'aluminium ont montré des effets similaires sur la croissance des plantes mais ne sont pas considérés comme éléments essentiels [29-31]. En outre, les plantes absorbent également des éléments qui n'ont pas de rôle biologique connu et sont même connus pour être toxiques à de faibles concentrations. Parmi ceux-ci, l'arsenic, le cadmium, le chrome, le mercure et le plomb. Toutefois, même les micronutriments peuvent être toxiques au-dessus de certains seuils.

### 1.3. Comportement, distribution et devenir de Cd, Cu et Zn dans l'environnement aquatique

Le devenir des métaux dans l'eau est tributaire de leur nature et de leurs propriétés, mais aussi des facteurs physiques et chimiques du milieu qui conditionnent leur répartition sous différentes formes chimiques. De ces dernières dépend la répartition des métaux dans les différents compartiments de l'écosystème [32]. D'une manière simplifiée, les compartiments sont divisés, entre le compartiment dit stationnaire, le sédiment et le compartiment circulant comprenant les fractions particulières et dissoutes du métal. En milieu aquatique, le cadmium est sous diverses formes physiques (dissoutes, colloïdales, particulières) et chimiques (minérales ou organiques). Les transformations du cadmium dans l'environnement dépendent d'un ensemble de paramètres physico-chimiques (la salinité, le pH, le potentiel redox, les caractéristiques sédimentologiques, la nature géochimique des particules, la concentration en chlorure). Dans le Tableau 1.4, sont présentées quelques données sur les formes de cadmium les plus rencontrées dans les eaux naturelles, dont les seuils sont fixés arbitrairement en fonction de leur taille, par filtration et ultrafiltration [33].

Tableau 1.4. Distribution selon la taille de quelques espèces chimiques du cadmium dans les eaux naturelles [33].

Forme dissoute (solution vraie)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ions libres</li> <li>- Complexes inorganiques</li> <li>- Complexes organiques</li> </ul> Exemple : $\text{Cd}^{2+}$ , $\text{CdCl}^+$
Forme Colloïdale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Colloïdales minéraux</li> <li>- Complexes organiques de poids moléculaire élevé</li> </ul> Exemple : $\text{CdCO}_3$ , $\text{CdS}$ , Cd-Acides Humiques
Formes Particulaires	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Précipités inorganiques et organiques</li> <li>- Organismes vivants</li> </ul> Exemple : Cd adsorbé sur les particules et les organismes

Les formes dissoutes (< 1nm) du cadmium sont présentes en milieu aquatique sous la forme d'espèces libre  $\text{Cd}^{2+}$ . Ces espèces forment des complexes avec des composés minéraux ou organiques (ligands ou complexants).

À pH = 8, la quasi-totalité du cadmium est présente sous forme  $\text{Cd}^{2+}$ . Pour des pH supérieurs à 8, le cadmium précipite avec les carbonates. En outre, en zone côtière lorsque les eaux douces rencontrent les eaux de mer, le cadmium est complexé par les chlorures ( $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdCl}_3^-$  et  $\text{CdCl}_4^{2-}$ ). Pour une salinité faible, l'espèce  $\text{CdCl}^+$  devient majoritaire dans le milieu alors qu'en milieu marin, l'espèce  $\text{CdCl}_2$  est majoritairement présente.

On rencontre le cadmium sous la forme colloïdale (de 450 à 1 nm) lorsqu'il se fixe à des oxydes de fer, des hydroxydes, des carbonates, des argiles ou de la matière organique colloïdale.

Il se trouve sous la forme particulaire ( $> 0,45 \mu\text{m}$ ) par intégration dans la structure cristalline des minéraux détritiques (bruit de fond géochimique), par liaison à une fraction organique (carbonates, restes d'organismes, pelotes fécales), par précipitation avec différentes fractions minérales (carbonates, phosphates, oxydes et hydroxydes de fer ou de manganèse, sulfures) et par adsorption sur des phases de différentes natures (argiles, matières organiques, oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse).

Les concentrations naturelles du cadmium dans les rivières et les mers atteignent l'ordre de microgramme par litre. Ce taux normal de cadmium dans l'eau peut aller jusqu'à  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  selon le JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives : comité mixte FAO/OMS d'experts des additives alimentaires) [34].



Le cadmium est accumulé dans les sols, par l'emploi des engrais super phosphatés qui favorise son passage dans les végétaux et dans les eaux. Les rapports indiquent que les concentrations de Cd dans les sols non contaminés varient de 0,01 à 5 mg.kg<sup>-1</sup> de sol [35]; toutefois, les engrais produits à partir de minerais de phosphate constituent une source importante de pollution par ce métal [36]. En outre, l'élimination inadéquate de déchets contenant du cadmium a augmenté ses émissions dans des zones peuplées dans le monde [37].

À travers les dépôts atmosphériques (secs ou humides), les applications en agriculture, les déchets solides ou encore les boues provenant des stations d'épuration, le cuivre arrive en majeure partie dans le sol. Dans ce compartiment, la plus grande partie du cuivre est fortement adsorbée et demeure dans les centimètres supérieurs du sol [38]. La nature du sol (pH, composition chimique et granulométrie) conditionne de façon importante son transfert vers le milieu aquatique. Le lessivage et l'érosion des sols, mais aussi les rejets ponctuels et diffus sont à l'origine de la présence du cuivre dans l'eau.

Dans le milieu aquatique, le cuivre peut être présent sous différentes formes (ions libres hydratés, complexé par des ligands inorganiques (e.g. OH<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>), complexé par des ligands organiques (e.g. urée, acides aminés, composés humiques et fulviques), adsorbé sur des colloïdes inorganiques et organiques, précipité, adsorbé sur des particules organiques en suspension, inclus dans la matrice de particules minérales [20].

Dans les eaux continentales, les concentrations du cuivre dissous sont généralement comprises entre 0,2 et 30 µg L<sup>-1</sup>. Les concentrations moyennes sont comprises entre 3 et 5 µg L<sup>-1</sup> [39]. La concentration moyenne mondiale dans les rivières a été estimée à 1,5 µg L<sup>-1</sup>[40].

Des concentrations nettement plus faibles et de l'ordre de 0,2 µg L<sup>-1</sup> en moyenne, sont observées en milieu océanique [41].

Dans les sédiments d'eau douce, les concentrations varient de 16 à 5000 mg kg<sup>-1</sup>. Dans les sédiments marins, la teneur en cuivre varie de 2 à 740 mg kg<sup>-1</sup> [42].

Il est rapporté dans quelques travaux que si la concentration moyenne en cuivre dans les eaux de rivières non polluées est de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , la concentration de celles qui sont polluées varie entre 30 et  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ [43].

Le zinc est indispensable au métabolisme des êtres vivants (oligo-éléments); en particulier comme co-enzyme. Il existe dans les eaux sous diverses formes : ion hydraté  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})^{2+}_n]$ , zinc complexé par les ligands organiques (acides humiques et fulviques) et zinc adsorbé sur de la matière solide.

#### 1.4. Effets de la pollution métallique sur les organismes aquatiques

Les métaux ont des effets divers sur les organismes aquatiques en fonction du métal et de l'organisme considéré.

Le cadmium, contrairement à de nombreux métaux (Cu, Zn, Fe, Co...) n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas être biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants. Il arrive parfois que le cadmium remplace le zinc dans des systèmes enzymatiques carencés en zinc chez les planctons. Dans les milieux aquatiques, le cadmium est transféré aux sédiments et est absorbé par les organismes évoluant dans et sur les vases. À de très fortes concentrations comprises entre 1 et  $10 \text{mg L}^{-1}$ , soit 20.000 à 200.000 fois supérieures à celles normalement rencontrées dans le milieu marin côtier, il provoque à court terme la mort des individus expérimentalement exposés [33]. Le cadmium ne présente aucune toxicité aigue pour les organismes aquatiques marins à des doses susceptibles d'être rencontrées dans le milieu. Au niveau subléthal, des concentrations de  $0,05$  à  $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ , il n'existe pas d'intoxication en tant que tel. Cependant, il peut avoir un dysfonctionnement physiologique tel que des anomalies dans le développement embryonnaire et larvaire de certaines espèces, apparition de stress inhibant la croissance [44].

L'effet toxique du cadmium sur les plantes aquatiques est remarquable par le ralentissement de leur croissance ou par un brunissement des feuilles qui se manifeste par une disparition totale de la flore aquatique. Cette mortalité est fonction de la concentration de cadmium se trouvant dans le milieu aquatique des effluents.

Le cuivre présente, comme d'autres métaux (Fe, Al, Zn), la particularité d'être à la fois essentiel et toxique au-dessus d'une certaine concentration. Son caractère essentiel est lié à son implication dans au moins 12 protéines importantes. Il joue en particulier un rôle important dans l'utilisation du fer pour la formation de l'hémoglobine. À titre d'exemple, la plupart des crustacés et des mollusques possèdent une protéine, l'hémocyanine, qui contient du cuivre et représente leur principal transporteur d'oxygène. Dans le cas des végétaux, le cuivre entre dans la composition de plusieurs enzymes qui interviennent dans le métabolisme des sucres, de l'azote et de la paroi cellulaire [45].

Les effets néfastes du cuivre sur les organismes vivants se traduisent généralement par des modifications des paramètres biochimiques et des fonctions physiologiques. Des effets toxiques peuvent être observés à partir de concentrations ne dépassant pas 1 à 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  [39]. La concentration pour laquelle aucun effet n'est observé (PNEC. Predicted No Effect Concentration) a été récemment évaluée à 1,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  [46].

Les travaux réalisés montrent que dans les milieux aquatiques, le phytoplancton ainsi que les invertébrés et les végétaux peuvent faire preuve d'une certaine tolérance au cuivre. Il faut alors prendre en considération les importantes variations de sensibilités spécifiques à chaque espèce, sachant que la tolérance au cuivre reste principalement liée à sa biodisponibilité dans le milieu. Le zinc comme le cuivre, est un métal essentiel, nécessaire, à la vie d'un grand nombre d'organismes, en quantité généralement faible. Sa toxicité vis-à-vis des organismes aquatiques est relativement faible. Cependant, le zinc ionique est facilement absorbé par les racines et pénètre dans les feuilles de plusieurs plantes, en affectant la croissance, l'absorption de nutriments et l'activité photosynthétique.

### 1.5. Les métaux lourds et les plantes des sites contaminés

Les plantes absorbent les éléments essentiels et non essentiels à partir des sols ou des eaux. La quantité d'éléments absorbée varie entre et au sein des espèces [47,48]. Des recherches ont montré que certaines plantes peuvent accumuler des métaux toxiques à fortes concentrations [49]. Ces plantes caractérisées par leur pouvoir d'ajuster les effets toxiques d'un polluant sont capables de vivre dans des sites contaminés par des métaux lourds/métalloïdes et constituent, ainsi, un bon candidat pour la phytoremédiation. En effet, les plantes accumulatrices de fortes concentrations en métaux dans leurs tissus sont dites hyperaccumulatrices. Ce terme a été utilisé pour définir les plantes contenant dans leurs feuilles sèches des quantités supérieures à  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de nickel [50]. Les plantes qui accumulent, dans leurs tissus, des quantités supérieures à  $100 \text{ mg Cd}\cdot\text{kg}^{-1}$  (0.01%) ou supérieures à  $500 \text{ mg Cr}\cdot\text{kg}^{-1}$  (0.05%) peuvent être considérées comme des hyper-accumulatrices [51].

En plus de ce pouvoir potentiel d'accumulation des polluants, en particulier des métaux lourds, les changements susceptibles de se produire au niveau de la plante offrent d'autres domaines d'utilisations de ces êtres vivants. En effet, l'utilisation d'organismes vivants, en parallèle des analyses physico-chimiques, dans l'évaluation de l'état d'un milieu a pris naissance au début du XX siècle [7]. Ces organismes, considérés comme des bio-indicateurs (définis comme des espèces ou des groupes d'espèces, dont la présence et/ou l'absence, ainsi que l'abondance reflètent la qualité d'un milieu, permettent la détermination avec précision l'impact et la progression de l'action anthropique sur la vitalité des biocénoses [53,54]. Parmi ces plantes aquatiques, les lentilles d'eau ont fait l'objet de plusieurs programmes de recherches. L'utilisation de ces plantes comme bio-indicateurs, constitue un outil potentiel, dans la biosurveillance de la qualité des écosystèmes aquatiques (biomonitoring des métaux lourds).

L'importance réservée à l'utilisation de ces espèces aquatiques a permis le développement de plusieurs biomarqueurs (définis comme tout changement, observable et/ou mesurable aux niveaux cellulaires, moléculaires, biochimiques, induit par l'exposition d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant) [6].

Ces biomarqueurs, indépendamment de leur type (biomarqueurs d'exposition, de stress, d'altération), offrent des informations plus complètes sur l'état sanitaire des organismes et constituent des signaux rapides et précoces pour des stress particuliers ou généraux [55-57]. Certaines études se sont orientées vers l'identification de biomarqueurs de stress. Les plantes aquatiques, totalement ou partiellement submergées, ont été étudiées principalement dans des écosystèmes lagunaires, sous des stress d'origines diverses (lumière, température, hydrique, salin, les herbicides, les métaux, les contaminants organiques).

Les principaux marqueurs testés sont " les réponses mesurables" qui se produisent dans les activités photosynthétiques, les processus enzymatiques de nutrition, synthèse de métabolite secondaire, stress oxydatif et/ou mécanismes de détoxification [58].

#### 1.5.2. Toxicité des métaux lourds vis-à-vis des plantes

Les ions métalliques peuvent être toxiques en activant les formes réduites de l'oxygène pour aboutir à la formation d'espèces radicalaires. Ces dernières réagissant, avec les molécules essentielles du vivant, telles que les acides nucléiques, les protéines ou les lipides et engendrent des dégâts cellulaires comme des mutations, des dysfonctionnements enzymatiques ou la peroxydation des lipides. Un certain nombre de réactions biochimiques se produisent dans les plantes stressées par les métaux lourds/métalloïdes [59-62]. La plupart de ces réactions sont produites par le déplacement des centres cationiques de la protéine ou de l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (Figure 1.2).

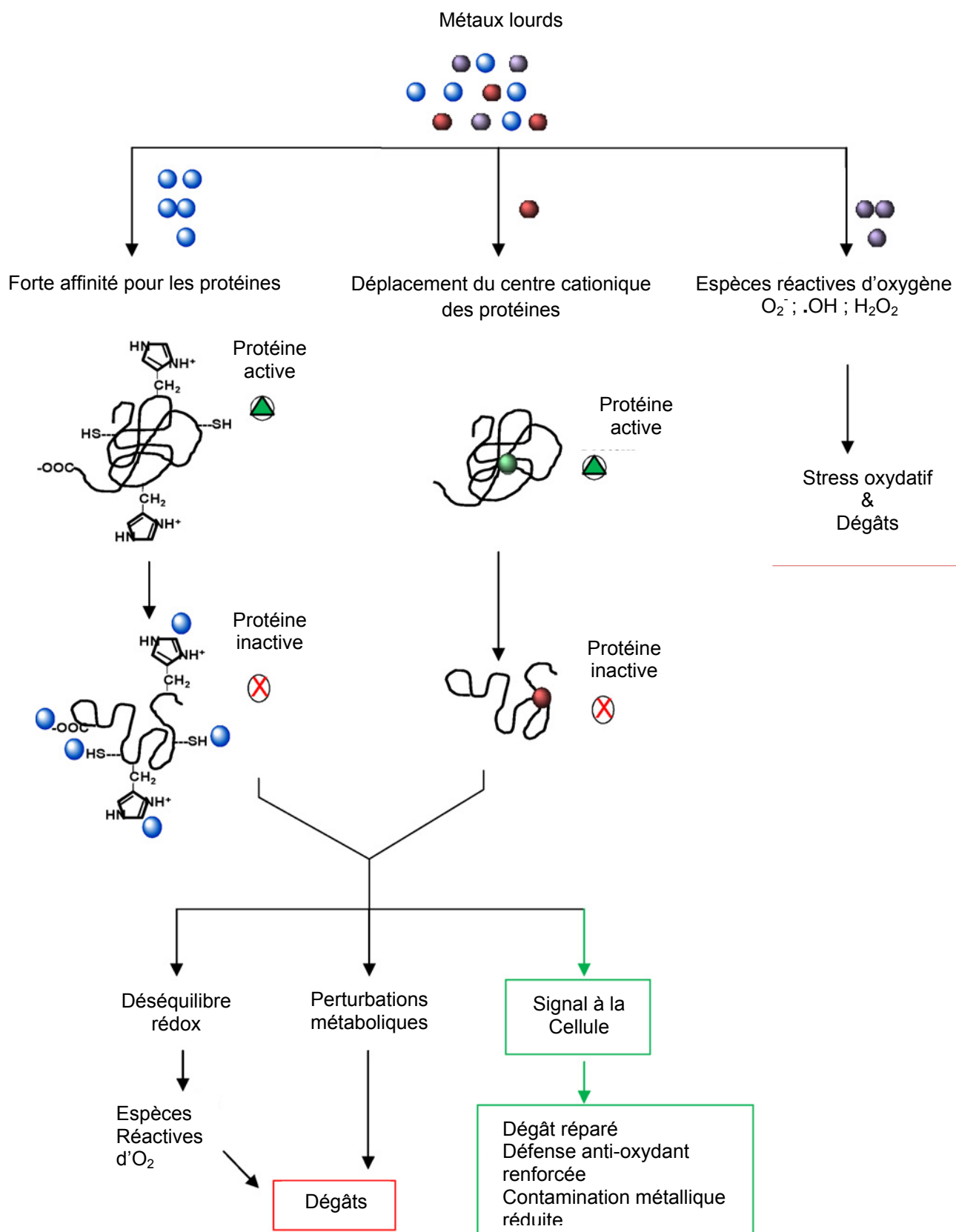


Figure 1.2. Toxicité des métaux lourds dans les plantes [76].

Plusieurs métaux, connus par leurs rôles biologiques et comme éléments indispensables ; en excès, ils deviennent toxiques en facilitant la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) [63].

Les métaux promoteurs de stress tels que le cuivre et autres éléments de transition produisent directement les ROS en participant dans les conversions des oxydants relativement stables en radicaux [63,64]. Les ROS générées par les métaux conduisent à la dégradation des lipides membranaires et des chloroplastes [65-67]. D'autre part, le cadmium, métal fortement toxique et qui n'est pas redox actif, induit une augmentation de la production des ROS : indirectement, en remplaçant un métal essentiel en tant que co-facteur au niveau d'un site actif d'une enzyme, ou par dégradation de glutathion [68,69].

Les plantes, exposées à des concentrations élevées en métaux lourds, manifestent généralement des symptômes observables (chlorose, petite taille, forme recroquevillée, non séparation des frondes) qui reflètent l'intensité et la diversité des perturbations engendrées par ces contaminants sur le fonctionnement cellulaire. L'apparition de la chlorose après une contamination par le cuivre et/ou le cadmium a été reportée chez différentes espèces aquatiques comme par exemple les plantes vasculaires à racines (*Eichhornia crassipes* et *Hydrilla verticillata*) [70], les algues (*Chlorella pyrenoidosa* et *Scenedesmus acutus*) [71] ou encore au sein du genre de *Lemna* [72]. Ce phénomène de chlorose est un symptôme qui traduit la dégradation des pigments et des membranes consécutives à un stress oxydant [73]. En plus des chloroses, d'autres effets et symptômes, comme l'inhibition de la croissance et la formation d'individus de petite taille avec des formes recroquevillées, suggèrent des problèmes de division et/ou d'élongation cellulaire. L'inhibition de la croissance a souvent été observée en présence de métaux lourds tels que le cuivre, le cadmium, le plomb [74]. Le cuivre est le métal modèle dans le blocage de l'élongation dû au stress oxydant généré par ce dernier. Les dommages oxydatifs subis au niveau du plasmalemme peuvent également perturber les processus de croissance. Ainsi la dégradation des membranes plasmiques peut entraîner une perturbation des canaux ioniques potassiques, des transporteurs plasma-lemmiques et ATP-ases avec pour conséquence des changements importants de l'homéostasie cellulaire [75]. L'illustration de l'impact des métaux lourds sur les plantes est schématisée par la Figure 1.2

## CHAPITRE II

### LES LENTILLES D'EAU, L'ÉCOTOXICOLOGIE ET LA PHYTOREMÉDIATION

#### 2.1. Introduction

Les lentilles d'eau, « lenticules », sont des plantes aquatiques flottantes, forment souvent une couche verte à la surface des eaux. Les Lemna montrent une aire de distribution géographique très étendue puisqu'on les retrouve sur tout le globe du fait de leur capacité de s'adapter à une très large gamme de conditions trophiques [77,78]. Elles sont trouvées aux cinq continents. Les milieux accueillant ces plantes sont variés. Il s'agit notamment de lacs, d'étangs, de marais, de lagunes [79]. Elles appartiennent à la famille des Lemnaceae et notamment aux genres : *Lemna* (*L. minor*; *L. gibba* et *L. Trisulca*); *Spirodela* (*Spirodela polyrhiza*) et *Wolffia* (*Wolffia arrhiza*). Elles se développent aux températures de l'eau entre 6 et 33°C, ils ont des dispositifs structuraux simplifiés. Une feuille de lenticule est plate et ovoïde encore appelée fronde. Beaucoup d'espèces de lentilles ont des racines qui fonctionnent comme un organe de stabilité et qui tendent à se rallonger lorsque des aliments minéraux dans l'eau sont épuisés.

La lentille d'eau douce ou « lentille bossue » ou encore « lentille d'eau gibbeuse » est une plante se propageant principalement par voie végétative ou par bourgeonnement des petites feuilles (frondes), ovales et arrondies (2 à 5 mm de longueur), de couleur verte à brun-rougeâtre, réunies par 2, 3 ou 4 convexes au-dessous (comme gonflées). Son habitat est constitué des étangs d'eaux douces et marais. Elle se développe également dans les marais légèrement saumâtres. Elle est rencontrée souvent associée à d'autres espèces de lentilles. Dans certaines conditions, en particulier en hiver, et au printemps les frondes de *L. gibba* ne développent pas de gibbosité importante à la face inférieure et restent plates, elles peuvent être confondues avec *L. minor*.

*L. gibba* est une espèce relativement thermophile, elle vit dans les eaux stagnantes ou faiblement courantes. Aussi, elle est connue pour sa tolérance importante aux sels et à la pollution des eaux [80].



Cet hydrophile libre qui flotte à racines plongeant dans l'eau est confiné aux eaux eutrophiques à pH neutre ou basique. Cette lentille a été localisée dans plusieurs régions en Algérie : à l'est au niveau du lac Tanga situé à El Kala (Wilaya de Annaba) ; Jardin d'essais (Alger), Oueds de Chiffa et Beni Salah (Wilaya de Blida) ; à l'ouest, aux wilayas de Tiaret et Tlemcen. *L. minor* est une monocotylédone appartenant à la famille des Lemnacées (taxonomie et morphologie rapportée par Hillman [81]). Cette dernière fait partie de l'ordre des Arales et du phylum des Pipérales [82]. Il s'agit d'une plante vasculaire flottante de petite taille qui se présente sous la forme de frondes (cladodes) très vertes de 2 à 5 mm de diamètre. Les cladodes sont réunies par des pédicelles souvent en groupe de 2,3 ou 4 (Figure 2.1.a). Lorsqu'un plant mère arrive à un stade de 4 frondes, une scission des pédicelles se produit et va donner naissance à 2 individus filles composés de 2 frondes chacun. Les frondes de forme ovale sont assez épaisses (plusieurs assises cellulaires), elles présentent deux faces planes et une seule longue racine pivot sur leur face inférieure. En Algérie, *L. minor* est une espèce très commune que l'on rencontre à la surface des eaux calmes, notamment les étangs, les mares, les fossés. Une des caractéristiques de la famille des Lemnacées est d'avoir une reproduction végétative très rapide, avec un temps de doublement du nombre d'individus de 1,3 à 2,8 jours pour *L. minor* [83].



Figure 2.1. Lentilles d'eau : (a) *L. minor* ; (b) *L. gibba*

## 2.2. Essais écotoxicologiques basés sur *Lemna*

Les tests écotoxicologiques en laboratoire (bioessais ou biotests) ont fait l'objet d'un développement et d'une standardisation conséquente afin de fournir des outils adaptés à l'évaluation des dangers des substances dans la démarche d'évaluation des risques. L'objet de tels essais est la mise en évidence d'effets toxiques sur des populations représentatives des écosystèmes et appartenant à des niveaux trophiques différents. Dans le cas des systèmes aquatiques, sont évalués les effets sur des bactéries, des producteurs primaires (algues), des consommateurs primaires (micro-crustacés) et consommateurs secondaires (poissons). Les caractéristiques de *L. minor* (croissance rapide, petite taille, structure simple, facilité de culture) associées à un faible coût de la réalisation de tests font de cet organisme un modèle végétale très utilisé pour évaluer la phytotoxicité de divers contaminants du milieu aquatique comme les métaux [84-87] ; les composés organiques [88]-90] ; les produits phytosanitaires [91-96] ; les effluents industriels complexes [97], les boues de stations et les déchets de combustion [98,99], et les surfactants [100].

D'autres espèces appartenant au même genre sont utilisées dans les études de toxicologie de l'environnement comme *L. gibba*, *L. valdiviana*, *L. polyrhiza*, *L. perpusilla*, *L. paucicostata* [90], mais *L. minor* demeure la plus fréquemment employée [101]. Le test « *Lemna* » fait l'objet de plusieurs normes qui codifient les conditions de culture, la durée des tests et les paramètres d'évaluation de la toxicité [102-105].

### 2.2.1. Conditions de réalisation de tests

D'une manière générale, les lentilles, prélevées à partir d'une culture mère, sont réparties dans les différentes unités expérimentales contenant un milieu nutritif enrichi en nutriments auquel le toxique est ajouté à diverses concentrations. De nombreux milieux de culture ont été proposés, dérivant pour la plupart du milieu de Hoagland [70]. L'article de Wang [90] peut être consulté pour une revue plus complète, bien que non exhaustive, de ces milieux. En parallèle, doivent être réalisés des témoins négatifs, dépourvus de contaminant, afin de pouvoir évaluer l'effet de la substance sur l'activité normale du végétal.

Certains auteurs [83,104] préconisent également la réalisation de témoins positifs bien que ces derniers soient peu fréquemment utilisés. Les tests les plus considérés sont réalisés sur une durée de 04 jours (toxicité aiguë) ou 07 jours (toxicité subléthale « chronique »), en illumination continue (1600 à 6700 Lux) et à une température variant de 23 à 28°C [70]. Bien que certains travaux aient été réalisés dans des conditions semi-statiques, c'est-à-dire avec renouvellement des milieux [88, 89,106], la plupart des tests rapportés dans la littérature sont effectués en conditions statiques. Ces dernières s'appliquent bien à des tests rapides et routiniers (« screening ») avec des molécules organiques et des métaux. En revanche, des chercheurs préconisent de travailler en conditions semi-statiques (renouvellement journalier) lorsque l'on travaille avec des molécules biodégradables ou volatiles [90]. Pour les effluents ces mêmes conditions sont recommandées par l'APHA [104].

### 2.2.2. Biomarqueurs et analyse de la phytotoxicité

Le paramètre le plus fréquemment retenu pour évaluer la phytotoxicité est l'inhibition de la croissance estimée par le nombre de frondes, compté quotidiennement sur toute la durée du test [9,10, 85, 92,108].

Néanmoins, d'autres indicateurs de phytotoxicité sont également utilisés. Parmi ceux-ci, sont cités la biomasse fraîche ou sèche [92], la teneur en chlorophylle [94,108], le diamètre des frondes et la longueur des racines [90] ou encore diverses activités physiologiques comme la production d'oxygène [109] ou biochimiques telles que la teneur en ATP [110], l'incorporation du <sup>14</sup>C [112], la teneur en proline [113] ou encore l'activité de la catalase [113-115] et de la superoxyde dismutase [116].

Dans ce cadre, il est intéressant de noter les différents symptômes qui reflètent l'état général des lentilles comme les chloroses (perte de pigments), les nécroses, le nombre des colonies, la perte des racines, la perte de la flottabilité ou encore la non séparation des frondes filles [104]. Les résultats les plus fréquemment donnés dans la littérature, tous paramètres confondus, sont les valeurs de CI et CE<sub>50</sub> (concentrations inhibitrices ou effectives 50, qui entraînent 50% d'inhibition, de réduction d'un effet mesuré). Bien que recommandées par l'APHA [104], les CE<sub>10</sub>, CE<sub>90</sub> et NOEL (la plus petite

concentration testée n'entraînent aucun effet notable), déterminables graphiquement ou par calcul, ne sont que très rarement rapportées.

### 2.2.3. Intérêt du test *Lemna*

On peut s'interroger sur la qualité des tests *Lemna* et sur leur sensibilité relative par rapport à d'autres tests végétaux. Des travaux montrent qu'il existerait une légère différence de sensibilité aux toxiques entre les 2 espèces principales *L.gibba* et *L.minor*, la première étant la moins sensible des deux [101]. La lentille d'eau est la plante vasculaire la plus fréquemment utilisée. D'autres macrophytes, comme *Elodea canadensis*, *Myriophyllum sp.* *Ceratophyllum sp.* ou *Hydrilla verticillata*, ont bien été parfois exploitées pour réaliser des tests de toxicité, mais leur utilisation demeure marginale.

La faible représentation des plantes vasculaires submergées à racine dans les études de toxicologie de l'environnement provient essentiellement de la difficulté à les cultiver et à les manipuler au laboratoire, de leur croissance lente et du quasi absence de validation des méthodes de test [70].

Lorsque la comparaison est possible, les résultats montrent que *L.minor* est d'une sensibilité intermédiaire, dans une gamme de cinq macrophytes, vis-à-vis de quatre herbicides [117]. Le faible nombre de données dont on dispose empêche cependant de pouvoir dégager une tendance générale, si elle existe.

En comparaison avec les tests d'algues, il n'apparaît pas non plus de règles bien précises et les différences de sensibilité varient en fonction des composés testés. Ainsi, certains travaux montrent que les lentilles sont moins sensibles à des résidus de combustion de charbon que *Selenastrum capricornutum* et *S. oligorrhiza* [118] ou à des composés phénoliques chlorés que *Chlorella pyrenoidesa* [119]. D'autres travaux montrent que l'atrazine est deux fois plus toxique pour *Scenedesmus subspicatus* que *L. minor* [94] alors que d'autres chercheurs rapportent une affirmation inverse avec *S. quadricauda* [117]. Le mécocrop ( herbicide) est 16 fois plus toxique pour *L. minor* que pour *S.subspicatus* [94]. Si la sensibilité de *L. minor* est la même que celle de *Chlorella vulgaris* et de *Selenastrum capricornutum* vis-à-vis de la métribuzine, l'alachlore et le métolachlore sont beaucoup plus toxiques pour ces deux algues que pour la macrophyte qui tolère cependant moins bien ces deux herbicides que *Chlamydomonas reinhardtii* [117].

De part ses caractéristiques d'espèce flottante, *L. minor* permet d'effectuer des tests de toxicité de substances hydrophobes présentes en surface telles que des hydrocarbures, des surfactants ou des tensioactifs ce qui ne répond pas aisément au test « algue ». Ce dernier trouve également ses limites lors de l'utilisation d'effluents turbides ou de composés colorés qui absorbent une partie de la lumière ; en raison de sa localisation superficielle *L. minor* n'est pas affecté par ce phénomène. Enfin, du fait de sa taille, il est possible de distinguer à l'œil nu différents symptômes qui caractérisent une détérioration de l'état sanitaire de *L. minor* ce que l'on ne peut pas évidemment faire avec les micro-algues classiquement utilisées en toxicologie. De plus, *L. minor* est une plante vasculaire, ce qui représente dans le règne végétal un niveau de complexité supérieur à celui des algues. Par conséquent, il apparaît qu'au lieu de s'exclure, ces deux types de modèles se complètent. Leur utilisation conjointe est donc fortement souhaitable pour déterminer la phytotoxicité d'un composé ou d'un effluent quelconque. Le test *Lemna* trouve ainsi parfaitement sa place au sein d'une batterie d'essais toxicologiques. Cependant, comme avec tout modèle, les résultats obtenus avec cette espèce doivent être interprétés avec prudence, notamment en ce qui concerne les extrapolations à d'autres végétaux aquatiques et plus particulièrement les plantes submergées et enracinées qui sont en contact non seulement avec la colonne d'eau mais aussi avec les sédiments potentiellement contaminés, alors que *L. minor* n'occupe que la surface.

### 2.3. Plantes aquatiques et phytoremédiation

La phytoremédiation est définie comme l'utilisation de plantes pour l'élimination de produits polluants dans les sols et les eaux, plus particulièrement les métaux lourds. Actuellement, plus de 800 espèces végétales susceptibles d'être actives par rapport à différents composés chimiques ont été référencées et reportées dans deux bases de données canadiennes (Phytorem<sup>®</sup> et Phytopet<sup>®</sup>) [120]. La phytoremédiation s'effectue de façon naturelle par les plantes survivant dans l'eau (rhizofiltration, phytostabilisation ou phytofiltration) et les sols contaminés (phytoextraction, phytodégradation, phytovolatilisation, rhizodégradation) [121-123].

Les eaux polluées, qui peuvent être traitées par phytoremédiation, comprennent, les eaux usées et les eaux usées municipales (nutriments, métaux), les eaux de ruissellement agricoles/eaux de drainage (engrais, nutriments, métaux, arsenic, sélénium, bore, pesticides organiques), les eaux usées industrielles (métaux, sélénium), des lixiviats de décharge, les eaux de drainage (métaux), les eaux souterraines (organiques, métaux) [124-127]. Certaines limitations des méthodes physico-chimiques traditionnelles (différences d'efficacité entre métaux, coût élevé pour les grands volumes à faible concentration en métal), les faibles coûts associés à la technologie de phytoremédiation ainsi que la possibilité de recyclage des résidus riches en métaux expliquent l'intérêt grandissant pour son développement [59, 128-130].

Le succès de la phytoremédiation dépend en grande partie de la plante (taux de croissance et capacité d'accumulation des concentrations élevées en métaux [131]. En effet, plusieurs travaux de recherches sur l'accumulation des métaux lourds et les possibilités d'utilisations des plantes aquatiques, telles que les lentilles d'eau « *L. minor*; *L. gibba* et *L. polyhriza* » ; *Microspora* et *Pistia stratiotes* , comme nouvelle approche d'élimination de ces polluants des eaux ont été réalisés [49,121,132-136]. La lentille d'eau *L. minor* a manifesté une bonne capacité d'accumulation de certains métaux dans certaines conditions. Un taux d'élimination de 75 à 90% du plomb après trois semaines de culture de cette lentille dans une eau contenant 5 mg L<sup>-1</sup> de ce métal a été rapporté [132].

Cette plante est capable de prélever 76 et 82% de plomb et de nickel, respectivement, selon [137]. Récemment, un taux d'élimination de 30% de cuivre par *L. minor* a été enregistré par Olette et al., [95]. Cette propriété accumulatrice des métaux lourds est derrière les propositions de la lentille d'eau *L. minor* pour la phytoremédiation des eaux contaminées par de faibles concentrations en métaux lourds comme le cuivre et le cadmium [138]. Des travaux de recherche, sur la toxicité de l'arsenic vis-à-vis de *L. gibba*, ont mis en évidence des taux de bioaccumulation d'arsenic élevé correspondant à une réduction moyenne de sa concentration de 40% [139]. Par ailleurs, cette espèce a présenté une forte tolérance à l'arsenic dans de la gamme comprise entre 10 et 500 µg L<sup>-1</sup>.

Selon Robinson et al., [140], les plantes tolérant des concentrations élevées d'éléments toxiques accumulent significativement les éléments non essentiels. L'évaluation comparée de la tolérance et de l'accumulation du cuivre et du chrome, par deux espèces de lentilles d'eau *L. minor* et *L. gibba*, par, a montré que chez *L. gibba* une tolérance nettement supérieure aux effets toxiques des deux métaux expérimentés [80]. Le chrome est moins toxique que le cuivre et s'accumule à des taux supérieurs à ceux du cuivre dans les tissus des plantes. Pour les deux métaux, l'accumulation est plus importante chez *L. minor*. Cependant, *L. gibba* a été plus indiquée pour des applications en phytoremédiation que *L. minor*, vu sa tolérance et sa productivité en biomasse. Les potentialités de ces deux espèces pour des applications de ce type se justifient par des taux d'accumulation élevés, spécialement pour le chrome où ils dépassent largement les 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  de poids sec. En effet, les concentrations des plantes en chrome obtenues dans ce travail atteignent 2140  $\mu\text{g g}^{-1}$  chez *L. minor* et 1710  $\mu\text{g g}^{-1}$  chez *L. gibba*. Ces performances montrent un potentiel fort intéressant en comparaison à d'autres macrophytes comme la jacinthe d'eau par exemple [141].

## CHAPITRE 03

### EFFETS DU CUIVRE, CADMIUM ET ZINC SUR LA TENEUR EN PROTÉINES ET EN PIGMENTS DE LA LENTILLE D'EAU ET EVALUATION DE LA CAPACITE DE L'ABSORPTION DE L'AZOTE ET DU PHOSPHORE

#### 3.1. Introduction

La pollution des écosystèmes aquatiques par les métaux lourds a pris des proportions graves en raison de leur toxicité et de leur propriété d'accumulation [142]. Ce genre de contaminants constitue une menace réelle pour la santé humaine dans de nombreuses régions du monde [143]. Dans plusieurs régions du nord de l'Algérie, la contamination par les métaux lourds en particulier le cuivre et le zinc est due aux activités anthropiques (agriculture et métallurgie) [3].

L'utilisation des plantes aquatiques telles que la lentille d'eau, peut être à la fois un outil très performant de diagnostic de ce genre de pollution et un moyen pour assainir le système aquatique. Cette technique de phytoremédiation est d'un intérêt considérable en tant qu'une branche de l'éco-technologie.

Les objectifs de cette partie de l'étude consistent à évaluer, dans une première étape, la toxicité du cuivre, du cadmium et du zinc vis-à-vis de deux espèces aquatiques (*L. gibba* et *L. minor*), par la mesure de leur impact sur la biomasse, les pigments et la quantité de protéines.

L'azote et le phosphore, sont deux éléments indispensables aux plantes et responsables du phénomène de l'eutrophisation. Leur assimilation par la lentille d'eau *L. gibba* en absence et en présence de ces trois métaux a été examinée dans une deuxième phase. Cette propriété d'assimilation de composés azotés et phosphatés par les plantes et les possibilités de récupération de la biomasse sont parmi les critères les plus importants pour la sélection des espèces aquatiques pouvant être exploitées en phytoremédiation.



### 3.2. Matériels et méthodes

#### 3.2.1 Échantillonnage de la plante

Les lentilles d'eau (*L. gibba* et *L. minor*) utilisées dans ce travail proviennent de trois sites :

- Le site du jardin d'essais d'El-Hama (Alger) qui est constitué d'un petit bassin récepteur des eaux de pluies (cf. Figure 3.1a).
- Le site de Ben Azouz situé à l'Est de l'Algérie et plus précisément dans la région d'El Kala, recevant des eaux non polluées.
- Le site de Beni Tamou, situé dans la wilaya de Blida, dont les eaux sont fortement polluées (cf. Figure 3. 1b).

Des colonies, désinfectées par trempage rapide dans l'éthanol (Panréac, pur) à 0,5% (v/v) suivi d'une immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5% pendant 3 min puis un rinçage par l'eau distillée stérile ont été cultivées dans un milieu nutritif minéral, puis placées sous conditions contrôlées : température =  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  ; luminosité = 4000 Lux et une photopériode de 16 h de lumière et 8 h d'obscurité.



(a) : *Lemna minor* (Jardin d'essais, Alger)



(b) : *Lemna gibba* dans la rivière de Beni-Salah (Blida)

Figure 3.1. Sites de prélèvements de la lentille d'eau

### 3.2.2. Milieu de culture

Le milieu de culture utilisé est celui de Haogland légèrement modifié dont la composition chimique en  $\text{mg L}^{-1}$  est la suivante [144]:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 118;  $\text{KNO}_3$ , 5,055;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4,932;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,68;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,307;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0,348;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,286;  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,155;  $\text{ZnSO}_4$ , 0,022;  $\text{CuSO}_4$ , 0,0079;  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,00478;  $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,00179;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,0128;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,0049.

Avant stérilisation de ce milieu en autoclave à  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 min, son pH est ajusté à  $6.5 \pm 0,1$  par ajout de la soude 0,1N.

Les réactifs utilisés pour la préparation des milieux de culture sont tous de pureté analytique reconnue (les proportions sont indiquées dans le tableau 3.1, Appendice 2). L'eau de dilution utilisée pour préparer ces derniers est une eau distillée de très bonne qualité (conductivité  $< 13 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) et de pH = 5,5.

### 3.2.3. Matériel végétal

La lentille d'eau utilisée a été prélevée d'un bac de stockage (placé sous conditions contrôlées au niveau du Laboratoire des Productions Végétales du Département des Sciences Agronomiques de l'Université Sâad Dahlab de Blida). Dix colonies de la lentille d'eau ont été cultivées dans des Erlen-Meyers de capacité de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture. Un essai témoin est prévu pour chaque test.

### 3.2.4. Concentrations en métal testées

Les milieux de cultures ont été contaminés par le cuivre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , Panréac Quimica, pureté supérieure à 98%), le cadmium ( $\text{CdCl}_2$ , Panréac Quimica, pureté supérieure à 98%) et le zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Merck, pureté supérieure à 98%) de telle façon que leurs concentrations soient comprises entre:

- $10^{-4}$  et  $1 \text{ mg L}^{-1}$  pour le cuivre.
- $10^{-4}$  et  $2 \text{ mg L}^{-1}$  pour le cadmium.
- $10^{-1}$  et  $40 \text{ mg L}^{-1}$  pour le zinc.

### 3.3. Paramètres de phytoxicité

#### 3.3.1. Inhibitions de la biomasse

Après chaque traitement, la biomasse est récupérée, séchée à l'air libre puis pesée (matière fraîche MF). Les inhibitions de la biomasse,  $I_m$  (%), induites par le cuivre, le cadmium et le zinc aux diverses concentrations sont calculées selon la formule suivante :

$$I_m (\%) = \frac{m_T - m_X}{m_T} \times 100 \quad (3.1)$$

Où  $m_T$  représente la biomasse mesurée dans le témoin et  $m_X$  la valeur du même paramètre en présence de l'un des métaux testés.

#### 3.3.2. Teneur en pigments

Tous les deux jours de culture dans les milieux sans et avec métal, les frondes de la lentille sont récupérées, essorées sur papier absorbant puis pesées. Une quantité de 300 mg est broyée puis introduites dans des tubes de 10 ml contenant 5 ml de méthanol (Panréac, 99,99 %). Ces tubes sont ensuite placés au bain- marie à 65 °C durant 20 minutes.

Après refroidissement des extraits, l'absorbance à 470 nm, 652,4 nm et 665,2 nm est lue sur un spectrophotomètre (Mini-spectrometer Shimadzu).

Les teneurs en pigments photosynthétiques (chlorophylle totale, chlorophylle a et Chlorophylle b) sont calculés par les formules de Lichtenthaler et Wellburn [145] :

$$Chla(\mu gL^{-1}) = 16,72 \times A_{665,2} - 9,16 \times A_{652,4} \quad (3.2)$$

$$Chlb(\mu gL^{-1}) = 34,09 \times A_{652,4} - 15,28 \times A_{665,2} \quad (3.3)$$

$$Chl(\mu gL^{-1}) = 24,93 \times A_{652,4} + 1,44 \times A_{665,2} \quad (3.4)$$

Où

*Chla* est la teneur en chlorophylle a,

*Chlb* est la teneur en chlorophylle b,

*Chl* est la teneur en chlorophylle totale.

$A_{665,2}$  est l'absorbance de l'extrait mesurée à 665,2 nm,

$A_{652,4}$  est l'absorbance de l'extrait mesurée à 652,4 nm,

Les concentrations finales en pigments seront exprimées en  $\mu g g^{-1}$  MF.

### 3.3.1. Teneur en Protéines [146]

La teneur en protéines a été déterminée tous les 02 jours de culture. Les frondes de la lentille sont récupérées, essorées entre deux couches de papier filtre puis pesées.

Une quantité variant entre 270 et 280 mg de matière fraîche est utilisée pour l'extraction. La masse pesée est broyée dans 5 ml de tampon phosphate de sodium (0,1 mM, pH 7,0) dans un mortier en céramique à froid. Le broyat subi une centrifugation à 4500 tr.mn<sup>-1</sup> pendant 15 mn.

L'extrait obtenu a servi à la détermination de la teneur en protéines par mesure de l'absorbance à 595 nm ( $A_{595}$ ) d'une solution contenant 3 ml de réactif de Bradford (Sigma, B6916) et 100 µl d'extrait [146]. Une gamme de 0.1 à 1.4µg.µl<sup>-1</sup> d'albumine bovine (Sigma) préparée dans du tampon phosphate de potassium (0,1 mM, pH 7) a été utilisée pour l'étalonnage. Au sein de cette gamme, une très bonne corrélation est observée entre la réponse du spectrophotomètre et la teneur en albumine bovine (Figure 3.2, Appendice 3).

### 3.4. Mesure de la capacité d'absorption du phosphore et de l'azote

Les teneurs en azote total et en phosphore ont été déterminées, dans les milieux faiblement puis fortement contaminés par le cuivre, le cadmium et le zinc. Des témoins ont servi au suivi de l'évolution de la teneur en azote et phosphore dans les échantillons sans plante et sans contaminants. Des témoins avec plante sans contamination ont servi à la détermination de l'assimilation de l'azote et du phosphore dans les conditions normales.

#### 3.4.1. Dosage de l'azote total (Méthode de Kjeldahl)

L'azote organique, des échantillons prélevés des milieux de culture, est transformé en acide minéral par une attaque acide. L'action oxydante de l'acide sulfurique concentré sur la matière organique est réalisée à chaud en présence d'un catalyseur approprié (Appendice 4). Après deux heures de minéralisation, une distillation après passage de l'ammoniac en milieu alcalin est effectuée.

Le distillat est recueilli dans une solution acide dont l'excès est titré par de l'acide sulfurique dilué. La quantité de l'azote total dans les milieux de cultures à l'instant initial et à l'instant t est déterminée selon l'équation suivante :

$$T_N (\%) = \frac{0,0014 \times V_X \times 4}{m} \times 100 \quad (3.5)$$

Où  $V$  : correspond au volume de l'acide sulfurique dilué utilisé lors de titrage

$m$  : masse de l'échantillon analysé (50 g correspondant à 50 mL)

4 : facteur de dilution de minéralisât

Le taux d'élimination de l'azote par la plante est calculé selon la formule suivante :

$$R_N(\%) = \frac{[N]_0 - [N]_t}{[N]_0} \times 100 \quad (3.6)$$

Où  $[N]_0$  représente la concentration de l'azote à l'instant initial,

$[N]_t$  représente la concentration de l'azote à l'instant  $t$ .

### 3.4.2. Dosage du phosphore

Le phosphore dans les différents échantillons est déterminé par méthode colorimétrique (ISO 6878-2004). Son principe est basé sur la réaction des phosphates  $[PO_4^{3-}]$  avec le molybdate d'ammonium en présence d'un catalyseur (le tartrate d'antimoine et de potassium) en milieu acide. Le complexe phospho-molybdique développe une coloration bleue, en présence de l'acide ascorbique, mesurable à 825 nm. Les concentrations correspondantes en phosphore sous forme de phosphate sont déterminées par extrapolation des absorbances sur la courbe d'étalonnage (Figure 3.3, Appendice 3). Le taux d'élimination du phosphore par la plante est calculé selon la formule suivante :

$$T_P(\%) = \frac{[PO_4^{3-}]_0 - [PO_4^{3-}]_t}{[PO_4^{3-}]_0} \times 100 \quad (3.7)$$

Où  $[PO_4^{3-}]_0$  représente la concentration en phosphore à l'instant initial,

$[PO_4^{3-}]_t$  représente la concentration en phosphore à l'instant  $t$ .

### 3.7. Analyse statistique

Trois expériences indépendantes ont été réalisées. Chaque concentration a fait l'objet de trois répétitions. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  écart type. L'étude statistique est réalisée par (SPSS Science Software GmbH, Germany).

Les différences significatives sont déterminées par Student's t-tests où le niveau de signification adopté est  $p < 0,05$ .

### 3.8. Résultats

#### 3.8.1. Effets sur la biomasse

La biomasse de la lentille d'eau, dans les milieux de culture sans métaux lourds, a augmenté graduellement durant la période de culture (Figure 3.4). Après 8 jours d'expérimentation, la biomasse de *L. gibba* et *L. minor*, augmente de 60 à 165 mg et de 50 à 118 mg, respectivement soit une croissance variant entre 57,62 et 63,63%.

Cette augmentation est plus rapide durant les quatre premiers jours de culture avec un taux d'augmentation moyen de 53%.

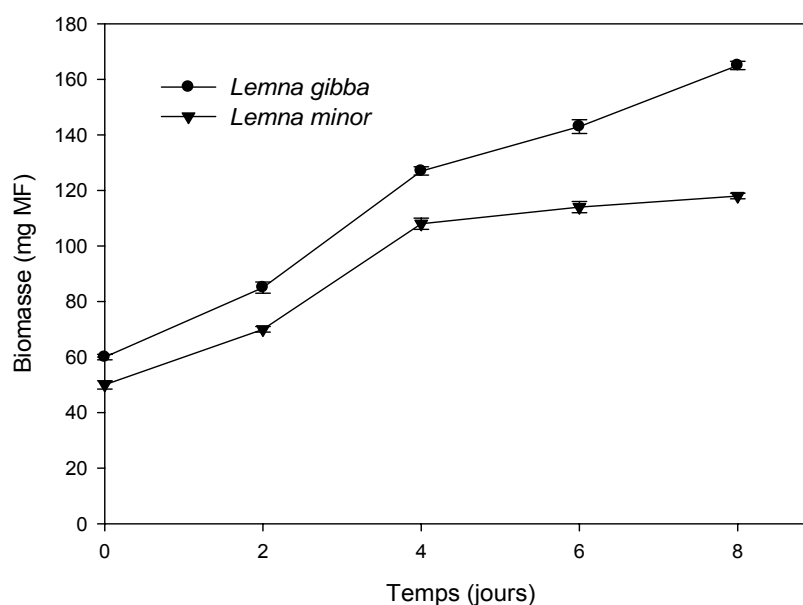


Figure 3. 4. Evolution de la biomasse dans le milieu de culture sans métaux lourds (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3).

L'exposition des deux espèces de lentille d'eau, *L. gibba* et *L. minor*, à différentes concentrations en métaux lourds, a provoqué des réductions de la biomasse (Figures 3.5 à 6).

Durant les deux premiers jours, contrairement à *L. gibba*, la biomasse de *L. minor* a été sensiblement réduite par la présence des trois contaminants.

À des concentrations supérieures à  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> en cuivre, les inhibitions enregistrées pour *L. gibba* varient entre 4,25 et 5,05 % alors ont atteint des valeurs comprises entre 8,75 et 15,78 % pour *L. minor* (Figure 3.5).

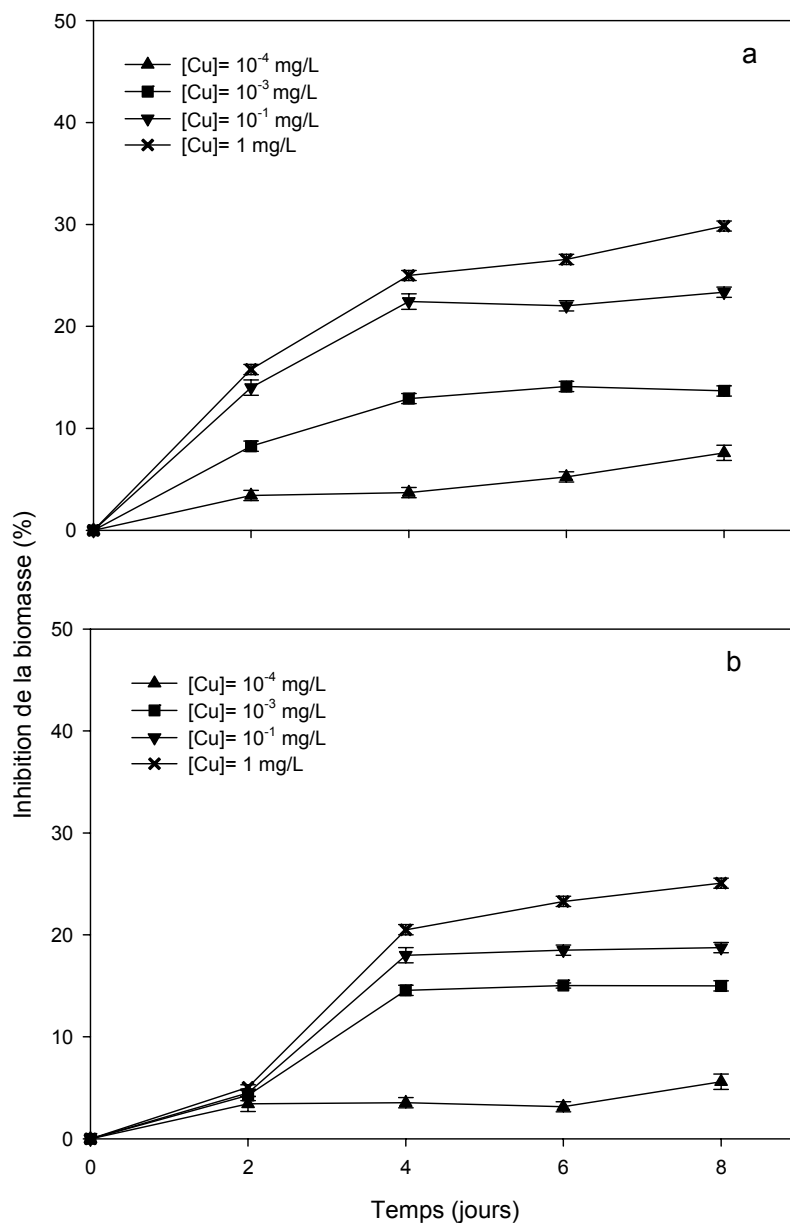


Figure 3.5. Inhibitions de la biomasse en présence du cuivre pour (a) *L. minor* et (b) *L. gibba* ; (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3).

Dans les mêmes conditions, le cadmium a montré un effet comparable sur la biomasse. Des inhibitions comprises entre 2,14 et 10% pour *L. gibba* et entre 11,17 et 14,28% pour *L. minor* sont observées (Figure 3.6).

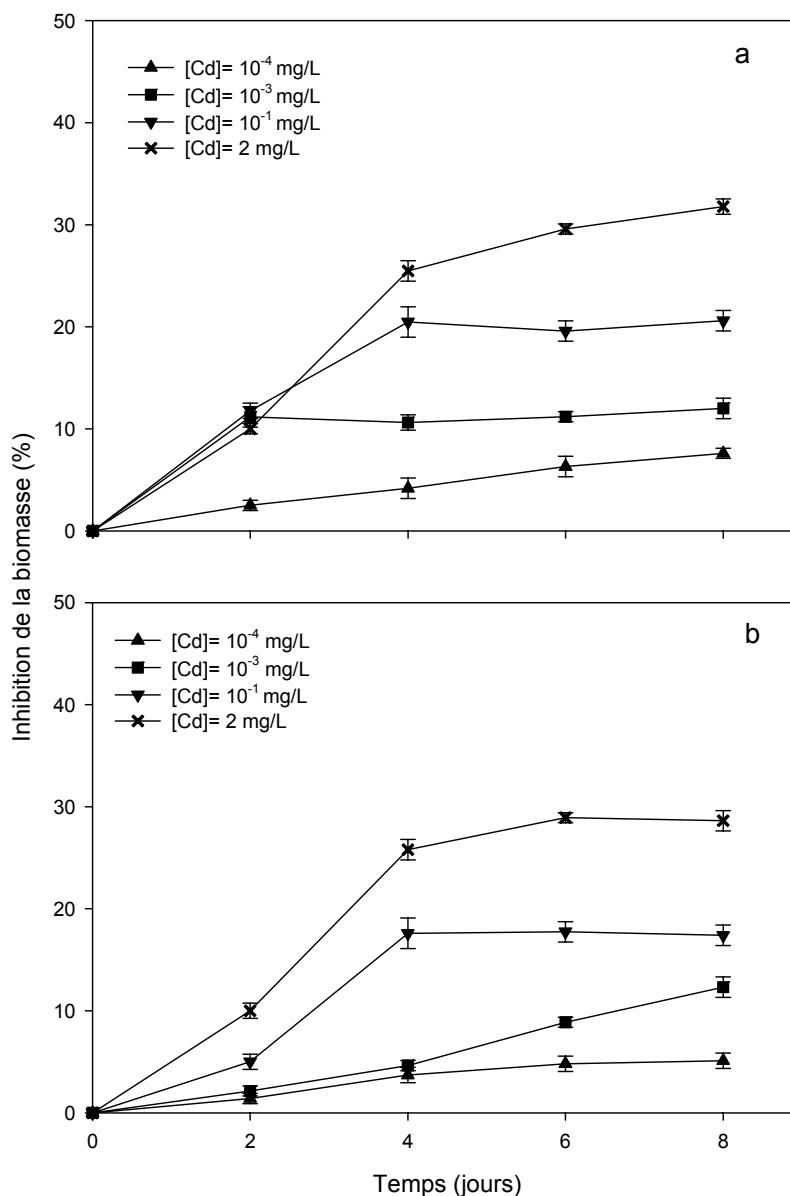


Figure 3. 6. Inhibitions de la biomasse en présence du cadmium pour (a) *L. minor* et (b) *L. gibba* ; (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3)

Contrairement aux deux premiers métaux (cuivre et cadmium), le zinc à faibles concentrations ( $\leq$  à  $10^{-1}$  mg L $^{-1}$ ) inhibe faiblement la biomasse : après 2 jours, une inhibition maximale de 3% a été enregistrée pour *L. minor* (Figure 3.7). La prolongation de la durée d'exposition se traduit par des inhibitions plus importantes avec un effet plus marqué sur la biomasse de *L. minor*. Ainsi, l'inhibition de la biomasse passe de  $2,98 \pm 0,25$  à  $21,01 \pm 1,00$  % pour *L. gibba* et de  $3,50 \pm 0,20$  à  $27,00 \pm 1,00$  % pour *L. minor* lorsque la concentration en zinc augmente de  $10^{-4}$  à  $40$  mg L $^{-1}$ .



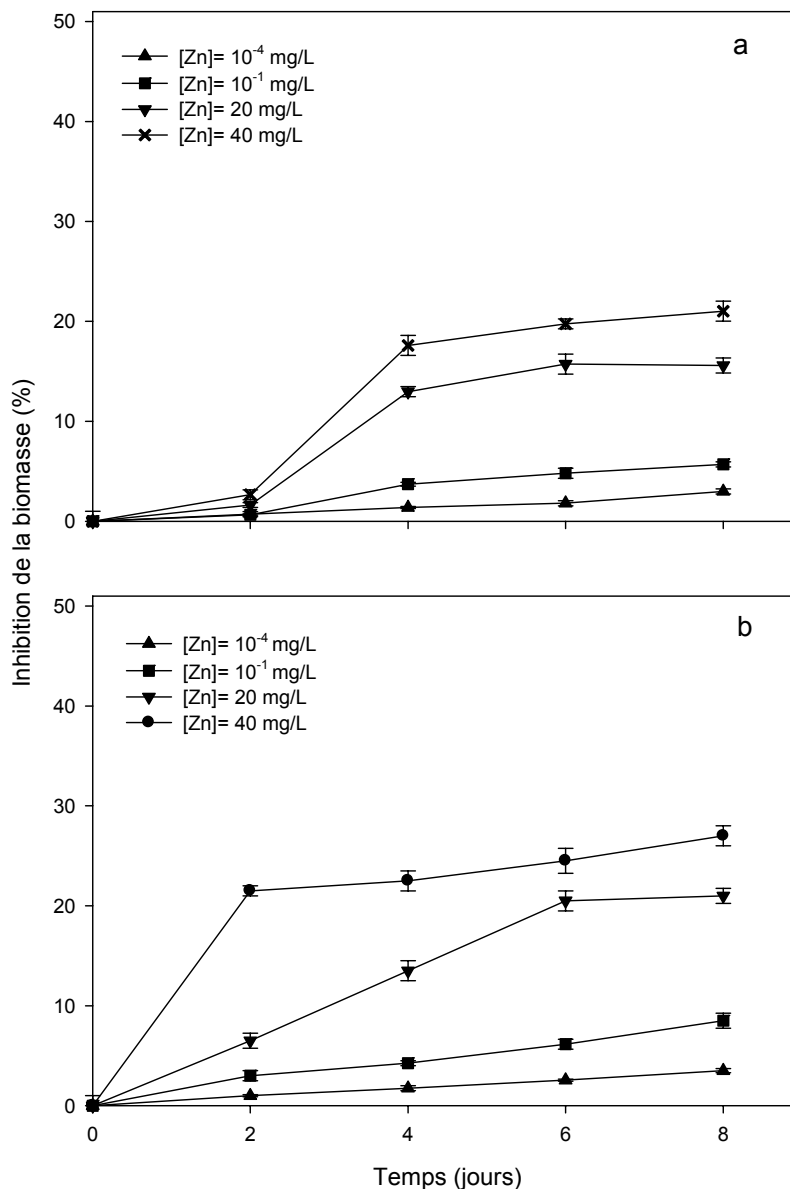


Figure 3.7. Inhibitions de la biomasse en présence du zinc pour (a) *L. minor* et (b) *L. gibba* ; (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3)

### 3.8.2. Effets sur les pigments

L'évolution des teneurs en chlorophylle totale en fonction de temps, des deux espèces de la lentille d'eau, est représentée par les Figures 3.8 à 10. Ces teneurs, dans le milieu de culture sans contaminants (témoin), sont de  $1003 \pm 50 \mu\text{g g}^{-1}$  MF pour *L. gibba* et de  $996 \pm 110 \mu\text{g g}^{-1}$  MF pour *L. minor*.

Dans les milieux contaminés, une diminution de la chlorophylle est observée dès les deux premiers jours de la culture et qui devient significative à forte concentration en métal.

En présence du cuivre et lorsque sa concentration passe de  $10^{-4}$  à  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , la teneur en chlorophylle totale de *L. gibba* décroît pour atteindre des valeurs de  $944,32 \pm 30,50 \mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$  et de  $686,35 \pm 60,50 \mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$  respectivement, soient des réductions de 5,85 et 31,57%, respectivement. Les mêmes taux de diminution sont enregistrés pour *L. minor*. Cette diminution devient plus importante, à la fin de la durée de traitement, avec des réductions comprises entre 11,2 et 50,14% pour *L. gibba* et entre 15,21 et 59,69% pour *L. minor*. Les inhibitions de la chlorophylle induites par des concentrations supérieures à  $10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  en cuivre sont plus élevées pour *L. minor*. L'écart est significatif ( $p < 0,005$ ) durant les deux premiers jours. Les frondes cultivées en présence de  $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$  et  $1 \text{ mg L}^{-1}$  sont de petite taille, particulièrement chez *L. minor* et fortement chlorosées.

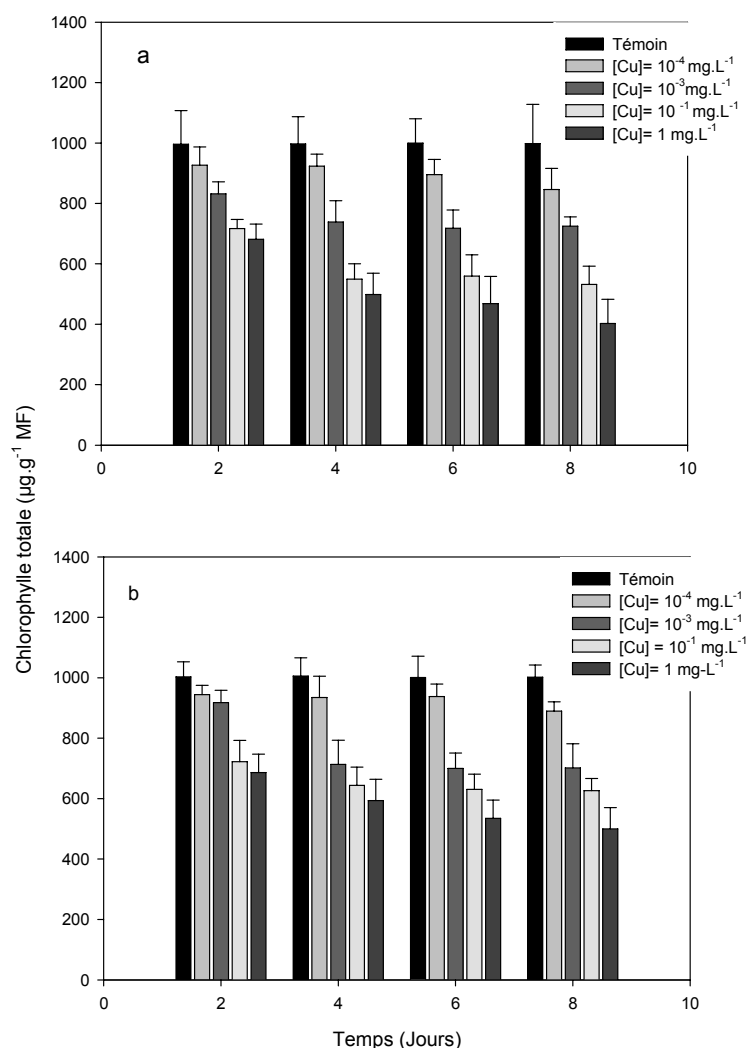


Figure 3.8. Teneurs en chlorophylle totale en présence du cuivre, (a) *L. minor* et (b) *L. gibba*; (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types,  $n=3$ ).

Après deux jours, lorsque la concentration en cadmium passe de  $10^{-4}$  à  $2 \text{ mg L}^{-1}$ , la teneur en chlorophylle totale de *L. gibba* décroît pour atteindre des valeurs de  $774,91 \pm 70,25 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} \text{ MF}$  et de  $716,44 \pm 40,50 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} \text{ MF}$  respectivement, soient des réductions de 2,8 et 28,57%, respectivement. Dans les mêmes conditions, les taux d'inhibition de la chlorophylle totale pour *L. minor* sont de 5,0 et 35%. Cette diminution devient plus importante, à la fin de la durée de traitement, avec des réductions comprises entre 10,20 et 57,25% pour *L. gibba* et entre 15,20 et 63,54%. À Faibles concentrations ( $10^{-4}$  à  $10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$ ), l'effet inhibiteur de la chlorophylle par le cuivre est légèrement supérieur à celui du cadmium. Les frondes cultivées en présence de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  ont manifesté une forte chlorose avec une taille petite.

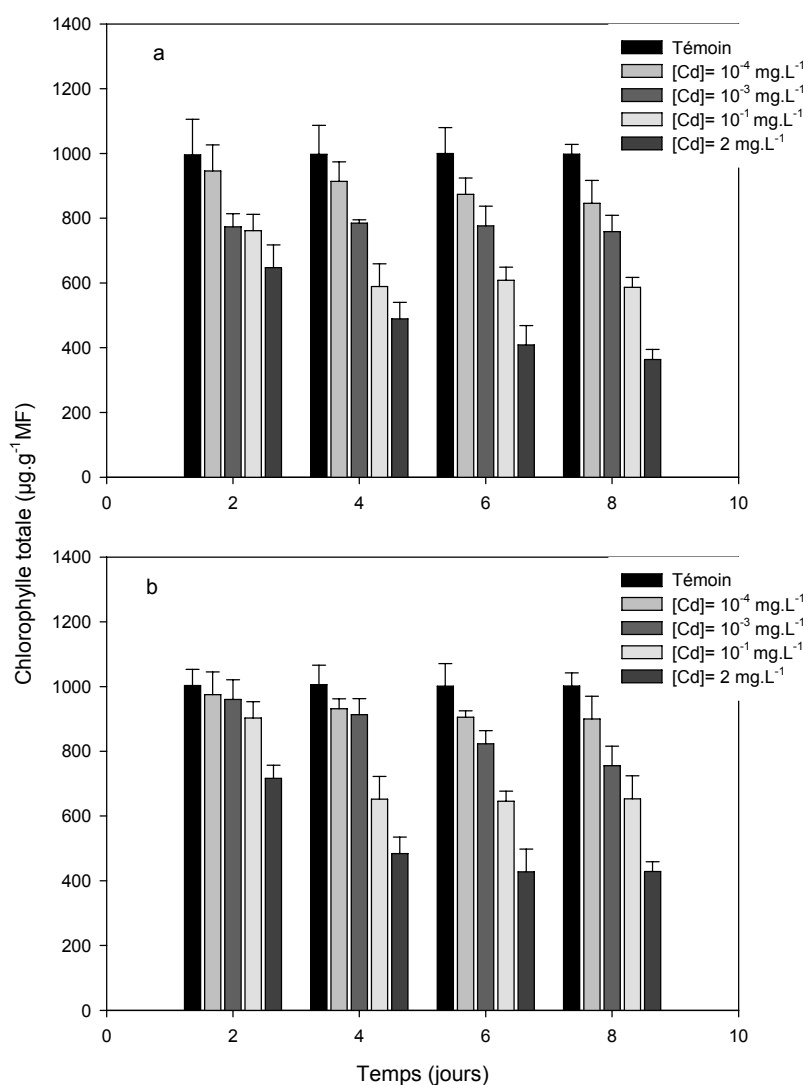


Figure 3.9. Teneurs en chlorophylle totale en présence du cadmium, (a) *L. minor* et (b) *L. gibba* ;(valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3).

Les teneurs en chlorophylle totale en présence des concentrations inférieures à  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> en zinc, diminuent faiblement tout au long de la durée de traitement. En effet, après huit jours, des valeurs de  $831,66 \pm 40,50$   $\mu\text{g g}^{-1}$  MF pour *L. gibba* et de  $884,33 \pm 40,50$   $\mu\text{g g}^{-1}$  MF pour *L. minor*, en réponse à  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> de zinc soient des inhibitions de 11,39 et de 17% respectivement. À fortes concentrations en zinc (20 et 40 mg L<sup>-1</sup>) la réduction des teneurs en chlorophylle devient importante à partir du 4<sup>ème</sup> jour de culture pour *L. gibba*. Il est à signaler que les frondes cultivées dans les milieux de culture contaminés par le zinc, sont en très bon état et ne présentent aucun symptôme apparent de stress.

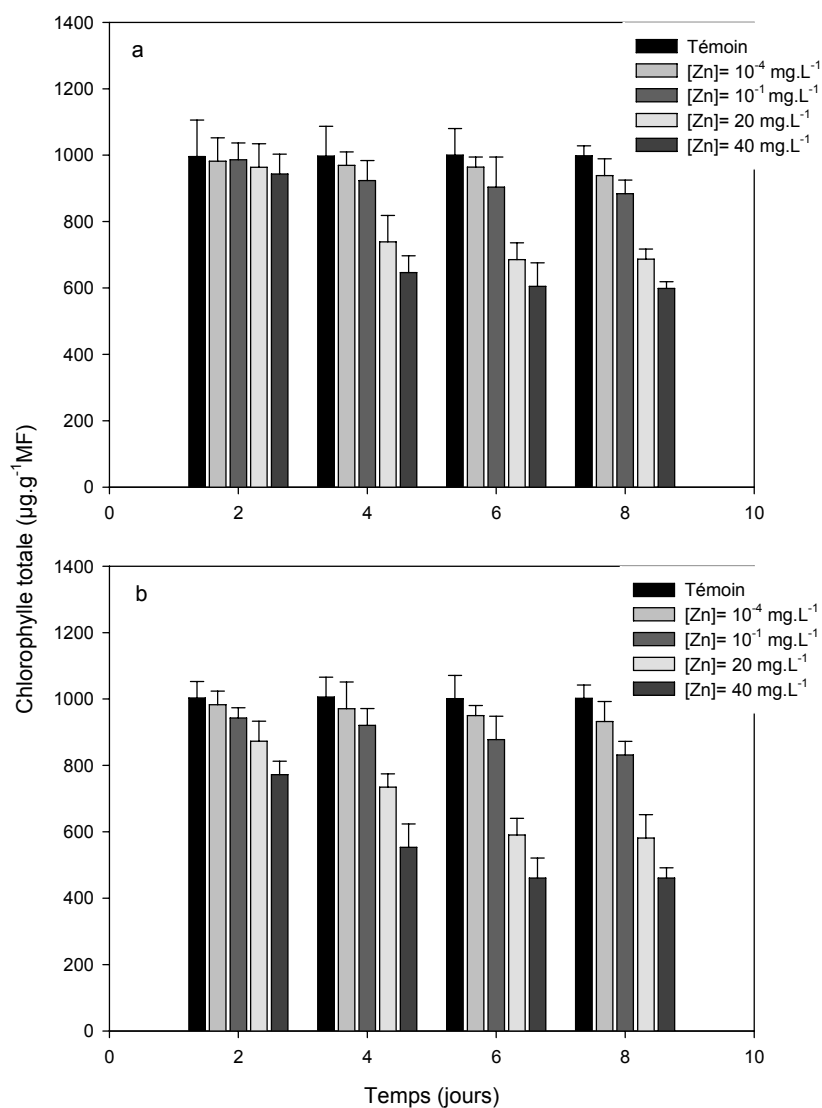


Figure 3.10. Teneurs en chlorophylle totale en présence du zinc, (a) *L. minor* et (b) *L. gibba* ;(valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3)

Les teneurs en chlorophylle a et b enregistrent des diminutions au cours de temps pour l'ensemble des échantillons contaminés (Figures 3.11 à 13). Le rapport Chla/Chlb décroît en présence des trois métaux. Pour *L. gibba*, ce rapport passe d'une valeur de  $3,0 \pm 0,20$  à  $1,04 \pm 0,10$  lorsque la concentration en cuivre augmente de  $10^{-4}$  à  $1 \text{ mg L}^{-1}$  soit une diminution de 65 % par rapport au témoin (Figure 3.11a). Pour *L. minor*, le cuivre a induit le même taux de réduction : lorsque la concentration en cuivre augmente de  $10^{-4}$  à  $1 \text{ mg L}^{-1}$  le rapport Chla/Chlb passe de  $2,99 \pm 0,10$  à  $1,04 \pm 0,10$  soit une diminution de 65 % par rapport au témoin (Figure 3.11b).

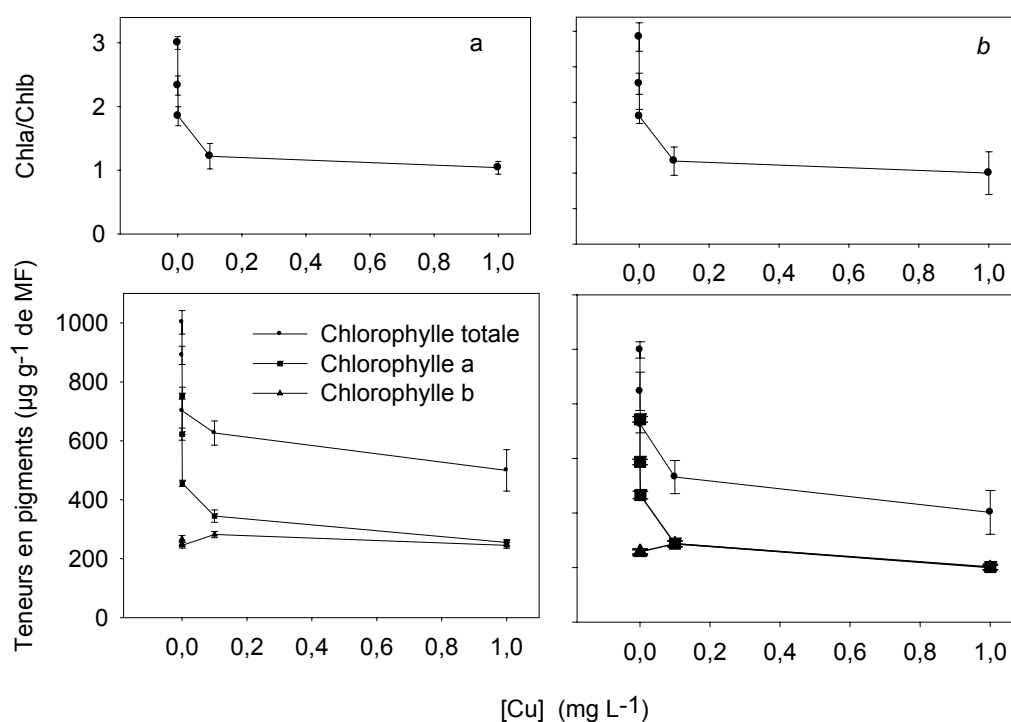


Figure 3.11. Effets du cuivre sur les teneurs en chlorophylle totale, chlorophylle a et chlorophylle b et le rapport Chla/Chlb de *L. gibba* après 8 jours ;  
(a) *L. gibba*, (b) *L. minor*

En présence du cadmium, le taux de réduction du rapport Chla/Chlb pour *L. gibba* est de 50% (la valeur passe de  $3,0 \pm 0,20$  à  $1,50 \pm 0,10$  lorsque la concentration en cadmium augmente de  $10^{-4}$  à  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Figure 3.12a).

L'augmentation de la concentration en cadmium de  $10^{-4}$  à  $2 \text{ mg L}^{-1}$  a induit une réduction du rapport Chla/Chlb de *L. minor* de 47,82% (la valeur passe de  $2,99 \pm 0,10$  à  $1,56 \pm 0,20$ ) (Figure 3.12b).

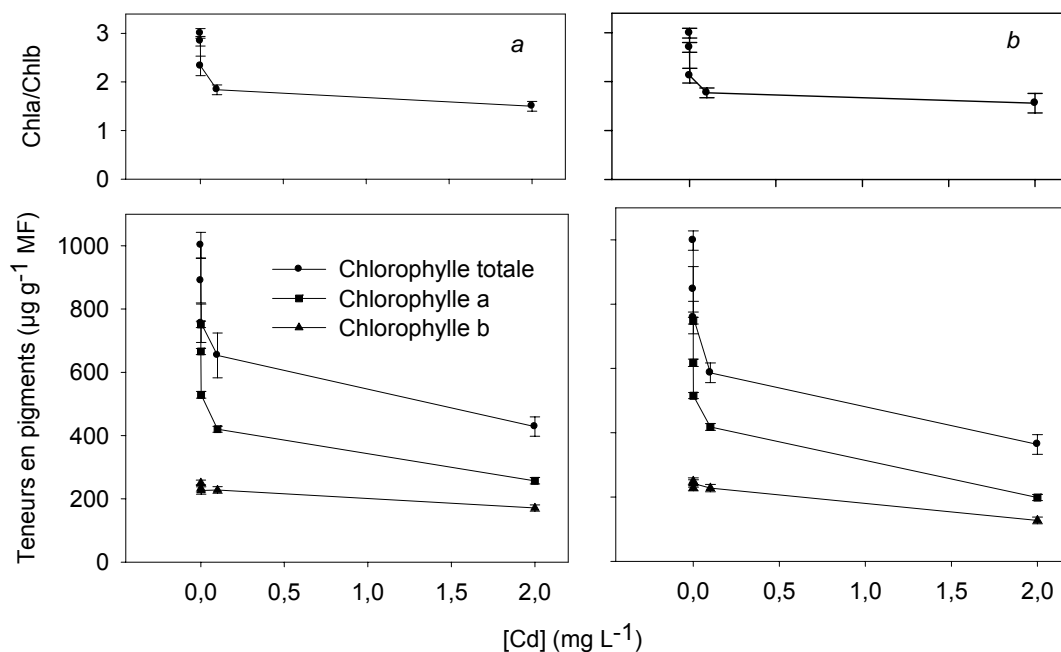


Figure 3.12. Effets du cadmium sur les teneurs en chlorophylle totale, chlorophylle a, chlorophylle b et le rapport Chla/Chlb après 8 jours ;  
(a) *L. gibba*, (b) *L. minor*

Le zinc induit des réductions moins importantes du rapport Chla/Chlb (il décroît de  $3,0 \pm 0,20$  à  $1,94 \pm 0,10$  et de  $2,99 \pm 0,10$  à  $1,75 \pm 0,10$  lorsque la concentration en zinc passe de  $10^{-4}$  à  $40 \text{ mg L}^{-1}$  pour *L. gibba* et *L. minor* respectivement) soit des taux de réduction de 35 et de 41,47% respectivement (Figures 3.13 a et b).

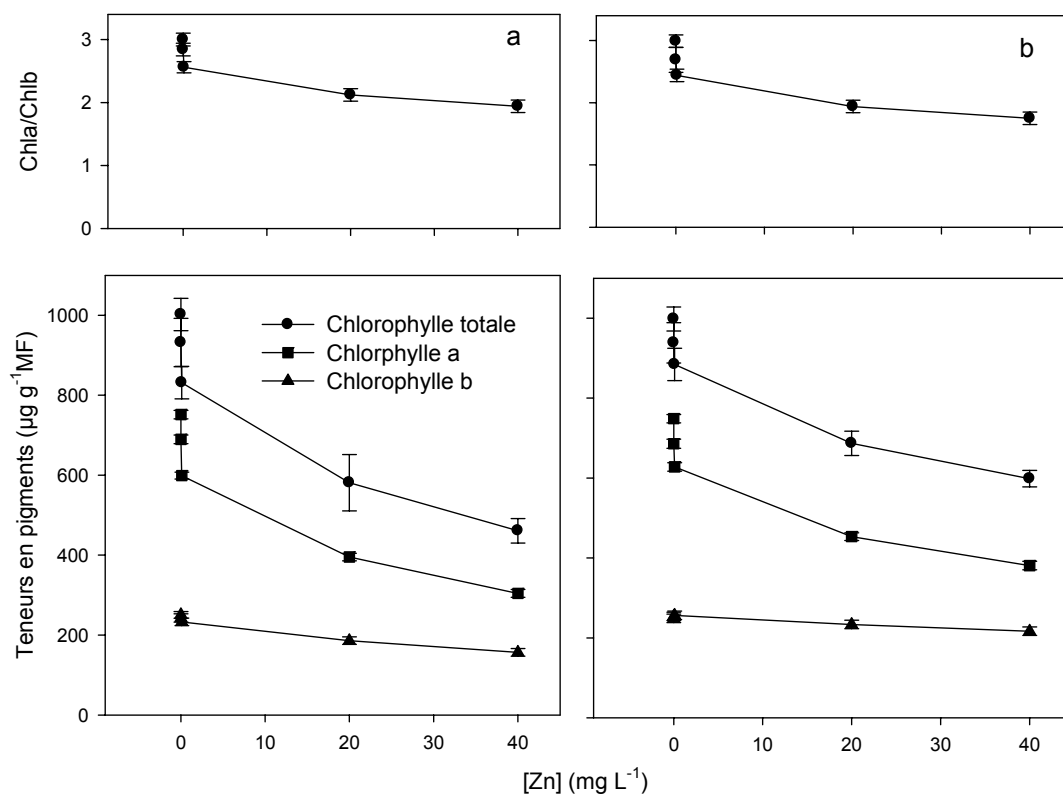


Figure 3.13. Effets du zinc sur les teneurs en chlorophylle totale, chlorophylle a, chlorophylle b et le rapport Chla/Chlb après 8 jours ;  
(a) *L. gibba*, (b) *L. minor*.

### 3.8.3. Effets sur la teneur en protéines

La teneur en protéines des lots témoins de *L. gibba* augmente, progressivement pour atteindre une valeur de  $5,70 \pm 0,35$  mg g<sup>-1</sup> MF, soit un taux d'augmentation de 27% (Figure 3.14). La quantité de protéines dans *L. minor* cultivée dans les milieux de cultures sans métaux, est passée de  $3,75 \pm 0,20$  à  $5,0 \pm 0,20$  mg g<sup>-1</sup> MF soit une hausse de 33,33% durant les 8 jours de culture (Figure 3.15).

À des concentrations en métal inférieures à  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup>, les teneurs en protéines de la lentille d'eau *L. gibba*, sont supérieures aux quantités enregistrées dans les milieux sans métaux lourds (Figure 3.14). L'allure de la courbe représentant l'évolution de la quantité des protéines en réponse à une contamination par  $10^{-4}$  et  $10^{-2}$  mg L<sup>-1</sup> en cuivre est comparable (Figure 3.14a).

La teneur augmente à partir d'une valeur moyenne de  $4,6 \pm 0,13 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  pour atteindre des maximums de  $8,00 \pm 0,75 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  (+40% par rapport au témoin) et de  $12,80 \pm 1,0 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  (+ 125% par rapport au témoin) (Figure 3.14a). La quantité maximale en protéines, en présence de  $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ , est observée après 04 jours de culture ( $10 \pm 1,0 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ). Au-delà de cet instant, la teneur décroît progressivement pour atteindre une valeur similaire à celle obtenue en présence de  $10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$  de cuivre. En présence de  $10^{-4}$  et  $10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  de cadmium, la quantité de protéines augmente d'une façon analogue tout au long de la durée de culture pour atteindre une valeur de  $9,50 \pm 0,4 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ , soit une augmentation de + 67% par rapport au témoin (Figure 3.14b). Après 04 jours de culture en présence de  $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$  de cadmium, la teneur en protéines est maximale avec une valeur de  $12,0 \pm 0,85 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  (+140% par rapport au témoin). Cette quantité se stabilise à une valeur de  $11,0 \pm 1,0 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  après 8 jours. La teneur en protéines augmente également en présence de  $10^{-4}$  et  $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$  de zinc (Figure 3.14c). Cette augmentation est moins prononcée comparativement au cuivre et au cadmium. Elle passe d'une valeur moyenne de  $4,70 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  à  $5,80 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  en présence de  $10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$  de zinc et à  $6,70 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  en présence de  $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$  de zinc, soient des taux d'augmentation de + 1,75% et + 18% par rapport au témoin. Une baisse de la teneur en protéine a été observée à fortes concentrations. La réduction est plus importante pour une concentration de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  en cuivre, la quantité atteint les  $2,50 \pm 0,17 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  après les 8 jours de culture, soit une baisse de 48%. Pour la même durée, la baisse de la teneur en protéines en présence de  $2 \text{ mg L}^{-1}$  en cadmium est de 20% (Elle passe de  $5,0 \pm 0,5 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  à  $4,0 \pm 0,17 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$ ) (Figure 3.14). En présence de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  de zinc, une stabilisation de la teneur en protéines au tour d'une valeur moyenne de  $4,80 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1} \text{ MF}$  a été enregistrée. Une concentration double ( $40 \text{ mg L}^{-1}$ ) induit une chute de la quantité des protéines (- 23% par rapport au témoin).



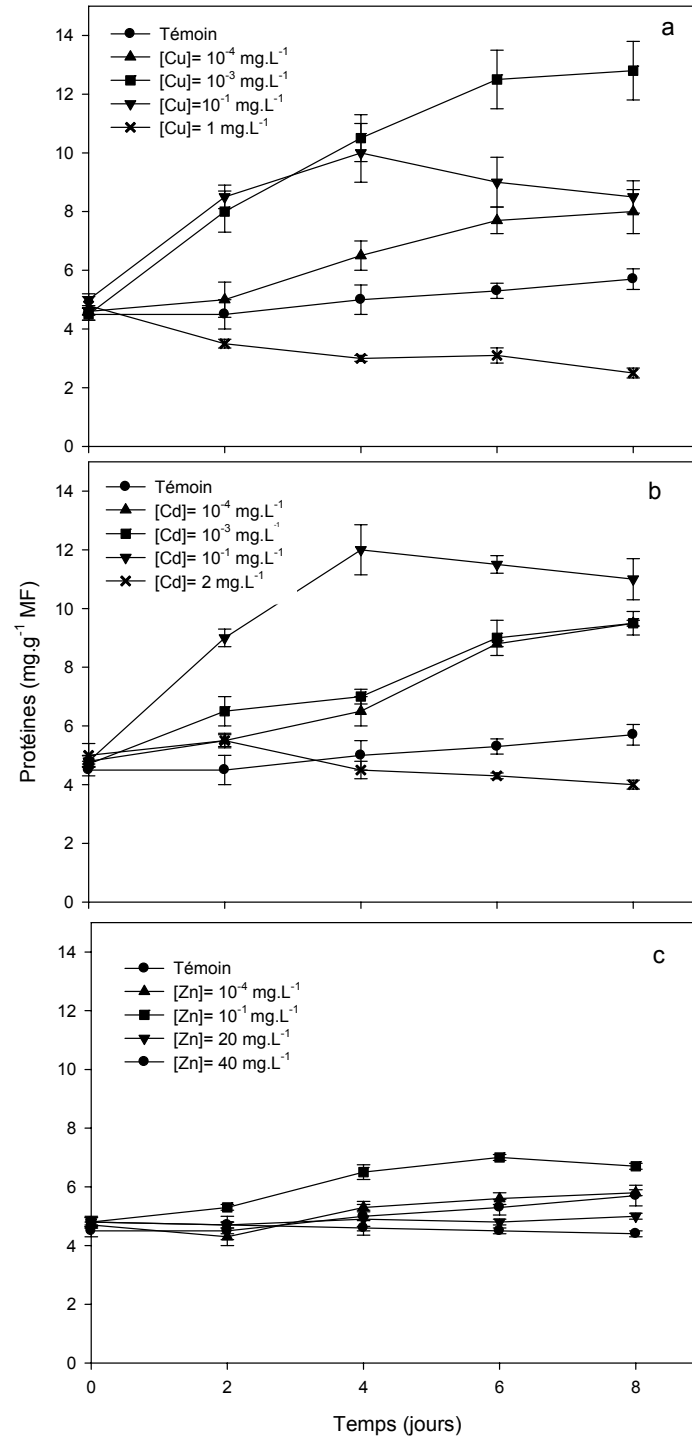


Figure 3.14. Teneurs en protéines de la lentille d'eau *L. gibba* en présence du (a) Cuivre ; (b) Cadmium et (c) Zinc ; (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3)

Les teneurs maximales en protéines dans la lentille d'eau *L. minor* ont été enregistrées après 8 jours de culture dans les milieux contenant  $10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup> en cuivre (la quantité des protéines passe de  $3,15 \pm 0,20$  à  $10,11 \pm 0,50$  mg g<sup>-1</sup> MF) (Figure 3.15a). Des concentrations en cuivre supérieures à  $10^{-2}$  mg L<sup>-1</sup> provoquent une réduction de la quantité de protéines à la fin de la durée de culture ( $6,50 \pm 0,55$  et  $2,00 \pm 0,10$  mg g<sup>-1</sup> MF en présence de  $10^{-1}$  et 1 mg L<sup>-1</sup> de cuivre, respectivement)

À des concentrations inférieures à  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> de cadmium, la quantité des protéines augmente tout au long de la durée de culture pour atteindre une valeur moyenne de  $8,00 \pm 0,1$  mg g<sup>-1</sup> MF, soit une augmentation de + 60% par rapport au témoin (Figure 3.15b).

Après 8 jours de culture, l'effet du zinc sur la teneur en protéines de *L. minor* est insignifiant en présence des concentrations inférieures à 20 mg L<sup>-1</sup> (Figure 3.15c). Néanmoins une légère différence entre la quantité de protéines dans les lots témoins et ceux contaminés par le zinc après 4 jours (elle passe d'une valeur moyenne de  $3,50 \pm 0,1$  mg g<sup>-1</sup> MF à  $4,65 \pm 0,1$  mg g<sup>-1</sup> MF en présence de  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> de zinc, de  $3,30 \pm 0,20$  mg g<sup>-1</sup> MF à  $5,50 \pm 0,15$  mg g<sup>-1</sup> MF en présence de  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> de zinc soient des taux d'augmentation de + 3,33% et + 22% par rapport au témoin. Une baisse de la teneur en protéine a été observée à fortes concentrations en zinc (de - 4 à - 30% par rapport au témoin).

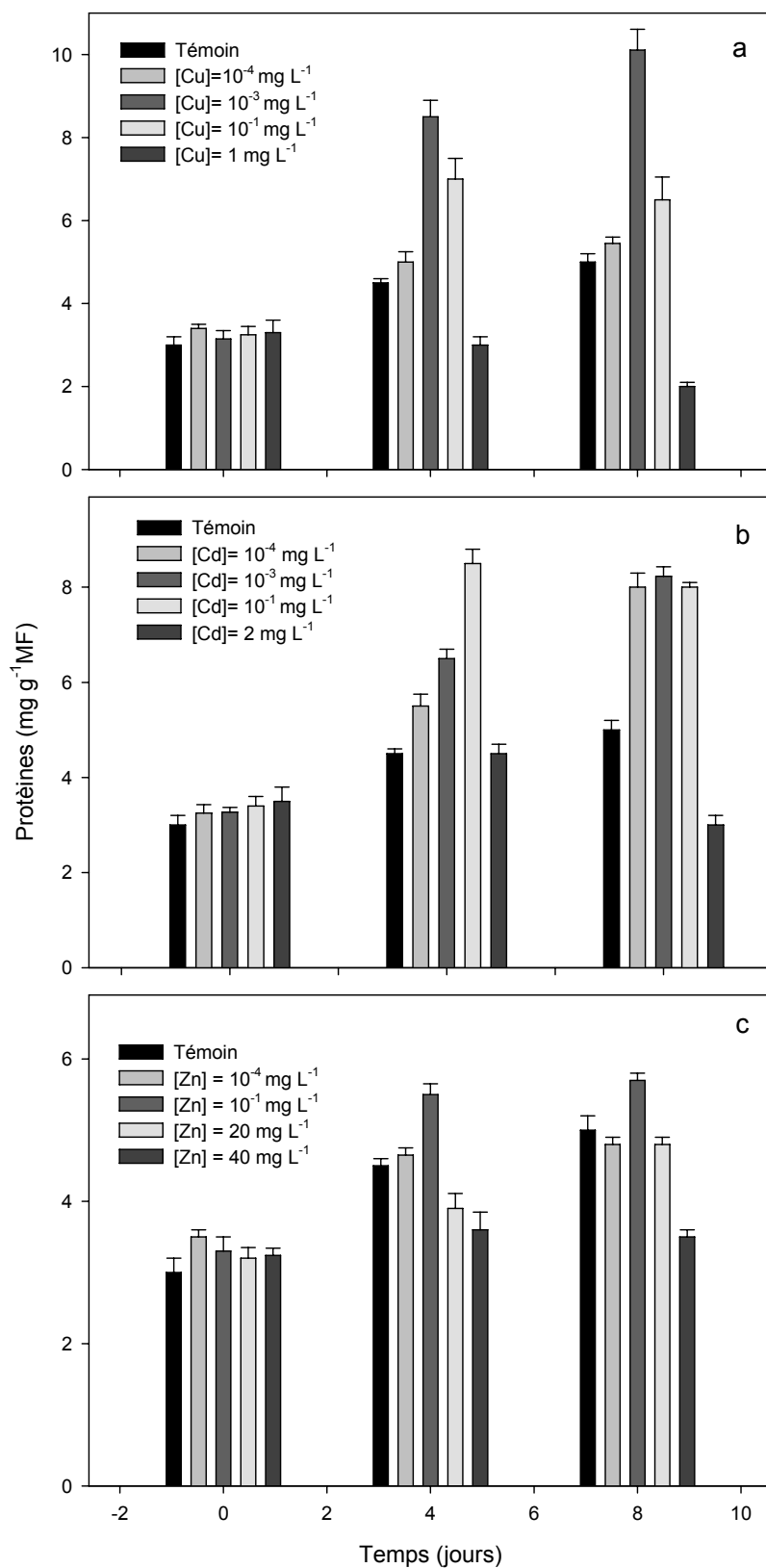


Figure 3.15. Teneurs en protéines de la lentille d'eau *L. minor* en présence du (a) Cuivre ; (b) Cadmium et (c) Zinc ; (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3)

### 3.8.4. Capacité d'absorption du phosphore et de l'azote

Les résultats relatifs à l'évolution de la quantité du phosphore, dans les milieux de culture, en fonction de temps en présence de *L. gibba* sont représentés par la Figure 3.16.

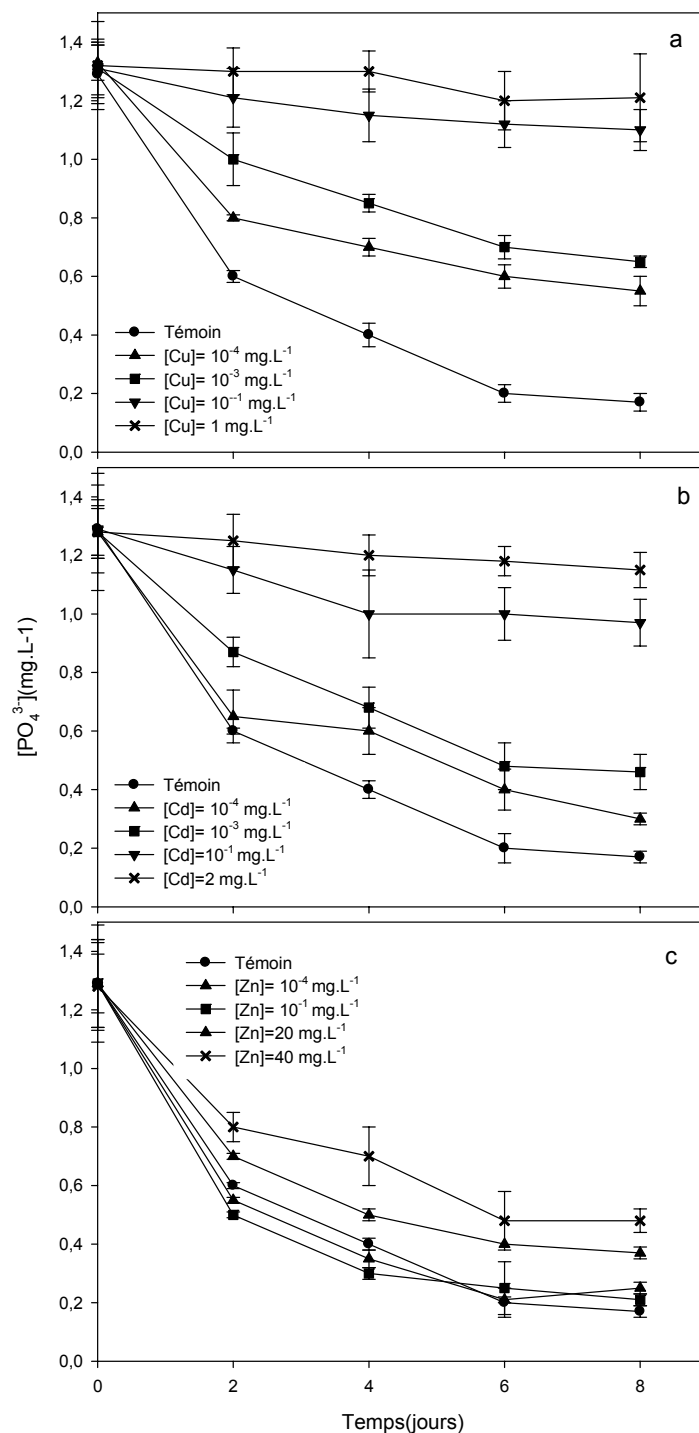


Figure 3.16. Evolution de la teneur en phosphore des milieux de cultures en présence du : (a) cuivre (b) cadmium et (c) zinc (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3)

Des réductions importantes en phosphates ont été enregistrées dans les milieux de cultures sans contaminants. Après deux jours, la teneur passe de  $1,29 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$  à  $0,6 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$  soit un taux d'élimination de 53,48%. À la fin de la durée d'expérimentation, la réduction de la teneur en phosphore est de 86,82%.

Dans les milieux contaminés, un ralentissement dans la biosorption du phosphore est observé. Ce phénomène est remarquable à fortes concentrations en métal. Cependant, en présence de  $10^{-4}$  et  $10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  en cuivre les réductions en phosphore sont de 58,64 et 50,38% respectivement (soient des taux de ralentissement de 32,45 et 41,97% par rapport au témoin). En présence de  $10^{-1}$  et  $1 \text{ mg L}^{-1}$  les réductions en phosphore sont de 16,03 et 8,30% respectivement, correspondant à des taux de ralentissement plus élevés (81,72 et 90,43% respectivement).

Les réductions des teneurs en phosphore observées en présence de  $10^{-4}$  et  $10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$  en cadmium sont de 76,56 et 64,06% respectivement (soient des taux de ralentissement de 11,81 et 26,21% respectivement). Des concentrations plus importantes en cadmium provoquent un ralentissement de la disparition du phosphore des milieux de cultures. La concentration passe de  $1,29 \pm 0,15$  à  $0,97 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$  et de  $1,28 \pm 0,08 \text{ mg L}^{-1}$  à  $1,15 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1}$  en présence de  $10^{-1}$  et  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de cadmium (ce qui correspond à des taux d'élimination de phosphore de 24,80 et 10,15% respectivement).

La quantité de phosphore éliminée en présence de concentrations en zinc identiques à celles du cuivre et du cadmium ( $10^{-4}$  et  $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ ) est plus importante. Les taux d'élimination enregistrés après huit jours de culture sont de 80,62 et 83,72% respectivement. Dans les milieux de culture à fortes concentrations en zinc (20 et  $40 \text{ mg L}^{-1}$ ), les réductions en phosphore restent appréciables (71,31 et 62,50% respectivement). La comparaison des effets séparés des trois métaux fait apparaître que l'inhibition de la biosorption du phosphore est plus marquée en présence du cuivre. Ainsi, par exemple, le taux de réduction final du phosphore, en présence de  $10^{-4} \text{ mg L}^{-1}$  en cuivre est de 58,64%, alors qu'il est de 76,56 et 80,62% en présence de la même concentration en cadmium ou zinc respectivement. En présence d'une concentration plus importante en métal ( $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ ), ce taux atteint les 16,03, pour le cuivre, 24% pour le cadmium et 83,72% pour le zinc.

Les résultats relatifs à l'évolution du taux d'assimilation de l'azote par la plante montrent que ce phénomène est sensible à la présence du cuivre, du cadmium et du zinc. Le taux de réduction de l'azote des milieux de culture sans contaminants est compris entre 60 et 75% (Figure 3.17). À la fin de la durée d'expérimentation, en présence de  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> en métal une légère augmentation du taux de réduction de l'azote est observée en présence du zinc ( $80 \pm 2\%$  contre  $75 \pm 3\%$  pour le témoin). Il semble donc qu'à faible concentration ( $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup>) le zinc exerce un pouvoir stimulant de la biosorption de l'azote même si cet effet reste non significatif (Figure 3.17).

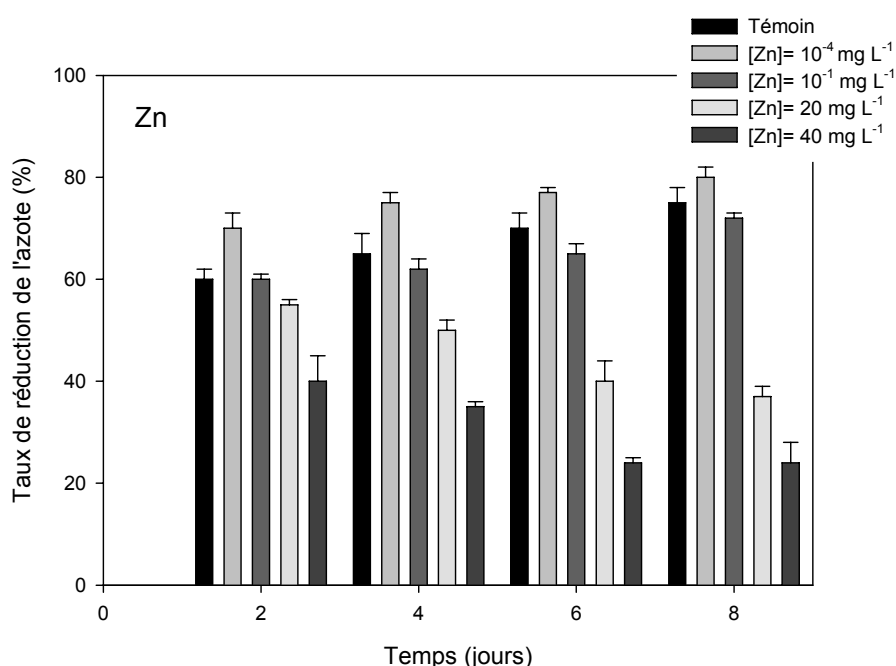


Figure 3.17. Taux de réduction de l'azote en fonction de temps à différentes concentrations en zinc (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3).

À des concentrations élevées en zinc (20 et 40 mg L<sup>-1</sup>), une baisse sensible du taux de réduction de l'azote est enregistrée. Dans ces conditions, ce taux est de 37% et 24% alors qu'il est de 75% pour le témoin. En présence des autres métaux (cuivre et cadmium), après une légère hausse de la biosorption durant les deux premiers jours (65 et 70% respectivement), les réductions observées sont inférieures à celles obtenues dans le témoin (55% en présence du cuivre et 30% en présence du cadmium) (Figure 3.18).

À fortes concentrations en métal, l'effet inhibiteur de l'absorption de l'azote devient de plus en plus important. En effet, lorsque la concentration en cuivre passe de 0,1 à 1 mg L<sup>-1</sup> la réduction de l'azote passe de 25 à 12%. Ce taux diminue de 23 à 11,5% quand la concentration en cadmium passe de 10<sup>-3</sup> à 2 mg L<sup>-1</sup>. L'augmentation de la concentration en zinc de 10<sup>-1</sup> à 40 mg L<sup>-1</sup> se traduit par une diminution des taux de réduction de l'azote de 72 à 24% ( $p \leq 0,05$ ).

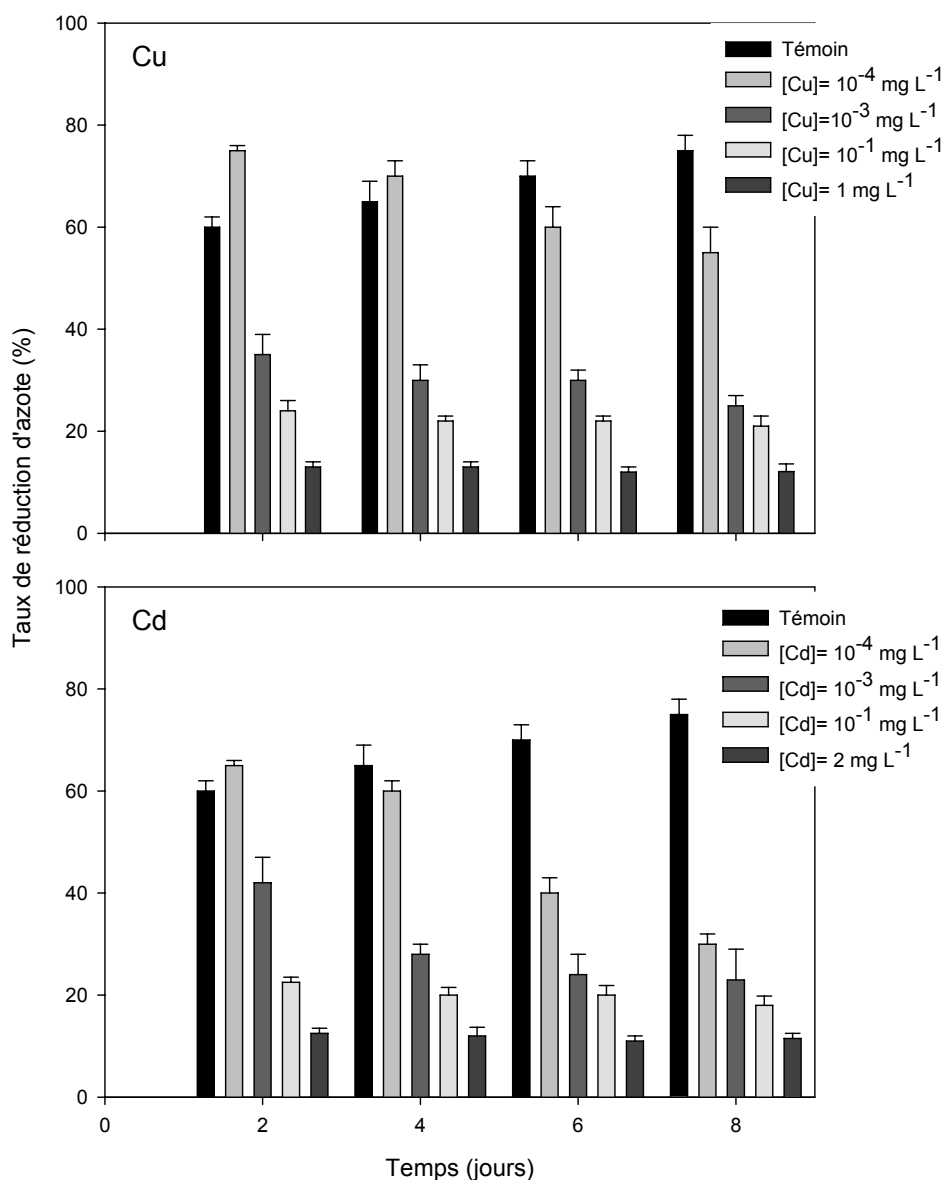


Figure 3.18. Taux de réduction de l'azote en fonction de temps à différentes concentrations en cuivre et en cadmium (valeurs moyennes  $\pm$  Ecart-types, n=3)

La comparaison des effets séparés du cuivre, du cadmium sur le taux de réduction de l'azote montre une inhibition plus marquée de la biosorption de l'azote en présence de  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> en cuivre. Ainsi, le taux final de réduction de l'azote est de 55% pour le cuivre et de 30% pour le cadmium.

Au-delà de cette concentration les inhibitions de la biosorption de cet élément sont très comparables (entre 11,50 et 25%).

### III.9. Discussion

L'exposition de la lentille d'eau, à différentes concentrations en métaux lourds (Cu, Cd et Zn), a entraîné des changements dans la physiologie de la plante, observables à travers les biomarqueurs utilisés (biomasse, chlorophylle et protéines). Généralement la biomasse des plantes aquatiques, en conditions de culture favorables, elle augmente progressivement. Récemment, il a été observé une augmentation graduelle de la biomasse de la jacinthe d'eau, la laitue d'eau et *Salvinia*, dans des solutions synthétiques à différentes concentrations en nitrates. Durant 10 jours de culture, la biomasse de la jacinthe d'eau, la laitue d'eau et *Salvinia* est passé de 75 à 101-106 mg L<sup>-1</sup>, 92-94 mg L<sup>-1</sup> et 84-88 mg L<sup>-1</sup> soit 37, 24 et 15% d'augmentations respectivement [147]. Au cours de cette étude le suivi de l'évolution de la biomasse, dans des milieux de culture contaminés, de *L. gibba* et de *L. minor*, a révélé une inhibition de cette dernière. À faibles concentrations ( $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup>), l'exposition pendant 8 jours de la lentille d'eau au cuivre et au cadmium a induit une inhibition moyenne de la biomasse comprise entre 5,6 - 15% et 5,1 - 12,31%, respectivement. Pendant la même durée de traitement, une concentration de  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> en zinc inhibe la biomasse de *L. minor* de 3,5% et celle de *L. gibba* de 2,98%. Cependant, des inhibitions de biomasse plus importantes sont enregistrées à fortes concentrations en métaux lourds testés. Ainsi,  $10^{-1}$  à 1 mg L<sup>-1</sup> en cuivre inhibent de 23,35 à 29,84 % la biomasse de *L. minor* et de 18,75 à 25,07% la biomasse de *L. gibba* ;  $10^{-1}$  à 2 mg L<sup>-1</sup> en cadmium inhibent de 20,60 à 31,77% la biomasse de *L. minor* et de 17,39 à 28,62% la biomasse de *L. gibba*. En termes de production de biomasse, il a été trouvé que le cuivre devient toxique à une concentration supérieure à 1  $\mu$ M (0,6537 mg L<sup>-1</sup>) [148].



Cependant, la plante aquatique *Hydrilla* pourrait se développer et accumuler le cuivre jusqu'à l'exposition à une concentration de 80  $\mu\text{M}$  [149]. Cette différence semble être due à la différence écotypique entre les plantes.

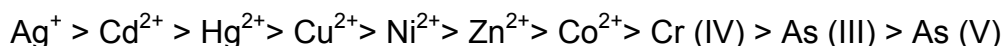
L'effet des trois métaux traces sur les pigments (chl, chla et chlb) de la lentille d'eau est visible même à faibles concentrations en métal. Néanmoins, les effets du cuivre et du cadmium sont plus marqués que ceux du zinc.

La toxicité du cuivre est due à l'existence de deux états d'oxydation facilement inter-convertibles qui le rend très réactif et peut ainsi catalyser la formation de radicaux libres par réaction de Haber-Weiss. Ces radicaux libres affectent l'appareil photosynthétique et catalysent également la dégradation des protéines par des modifications oxydatives et augmentation de l'activité protéolytique [150, 151,152, 215]. Pour le cadmium, dans une étude sur *Arabidopsis* réalisée par Herbette et al.,[153], il a été démontré que cet élément réduit les régulateurs des gènes codant des enzymes de biosynthèse de la chlorophylle, les protéines de PSI et PSII, transporteurs d'électrons,  $\text{H}^+$ -ATPase ainsi que les enzymes du cycle de Calvin.

Les plantes exposées à des concentrations élevées en métaux lourds manifestent généralement des symptômes observables (chlorose, petite taille, forme recroquevillée, non séparation des frondes) et qui reflètent l'intensité et la diversité des perturbations engendrés par ces contaminants sur le fonctionnement cellulaire. L'apparition de chlorose après une contamination par le cuivre et/ou le cadmium a été reportée chez différentes espèces aquatiques comme par exemple les plantes vasculaires à racines *Eichhornia crassipes* et *Hydrilla verticillata* [70], les algues *Chlorella pyrenoidosa* [71] et *Scenedesmus acutus*, des macrophytes (*P. pusillus*) ou encore au sein de genre de *Lemna* [72,111]. Ce phénomène de la chlorose est un symptôme qui traduit la dégradation des pigments et des membranes consécutives à un stress oxydant [73]. En plus des chloroses, d'autres effets et symptômes, comme l'inhibition de la croissance et la formation d'individus de petite taille avec des formes recroquevillées, suggèrent des problèmes de division et/ou d'élongation cellulaire. L'inhibition de la croissance a souvent été observée en présence de métaux lourds tels que le cuivre, le cadmium, le plomb [74].

Dans une étude, sur la toxicité de dix métaux lourds vis-à-vis de *L. minor* [108], le classement par ordre de toxicité de ces derniers dépend du paramètre

de son évaluation. Sur la base des valeurs des  $EC_{50}$ , l'ordre suivant a été établi :



La teneur en protéines enregistre des réductions importantes en présence des concentrations élevées en cuivre et en cadmium (48% en présence de  $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de cuivre et 20% en présence de  $2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en cadmium). En effet, la teneur en protéines solubles dans les cellules des plantes est un bon indicateur de leur état physiologique. La réduction de leur quantité semble être la conséquence d'un ralentissement de leur biosynthèse ou à l'accélération du processus de leur catabolisme [154]. Les résultats de son travail sur la toxicité du cadmium, indique que la dégradation des protéines en acides aminés est en fait une adaptation des cellules à la carence en glucides. D'autre part, le catabolisme accéléré est probablement due aux perturbations considérables dans les systèmes membranaires, en réponse à la phytotoxicité des métaux. □ faibles concentrations en métaux traces testés, une augmentation de la biomasse ainsi que de la quantité des protéines a été constatée. Ce phénomène a été observé dans de nombreux travaux et qui est supposé du à une induction des protéines de faible poids moléculaire ainsi que les enzymes antioxydantes [12, 148, 155, 156, 157]. L'incapacité des frondes de la lentille d'eau à synthétiser des protéines après le traitement par le cuivre pourrait être causée par le stress oxydatif aigu par l'excès de ce métal dans les cellules végétales.

Les résultats relatifs à la biosorption du phosphore par *L. gibba* ont montré une grande capacité de biosorption de cet élément sous forme de phosphate par cette plante (87% d'élimination après 8 jours de traitement). Ce taux d'élimination est très proche de celui enregistré par Öbek et Hasar [158]. Ils indiquent une baisse de la concentration en phosphate de  $15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  à  $0,5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (soit 97% de réduction) pendant 8 jours de culture de *L. minor* dans une eau usée issue d'un traitement secondaire. Cependant, la capacité de la biosorption du phosphore par *L. gibba* a montré une sensibilité significative au cuivre. Ainsi, par exemple, le taux de réduction final du phosphore, en présence de  $10^{-4}\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en cuivre est de 58,64%, alors qu'il est de 76,56 et 80,62% en présence de la même concentration en cadmium ou zinc respectivement.

En présence d'une concentration plus importante en métal ( $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup>), ce taux atteint les 16,03 pour le cuivre, 24% pour le cadmium et 83,72% pour le zinc.

Les résultats trouvés par Rahman et al., [159] indiquent que l'arsenic comme métal induit une forte inhibition de la biosorption des phosphates par *S. polyrhiza* L. Les résultats trouvés au cours de cette étude montrent que l'effet du cuivre, du cadmium et du zinc sur la biosorption de l'azote est aussi conséquent. Une inhibition plus marquée de la biosorption de l'azote en présence de  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> en cuivre. Ainsi, le taux final de réduction de l'azote est de 55% pour le cuivre et de 30% pour le cadmium. Au-delà de cette concentration les inhibitions de la biosorption de cet élément sont très comparables (entre 11,50 et 25%). Plusieurs travaux ont montré que le cuivre entraîne souvent des changements dans le métabolisme de l'azote, induit des hausses en acides aminés libres et inhibe l'activité de l'enzyme nitrate réductase [160,161].

### III.10. Conclusion

Les essais de toxicité réalisés au cours de cette première partie ont montré d'importants effets des trois métaux testés sur, la biomasse, les pigments et les teneurs en protéines de la lentille d'eau (*L. gibba* et *L. minor*). Les inhibitions enregistrées sont plus importantes en présence du cuivre, du cadmium puis le zinc.

*L. gibba*, dans des milieux non contaminés a manifesté une bonne capacité de biosorption du phosphore et de l'azote. La présence de l'un des métaux particulièrement le cuivre et le cadmium a réduit son potentiel de l'absorption.

Ces résultats justifient les possibilités d'utilisation de ce genre de plante en phytoremédiation du phosphore et de l'azote (éléments responsables du phénomène d'eutrophisation) particulièrement en absence et/ou présence à l'état de trace des métaux lourds tels que le cuivre, le cadmium et le zinc.

## CHAPITRE 04

### ÉTUDE DE LA TOXICITÉ ET DE LA RÉTENTION DU CUIVRE, DU CADMIUM ET DU ZINC SUR LA LENTILLE D'EAU « *L. gibba* »

#### 4.1. Introduction

La contamination de l'environnement par les métaux traces est depuis longtemps d'actualité. Contrairement aux polluants organiques susceptibles de se dégrader, les pollutions métalliques sont persistantes. Cependant, les écosystèmes aquatiques, récepteurs directs de ces rejets, révèlent des taux élevés de concentrations en polluants supérieurs aux charges naturelles et sont l'objet de programmes de surveillances qui cherchent à quantifier et à prévenir l'impact des pollutions [1]. Ces métaux lourds sont caractérisés par leur toxicité vis-à-vis des écosystèmes aquatiques, la santé humaine et leur potentiel d'accumulation dans les organismes. En effet, les plantes aquatiques, particulièrement, les *Lemna* ont manifesté de fortes accumulations de métaux lourds comme le cadmium, le cuivre et le sélénium dans leurs tissus [13-15]. Cette propriété de bio-accumulation a suggéré l'utilisation de ces plantes pour l'évaluation de la toxicité et la surveillance des métaux dans l'eau [10, 16,17]. En ce qui concerne l'effet potentiel des métaux sur les organismes aquatiques, de nombreuses études ont montré qu'ils sont toxiques à l'état de traces, et l'exposition de ces plantes à ces substances provoque des changements physiologiques et biochimiques. L'exploitation de ces modifications pour l'évaluation de la toxicité de ces polluants a été largement discutée [11, 12,162]. Les objectifs de cette partie consistent, dans une première étape, à examiner les effets toxiques induits par le cuivre, le cadmium et le zinc. En plus de la mesure des inhibitions de la croissance, l'indice de stress défini par le rapport de la chlorophylle sur son produit de dégradation la phéophytine ( $DO_{665}/DO_{665a}$ ) utilisé avec succès pour l'évaluation de la toxicité des bryophytes aquatiques [163], ainsi que l'accumulation de la proline comme marqueurs de stress ont été testés.

En raison de leur potentiel d'accumulation des contaminants minéraux résiduels émanant des activités anthropiques, plusieurs travaux de recherches sur l'élimination des métaux lourds par les lemnacées ont été réalisés [59,133, 137].

D'autre part, de fortes réductions en matières organiques ont été enregistrées sur un bio-filtre à base de *L. gibba* [164,165]. C'est pourquoi l'étude de la rétention de ces trois métaux lourds, par cette plante a été étudiée.

La lentille d'eau *L. gibba* a été choisie comme espèce modèle pour cette étude. Cette plante aquatique est caractérisée à la fois par ses facilités d'utilisation et de culture, par son adaptation aux différentes conditions climatiques et est aussi présente dans plusieurs régions [78].

## 4.2. Matériels et méthodes

### 4.2.1. Matériel végétal

La lentille *L. gibba* a été prélevée des cultures mères et sélectionnée sur la base des critères suivants : absence de nécroses, de chlorose et de contamination algale, la colonie doit être composée de deux frondes adultes de tailles identiques. Le milieu de culture utilisé est celui de Haogland légèrement modifié [144] (cf.3.2.2).

### 4.2.2. Conditions de culture

Des groupes de cinq individus, soit dix frondes, sont cultivés dans des Erlenmeyers en verre de 250 ml de capacité contenant 100 ml de milieu de culture stérile (pH =  $6,5 \pm 0,1$ ). Les Erlenmeyers, fermés par un film plastique légèrement perforé, sont répartis en plusieurs lots et placés dans une chambre thermostatée (à  $22 \pm 2$  °C) avec une photopériode de 16 heures de lumière (4000 Lux) et 8 heures d'obscurité.

### 4.2.3. Métaux lourds

Trois solutions mères ont été utilisées pour préparer les milieux de culture contaminés :

- Une solution mère de cuivre à  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , obtenue par dissolution du sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Panreac Quimica, pureté supérieure à 98%), est utilisée pour préparer des milieux de cultures à différentes concentrations en cuivre :  $10^{-4}$ ;  $10^{-3}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-1}$  et  $4 \text{ mg L}^{-1}$ .
- Une solution mère de cadmium à  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , obtenue à partir du chlorure de cadmium  $\text{CdCl}_2$  (Panreac Quimica, pureté supérieure à 98%), est utilisée pour préparer des milieux de cultures contaminés par différentes concentrations en cadmium:  $10^{-3}$ ;  $10^{-2}$  et  $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$ .

- Une solution mère de zinc à  $1\text{ g L}^{-1}$ , obtenue par dissolution de sulfate de zinc  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, pureté supérieure à 98%), est utilisée pour la préparation des milieux de cultures contaminés par différentes concentrations en zinc :  $10^{-2}$ ;  $10^{-1}$ ; 4; 30 et  $50\text{ mg L}^{-1}$ .

Un milieu non contaminé est utilisé pour servir de témoin.

#### 4.2.4. Paramètres de mesure de la toxicité

##### 4.2.4.1. Croissance de la plante

Pour mesurer la croissance de la plante, un dénombrement des frondes est réalisé chaque deux jours. À partir de ces valeurs, la croissance est déterminée par la formule suivante [166]:

$$C(\%) = \frac{N_t - N_0}{N_0} \times 100 \quad (4.1)$$

où  $N_t$  est le nombre de colonies moyen à l'instant t

$N_0$  est le nombre de colonies moyen à l'instant initial ( $N_0 = 10$ ).

Les taux d'inhibition de la croissance de la *L. gibba*, noté  $In(\%)$ , en présence du cadmium, du cuivre et du zinc à différentes concentrations, sont calculés selon la formule suivante :

$$In(\%) = \frac{\Delta N_t - \Delta N_0}{\Delta N_t} \times 100 \quad (4.2)$$

Où

$\Delta N_t$  est la variation moyenne du nombre de colonies, observée dans le témoin,

$\Delta N_0$  est la variation moyenne du nombre de colonies en présence du métal.

##### 4.2.4.2. Indice de stress physiologique ( $DO_{665}/DO_{665a}$ )

L'indice de stress physiologique correspond au rapport de la chlorophylle et de son produit de dégradation « la phéophytine totale » [163,167].

Pour chaque mesure, 230 mg de biomasse fraîche sont prélevées tous les 2 jours. Ce matériel végétal est broyé, à l'aide d'un mortier en céramique, dans 5 ml d'acétone à 90% (Panreac Quimica, pour analyses), puis placé dans des tubes en verre de 50 ml de capacité contenant 15 ml d'acétone, pendant 24

heures, à l'obscurité et à une température égale à 5°C. L'extrait obtenu est centrifugé à une vitesse de 3000 tours par minutes pendant 10 min à 20°C.

Les absorbances à des longueurs d'onde de 665 et 750 nm ont été déterminées par un spectrophotomètre (Mini-UV spectrophotomètre Shimadzu). Le réglage du spectrophotomètre est réalisé par une solution d'acétone 90% (blanc).

La conversion de la chlorophylle en phéophytine est réalisée par l'ajout de 10 µl d'acide chlorhydrique concentré (37%, Fluka Chemika) à 3 ml d'extrait. Après 2 minutes, une mesure de l'absorbance aux deux longueurs d'onde 665 et 750 nm est à nouveau réalisée. Le rapport étudié ( $DO_{665}/DO_{665a}$ ) qui est la densité optique de l'extrait à 665 nm acidifié et non acidifié est corrigé par une lecture de l'absorbance de l'extrait à 750 nm. Les indices de stress sont notés IS et sont calculés selon la formule:

$$IS = \frac{DO_{665} - DO_{750}}{DO_{665a} - DO_{750a}} \quad (4.3)$$

Où

$DO_{665}$  est l'absorbance de l'extrait non acidifié mesurée à 665 nm,

$DO_{750}$  est l'absorbance de l'extrait non acidifié mesurée à 750 nm,

$DO_{665a}$  est l'absorbance de l'extrait acidifié mesurée à 665 nm,

$DO_{750a}$  est l'absorbance de l'extrait acidifié mesurée à 750 nm.

#### 4.2.4.3. Dosage de la proline

La proline est dosée selon la méthode décrite par Troll et Lindsley [168]. La proline et l'hydroxyproline, obtenues par extraction au méthanol à 40% (v/v), mélangées avec la ninhydrine en milieu acide et à chaud donnent un composé rose, soluble dans le toluène, et susceptible d'un dosage spectrophotométrique à une longueur d'onde de 528 nm. Pour chaque test, une biomasse de matière fraîche dont la masse est 100 à 150 mg est mélangée au méthanol à 40% (v/v). Après 1 heure d'extraction à 80°C, de l'acide acétique et de la ninhydrine sont ajoutés à l'extrait. Après homogénéisation, l'extrait est placé dans de l'eau

bouillante pendant 30 min. Une coloration rose se développe. Après refroidissement, 5 ml de toluène sont ajoutés, deux phases bien distinctes apparaissent.

La phase supérieure est récupérée et une lecture de l'absorbance à 528 nm est réalisée. Une série de solutions étalons de concentration comprise entre 0 et 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a servi à l'établissement de la courbe d'étalonnage (Figure 4.1, appendice 6).

#### 4.2.5. Taux de rétention des métaux lourds

Des cinétiques ont été effectuées sur 10 jours au cours desquels des prélèvements périodiques (chaque deux jours) ont été effectués. Le dosage des trois métaux lourds dans le milieu prélevé a été réalisé par absorption atomique à flamme en utilisant comme gaz vecteur un mélange (air/acétylène). L'appareil est de type **Perkin Elmer 300**. À faibles concentrations en cuivre et en cadmium ( $10^{-4}$  et  $10^{-3}$   $\text{mg L}^{-1}$ ), la méthode des ajouts dosés a été utilisée. Les taux de rétention des trois métaux lourds sont calculés par la formule ci-après [169] :

$$R(\%) = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (4.4)$$

Où  $C_0$  et  $C_t$  représentent les concentrations résiduelles du métal à l'instant initial et à l'instant t.

#### 4.2.6. Analyse statistique des résultats

Chaque essai a fait l'objet de trois répétitions. Au cours de chaque traitement, pour chaque concentration trois répétitions ont été réalisées avec un témoin. Les résultats présentés dans les différentes figures représentent les moyennes arithmétiques avec les écarts –types correspondants. Les analyses statistiques ont été réalisées par SigmaStat 3.0 (SPSS Science Software GmbH, Germany). Les réponses de la plante exposée aux métaux lourds sont analysées par comparaison avec le témoin à l'aide du test de Student's t-test et des valeurs de p inférieures à 0,05 ont été retenues pour définir la significativité du traitement.



### 4.3. Résultats

#### 4.3.1. Effet des métaux lourds sur la croissance de *L. gibba*

La figure 4.2 montre la croissance de *L. gibba* en présence des différentes concentrations en cuivre à différents instants.

À de faibles concentrations ( $10^{-4}$  et  $10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup>), l'effet du cuivre sur la croissance est relativement faible durant les huit premiers jours de traitement. Après quatre jours d'exposition de la plante au cuivre à ces faibles concentrations, les taux de croissance observés varient entre 30 et 35%, soit un taux d'inhibition de la croissance inférieur à 25%. Au delà de 4 jours d'exposition, le taux de croissance augmente pour atteindre des valeurs maximales au bout du 10<sup>ième</sup> jour (100% à  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> et 90% à  $10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup> en cuivre), avec des taux d'inhibition inférieurs à 36 %. En présence de  $10^{-2}$  et  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> de cuivre, les taux de croissance (20%) sont nettement inférieurs à ceux enregistrés dans le témoin (35%), soit une inhibition significative ( $p \leq 0,05$ ). Cet effet inhibiteur augmente avec la durée de l'exposition pour atteindre les 54 et 75% à  $10^{-2}$  et  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> par rapport au témoin, respectivement.

Contrairement au cuivre, le cadmium aux concentrations considérées, affecte la croissance d'une manière significative ( $p \leq 0,001$ ). Cependant, de faibles taux de croissance, ont été enregistrés à compter du 4<sup>ème</sup> jour de culture (inférieur à 30% en moyenne), comparativement au témoin où le même taux a atteint une valeur de 40% soit une inhibition de 50%. L'inhibition de la croissance par ce métal s'avère plus importante avec des taux d'inhibition supérieurs à 25% dès les deux premiers jours de traitement. Après une durée d'exposition de dix jours ces taux d'inhibition ont atteint des valeurs maximales : 75% à  $10^{-3}$  mg L<sup>-1</sup>; 83% à  $10^{-2}$  mg L<sup>-1</sup> ( $p \leq 0,001$ )

Les plantes exposées aux différentes concentrations en zinc ont montré deux comportements différents vis-à-vis de ce métal :

Aux faibles concentrations, l'évolution de la croissance est très comparable à celle du témoin. En effet, après 10 jours d'exposition les taux de croissance atteignent une valeur maximale de 140%.

Aux fortes concentrations ( $>$  à 4 mg L<sup>-1</sup>), un ralentissement de la croissance est observé à partir du 4<sup>ème</sup> jour de traitement. En effet, les taux de croissance n'excèdent pas les 50% ( $p \leq 0,001$ ) correspondant à des taux d'inhibition de 68 et 79% à 30 mg L<sup>-1</sup> et 50 mg L<sup>-1</sup> en zinc, respectivement.

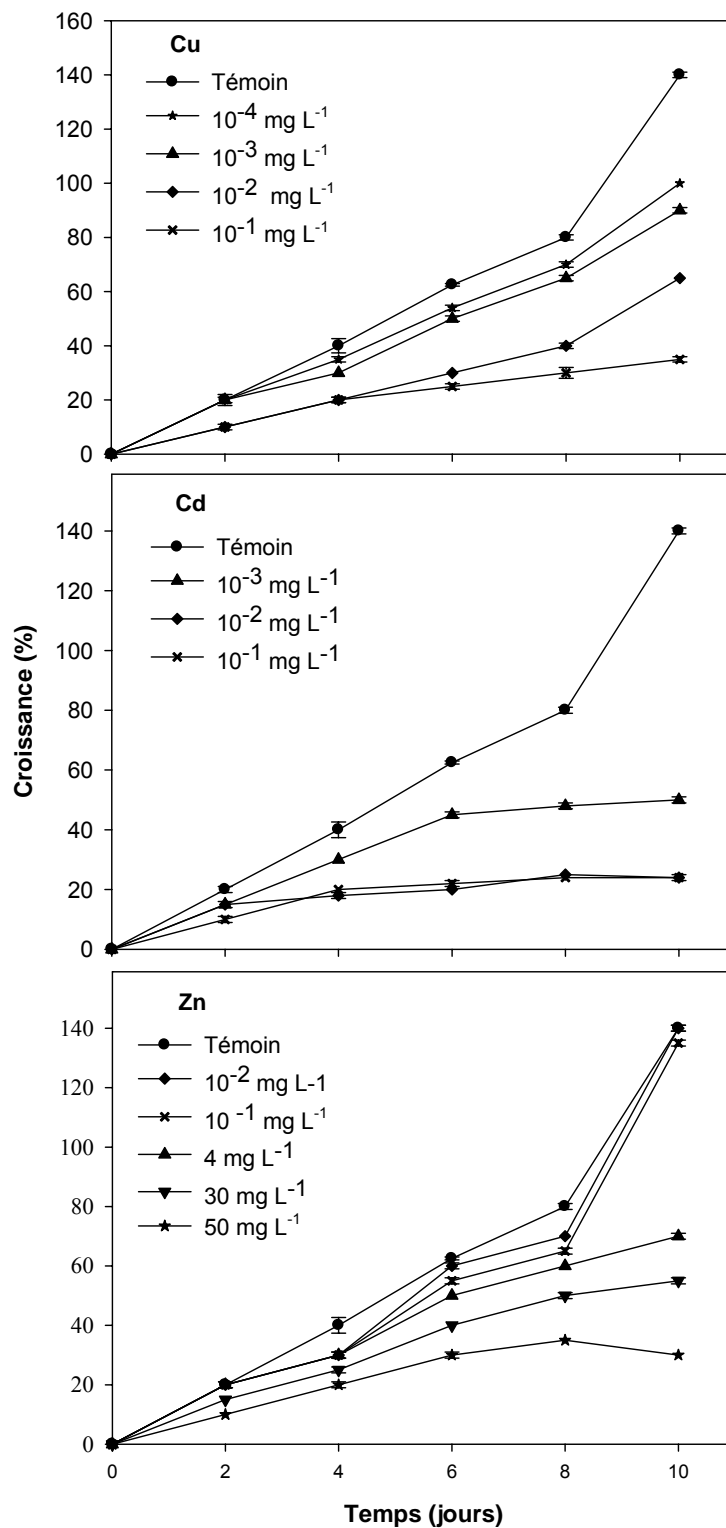


Figure 4.2. Évolution de la croissance en fonction de temps (valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types, n=3)

### 4.3.2. Effet sur l'indice de stress ( $DO_{665}/DO_{665a}$ )

L'évolution de l'indice de stress est illustrée par la Figure 4.3.

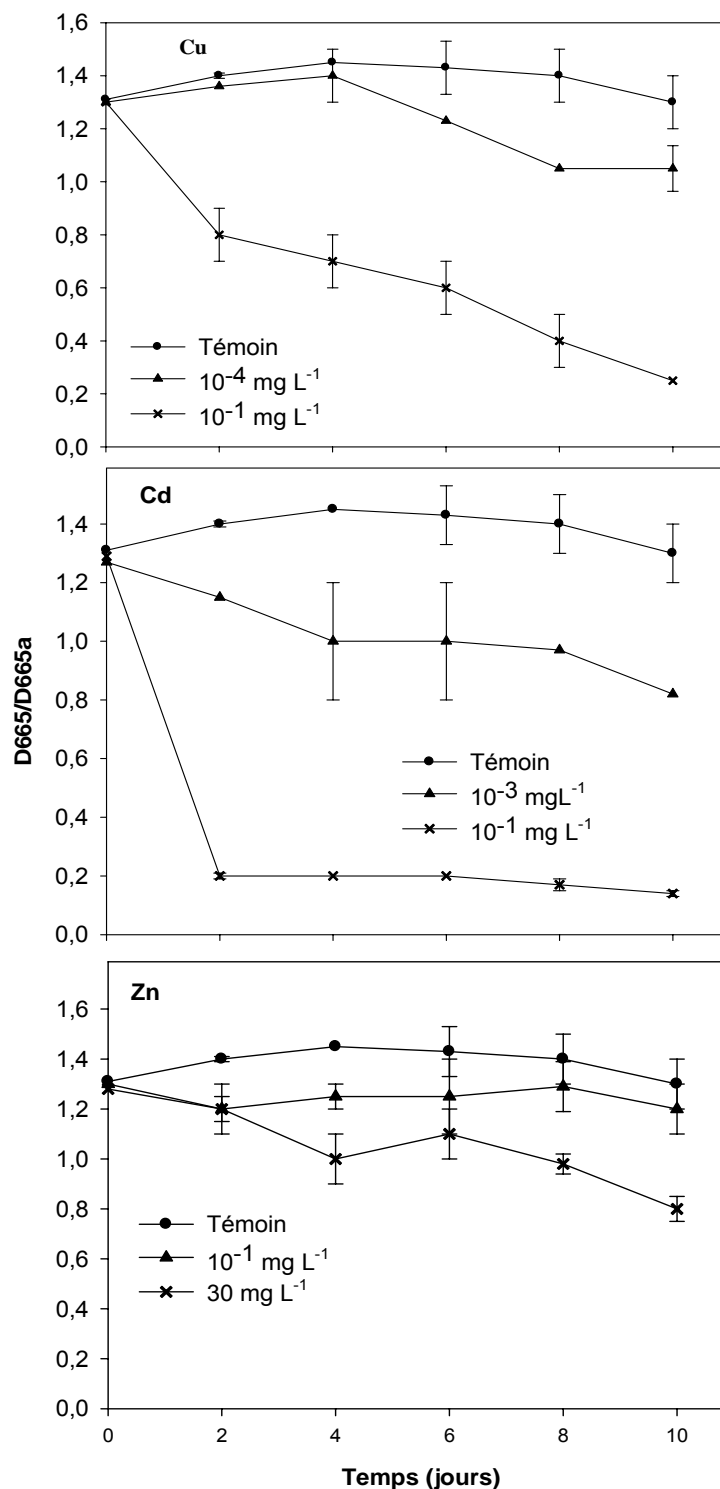


Figure 4.3. Evolution de l'indice de stress ( $DO_{665}/DO_{665a}$ ) en fonction de temps (valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types,  $n=3$ )

À partir de la Figure 4.3, nous avons noté une légère variation de l'indice de stress des colonies cultivées dans le milieu de culture sans contamination (1,3 à 1,4), tout au long de la durée de la culture (Figure 4.3).

Pendant cette durée, de fortes diminutions de cet indice ont été engendrées par les métaux lourds testés et particulièrement aux concentrations élevées. Des réductions de 81% en présence du cuivre ( $p \leq 0,001$ ), 89% en présence du cadmium ( $p \leq 0,001$ ) et de 37,5% en présence du zinc ( $p = 0,025$ ) sont notées. À faibles teneurs en cuivre, en cadmium et en zinc, les diminutions d'indice de stress enregistrées durant toute la durée de traitement sont nettement faibles et égales à 19, 35 et 8%, respectivement.

#### 4.3.3. Effet sur la teneur en proline

L'évolution de la quantité de proline dans *L. gibba* cultivée dans les différents milieux de culture contaminés par le cuivre, le cadmium et le zinc, à différentes concentrations est illustrée par la Figure 4.4.

La quantité de proline, dans les plantes cultivées dans les milieux témoins, a évolué lentement pendant la durée de culture (0,2 à 0,6  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF) soit une augmentation de 67%.

Par ailleurs, nous constatons une augmentation de la teneur en proline, dans les plantes des milieux de cultures fortement contaminés, durant les quatre premiers jours de traitement, suivie d'une chute assez rapide pour atteindre des valeurs comparables aux témoins. En effet, après 4 jours d'exposition de la plante au cuivre, au cadmium et au zinc les taux de proline enregistrés sont : 1,75  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF en présence du cuivre à  $10^{-1}$   $\text{mg L}^{-1}$  ( $p \leq 0,001$ ) ; 3  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF en présence du cadmium à  $10^{-1}$   $\text{mg L}^{-1}$  ( $p \leq 0,001$ ) et 1,25  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF en présence du zinc à 30  $\text{mg L}^{-1}$  et une teneur de 0,45  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF dans le témoin.

Aux faibles concentrations en cuivre et cadmium, les teneurs maximales en proline sont observées après 6 jours (0,87  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF en présence du cuivre ; 0,98  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF en présence du cadmium à  $10^{-1}$   $\text{mg L}^{-1}$ ). Il apparaît donc, que le cadmium est le métal le plus influant sur l'évolution de la quantité de proline dans la plante où une teneur maximale de 3  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MF a été observée après 4 jours d'expérience.

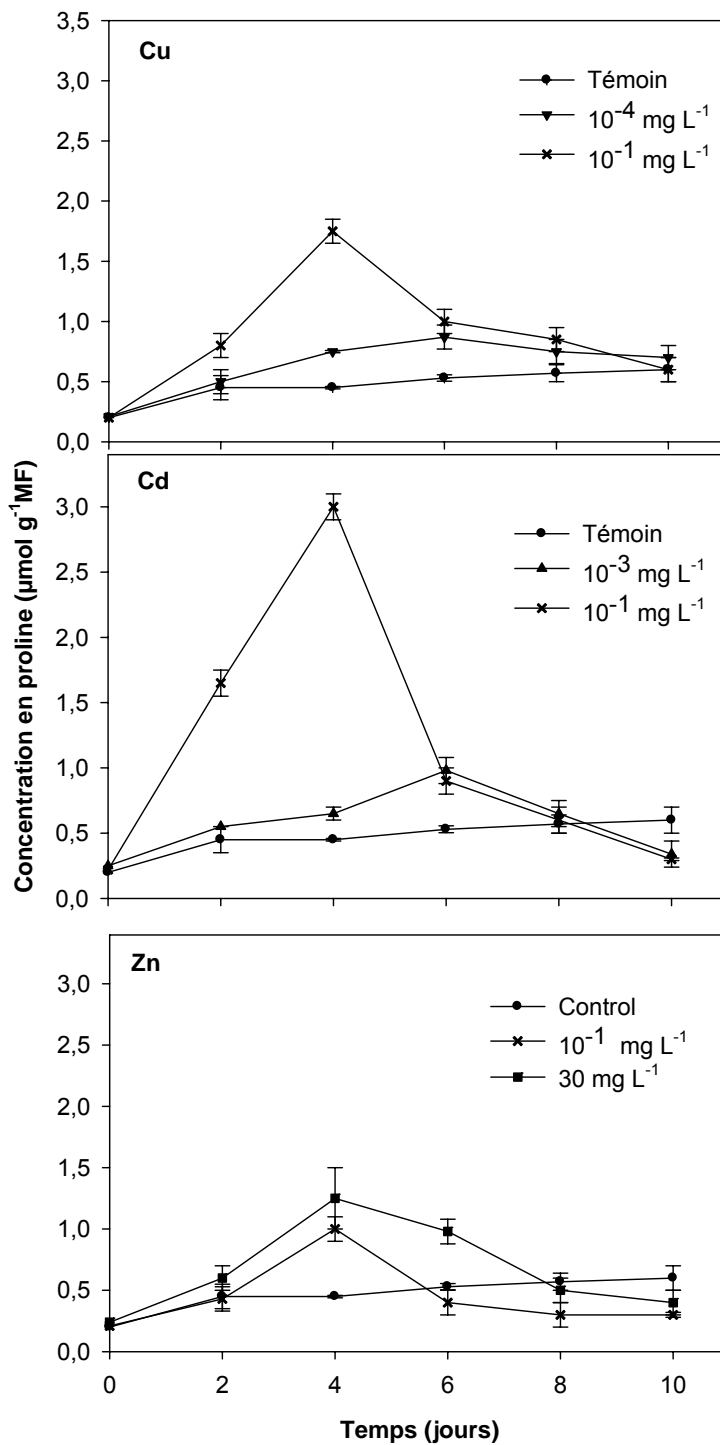


Figure 4.4. Teneurs en proline en fonction de temps (valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types,  $n=3$ )

#### 4.3.4. Rétention du cuivre, du cadmium et du zinc par *L. gibba*

Les variations des taux de rétention du cuivre, du cadmium et du zinc en fonction de temps sont représentées par la Figure 4.5.

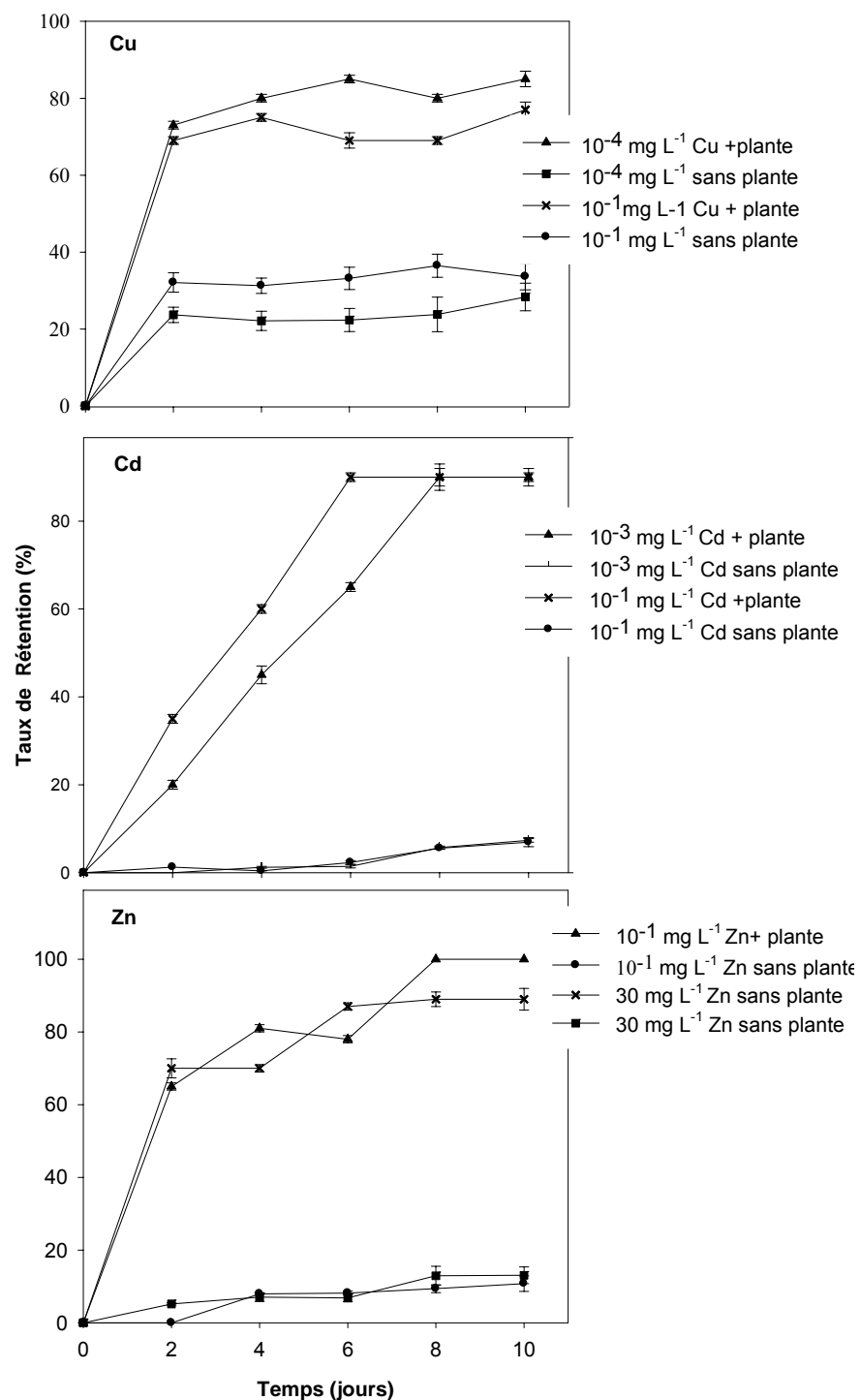


Figure 4.5. Taux de rétention de Cd, Cu et Zn en fonction du temps (valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types, n=3)

En absence de la lentille d'eau, contrairement au cadmium et au zinc, les taux d'élimination du cuivre sont importants (22 à 36%). En présence de la plante, la cinétique de rétention du cuivre et zinc se produit principalement en deux étapes :

- Une première phase, d'une durée de deux jours, caractérisée par des taux de rétention élevés. Les taux de rétention sont de 73 et 69% en présence de  $10^{-4}$  et  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> de cuivre et de 65 et 70% en présence de  $10^{-1}$  et 30 mg L<sup>-1</sup> en zinc. La rétention du cuivre est plus importante durant les six premiers jours où des taux de rétention variant entre 65 et 90% ont été obtenus.
- Une deuxième phase est caractérisée par une lente augmentation du taux de rétention de zinc pour atteindre les 89 et 100% après dix jours, une tendance de stabilité du taux de rétention du cuivre entre 77 et 85%.

La courbe de rétention du cadmium est différente à celle observée en présence des deux autres métaux. En effet, l'élimination du cadmium est linéaire et dépendante de la concentration initiale en métal. Des taux de rétention de 90% sont enregistrés après 6 et 8 jours de culture pour des concentrations initiales de  $10^{-1}$  et  $10^{-4}$  mg L<sup>-1</sup> respectivement.

#### 4.4. Discussion

Le cuivre est un micronutriment essentiel pour un déroulement normal des processus métaboliques des plantes, par son rôle crucial dans plusieurs métallo-enzymes et dans la structure des membranes. Cependant, il a été cité dans plusieurs travaux comme le métal le plus toxique [170].

Sa forte accumulation dans les tissus de la plante affecte parfois significativement plusieurs processus physiologiques et biochimiques comme la réduction de l'activité photosynthétique [95,171], métabolisme de l'azote, production des amino-acides [172,173] ainsi que la croissance [74,174].

À travers nos résultats, le cuivre s'avère toxique pour *L. gibba*. En effet, un taux d'inhibition de la croissance variant entre 29 et 75% en présence de  $10^{-4}$  et  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> a été observé.

L'ensemble des symptômes, observés à fortes concentrations, reflètent l'intensité et la diversité des perturbations engendrées sur le fonctionnement cellulaire.

L'inhibition de la croissance a été déjà observée en présence de ce métal et qui suggère des problèmes de division et/ou d'élongation cellulaire [74]. Une hypothèse d'explication de cette inhibition est liée au stress oxydant généré par le cuivre. Celui-ci entraîne la formation de dérivés secondaires (aldéhydes,  $H_2O_2$  etc.) qui sont des éliciteurs de la réponse systémique à une infection pathogène [175].

L'apparition de chlorose à cause du cuivre a été rapportée chez différentes espèces aquatiques [70,71].

Selon Sudhakar et al., [174], l'effet sur la croissance et la teneur en chlorophylle est marqué par des concentrations en cuivre supérieures à 4  $\mu M$ . Cette diminution est accompagnée de forte nécrose. Au cours de notre étude parallèlement aux inhibitions de la croissance, une dégradation des pigments photosynthétiques est produite par des réductions importantes du rapport  $DO_{665}/DO_{665a}$  (19 à 81% en présence de  $10^{-4}$  et  $10^{-1}$   $mg L^{-1}$  de cuivre, respectivement).

Ceci confirme l'existence possible d'une relation entre la dégradation des pigments due à un stress oxydatif et la toxicité du cuivre [58,175].

Par comparaison des inhibitions de la croissance enregistrées aux réductions d'indices de stress, en présence du cuivre, nous pouvons conclure que les sensibilités sont similaires.

Comparativement au cuivre, le ralentissement conséquent de la croissance causé par le cadmium a été accompagné par une baisse importante de l'indice de stress particulièrement à  $10^{-1}$   $mg L^{-1}$ . Les inhibitions du rapport  $DO_{665}/DO_{665a}$  sont de 89 et 86% après 10 et 2 jours de culture respectivement alors que les inhibitions de la croissance sont de 37 et 50% seulement. Dans ce cas, l'indice de stress peut être un bon biomarqueur pour l'évaluation de la toxicité du cadmium.

Physiologiquement, cette forte sensibilité indique que la dégradation de la pigmentation est un phénomène très rapide en réponse à la toxicité du cadmium.



Par ailleurs, les symptômes observés en présence du cuivre sont plus intenses en présence du cadmium avec un détachement des racines de quelques colonies.

Des chercheurs [176] ont signalé plusieurs symptômes de toxicité (plantes pâles et transparentes), observés sur des plantes cultivées dans des milieux contenant  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de cadmium. Ces effets sont immédiatement (24 h d'exposition) observés en présence de forte concentration en cadmium ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Contrairement aux deux autres métaux testés (Cd et Cu) l'effet du zinc sur la croissance (50 à 79% d'inhibition de la croissance) et sur l'indice de stress (une chute d'indice de 37%) n'est visible qu'aux fortes concentrations ( $> 4 \text{ mg L}^{-1}$ ) avec absence des symptômes. L'absence des symptômes a été rapportée [166], en présence de  $7,1 \text{ mg L}^{-1}$  de zinc.

Par ailleurs, Drost et al., [9] ont trouvé qu'après 7 jours d'exposition, le cadmium et le cuivre ont manifesté une forte toxicité pour *Lemna* ( $EC_{50}$  de 1,9 et  $9,7 \text{ }\mu\text{M}$  respectivement), alors que le zinc a montré une faible toxicité ( $EC_{50}$  de 56,3 et  $46,1 \text{ }\mu\text{M}$  respectivement). Il apparaît donc que le cadmium est le métal le plus toxique pour *L. gibba*, suivi par le cuivre puis le zinc.

L'implication de la proline dans les réponses des plantes au stress salin, au stress hydrique et aux faibles températures est connue depuis un temps relativement long [178-180,184]. Il est rapporté une augmentation de cet acide aminé comme réponse générale au stress dans les plantes [182].

Au cours de notre expérimentation, les trois métaux testés, ont provoqué une augmentation transitoire de la proline dans la lentille *L. gibba*. La cinétique d'accumulation passe par un maximum après 04 jours de culture suivi d'une chute pour atteindre des quantités en proline proches à celles trouvées dans le témoin. Les teneurs de la proline en présence de cadmium sont les plus élevées comparativement aux deux autres métaux. En effet, une augmentation rapide de la quantité de cet acide aminé, ayant atteint  $3 \text{ }\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$  (soit un taux d'augmentation de 567%),  $1,75 \text{ }\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$  (soit une augmentation de 289%) et  $1,25 \text{ }\mu\text{mol g}^{-1} \text{ MF}$  (soit une augmentation de 122%) a été constatée dans les milieux de culture contenant  $10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$  de cadmium, de cuivre et de zinc respectivement. Ceci confirme les résultats obtenus avec la croissance et l'indice de stress.

L'accumulation de la proline en réponse à un excès de métaux tels que le cuivre, le cadmium, le zinc et nickel dans les plantes a été examinée par plusieurs chercheurs [183,184]. Paradoxalement, les hydrophytes n'accumulent pas la proline alors que nos résultats et d'autres travaux ont décrit l'accumulation de cet acide aminé [112,185]. La cinétique d'accumulation se traduit généralement par une augmentation suivie d'une chute par contre l'instant correspondant au maximum est différent. En effet, une augmentation rapide de la quantité de la proline dans *L. minor* soumise à 10 mg L<sup>-1</sup> en zinc et 5 mgL<sup>-1</sup> en cuivre, durant l'intervalle 12 à 24 h a été constatée par [112]. Bien que la plupart des métaux induit une accumulation de la proline, leur effets dépend du matériel végétal, du métal et de sa concentration. Le cuivre, en concentration équimolaire, induit une forte accumulation de la proline dans *Silene vulgaris*, suivi par le cadmium et le zinc selon [186].

#### 4.4.4 Rétention du cuivre, cadmium et zinc

Les résultats de la cinétique de disparition des trois métaux, dans les milieux de culture sans plante, montrent une faible élimination du cadmium et du zinc (inférieure à 11%) signifiant que les taux d'élimination observés sont dus à la lentille d'eau *L. gibba*. Au contraire, sans plante, 23 à 36% du cuivre ont été éliminés des milieux de culture, vraisemblablement par des phénomènes de précipitation et d'adsorption. En effet, Kamal et al., [141], ont trouvé que 50% du cuivre peut précipiter sous forme d'orthophosphate de cuivre  $Cu_3(PO_4)_2$  et l'autre partie est due à la présence des macrophytes. En présence de la lentille *L. gibba*, la cinétique de la rétention du cuivre et du zinc est rapide durant les deux premiers jours suivi d'une augmentation graduelle durant la deuxième phase. L'élimination du cadmium se fait graduellement pour atteindre 90%.

Avec d'autres macrophytes (*Spirodela polyrhiza*, *Pistia stratiote* et *Eichhormia crassipes*), Mishra et Tripathi [187], ont constaté une élimination du cadmium plus faible que celle du cuivre et du zinc. Ceci est lié à l'importance de ces deux éléments comme micronutriments indispensables aux plantes alors que le cadmium n'a aucun rôle. La lentille d'eau utilisée au cours de cette étude en l'occurrence *L. gibba* a montré une bonne efficacité, dans l'élimination du zinc, cadmium et cuivre, où des taux d'élimination de 100, 90 et 77%

respectivement, ont été enregistrés après 10 jours de traitement. Ces performances sont supérieures à celles obtenues en présence de *Myriophyllum aquaticum*, *Ludwigia palustris* et *Mentha aquatica* (42 et 34% d'élimination de cuivre et de zinc, respectivement) après deux semaines de culture [141].

L'accumulation des métaux par les plantes est un phénomène complexe, il varie d'une espèce à une autre et dépend des propriétés de chaque élément. *L. minor*, par exemple, est capable d'accumuler des quantités dépassants 3 g de zinc et de cuivre par kg de matière sèche [13,86]. L'accumulation peut se faire par une simple adsorption sur la surface de la biomasse. En effet, des pourcentages d'éliminations du zinc et du cuivre variant entre 63 et 94% d'une eau contenant 10 et 20 mg L<sup>-1</sup> respectivement, par la lentille d'eau *L. minor* morte, ont été obtenus par [188]. Cette adsorption est attribuée à un échange entre un métal monovalent présent dans la biomasse de la macrophyte, le métal et le proton de la solution à traiter. Cependant, une importante fraction des métaux peut passer à l'intérieur de la cellule [189]. Plusieurs mécanismes sont mis en jeu [190]. Par exemple, la complexation avec la phytochélatine est connue comme étant le mécanisme le plus important dans l'élimination du cadmium et du cuivre. Le zinc, par contre, semble être séquestré par la métallothionine et non par la phytochélatine, puis transporté à l'intérieur de la vacuole [191,192]. Dans un travail récent, des chercheurs [3] ont montré que la contribution de la précipitation chimique à l'élimination du zinc est plus importante que celle de la lentille d'eau *L. gibba*. Le bilan de masse établi révèle des pourcentages d'élimination, sous forme de phosphate de zinc Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, entre 49 et 68% pour des concentrations initiales comprises entre 6 et 18 mg L<sup>-1</sup>, respectivement.

#### 4.5. Conclusion

À travers cette étude, l'ensemble des paramètres utilisés, pour évaluer la toxicité des trois métaux lourds vis-à-vis de la lentille d'eau *L. gibba*, ont montré que le cadmium est le plus toxique suivi par le cuivre et le zinc.

L'indice de stress ( $DO_{665}/DO_{665a}$ ) s'est avéré le plus sensible et par conséquent, il peut être proposé comme un très bon biomarqueur de la pollution métallique. D'autre part, les amplitudes de changement de la quantité de la proline plus importantes, font de cet acide aminé un bon indicateur de la toxicité. Cependant, les transitions enregistrées au cours de son accumulation, sous l'effet des métaux, représentent un inconvénient majeur pour son utilisation comme unique biomarqueur. Les résultats trouvés au cours de cette étude, confirment les capacités d'accumulation de *L. gibba* vis-à-vis du cuivre, du cadmium et du zinc et son grand potentiel pour une phytoremédiation.

## CHAPITRE 05

### EFFETS DE L'ASSOCIATION DU CUIVRE ET DU DIMÉTHOMORPHE SUR LEUR TOXICITÉ ET LEUR ÉLIMINATION PAR LA LENTILLE D'EAU *L. minor*

#### 5.1. Introduction

De tous les contaminants des écosystèmes terrestres et aquatiques, les métaux lourds sont parmi les plus préoccupants en raison de leur toxicité, de leur rémanence, du caractère bioaccumulable de certains (bioconcentration et bioamplification) et de l'absence d'efficacité de leur élimination par les systèmes classiques d'épuration des eaux. Le cuivre est l'un des plus étudiés d'entre eux, avec le cadmium et le mercure, et figure parmi les principaux polluants de l'hydrosphère [193]. La contamination des eaux, des sédiments, et des sols, par le cuivre résulte de l'utilisation des produits à base de cuivre dans l'agriculture comme engrais, fongicides, herbicides, algicides et molluscides [194,195].

En raison des possibilités d'existence simultanée des métaux lourds et autres contaminants comme les produits phytosanitaires, leurs comportements se trouvent modifiés dans les écosystèmes aquatiques. En effet, la compréhension des différents types d'interaction entre les métaux et les pesticides est d'une importance capitale en écotoxicologie pour toute éventuelle application de la phytoremédiation. Ces interactions entre les polluants peuvent conduire à des synergies, des additivités ou des antagonismes. Lorsqu'on s'intéresse à l'évaluation des risques écotoxicologiques, les synergies sont souvent considérées comme étant les interactions les plus dangereuses dans la mesure où elles sont difficilement prévisibles et conduisent à une augmentation, qui peut être très forte, des effets toxiques individuels. Dans les mélanges métalliques, des phénomènes de potentialisation de toxicité ont également été décrits [196,197]. La synergie apparaît essentiellement lorsque les composants des mélanges ont des modes d'action différents [198,199]. Ce type d'interaction positive, recherchée pour des applications agronomiques précises [200], semble être, cependant, peu fréquent du point de vue écotoxicologique.

Bien que moins spectaculaire que la synergie, l'additivité demeure néanmoins très préoccupante en termes de risques écotoxicologique.

Lorsque plusieurs contaminants sont présents dans un milieu, ils génèrent individuellement leur propre effet toxicologique et, bien que chacun d'eux pris isolément soit peu toxique pour les organismes qui y vivent, l'accumulation de ces petits effets peut sérieusement augmenter la toxicité du milieu. Les antagonismes quant à eux représentent une situation que l'on peut qualifier de « moins pire » que les deux précédentes, bien qu'elle ne soit cependant pas sans danger non plus. En conclusion, les dangers liés aux mélanges de contaminants ne proviennent donc pas uniquement d'actions synergétiques. Les situations d'additivité et d'antagonisme peuvent également présenter des dangers et doivent être sérieusement prises en compte dans la mesure où elles sont très fréquentes.

Les travaux de recherches réalisés, sur les interactions entre métaux en particulier le cuivre et pesticides, ont montré que le type de ces derniers dépend de la nature du pesticide et de sa concentration [171,201-204].

Selon ces auteurs, la présence simultanée du cuivre et quelques pesticides comme le folpel et le flumioxazin, modifié leur toxicité. Ils ont constaté que la combinaison du cuivre avec le flumioxazin et des fongicides antibotrytiques affectent l'activité photosynthétique de *L. minor* avec l'existence des trois types d'interactions (antagonisme, synergisme et additivité) entre le métal et les pesticides testés. L'impact de la présence simultanée du cuivre et des pesticides sur la capacité de rétention de *L. minor*, des contaminants est peu étudiée. Cependant, Olette et al. [95] ont trouvé que le diméthomorphe seul (sous sa forme forum) induit une faible inhibition de la capacité photosynthétique de *L. minor* et que la capacité maximale de rétention du cuivre et ce fongicide considérés séparément était de 30 et 11% respectivement. Au cours de notre étude, les effets du cuivre et du diméthomorphe seuls et en combinaison sur la lentille d'eau *L. minor*, sont évalués en premier lieu.

Dans une deuxième étape, la capacité d'élimination de ces deux contaminants par cette plante aquatique [58, 90, 117, 171].

## 5.2. Méthodes et matériels

### 5.2.1. Produits testés

#### 5.2.1.1. Cuivre

Le cuivre est connu depuis longtemps au niveau du vignoble puisqu'il entre dans la composition de la bouillie bordelaise (mélange de sulfate de cuivre et de chaux) qui est un fongicide luttant contre le développement du mildiou et de l'oïdium, deux champignons parasites très courants en Champagne-Ardenne (France). La bouillie bordelaise est utilisée de façon traditionnelle en viticulture pour lutter contre le mildiou depuis plus d'une centaine d'années [205]. Il s'agit d'une solution de sulfate de cuivre neutralisée par de la chaux éteinte qui est employée en application foliaire par pulvérisation sur différentes cultures (viticulture et arboriculture essentiellement). Les solutions de sulfatages contiennent en général 500 g Cu hL<sup>-1</sup> et les apports sont de 2,5 à 4 kg ha<sup>-1</sup> [206]. De plus le cuivre entre dans la composition de nombreux autres mélanges de produits phytosanitaires, tels que le folpel, le cymoxanil, le mancozèbe [206]. De ce fait, le cuivre est un métal que l'on retrouve très couramment au niveau des eaux superficielles, parfois jusqu'à 400 µg L<sup>-1</sup> [207]. L'effet du cuivre sur les végétaux est actuellement très bien décrit dans la littérature. Le cuivre a de nombreux sites d'action au niveau de l'appareil photosynthétique. Si ce métal s'avère indispensable à la physiologie de la plante, en excès il peut avoir de nombreuses conséquences dont le blocage du transport d'électrons photosynthétiques, l'induction d'un stress oxydant, la diminution de la fixation de CO<sub>2</sub> [208-210].

#### 5.2.1.2. Diméthomorphe

Le fongicide choisi dans cette étude est un anti-botrytique, c'est-à-dire qu'il contribue à lutter contre le développement du *Plasmopara viticola*, champignon phytopathogène responsable du mildiou du vignoble (attaque des feuilles, des rafles, des baies). Le Forum est actif contre les mildious et autres maladies du genre *Phytophthora* ou *Plasmopara* (notamment *Plasmopara viticola*) ainsi que sur la famille des *Peronosporaceae*.

Le diméthomorphe appartient au groupe chimique des dérivés de l'acide cinnamique [(E,Z) 4-[3-(4-chlorophényl)-3(3,4-diméthoxyphényl)- acryloyl] morpholine].

Il s'agit d'une molécule dont le mode d'action biochimique n'est pas complètement élucidé mais le diméthomorphe inhibe la biosynthèse des parois cellulaires [211].

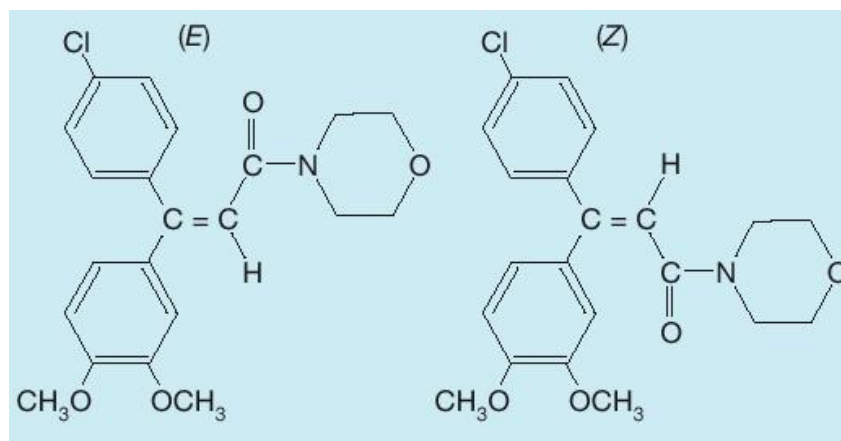


Figure 5.1. Représentation de la molécule du diméthomorphe

Le Tableau 5.1, regroupe quelques propriétés élémentaires du diméthomorphe

Tableau 5.1. Propriétés élémentaires du diméthomorphe [212]

Propriétés	Valeurs
Solubilité dans l'eau ( $\text{mg L}^{-1}$ ) à pH 7 et $20^\circ\text{C}$	47,2 E et 10,7 Z
$\text{DT}_{50}$ dans la nature (jours)	10 à 61
$\text{DT}_{50}$ dans l'eau (jours)	5 à 15
Coefficient d'adsorption $K_{oc}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	290 à 566
$\text{CL}_{50}$ (poissons) $\mu\text{g L}^{-1}$	3400
Concentration sans effet à long terme $\mu\text{g L}^{-1}$	5,6
Concentration sans effet à court terme $\mu\text{g L}^{-1}$	34

DT : temps de demi-vie.



### 5.2.2. Concentrations choisies

Au cours de cette étude, les concentrations en produits testées sont choisies en fonction de celles susceptibles d'être retrouvées dans les écosystèmes aquatiques.

#### 5. 2.2.1. Contaminants seuls

- Le cuivre

Une solution mère de cuivre de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  de cuivre est préparée par dissolution du sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Fontenay sous Bois, France) dans de l'eau distillée. Cette solution a servi à la préparation des milieux de cultures contenant 50, 100, 200, 300, 600 et  $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  et dépourvues d'EDTA afin d'éviter la complexation des ions métalliques.

- Le diméthomorphe

Le diméthomorphe, sous forme commerciale Forum<sup>®</sup> ( $150 \text{ g L}^{-1}$ , BASF, France) et sous forme de matière active pure (97%, BASF, France) a été utilisé pour la préparation des milieux de cultures contaminés par 40, 200, 400, 800 and  $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de diméthomorphe.

#### 5.2.2.2. Les mélanges cuivre –diméthomorphe

Le diméthomorphe est susceptible de se retrouver en présence du cuivre dans l'environnement. Les concentrations choisies pour déterminer les interactions entre ces deux contaminants sont 10, 20 et  $30 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  pour le cuivre et 250, 500 et  $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  pour le diméthomorphe.

Ces valeurs sont des concentrations moyennes comparables à celles de l'environnement aquatique [171,213]. Pour chaque contaminant, les concentrations sont retenues pour leur représentativité environnementale d'une part, leur validité pour l'application de la formule d'Abott's, d'autre part (Inhibition induite par chaque contaminant doit être inférieure à 70 % [200]).

#### 4.2.3. Mode de contamination et culture

Les lentilles mises en expérience sont prélevées à partir d'une culture stock, placées dans une enceinte thermostatée ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) sous une photopériode de  $60 \mu\text{moles PAR. m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Le milieu de culture utilisé est celui de Chollet,[214] caractérisé par la composition suivante ( $\text{mg L}^{-1}$ ) :

$\text{CaCl}_2$ , 11,1;  $\text{KNO}_3$ , 202 ;  $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ , 49,6 ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50,3 ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 27,8 ;  $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ , 6 ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 17,4 ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 5,72 ;  $\text{MnCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$ , 2,82 ;  $\text{ZnSO}_4$ , 0,6 ;  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 10 ;  $\text{CuCl}_2.\text{H}_2\text{O}$  , 0,008;  $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$ , 0,054 ;  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}.4\text{H}_2\text{O}$ , 0,043.

Les proportions en volume nécessaires à la préparation d'un litre de ce milieu de culture sont regroupées dans le tableau 5.2 (Appendice 2).

Les frondes sélectionnées ne doivent pas présenter de nécroses, de chloroses ou de contaminations algales. Vingt frondes de taille identique sont placées dans des Erlenmeyers de 150 mL contenant 50 mL de milieu de culture stérile contaminé par le cuivre et/ou le diméthomorphe.

Les Erlenmeyers sont ensuite placés dans les mêmes conditions que celles de la culture stock. Le pH du milieu de culture est ajusté à  $6,5 \pm 0,1$  avant stérilisation. Le cuivre est ajouté au milieu de culture sans EDTA avant stérilisation. Dans les mêmes conditions des cultures sont réalisées dans des milieux sans cuivre servant de témoin.

#### 5.2.4. Mesure de la toxicité

Le paramètre considéré pour la mesure de la toxicité du cuivre et du diméthomorphe est la croissance de la lentille d'eau. C'est le paramètre le plus fréquemment retenu pour l'évaluation de la phytotoxicité [72,92]. Il consiste à compter le nombre de frondes aux différents instants. La croissance relative,  $C(\%)$ , ainsi que les taux d'inhibition de la croissance,  $\text{In}(\%)$ , sont calculés selon les formules décrites au paragraphe 4.2.4.1.

#### 5.2.5. Combinaison du cuivre et diméthomorphe

Les tests de la phytotoxicité des mélanges des deux contaminants (cuivre et diméthomorphe) sont effectués selon la méthodologie générale décrite aux paragraphes (5.2.2.2 et 5.2.3). Le type d'interaction entre les deux contaminants est évalué par la formule d'Abott's [200].

Dans ce modèle, l'inhibition théorique du mélange,  $I_{th}$ , exprimée en pourcentage est déterminé selon la formule suivante :

$$I_{th} = I_A + I_B - \left( \frac{I_A * I_B}{100} \right) \quad (5.3)$$

Où  $I_A$  et  $I_B$  représentent les inhibitions causées par les contaminants seuls (cuivre et diméthomorphe, respectivement).

Le rapport d'inhibition ( $RI$ ) correspondant à chaque combinaison est calculé selon l'équation suivante :

$$RI = \frac{I_{obs}}{I_{th}} \quad (5.4)$$

Les valeurs de ce rapport sont comparées à 1 :

Des valeurs de ( $RI$ ) supérieures à 1, indiquent une synergie entre les deux contaminants. Des valeurs de ( $RI$ ) inférieures à 1, signifient un antagonisme entre les deux produits. Des valeurs de  $RI$  égales à 1 correspondent à une additivité des effets.

#### 5.2.6. Suivi des concentrations en contaminants

Les concentrations en cuivre et en diméthomorphe dans les milieux de cultures sont déterminées dans les échantillons initialement contaminés, après 96 et 168 h de culture. La teneur en cuivre dans la plante a fait l'objet d'une évaluation. En effet, les frondes récupérées, pesées puis séchées pendant 48 h à 60°C sont à nouveau pesées (0,1 g), broyées, et digérées par un mélange (4 mL) d'acide nitrique  $HNO_3$  à 65% et de peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  à 30% avec un ratio 1:1 [9].

L'extrait obtenu est dilué dans l'acide nitrique à 0,3% puis analysé.

##### 5.2.6.1. Dosage du cuivre

Le dosage du cuivre est réalisé par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique. Le système comporte un spectrophotomètre d'absorption atomique SpectrAA Zeeman 220 (Varian<sup>®</sup>, Les Ulis, France) équipé d'un four pour tube graphite de qualité pyrolytique balayé par un courant d'Argon et d'un échantillonneur automatique. L'appareil est piloté par le logiciel SpectrAA 220 2.10 FS sous Windows 98.

Avant chaque mesure, les échantillons sont acidifiés avec de l'acide nitrique concentré (63%, qualité analytique, Merck).

Le détecteur est réglé pour une longueur d'onde d'absorption de 327,4 nm (largeur de la fente 0,5 mm).

Dix  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont séchés dans le four à  $120^\circ\text{C}$  puis décomposés par pyrolyse à  $300^\circ\text{C}$  avant d'être atomisés à  $2300^\circ\text{C}$  (Appendice 7). Le débit d'Argon à l'intérieur du four est réglé à  $3 \text{ mL mn}^{-1}$ , stoppé au moment de l'atomisation, puis à nouveau déclenché à la fin de la mesure.

Avant chaque mesure, une gamme étalon de concentration comprise entre 0 et  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  est analysée (courbe d'étalonnage annexée en appendice 6).

#### 5.2.6.2. Dosage du diméthomorphe

Le dosage du diméthomorphe a été réalisé par une chaîne de Chromatographie Phase Liquide à haute Performance (HPLC : High Performance Liquid Chromatography, système Prostars, Varian®). Elle est composée d'un dégazeur d'éluant afin d'éviter les variations de pression au sein de la colonne. L'injection des échantillons ( $20 \mu\text{L}$ ) s'effectue automatiquement. La molécule est séparée sur colonne en phase inversée en C18 (100 mm x 3 mm, Pursuit XRs 5, Varian, France).

L'éluion dure 4 min avec un mélange de 60% d'acétonitrile additionné à 40% d'eau distillée, acidifié par l'acide ortho-phosphorique (0,1%), circulant à  $0,8 \text{ mL mn}^{-1}$ . La détection du produit s'effectue à 246 nm. L'identification des pics d'absorption sur le chromatogramme s'effectue sur la base des temps de rétention (Figure 5.31 , appendice 7 ).

#### 5.2.7. Elimination du cuivre et diméthomorphe

Les taux d'élimination du cuivre et du diméthomorphe par la lentille d'eau sont calculés par la formule décrite au paragraphe 4.2.5.

Des témoins sans plante ont servi au suivi des éventuelles disparitions des contaminants des milieux de culture (Figure 5.32 , appendice 7).

### 5.2.8. Analyse statistique des résultats

Chaque test de toxicité a fait l'objet de trois expériences indépendantes ; pour chaque concentration, deux répétitions sont réalisées. Les tests de phytoremédiation ont fait l'objet de deux expériences indépendantes et pour chaque concentration deux répétitions ont été réalisés. Les résultats présentés représentent les moyennes arithmétiques avec leurs écarts-types correspondants. Les analyses statistiques sont réalisées avec SigmaStat 3.5 (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA) sous Windows. Des différences significatives entre les témoins et les échantillons contaminés sont évaluées par le t-test de Student's où des valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme significatives.

## 5.3. Résultats et discussion

### 5.3.1. Effets du cuivre et diméthomorphe sur la croissance de *L. minor*

Les effets du cuivre et du diméthomorphe sur la croissance de *L. minor* sont présentés dans la Figure 5.4. La Figure 5.4 montre que la croissance est significativement inhibée par le cuivre. Après 96 h, les inhibitions varient entre 16% et 73%. Cet effet inhibiteur augmente avec la durée du traitement et la concentration de cuivre. Après 168 h, une inhibition maximale de 90% est observée en présence de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Des concentrations en cuivre comprises entre 10 et  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , entraînent des inhibitions de 25 à 40%. Contrairement au cuivre, le diméthomorphe, sous sa forme formulée ou à l'état pur, s'est avéré moins limitant de la croissance de *L. minor* (Figure 5.4). En effet, les taux de croissance enregistrés après 96 h, varient de 90 à 132% lorsque la concentration de diméthomorphe Forum passe de 40 à  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  (Tableau 5.2 ; appendice 8), soit un taux d'inhibition inférieur à 45% (Figure 5.4).

Après 168 h d'expérience, le taux d'inhibition a atteint des valeurs maximales ne dépassant pas les 50% à forte concentration en diméthomorphe (44% à  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Figure 5.4). En présence du diméthomorphe pur, les taux d'inhibition de la croissance, enregistrés à 96 h, sont inférieurs à 19%. Des valeurs variant entre 16.5 et 33% ont été enregistrées après 168 h.

Par ailleurs, l'observation des plantes exposées au cuivre ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ) montre une forte décoloration de leurs frondes (blanchissement) alors que le diméthomorphe n'induit aucun symptôme visible.

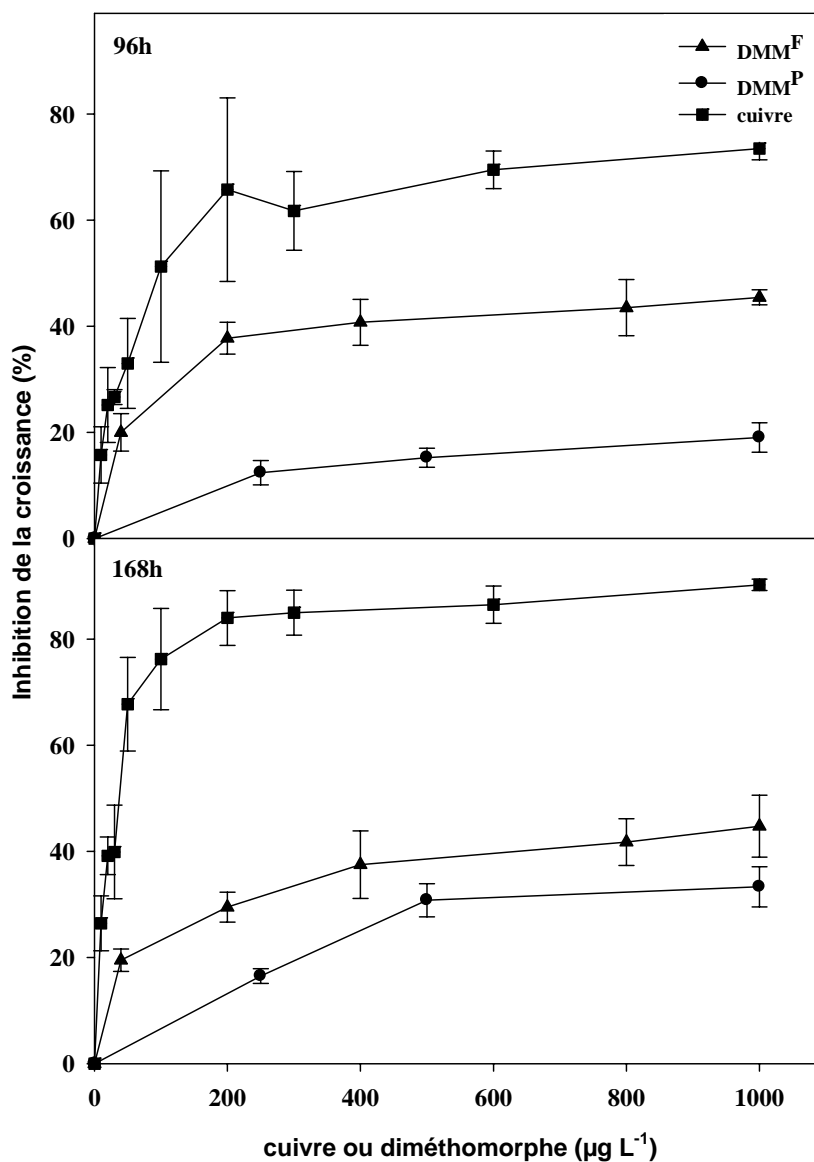


Figure 5.4. Inhibitions de la croissance après 96 et 168 h d'exposition au cuivre et au diméthomorphe (valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types, n=3)

L'effet d'existence simultanée du cuivre et du diméthomorphe (forum et pur) sur la croissance, a été réalisé en présence de 10, 20 et 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre et 250, 500 et 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de diméthomorphe (gamme dans laquelle l'effet d'inhibition généré par l'un des contaminant est inférieur à 70% ; limite de validité de l'équation 5.1 [200]).

L'inhibition de la croissance de *L. minor* exposée au mélange cuivre et diméthomorphe forum augmente avec l'augmentation de leurs concentrations (Tableau 5.4). En effet, après 96 h, l'augmentation de la concentration du cuivre de 10 à 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , induit des augmentations de l'inhibition de la croissance de 38 à 85%, de 45 à 93% et de 44 à 93% en présence de 250, 500 et 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de DMM<sup>F</sup> ( $p < 0,005$ ). En outre, les inhibitions de la croissance observées, dans les mélanges cuivre – DMM<sup>F</sup>, sont supérieures à la somme des inhibitions des contaminants seuls. Par exemple, après 96 h l'inhibition causée par 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre est de  $15,75 \pm 5,30\%$ , celle de 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de DMM<sup>F</sup> est de  $38,00 \pm 10,60\%$  et celle du mélange est de  $75,75 \pm 11,00\%$  ( $p < 0.05$ ). Ceci indique une synergie entre les deux contaminants illustrée par des valeurs du rapport d'inhibition supérieures à 1 (Tableau 4.4). Ces valeurs varient de 1,54 à 2,07 et de 1,24 à 1,46 après 96 et 168 h respectivement. La valeur la plus élevée est observée après 96 h de traitement en présence de 10 et 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de DMM<sup>F</sup> alors que celle la plus faible est observée après 168 h en présence de 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre (Tableau 5.6).

En présence du diméthomorphe pur les rapports d'inhibition sont proches de 1 (Tableaux 5.5 et 5.7). Elles varient de 0,92 à 1,26 et de 0,95 à 1,09 après 96 et 168 h respectivement, indiquant une simple additivité de l'effet des deux contaminants.

Tableau 5.4. Inhibition de la croissance (%) et rapports d'inhibition (RI) par les mélanges binaires de cuivre et de diméthomorphe forum après 96 h

Cuivre ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	DMM <sup>F</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	0	250	500	1000
0	0	38,00±10,60	45,45±6,40	43,76±5,33
10	15,75±5,30	75,75±11,00 <b>(1,58±0,30)</b>	77,27±8,50 <b>(1,74±0,13)</b>	80,30±11,00 <b>(2,07±0,55)</b>
20	25,15±7,07	84,09±9,60 <b>(1,57±0,27)</b>	85,60±11,00 <b>(1,55±0,21)</b>	87,12±6,12 <b>(1,93±0,39)</b>
30	26,66±1,41	84,84±7,70 <b>(1,55±0,22)</b>	93,18±07,80 <b>(1,54±0,15)</b>	86,06±7,06 <b>(1,84±0,43)</b>

Tableau 5.5. Inhibition de la croissance (%) et rapports d'inhibition (RI) par les mélanges binaires de cuivre et de diméthomorphe pur après 96 h

Cuivre ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	DMM <sup>P</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	0	250	500	1000
0	0	12,38±2,29	15,23±1,79	19,04±2,77
10	20,00±2,82	29,52±2,15 <b>(0,99±0,15)</b>	38,50±0,71 <b>(1,20±0,14)</b>	44,28±3,84 <b>(1,26±0,16)</b>
20	29,90±1,27	35,61±02,27 <b>(0,92±0,01)</b>	41,33±3,77 <b>(1,02±0,04)</b>	49,04±4,29 <b>(1,13±0,03)</b>
30	34,85±0,81	40,00±2,82 <b>(0,93±0,07)</b>	49,90±1,55 <b>(1,11±0,06)</b>	53,00±2,82 <b>(1,12±0,07)</b>



Tableau 5.6. Inhibition de la croissance (%) et rapports d'inhibition (RI) par les mélanges binaires de cuivre et de diméthomorphe forum après 168 h

Cuivre ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	DMM <sup>F</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	0	250	500	1000
0	0	43,50±2,80	45,25±5,30	43,76±11,00
10	26,46±5,17	82,96±11,60 <b>(1,38±0,22)</b>	84,18±7,07 <b>(01,46±0,20)</b>	85,70±10,50 <b>(1,46±0,17)</b>
20	39,17±3,53	82,96±6,01 <b>(1,33±0,11)</b>	85,40±3,53 <b>(01,38±0,17)</b>	87,22±12,50 <b>(1,41±00,18)</b>
30	39,90±6,10	89,66±7,07 <b>(1,24±0,11)</b>	92,70±08,60 <b>(01,28±0,17)</b>	93,30±7,50 <b>(1,32±0,18)</b>

Tableau 5. 7. Inhibition de la croissance (%) et rapports d'inhibition (RI) par les mélanges binaires de cuivre et de diméthomorphe pur après 168 h

Cuivre ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	DMM <sup>P</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
	0	250	500	1000
0	0	16,51±1,40	30,80±3,11	33,33±3,77
10	30,21±0,29	45,50±0,71 <b>(1,09±0,16)</b>	55,60±0,56 <b>(1,07±0,04)</b>	57,60±0,56 <b>(01,08±0,05)</b>
20	43,17±4,00	50,12±2,99 <b>(0,95±0,08)</b>	60,34±2,34 <b>(0,99±0,08)</b>	62,00±1,41 <b>(0,99±0,08)</b>
30	43,92±1,51	54,98±02,85 <b>(1,03±0,04)</b>	65,07±2,73 <b>(1,06±0,05)</b>	81,55±3,60 <b>(1,10±0,07)</b>

\*les chiffres entre parenthèses et en gras représentent les rapports d'inhibition (RI)

### 5.3.2. Rétention du cuivre et du diméthomorphe par la lentille d'eau *L.minor*

La Figure 5.5 montre les taux d'élimination du cuivre et du diméthomorphe après 96 et 168 h.

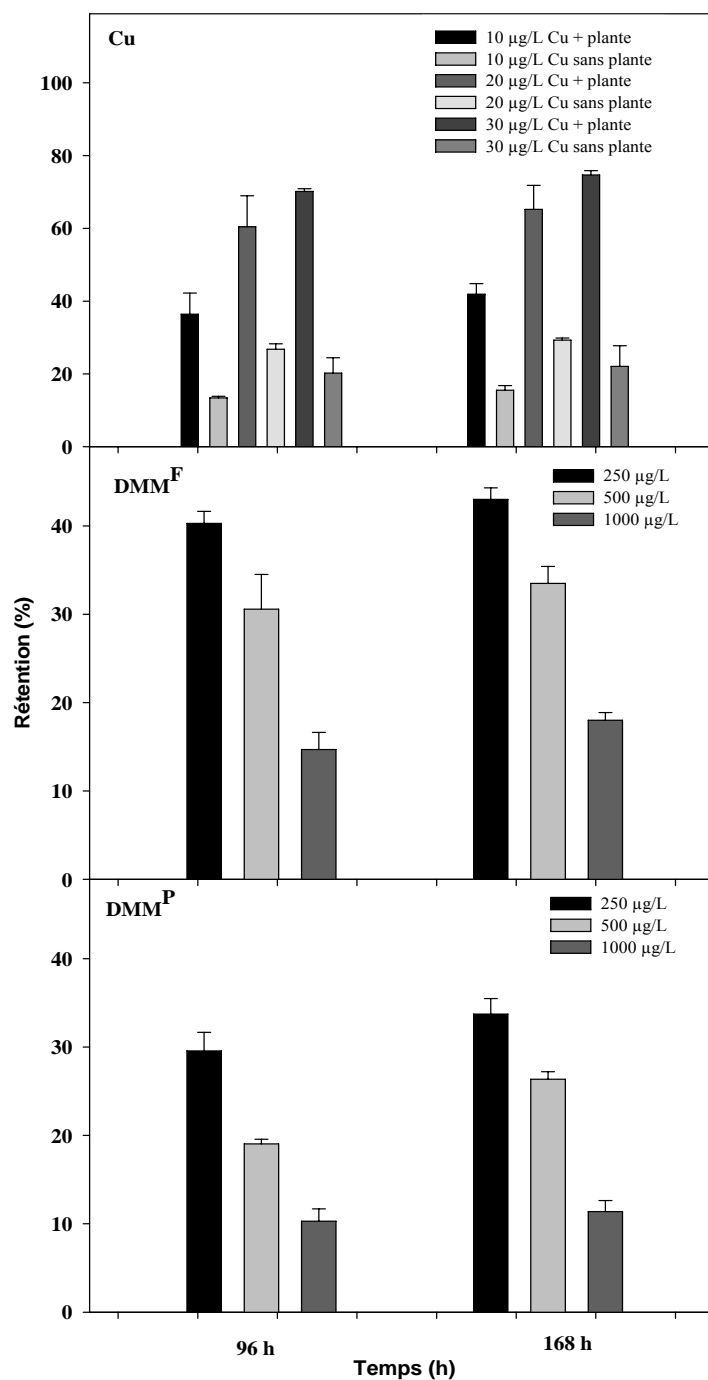


Figure 5.5. Pourcentages d'élimination du cuivre et du diméthomorphe (formulé et pur) des milieux de culture de la lentille d'eau *L. minor* à 96 et 168 h (valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types, n=3).

En absence de la plante, après 168 h de culture, la réduction des quantités de cuivre du milieu de culture est comprise entre 13 et 29% de la concentration initiale. En présence de *L. minor*, les pourcentages d'élimination sont plus importants, des valeurs de 42, 65 et 75% ont été obtenues à 10, 20 et 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre respectivement après 168 h de culture. Une légère différence entre les taux d'élimination observés après 96 et 168 h, le maximum d'élimination est atteint donc après 96 h (Figure 5.5). En présence de diméthomorphe forum, une légère augmentation de l'élimination de cuivre a été observée (Figure 5.6).

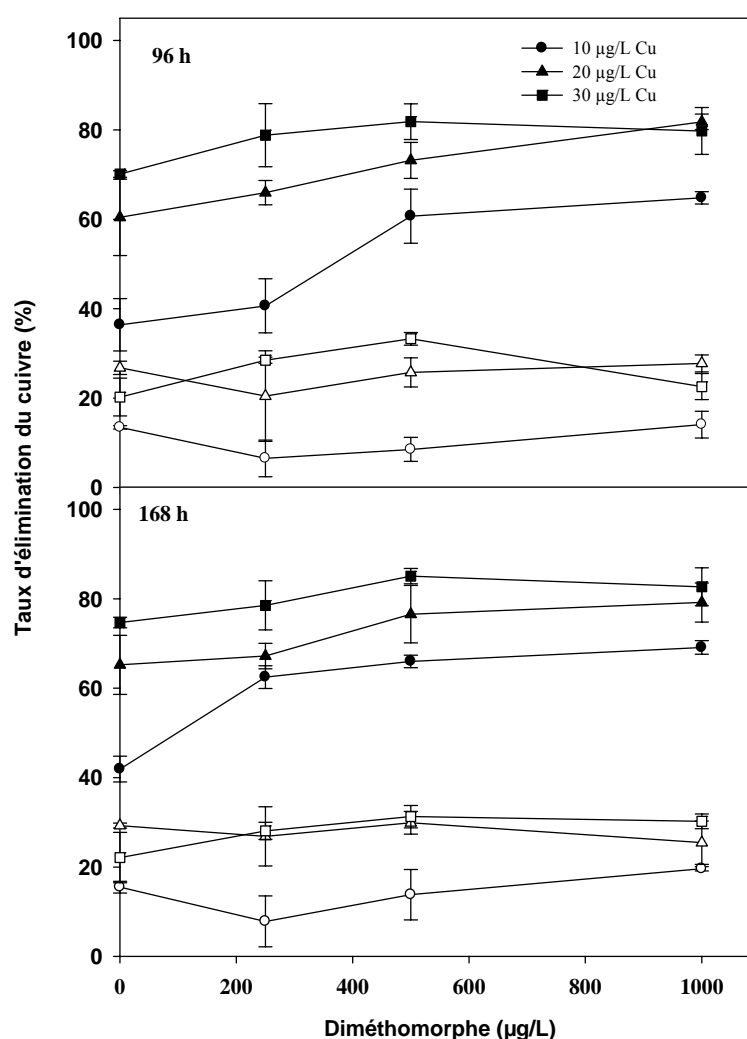


Figure. 5.6. Effet du diméthomorphe (DMM<sup>F</sup>) sur l'élimination du cuivre après 96 et 168 h. Symboles pleins en présence de la plante, symboles vides sans plante. (valeurs moyennes  $\pm$  écarts-types, n=3).

Cette élimination augmente avec la concentration en fongicide avec un effet apparent à 96 h. En effet, et à titre exemple, pour une concentration initiale en cuivre de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , le taux d'élimination passe de 36 à 65% ( $p < 0,05$ ) lorsque la concentration en DMM<sup>F</sup> passe de 0 à  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Après 168 h, lorsque la concentration en DMM<sup>F</sup> augmente de 0 à  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  la rétention du cuivre augmente de 42 à 69% ( $p < 0.05$ ); de 65 à 79% ( $p > 0.05$ ) et de 75 à 83% ( $p > 0.05$ ) pour des concentrations initiales en cuivre de 10, 20 et  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivement. Dans les mêmes conditions les quantités de cuivre accumulées dans la plante sont de  $9,6 \pm 0,20$ ;  $12,1 \pm 0,1$  et  $14,6 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$  MS. Cependant, la quantité de cuivre accumulée, après 168 h, en présence du DMM<sup>P</sup> est inférieure :  $7,4 \pm 0,10$ ;  $09,30 \pm 0,2$  et  $11,4 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$  MS.

Les éliminations de cuivre, des milieux de culture sans plante, ont conduit à une faible variation du pH (inférieure à 0,4 d'unité de pH) (Tableau 5.8). Cependant, la réduction de la concentration de ce métal, des milieux de culture en présence la plante, a été marquée par des augmentations de pH, variant de 2 à 3 unités de pH.

Tableau 5.8. Evolution du pH des milieux de culture sans et avec plante

Cuivre ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Temps (heures)		
	0	96	168
0	$6,52 \pm 0,03$	$7,70 \pm 0,29$ ( $6,89 \pm 0,10$ )	$9,27 \pm 1,45$ ( $6,90 \pm 0,04$ )
10	$6,46 \pm 0,20$	$7,53 \pm 0,44$ ( $6,90 \pm 0,01$ )	$8,66 \pm 0,68$ ( $6,89 \pm 0,26$ )
20	$6,42 \pm 0,04$	$7,43 \pm 0,44$ ( $6,86 \pm 0,09$ )	$8,75 \pm 1,02$ ( $6,82 \pm 0,01$ )
30	$6,46 \pm 0,04$	$7,48 \pm 0,42$ ( $6,87 \pm 0,06$ )	$8,75 \pm 0,99$ ( $6,86 \pm 0,04$ )

\*Les valeurs entre parenthèses correspondent aux variations de pH dans le témoin sans plante.

La concentration du DMM<sup>F</sup> dans les milieux de culture sans plante reste relativement stable. La variation reste inférieure à 5% durant les 168 h d'expérimentation (Figure 5.3) (Appendice 8). En présence de la plante, le taux d'élimination du diméthomorphe, des milieux de culture sans cuivre, dépend de sa concentration initiale (Figure 5.5).

En effet, après 96 h, les pourcentages d'élimination du fongicide formulé (DMM<sup>F</sup>) sont de 40, 31 et 15% pour des concentrations initiales respectives de 250, 500 et 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . La même tendance a été observée pour le diméthomorphe pur avec des taux d'élimination plus faibles. Après 96 h, nous avons enregistré 30, 19 et 10% d'élimination en présence de 250, 500 et 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivement (Figure 5.5).

Le taux d'élimination du DMM<sup>F</sup> décroît faiblement lorsque la concentration en cuivre augmente. L'effet est non significatif à 96 h ; on passe de 40 à 34% ; de 31 à 10% et de 15 à 12% lorsque la concentration en cuivre augmente de 0 à 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivement (Figure 5. 7).

Après 168 h, l'effet du cuivre sur l'élimination du DMM<sup>F</sup> devient significatif en présence de 250 et 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  de DMM<sup>F</sup> : on passe de 43 à 36% ( $p = 0,039$ ) et de 33 à 13% ( $p = 0,01$ ) lorsque la concentration en cuivre augmente de 0 à 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figure 5.7).

La présence du cuivre induit des réductions des taux d'élimination du DMM<sup>P</sup> qui sont plus marqués à 250 et 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  où ces pourcentages passent de 30 à 17% ( $p \leq 0,05$ ); 19 à 10% ( $p < 0,05$ ) lorsque la concentration en cuivre augmente de 0 à 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figure V.8). Dans les mêmes conditions, l'effet du cuivre devient plus significatif à 168 h ; l'élimination du DMM<sup>P</sup> passe de 34 à 16% et de 26 à 11%.

À forte concentration en DMM<sup>P</sup> (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), l'effet du cuivre sur l'élimination du fongicide est non significatif (le taux d'élimination passe de 10 à 7% et de 11 à 8% lorsque la concentration en cuivre augmente de 0 à 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  à 96 et 168 h respectivement).

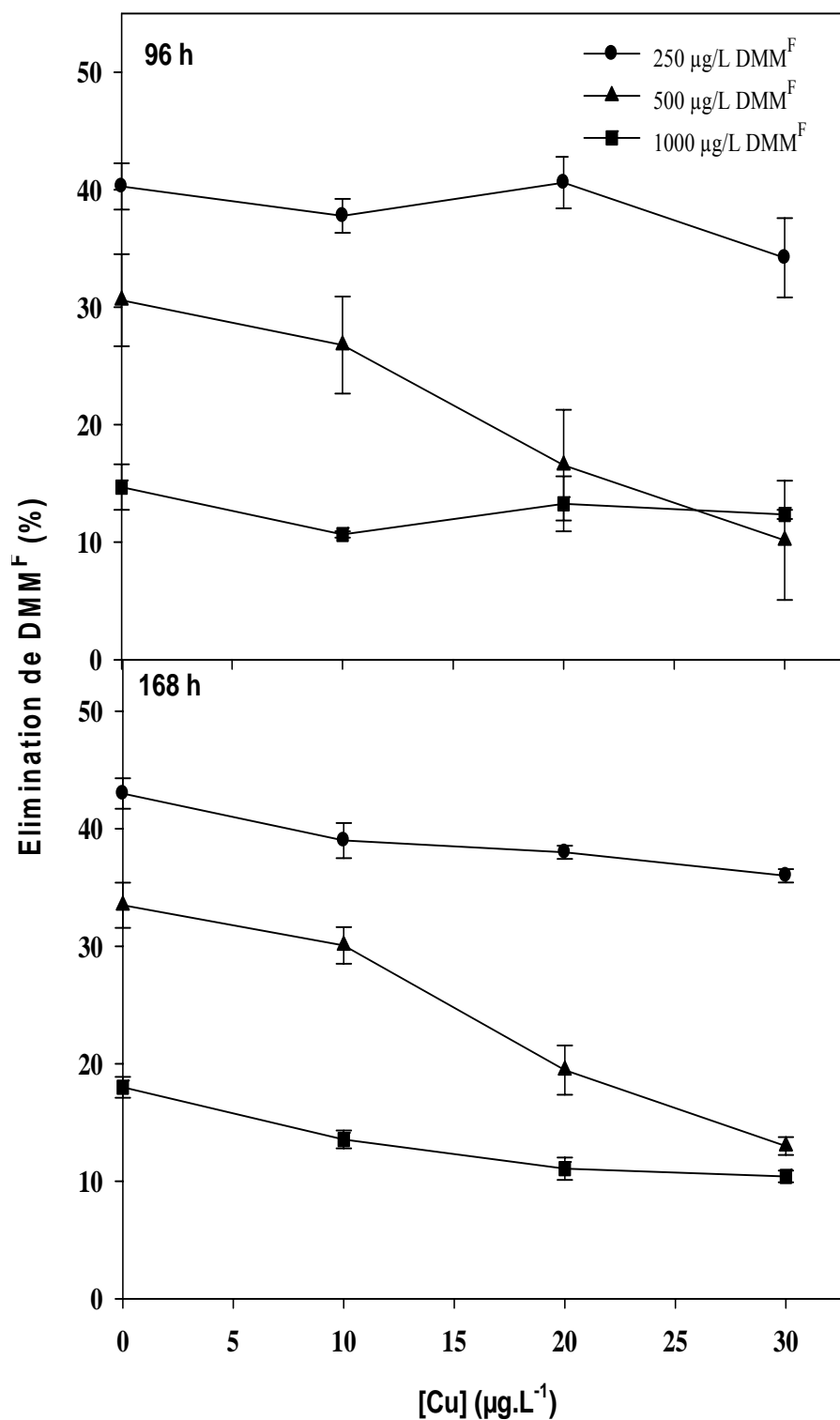


Figure 5.7. Effet du cuivre sur l'élimination de diméthomorphe (DMM<sup>F</sup>) après 96 et 168 h (valeurs moyennes  $\pm$  écart- types, n=3).

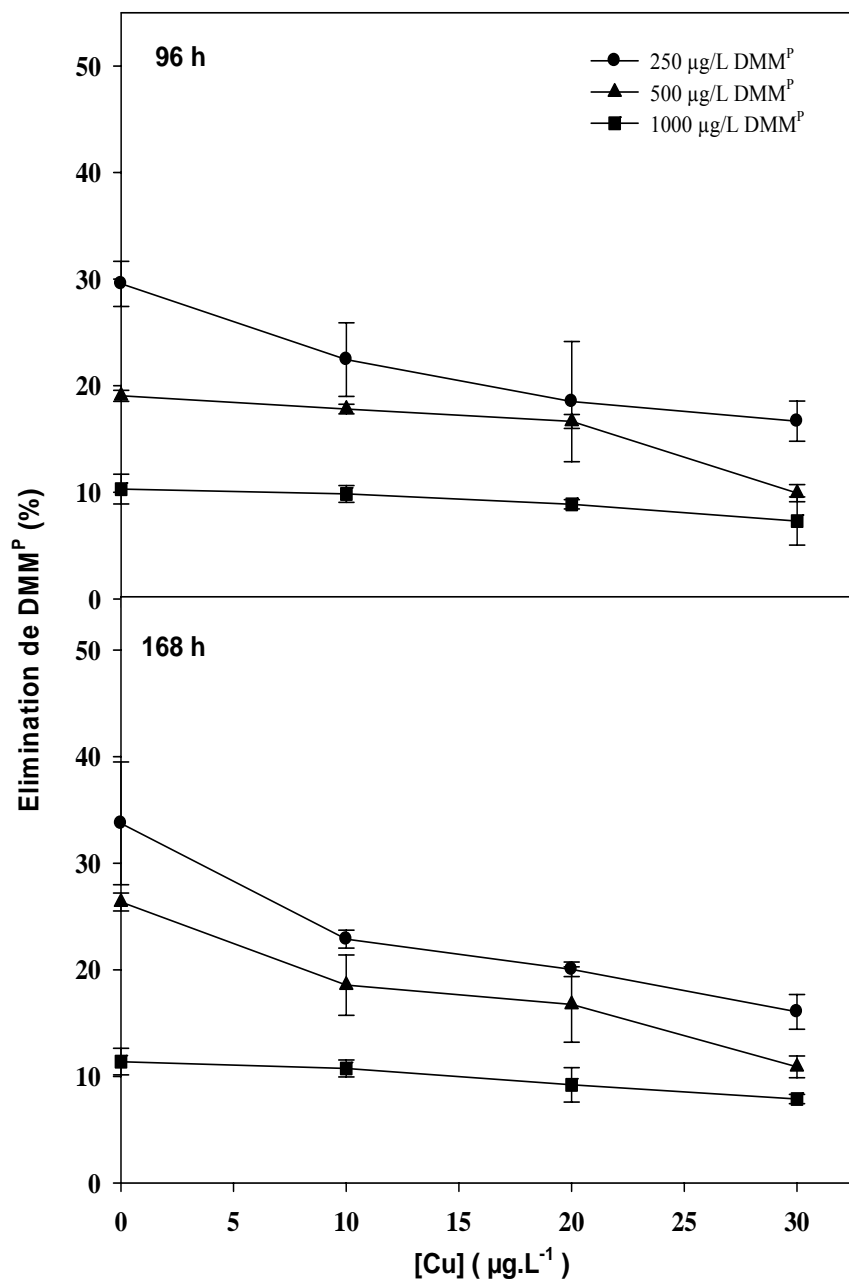


Figure 5.8. Effet du cuivre sur l'élimination de diméthomorphe pur (DMM<sup>P</sup>) après 96 et 168 h (valeurs moyennes ± écart- types, n=3).

#### 5.4. Discussion

Le cuivre est un nutriment essentiel à la croissance et au développement des plantes, on le retrouve normalement dans les tissus des plantes à des concentrations voisines de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  de matière sèche (MS) [215]. Son accumulation excessive dans les tissus le transforme en élément toxique et peut affecter ainsi plusieurs processus physiologiques et biochimiques [58, 95, 171-174, 207].

Les résultats trouvés au cours de cette étude ont montré que l'inhibition de la croissance par le cuivre dépend de sa concentration et de la durée de l'expérience. En effet, après 96 h d'exposition, la croissance est significativement inhibée par les  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre avec un taux d'inhibition de 16%. Cette inhibition est maximale en présence de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre (aux environs de 65%). Après 168 h, l'inhibition augmente pour atteindre 90% à partir de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ . Parallèlement à ces inhibitions, des symptômes morphologiques (nécroses et jaunissement) ont été observés. Il semble donc que la lentille d'eau *L. minor* est très sensible au cuivre même à faible concentration. Ce comportement est différent à celui observé par Sudhakar et al. [174] mais comparable à celui obtenu par Teisseire et Vernet [58]. Selon Sudhakar et al. [174], les réductions de la croissance et de la teneur en chlorophylle ne sont pas significatives à des concentrations inférieures à  $4 \mu\text{M}$  en cuivre ( $250 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Au-delà de cette concentration, la croissance et la teneur de la chlorophylle sont significativement réduites accompagnées par des nécroses.

Récemment, les chercheurs [215] ont observé une forte dépigmentation des frondes après 72 h d'exposition à 50 et  $100 \mu\text{M}$  de cuivre. Contrairement à ce qu'on a observé en présence du cuivre, le diméthomorphe seul (formulé et pur) s'est avéré moins toxique pour la lentille d'eau. En effet, après 168 h d'exposition, l'inhibition de la croissance reste inférieure à 50% en présence de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  de fongicide. Ce résultat confirme le faible effet du diméthomorphe formulé sur l'activité photosynthétique de *L. minor* observé par Olette et al., [95] et semble être une propriété générale de cette plante présentant une faible sensibilité aux fongicides [114,217].



D'autre part, nos résultats montrent que le diméthomorphe formulé est plus toxique pour la lentille d'eau que le diméthomorphe pur particulièrement après 96 h. Cette différence de toxicité entre les deux formes a diminué après 168 h.

Dans la littérature, il est reporté que dans le cas des pesticides, les formulations actuellement commercialisées contiennent des additifs comme les solvants, émulsifiants et des stabilisants qui peuvent être toxiques [218]. Toutefois, la faible différence de toxicité entre les deux formes observées après 168 h suggère que les additifs de la formulation ont permis la pénétration rapide de la matière active dans la plante.

Le mélange de cuivre et de diméthomorphe induit deux types d'interactions: une synergie et une additivité. La synergie est observée en présence de diméthomorphe formulé alors que l'additivité est observée avec le diméthomorphe pur. La synergie est importante à forte concentration en DMM<sup>F</sup> pouvait être due à l'accélération de la pénétration du cuivre à l'intérieur de la plante par les adjuvants de Forum. Ce phénomène a été observé dans de nombreux travaux [114,171]. La formulation provoque entre autre la dissolution des cuticules [219] ce qui rend facile le transfert du cuivre dans la cellule et par conséquent induit une plus forte phytotoxicité. Pour cette étude, l'absence de synergie, en présence du diméthomorphe pur, confirme cette hypothèse.

À forte concentration en cuivre et après une longue durée d'exposition, la synergie s'est transformée en simple additivité, ceci est probablement dû à la toxicité élevée du mélange ( $89,66 \pm 7,07\%$  d'inhibition pour  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre et  $250 \mu\text{g L}^{-1}$  de DMM<sup>F</sup> après 168 h). Le modèle d'Abott's est valable pour des inhibitions inférieures à 70%.

Le suivi de la concentration de cuivre dans les milieux de culture sans plantes fait apparaître la disparition de 6,5 à 33% du métal. Ce phénomène est dû soit à une précipitation soit à une adsorption sur les parois des Erlenmeyers. Ces proportions sont inférieures à celles observées par [141]. Ils indiquent qu'en moyenne 50 % de cuivre est éliminé de l'eau par précipitation sous forme de  $\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$  et la fraction restante est éliminée par les macrophytes.

En présence de la lentille d'eau, les courbes d'élimination montrent une excellente performance de *L. minor* dans l'élimination du cuivre. En effet, après 96 h de traitement, la rétention est maximale (36, 60 et 76% à 10, 20 et 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cuivre, respectivement). Cette efficacité est meilleure que celle observée en présence d'autres macrophytes (*Myriophyllum aquaticum*, *Ludwigina palustris*, *Mentha aquatica*) où le taux moyen d'élimination du cuivre était de 42 % après deux semaines de traitement [141].

Avec d'autres macrophytes (*Spirodela polyrrhiza*, *Pistia stratiotes* et *Eichhornia crassipes*), les chercheurs Mishra et Tripathi [187] ont trouvé des taux d'élimination de cuivre plus importants (76 à 91%) à 5 et 2  $\text{mg L}^{-1}$ , respectivement.

D'après les premiers résultats, il semble que l'élimination du métal des milieux est due à son accumulation dans ou sur la plante. *L. minor* est capable d'accumuler des quantités supérieures à 3 g de cuivre par kg de matière sèche [13]. Une fraction du métal accumulée est simplement adsorbée sur la surface de la plante. En effet, une biomasse de *L. minor* morte est capable d'éliminer 63 à 94% en métal d'eau contaminée initialement par 10 et 20  $\text{mg L}^{-1}$  de Zn, Cu, et Cd [188]. Cette adsorption est attribuée à un échange entre les métaux monovalents présents dans la biomasse de la macrophyte, le métal et le proton à partir de l'eau à traiter. Nos résultats montrent, qu'après 96 h, le maximum d'élimination du cuivre (70%) a été obtenu en présence de la concentration la plus élevée en métal (30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Cette forte élimination, à concentration élevée, est favorisée par les augmentations de pH des milieux de culture responsables potentiels des phénomènes de précipitation. En effet, parallèlement à cette disparition du cuivre, une faible variation du pH a été enregistrée (< à 0,4 d'unité de pH) dans les milieux de culture sans plantes, alors qu'une variation plus importante de ce paramètre (des augmentations de 1 à 2 unités de pH) est observée dans les milieux de cultures avec plantes.

L'effet de pH sur l'élimination des métaux a souvent été démontré à travers plusieurs travaux de recherches où les résultats trouvés montrent que le pH de la solution influence significativement la rétention des métaux [220,221].

Ils signalent l'augmentation de la rétention lorsque le pH augmente.

L'effet du pH peut être expliqué par la compétition entre les ions  $H_3O^+$  et les ions métalliques. À faibles valeurs de pH, la concentration en ions  $H_3O^+$  est en excès, ils occupent ainsi les sites actifs sur les parois de la plante laissant le métal dans la solution. Lorsque le pH augmente, l'effet de compétition avec les ions  $H_3O^+$  diminue et les charges positives du métal se fixent sur les sites et conduisent à des augmentations de la rétention du métal.

Au cours de notre travail, le pH de la solution contenant du cuivre a atteint une valeur de  $8,75 \pm 0,99$  après 168 h de traitement. Cette valeur de pH est favorable à une précipitation de ce métal sous forme d'hydroxyde  $Cu(OH)_2$  et/ou d'orthophosphate  $Cu_3(PO_4)_2$ . Ainsi, l'augmentation de la rétention du cuivre peut être attribuée aussi à des phénomènes de précipitation.

À faible concentration ( $10 \mu g L^{-1}$ ), l'élimination du cuivre passe de 36 à 65 % lorsque la concentration en DMM<sup>F</sup> augmente de 0 à  $1000 \mu g L^{-1}$  ( $p < 0.05$ ). La fraction du cuivre disparue des milieux sans DMM<sup>F</sup> est inférieure à celle observée en présence du fongicide, suggère que cette augmentation est due aux ingrédients de la formulation qui facilitent la pénétration du cuivre dans la plante. La stimulation de l'élimination du cuivre est moins importante à fortes concentrations ( $20$  et  $30 \mu g L^{-1}$ ). Elle peut être expliquée soit par le fait que le maximum de rétention est atteint sans fongicide, soit par la toxicité élevée des deux contaminants réduisant ainsi la rétention du cuivre.

L'élimination du diméthomorphe dépend de sa concentration initiale. Une réduction maximale (10 à 40%) est atteinte après 96 h. La prolongation de la durée de traitement n'induit pas des augmentations de rétention du fongicide.

Nos résultats montrent que l'élimination du diméthomorphe est moins importante que celle du cuivre mais comparable à d'autres investigations utilisant la lentille d'eau pour l'enlèvement des pesticides des eaux [95,222].

Les polluants organiques sont introduits usuellement par l'Homme et sont des xénobiotiques pour les plantes. En conséquence, il n'existe pas de transporteurs spécifiques à ces composés dans les membranes des plantes. Ils ont tendance à se déplacer à travers et dans les tissus des plantes par une simple diffusion en fonction de leurs propriétés chimiques. Parmi ces propriétés, l'hydrophobicité est l'un des paramètres potentiels responsables de l'élimination de ces produits par les plantes.

En effet, les produits chimiques dont le coefficient de partage ( $\text{Log } K_{ow}$ ) dans le mélange octanol-eau est compris entre 0,5 et 3 sont considérés comme hydrophobes et capables de se déplacer à travers la membrane (bicouches lipidiques) tout en restant soluble dans l'eau [223]. Le coefficient de partage du diméthomorphe utilisé au cours de cette expérimentation est de 2,63, favorisant un transfert rapide de ce composé à l'intérieur de la cellule. Cette propriété explique ainsi la rétention maximale observée à 96 h. Après 24 h d'expérience, la rétention de diméthomorphe formulé par *L. minor* atteint son maximum selon [95].

Une baisse de la rétention du diméthomorphe a été observée lorsque la concentration en cuivre augmente particulièrement aux faibles concentrations testées (40 à 34% ; 31 à 10% en présence de 250 et 500  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivement). Cette réduction d'élimination du fongicide pouvait être attribuée à la toxicité du cuivre.

### 5.5. Conclusion

L'étude de la toxicité engendrée par deux fongicides (cuivre et diméthomorphe), considérés séparément et en combinaison sur la lentille d'eau *Lemna minor*, a montré que le cuivre est un métal fortement toxique alors que le diméthomorphe a manifesté une faible toxicité.

Une synergie, après 96 h d'exposition, a été observée, uniquement dans le cas des mélanges cuivre et diméthomorphe formulé, plus marquée. Ceci montre la complexité de l'étude de la toxicité dans un environnement hétérogène. Malgré les inhibitions induites par le cuivre et le diméthomorphe formulé, les taux d'élimination de ces deux contaminants, par cette lentille d'eau, sont appréciables. Cette plante usuellement utilisée dans les tests de toxicité s'avère une très bonne alternative pour la phytoremédiation. L'élimination du cuivre est plus importante à forte concentration et diminue en présence du diméthomorphe formulé. La rétention du diméthomorphe est plus faible que celle du cuivre. Elle est plus importante pour le forum et la présence du cuivre réduit la capacité de la plante à éliminer ce contaminant du milieu de culture.

## CONCLUSION

Les objectifs de notre étude se situent dans un cadre écotoxicologique d'une part et de la phytoremédiation d'autre part. Parmi les toxiques largement rencontrés dans les systèmes aquatiques, nous nous sommes intéressés aux métaux lourds et plus particulièrement au cuivre, au cadmium et au zinc.

Le choix de ces trois éléments est fondé principalement sur leur comportement toxicologique. Le premier métal est un élément indispensable aux êtres vivants et il joue un rôle crucial dans les processus métaboliques des plantes et qui peut être toxique dans certaines conditions. Le second n'a pratiquement aucun rôle physiologique mais fortement toxique alors que le troisième en tant qu'élément en traces est rarement toxique.

L'emploi des plantes aquatiques, dans le cadre de réseaux de surveillance ou d'études particulières, montre l'intérêt porté à ces organismes traceurs de la contamination métallique dans les eaux continentales.

Au plan expérimental, les tests de toxicologie classiques réalisés ont révélé que le cuivre et le cadmium sont particulièrement toxiques pour nos modèles biologiques : *L. gibba* et *L. minor*.

□ la lumière des résultats de la première partie, la toxicité de ces deux métaux s'est manifesté par des inhibitions de la biomasse, des pigments (chlorophylle totale, chl<sub>a</sub> et chl<sub>b</sub>) ainsi que des chloroses. Ainsi, des concentrations comprises entre  $10^{-4}$  et  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> en cuivre et en cadmium ont provoqué des inhibitions de biomasse variant de 5,6 à 23,35% et de 5,1 à 28,62%, respectivement; des inhibitions de la chlorophylle totale comprises entre 11,20 et 59,69% et entre 15,20 et 63,54%. Cependant, en réponse à l'exposition à ces deux métaux, la quantité des protéines a connue une augmentation durant les 4 premiers jours, plus marquée en présence du cuivre.

□ l'issue de la deuxième partie de notre travail, l'effet toxique du cuivre et du cadmium s'est confirmé. En effet,  $10^{-2}$  à  $10^{-1}$  mg L<sup>-1</sup> de cuivre sont suffisants pour entraîner une inhibition de la croissance supérieure à 50% et ce au bout de 4 jours d'exposition de *L. gibba* à ce métal. Le cadmium inhibe la croissance encore plus fortement que le cuivre :

de faibles taux de croissance ont été enregistrés à compter du 4<sup>ème</sup> jour de culture (inférieurs à 30% en moyenne) soit une inhibition de 50%.

Contrairement aux deux éléments précédents, le zinc ne présente aucune toxicité à faibles concentrations : une croissance comparable à celle observée dans le témoin avec un ralentissement de la croissance à partir du 4<sup>ème</sup> jour de traitement pour des concentrations supérieures à 4 mg L<sup>-1</sup>.

Les chloroses observées en présence de fortes concentrations en métaux testés justifient les fortes diminutions de l'indice de stress physiologique  $DO_{665}/DO_{665a}$  : une réduction de 81% en présence du cuivre ; 89% en présence du cadmium et 37,5% en présence du zinc. À faibles teneurs en cuivre, en cadmium et en zinc, les diminutions d'indice de stress enregistrées durant toute la durée de traitement sont nettement faibles: 19, 35 et 8%, respectivement. Donc ce paramètre, utilisé pour d'autres espèces aquatiques, semble être un bon biomarqueur de la contamination métallique en particulier pour le cadmium. La phytotoxicité du cadmium et du cuivre semble bien être confirmée par les résultats d'analyse de la proline comme un deuxième biomarqueur. En effet, Les teneurs de la proline en présence de cadmium sont les plus importantes : une augmentation rapide de la quantité de cet acide aminé, ayant atteint 3  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$  (soit un taux d'augmentation de 567%), 1,75  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$  (soit une augmentation de 289 %) et 1,25  $\mu\text{mol g}^{-1}\text{MF}$  (soit une augmentation de 122%) en présence de 10<sup>-1</sup> mg L<sup>-1</sup> de cadmium, de cuivre et de zinc, respectivement.

Les effets du cuivre, à des concentrations plus faibles que celles testées lors des deux premières parties (0 à 30  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) ont montré que la croissance de *L. minor* est significativement inhibée par ce métal : les inhibitions varient de 25 à 40%.

Les concentrations en métaux testés, particulièrement le cuivre et le cadmium sont très proches des quantités environnementales ; et par conséquent, ces deux éléments présentent un risque potentiel pour *L. gibba* et *L. minor*. En prenant toutes les précautions nécessaires à l'extrapolation à d'autres espèces, ces deux contaminants peuvent être considérés comme toxiques pour les végétaux aquatiques.

Le risque écotoxicologique lié à la présence de ces éléments en milieu aquatique est également lié aux effets d'interaction qu'ils peuvent présenter entre eux et avec d'autres produits organiques (pesticides, substances humiques, produits pharmaceutiques, etc.).

Pour évaluer ce facteur, nous avons réalisé des expériences avec des associations binaires d'éléments toxiques à des concentrations de 0 à 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour le cuivre et 0 à 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  pour le diméthomorphe (fongicide) choisis pour être représentatifs des situations environnementales. Elles ont révélés des augmentations de l'inhibition de la croissance de 38 à 85%, de 45 à 93% et de 44 à 93 % en présence de 250, 500 et 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de DMM<sup>F</sup> ( $p < 0,005$ ). En revanche, lorsque le cuivre a été associé au diméthomorphe, deux types d'interactions ont pu être constatés. Leurs effets inhibiteurs sur la croissance de la lentille d'eau *L. minor* sont synergiques en présence du forum et additifs en présence du diméthomorphe pur. En effet, la synergie est importante à forte concentration en DMM<sup>F</sup> à cause de l'accélération de la pénétration du cuivre à l'intérieur de la plante par les adjuvants du forum : l'absence de synergie, en présence du diméthomorphe pur, confirme cette hypothèse.

Les expériences réalisées en conditions contrôlées indiquent que la lentille d'eau (*L. minor* et *L. gibba*) usuellement utilisée dans les tests de toxicité s'avère une très bonne candidate pour la phytoremédiation : taux de réduction de l'azote de 60% ; taux de réduction de phosphore de 80% ; l'élimination du zinc, cadmium et cuivre, est de 100, 90 et 77% respectivement ; (10 % à 40 %) d'élimination pour le diméthomorphe.

Nos résultats montrent que l'association d'un métal à un fongicide se traduit par une réduction des taux d'élimination du cuivre par la lentille *Lemna minor*. L'idée de ces expériences était de voir la relation entre les éventuels interactions entre les métaux et le fongicide et leur impact sur la capacité d'enlèvement du métal par une plante aquatique.

À la lumière de l'ensemble des résultats trouvés, quelques approches, à développer en perspective, se dégagent :

- La première concerne la recherche des corrélations entre la composition et les propriétés physicochimiques classiques du milieu de culture et/ou de l'eau à tester (pH, conductivité, alcalinité, phosphates, ammonium) et les réponses possibles de la plante. La composition du milieu à tester en contaminants (métaux, substances humiques, pesticides, etc...) peut faire l'objet de corrélations entre quelques réponses biochimiques des plantes.
- La deuxième consiste à valider, à l'échelle du laboratoire toujours, les expériences réalisées avec un milieu artificiel sur une eau naturelle.
- La troisième grande orientation consiste à la validation des résultats du laboratoire concernant l'usage des réponses de la lentille d'eau (*L. gibba* ou *L. minor*) sur le plan écotoxicologique ou de son utilisation comme agent dépolluant sur le plan de la phytoremédiation.

Ces recherches vont permettre d'associer l'ensemble des paramètres environnementaux et représentent une situation environnementale réelle. Les plans d'eau comme les maris, les étangs et les lacs sont très favorables à des cultures de la lentille d'eau. Sa culture dans les eaux courantes trouve ses limites en raison de ses propriétés d'espèce flottante. Différents dispositifs expérimentaux pourraient être envisagés pour remédier à ce problème.



## APPENDICE 1

### LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

AFNOR	: Association Française de Normalisation
A	: croissance relative, (%)
A <sub>x</sub>	: croissance dans l'échantillon contaminé
A <sub>T</sub>	: croissance dans le témoin
BASF	: The Chemical Compagny
CE	: Comité Européen
CE <sub>50</sub>	: concentration ayant un effet toxique chez 50% d'individus exposés après un temps t
CI	: concentration inhibitrice
C <sub>0</sub>	: concentration initiale du métal dans le milieu de culture (mg L <sup>-1</sup> )
C <sub>t</sub>	: concentration résiduelle du métal dans le milieu de culture (mg L <sup>-1</sup> )
Chl	: chlorophylle totale
Chl a	: chlorophylle a
Chl b	: chlorophylle b
DHT	: dose tolérable hebdomadaire
DMM <sup>F</sup>	: diméthomorphe formulé ou commercial
DMM <sup>P</sup>	: diméthomorphe pur
DT <sub>50</sub>	: temps de demi-vie (jours)
DO <sub>665</sub>	: absorbance de l'extrait chlorophyllien non acidifié mesurée à une longueur d'onde de 665 nm, adimensionnel
DO <sub>750</sub>	: absorbance de l'extrait chlorophyllien non acidifié « chlorophylle a » mesurée à une longueur d'onde de 750 nm, adimensionnel
DO <sub>665a</sub>	: absorbance de l'extrait chlorophyllien acidifié « phéophytine a » mesurée à une longueur d'onde de 665 nm adimensionnel
DO <sub>750a</sub>	: absorbance de l'extrait chlorophyllien acidifié « phéophytine a » mesurée à une longueur d'onde de 665 nm adimensionnel
E	: essentiel
FAO	: Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture
g	: gramme
In	: taux d'inhibition de la croissance (%)

IS	: indice de stress, adimensionnel
ISO	: Organisation Internationale de Normalisation
JECFA	: comité d'experts des additives alimentaires (Joint Expert committee on food additives)
Koc	: coefficient de partage carbone organique-eau ( $L.kg^{-1}$ )
Log Kp	: logarithme de coefficient de partage
MES	: matière en suspension
M.F	: matière fraîche
mg L <sup>-1</sup>	: milligramme par litre
N <sub>t</sub>	: nombre de colonies moyen à l'instant t, adimensionnel
N <sub>o</sub>	: nombre de colonies moyen à l'instant initial, adimensionnel
NAS	: National Academy of Science
NRC	: National Research Council
ΔN <sub>t</sub>	: variation moyenne du nombre de colonies dans le témoin, (N <sub>t</sub> -N <sub>o</sub> ), adimensionnel
ΔN	: variation moyenne, du nombre de colonies en présence du métal, (N <sub>t</sub> -N <sub>o</sub> ), adimensionnel
R	: taux de rétention des métaux lourds, (%)
RI	: Rapport d'inhibition
ROS	: Formes réactives de l'oxygène
OMS	: Organisation mondiale de la santé
PAR	: Photosynthetic active radiation
T	: Toxique
μg	: microgramme

## APPENDICE 2

Tableau 3.1. Concentrations et volumes des réactifs chimiques utilisés dans la préparation du milieu de culture [144].

Solution	Composition chimique	Concentration (g L <sup>-1</sup> )	Volume prélevé pour un litre de milieu de culture (ml)
S <sub>1</sub>	• Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	• 11,80	100
S <sub>2</sub>	• KNO <sub>3</sub>	• 10,11	5
S <sub>3</sub>	• MgSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	• 12,33	4
S <sub>4</sub>	• KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	• 6,80	1
S <sub>5</sub>	• MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O • H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> • ZnSO <sub>4</sub> • CuSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	• 1,55 • 2,86 • 0,22 • 0,079	1
S <sub>6</sub>	• (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O • NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub> • Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O • NiSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O • Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	• 0,128 • 0,229 • 0,049 • 0,0478 • 0,017	1

Tableau 5.1. Concentrations et volumes des réactifs chimiques utilisés dans la préparation de milieu de culture [214]

Solution	Composition chimique	Concentration (g L <sup>-1</sup> )	Volume prélevé pour un litre de milieu de culture (ml)
S <sub>1</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• KNO<sub>3</sub></li> <li>• KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></li> <li>• K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 40,40</li> <li>• 10,06</li> <li>• 05,76</li> </ul>	5
S <sub>2</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</li> <li>• CaCl<sub>2</sub></li> <li>• H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></li> <li>• MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 04,96</li> <li>• 01,14</li> <li>• 0,036</li> <li>• 0,28</li> </ul>	10
S <sub>3</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ZnSO<sub>4</sub></li> <li>• (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O</li> <li>• CoCl<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,60</li> <li>• 0,043</li> <li>• 0,054</li> </ul>	1
S <sub>4</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O</li> <li>• K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1,20</li> <li>• 3,48</li> </ul>	5
S <sub>5</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CuCl<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,078</li> </ul>	1
S <sub>6</sub>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Na<sub>2</sub>-EDTA *</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10,00</li> </ul>	1

\* pour les tests en présence du cuivre, l'EDTA n'est pas utilisé afin d'éviter les phénomènes d'interférences «complexation» avec ce métal.

## APPENDICE 3

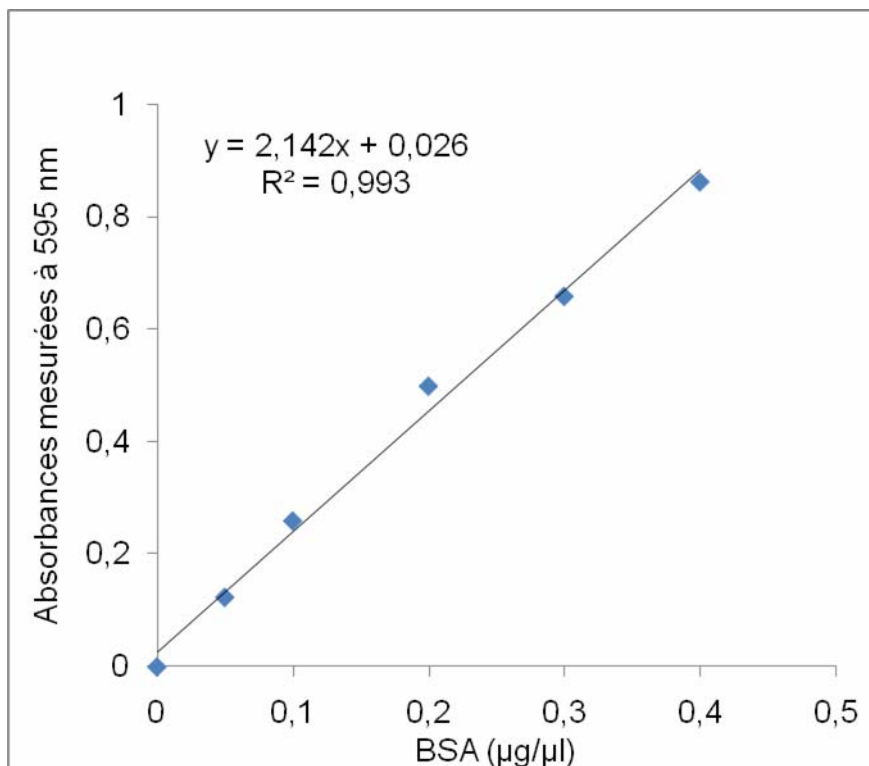


Figure 3.2. Courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines (méthode de Bradford)

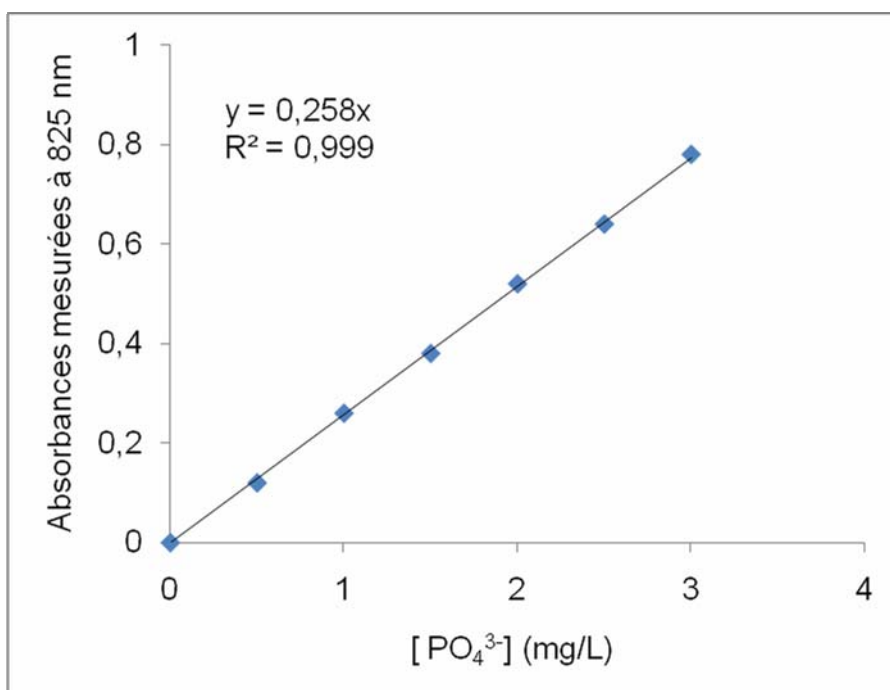


Figure 3.3. Courbe d'étalonnage pour le dosage du phosphore

## APPENDICE 4

### 1. Composition chimique du catalyseur à utiliser durant la minéralisation

- Sulfate de potassium ( $K_2SO_4$ ) :100 g.
- Sulfate de cuivre ( $CuSO_4$ ) :10 g.
- Sélénium (Se) :1 g.

### 2. L'indicateur coloré permettant de visualisé la présence d'ammoniaque

- Acide borique  $H_3BO_3$  : 6 g.
- Ethanol ( $C_2H_5OH$ ) : 600 mL.
- Rouge de méthyle à 0,2% dans l'éthanol à 96% : 22,5 ml.
- Vert de bromocrésol à 0,1% dans l'éthanol à 96% : 7,5 ml

## APPENDICE 5

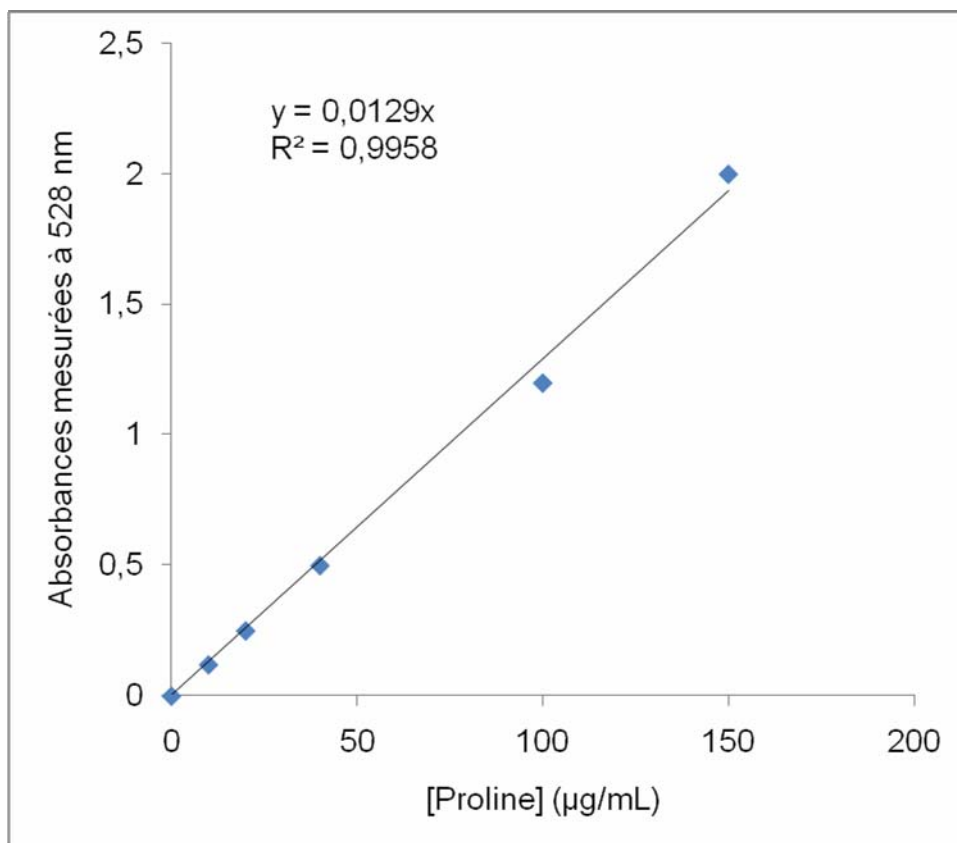


Figure 4.1. Courbe d'étalonnage pour le dosage de la proline

## APPENDICE 6

1. Programme thermique pour l'analyse du cuivre, Cu, en spectrométrie d'absorption atomique : Limite de détection :  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  ; longueur d'onde 327,4 nm.

Étape N°	Température (°C)	Temps (s)	Débit de gaz (L/mn)
1	85	5	3
2	95	40	3
3	120	10	3
4	800	5	3
5	800	1	3
6	800	2	3
7	2300	1	0,3
8	2300	2	0,3
9	2300	2	0,3
10	2300	2	3,0

2. Résultats de la gamme étalons

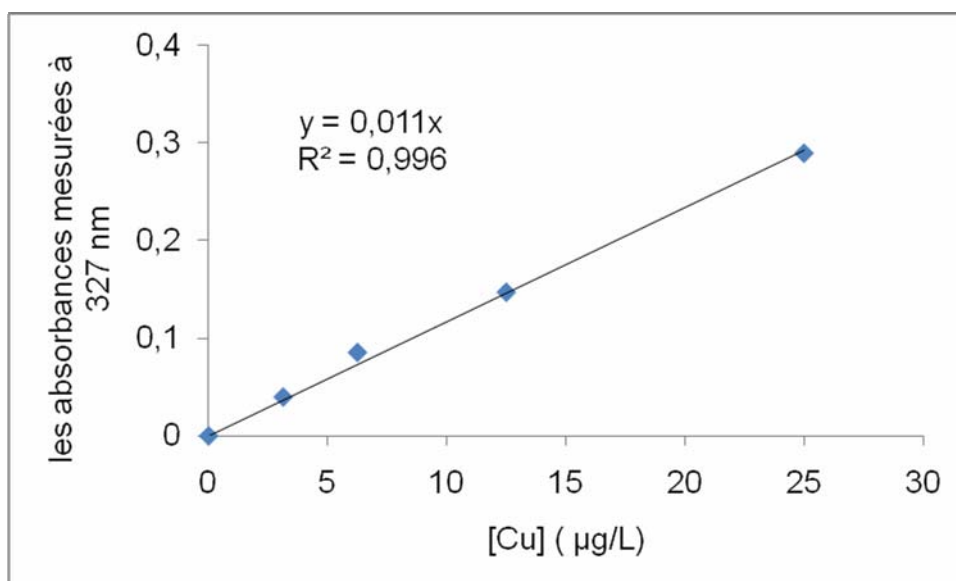


Figure 5.2. Courbe d'étalonnage pour l'analyse du cuivre



## APPENDICE 7

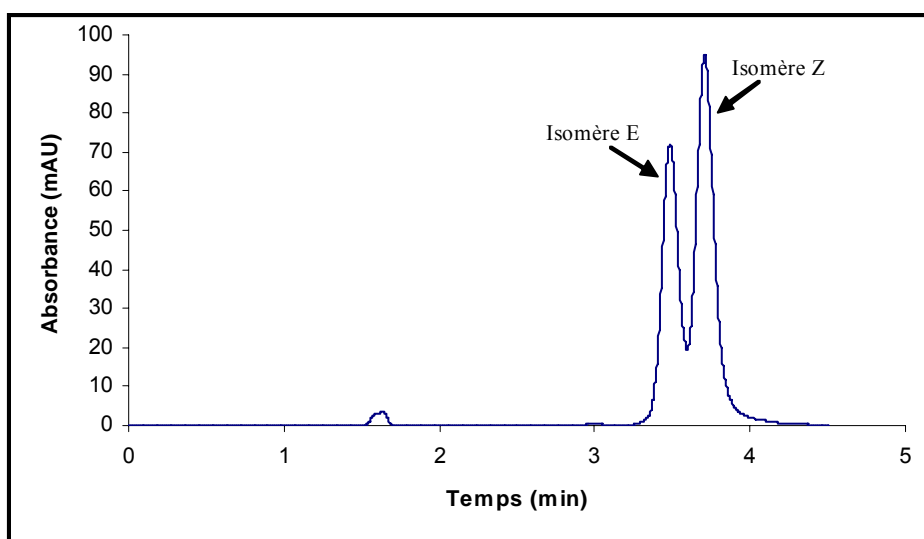


Figure 5.31. Séparation des deux isomères du diméthorphe par HPLC

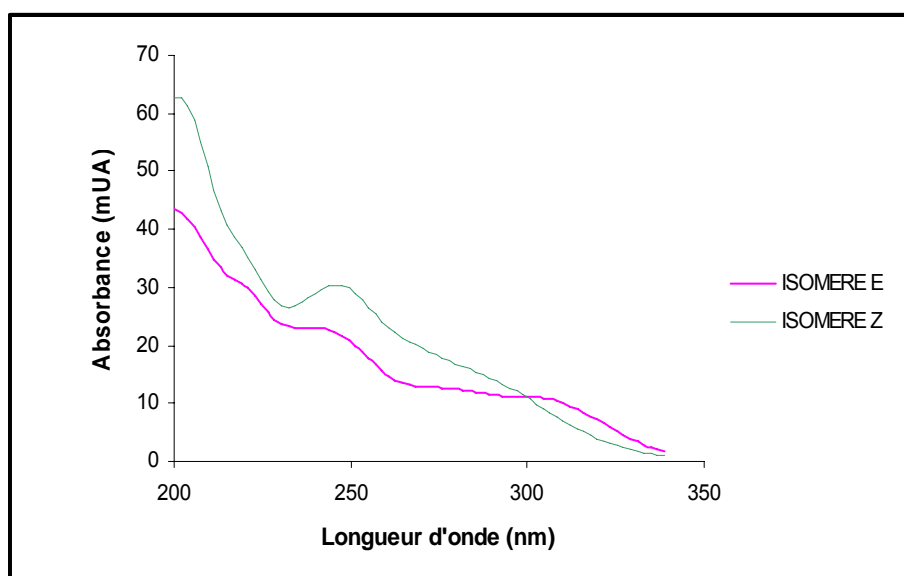


Figure 5.32. Spectre d'absorption des deux isomères du diméthorphe.

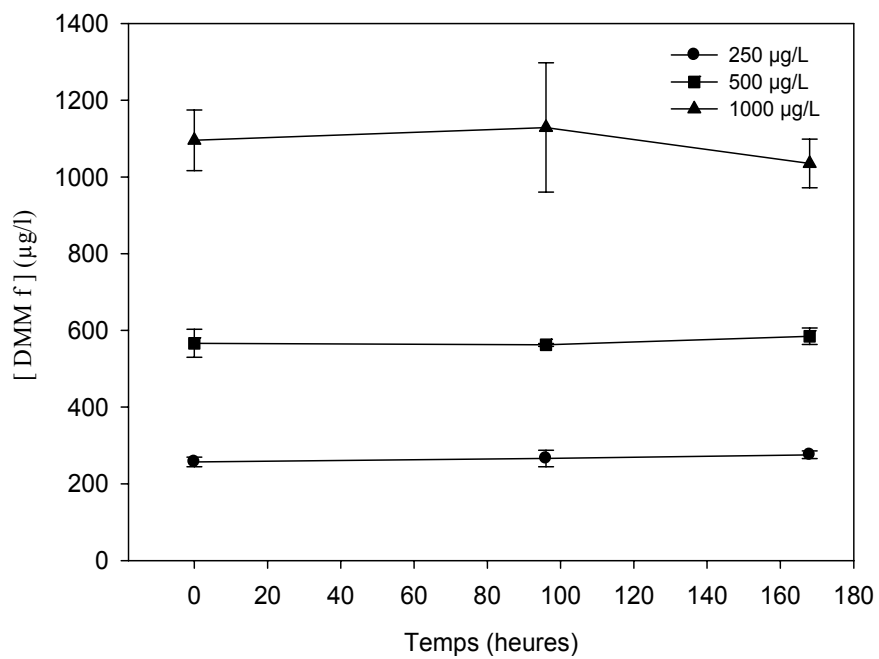


Figure 5.3. Evolution de la concentration en diméthomorphe en fonction de temps dans les milieux de culture sans plante

## APPENDICE 8



## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Perry, A.R.R., Flammarion, P., Vollat, B., Bedaux, J.J.M., Kooijman, S.A.L.M., Garric, J., "Using a biology based model (Debtox) to analyse bioassays in ecotoxicology: opportunities and recommendation". *Environ. Toxicol., Chem.* 21, (2002), 459-465.
2. Aksoy, A., Demirezen, D., Duman, F., "Bioaccumulation, detection and analyses of heavy metal pollution in Sultan Marsh and its environment". *Water Air Soil Poll.*, 164, (2005), 241–255.
3. Khellaf, N., Zerdaoui, M., "Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba L*". *Biores. Technol.*, 100, (2009), 6137-6140.
4. Semsari, S., Gaid, A., "Inhibition de l'activité des boues activées en présence du Chrome(III) ". *Environ. Technology* 15, (1994), 255-262.
5. Semsari, S., Ait Amar, H., "Effet de la salinité et de la dureté de l'eau sur la toxicité des métaux vis-à-vis de *Daphnia magna* Strauss". *Ann. Limnol.* 37, (2001), 75-83.
6. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., "Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux", Ed Masson, Paris, (1997), 419 p.
7. Amiard J.C., Caquet T. et Lagadic L., "Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement", In : "Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement", Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C et Ramade F. (Eds.), *Technique de Documentation*, Londres, Paris, New York, (1998), pp.XXI-XXX.
8. AFNOR, Association Française de Normalisation, "Recueil de normes françaises : Qualité de l'eau", Paris, 4 tomes, (1997), 1420 p., AFNOR.
9. Drost, W., Matzke, M., Backhaus, T., "Heavy metal toxicity to *Lemna minor*. Studies on the time dependance of growth inhibition and the recovery after exposure". *Chemosphere*, 67, (2007), 36-43.
10. Cardwell, A., Hawker, D., Greenway, M., "Metal accumulation in aquatic macrophytes from Southeast Queensland, Australia". *Chemosphere*, 48, (2002), 653-663.
11. Dhir, B. P., Sharmila, P., Saradhi, P.P., "Hydrophytes lack potentiel to exhibit cadmium stress induced enhancement in lipid peroxidation and accumulation of proline". *Aquatic. Toxicol.* 66, (2004), 141-147.

12. Prasad, M.N.V., Malec, A., Waloszek, A., Bojka, M., Strzalka, K., "Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation". *Plant Sci.* 161, (2001), 881-889.
13. Zayed, A., Gowthaman, S., Terry, N., "Phytoaccumulation of traces elements by Wetland plants: I. Duckweed". *J. Environ. Qual.* 27, (1998), 715-721.
14. Qian, J.H., Zayed, A., Zhu, V.L., Yu, M., Terry, N., "Phytoaccumulation of traces elements by Wetland plants: III. Uptake and phytoaccumulation of ten trace elements by twelve plant species". *J. Environ. Qual.* 28, (1999), 1448-1455.
15. Gao, J., Garrison, A.W., Hoehamer, C., Mazur, C.S., Wolfe, N.L., "Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants". *J. Agric. Food Chem.* 48, (2000), 6114-6120.
16. Wahaab, A.R., Lubberding, H.J., Alaerts, G.J. "Copper and chromium (III) uptake by duckweed". *Water Sci. Technol.* 32, (1995), 105-110.
17. Kähkönen, M.A., Manninen, P.G.K., "The uptake of nickel and chromium from water by *Elodea canadensis* at different nickel and chromium exposure levels". *Chemosphere*, 36, (1999), 1381-1390.
18. Miquel, G., "Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé". Rapport parlementaire, N°2979/N°261, Assemblée Nationale/Sénat, office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, Paris, (2001).
19. Tessier, A., Turner, D., "Metal speciation and bioavailability in aquatic systems". Chisters, (1995), John Winely and Sons.696p
20. Stumm, W., Morgan, J., "Aquatic Chemistry :Chemical Equilibria and Rates in Natural waters". Third Ed. New York, (1996), John Wiley and Sons. 1022p.
21. Chiffolleau, J.F., Auger, D., Chartier, E., Michel, P., Truquet, I., Ficht, A., Gonzalez, J.L., Romaña, L.A. "Spatiotemporal changes in cadmium contamination in the Seine Estuary (France)". *Estuaries*, (2001), 24(6B), 1029-1040.
22. Nicholson, F.A., Smith, S.R., Alloway, B.J., Carlton-Smith, C., Chambers, B.J., "An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and wales.", *Sci. Total Environ.*, 311, (2003), 205-219.

23. Tijani, M.N., "Contamination of shallow groundwater system and soil-plant transfer of trace metals under amended irrigated fields". *Agricultural water management*, 96, (2009), 437 – 444.
24. Tonneau, J., Hemes, S.L., "Printemps des sciences : d'un bout à l'autre". *Revue scientifique de la FAO, rapport et étude ADEME édition*, (2003).
25. Dursma, E., Carroll, J., "Environmental compartments- Equilibria and assessment of processes between Air, Water, Sediment and Biota". Berlin, (1996), Springer-Verlag. 277p.
26. Guéguen, C., Dominik, J., "Partitioning of traces metals between particulate, colloidal and truly dissolved fractions in polluted river: the Upper Vistula River (Poland)". *Applied Geochemistry*, (2001).
27. Bliefert, C., Perraud, R., "Chimie de l'environnement : air, eau, sols, déchets". De Boeck université, Paris, (2001), 477p.
28. Arnon, D.I., Stout, P.R., "The essentially of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper". *Plant Physiol.*, 14, (1939), 371–375.
29. Gomez, A., "The nano-particle formation and uptake of precious metals by living alfalfa plants". Master Thesis, University of Texas at El Paso, (2002).
30. Taiz, L., Zeiger, E., "Plant physiology". 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer associates; (1998).
31. Ghanati, F., Morita, A., Yokota, H., "Effects of aluminum on the growth of tea plant and activation of antioxidant system". *Plant Soil*, 276, (2005), 133 – 41.
32. Florence, T.M., Morison, G.M., Stauber, J.L., "Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity". *Sci.Total Environ.* 125, (1992), 1-13.
33. Cossa, D., Lassus., P., "Le cadmium en milieu marin. Biogéochimie et Ecotoxicologie". *Rapports Scientifiques et Techniques de l'Ifremer*, (1989), n° 16, 111 p.
34. JECFA: "Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives".
35. Kabata-Pendias, A., "Soil-plants transfer of trace elements- an environmental issue". *Geoderma*, 122, (2004), 143-149.

36. Chen, W., Chang, A.C., Wu, L., "Assessing long term environmental risks of trace elements in phosphate fertilizers". *Ecotoxicol Environ Safety*, 6, (2007), 48–58.
37. Jarup, L., "Hazards of heavy metal contamination". *Br. Med. Bull.*, 68, (2003), 167– 82.
38. Adriano, D.C., "Trace elements in the terrestrial environment; Biochemistry, bioavailability and risks of metals". Springer Verlag, New York. (2001).
39. Flemming, C.A. Trevors, J.T., "Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, air and soil Pollution* 44, (1989), 143-158.
40. Martin, J.M., Windom, H.L., "Present and future roles of ocean margins in regulating marine biogeochemical cycles of trace elements". In : Dahlem Conference Marginal Seas processes in Global Changes, Mantoura R.F.C., Martin J.-M and Wollast R., eds., John Wiley and Sons, (1990),pp 45-67
41. Chester. R., "Marine geochemistry", London, Unwin Hyman, (1990), 698 p.
42. Chester, R., Aston, S. R., "The geochemistry of deep-sea sediments". In: "Chemical oceanography, Vol. 6 (ed. J. P. Riley and R. Chester)", Academic Press, (1976), pp 281-390.
43. Mal, T.K., Adorjan, P., Corbett, A.L., "Effect of copper on growth of an aquatic macrophyte, *Elodea Canadensis*". *Environ. pollution*, 120, (2002), 307-311.
44. Devi, M., Thomas, D.A., BARBER, J.T., FINGERMAN, M., "Accumulation and physiological and biochemical effects of cadmium in a simple aquatic food chain". *Ecotoxicol and Environ Safety*, 33, (1996), 38-41.
45. Küpper, H., Küpper, F., Spiller, M., "Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants". *J of Experim. Botany*, 47, (1996), 259-266.
46. GRNC, Groupe Radioécologie Nord-Cotentin, 2002.
47. Huang, J.W., Cunningham, S.D. "Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation". *New Phytol.*, 134, (1996), 73–84.
48. McGrath, S.P., Zhao, F.J., Lombi, E., "Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides". *Adv Agric.*, 75, (2002), 1–56.
49. Rahman, M.A., Hasegawa, H., Ueda, K., Maki, C.O., Rahman, M., "Arsenic accumulation in duckweed (*Spirodela polyrhiza* L.): A good option for phytoremediation. *Chemosphere*, 69, (2007), 439-499.



50. Baker, A.J.M., Brooks, R.R. "Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements—a review of their distribution"., *Ecology and Phytochemistry. Biorecovery*, 1, (1989),81–126.
51. Baker, A.J.H., McGrath, S.P., Reeves, R.D, Smith, J.A.C. "Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils". In: Terry, N., Bañuelos, G., editors. "Phytoremediation of contaminated soil and water"., Boca. Raton., FL: Lewis Publishers, (2000). p. 85–87.
52. Amiard, J.C., Caquet, T., Lagadic, L., "Les biomarqueurs parmi le méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement", in « Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement »(Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C et Ramade, F., eds), Introduction, Techniques et Documentations, Lavoisier, Paris,(1998).
53. Ramade, F., "Précis d'écotoxicologie".Ed Masson,Paris,(1992),224p.
54. Phillips, D.J.H., Rainbow, P.S., "Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants". Elsevier Applied Science: New York, NY, (1993).
55. De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H.M., "Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assesment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada)". *Aquatic Toxicol.*, 50, (2000), 51-71.
56. Vander Oost, R., Goksoyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., "Biomonotoring of aquatic pollution with feral eel ( *Anguilla anguilla*). II. Biomarkers : pollution induced biochemical responses". *Aqua. Toxicol.* 189, (1996), 189-222.
57. Vangronsveld, J., Mocquot, B., Mench, M., Clijsters, H., " Biomarqueurs du stress oxidant chez les végétaux". In " Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux"., Masson, Paris, (1997), 165-184.
- 58 Teisseire, H., Vernet, G., "Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*)". *Plant Sci.* 153, (2000), 65–72.
59. Miretzky, P., Saralegui, A., Fernandez Cirelli, A., "Aquatic macrophytes potentiel for the simultaneous removal of heavy metals". *Chemosphere*, 57, (2004), 997-1005.

60. Maine, M.A. Duarte, M.V. Sune, N.L., "Cadmium uptake by floating macrophytes", *Water Res.* 35, 11, (2001), 2629-2634.
61. Mishra, V. K., Tripathi, B.D., "Concurrent removal and accumulation of heavy metals by three aquatic macrophytes". *Bioresource Technol.* 99, (2008a), 7091-7097.
62. Shankers, A.K., Cervantes, C., Losa-Tavera, H., "Chromium toxicity in plants"., *Environ. Int.*, 31, (2005), 739–753.
63. Clijsters, H., Cuypers, A., Vangronsveld, J., "Physiological responses to heavy metals in higher plants; Defence against oxidative stress". *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung.* 54, (1999), 730-734.
64. Kohen, R., Nyska, A., "Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification". *Toxicologic Pathology*, 30, (2002), 620-650.
65. Quariti, O., Boussama, N., Zarrouk, M., Cherrif, A., Habib, Ghorbal, M., "Cadmium and copper induced changes in tomato membranes lipids". *Phytochem.*, 45 (7), (1997),1343-1350.
66. Briat, J.F., "Metal ion-activated oxidative stress and its control". In:Inze, M., Van Montagu, M. (Eds.), "Oxidative Stress in Plants". Taylor &Francis, New York, 2002, pp. 171-191.
67. Eleftheriou, E.P., Karataglis, S. "Ultrastructural and morphological characteristics of cultivated wheat growing on copper – polluted field". *Bot. Acta.*, 102,(1989),134-140.
68. Dietz, K.J., Baier, M., Kramer, U., "Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants". In: Prasad, M.N.V.,Hagemeyer, J. (Eds.), "Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems". Springer, Berlin, (1999), pp. 73-97.
69. Cobbett, S.C., "Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification". *Plant Physiology.* 123, (2000), 825-832.
70. Lewis, M.A. "Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review". *Environ. Pollu.*, 87, (1995),319-336.
71. Vavilin, D.V., Polynov, V.A., Matorin, D.N., Venediktov, J., "Sublethal concentration of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa*", *J. Plant Physiol.* 146, (1995), 609-614.

72. Wang, W. "The effect of river water on phytotoxicity of Ba, Cd and Cr. Environ.Pollut., 11, (1986b), 1-14.
73. Heiser, I. Obwald, W. Elstner E.F. "The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins". Plant Physiol.Biochem., 36, (1998),703-713.
74. Weckx, J.E.J., Clijsters, H.M.M., "Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper". Physiol. Plant. 96, (1996), 506-512.
75. Demidchik, V., Sokolik, A. Yurin.,V., "The effect of Cu<sup>2+</sup> on ion transport systems of the plant cell plasma lemma". Plant Physiol., 114, (1997), 1313 - 1325.
76. Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., Gardea-Torresdey, J., "The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: Implications for the food chain: Review". Biochemistry and Cell Biology, 41, (2009), 1665-1677.
77. Hillman, W.S., Culley, J.D.D., "The use of duckweed"., Am.Scient., 66 ,(1978),442-451.
78. Fujisawa, T., Kurosawa, M., Katagi, T., "Uptake and Transformation of Pesticide Metabolites by Duckweed (*Lemna gibba*)". Agric. Food Chem., 54, (2006), 6286-6293.
79. O.I.E (Office International de l'Eau), " Plantes aquatiques utiles ; les lentilles d'eau ou lemnaées". Ed. Tec & doc, Lavoisier. France, (1984), 69p.
80. Ater, M., Aït Ali, N., Kasmi, H., "Tolérance et accumulation du cuivre et du chrome chez deux espèces de lentilles d'eau : *Lemna minor L.* et *Lemna gibba L.*" Journal of Water Science, vol. 19, n° 1, (2006), 57-67.
81. Hillman, W.S., "The Lemnaceae or duckweeds: a review of the descriptive and experimental procedure". Bot.Rev., (1961), 27, 221-287.
82. Chadefau, M., Emberger, L., "Phylum des Pipérales" in " Traité de botanique systématique : les végétaux vasculaires", Masson, Paris, (1960), 1030-1040.
83. Wang, W., "Chromate ion as reference toxicant for aquatic phytotoxicity tests". Environ.Toxicol.Chem., 6,(1987),953-960.
84. Nasu, Y., Kugimoto, M., Tanaka, O., Takimoto, A., "comparative studies on the absorption of cadmium and copper in *Lemna pausicostata*". Environ.Pollut., 32,(1983),201-209.

85. Wang, W., "Toxicity test of aquatic pollutants by using common duckweed". *Environ.Pollut.*, (1986a),11,1-14.
86. Jain, S.K., Vasudevan, P., Jha, N.K., Azolla pinnata R.Br., "*Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water". *Water Res.* 24, (1990), 177-183.
87. Dirilgen, N., Inel, Y., "Effect of zinc and copper on growth and metal accumulation in duckweed *Lemna minor*". *Bull.Environ.Contam.Toxicol.*, 53,(1994),442-449.
88. Bishop, W.E., Perry, R.L., "Developpement and evaluation of flowthrough growth inhibition test with duckweed (*Lemna minor*)". ASTM SP 737, ASTM, Philadelphie,(1981),421-435.
89. Davis, J.A., "Comparison of static-replacement and flow-through bioassays using duckweed, *Lemna gibba* G3, U.S Environmental Protection Agency,(1981), Washington DC, EPA 560/6-81-003.
90. Wang, W., "Literature review on Duckweed toxicity testing". *Environ. Res.* 52, (1990), 7-22.
91. Hartman, W.A., Martin, D.B., "Effect of four agricultural pesticides on *Daphnia pulex*, *Lemna minor* and *Potamogeton pectinatus*". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 35, (1985), 646-651.
92. Lockart, W.L., Billeck, B.N., Baron, C.L., "Bioassays with a floating aquatic plant *Lemna minor* for effects of sprayed and dissolved glyphosate". *Hydrobiologia*,188-189, (1989),353-359.
93. Matsumoto, H., Duke, S.O., "Acifluorfen-methyl effects on porphyrin synthesis in *Lemna paucicostata* Hegelm.6746". *J.Agric.Food.Chem.*, 38, (1990),2066-2071.
94. Kirby, M.F., Sheahan, D.A. "Effect of atrazine, isoproturon and mecoprop on the macrophyte *Lemna minor* and the alga *Scenedesmus subspicatus*". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 53, (1994),120-126.
95. Olette, R., Couderchet, M., Biagianti, S., Eullaffroy, P., "Toxicity and removal of pesticides by selected aquatic plants". *Chemosphere*, 70, (2008), 1414-1421.
96. Megateli, S., Olette, R., Semsari, S., Couderchet, M., "Toxicity of copper/ dimethomorph combination for *Lemna minor* and depuration of the fungicides by aquatic plant". 61<sup>th</sup> symposium on crop protection, Ghent University, Belgium, (2009).

97. Taraldsen, J.E., Noberg-King, T.J., "New method for determining effluent toxicity using duckweed *Lemna minor*". Environ.Toxicol.Chem.,9, (1990),761-767.
98. Jenner, H.A., Jansen-Mommen, J.P.M., "Phytomonitoring of pulverized fuel ash and leachates by the duckweed *Lemna minor*".Hydrobiologia,188 -189, (1989),361-366.
99. Jenner, H.A., Jansen-Mommen, J.P.M., "Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity of coal residues and polluted sediements". Arch.Environ.Contam.Toxicol., 25,(1993),3-11.
100. Dirilgen, N., Ince, N., "Inhibition effect of anionic surfactant SDS on duckweed *Lemna minor* with considerations on growth and accumulation". Chemosphere, 31, (1995), 4185-4196.
101. Lewis, M.A .1993. "Freshwater primary producers" in "Handbook of ecotoxicolgy Vol.1" , (Calow P.,ed.),Blackwell Sc.Pub.Oxford, Londres,1993, pp.28-50.
102. EPA: U.S. Environmental Protection Agency. "*Lemna* acute toxicity test". National Information Serv., (1983a), Springfield, Va, EPA-560/6-82-002.
103. ASTM: American Society for testing Material., "New standard guide for conducting static toxicity tests with *Lemna gibba*", (1991),ASTM, Philadelphie, E1415-91.
104. APHA: American Public Health Association, American water Works Association and water Environment Federation., "Toxicity test procedure using common duckweed". (1992), section 8211.
105. AFNOR: Association Française de Normalisation., "Détermination de l'inhibition de croissance de *L.minor*, norme XP T 90-337" in " essais écotoxicologiques"., (1998), 671 p., AFNOR, Paris.
106. Walbridge, C.T., "A flow testing procedure with duckweed *Lemna minor*"., U.S. Environmental Protection Agency, (1977),Duluth,Mn, EPA-600/3-77-108.
107. Davis, S.M., Drake, K.D., Maier, K.J., "Toxicity of boron to the duckweed, *Spirodella polyrrhiza*". Chemosphere, 48, (2002), 615-620.
108. Naumann, B., Eberius, M., Appenroth, K.J., "Growth rate based dose–response relationships and EC-values of ten heavy metals using the

- duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. plant Physiol., 164, (2007), 1656-1664.
109. Huber, W., Shubert, V., Sauter, C., "Effects of the pentachlorophenol on the metabolism of the macrophyte *Lemna minor*". Environ. Pollut. 29,(1982),215-223.
  110. Caux, P.Y., Weinberger, P., Carlisle, D.B., " A physiological study on the effect of triton surfactants on *Lemna minor*"., Environ. Toxicol. Chem., 7, (1988), 671-676.
  111. Filbin, G.J., Hough, R.A., "The effects of excess copper sulfate on the metabolism of the duckweed *Lemna minor*"., Aquat.Bot., 7, (1979),79-86.
  112. Bassi, R., Sharma, S. S., "Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor*". Ann. Bot. 72, (1993a), 151–154.
  113. Subhadra, A.V., Nanda, A.K., Behera, P.K., Panda, B.B., "Acceleration of catalase and peroxidase activities in *Lemna minor* L. and *Allium cepa* L. in response to low levels of aquatic mercury". Environ. Pollut., 69, (1991), 169-179.
  114. Teisseire, H., Couderchet, M. Vernet, G., "Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination". Ecotoxicol. Environ. Safety 40, (1998), 194 - 200.
  115. Razinger, J., Dermastia, M., Koce, D.J., Zrimec, A., "Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure". Environ. Pollution 153, (2008), 687-694.
  116. Buckley, J.A., "The susceptibility of superoxide dismutase in *Lemna minor* to systemic copper concentrated from waste water". Wat.Res., 28,(1994), 2469-2476.
  117. Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Haverland, P.S. Carlson, A.R., "Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides". Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, (1997), 353 - 357.
  118. Klaine, S.J., "Toxicity of coal gasifier solid waste to the aquatic plants *Selenastrum capricornutum* and *Spirodela oligorhiza*". Bull. Environ. Contam. Toxicol., 35,(1985), 551-555.
  119. Rowe, E.L., Ziobro, R.J., Wang, C.J.K., Dence, C.W., " The use of alga *Chlorella pyrenoidesa* and *Lemna perpusilla* as test organisms for toxicity

- bioassays of spent bleaching liquors and their compounds”., *Environ. Pollut.*, 27, (1982),289-296.
120. Anonyme1., “Technologies Clefs: développement des techniques de diagnostic et de traitement des sols (La Phytoremédiation) ”. *Technologies Médicales et Biotechnologiques (ARTEB)*, 2000-2005.
  121. Dushenkov, V.P., Nanda Kumar, B.A., Motto, H., “Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams”., *Environ.Sci. Technol.*, 29, (1995),1239 -1245.
  122. Judith, S.W., Peddrick, W., “Metal uptake, transport and release by wetlands plants: implications for phytoremediation and restoration”. *Enviro.Interna.*, 30, (2004),685-700.
  123. Faisal, I., Khan, T. H., Ramzi, H., “An overview and analysis of site remediation technologies”., *Environ. Manag.*, 71, (2004), 95-122.
  124. Ferro, A., Chard, J., Kjeldren, R., Turner, D., Montague, T., “Ground water capture using hybrid poplar trees: evaluation of a system in Ogden, Utah”. *Int.J. Phytoremed.* 3, (2001), 87-104.
  125. Hassen, D., Duda, P.J., Zayed, A., Terry, N., “Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization”. *Environ. Sci.Technol.*, 32,(1998),591-597.
  126. Horn, A.J. 2000. “Phytoremediation by constructed wetlands. In *phytoremediation of contaminated soil and water*”, ed. N terry, G Bañuelos,(2000),Boca Raton:Lewis, pp.13-40.
  127. Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., “Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment”. *Curr.Opin.Biotechnol.*,8, (1997c), 221-226.
  128. Raskin, I., Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, S., Salt, D.E., Ensley, B.D., “Removal of radionuclides and heavy metals from water and soil by plants”. *OECD Document Biorem.*, (1994a), 345–354.
  129. Raskin, I., Kumar, P.B.A.N., Dushenkov, S., Salt, D.E., “Bioconcentration of heavy metals by plants”. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5, (1994b), 285–290.
  130. Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., “Phytoremediation”. *Ann. Rev.Plant Physiol. Mol. Biol.*, 49, (1998), 643–668.
  131. Abhilash, P.C., Pandey, V.C., Rakesh, P.S., Chandran, S., Verma, A.K. Singh, N. Thomas A.P., “Phytofiltration of cadmium from water by

- Limnocharis flava* (L.) Buchenau grown in free-floating culture system”, Hazardous Materials, 170, (2009), 791-797.
132. Gazi, N.H.R. Steven, P.K.S., “Bioremoval of lead from water using *Lemna minor*”, Bioresource Technol. 70, (1999),225-230.
  133. Kara, Y., “Bioaccumulation of copper from contaminated wastewater by using *Lemna minor*”, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 72, (2004), 467-471.
  134. Maine, M., Duarte, M., Sune, N. “Zinc uptake by floating macrophytes”. Water Res., 35, (2001), 2629–2634.
  135. Nicholas, R.A. Steven, P.K.S. Kathryn, C., “Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*”, Biosource Technol. 89, (2003), 41-48.
  136. Mkandawire, M., Dudel, E.G, “Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany”.Sci.Tot.environ.,336,(2005),81-89.
  137. Axtell, N.R., Sternberg, S.P.K., Claussen, K., “Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*”.Bioresource.Technol.89. (2003), 41-48.
  138. Hou, W., Chen, X., Song, G.,Wang, Q., Chang, C.C., “Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*)”. Physiol. Plant and Biochem. 45, (2007), 62-69.
  139. Mkandawire, M., Lyubun, Y.V., Kosterin, P.V., Dudel, E.G,“ Toxicity of arsenic species to *Lemna gibba* L. and the influence of phosphate on arsenic bioavailability”. environ. Toxicol., 19, (2004), 26-35.
  140. Robinson, B.H., Lombi, E., Zhao, F.J., McGrath, S.P., “Uptake and distribution of nickel and other metals in the hyperaccumulator *Berkheya coddii*”. New Phytol, 158, (2003), 279 – 85.
  141. Kamal, M., Ghaly, A.E., Mahmoud, N., Côté, R., “Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic”. Environ. Int. 29, (2004), 1029-1039.
  142. Jain, C.K., “Metal fractionation study on bed sediments of river Yamuna,India”. Water Res. 38, (2004), 569–578.
  143. Xiong, Z.T., Liu, C., Geng, B., “Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr”. Ecotox. Environ. Safety, 64,(2006),273-280.



144. Hoagland, D.R., Arnon, D.I., "The water culture method for growing plants without soil". California Agriculture Experimental Station Circular 347, Berkely, California, USA, 1938.
145. Lichtenthaler, H.K., and Wellburn, A.R., "Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents"., Biochemical Society Transactions, v. 11, (1983),p. 591-592.
146. Bradford, M.M., "A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding". Anal.Biochem.,72, (1976), 248-254.
147. Ayyasamy, P.M., Rajakumar, S., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., Shanthid, K. Lakshmanaperumalsamy, P., Lee, S. "Nitrate removal from synthetic medium and groundwater with aquatic macrophytes". Desalination. 242, (2009), 286–296.
148. Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Gupta, D.K., "Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f) Ryle". Aquatic Toxicol., 80, (2006), 405 – 415.
149. Gupta, M., Sinha, S., Chandra, P., "Copper-induced toxicity in aquatic macrophyte *Hydrilla verticillata*: effect of pH". Ecotoxicology 5, (1996), 23-33.
150. Devi, S.R., Prasad, M.N.V., "Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants". Plant Sci. 138, (1998),157–165.
151. Vajpayee, P., Rai, U.N., Ali, M.B., Tripathi, R.D., Kumar, A., Singh, S.N., "Possible involvement of oxidative stress in copper-induced inhibition of nitrate reductase activity in *Vallisneria spiralis* L.", Bull. Environ. Contam. Toxicol. 74, (2005), 745–754.
152. Romero-Puertas, M.C., Palma, J.M., Gómez, M., del Rio, A., Sandalio, L.M., . "Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants". Plant Cell Environ. 25, (2002), 677–686.
153. Herbette, S., Taconnat, L., Hugouvieux, V., Piette, L., Magniette, M.L.M., Cuine, S., Auroy, P., Richaud, P., Forestier, C., Bourguignon, J., Renou, J.-P., Vavasseur, A., Leonhardt, N., "Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots". Biochimie 88, (2006), 1751–1765.

154. Vassilev, A., T. Tsonev, I. Yordanov, "Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenesis". *Environ. Pollut.* 103, (1998), 287–293.
155. Cuypers, A., Koistinen, K., Kokko, H., Kärenlampi, S., Auriola, S., Vnagrönsveld, J., "Analysis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins affected by copper stress". *J. Plant Physiol.* 162, (2005), 383–392.
156. Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V., "Phytochelatin synthesis and resopsne of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L". *Plant Physiol. Biochem.* 44, (2006a), 25–37.
157. Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S., Gupta, D.K., "Lead detoxification by Coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation". *Chemosphere* 65, (2006b), 1027–1039.
158. Öbek, E., Hasar, H., "Role of Duckweed (*Lemna minor* L.) Harvesting in biological phosphate removal from secondary treatment effluents". *Fresenius Environ Bull.*, 11, (2002), 27-29.
159. Rahman, M.A., Hasegarca, H., Ueda, K., Rahman, M.M., "Arsenic uptake by aquatic macrophyte *Spirodela polyrhiza* L.: interactions with phosphate and iron". *J. Hazar Material*, 160, (2008), 356-361.
160. Fenske, C., Daeschlein, G., Gunther, B., Knauer, P.R., "Comparaison of different biological methods for assessment of ecotoxicological risks". *Int.J.Hyg.Environ. Health.*, 209, (2006), 275-284.
161. Luna, C.M., Casano, I.M., Trippi, V.S., "Nitrate reductase is inhibited in leaves of *Triticum aestivum* treated with high levels of copper". *Physiol. Plant.* 101, (1997),103–108.
162. Horvat, T., Vidaković-cifrek, Ž., Oreščanin, V., Tkalec, M., Pevalek-kozlina, B., " Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L.". *Sci. Total Environ.*, 384, (2007), 229-238.
163. Lopez, J., Retuerto, R., Carballeira, A., "D665/D665a index vs. frequencies as indicators of bryophyte response to physicochemical gradients". *Ecology* 78, (1997), 261–271.

164. Noemi, R., Moshe, A. Gideon, O., "A pilot study of constructed wetlands using duckweed (*Lemna gibba* L) for treatment of domestic primary water in Israel". *Water Res.* 38, (2004), 2241-2248.
165. Dunbabin, J.S., Bowmer, K.H., "Potential use of constructed wetlands for treatment industrial waste water containing metals". *Sci.Total Environ.*111, (1992), 151-168.
166. Ensley, H.E., Barber, J.T., Oliver, A.I., "Toxicity and metabolism of 2,4-dichlorophenol by the aquatic angiosperm *Lemna gibba*". *Environ. Toxicol. Chem.*13, (1994), 325-331.
167. Lopez, J., Vazquez, M.D., Carballeira, A., "Stress responses and metal exchange kinetics following transplant of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* Hedw". *Freshwater Biol.* 32, (1994), 185–198.
168. Troll, W., Lindsley, J., "A photometric method for the determination of proline". *J. Biol. Chem.* 215, (1955), 655-660.
169. Pandey, P.K., Verma, Y., Choubey, S., Pandey, M., Chandrasekhar, K., Biosorptive removal of cadmium from contaminated ground water and industrial effluents. *Bioresource Technol.* 99, (2008), 4420-4429.
170. Li, T.Y., Xiong, Z.T., "A novel response of wild type duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) to heavy metals". *Environ. Toxicol.*, 19, (2004), 95-102.
171. Frankart, C., Eullaffoy, P., Vernet,G., "Photosynthetic responses of *Lemna minor* exposed to xenobiotics, copper, and their combinations". *Ecotox. Environ. Safety.* 53, (2002), 439-445.
172. Llorens, N., Arola, L., Blade, C., Mas, A., "Effects of copper exposure up on nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*". *Plant Sci.*160, (2000), 159-163.
173. Mazen, A.M.A., "Accumulation of four metals in tissues of *Corchorus olitorius* and possible mechanisms of their tolerance". *Biol. Plant.* 48, (2004), 267-272.
174. Sudhakar Babu, T., Akthar, T.A., Lampi, M.A., Tripuranthakam, S., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., "Similar Stress Responses are elicited by Copper and Ultraviolet Radiation in the Aquatic Plant *Lemna gibba*: Implication of Reactive Oxygen Species as Common Signals". *Plant Cell Physiol.*, 44, (2003), 1320–1329.

175. Maksymiec, W., "Effect of copper on cellular processes in higher plants". *Photosynthetica*, 34, (1997), 321-342.
176. Qysal, Y., Taner, F., "The effect of cadmium ions in the growth rate of the freshwater macrophyte duckweed *Lemna minor*". *Ekoloji*, 16, (2007), 9-15.
177. Mishra, V. M., Upadhyaya, A.R., Pandey, S.K., Tripathi, B.D., "Heavy metal induced due to coal mining effluent on surrounding aquatic system and its management through naturally occurring aquatic macrophytes". *Bioresource Technol.* 99, (2008b), 930-936.
178. Chu, T. M., Aspinall, D., Paleg, L.G., "Stress metabolism.VI-temperature stress and accumulation of proline in barley". *Aus. J. Plant Physiol.* 1, (1974), 89-97.
179. Ashraf, M., Harris, P.J., "Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants". *Plant Sci.*, 166, (2004), 3–16.
180. Aspinall, D., Paleg, L.G., "Proline accumulation: physiological aspects". In: Paleg, L. G., Aspinall, D. (Eds), "The physiology and biochemistry of drought resistance in plants". Academic Press, Sydney, Australia, (1981), 205–240.
181. Naidu, B.P., Paleg, L.G., Aspinall, D., Jennings, A.C., Jones, G.P., "Amino acid and glycine betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings". *Phytochemistry* 30, (1991), 407-409.
182. Ashraf, M., Foolad, M.R., "Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance". *Environ. Exp. Bot.* 59, (2007), 206-216.
183. Alia, Pardha Saradhi, P., "Proline accumulation under heavy metal stress". *J. Plant Physiol.* 138, (1991), 554–558.
184. Sharma, S.S., Diestz, K.J., "The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress". *J. Exp. Bot.* 57, (2006), 711–726
185. Mohan, B.S., Hosetti, B.B., "Potentiel phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds". *Environ. Pollut.* 98, (1997), 233-238.
186. Shat, H., Sharma, S.S., Vooijs, R., "Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and non-tolerant ecotype of *Silene vulgaris*". *Physiol. Plant.* 101, (1997), 477-482.

187. Mishra, V. K., Tripathi, B.D., "Accumulation of chromium and zinc from aqueous solutions using water hyacinth (*Eichornia crassipes*)". J. Hazard. Mater, 164, (2009), 1059-1063.
188. Miretzky, P., Saralegui, A., Fernandez Cirelli, A., "Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes". Chemosphere, 62, (2006), 247-254.
189. Vazquez, M.D., Lopez, J., Carballeira, A., "Uptake of heavy metal to the extracellular and intracellular compartment in tree species of aquatic bryophytes". Ecotoxicol. Environ. Safety, 44, (1999), 12-24.
190. Prasad, M.N.V., "Metallothioneins and metal binding complexes in plants". In: Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J. (Eds.), Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, (1999), pp. 51–72.
191. Harmens, H., Gusmão, N.G.C.P.B., Den Hartog, P.R., Verkleij, J.A.C., Ernst, W., "Uptake and transport of zinc in zinc-sensitive and zinc-tolerant *Silene vulgaris*". J Plant Physiol. 141, (1993), 309-315.
192. Clemens, S., "Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis". Planta. 212, (2001), 475–486.
193. Cosson, R.P., "Influences des pratiques agricoles sur la contamination des écosystèmes par les métaux lourds : approches écotoxicologiques", Thèse, Université de Paris –Sud Orsay, 1987, 53p.
194. Rusjan, D., Strlic, M., Pucko D. Korosec-koruza, Z., "Copper accumulation regarding the soil characteristics in sub – Mediterranean vineyards of Slovenia". Geoderma, 141, (2007), 111-118.
195. de Oliveira-Filho, E.C., Matos Lopes, R., Paumgarten, F.J.R. "Comparative study on the susceptibility of freshwater species to copper-based pesticides". Chemosphere, 56, (2004), 369 - 374.
196. Lucan-Bouché, M.L., "Contribution à l'étude de la biodisponibilité et de l'impact biologique chez *Tubifex tubifex* de contaminants du pool sédimentaire de l'environnement champardennais", Thèse, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, (1997), 232p.

197. Vanegas, C., Espina, S., Botello, A.V., Villanueva, S., "Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in white shrimp, *Penaeus setiferus*, juveniles", Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58, (1997), 87-92.
198. Gisi, U., Binder, H., Rimbach, E., "Synergistic interactions of fungicides with different modes of action". Trans. Br. Mycol. Soc., 85(2), (1985), 299-306.
199. Pape Lindstrom, P.A., Lydy, M.J., "Synergistic toxicity of atrazine and organophosphate insecticides contravenes the response addition mixture model". Environ. Toxicol. Chem., 16(11), (1997), 2415-2420.
200. Gisi, U., "Synergistic interaction of fungicides in mixtures" Phytopathology. 86, (1996), 1273 - 1279.
201. Gatidou, G., Thomaidis, N.S., "Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays". Aquat. Toxicol. 85, (2007), 184 – 191.
202. Liu, T.F., Sun, C., Ta, Na., Hong, J., Yang, S.G. Chen, C.X., "Effect of copper on the degradation of pesticides cypermethrin and cyhalothrin". Environ. Sci. 19, (2007), 1235 - 1238.
203. Shoji, R., "Effect of dissolved organic matter source on phytotoxicity to *Lemna aequinoctialis*". Aquat. Toxicol. 87, (2008), 210 - 214.
204. Teisseire, H., Couderchet, M. Vernet, G., "Phytotoxicity of diuron alone and in combination with copper or folpet on duckweed (*Lemna minor*)". Environ. Int. 106, (1999), 39 – 45.
205. Tomlin, C.D.S., "copper sulfate" in "the pesticide Manuel 11<sup>th</sup> edition" (Tomlin, C.D.S., ed.), British crop protection Council, Farnham, Grande Bretagne, (1997), pp. 270- 272.
206. Cluzeau, S., "Index phytosanitaire". Acta publication, Paris, 1997.
207. Paris-Palacios, S., Biangianni-Risbourg, S., Vernet, G., "Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate". Aquatic Toxicology, 50,(2000), 109-124.
208. Mocquot, B., Vangronsveld, J., Clijsters, H., Mench, M., "Copper toxicity in young maize (*Zea mais* L.) plants: effect on growth, mineral and chlorophyll contents and enzyme activities". Plant and Soil, 182, (1996), 287–300.

209. Navari-Izzo, F., Quartacci, M. F., Pinzino, C., Vecchia, F. D., Sgherri, C. L. M., "Thylakoid-bound and stromal antioxidative enzymes in wheat treated with excess copper". *Physiol. Plant.*, 104, (1998), 630-638.
210. Lu, C., Zhang, J., "Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants"., *Experimental Botany*, 50, (1999), 1199-1206.
211. Albert, G., Curtze, J. Drandarevski, C.A., "Dimethomorph (CME151): a novel curative fungicide". *Proceedings of the British Crop Protection Conference. Pests Disease 1*, (1998), 17 – 24.
212. BASF "The Chemical Company", diméthomorphe, 2008.
213. IFEN " Les pesticides dans l'eau", Rapport N°5 de l'Institut Français de l'Environnement, données de 2003 et 2004, Paris, (2006), p15.
214. Chollet, R., "Screening inhibitors (antimetabolites) of the biosynthesis or function of amino acids or vitamins with *Lemna* assay". In: Böger P. & Sandmann G. Eds. *Target assays for modern herbicides and related phytotoxic compounds*. (1993), pp.143 – 149.
215. Kanoun-Boulé, M., Vicente, J.A.F., Nabais, C., Prasard M.N.V. Freitas, H., "Ecophysiological tolerance of duckweeds exposed to copper". *Aquat. Toxicol.* 91, (2009), 1 - 9.
216. Ince, N.H., Dirilgen, N., Apikyan, I.G., Tezcanli, G. Üstün B., "Assessment of toxic interactions of heavy metals in Binary Mixture: A statistical Approach". *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, (1999), 365 - 372.
217. Verdisson, S., Couderchet, M. Vernet, G., "Effects of procymidone, fludioxonil and pyrimethanil on two non-target aquatic plants". *Chemosphere* 44, (2001), 467 - 475.
218. Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly R.M. Peakall, D.B., "Principles of Ecotoxicology". CRC Press. Third Edition. (2006).
219. Zabkiewicz, J.A., "Adjuvant and herbicidal efficacy, present status and future prospects". *Weed Res.* 40,(2000),139 –149.
220. Liu, Y., Cao, Q., Luo, F. Chen, J., "Biosorption of Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions from aqueous solutions by pretreated biomass of brown algae". *J. Haza. Materials* 163, (2009), 931 - 938.
221. Sarioglu, M., Güler U. Beyazati, N., "Removal of copper from aqueous solutions using biosolids". *Desalination* 239, (2009), 167 – 174.

222. Böttcher, T., Schroll, R., “The fate of isoproturon in a freshwater microcosm with *Lemna minor* as a model organism. Chemosphere, 66, (2007), 684 – 689.
223. Cedergreen, N., Andersen, L., Olesen C.F., Spliid H.H. Streibig J.C., “Does the effect of herbicide pulse exposure on aquatic plants depend on Kow or mode of action?”, Aquat. Toxicol. 71, (2005), 261 – 271.