

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie Des Procédés

THESE DE DOCTORAT

En Chimie Industrielle

Spécialité : Chimie industrielle

**ETUDE DES EFFETS D'INHIBITION DU CADMIUM ET DU PLOMB
ET LEUR PHYTOACCUMULATION PAR LA PLANTE AQUATIQUE
ET EPURATRICE *Lemna gibba***

Par

Amele AGGOUN

Devant le jury composé de :

H. KHALAF	Professeur, U. BLIDA 1	Président
H. LOUNICI	Professeur, U. BOUIRA	Examineur
D. ABDESSEMED	Professeur, U. S.T.H.B	Examineur
M. KREA	Professeur, U. MEDEA	Examineur
H. BOUTOUMI	Professeur, U. BLIDA 1	Examineur
Z.BENMAAMAR	Professeur, U. BLIDA 1	Directeur de thèse

Blida, 12 Décembre 2018

ملخص

استعمال النباتات في تطهير المحيط الطبيعي الملوث (فيتوروميديا)، هي تقنية حديثة. نوع النبات المستعمل في هذه التقنية يجب أن تتوفر فيه آلية التحمل والتكيف، القدرة على امتصاص الملوثات وإنتاج كتلة حيوية معتبرة. يمكن لـ "ليمناجيبيا"، هذه النبتة المائية المحلية المنتشرة في الجزائر، أن تكون مترشحة جيدة للتخلص من المعادن الثقيلة السامة والفائض من المغذيات من الأوساط المائية.

في الجزء الأول من العمل، تم اختبار آلية التكيف لدى "ليمناجيبيا"، تحت تأثير الكاديوم (Cd) والرصاص (Pb) ولذا تم تحديد الاستجابة الفيزيولوجية والكميات المتراكمة في أنسجتها أثناء تعريضها لـ 0.01، 0.1، 1 مغ/ل من Cd أو 0.1، 1، 10 مغ/ل من Pb، وكذا في مزيج ثنائي Cd+Pb يحتوي على التراكيز المذكورة أعلاه من Cd و 0.1 أو 1 مغ/ل من Pb.

بينت النتائج أنه تم تراكم المعادن المذكورة في نسيج النبتة، دون ظهور آثار للتسمم عليها، حيث حافظت على مظهرها الخارجي. أدى التسمم إلى إعاقة نسبة النمو التي لم تتجاوز 42%، عند تعريض النبتة لـ Cd و Pb كل واحد على حدى. أما في حالة المزيج Cd+Pb، فإن إعاقة نسبة النمو كانت أقل. قيم معامل التركيز تبين أن تراكم المعادن في النبتة جيد في حالة تعريضها لـ Cd أو Pb و قد يكون من متوسط إلى ضعيف في حالة المزيج.

في الجزء الثاني من هذه الدراسة، تم تحديد أثر المعادن الثقيلة على تخفيض كمية الفوسفات و النترات الموجودة في الوسط المائي الاصطناعي بالإضافة إلى تعيين كميات الكاديوم و الرصاص التي قامت "ليمناجيبيا" بامتصاصها.

انطلاقاً من النتائج يظهر أن:

- أكبر نسب تخفيض الفوسفات و النترات تحققت خلال أربعة أيام في الوسط المائي الذي يحتوي على 1 مغ/ل من الكاديوم (90.32%) و 1 مغ/ل من الرصاص (97.57%). أما بالنسبة للنترات النسب المحققة تتراوح بين 47.22-79.31% و بين 48.57-80.91% بوجود Cd و Pb على التوالي. في المزيج، ان تركيز الفوسفات انخفض بنسب تتجاوز 80% فحين انخفاض النترات كان ضعيفاً.
- انخفاض تراكيز Cd و Pb في الوسط المائي الذي يحتوي على الكاديوم و 0.1 مغ/ل من الرصاص بـ 6-100% من الكاديوم و بـ 66-100% من الرصاص. في الوسط المائي الذي يحتوي على الكاديوم و 1 مغ/ل من الرصاص من الملاحظ ان امتصاص النبتة لـ Cd ضعيف. عند تعريض "ليمناجيبيا" لـ 1 و 10 مغ/ل من الرصاص تم امتصاصه بنسبة 57% و 86.58% على التوالي.

ان تراكيز الكاديوم، الرصاص، الفوسفات و النترات في الوسط المائي الاصطناعي ينخفض بصفة معتبرة خلال اليومين الاولين من التجربة

كلمات-مفتاحية: ليمناجيبيا، الكاديوم، الرصاص، فيتوروميديا

ABSTRACT

Phytoremediation is an emergent technology using selected plants to clean up the contaminated environments. Plant species used should have high tolerance, the ability to accumulate the pollutants, and high biomass yield. *Lemna gibba* is an Algerian autochthonous species can be a suitable candidate for removal of heavy metals from pollutant water bodies.

In the first part of the study, the stress adaptation of the aquatic plant *L.gibba* treated with cadmium (Cd) and lead (Pb) either individually or in binary mixtures was examined. Thus the physiological response of *L.gibba* at uptake of Cd and Pb and their accumulation either alone or in combination were determined. Duckweed plants were exposed to 0.01, 0.1 and 1mg/L of Cd and 0.1, 1 and 10 mg/L of Pb. In the binary mixture, Varied Cd concentration (used above) in presence of 0.1 and 1 mg/L of Pb were tested. Plants have accumulated the selected heavy metals in its body without inducing any toxicity symptoms. Fronds looked green and healthy. Metal toxicity induced growth inhibition not exceeding 42 % when duckweed was exposed to Cd and Pb individually. Lowest growth inhibitions were recorded in binary mixtures. Thus, Cd and Pb interaction is an antagonistic type. On the basis of the BCF values of Cd and Pb, this useful parameter for evaluating of metal uptake efficiency, *L.gibba* can be considered as hyper-accumulative plant when exposed individually to the toxic metals and moderate or weak accumulator when co-contaminated.

In the second part of the study, the effect of the tested heavy metals (individually or in combination) on the removal of nitrate (NO_3^-) and orthophosphate (PO_4^{3-}) was assessed using *Lemna gibba* and also Cd and Pb removal from the culture medium and pH were carried. Results showed:

- The maximum phosphate removal efficiencies were recorded on the fourth day at 1 mg Cd/L (90.32%) and at 1 mg Pb/L (97.57%).Whereas, nitrate removal was 47.22-79.31% and 48.57- 80.91% for Cd and Pb containing set-ups respectively. In the binary mixtures, phosphate removal efficiency exceeds 80%. Nevertheless, nitrate removal was weak with time.

- In the binary mixture of Cd and 0.1 mg Pb/L, removal percentage ranged between 6-100% for Cd and 66-100% for Pb. Weak Cd removal efficiencies were recorded when the duckweed was exposed to mixtures of Cd and 1 mgPb/L. The maximum Pb removal efficiencies were 57% and 86.58% respectively at 1 and 10 mg/L of Pb alone.

○ Overall, in all treatments, orthophosphates, nitrate, Cd and Pb concentrations in the medium, decreased markedly within the two days of initiating experiments

Keywords: *Lemna gibba*, Cadmium, lead, phytoremediation.

RÉSUMÉ

La phytoremédiation constitue une nouvelle technologie permettant de dépolluer l'environnement contaminé en utilisant des plantes. L'espèce végétale doit posséder un fort pouvoir de tolérance, d'accumulation et une production importante de biomasse. La lentille d'eau *Lemna gibba*, une espèce autochtone Algérienne, peut être une bonne candidate pour l'élimination des métaux lourds et l'excès de nutriments des milieux aquatiques.

Dans la première partie de ce travail, l'adaptation de la plante aquatique *L.gibba* au stress causé par le cadmium (Cd) et le Plomb (Pb) individuellement ou en mélange binaire lors de leur accumulation est examinée. De ce fait, la réponse physiologique de *L.gibba* lors de son exposition à ces métaux ainsi que les quantités accumulées ont été déterminées. Les concentrations testées de Cd sont de 0.01, 0.1 et 1 mg / L et celles de Pb de 0.1, 1 et 10 mg/L. Dans les mélanges binaires, la co-contamination de la plante est réalisée avec les concentrations suscitées de Cd et 0.1 ou 1 mg/L de Pb.

Les résultats ont montré que la plante a accumulé les métaux lourds sélectionnés sans induire de toxicité apparente. Les frondes semblent être en bonne santé (vigoureuses et vertes). La toxicité s'est manifestée par l'inhibition de la croissance de la lentille d'eau ne dépassant pas 42% dans le cas de sa contamination individuelle par Cd et Pb. Une inhibition moins importante est observée dans les mélanges binaires Cd+Pb. De ce fait, le type d'interaction entre les deux contaminants est antagoniste.

A partir des valeurs calculées du facteur de bioconcentration (FBC), ce paramètre indispensable à l'évaluation de la capacité de la plante à accumuler les contaminants, il ressort que la lentille d'eau est un bon "accumulateur" de Cd et de Pb à partir du milieu de culture contaminé individuellement par chaque métal. Par ailleurs, l'accumulation peut-être modérée à faible dans le milieu de culture co-contaminé.

Dans la deuxième partie de cette étude, l'effet des métaux lourds individuellement ou en combinaison sur l'abattement des nitrates (NO_3^-) et des phosphates (PO_4^{3-}) par *Lemna gibba* a également été examiné ainsi que le suivi de l'évolution de la concentration des métaux dans le milieu de culture et celle du pH. A partir des résultats, il apparaît que :

- Le maximum d'élimination des phosphates est obtenu au 4^{ème} jour à 1mg/L de Cd (90.32%) et à 1 mg/L de Pb (97.57%). Quant aux nitrates, des taux de réduction allant de

47.22% à 79.31% et de 48.57% à 80.91% sont obtenus en présence de Cd et de Pb respectivement. En présence du mélange binaire Cd+Pb, les taux d'élimination des phosphates dépassent 80% alors que l'abattement des nitrates s'est révélé très faible.

- Les pourcentages d'élimination de Cd et de Pb par *Lemna gibba* à partir des solutions contenant le mélange binaire de Cd et 0.1 mg/L de Pb sont compris entre 6-100% pour Cd et entre 66-100% pour Pb. Par ailleurs, l'élimination de Cd est faible dans le milieu de culture co-contaminé par Cd et 1 mg/L de Pb. La présence individuelle de Pb dans le milieu de culture contaminé par à 1 et 10 mg/L, a conduit à un maximum de réduction de 57% et 86.58% respectivement.

- La concentration de Cd, Pb, nitrates et des phosphates diminue considérablement du milieu de culture, les deux premiers jours.

Mots-clés: *Lemna gibba*, Cadmium, lead, phytoremediation.

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans cette thèse a été réalisé au laboratoire de Génie chimique (LGC) du département de Génie des Procédés et au laboratoire d'amélioration des plantes du département des sciences agronomiques de l'université de Blida1.

Au terme de ce travail, je tiens à remercier les personnes qui d'une façon ou d'une autre ont contribué à sa réalisation.

Ainsi, je tiens à exprimer en premier lieu, ma profonde gratitude envers le Professeur Saida SEMSARI pour m'avoir proposée ce passionnant sujet de thèse sur une thématique nouvelle pour notre équipe.

Je voudrais ensuite témoigner ma reconnaissance au Professeur Zoubir BENMAAMAR qui a assuré la continuité de l'encadrement de cette thèse. J'ai beaucoup apprécié ses qualités humaines, ses précieux conseils, ses encouragements, sa disponibilité et la confiance qu'il m'a accordée.

Mes remerciements vont à Monsieur Hussein KHALAF, Professeur à l'Université de Blida1, d'avoir accepté de présider le jury. Je bénéficierai certainement de ses grandes connaissances.

J'exprime ma gratitude à Monsieur Hakim LOUNICI, Professeur à l'Université de Bouira, de l'honneur qu'il me fait en acceptant de participer à ce jury.

Ma reconnaissance s'adresse aussi à Monsieur Djamel ABDESSEMED, Professeur à l'Université des Sciences et Technologie Houari Boumediene, pour sa participation à ce jury et pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.

Je suis très honorée par la présence de Monsieur Mohamed KREA, Professeur à l'Université de Médéa. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie chaleureusement Monsieur Hocine BOUTOUMI, Professeur à l'Université de Blida 1, pour avoir pris le temps de lire et d'évaluer ce travail. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur Smail LOUALHI du Centre de Recherche Nucléaire d'Alger (CRNA) et Monsieur A. Tabet de l'Agence Nationale des Ressources Hydriques (ANRH) qui m'ont permis d'effectuer les analyses indispensables à cette recherche.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à Madame CHAOUCHÉ, Professeur au département des sciences Agronomiques de l'université de Blida1, d'avoir accepté de

m'accueillir dans le laboratoire d'Amélioration des Plantes me permettant de bénéficier de l'appareillage nécessaire à la réalisation de mes expériences.

Je n'oublierai certainement pas de remercier vivement tous les techniciens du département de Génie des Procédés de l'Université de Blida1, pour leur collaboration et leur disponibilité, sans oublier, Mademoiselle Zakia LAICHI, ingénieur au laboratoire d'amélioration des plantes.

Je dédie cette thèse à ma famille :

A mes chers parents qui m'ont toujours soutenue et épaulée pendant toute la durée de mes études. Que le bon Dieu vous protège et vous garde pour moi.

A mon adorable fille Nihad, qui a supporté mes sautes d'humeur tout au long de ses années. Elle jouait parfois le rôle de mère aux moments où je me sentais démoralisée. Je t'aime très fort ma puce.

A ma grande sœur, mon beau- frère et mes adorables nièces qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans les moments durs.

A mes frères, mes belles-sœurs et mes neveux, merci pour tout.

A tous mes collègues du département ST de l'Université de Blida 1.

A tous(tes) mes amis (ies). En particulier Nadjib Houari et Nabila Belal.

TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	16
CHAPITRE 1	18
LES METAUX LOURDS ET L'ENVIRONNEMENT	
1.1. Introduction	18
1.2. Définition	18
1.3. Origine des métaux lourds	19
1.4. Sources d'émission	19
1.4.1. Sources d'origine naturelle	19
1.4.2. Sources d'origine anthropique	21
1.5. Forme des métaux lourds dans les eaux	21
1.6. Le Cadmium	22
1.6.1. Le cadmium dans l'environnement	22
1.6.2. Le cadmium et le vivant	24
1.7. Le plomb	25
1.7.1. Le plomb dans l'environnement	25
1.7.2. Le plomb et le vivant	26
CHAPITRE 2	27
LA PHYTOREMEDIATION	
2.1. Introduction	27

	9
2.2. Historique	27
2.3. Principe de la technique de phytoremédiation	28
2.4. Les différents types de remédiation	28
2.4.1. La phytoextraction ou phytoaccumulation	29
2.4.2. La phytostabilisation	29
2.4.3. La phytotransformation ou phytodégradation	30
2.4.4. La phytovolatilisation	30
2.4.5. La rhizofiltration	30
2.5. Le potentiel épuratoire des plantes aquatiques	33
2.6. Le matériel végétal	33
2.7. Les lentilles d'eau	34
2.7.1. <i>Lemna minor</i>	34
2.7.2. <i>Lemna gibba</i>	35
2.8. Les aspects économiques de la phytoremédiation	36
CHAPITRE 3	37
TOLERANCE AUX METAUX LOURDS CHEZ LES VEGETAUX	
3.1. Introduction	37
3.2. Les métaux lourds dans la plante	37
3.3. Absorption, transport et compartimentation des métaux lourds dans les cellules	38
3.3.1 Absorption au niveau de la membrane plasmique	38
3.3. 2. Association aux ligands et transport	39
3.3.3. Compartimentation	40
3.4. Toxicité et tolérance	41
3.4.1 La membrane plasmique	42
3.4.2 Système anti-oxydant	42
3.4.3. La chélation et la compartimentation cellulaire	45
3.4.4. Autres systèmes de défense au stress métallique	48

CHAPITRE 4 **51**

EFFET INDIVIDUEL ET COMBINE DU CADMIUM ET DU PLOMB

SUR LA CROISSANCE DE LA LENTILLE D’EAU

ET LEUR BIOACCUMULATION

4.1. Introduction	51
4.2. Matériels et méthodes	52
4.2.1. Le matériel végétal	52
4.2.2. Contamination aux métaux lourds testés	52
4.2.3. Paramètres de croissance	53
4.2.4. Dosage des métaux lourds dans la plante	54
4.3. Analyses statistiques	54
4.4. Résultats	56
4.4.1. Effet individuel des métaux lourds sur la croissance (NF) de <i>L.gibba</i>	56
4.4.2. Effet combiné des métaux lourds sur la croissance (NF) de <i>L.gibba</i>	58
4.4.3. Effet individuel des métaux lourds sur la biomasse sèche (PS) de <i>L.gibba</i>	61
4.4.4. Effet combiné des métaux lourds sur la biomasse sèche (PS) de <i>L.gibba</i>	63
4.4.5. Accumulation individuelle des métaux lourds par <i>L.gibba</i>	65
4.4.6. Accumulation simultanée des métaux lourds par <i>L.gibba</i>	68
4.5. Discussion	73
4.6. Conclusion	79

CHAPITRE 5 **80**

EFFET DES METAUX LOURDS SUR L’ABSORPTION DES PHOSPHATE ET DES NITRATES PAR LA LENTILLE D’EAU «*L.gibba*»

5.1. Introduction	80
5.2. Matériels et Méthodes	81
5.2.1 Matériel végétal	81

	11
5.2.2. Conditions de culture	81
5.2.3. Mesure de la capacité d'absorption du phosphore et de l'azote	81
5.2.4. Dosage des phosphates et des nitrates	81
5.3. Analyse statistique	82
5.4. Résultats	82
5.4.1. Effet des métaux lourds sur l'absorption des phosphates et des nitrates	82
5.4.1.1. Effet individuel de Cd ou de Pb	82
5.4.1.2. Effect combiné de Cd+Pb	86
5.4.2. Elimination des métaux lourds du milieu de culture	90
5.4.2.1. Elimination de Cd ou de Pb à partir du milieu de culture contaminé individuellement	90
5.4.2.2. Elimination de Cd et de Pb à partir du milieu de culture co-contaminé	91
5.4.3. Suivi de l'évolution du pH	95
5.4.3.1. Evolution du pH du milieu de culture contaminé individuellement par Cd ou Pb	95
5.4.3.2. Evolution du pH du milieu de culture co-contaminé par Cd et Pb	96
5.5. Discussion	98
5.6. Conclusion	100
CONCLUSION GENERALE	101
APPENDICES	104
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	108

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Liste des illustrations et graphiques :

Figure 2.1	Mécanismes de phytoremédiation	31
Figure 2.2	Photographie de <i>Lemna minor</i>	35
Figure 2.3	Photographie de <i>Lemna gibba</i>	35
Figure 3.1	Familles de transporteurs impliqués dans l'absorption des principaux métaux essentiels au développement des plantes.	38
Figure 4.1	Effet du Cadmium à différentes concentrations sur la croissance de <i>L.gibba</i> à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)	56
Figure 4.2	Effet du Plomb à différentes concentrations sur la croissance de <i>L.gibba</i> à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)	57
Figure 4.3	Effet de l'association du Cadmium à différentes concentrations et du plomb (0.1 mg/L) sur la croissance de <i>L.gibba</i> à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)	59
Figure 4.4	Effet de l'association du Cadmium à différentes concentrations et du plomb (1 mg/L) sur la croissance de <i>L.gibba</i> à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)	59
Figure 4.5	Effet du Cadmium à différentes concentrations sur la biomasse sèche (poids sec) de <i>L.gibba</i> à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)	62
Figure 4.6	Effet du Plomb à différentes concentrations sur biomasse sèche (poids sec) de <i>L.gibba</i> à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)	62
Figure 4.7	Effet de l'association du Cadmium à différentes concentrations et du plomb (1mg/L) sur la biomasse sèche (poids sec) de <i>L.gibba</i> à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)	64
Figure 4.8	Effet de l'association du Cadmium à différentes concentrations et du plomb (1 mg/L) sur la biomasse sèche (poids sec) de de <i>L.gibba</i> à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)	64
Figure 4.9	Evolution des quantités de Cd accumulées (en mg/g) par <i>L.gibba</i> en fonction du temps et de la concentration initiale de Cd (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)	65
Figure 4.10	Evolution des quantités de Pb accumulées (en mg/g) par <i>L.gibba</i> en	65

fonction du temps et de la concentration initiale de Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

- Figure 4. 11 Evolution des quantités de Cd accumulées (en mg/g) par *L.gibba* en 68
fonction du temps et de la concentration initiale de Cd en présence de
0.1 mg/L de Pb
- Figure .4.12 Evolution des quantités de Pb accumulées (en mg/g) par *L.gibba* en 68
fonction du temps et de la concentration initiale de Cd en présence de
0.1 mg/L de Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).
- Figure.4.13 Evolution des quantités de Cd accumulées (en mg/g) (valeurs 71
moyennes \pm Ecart-types, n=3) par *L.gibba* en fonction du temps et de
la concentration initiale de Cd en présence de 1 mg/L de Pb.
- Figure.4.14 Evolution des quantités de Pb accumulées (en mg/g) par *L.gibba* en 71
fonction du temps et de la concentration initiale de Cd en présence de 1
mg/L de Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).
- Figure 5.1 Evolution de la teneur en phosphates dans le milieu de culture en 83
présence du (a) cadmium et (b) plomb (valeurs moyennes \pm Ecart-
types, n=3)
- Figure 5.2 Evolution de la teneur en nitrates dans le milieu de culture en présence 85
de (a) Cd et (b) Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)
- Figure 5.3 Evolution de la teneur en phosphate dans le milieu de culture en 87
présence du mélange binaire Cd+ 0.1Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-
types, n=3)
- Figure 5.4 Evolution de la teneur en phosphate dans le milieu de culture en 87
présence du mélange binaire Cd+ 1Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-
types, n=3)
- Figure 5.5 Evolution de la teneur en nitrates dans le milieu de culture en présence 89
du mélange binaire Cd+0.1Pb (valeurs moyennes \pm Ecart- types, n=3)
- Figure 5.6 Evolution de la teneur en nitrates dans le milieu de culture en présence 89
du mélange binaire Cd+ 1Pb (valeurs moyennes \pm Ecart- types, n=3)
- Figure 5.7 Evolution de la concentration de Pb dans le milieu de culture (valeurs 91
moyennes \pm Ecart- types, n=3)
- Figure 5.8 Evolution de la concentration de Cd milieux de cultures en présence 92
du mélange binaire Cd+ 0.1Pb (valeurs moyennes \pm Ecart- types,

	n=3).	
Figure 5.9	Evolution de la concentration de Pb dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+ 0.1Pb (valeurs moyennes \pm Ecartstypes, n=3).	93
Figure 5.10	Evolution de la concentration de Cd dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+ 1Pb (valeurs moyennes \pm Ecartstypes, n=3).	93
Figure 5.11	Evolution de la concentration de Pb dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+ 1Pb (valeurs moyennes \pm Ecartstypes, n=3)	94
Figure 5.12	Evolution du pH du milieu de culture contaminé par Cd. (valeurs moyennes \pm Ecartstypes, n=3).	95
Figure 5.13	Evolution du pH du milieu de culture contaminé par Pb. (valeurs moyennes \pm Ecartstypes, n=3).	96
Figure 5.14	Evolution du pH du milieu de culture co-contaminé Cd+Pb en présence de 0.1 mgPb/L (valeurs moyennes \pm Ecartstypes, n=3)	97
Figure 5.15	Evolution du pH du milieu de culture co-contaminé Cd+Pb en présence de 1 mgPb/L (valeurs moyennes \pm Ecartstypes, n=3).	97

Liste des tableaux :

Tableau 1.1	Origine des métaux lourds	20
Tableau 1.2	Valeurs moyennes des émissions des métaux lourds	21
Tableau 1.3	Forme de quelques métaux dans les eaux	22
Tableau 2.1	Stratégies de phytoremédiation	32
Tableau 4.1	%inhibition de la croissance de <i>L.gibba</i> en présence de Cd et de Pb	58
Tableau 4.2	%inhibition de la croissance de <i>L.gibba</i> en présence du mélange Cd+ Pb	60
Tableau 4.3	La toxicité observée est calculée pour le taux de croissance de la plante à différentes combinaisons de Cd et Pb.	60
Tableau 4.4	Facteur de bioconcentration (FBC) de Cd (valeurs moyennes \pm Ecartstypes, n=3)	67
Tableau 4.5	Facteur de bioconcentration (FBC) de Pb (valeurs moyennes \pm	67

	Ecarts- types, n=3)	
Tableau 4.6	Facteur de bioconcentration (FBC) de Cd en présence du mélange Cd+0.1 Pb (valeurs moyennes \pm Ecarts- types, n=3)	69
Tableau 4.7	Facteur de bioconcentration (FBC) de Pb en présence du mélange Cd+0.1 Pb (valeurs moyennes \pm Ecarts- types, n=3).	70
Tableau 4.8	Facteur de bioconcentration (FBC) de Cd en présence du mélange Cd+ 1 Pb (valeurs moyennes \pm Ecarts- types, n=3)	72
Tableau 4.9	Facteur de bioconcentration (FBC) de Pb en présence du mélange Cd+ 1 Pb (valeurs moyennes \pm Ecarts- types, n=3)	72
Tableau 5.1	Effet de Cd et de Pb sur l'abattement (%) des phosphates.	84
Tableau 5.2	Effet de Cd et de Pb sur l'abattement (%) des nitrates.	86
Tableau 5.3	Effet de Cd+Pb sur l'abattement (%) des phosphates.	88
Tableau 5.4	Effet de Cd+Pb sur l'abattement (%) des nitrates.	90
Tableau 5.5	Pourcentage d'élimination (%) de Cd à partir du milieu de culture.	91
Tableau 5.6	Pourcentage d'élimination (%) de Cd à partir du milieu de culture co-contaminée par Cd+Pb	94
Tableau 5.7	Pourcentage d'élimination (%) de Cd à partir du milieu de culture co-contaminée par Cd+Pb	95

INTRODUCTION

Le développement industriel, agricole et urbain est accompagné inévitablement par des problèmes de pollution de l'environnement aquatique. Parmi les polluants pouvant contaminer les eaux, l'accent est mis, ces dernières années sur les micropolluants métalliques, plus précisément sur les métaux lourds [1].

L'accumulation des métaux lourds dans l'environnement peut se répercuter sur la santé des êtres humains et des animaux [2]. Ces éléments, par nature non biodégradables, présentent une forte écotoxicité et pourraient être impliqués dans de nombreuses pathologies [3,4].

Les métaux lourds tels que le Cadmium et le Plomb, souvent présents dans les effluents industriels, sont très toxiques pour les organismes vivants dans les systèmes aquatiques [5].

Le cadmium est utilisé dans une multitude d'industries, principalement pour la fabrication de batterie, piles, pigments, agents de polymérisation ou de stabilisation des matières plastiques et dans les traitements des surfaces de métaux [6].

Les effets toxiques du cadmium sur les écosystèmes notamment de son transfert dans les chaînes trophiques et la santé des organismes sont connus: atteintes rénale, pulmonaire, osseuse, par ailleurs cancérologène et mutagène.

Les principales sources de contamination en Pb sont les rejets anthropiques. Ils proviennent principalement des industriels qui extraient et purifient le Pb naturel et qui recyclent les composants contenant du Pb comme les batteries [7].

La présence des métaux lourds dans les écosystèmes aquatiques ou terrestres engendre aussi des conséquences dangereuses pour la majorité des plantes. Cependant, quelques espèces développent des moyens de protection efficaces contre ces molécules. Ces propriétés naturelles des plantes sont exploitées dans le domaine de la phytoremédiation.

La phytoremédiation est une technologie émergente qui utilise les plantes pour

extraire, transformer ou stocker les polluants contenus dans les sols, les sédiments, les eaux souterraines ou de surface et même l'atmosphère [8].

Cette méthode de dépollution, plus longue qu'une extraction classique, s'avèrerait cependant moins coûteuse, ce qui la place en bonne position dans les stratégies de dépollution. Il est admis que les procédés de phytoremédiation entraînent des dépenses 50 à 80 % inférieures à celles nécessaires pour des traitements conventionnels tels que la précipitation chimique, l'échange d'ions, l'adsorption, les procédés à membranes et les traitements électrochimiques [9].

Pour qu'elles soient utilisées dans ce cadre, les plantes doivent tolérer la présence du contaminant présent parfois en concentration élevée et d'être capables d'accumuler le polluant dans les racines ou les parties aériennes.

Les plantes aquatiques telles que les lentilles d'eau (*Lemna minor* et *Lemna gibba*) possèdent des propriétés qui leur confèrent un grand potentiel en phytoremédiation.

Le travail expérimental réalisé a été consacré à l'estimation du potentiel phytoremédiateur d'une espèce aquatique, *Lemna gibba* d'une part vis-à-vis du Cadmium et du Plomb individuellement ou en combinaison binaire et d'autre part, vis-à-vis des nitrates et des phosphates, responsables du phénomène d'eutrophisation, en présence des contaminants métalliques. Le choix de *Lemna gibba* est fondé sur sa tolérance, sa capacité d'accumulation et sa productivité en biomasse [10].

Cette thèse est articulée autour de deux parties :

-Une synthèse bibliographique qui retrace les connaissances actuelles sur les métaux lourds et leurs effets sur la plante étudiée, sur les principaux mécanismes de la technique de phytoremédiation et sur la tolérance développée chez les végétaux envers les polluants métalliques.

-Une partie expérimentale composée de deux chapitres. Le premier, est consacré à l'étude de l'effet du cadmium et du plomb sur la croissance de la plante ainsi que leur phytoaccumulation. Le deuxième chapitre est porté sur l'étude de l'effet du cadmium et du plomb sur l'élimination des phosphates et des nitrates. Dans chaque chapitre, le matériel, les protocoles expérimentaux et les techniques d'analyse utilisés pour la réalisation des objectifs sont décrits puis les résultats sont présentés et discutés.

CHAPITRE 1

LES METAUX LOURDS ET L'ENVIRONNEMENT

1.1. Introduction

Chaque année, des milliers de tonnes de contaminants provenant de sources domestiques, industrielles et agricoles sont déversés directement ou indirectement dans les eaux de surface. Parmi ces contaminants, les métaux lourds qui occupent une place non négligeable.

Les métaux sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, en particulier dans l'eau et leurs concentrations varient suivant l'élément considéré. Par exemple le fer, le zinc, le nickel et le cuivre peuvent se retrouver fréquemment à des concentrations de 100 nM à 1 μ M, alors que d'autres métaux comme le cadmium et le mercure se présentent sous forme de traces de l'ordre de 1 nM.

La découverte des métaux constitue une étape fondamentale dans l'histoire de l'homme. Ils paraissent étroitement liés à la civilisation, canalisation en plomb à Rome, pigments à base de plomb ou de mercure dans les peintures anciennes, miroirs étamés à l'étain et au mercure et outils de toutes sortes. La civilisation moderne fait un usage important des métaux et en particulier des métaux dits « lourds », qui sont des toxiques puissants.

1.2. Définition

Les métaux lourds sont définis par certains auteurs comme des éléments métalliques ayant une masse volumique minimale de 4000 à 5000 kg / m³ [11,12]. D'autres définissent comme métaux lourds les éléments métalliques compris entre le cuivre et le plomb dans le tableau périodique des éléments (excluant donc le fer et le chrome). L'arsenic est aussi très souvent inclus parmi les métaux lourds ou métalloïdes.

D'un point de vue biologique, on distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques.

(i) Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus

biologiques [13]. Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn) et du fer (Fe). Par exemple, le zinc (Zn), à la concentration du millimolaire, est un oligo-élément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques (déshydrogénases, protéinase, peptidase) et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides [14].

(ii) Les métaux toxiques ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg) et du cadmium (Cd).

Les métaux lourds sont aussi connus comme éléments trace métalliques (ETM). Cette nomination a pour raison le fait qu'ils se trouvent en faibles concentrations dans la croûte terrestre. Toutefois, des facteurs anthropiques comme l'activité minière, peuvent générer une augmentation considérable des concentrations en métaux dans les eaux et dans les sédiments de la région affectée, alors dans ce cas, ces éléments peuvent être considérés comme des éléments majeurs dans le milieu étudié. De ce fait, au cours de ce travail, nous avons préféré utiliser l'expression « métaux lourds pour ne pas altérer la définition des éléments traces métalliques (ETM).

1.3. Origine des métaux lourds

Il existe de nombreuses sources de métaux lourds de nature différente. Produits agricoles, déchets urbains et industriels, retombées atmosphériques, etc. Le tableau 1.1 récapitule l'origine de quelques métaux [15].

1.4. Sources d'émission

Les ions métalliques présents dans l'environnement peuvent provenir de deux sources principales :

1.4.1. Sources d'origine naturelle

Les métaux lourds se trouvent dans tous les compartiments de l'environnement. Les réserves les plus importantes se trouvent dans les roches et /ou les sédiments océanique. Les gisements naturels deviennent des sources de contamination des eaux dans les situations suivantes :

- L'exploitation des mines ; L'érosion qui transporte les métaux vers les sols, les eaux de surface et les sédiments ;
- Des éruptions volcaniques terrestres ou sous- marines ;

Tableau 1.1: Origine des métaux lourds [16]

Métaux	Leurs provenances	(1)	(2)
Cr	Tannerie, fabrication d'alliages spéciaux, industries de traitement de surface.	*	*
Cd	Industrie de traitement de surface des métaux et de la stabilisation des matières plastiques, fabrication de caoutchouc, colorants.		*
Cu	Canalisation d'eau, fabrication de fils électriques, radiateurs d'automobiles.	*	*
Zn	Produits pharmaceutiques ou domestiques, conduites d'eau, fabrication de piles, galvanisation.	*	*
Ni	Fabrication d'aciers et d'alliages spéciaux pour le recouvrement de surfaces métalliques par électrolyse, fabrication des peintures.		*
Hg	Produits pharmaceutiques ou domestiques, fabrication d'appareils électriques, fabrication de chlorure de vinyle.		*
Pb	Canalisation d'eau, fabrication de bacs de batteries, peintures, additifs pour essence, stabilisants des chlorures polyvinyles(PVC).		*

- (1) Oligo-élément nécessaire jusqu'à un certain seuil.
- (2) Élément toxique et/ou phytotoxique au-delà d'une certaine limite.

Il y a donc des sources de contamination naturelles ; une fois en circulation, les métaux se distribuent dans tous les compartiments de notre environnement : l'eau, l'air et les sols.

1.4.2. Sources d'origine anthropique [16]

Le quart de la contamination par les métaux lourds est dû aux ordures ménagères (piles au cadmium, batteries au plomb, cuivre et zinc, des pesticides, ...etc. Ils sont nombreux et variés.

Les teneurs des principaux métaux lourds (valeurs moyennes des émissions) de sources naturelles et anthropiques en tonnes/an sont représentés dans le tableau 1.2

Tableau 1.2 : Valeurs moyennes des émissions des métaux lourds

Métal	Valeurs moyennes des émissions des métaux (T/an)	
	Sources naturelles	Sources anthropiques
Cr	44.000	30.77
Cu	28.000	38.189
Ni	30.000	55.642
Pb	12.000	333.854
Zn	45.000	131.866

1.5. Formes des métaux lourds dans les eaux

La composition des eaux usées est très hétérogène. Ces eaux renferment de nombreuses substances organiques ou minérales qui se trouvent en suspension ou dissoutes.

Les métaux lourds dans les eaux peuvent se manifester sous les formes suivantes [17] :

- Solubles ;
- En suspension.

Tableau 1.3 : Formes de quelques métaux dans les eaux [18].

Métaux lourds	Symbole chimique	Forme des métaux dans les eaux	
Chrome	Cr	Cr en suspension	
		Cr dissous	Cr ⁶⁺
			Cr ³⁺
Cadmium	Cd	Cd en suspension	
		Cd dissous	Sous forme ionique
			Sous forme complexe
Plomb	Pb	Pb en suspension (phosphate, carbonate, hydroxyde sulfure)	
		Pb dissous Pb ²⁺	
Cuivre	Cu	Cu en suspension	
		Cu dissous	Sous forme ionique Cu ²⁺ essentiellement mais possibilité de Cu ⁺
Nickel	Ni	Ni en suspension [(Ni(OH) ₂ , Cyanure de Ni, carbonates]	
		Ni dissous	-Ni ionique Ni ²⁺ -Ni complexe (Cyanure, EDTA)

Dans ce qui suit, nous donnerons des informations sommaires sur le cadmium et le plomb, contaminants utilisés dans notre étude pour tester la tolérance de la plante aquatique *lemna gibba* vis-à-vis de ces deux métaux ainsi que leur accumulation.

1.6. Le Cadmium

1.6.1. Le cadmium dans l'environnement

Le cadmium n'existe pas à l'état natif. Son minerai, la greenockite, est un sulfure (CdS) présent en faibles proportions (de 0,01 à 0,05%) dans presque tous les minerais de zinc. C'est donc un sous-produit de la métallurgie du zinc, mais il est aussi présent dans des minerais de cuivre, de plomb et dans certains phosphates naturels.

Ce métal n'a été découvert et isolé qu'au début du XIX^{ème} siècle et il est resté inexploité jusqu'à ce que ses potentialités industrielles soient mises en évidence. La production mondiale annuelle est de 20.000 tonnes

Le cadmium est un métal blanc argenté, ductile et malléable qui résiste particulièrement à la corrosion. Après dépôt par électrolyse, il constitue de ce fait un revêtement protecteur de qualité pour l'acier (cadmiage). Il sert également de pigments pour colorer divers matériaux en jaune avec CdS ou en rouge avec Cd(S, Se), mais à cause de leur toxicité, l'utilisation de ces pigments est fortement réglementée par la Communauté Européenne. Il est également ajouté comme stabilisant (anti-UV) dans les plastiques, le PVC. Mais son utilisation essentielle, à plus de 70%, concerne la fabrication des accumulateurs, les piles rechargeables Ni-Cd.

Le cadmium ne se dégrade pas dans l'environnement, mais des processus physiques et chimiques peuvent modifier sa mobilité, sa biodisponibilité et son temps de séjour dans différents milieux. Dans ce sens, l'activité humaine peut en changer la répartition, la complexation chimique et les concentrations par l'introduction de nouveaux modes de dispersion. Les activités humaines entraînent des rejets de cadmium, dans l'air, le sol et l'eau.

Les sels de cadmium, très peu volatils, sont présents dans l'air sous forme de très fines particules solides (fumées ou poussières). Lors d'expositions professionnelles ou environnementales, ces particules peuvent être inhalées et se déposer principalement dans les alvéoles pulmonaires. La valeur guide pour la concentration du cadmium dans l'air, proposée par le bureau Européen de l'Organisation Mondiale pour la Santé (O.M.S.), est de 5 ng.m^{-3} .

En plus des rejets atmosphériques, une partie du cadmium part directement dans le sol et les eaux. Cette pollution résulte essentiellement des activités métallurgiques, minières et agricoles. L'utilisation d'engrais phosphatés introduit par exemple une pollution par le cadmium dans l'eau et donc au niveau de la chaîne alimentaire (82 tonnes par an). Les normes européennes fixent une limite pour l'eau potable à $5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de cadmium.

L'eau est un élément très important pour la pollution par les métaux lourds, car elle sert d'une part de vecteur, mais peut également entraîner des modifications chimiques

selon la salinité ou la température. Ce qui est essentiel, puisque les divers composés du cadmium présentent des effets toxiques variables selon leur solubilité et donc leur facilité d'assimilation par un organisme [19].

Le cadmium est l'un des principaux polluants métalliques de l'environnement. Il provient essentiellement des activités humaines avec une émission chiffrée à presque 30 000 tonnes par an [12]. L'origine de la présence de cadmium dans les sols est attribuée aux retombées atmosphériques de fonderies de zinc, raffineries, incinérateurs ainsi qu'aux combustions de charbon, à divers déchets urbains et à l'utilisation de fertilisants en agriculture [12,20].

Il est rare de trouver des sols uniquement pollués par du cadmium car ce métal est plus souvent présent dans des milieux contenant aussi du plomb et / ou du zinc [21]. Les sols faiblement pollués contiennent des concentrations de cadmium comprises entre 0,04 et 0,32 mM de Cd. Les sols modérément à fortement contaminés atteignent quant à eux des concentrations supérieures à 0,32 mM et pouvant aller jusqu'à 1 mM [21].

1.6.2. Le cadmium et le vivant

Le cadmium (Cd) est un métal non essentiel pour les organismes vivants. Sa toxicité est un phénomène avéré chez la plupart des êtres vivants dont l'Homme car le cadmium est classé comme agent cancérigène et génotoxique de groupe 1 par «International agency for research on cancer » ou IARC [21].

Le cadmium est un élément toxique. Selon les doses d'exposition, les modes de contamination et les organismes considérés, ses effets peuvent être plus ou moins importants. Présent dans tous les compartiments de l'environnement, il peut contaminer les plantes, les animaux et bien sûr l'homme.

- **Chez l'homme**

Des cas d'intoxication aiguë provenant d'expositions accidentelles provoquent d'importants dommages pulmonaires et peuvent entraîner la mort [22]. Cependant, en dehors de ces expositions accidentelles, la principale préoccupation pour la santé correspond aux possibilités d'expositions prolongées de l'ensemble d'une population à de faibles doses de cadmium.

Pour l'homme, les deux principales voies de contamination sont l'inhalation et l'ingestion. Par voie pulmonaire, une partie du cadmium se dépose dans le système respiratoire. Les sels de cadmium les plus solubles, les chlorures et les oxydes sont absorbés à 90%, les sulfures beaucoup moins solubles, seulement à 10%. Cette absorption peut se poursuivre plusieurs semaines après l'inhalation.

L'origine de cette contamination provient de l'air atmosphérique urbain, où les niveaux de cadmium peuvent être élevés près des centres industriels, mais aussi de la fumée de cigarette. Selon l'OMS (1992), une cigarette contient entre 1 et 2 µg de cadmium et environ 10% de ce cadmium est inhalé lorsque la cigarette est fumée. Une autre source de contamination est l'alimentation (légumes, poissons, *etc.*).

- ***Chez les organismes aquatiques***

La toxicité avérée du cadmium et de ses composés impose un principe de précaution, limitant au maximum les contaminations par ce métal et une stratégie de surveillance du niveau de pollution. Dans cette optique, la recherche d'organismes sentinelles et la mise au point d'indicateurs, ou biomarqueurs permettant de détecter de façon précoce une pollution par le cadmium est très importante.

Comme nous venons de le voir, les sources de contamination environnementale par le cadmium sont variées et l'eau est un vecteur important de cette pollution. Les organismes aquatiques peuvent être contaminés directement à partir de la phase soluble ou par ingestion de la phase particulaire.

L'impact du cadmium sur les organismes dépend tout d'abord de la forme chimique sous laquelle il se trouve. Il peut exister sous forme d'ion libre, de complexes organiques ou inorganiques, ou sous des formes insolubles, hydroxyle ou sulfure. La chimie du cadmium soluble dans l'eau est affectée par de nombreux paramètres tels que le pH ou la salinité.

1.7. Le plomb

1.7.1. Le plomb dans l'environnement

Le plomb, élément du groupe IV-A du tableau périodique, de masse atomique 207,2 g/mol, possède une densité élevée de 11,3 g.cm⁻³. Le plomb possède un point de

fusion de 327°C et sa température d'ébullition est d'environ 1700°C. Il est difficilement détruit, et non dégradable [23]. Dans le sol, le Pb peut se retrouver sous forme ionique, dissoute, ou liée plus ou moins fortement aux particules [24].

L'accumulation de Pb, provenant des retombées atmosphériques, ou de déchets contaminés déposés sur le sol, se fait principalement dans les horizons de surface [25] et plus précisément dans les horizons riches en matière organique. Les teneurs en Pb diminuent, ensuite, plus en profondeur [26]. Ceci s'explique par le fait que le Pb est peu mobile.

Etant principalement associé aux argiles, aux oxydes, aux hydroxydes de fer et à la matière organique, il n'est mobile que lorsqu'il forme des complexes organiques solubles et/ou que le sol a dépassé sa capacité d'absorption pour le Pb [23, 24].

1.7.2. Le plomb et le vivant

Le plomb peut causer des dommages au système nerveux. Il peut également endommager les reins, le foie et le système reproducteur, processus cellulaires de base et les fonctions cérébrales. Les symptômes d'intoxication sont l'anémie, l'insomnie, des maux de tête, des étourdissements, de l'irritabilité, la faiblesse des muscles, des hallucinations et des dommages rénaux [1]

CHAPITRE 2

LA PHYTOREMEDIATION

2.1. Introduction

Les nombreux cas de pollution par les métaux lourds génèrent autant de site contaminés qu'il faut réhabiliter. Les méthodes physico-chimiques de dépollution de ces sites utilisées *in situ* et *ex situ* présentent l'inconvénient d'être coûteuses et lourdes à mettre en œuvre [27-29].

La capacité de certaines plantes à tolérer ou même à accumuler des métaux a permis d'ouvrir de nouvelles voies de recherche sur le traitement des sols, des eaux et de l'air : on parle de phytoremédiation. Le besoin de nouvelles techniques économiquement compétitives s'est fait sentir et l'utilisation des biotechnologies s'est avérée être une alternative intéressante.

2.2. Historique

Cette technique a été utilisée dès l'antiquité par les Grecs et les Romains. En 1871 les travaux de Mille et Claye sur la dégradation des polluants des eaux usées par les cultures agricoles permirent de mettre en place à Paris un hectare de « jardin modèle » ouvert au public afin de convaincre les cultivateurs du bienfait de ce type d'installation.

En 1875, les villes de Moscou et de Berlin mettent en place des systèmes d'épuration similaires sur une surface de 25 000 ha pour la région berlinoise. En 1901, un lac artificiel (lac Mitchell) d'une surface de 275ha est mis en place dans la ville de San Antonio au Texas, puis à Munich en Allemagne. En 1912, la première zone humide pour l'épuration des eaux usées naît dans le Massachusetts. Puis la technique se perfectionne en Amérique du Nord et en Allemagne.

Depuis les années 90, l'utilisation de la phytoremédiation pour le traitement de l'eau est en plein développement à travers le monde : la ville de New York a lancé, au début des années 2000, un grand programme de phytoremédiation visant à préserver ses

ressources en eau, ce qui illustre bien le formidable potentiel de cette biotechnologie qui n'en est pourtant encore qu'à ses premiers développements.

Les végétaux vasculaires flottants ou enracinés (les macrophytes), n'interviendront dans le traitement qu'à partir de 1950 où leur effet dépolluant commence à être étudié de façon scientifique par des chercheurs allemands. Il a cependant fallu attendre jusqu'à 1972 pour que la première station fonctionnelle soit construite à Othfresen en Allemagne [30].

La phytoremédiation est en plein essor. L'utilisation de plantes pour éliminer notamment les métaux lourds et les pesticides, suscite un intérêt croissant et fait l'objet de nombreuses études.

2.3. Principe de la technique de phytoremédiation

Connue sous le nom de phytoremédiation « phyto » = plante et « remedium » =rétablissement de l'équilibre, remédiation, la phytoremédiation est définie comme l'utilisation de plantes pour extraire ou transformer les polluants organiques et aussi inorganiques (plus particulièrement les métaux lourds) [31].

Les aspects technologiques d'efficacité, de coût du traitement et les aspects économiques sont abordés. Plus précisément, les types de stratégies de phytoremédiation, particulièrement utilisés dans la dépollution des métaux lourds sont décrits ci-dessous et illustrés dans la figure 2.1

2.4. Les différents types de remédiation

Plusieurs mécanismes permettent aux plantes l'élimination des polluants par phytoremédiation [8] [32-35].

La première étape de la phytoremédiation est l'absorption ou extraction du polluant par voie racinaire pour un polluant du sol ou des eaux ou par voie aérienne pour un polluant atmosphérique. Ensuite, plusieurs mécanismes peuvent être développés par les plantes : certains polluants sont stockés et compartimentés dans la plante, ce qui correspond à une majorité des métaux lourds (phytoaccumulation).

D'autres polluants sont transformés par la plante en composés secondaires moins toxiques (phytodégradation) qui peuvent rester dans la plante ou être éliminés par voie racinaire ou aérienne (phytovolatilisation). Il s'agit généralement de polluants organiques

mais quelques métaux lourds comme le mercure et le sélénium peuvent être éliminés par voie aérienne.

A l'opposé, certaines plantes sont capables de sécréter des composés par voie racinaire afin de complexer les polluants dans le sol au lieu de les absorber (phytostabilisation).

2.4.1. La phytoextraction ou phytoaccumulation

Ce mécanisme permet d'extraire et d'accumuler des polluants dans les plantes qui absorbent et concentrent dans leurs parties récoltables (feuilles, tiges, racines), les polluants provenant des sols ou des eaux.

Certaines plantes dites hyperaccumulatrices sont capables d'emmagasiner des grandes quantités d'éléments métalliques. Les polluants absorbés peuvent ensuite être extraits des tissus végétaux.

Certaines espèces sont capables d'accumuler deux métaux lourds ou parfois même davantage. Par exemple, le tabouret bleuâtre (*Thlaspi caerulescens*) est une Brassicacée hyperaccumulatrice de cadmium, plomb, nickel et zinc [36]. Un métal est dit hyperaccumulé lorsque sa masse dans les différents tissus de la plante est supérieure à 0,1 % de la masse sèche de la plante, soit 1 g / kg [37]. Il existe cependant des exceptions à cette définition : l'hyperaccumulation du cadmium est définie pour une quantité supérieure ou égale à 0,01 % de la masse sèche de la plante et les plantes hyperaccumulatrices de fer, de manganèse ou de zinc doivent contenir au moins 1 % de ces éléments dans leur masse sèche.

2.4.2. La phytostabilisation

Cette technique permet d'éviter la dispersion des polluants dans les eaux de surface et souterraines [38]. Les plantes absorbent les polluants (essentiellement des métaux lourds) du sol, de l'eau ou de l'air, les retenant localement et réduisant leur biodisponibilité. Les composés polluants sont immobilisés en les liants chimiquement par précipitation, stabilisation, absorption ou piégeage de ceux-ci par la plante.

L'avantage de cette stratégie par rapport à la phytoaccumulation est de ne pas avoir à traiter les plantes par la suite. Cependant, la phytostabilisation, si elle évite la propagation des polluants, ne permet pas une réelle décontamination des sites. Il s'agit plutôt d'une

solution temporaire pour confiner rapidement une pollution avant qu'elle n'atteigne les milieux situés à proximité. Cette stratégie est généralement mise en place sur des mines d'extraction de métaux en fin d'exploitation avant d'utiliser par la suite des méthodes de dépollution de ces sites.

2.4.3. La phytotransformation ou phytodégradation

La phytodégradation utilise les propriétés de certaines plantes à produire des enzymes qui catalysent la dégradation des substances absorbées ou adsorbées, celles-ci sont alors transformées en substances moins toxiques ou non toxiques par la métabolisation des contaminants dans les tissus des plantes ou par les organismes de la rhizosphère maintenue par la plante. On parle alors de rhizodégradation, de phytostimulation ou encore de bioremédiation).

2.4.4. La phytovolatilisation

La phytovolatilisation est une forme particulière de phytodégradation. C'est le processus par lequel les plantes transforment les contaminants du sol ou des eaux polluées en éléments volatiles et les relâchent dans l'atmosphère via leurs feuilles [39].

Ce phénomène peu fréquent a été mis en évidence surtout pour la transformation du sélénium, du mercure et de quelques solvants chlorés. Des plantes peuvent par exemple convertir du sélénium en diméthyl sélényde qui est une forme volatile 100 fois moins toxique du sélénium. Deux espèces végétales, la moutarde chinoise (*Brassica juncea*) et une macro algue d'eau douce, le charophyte dioïque (*Chara canescens*) ont été décrites comme de bons phytovolatilisateurs de ce métal [40, 41].

2.4.5. La rhizofiltration

Les capacités élevées du système racinaire de certains végétaux, permet la dépollution et la restauration des eaux de surface et souterraines. Les plantes fonctionnent comme des pompes qui vont absorber de grandes quantités d'eau et en rejeter par transpiration. Certaines espèces ligneuses tolérant des sols gorgés d'eau sont également des modèles intéressants pour la rhizofiltration. C'est par exemple le cas des saules qui peuvent absorber jusqu'à 200 litres d'eau par jour [8]. La rhizofiltration est donc une étape préalable à une phytoaccumulation ou à une phytodégradation selon le type de polluant.

De plus, l'assèchement du milieu aquatique permet la création d'un milieu aérobie favorable à la dégradation par des microorganismes des polluants non absorbés par les plantes. Parmi les études réalisées, il a été montré que la jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*), une hydrophyte flottante, est une plante très prometteuse pouvant accumuler de nombreux métaux lourds suite à l'absorption d'eau [42]. Les quantités de métal accumulées par ha vont de 0,24 kg pour le cadmium à plus de 25 kg pour le zinc.

Le tableau 2.1 résume une partie des polluants traités par au moins un procédé de phytoremédiation. Les procédés de phyto- et rhizo- dégradation sont spécifiques des polluants organiques alors que l'accumulation, la volatilisation et la stabilisation sont des méthodes de traitement essentiellement utilisées pour des milieux (solides ou aqueux) riches en métaux lourds.

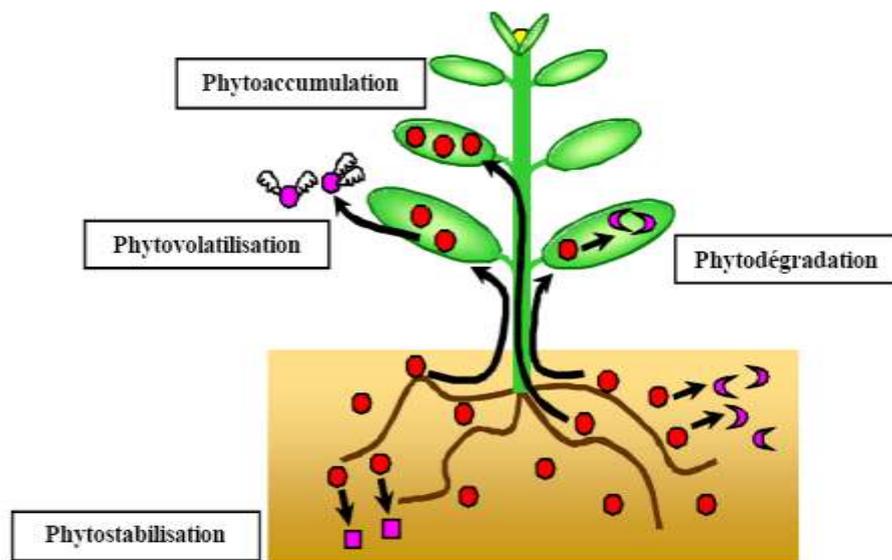


Figure 2.1 : Mécanismes de phytoremédiation.

Les xénobiotiques (métaux lourds ou composés organiques) représentés en rouge peuvent s'accumuler dans la plante en conservant la même forme ou être transformés (symboles roses) de différentes manières : dégradation dans le sol ou dans la plante (symboles en croissant), volatilisation dans l'atmosphère (ronds ailés) ou stabilisation dans le sol (carrés).

Tableau 2.1 : Stratégies de phytoremédiation

Procédé de phytoremédiation	Polluants traités
Phytoaccumulation	Métaux lourds et quelques composés organiques :BTEX(benzène, éthylbenzène,toluène,xylène),pentachlorophénol
Rhizofiltration	Métaux lourds et composés organiques
Phytovolatilization	Sélénium, Mercure,quelques solvants chlorés (tri et tétra-chlorométhane)
Phytostabilisation	Métaux lourds et potentialité pour des solvants chlorés (tri- et tétra-chlorométhane)
Phytodégradation	Organiques :explosifs (HMX, nitrobenzène, nitrométhane, nitrotoluène,acide picrique, RDX, TNT),pesticides (atrazine, DDT, pesticides chlorés et/ phosphorés), PCB,solvants chlorés (chloroforme, tétrachlorures de carbone,di-,tri-,tétra et hexa-chloroéthane, chlorure de vinyl,di- et tri-chloroéthanol, acide mono, di- et tri-chloroacétique, tri et tétra-chlorométhane), bromure de méthyle, tétrabromoéthane.
Rhizodégradation	Organiques : HAP,BTEX , pesticides (atrazine,alachlor), PCB, solvants chlorés (tri-et tétra-chloroéthane).

2.5. Le potentiel épuratoire des plantes aquatiques

La capacité des plantes à diminuer la turbidité, la pollution par les matières organiques et les éléments nutritifs de 50 à plus de 80 % est maintenant bien reconnue [43]. Elles ont également une forte capacité de prélèvement des métaux avec des rendements élevés qui ont été décrits dans la littérature scientifique : le plomb (76 %), le nickel (82 %), le fer (79%), le zinc (98 %), le manganèse (95 %), le chrome (97 %), le mercure et le cuivre (90 %) [44-46].

Vincent (1997) [47] constate que des étangs filtrants au Québec donnent de meilleurs résultats d'épuration que ceux obtenus dans les stations d'épuration. Cependant, si on connaît de mieux en mieux la capacité des plantes à épurer les eaux contaminées par la matière organique, les éléments nutritifs et les métaux, nos connaissances sont plus limitées sur leur capacité à éliminer les composés organiques même si elles semblent en avoir le potentiel [48,49].

Les végétaux aquatiques ont montré leur efficacité dans l'élimination de polluants organiques comme les phénols, les composés organochlorés et organophosphorés, les chlorobenzènes, et même les pesticides (voir article de synthèse : Dhir *et al.*, 2009). Concernant ces derniers, les rendements d'épuration à l'aide de plantes aquatiques sont variables, de 20 à 95 %, selon les propriétés physico-chimiques des molécules et le type de plantes [50-55]. Les plantes aquatiques paraissent donc avoir un fort potentiel dans le processus de phytoremédiation.

Cette biotechnologie de remédiation des milieux aquatiques est à évaluer sur les métaux lourds à savoir le cadmium et le plomb ainsi que leur mélange.

2.6. Le matériel végétal

Les plantes sélectionnées en vue d'une utilisation en phytoremédiation doivent, si possible, présenter un bon compromis des qualités suivantes [56] :

- être hyper tolérantes aux concentrations en polluants ;
- être hyperaccumulatrices ;
- avoir un système foliaire et racinaire développé ;

- avoir une activité photosynthétique intense;
- permettre un transport et un stockage à taux élevé ;
- permettre une extraction rapide;
- être dotée de mécanismes internes pour métaboliser des polluants ;
- être adaptable au climat local ;
- avoir une certaine résistance aux insectes et aux maladies;
- permettre une facilité de gestion.

2.7. Les lentilles d'eau

Les lentilles d'eau sont des plantes aquatiques flottantes de petite taille qui se présentent sous forme de colonies de frondes très vertes de 2 à 6 mm de diamètre. Les colonies sont formées de 2, 3 ou 4 frondes réunies par des pédicelles. Chaque fronde porte une fine racine pouvant atteindre 3 cm.

Ce végétal colonise très facilement la surface des eaux douces et calmes au niveau des étangs, des chenaux, des mares ... Il est très commun sous les latitudes tempérées. Il se multiplie très rapidement et de manière végétative, les frondes mères donnant naissance à des frondes filles qui arrivées à maturité se détachent des frondes mères pour donner de nouvelles colonies. Cet organisme est souvent utilisé pour les études écotoxicologiques et dans des tests normalisés [57,58].

La lentille d'eau est bien connue pour ses propriétés de bioconcentration de métaux [59-62]. Les plus communément utilisées en écotoxicologie et en phytoremédiation sont *Lemna minor* et *Lemna gibba*

2.7.1. *Lemna minor*

Petites frondes flottantes de 2-3 mm de diamètre, plane sur les deux faces. Les petites lames foliacées de ces plantes flottantes ne dépassent pas 6 mm de largeur. Chaque lame porte une seule racine (Figure 2.2)



Figure 2.2 : Photographie de *Lemna minor*

2.7.2. *Lemna gibba*

Lentille d'eau bossue. Cette lentille se reconnaît à sa face plus ou moins renflée. Chaque lame ne porte qu'une seule racine. Les fleurs vertes, minuscules et unisexuées, se forment sur le bord des lames foliacées. Ces espèces sont de bons indicateurs biologiques.

Lemna gibba préfère les eaux stagnantes ou faiblement courantes : fossés, mares, canaux, lacs, anses calmes de cours d'eau et de secteurs à embâcles. La lentille bossue peut développer des nappes vastes et épaisses recouvrant des surfaces de plusieurs hectares.

L'appareil reproducteur présente des fleurs rares et très petites, de couleur verte. Elles sortent de la fronde par une fente latérale. *Lemna gibba* fleurit entre mai et juillet préfère les milieux plus chauds et eutrophes. Le thalle hivernal de *Lemna gibba* est vert foncé et non renflée.



Figure 2.3 : Photographie de *Lemna gibba*

Pour optimiser le potentiel épurateur de la plante, il faut, entre autre, que celle-ci soit en bonne « santé » [63, 64].

2.8. Les aspects économiques de la phytoremédiation

Les coûts de la phytoremédiation mentionnés dans la littérature sont rares, variables et approximatifs. Il serait en moyenne de 1 euro par m³ de sol ou d'eau à dépolluer.

L'avantage majeur de la phytoremédiation en terme de coût, apparaît très nettement par rapport aux autres méthodes traditionnelles (de 100 à 10 000 fois moins chère [65]).

Le marché américain pour la phytoremédiation est passé de 50 millions de dollars en 1999 à plus de 300 millions de dollars en 2007. Cette technologie est en pleine expansion, notamment aux États-Unis où l'EPA recensait, dès 1990, 150 projets utilisant cette technique pour éliminer divers polluants comme, les solvants chlorés, les explosifs, les combustibles, les pesticides, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les composés d'hydrocarbures pétroliers, les radionucléides, et les métaux lourds [34, 35].

CHAPITRE 3

TOLERANCE AUX METAUX LOURDS CHEZ LES VEGETAUX

3.1. Introduction

Certains éléments métalliques sont essentiels aux organismes vivants à de faibles concentrations. Mais, ils agissent à de fortes concentrations comme un facteur de stress qui entraîne une modification de la réaction physiologique. Le terme « **sensibilité** » décrit les effets du stress, qui peuvent aller jusqu'à la mort de la plante. Par opposition, le terme « **résistance** » fait référence à la réaction de la plante qui lui permet de survivre face au stress métallique et d'assurer sa descendance [66].

Deux stratégies principales sont impliquées dans ce phénomène de résistance :

- **la stratégie d'évitement** par laquelle les plantes se protègent du stress métallique en limitant leur absorption ;
- **la stratégie de tolérance** (terme qui sera utilisé dans la suite de ce travail comme étant synonyme de résistance) qui fait référence aux réactions permettant de limiter les effets néfastes des métaux dans l'organisme.

Ces différents aspects sont abordés dans ce chapitre de façon à comprendre la physiologie de la plante vis-à-vis des métaux lourds. Pour terminer, nous développerons les stratégies d'utilisation des plantes dans une optique de phytoremédiation.

3.2. Les métaux lourds dans la plante

Parmi l'ensemble des métaux lourds, une vingtaine d'entre eux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (azote, soufre... ;)[14]. Nombre de ces métaux, Cu, Zn, Ni, Fe, Co, Se et Ba sont aussi impliqués au niveau de processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes ; la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires ; le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress [67].

Les métaux lourds sont concernés par les phénomènes d'absorption par les plantes car des éléments comme Zn et Cu font partie des éléments essentiels au métabolisme des plantes. Cependant, à des concentrations élevées, ces oligoéléments peuvent être toxiques.

D'autres éléments comme Pb et Cd n'ont pas de rôle biologique connu et peuvent être très toxiques même à de très faibles concentrations. C'est pourquoi, l'hyperaccumulation des métaux dans les parties aériennes sans effet toxique notable est un phénomène rare chez les plantes.

3.3. Absorption, transport et compartimentation des métaux lourds dans les cellules

3.3.1 Absorption au niveau de la membrane plasmique

La plupart des métaux lourds pénètrent dans les cellules grâce à des transporteurs situés au niveau de la membrane plasmique. Certains cations métalliques n'étant pas indispensables pour les végétaux, ils entrent en compétition avec des éléments essentiels (métalliques ou non) de structure et / ou de charge proche(s) afin d'être pris en charge par des transporteurs qui ne leur sont pas spécifiques.

La figure 3.1 résume les grandes familles de transporteurs impliqués dans l'absorption des principaux métaux essentiels au développement des végétaux.

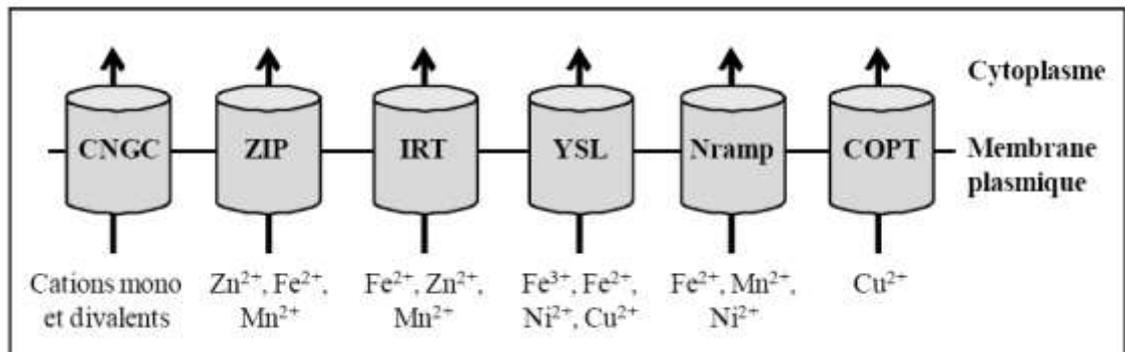


Figure 3.1 : Familles de transporteurs impliqués dans l'absorption des principaux métaux essentiels au développement des plantes. Cyclic Nucleotide-Gated Channel (CNGC), Zinc regulated transporter - Iron regulated transporter-like Protein (ZIP), Iron Regulated Transporter (IRT), Yellow Stripe Like (YSL), Natural resistance associated-macrophage protein (NRAMP), COPper Transporter (COPT).

Les métaux lourds non essentiels pour les plantes ne pénètrent pas tous dans les cellules par l'un des transporteurs précédemment décrits. En effet, quelques éléments métalliques empruntent d'autres voies pour être absorbés.

Le plomb n'étant pas un élément essentiel pour les plantes, il n'existe pas de transporteur spécifique pour son absorption. Il a été montré que le plomb se lie aux groupes carboxyliques d'acides uroniques présents dans le mucilage de la surface racinaire [68, 69] ou au niveau des parois [70-71].

Le plomb peut pénétrer à l'intérieur des cellules mais à ce jour, le processus d'absorption de ce métal n'est pas totalement établi [72]. Quelques études suggèrent que le plomb pourrait pénétrer grâce à un transporteur de type CNGC [73, 74].

Des travaux réalisés sur le tabac (*Nicotiana tabacum*) et sur une gesse (*Lathyrus sativus*) suggèrent une absorption du plomb par des transporteurs de calcium de faible affinité de type LCT pour Low affinity Cation Transporter [75, 76].

Pour pénétrer dans la cellule, le cadmium entre en compétition avec de nombreux cations divalents et notamment avec le calcium et emprunte de nombreux transporteurs appartenant aux familles mentionnées précédemment (figure 3.1) à l'exception des transporteurs de type COPT [77, 78].

Le cadmium peut également emprunter une autre famille de transporteurs appelée LCT (Low affinity Cation Transporter) qui permet plutôt l'entrée de calcium lorsque les plantes ne sont pas soumises à un milieu pollué par des métaux lourds.

Le cadmium semble emprunter davantage de transporteurs membranaires que les autres métaux lourds, probablement parce qu'il est l'un des éléments métalliques les plus mobiles dans le sol et qu'il entre ainsi davantage en compétition avec les éléments essentiels au développement des plantes comme le calcium, le cuivre, le zinc ou le fer [12].

3.3. 2. Association aux ligands et transport

Une fois absorbés, les métaux lourds ne sont pas toujours transportés sous forme libre. Ils peuvent être rapidement complexés dans le cytoplasme à différentes molécules (acides organiques, les acides aminés et divers peptides). Le fer est pris en charge par le

citrate ; le zinc peut être transporté par un complexe anionique [79] ; la majorité du cuivre et une partie du nickel sont chélatés par un acide polyaminopolycarboxylique.

Le transport peut se faire sur une courte distance à l'intérieur de la cellule et sur une distance plus longue vers d'autres cellules et tissus de l'organe d'absorption ou vers d'autres organes de la plante.

3.3.3. Compartimentation

3.3.3.1. Compartimentation intracellulaire

*Séquestration vacuolaire

Les métaux lourds restent rarement dans le cytoplasme où ils peuvent générer des effets toxiques. Certaines protéines utilisant des métaux comme co-facteurs, ont cependant besoin d'une concentration minimale de ces éléments pour leur fonctionnement et leur renouvellement. Cependant, chez les plantes non tolérantes, les métaux lourds peuvent s'accumuler dans le cytoplasme avec des conséquences létales.

Chez les plantes tolérantes ou les plantes sensibles faiblement exposées à des métaux lourds, la vacuole constitue généralement le lieu de stockage majoritaire car elle est moins sensible aux oxydations que des organites comme les chloroplastes. Les éléments métalliques y sont acheminés par différents ligands (chaperonnes, composés riches en cystéines, acides organiques...) et entrent dans la vacuole seuls ou complexés à certains ligands par des transporteurs du tonoplaste [78].

Il existe 3 familles majoritaires de transporteurs de métaux lourds vers la vacuole :

1) Les transporteurs de type CDF (Cation Diffusion Facilitators) sont, comme leur nom l'indique, impliqués dans le transport de cations dont certains cations métalliques.

2) Les transporteurs antiports cations / H^+ permettent l'entrée dans la vacuole de cations (dont des cations métalliques) parallèlement à une sortie de protons. Les métaux lourds pour lesquels cette voie d'entrée a été identifiée sont le manganèse et le cadmium qui entreraient en compétition avec le calcium.

3) Les transporteurs de type ABC (ATP-Binding Cassette) constituent une famille de protéines que l'on retrouve chez un certain nombre d'organismes vivants, allant de la bactérie à l'homme. Ces protéines ATP-dépendantes transportent des molécules variées vers l'intérieur de la vacuole comme des ions, des glucides, des lipides, des pigments, des antibiotiques et des xénobiotiques organiques [80, 81]. Cependant, certains transporteurs ABC constituent les voies d'entrée de métaux lourds et sont donc regroupés dans une sous-famille notée HMT pour Heavy Metal Tolerance ou MRP pour Multidrug Resistance associated-Proteins [82].

Ces métaux lourds n'entrent pas sous forme libre mais sous forme complexée avec du glutathion ou le plus souvent avec des phytochélatines [81]. Une fois dans la vacuole, le devenir de l'association métal-ligand n'est pas clairement établi.

Certains auteurs pensent que les métaux forment des complexes plus importants et stables grâce à la présence de sulfides vacuolaires et d'autres métaux lourds entrent sous forme libre par des transporteurs différents des transporteurs ABC tels que des antiports cations / protons [83,84].

*Autres lieux de séquestration

Les métaux lourds non essentiels sont stockés au niveau de la vacuole afin de préserver les autres compartiments de la cellule. En revanche, les métaux lourds nécessaires à l'élongation, la différenciation et / ou à la défense des cellules sont en partie stockés dans d'autres organites où ils interviennent de diverses manières.

3.4. Toxicité et tolérance

Le premier effet des métaux lourds observable chez les végétaux est une inhibition de la croissance. Celle-ci s'accompagne très souvent de nombreux autres indices de dysfonctionnement : chlorose foliaire, importantes lésions nécrotiques, jaunissement progressif, repliement ou dessèchement du feuillage...

A l'heure actuelle, les bases moléculaires de ces perturbations sont encore mal connues, mais on admet généralement qu'elles résultent d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « Réactive Oxygen Species » (ROS). Les ROS altèrent toute une série de substrats biologiques importants, avec comme conséquence la modification des domaines fonctionnels des biomolécules : inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme végétal (notamment la photosynthèse et la

respiration), oxydation de protéines, altération des membranes cellulaires via l'induction de phénomènes de peroxydation lipidique, apparition de cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire [85-87].

Pour éviter ces inconvénients, des systèmes de stockage ou de détoxification des métaux accumulés ont été sélectionnés chez certains végétaux.

D'efficacité variée selon les espèces, il semble à l'heure actuelle que trois mécanismes, encore mal compris, soient largement prépondérants : la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule, le système anti-oxydant, qui limite les dégâts des espèces réactives de l'oxygène et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique.

3.4.1. La membrane plasmique

Le transport actif à travers la membrane plasmique des cellules racinaires est un processus important, car les ions ne peuvent pas diffuser librement à travers la double couche phospholipidique [88], même passivement.

La membrane plasmique peut limiter l'accumulation des ions toxiques, soit en modifiant l'ensemble du flux ionique, soit en employant des systèmes ultra spécifiques autorisant un flux ionique qui ne transporterait pas les ions toxiques [89].

Cependant, si la membrane plasmique apparaît comme étant la première barrière face à l'entrée des éléments métalliques dans le cytosol, elle constitue également une cible importante pour la toxicité métallique. Par conséquent, l'imperméabilité n'est plus assurée et l'entrée des métaux toxiques par diffusion est facilitée [14]. Dès lors, la tolérance pourrait être due en partie à un renforcement de la protection de l'intégrité membranaire.

3.4.2 Système anti-oxydant

Le système anti-oxydant jouerait un rôle central dans la détoxification des métaux lourds ayant pénétrés dans la cellule. Il est donc important de bien comprendre d'une part les événements conduisant à un stress oxydant et d'autre part les mécanismes biochimiques impliqués dans la réponse à ce stress.

3.4.2.1 Les métaux lourds induisent l'accumulation de ROS

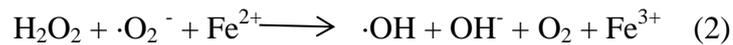
Le rôle des métaux lourds dans la formation des ROS est lié à leur capacité à exister sous différents états d'oxydation.

En effet, les cations d'éléments comme Fe, Cu, Cr ou Mn sont capables de céder un ou plusieurs électrons susceptibles de réduire l'oxygène et ses dérivés. La plus connue de ces réactions est la réaction de Fenton (1) qui se produit en présence de fer ferreux et qui conduit à la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en radical hydroxyl (·OH) et en anion hydroxyl (OH⁻) :



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

D'autres réactions de ce type faisant intervenir des métaux réduits ont également été décrites, telle que la réaction d'Haber-Weiss (2) au cours de laquelle le peroxyde d'hydrogène réagit avec un radical superoxyde, comme l'anion superoxyde ·O₂⁻, aboutissant, là encore, à la production du radical hydroxyle.



Par ailleurs, même des métaux qui n'existent que sous un seul état d'oxydation, tels que le cadmium et le nickel par exemple, peuvent induire une accumulation de ROS pour trois raisons : une perturbation de certaines voies métaboliques, une inactivation et un « down régulation » des enzymes du système anti-oxydant ou un épuisement du stock de molécules de faible masse moléculaire comme l'ascorbate, le glutathion, la vitamine E ou les caroténoïdes, qui présentent des capacités anti-oxydantes [12].

3.4.2.2. Le système anti -oxydant contrôle la production de ROS

Trois activités enzymatiques clefs occupent une place centrale dans les mécanismes de détoxication des ROS : il s'agit des superoxyde-dismutases (SOD), des catalases (CAT) et des peroxydases (POX). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade

radicalaire au niveau de l'anion superoxyde $\cdot\text{O}_2^-$ et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire.

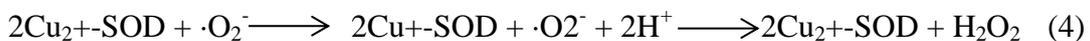
*Les **superoxyde-dismutases**, SODs, sont responsables de la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), selon la réaction (3) :



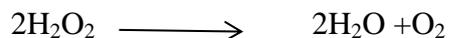
Ces enzymes existent sous différentes isoformes, dont la structure d'ensemble est très bien conservée au cours de l'évolution : le repliement tridimensionnel forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, dans lequel se glisse l'anion superoxyde.

Le mécanisme réactionnel est catalysé par un métal divalent situé au coeur de l'enzyme. Selon la nature de ce métal on distingue les superoxyde-dismutases à manganèse (Mn-SOD) localisées dans les mitochondries, les superoxyde-dismutases à cuivre-zinc (Cu/Zn-SOD), cytosoliques et enfin, les superoxyde-dismutases à fer ferreux (Fe-SOD), localisées dans le chloroplaste.

L'équation (4) décrit la chaîne catalytique typique avec le cuivre :



*Les **catalases**, CATs, sont contenues dans les peroxysomes et dans le cytosol. Elles agissent en synergie avec les SODs puisque leur rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



*Les **peroxydases**, POX, permettent, comme les catalases, la réduction de H_2O_2 en eau et en oxygène moléculaire. Cependant, à la différence des catalases, les POX nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités.

Deux types principaux de « molécules antioxydantes » sont utilisés comme substrat par les peroxydases : l'acide ascorbique (Asc) et le glutathion (GSH). Ces deux molécules participent au cycle « ascorbate/glutathion » [90, 91].

*Le **glutathion** est un tripeptide composé de glutamate, cystéine et glycine. C'est une molécule ubiquitaire synthétisée dans le cytoplasme et les chloroplastes. Sa forte concentration (jusqu'à 1 mM dans le cytoplasme et 5 mM dans les chloroplastes) fait du glutathion une source importante de soufre pour les cellules [92].

Le rôle principal du glutathion est un rôle anti-oxydant contre les agressions biotiques et abiotiques subies par les plantes. Le glutathion permet de réguler l'état d'oxydo-réduction des cellules.

Outre le rôle d'anti-oxydant, le glutathion intervient dans les mécanismes de détoxification de xénobiotiques où il sert de substrat aux glutathion-Stransférases, dans le transport et le stockage d'acides aminés, dans la régulation de la prolifération cellulaire ou encore dans la synthèse de désoxyribonucléotides [93]. Le glutathion est aussi capable de piéger des métaux lourds.

3.4.3. La chélation et la compartimentation cellulaire

3.4.3.1. La chélation

La présence intracellulaire de ligands organiques, qui assurent une complexation et donc la détoxification de nombreux ions métalliques constitue à l'heure actuelle un aspect fondamental de la résistance aux métaux lourds. Chez les végétaux, quatre groupes principaux de ligands intracellulaires ont été caractérisés :

a) Les métallothionéines

Les métallothionéines sont de petites protéines riches en cystéine et présentes chez la majorité des eucaryotes et chez plusieurs procaryotes [94]. Ces protéines sont caractérisées par leur richesse en cations métalliques (essentiellement Cu et/ou Zn) et par leur forte proportion de résidus cystéines (environ 30 %). Elles se distinguent aussi par leur faible masse moléculaire (6 à 8 kDa et 60 à 75 acides aminés) et par l'absence de résidus aromatiques.

Des études effectuées sur plusieurs espèces végétales dont le silène enflé (*Silene vulgaris*), un peuplier hybride (*Populus trichocarpa* x *deltoides*), *Thlaspi caerulescens* ou encore la massette (*Typha latifolia*), indiquent que les métallothionéines sont impliquées

essentiellement dans le transport du cuivre et du zinc et réguleraient donc la distribution de ces métaux essentiels au sein des cellules et de la plante entière [95-98].

Cependant, il a été montré que ces protéines peuvent aussi se lier aux métaux lourds non essentiels au développement des plantes.

Le rôle précis des MT dans la réponse aux métaux lourds est encore débattu, mais de nombreuses observations ont montré qu'elles pourraient être impliquées dans certains mécanismes de tolérance, notamment vis-à-vis du cadmium et du cuivre. Chez *Arabidopsis thaliana* par exemple, il a été démontré que la présence de cuivre stimule la biosynthèse de MT et que la variation écotypique de la tolérance à ce métal est corrélée au taux de transcription des gènes MT [99].

b) Les phytochélatines

Les phytochélatines (PC) sont des oligopeptides riches en cystéine. Dans la majorité des cas, les PC sont synthétisées par voie enzymatique à partir du glutathion. La synthèse de PC est catalysée par la phytochélatine synthase (PCS). La synthèse des PC est activée par la présence de métaux lourds dans la cellule et par leur liaison à la PCS [100].

La phytochélatine synthase est active lorsque deux molécules de glutathion et une molécule de métal forment un thiolate (GS-métal-GS) [93].

Les PC possèdent également un site de liaison aux métaux lourds. Elles vont se lier, par l'intermédiaire des groupes sulfhydriles des cystéines, aux ions métalliques libres et former des complexes PC-métal au sein desquels la toxicité du métal est réduite [101].

Les PC sont connus pour piéger plusieurs métaux lourds dont l'arsenic, le plomb, le mercure, l'argent mais aussi des métaux essentiels lorsqu'ils sont en forte concentration comme le zinc et le cuivre [102].

Elles représentent le deuxième groupe de chélateurs intracellulaires, uniquement rencontrés dans le règne végétal.

De nature peptidique, ces molécules sont classées dans une petite famille apparentée aux MT avec lesquelles elles partagent d'assez nettes similarités de structure et

de fonction : elles sont très riches en Cys [formule générale (Glu-Cys) $_n$ -Gly (avec $n = 2$ à 11)] et leur synthèse est stimulée par la présence de métaux lourds (Cd, Cu, Zn, etc...).

Une différence essentielle avec les autres MT réside dans l'origine biosynthétique des PC ; elles ne sont pas directement codées par le génome mais sont synthétisées par une phytochélatine synthase, à partir d'un tripeptide précurseur, le glutathion (Glu-Cys-Gly).

Bien que les PCs soient clairement impliquées dans la liaison des métaux intracellulaires, l'activité PC synthase semble constitutive chez la plupart des plantes. En effet, les écotypes tolérants ne présentent pas de concentrations accrues en PC [103].

c) Les acides organiques

Ces molécules sont des acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou des acides tricarboxyliques (comme l'acide citrique).

Ce sont des composés sécrétés par voie racinaire dans le milieu afin de solubiliser les métaux lourds. Ces mêmes acides, peuvent également s'accumuler dans les cellules et former des complexes avec certains métaux absorbés pour faciliter leur transport dans la plante. Toutes ces petites molécules sont clairement impliquées dans les phénomènes d'accumulation.

De plus, des observations récentes ont clairement montré que, au moins dans certains cas, des acides organiques pourraient être directement impliqués dans les mécanismes de tolérance. Plusieurs études ont montré que le plomb est transporté sous forme de complexe avec des acides organiques comme le citrate [104]. *Sesbania drummondii*, une Fabacée hyperaccumulatrice de plomb, transporte ce dernier depuis les racines vers les parties aériennes sous forme de complexe plomb-acétate mais aussi plomb-nitrate et plomb-sulfide [105, 106].

Ainsi, les capacités d'hyperaccumulation et de résistance de certaines variétés de blé noir (*Fagopyrum esculentum*) vis-à-vis de l'aluminium sont directement dépendantes de la synthèse d'acide oxalique [107].

De même, une synthèse accrue de malate a été observée chez une population tolérante de *Festuca rubra* se développant sur des dépôts riches en Cu et Zn, par rapport à une population sensible provenant d'une prairie [108].

Ces deux exemples suggèrent donc que la tolérance aux métaux chez quelques métallophytes hyperaccumulatrices serait acquise par une synthèse spécifique de petites molécules organiques à fortes capacités de chélation.

d) Les acides aminés

Libres, comme la proline, l'histidine et la cystéine, ils s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être eux aussi impliqués dans la chélation de divers métaux lourds, notamment du zinc et du nickel [109, 110]. C'est ainsi que l'accumulation et la tolérance au nickel dans le genre *Alyssum* semblent principalement dues à une synthèse accrue d'histidine [111].

3.4.3.2 La compartimentation

Une des hypothèses les plus fréquentes pouvant expliquer le phénomène de tolérance serait attribuée à la compartimentation accrue des métaux lourds sous forme ionique dans la vacuole, grâce à plusieurs familles de transporteurs protéiques.

Par exemple, un transporteur tonoplastique appartenant à la famille des protéines GTP a été identifié chez un écotype de *Silene vulgaris* tolérant au zinc. Le transport de zinc sous forme ionique dans les vacuoles dépend de la présence de magnésium et de GTP et permet la détoxification du zinc plus rapidement que chez l'écotype sensible [112].

Chez *Rauwolfia serpentina*, le cadmium forme, avec les phytochélatines, des complexes de faible masse moléculaire (Low Molecular Weight (LMW)), qui s'agrègent les uns aux autres par des ponts sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée (High Molecular Weight (HMW)).

Les HMW pourraient alors être transportés par un complexe protéique spécifique dans la vacuole. Le pH vacuolaire provoquerait alors la dissociation du complexe, et les ions seraient pris en charge par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate [12].

3.4.4. Autres systèmes de défense au stress métallique

D'autres mécanismes agissant contre les effets néfastes des métaux lourds peuvent être mis en œuvre chez les plantes :

➤ **Des transporteurs membranaires**, de type pompe ATPasique, spécifiques du cadmium seraient présents chez *A. thaliana* et réaliseraient un efflux actif des ions métalliques à l'extérieur des cellules [109].

➤ **L'accumulation des métaux dans les feuilles âgées**, juste avant leur abscission diminuerait ainsi les concentrations métalliques dans la plante. En général, la concentration dans les feuilles augmente avec l'âge.

Chez *Armeria maritima* subsp. *halleri*, dans les feuilles marron (les plus âgées), les concentrations en Cu, Cd, Zn et Pb sont 3 à 8 fois celles des jeunes feuilles [113].

Cette observation suggère un transport interne depuis des feuilles vertes, encore actives d'un point de vue photosynthétique, vers les feuilles qui sont sur le point de tomber, préservant ainsi la photosynthèse tout en détoxiquant la plante. Une accumulation de Cd a été également observée dans les trichomes de plusieurs espèces [29].

➤ **Les protéines de choc thermique (Hsp)**, déjà réputées pour leur implication dans le stress lié à un choc thermique, seraient également responsables de la tolérance aux métaux toxiques.

En effet, des stress très variés, ayant en commun de dénaturer les protéines (stress protéotoxique), sont capables d'induire cette réponse de type « choc thermique ». L'induction des HSP par le stress protéotoxique permet à la cellule de réparer les dommages protéiques ainsi occasionnés par re- solubilisation des agrégats, renaturation des polypeptides ou, si cela est impossible, par l'engagement des protéines dénaturées vers les voies de dégradation. Ainsi, les résultats obtenus sur des cellules de tomate ont établi que l'action d' H_2O_2 induisait la synthèse de protéines de choc thermique [114].

De la même façon, dans les cellules de *Lycopersicon peruvianum* exposées à 1 mM de cadmium, des quantités significatives d'HSP 70 ont été relevées au niveau du plasmalemme, de la membrane mitochondriale et du réticulum endoplasmique, sièges de multiples dégâts du stress oxydant provoqué par les métaux lourds [115].

➤ **La biosynthèse d'éthylène** dans les racines et les feuilles est provoquée par certains métaux, comme le cadmium. L'éthylène serait alors un messager stimulant la

lignification capable de limiter les flux de métaux dans les systèmes vasculaires et accélérant la réponse anti-oxydante par induction de l'activité ascorbate peroxydase, ainsi que la synthèse de métallothionéines.

CHAPITRE 4

EFFET INDIVIDUEL ET COMBINE DU CADMIUM ET DU PLOMB SUR LA CROISSANCE DE LA LENTILLE D'EAU ET LEUR BIOACCUMULATION

4.1. Introduction

Les métaux lourds font partie des éléments toxiques pour la santé. On les retrouve principalement dans les eaux usées industrielles et municipales (Cd, Cu, Pb, Zn), les précipitations atmosphériques, et les eaux provenant de l'activité agricole (Hg, Cu, Pb).

Des doses élevées d'engrais au phosphore ont enrichi le sol en cadmium. L'utilisation à long terme de certains composés chimiques pour la protection des plantes a mené à l'augmentation des quantités de cuivre, de mercure, de cadmium et de plomb dans les sols [116].

Des quantités importantes d'éléments chimiques s'infiltrent dans l'eau qui s'écoule des terres. Certaines plantes sont capables d'accumuler une très grande quantité de métaux lourds toxiques, à des concentrations cent fois plus élevées que chez les autres plantes. On les appelle plantes hyperaccumulatrices. Près de 400 plantes pourvues de cette faculté sont actuellement connues.

Les efforts des chercheurs se concentrent sur la recherche et l'évaluation des plantes à pousse rapide, c'est-à-dire des plantes dont la biomasse augmente rapidement, permettant une dépollution rapide, simple et peu coûteuse de l'environnement. Ce procédé est appelé phytoremédiation.

Les plantes offrent deux opportunités :

- d'une part, les plantes sont d'excellents bio-indicateurs soit pour observer la nature des polluants, soit pour analyser l'origine des polluants.
- d'autre part, les plantes peuvent avoir un rôle stabilisant, voire curatif. Sans négliger

l'atout esthétique, les plantes évitent surtout les envols de poussière et peuvent servir à végétaliser les sites pollués, sous réserve que la pollution ne soit pas excessive, et concerne certains métaux.

Les lentilles d'eau constituent un bon modèle expérimental vu leur croissance rapide et la facilité de culture et de récolte.

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Le matériel végétal

L'écotype de *lemna gibba* utilisé dans cette étude a été échantillonné à partir d'un étang au niveau du jardin d'essais d'El Hamma à Alger. Une fois au laboratoire d'Amélioration des Plantes du Département des Sciences Agronomique de l'université de Blida 1, les frondes récoltées sont stérilisées avec d'abord, de l'eau distillée stérile, puis de l'éthanol dilué à 0.5% (v/v) et en dernier lieu dans l'eau de javel à 0.5% (v/v), avant d'être ensemencées dans des bacs en PVC de 1L contenant la solution nutritive stérile suivante (mg/L)[117] : $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 118; KNO_3 , 5.055; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4.932; KH_2PO_4 , 0.68; Fe-EDTA, 0,1; H_3BO_3 , 0.286; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.155; ZnSO_4 , 0.022; 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.

La stérilisation du milieu de culture est réalisée dans un autoclave à 120° pendant 20 minutes. Les réactifs utilisés pour la préparation des milieux de culture sont tous de pureté analytique reconnue (les proportions sont indiquées dans le tableau B.1, Appendice B).

Les cultures sont conduites dans un phytotron à une température de (25 ± 2) °C où une photopériode de 16 heures d'éclairage et 8 heures d'obscurité est fixée. L'intensité de la lumière est de 3550 lux.

4.2.2. Contamination aux métaux lourds testés

Le CdCl_2 (Panréac Quimica, pureté supérieure à 98%), a été utilisé, comme source de cadmium (Cd) et le PbCl_2 comme source de plomb (Pb). Soixante(60) frondes soigneusement sélectionnées des bacs précédents, ont été ensemencées dans des flacons contenant 100 ml de la solution nutritive stérilisée dont le pH a été ajusté à 6,5 avant

stérilisation. En plus des témoins, on a utilisé des traitements correspondants aux gradients de concentration suivants : 0.01, 0.1 et 1mg/L de Cd et 0.1, 1 et 10 mg/L de Pb.

De plus, des combinaisons binaires ont également été réalisées avec 0.01, 0.1 et 1 mg/L de Cd et 0.1 et 1mg/L de Pb afin de tester l'effet combiné de Cd+Pb sur la croissance en terme de nombre de frondes et de la biomasse sèche.

Chaque traitement a été répété trois fois.

4.2.3. Paramètres de croissance

La croissance des lentilles d'eau a été suivie par le dénombrement des frondes (NF) et par le poids sec des plantes et ce, tous les deux jours. Tous les thalles visibles ont été comptés.

La croissance a été définie par le calcul du taux de croissance relatif [118] :

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

Où :

N_t : le nombre de colonie moyen à l'instant t.

N_0 : le nombre de colonie moyen à l'instant t=0.

Le pourcentage d'inhibition (% inh) du N_F par rapport au témoin est estimé par :

$$\% \text{inh} = \frac{N_F(\text{témoin}) - N_F(\text{traitement})}{N_F(\text{témoin})} \times 100 \quad (4.2)$$

Le poids sec est obtenu à la suite du séchage de la plante préalablement rincée, dans l'étuve à 80°C jusqu'à poids constant (48 h). Le taux de croissance de la plante est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{PS} = \frac{P_{S_t} - P_{S_0}}{P_{S_0}} \times 100 \quad (4.3)$$

Où :

P_{S_t} : le poids sec moyen à l'instant t.

P_{s0} : le poids sec à l'instant $t=0$

4.2.4. Dosage des métaux lourds dans la plante

Pour évaluer l'accumulation de Cd et de Pb, la plante exposée aux traitements sus-cités, a été lavée trois fois avec de l'eau distillée acidifiée avant d'être séchée dans l'étuve à 80 °C durant 48 heures et broyée en poudre fine. Cette poudre a été minéralisée avec un mélange d'acide nitrique et perchlorique (3/1, v/v) [119]

La minéralisation est considérée comme terminée quand le mélange devient clair. Les concentrations en Cd et en Pb sont déterminées par spectrophotométrie d'absorption atomique à flamme.

Le facteur de bioconcentration (FBC) est calculé à partir de la quantité du métal (Cd, Pb) dans la biomasse sèche afin de quantifier le potentiel d'élimination du métal. Ce facteur est calculé par l'équation suivante [120] :

$$FBC = \frac{C \text{ métal dans la biomasse sèche } (\mu\text{g/g})}{C \text{ métal dans le milieu de culture } (\mu\text{g/mL})} \quad (4.4)$$

4.3. Analyses statistiques

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. Des comparaisons entre les moyennes ont été effectués en fonction du temps et en fonction de la concentration 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. Des lettres différentes sur les figures indiquent des différences significatives. Les analyses statistiques ont été réalisées par SigmaPlot 11.0.

Le type d'interaction binaire est estimée par la comparaison de la toxicité observée au $i^{\text{ème}}$ niveau et à la concentration $(x+y)_i$ (où x et y représentent les concentrations du premier et du second ion métallique respectivement), avec la valeur de l'hypothèse nulle à ce niveau, définie comme étant «la somme des indices de toxicité des deux métaux testés x et y.

L'évaluation de l'hypothèse nulle est basée sur la multiplication des taux de croissance (% Croissance) de chaque métal selon la formule de Colby telle que reportée par Dirilgen [121] :

$$(\% \text{ Croissance})_{H(x+y)_i} = \frac{(\% \text{ Croissance})_{x,i} \cdot (\% \text{ Croissance})_{y,i}}{100} \quad (4.5)$$

Où : $(\% \text{ Croissance})_{x,i}$ et $(\% \text{ Croissance})_{y,i}$ représentent les taux de croissance relative de la plante obtenus en présence de Cd et de Pb aux concentrations individuelles x et y au niveau i.

L'effet interactif des métaux qu'il soit additive, synergétique ou antagoniste est évalué par un test statistique de la différence entre la réponse calculée et celle observée à 95% de confiance. Le test statistique de l'hypothèse nulle comprend les étapes suivantes :

- 1) Le calcul de la différence entre l'hypothèse nulle et la réponse observée à chaque niveau de test ;

$$(\% \text{ Croissance})_{\text{diff}} = (\% \text{ Croissance})_{\text{obs}} - (\% \text{ Croissance})_{H} \quad (4.5)$$

- 2) Estimation de t student pour chaque différence :

$$t = \frac{(\% \text{ Croissance})_{\text{diff}}}{SE_{\text{diff}}} \quad SE_{\text{diff}} = [(SE_{\text{obs}})_i^2 + (SE_{Hs})_i^2]^{1/2}$$

Avec : SE est l'erreur standard.

- 3) Comparaison de la valeur estimée de t avec celle tabulée (t_{sig})

Le type d'interaction binaire à chaque niveau du test est évalué par rapport à la significativité statistique de la valeur de **(% Croissance)_{diff}** de la manière suivante :

- i.** si la différence est positive et $t > t_{\text{sig}}$, l'interaction est antagoniste, ce qui indique que la toxicité du mélange est inférieure à la toxicité additive ;
- ii.** si la différence est négative et $t > t_{\text{sig}}$, l'interaction est synergique, ce qui indique que la toxicité du mélange est supérieure à la toxicité additive ;
- iii.** si la différence est statistiquement non significative indépendamment de son signe, l'interaction est additive.

4.4. Résultats

4.4.1. Effet individuel des métaux lourds sur la croissance (NF) de *L.gibba*

L'effet du cadmium et du plomb sur la croissance de la plante à différentes concentrations de contaminants et à différents instants est illustré par la figure 4.1 et la figure 4.2.

Dans les milieux de culture sans métaux lourds (Témoin), le nombre de fronde augmente rapidement durant la période de culture se traduisant par un taux de croissance de 131.66% à la fin de la durée de l'expérimentation. Dans les milieux de cultures contaminés par différentes concentrations de Cd et de Pb, il ressort également une augmentation significative de la croissance de la plante au bout de 6 jours ($p < 0.05$).

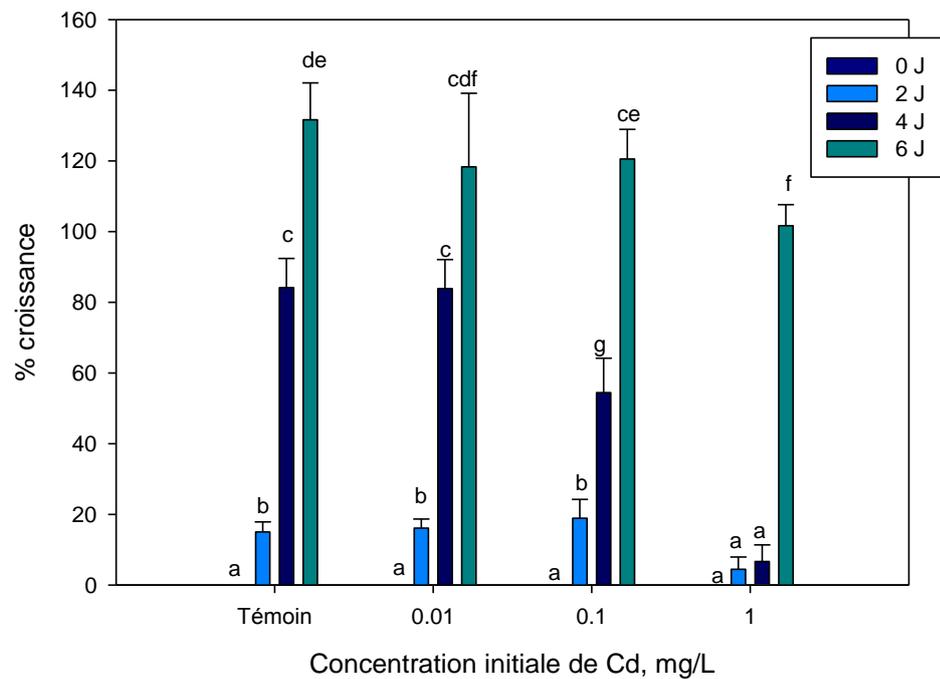


Figure 4.1 : Effet du Cadmium à différentes concentrations sur la croissance de *L.gibba* à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, $n=3$)

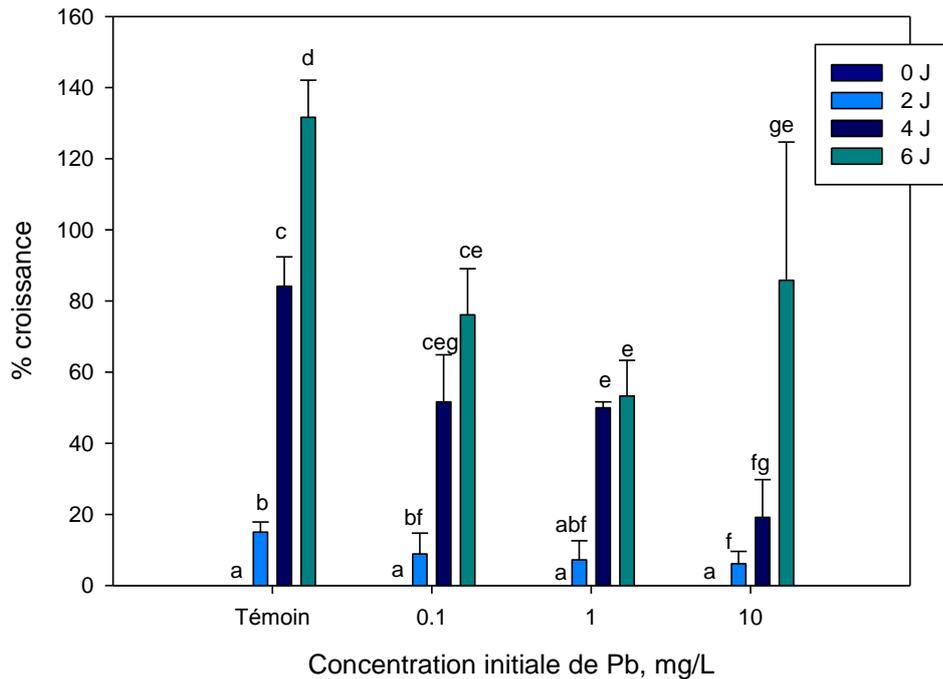


Figure 4.2 : Effet du Plomb à différentes concentrations sur la croissance de *L.gibba* à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

D'autre part, l'exposition de *L.gibba* à une concentration de 1 mg/L de Cd réduit sensiblement la croissance de la plante à 2 et 4 jours, par rapport au témoin. De même, l'augmentation de la concentration de Cd dans la solution de culture de 0.1 mg/L à 1mg/L révèle une inhibition de la croissance.

Cependant, la croissance de la plante cultivée dans le milieu contaminé par 0.01 mg/L de Cd ne semble pas être affectée par Cd. Les taux de croissance obtenus dans cette solution sont comparables à ceux calculés dans les solutions exemptes de contaminants (Témoin).

Quant aux concentrations de 0.1 et 1 mg/L de Pb, il apparaît une réduction de la croissance de la plante de 23.98% et de 33.81% au sixième jour par rapport au témoin (Tableau 4.1).

L'effet des contaminants sur la croissance de la plante apparaît fortement à 1mg /L de Cd et à 10 mg/L de Pb se traduisant par des taux d'inhibition de 41.78% et 35.29% respectivement.

Tableau 4.1 : %inhibition de la croissance de *L.gibba* en présence de Cd et de Pb

Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd			Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Pb		
	0.01	0.1	1		0.1	1	10
2	0	0	9.18	2	5.31	6.76	7.74
4	0.15	16.14	41.78	4	17.65	18.18	35.29
6	5.75	4.78	12.94	6	23.98	33.81	19.78

4.4.2. Effet combiné des métaux lourds sur la croissance (NF) de *L.gibba*

Les résultats obtenus de l'étude de l'effet de la co-contamination binaire par Cd+Pb sur l'évolution du nombre de frondes et par conséquent sur les taux de croissance de la lentille d'eau sont représentés par la figure 4.3 et la figure 4.4. Il ressort nettement, une augmentation significative du taux de croissance ($P < 0.05$) à la fin de la durée de l'expérimentation (8 jours).

Les valeurs des taux de croissance obtenues au huitième jour sont de 243.33%, 256.11%, 194.44% et 187,77% dans les solutions sans contaminants (témoin) et celles co-contaminées par différentes concentrations de Cd (0.01, 0.1 et 1 mg/L) combinées avec 0.1 mg/L de Pb.

De même, comme le montre la figure 4.4, la plante croit considérablement avec le temps pour atteindre le maximum à la fin de la durée de l'expérience (149.99%, 142.77%, 139.44% et 104.44%) dans les solutions servant de témoin et celles co-contaminées par différentes concentrations de Cd combinées à 1 mg/L de Pb.

Par ailleurs, la croissance de la lentille d'eau exposée au mélange binaire de 1 mg/L de Cd et 0.1 mg/L de Pb, est réduite de 18% par rapport au témoin (Tableau 4.2) et ce, au sixième jour. Le même résultat est obtenu au huitième jour, lors de la combinaison de Cd et Pb à une concentration de 1 mg/L chacun.

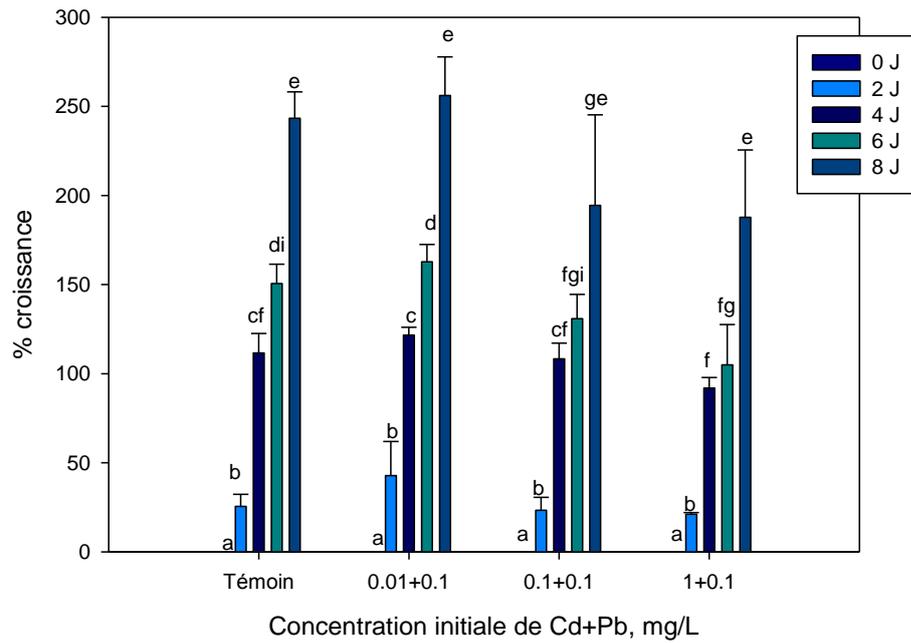


Figure 4.3 : Effet de l'association du Cadmium à différentes concentrations et du plomb (0.1 mg/L) sur la croissance de *L. gibba* à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecarts-types, n=3).

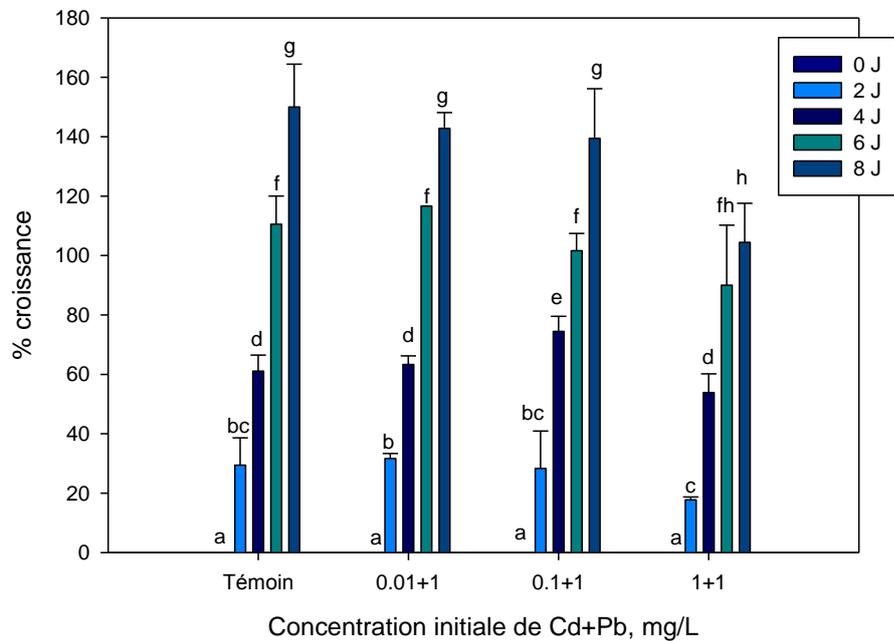


Figure 4.4. Effet de l'association du Cadmium à différentes concentrations et du plomb (1 mg/L) sur la croissance de *L. gibba* à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecarts-types, n=3).

Tableau 4.2 : %inhibition de la croissance de *L.gibba* en présence de Cd+Pb

Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb			Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb		
	0.01+0.1	0.1+0.1	1+0.1		0.01+1	0.1+1	1+1
2	0	1.76	3.54	2	0	0	9.01
4	0	1.57	9.44	4	0	0	4.47
6	0	8.20	18.18	6	0	4.21	9.76
8	0	14.24	16.18	8	0	4.22	18.22

Comme le montre les résultats regroupés dans le tableau 4.3, l'effet du mélange Cd+Pb sur la croissance de la plante est de type antagoniste. Ceci signifie que la toxicité exercée par l'association de Cd et Pb sur la croissance de la plante est moins importante que la somme des toxicités individuelles de chaque métal.

Tableau 4.3 : La toxicité observée est calculée pour le taux de croissance de la plante à différentes combinaisons de Cd et Pb.

a) 2 jours

Cd (mg/L)	Pb (mg/L)	toxicité observée ^a	toxicité calculée ^b	différence ^c (df=4)		Interaction
0.01	0.1	1.48 ± 0.84	42.77 ± 19.17	41.29	S	ANT
0.01	1	1.59 ± 0.45	23.33 ± 7.26	21.74	S	ANT
0.1	0.1	0.48 ± 0.55	21.11 ± 0.96	20.63	S	ANT
0.1	1	1.24 ± 1.06	31.64 ± 1.66	30.40	S	ANT
1	0.1	1.22 ± 0.67	28.33 ± 12.58	27.11	S	ANT
1	1	0.43 ± 0.58	17.77 ± 0.96	17.34	S	ANT

b) 4 jours

Cd (mg/L)	Pb (mg/L)	toxicité observée ^a	toxicité calculée ^b	différence ^c (df=4)		Interaction
0.01	0.1	43.86 ± 14.47	121.94 ± 4.88	78.08	S	ANT
0.01	1	27.71 ± 7.21	108.33 ± 8.82	80.62	S	ANT
0.1	0.1	4.03 ± 3.03	92.49 ± 8.25	39.26	S	ANT
0.1	1	41.86 ± 3.00	63.33 ± 2.88	21.47	S	ANT
1	0.1	27.13 ± 4.32	74.44 ± 5.09	47.31	S	ANT
1	1	3.28 ± 2.20	52.49 ± 8.25	49.22	S	ANT

c) 6 jours

Cd (mg/L)	Pb (mg/L)	toxicité observée ^a	toxicité calculée ^b	différence ^c (df=4)		Interaction
0.01	0.1	162.77 ± 9,77	88.33 ± 0,99	74.44	S	ANT
0.01	1	116.66 ± 00	64.10 ± 22.37	52.56	S	ANT
0.1	0.1	130.83 ± 13.64	91.56 ± 14.61	39.26	S	ANT
0.1	1	101.66 ± 5.77	64.07 ± 11.41	37.59	S	ANT
1	0.1	104.99 ± 22.55	77.97 ± 17.52	27.03	I	ADD
1	1	89.99 ± 20.21	53.94 ± 8.11	36.06	S	ANT

S= Statistiquement significative I= Statistiquement non significative

^a toxicité observée : (% Croissance)_{obs}^b toxicité calculée : (% Croissance)_H = (% Croissance × % Croissance) / 100^c Différence = (% Croissance)_{obs} - (% Croissance)_H4.4.3. Effet individuel des métaux lourds sur la biomasse sèche (PS) de *L.gibba*

L'évolution de la biomasse sèche de *L.gibba* à différentes concentrations testées de Cd et de Pb est représentée par la figure 4.5 et la figure 4.6.

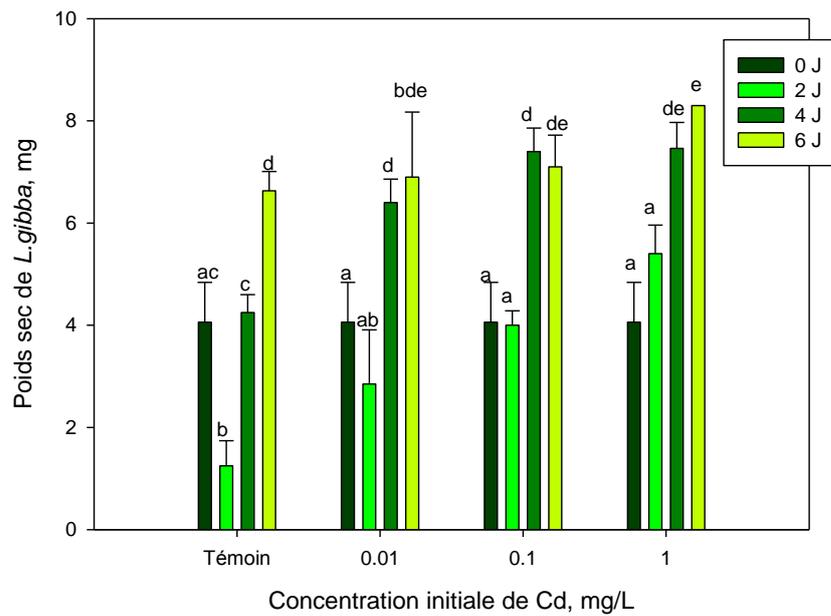


Figure 4.5. Effet du Cadmium à différentes concentrations sur la biomasse sèche (poids sec) de *L. gibba* à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

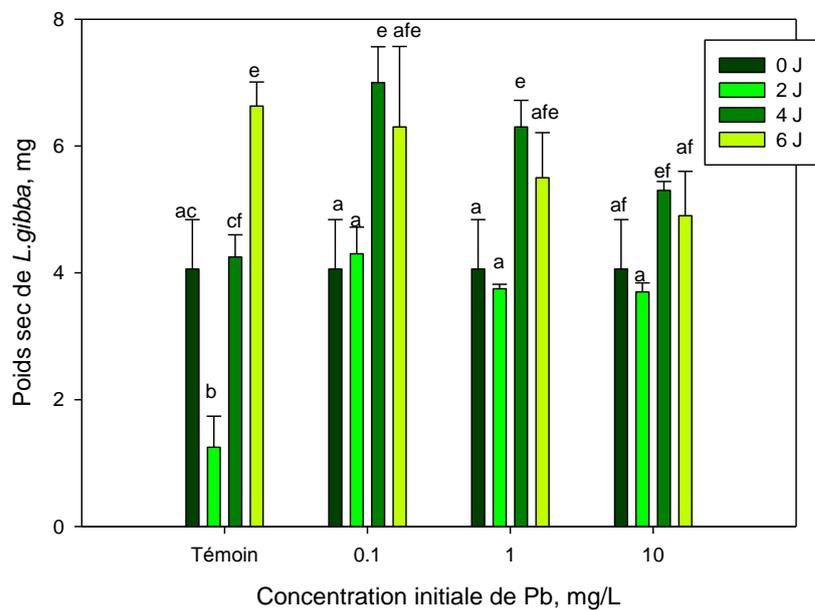


Figure 4.6 : Effet du Plomb à différentes concentrations sur biomasse sèche (poids sec) de *L. gibba* à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

La biomasse de la lentille d'eau, dans les milieux de culture sans métaux lourds, a augmenté graduellement durant la période de culture (66.23%). Pour les plantes cultivées

dans les solutions contaminées par Cd et Pb, une augmentation significative ($P < 0.05$) du poids sec est également observée à la fin de la durée de l'expérimentation se traduisant par des taux de croissance de 87.7%, 79.14% et 109.66% à 0.01, 0.1 et 1 mg/L de Cd respectivement et de 62.99%, 34.05% et 25.82% à 0.1, 1 et 10 mg/L de Pb respectivement.

L'augmentation considérable du poids sec se produit particulièrement entre le deuxième et le quatrième jour.

De plus, une augmentation de la biomasse sèche de la lentille d'eau contaminée par Cd, par rapport au témoin est observée à 0.1 et 1 mg/L de Cd à 2 jours, à 0.01, 0.1 et 1 mg/L à 4 jour et à 1mg/L à 6 jours. La même observation est faite quant au poids sec de la lentille d'eau cultivée dans le milieu contaminé par 1 mg/L de Pb à 2 et 4 jours et dans la solution contenant 10 mg/L de Pb et ce, à 2 jours.

4.4.4. Effet combiné des métaux lourds sur la biomasse sèche (PS) de *L.gibba*

Les résultats réalisés lors du suivi de l'évolution de la biomasse sèche de *L.gibba*, sous l'effet de la co-contamination binaire de Cd+ Pb, sont représentés par la figure 4.7 et la figure 4.8.

Dans les solutions nutritives servant de témoins (sans contaminants), une augmentation significative du poids sec est observée en fonction du temps. Les valeurs atteintes dans les solutions servant comme témoins sont de 30 ± 1.089 mg et 7.33 ± 1.620 mg dans les expériences où le cadmium est associé à 0.1 et 1mg/L de Pb correspondant à des taux de croissance de 572.41% et 61.49% respectivement.

L'exposition de *L.gibba* aux concentrations combinées de Cd et 0.1 mg/L de Pb a conduit à une augmentation significative du poids sec de la plante avec le temps réalisant des taux de croissances comprises entre 226.46- 415.46%. Cependant, les résultats relatifs au suivi de l'évolution du poids sec de la lentille d'eau soumise au stress combiné de Cd et de Pb à 1mg/L montrent que le poids sec à la fin de l'expérience augmente peu et une réduction importante de 54.36% de la biomasse sèche est observée dans le milieu co-contaminée par 1mg/L Cd+1mgPb/L.

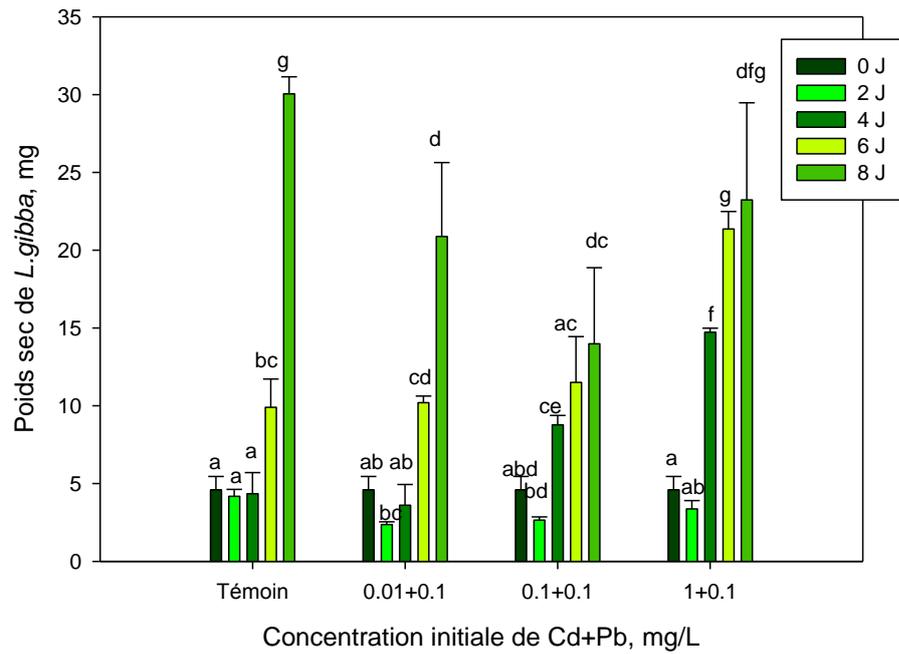


Figure 4.7 : Effet de l'association du Cadmium à différentes concentrations et du plomb (0.1mg/L) sur la biomasse sèche (poids sec) de *L.gibba* à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)

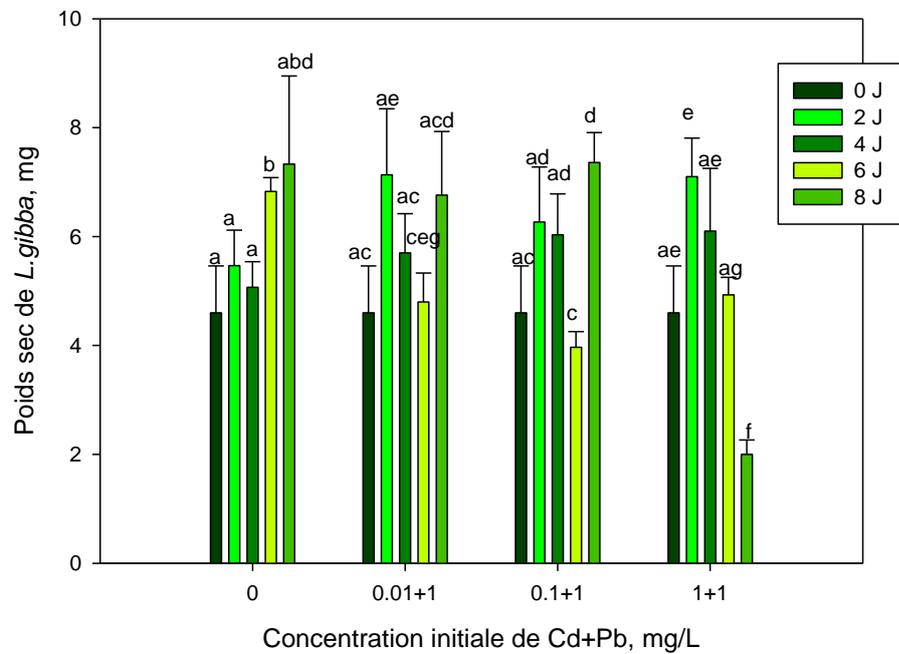


Figure 4.8 : Effet de l'association du Cadmium à différentes concentrations et du plomb (1 mg/L) sur la biomasse sèche (poids sec) de *L.gibba* à différents instants (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)

4.4.5. Accumulation individuelle des métaux lourds par *L.gibba*

Les quantités de cadmium et du Plomb accumulées par *L.gibba* sont illustrées par la figure 4.9 et la figure 4.10.

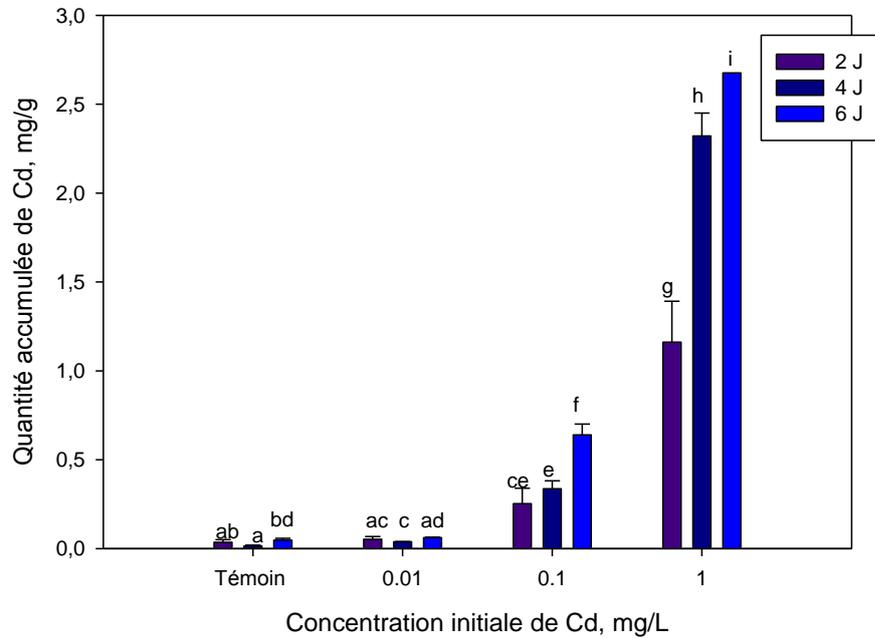


Figure 4.9 : Evolution des quantités de Cd accumulées (en mg/g) par *L.gibba* en fonction du temps et de la concentration initiale de Cd (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)

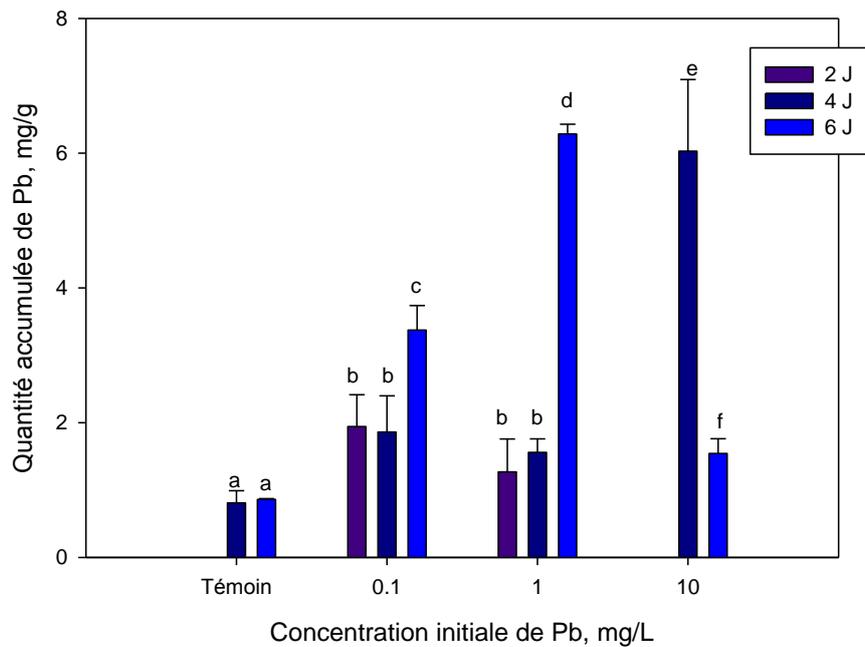


Figure 4.10 : Evolution des quantités de Pb accumulées (en mg/g) par *L.gibba* en fonction du temps et de la concentration initiale de Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

Il apparaît que les frondes cultivées dans les solutions sans contaminants (témoins) étaient contaminées au préalable par le cadmium et le plomb. En présence de 0.01 mg/L de Cd, les quantités accumulées sont $0,0526 \pm 0,0156$ mg/g, $0,0385 \pm 0,0011$ et $0,0610 \pm 0,0367$ mg/g à 2, 4 et 6 jours respectivement.

A 0.1 et 1 mg Cd/L, les quantités de Cd absorbées par les frondes augmentent avec le temps. On note également une augmentation des quantités de Cd avec l'augmentation de la concentration initiale de ce contaminant dans le milieu nutritif.

A 2 jours, la quantité accumulée à 0.1 mg/L de Cd est 4,8 fois plus grande que celle accumulée à 0.01 mg/L et la quantité trouvée dans la plante à 1 mg/L est 4,5 fois plus grande que la quantité de Cd à 0.1 mg/L.

A 4 jours, la quantité de Cd accumulée à 0.1 mg/L de Cd est 8,7 fois plus grande que celle obtenue à 0.01 mg/L alors qu'à 1 mg/L, elle est de 7 fois supérieure à celle trouvée à 0.1 mg/L.

A 6 jours, les quantités de Cd accumulées à 1 mg/L sont 4 fois plus grandes que celles obtenues à 0.1 mg/L.

Les frondes de *lemna gibba* cultivées dans les solutions témoins exempt de contaminants, contenaient du Pb. Les quantités les plus importantes du Pb dans les frondes sont $3,075 \pm 0,364$ and $6,284 \pm 0,145$ mg/g de accumulées à 0.1 mg/L et à 1 mg/L à la fin de la durée de l'expérimentation. A 10 mg Pb/L, la plus grande quantité de Pb est de $6,030 \pm 1,062$ mg/g obtenue au 4^{ème} jour de traitement. Par ailleurs, l'accumulation baisse considérablement à 6 j.

Les valeurs du facteur de bioconcentrations de Cd et de Pb obtenues lors de l'accumulation individuelle de chaque élément par la plante aquatique *L.gibba* sont regroupées dans le tableau 4.4 et le tableau 4.5. Ces valeurs varient entre 1167 et 6396 en présence de Cd. L'accumulation de Pb a conduit à des valeurs maximales de 33750, 6284 et 603 obtenues à 0.1, 1 et 10 mg/L respectivement.

A la fin de la durée de l'expérimentation, il est à constater qu'à 0.1 mg/L de Pb, la valeur de FBC estimée à 33750 est 5 fois plus grande que celle obtenue à la même concentration de Cd et 12 fois supérieure à la valeur de FBC calculée à la plus grande concentration de Cd testée.

Ainsi, un tel résultat confirme que l'accumulation de Pb aux concentrations de 0.1 et 1 mg/L est plus importante que celle de Cd. Par ailleurs, à 10 mg/L de Pb, les valeurs du facteur de bioconcentration sont les plus faibles.

Tableau 4.4 : Facteur de bioconcentration (FBC) de Cd (valeurs moyennes \pm Ecarts- types, n=3)

Temps (Jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd		
	0.01	0.1	1
2	5260 \pm 1556	2355 \pm 1115	1167 \pm 222
4	3857 \pm 93	3368 \pm 447	2321 \pm 129
6	6100 \pm 361	6396 \pm 603	2677 \pm 0.71

Tableau 4.5 : Facteur de bioconcentration (FBC) de Pb (valeurs moyennes \pm Ecarts- types, n=3)

Temps (Jours)	Concentration initiale (mg/L) Pb		
	0.1	1	10
2	19440 \pm 4709	1270 \pm 488	n.d
4	18610 \pm 5385	1559 \pm 202	603 \pm 105
6	33750 \pm 3645	6284 \pm 146	154 \pm 22

n .d : non déterminé

4.4.6. Accumulation simultanée des métaux lourds par *L.gibba*

Les résultats des quantités de Cd et de Pb accumulées par la lentille d'eau traitée par un mélange binaire de Cd et de 0.1 mg/L de Pb sont reportés sur la figure 4.11 et la figure 4.12.

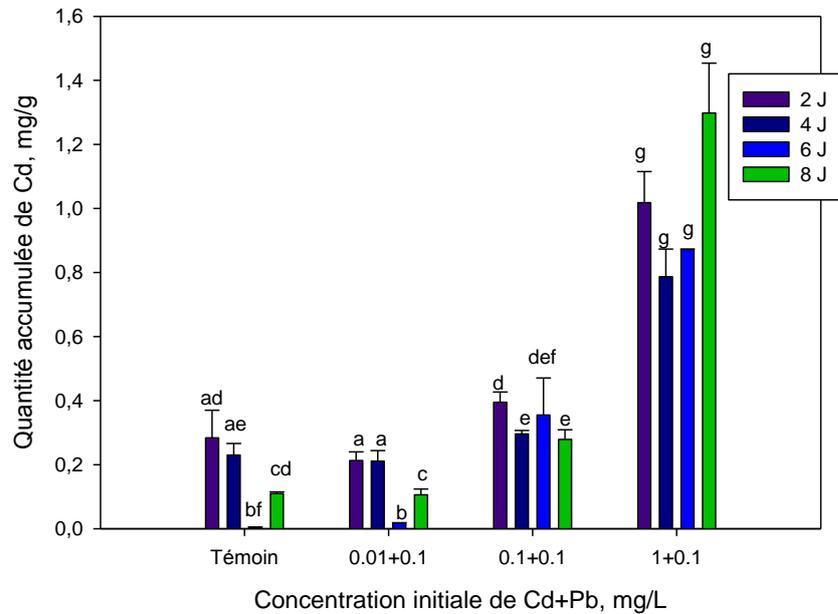


Figure 4. 11 : Evolution des quantités de Cd accumulées (en mg/g) par *L.gibba* en fonction du temps et de la concentration initiale de Cd en présence de 0.1 mg/L de Pb.

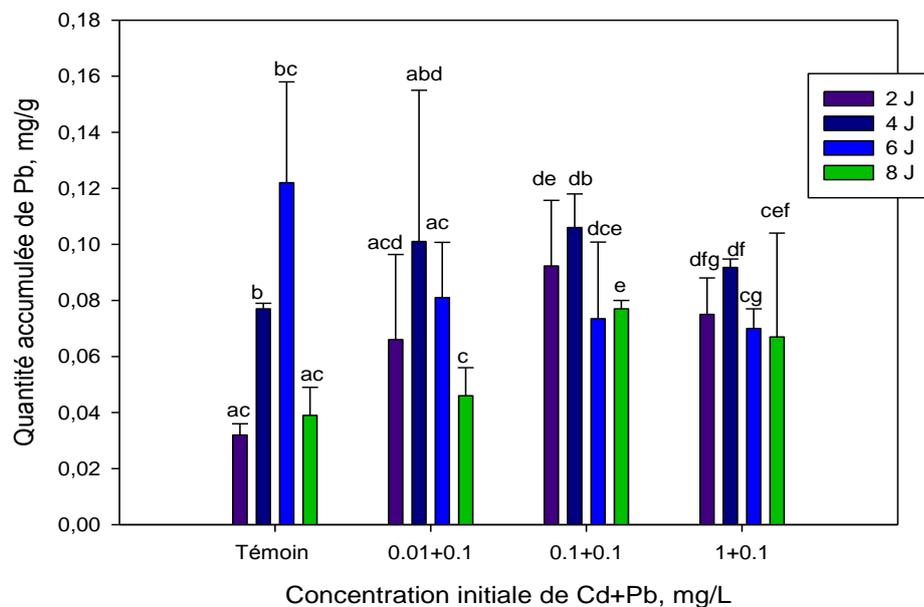


Figure 4.12 : Evolution des quantités de Pb accumulées (en mg/g) par *L.gibba* en fonction du temps et de la concentration initiale de Cd en présence de 0.1 mg/L de Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

Les plantes traitées avec un mélange binaire de Cd+Pb, accumulent des quantités de Pb moins importantes que celles accumulées dans les plantes contaminées par le Pb uniquement. Ceci suggère qu'il existe une compétition entre le Cd et le Pb. Ainsi, le Cd exerce un effet antagoniste sur le Pb en diminuant son accumulation dans la plante.

Les valeurs calculées du facteur de bioconcentration de Cd et de Pb lors de l'accumulation de ces deux éléments par *L.gibba* co-contaminée par Cd et 0.1 mg/L de Pb sont reportées dans les tableaux 4.6 et 4.7.

Pour l'ensemble des résultats, il ressort, des valeurs de FBC supérieures à 1000 quand il s'agit de l'accumulation de Cd et des valeurs inférieures à 1000 lors de l'accumulation de Pb. Ceci indique que l'accumulation de Cd par la lentille d'eau est favorisée plus que l'accumulation de Pb.

Tableau 4.6 : Facteur de bioconcentration (FBC) de Cd en présence du mélange Cd+ 0.1Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)

Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb		
	0.01+0.1	0.1+0.1	1+0.1
2	21333 \pm 2721	3953 \pm 323	1018 \pm 97
4	21100 \pm 3315	2960 \pm 113	787 \pm 86
6	1800 \pm 700	3550 \pm 1160	874 \pm 1
8	10573 \pm 1772	2790 \pm 306	1264 \pm 205

Tableau 4.7 : Facteur de bioconcentration (FBC) de Pb en présence du mélange Cd+0.1Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb		
	0.01+0.1	0.1+0.1	1+0.1
2	665 \pm 304	899 \pm 194	750 \pm 127
4	986 \pm 152	1055 \pm 120	980 \pm 28
6	810 \pm 198	735 \pm 276	700 \pm 71
8	467 \pm 103	773 \pm 25	665 \pm 375

A partir de la figure 4.13 représentant la quantité de Cd accumulée par *L.gibba* cultivée dans le milieu de culture co-contaminé par le mélange binaire de Cd et 1mg/L de Pb, que l'accumulation de Cd se produit uniquement lorsque la concentration initiale de Cd est de 1mg/L, alors que Pb est accumulé par la plante à toutes les concentrations testées (figure 4.14).

Les résultats regroupés dans le tableau 4. 8 et le tableau 4.9 représentent les valeurs du facteur de bioconcentration de Cd et de Pb respectivement, suite à l'accumulation de ces deux éléments par la plante cultivée dans les mélange binaires de Cd et 1 mg/L de Pb.

Les valeurs obtenues montrent clairement que l'accumulation du cadmium qui ne se produit que dans les mélange binaire de Cd +Pb de concentration de 1 mg/L de chaque métal, est faible comparée au mélanges précédent.

La valeur de FBC fait apparaître que *L.gibba* est un faible accumulateur de Cd dans ce mélange

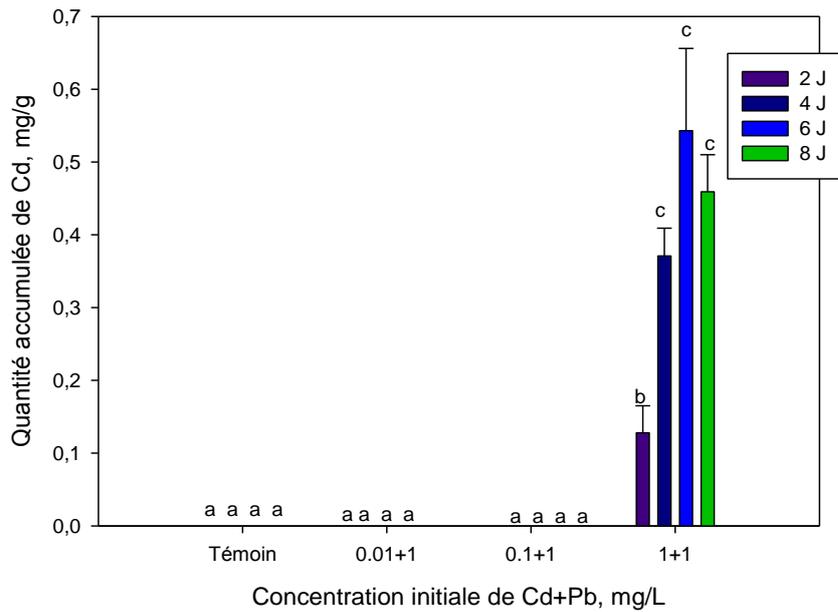


Figure.4.13 : Evolution des quantités de Cd accumulées (en mg/g) par *L.gibba* en fonction du temps et de la concentration initiale de Cd en présence de 1 mg/L de Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

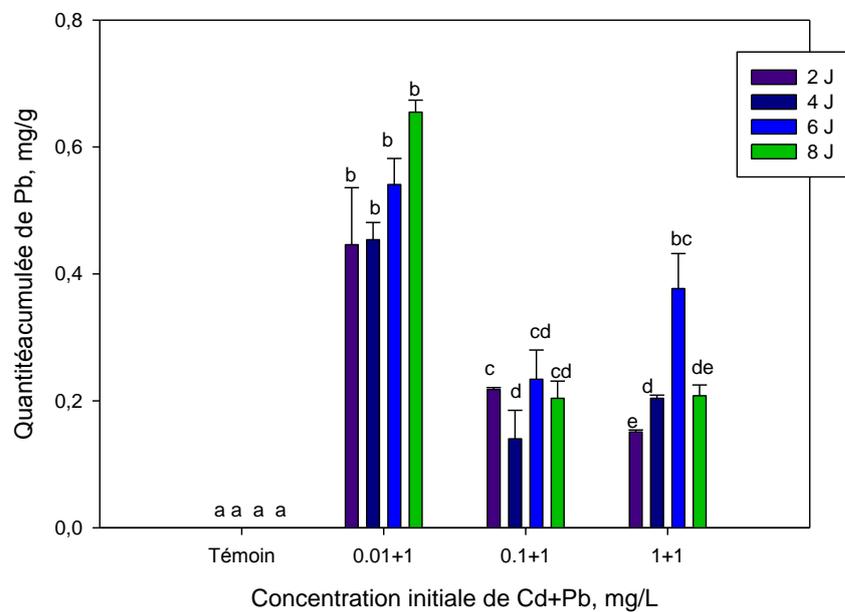


Figure.4.14: Evolution des quantités de Pb accumulées (en mg/g) par *L.gibba* en fonction du temps et de la concentration initiale de Cd en présence de 1 mg/L de Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

Tableau 4.8 : Facteur de bioconcentration (FBC) de Cd en présence du mélange Cd+ 1 Pb (valeurs moyennes \pm Ecart- types, n=3)

Temps (Jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb		
	0.01+1	0.1+ 1	1+ 1
2	0 \pm 0	0 \pm 0	128 \pm 37
4	0 \pm 0	0 \pm 0	371 \pm 38
6	0 \pm 0	0 \pm 0	543 \pm 114
8	0 \pm 0	0 \pm 0	459 \pm 51

Tableau 4.9 : Facteur de bioconcentration (FBC) de Pb en présence du mélange Cd+1 Pb (valeurs moyennes \pm Ecart- types, n=3)

Temps (Jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb		
	0.01+ 1	0.1+1	1+1
2	447 \pm 93	218 \pm 3	151 \pm 31
4	454 \pm 27	140 \pm 45	204 \pm 5
6	543 \pm 41	235 \pm 46	377 \pm 55
8	656 \pm 19	204 \pm 27	208 \pm 17

4.5. Discussion

L'évolution de la croissance de la biomasse de la plante aquatique *L.gibba* a été suivie. Le dénombrement des frondes et le poids sec sont des paramètres de croissance classiques à déterminer lors de l'utilisation de *Lemna gibba* dans les bio-essais [122].

Dans la présente étude, la croissance relative de la plante augmente avec le temps. Cependant, elle est ralentie en présence des deux contaminants à savoir le cadmium et le plomb, au fur et à mesure que leur concentration dans le milieu nutritif augmente. Ceci concorde parfaitement avec les résultats obtenus dans d'autres travaux ayant testé des plantes telles que *Chlorella vulgaris*, *Nasturtium officinale*, *Mentha aquatica*, and *Wolffia arrhiza* [122-126]

A la lumière des résultats obtenus, il apparaît que la lentille d'eau acquiert une grande tolérance vis-à-vis du cadmium, du plomb et de leur association. En effet, pour l'ensemble des essais réalisés, la plante a maintenu sa bonne santé et n'a présenté aucun signe d'altération extérieure tel que la chlorose ou la nécrose. Verma et Suthar [127] ont également observé que les frondes de *Lemna gibba* immergées dans des cultures contaminées par Cd ou Pb aux concentrations de 2.0, 5.0 et 10 mg/L sont vertes et vigoureuses, sans signe de senescence. L'effet des contaminants s'est traduit par une diminution de la croissance à certaines concentrations de Cd et de Pb. Il a également été observé que la nécrose de la plante survient au bout du septième jour [127]. Garnczarska et Ratajczak [128] ont reporté une dégradation de la pigmentation et l'inhibition de la photosynthèse dans *Lemna trisulca* inoculée dans le milieu de culture de concentration en Cd > 1.12 mg/L.

Dans une autre étude, les résultats montrent que le traitement de *L.gibba* par des concentrations modérées de Cd (0.05- 5 mg/L) allègent le stress oxydative dans les plantes [129]. La croissance relative des plantes *Ceratophyllum demersum*, *Hygrophila difformis*, *Cabomba caroliniana* et *Ludwigia hyssopifolia* exposées à une concentration de 10mg/L de Pb pour une durée de 15 jours a diminué de 20% [130] et celle des plantes *Eichhornia crassipes*, *Veronica anagallis* and *Ranunculus aquatilis* cultivées dans des solutions contaminées par 4-7.5 mg/L de Cd pendant 12-14 jours est réduite de 20-24% [131, 132].

Par ailleurs, la croissance relative de *C.demersum* exposé à 5 mgPb/L pendant 7 jours, n'a pas été affectée [133]. John et al., [134] ont conclu à partir des résultats obtenus de leur étude, que l'exposition de *Lemna polyrrhiza* à faibles concentrations de Cd et de

Pb conduit à une augmentation de la croissance, de la quantité de pigment, de proline, de protéine et de sucre alors que ces paramètres diminuent à concentrations élevées de ces contaminants. D'après Hou et al. [135], *L. minor* peut tolérer des concentrations de $Cd^{2+} < 0.5$ mg/L. De plus, des tests menés sur trois macrophytes *P.Stratiotes* L., *S.polyrrhiza* W et *E. Crassipes* ont montré une grande tolérance au Cd et une grande capacité d'élimination de ce métal lorsque la concentration est de 1.0, 2.0 et 5.0 mg/L [136].

En présence de 0.1 et 0.2 mg/L de Pb, la croissance de *Lemna minor* est promu à 103% mais elle est réduite de 37-38% à 10 mg/L de Pb et la décoloration des frondes est observée à une concentration supérieure et égale à 8 mg Pb/L [121].

Dans notre étude, il a été trouvé que la toxicité combinée des métaux testés vis-à-vis de *Lemna gibba* est moins prononcée que celle due à l'effet individuel de Cd ou de Pb. Ceci est conforté par les résultats de Mohan et Hosetti [137] où il a été observé que la plante aquatique *L.minor* traitée par 0,25mM Pb +0,5µM Cd commence à régénérer après 8 jours. Cette observation particulière montre que la plante a développé une résistance métallique.

La croissance relative de *Typha latifolia* exposée au mélange binaire de Cd et de Pb diminue de manière significative de 16% en présence de 5mg/L de Cd+5mg/L de Pb et de 25% dans les cultures contaminées par 7.5 mg/L de Cd+7.5 mg/L de Pb alors que l'effet individuel des deux contaminants sur la croissance relative de la plante n'est pas significatif [138]. Cependant, d'autres résultats montrent que la co-contamination des plantes *Lemna minor* et *C. demersum* par Cd et Pb affecte plus leur croissance que lors de la contamination individuelle [139].

Le mécanisme de tolérance et la réponse des plantes à la toxicité du métal est complexe et ne peut être expliqué sans investigation [137].

Les plantes dont la croissance à lieu dans des sites contaminés, ont besoin de développer un certain degré de résistance afin de pouvoir survivre. Les mécanismes de tolérance proposés sont [140] : (a) Séquestration du métal par des composés organiques spécialement produit ; (b) Compartimentation dans certains compartiments de la cellule ; (c) efflux de l'ion métallique ; (d) exsudation du ligand organique.

Le cadmium possède plusieurs sites d'action à l'intérieur de la plante. Il est probable que la tolérance soit associée à un mécanisme de giving out de ce métal du tissu de la plante ou bien de sa séquestration en une forme moins toxique [137].

Les plantes ont aussi développés des mécanismes de tolérance en réponse à la toxicité du Plomb. Les racines des plantes répondent rapidement soit par [141]: i) Synthèse de callose, créant ainsi une barrière empêchant la pénétration de Pb (ii) Rétention d'une grande quantité de Pb et sa séquestration dans la vacuole, accompagnée par des changements dans la croissance des racines et le mode de ramification (iii) Translocation dans les parties supérieures de la plante dans le cas des plantes hyperaccumulatrices.

Le poids sec de la plante ou biomasse sèche peut également être utilisé afin d'évaluer la tolérance des plantes vis-à-vis des éléments toxiques [142].

À 4 jours, la plante contaminée par les concentrations testées de Cd présente un poids sec supérieur à celui de la plante servant de témoin ainsi qu'à 2 jours en présence de 1 mg/L. De même, l'effet de Pb (0.1, 1.0 et 1mg/L) a conduit à un gain de la biomasse sèche à 2 jours ainsi qu'aux concentrations de 0.1 et 1.0 mg/L à 4 jours. Les résultats concordent avec des travaux précédents qui confirment que le stress induit dans par les métaux l'environnement ambiant a pour conséquence un gain en biomasse des lentilles d'eau [121,128, 143].

Dans les conditions de stress en présence d'une charge (concentration) métallique élevée dans les plantes, ceci conduit à l'activation de synthèse métabolique. Il en résulte un gain de biomasse, à travers la synthèse rapide de nouvelles protéines et carbohydrates dans les tissus de la plante. Dans les conditions de stress chimique, une augmentation de la biomasse de la plante se produit principalement à cause du chargement (loading) des chloroplastes avec des granules d'amidon (starch granules) [144]. Des études ont également montré la synthèse de liaisons métal-peptides dans les macrophytes aquatiques (*Eicchornia*, *Pistia* and *hydrilla*) exposées aux métaux lourds. [145,146]

Les résultats de Verma et Suthar [127] révèlent un gain de la biomasse sèche de *L.gibba* en présence de Cd et de Pb. Le plus grand gain en biomasse de *L.gibba* est observé en présence de 10 mg Cd/L. Les doses élevées de Cd dans les plantes aquatiques cause la synthèse de quelques métabolites (Starch, protéines, polypeptides ... etc) ce qui contribue à l'excès de biomasse [127].

Le rapport du poids frais /poids sec de *L. minor* augmente lorsque la concentration initial du métal (Pb, Hg) augmente [121]. En présence de Hg ce rapport est encore plus important. Par ailleurs, le traitement de *L. minor* et *L. gibba* avec le mercure, le cadmium et le chrome appliquées aux concentrations de 0.02-20 mg/L pour une durée de 24 heures n'ont pas d'effet significatif sur leur poids frais [147].

Les aspects biochimiques impliqués dans les changements de la biomasse ont besoin de plus d'investigation afin de trouver l'effet de doses élevées de Cd et de Pb sur les niveaux cellulaires et moléculaires de la plante [127].

Il est bien connu que les plantes aquatiques, vivantes ou mortes, accumulent les métaux, absorbés à partir de l'environnement [148]. Récemment, Newete and Byrne (2016) [149] ont montré que la lentille d'eau (*Lemna ssp.*) est la plante la plus utilisée en phytoremediation comparée aux autres macrophytes aquatiques.

L'accumulation de Cd et de Pb par *Lemna gibba* dépend du temps et de la dose du contaminant. Ceci est également observé dans d'autres travaux sur les plantes aquatiques telles que *Chlorella vulgaris*, *Nasturtium officinale*, *Mentha aquatica*, *Bacopa monnieri* and *Wolffia arrhiza* [123-126, 138].

Les résultats montrent que l'accumulation de Cd et de Pb par *L. gibba* augmente de manière significative lorsque leur concentration dans le milieu de culture augmente (à l'exception du résultat obtenu en présence de 10mg/L et ce, à 6 jours). Ceci concorde avec les résultats issus d'autres études [138, 150]. De même, Dirilgen [121] a également trouvé que les quantités accumulées de Pb et de Hg par *L. minor* augmente avec le temps et avec l'augmentation de la concentration initiale des métaux testés.

De plus, il est clair que la quantité accumulée de Pb est supérieure à celle de Cd. L'affinité des plantes pour le plomb est reportée par d'autres chercheurs [121, 127].

A 10mg/L de Pb, l'accumulation de la plante dans la lentille d'eau est de $6,030 \pm 1,062$ mg/g après 4 jours d'exposition, puis une diminution est observée à 6 jours ($1,543 \pm 0,219$ mg/g). Selon Drost et al. [151], deux processus peuvent être responsables de cette diminution (a) Excrétion active ou passive du métal de la plante (b) "Dilution" de la concentration interne du métal provoquée par l'augmentation de la croissance de la biomasse totale.

A partir des résultats, il ressort aussi que la quantité accumulée de chaque métal dans la plante diminue lorsqu'il s'agit du mélange binaire comparée à la quantité retenue lors du traitement individuel de la plante par Cd et Pb. Alonso-castro et Carranza-Álvarez [138] ont constaté que comparé au traitement individuel, la concentration de Cd et de Pb dans *T.Latifolia* diminue lors de son traitement binaire par ces contaminants. D'après eux, la raison probable d'un tel résultat est la réduction de la croissance relative de la plante exposée à Cd et à Pb. Dans le cas de la présente étude, cette hypothèse n'est pas vérifiée vu que la croissance de la plante exposée au mélange binaire est supérieure par rapport au traitement individuel.

Il ressort également que la quantité de Pb accumulée par la lentille d'eau co-contaminée par Cd et 0.1 mg/L de Pb a nettement diminué par rapport à la quantité dans le traitement individuel. John et al. [134] ont montré que l'accumulation de Cd est supérieure à celle de Pb dans la plante *Cucumis sativus*, ce qui confirme que la rétention de Pb est moins importante en présence de Cd. Saygideğer et Doğan [139], ont reporté un effet antagoniste entre Cd et Pb lorsqu'ils sont présents en solution ; Cd diminue l'accumulation de Pb par la plante *C.demersum* comparé à la présence individuelle de Pb. Georgieva et al. [152] ont montré que Pb est un antagoniste puissant sur l'accumulation de Cd par les plante *Pisum sativum*. Il semble que Cd rivalise le Pb pour le même transporteur [138]. Cd présente plus d'affinité que le Pb pour le site d'union dans les racines. Ceci conduit à la diminution de la quantité de Pb absorbée et accumulée par la plante. Cependant, Mendoza-Cózalt et al. [153], ont montré que Pb diminue la quantité de Cd dans le protiste *Eulgena gracilis* exposé à un mélange binaire de ces deux métaux. Dans la présente étude, un résultat identique est obtenu dans le traitement binaire de *L.gibba* avec Cd et 1mg/L de Pb. L'effet d'interaction de Cd et de Pb sur leur accumulation par la plante aquatique n'est pas élucidé.

Les mécanismes impliqués dans l'accumulation des métaux lourds par les macrophytes aquatiques sont partiellement élucidés et peuvent différer selon l'espèce [138]. Dans une même espèce, l'accumulation des métaux lourds dépend de leur comportement chimique et de la concentration des métaux [138].

Dans l'étude menée par Suñe et al. [154], sur l'accumulation de Cd et de Cr sur *Pistia stratiotes* et *Salvinia hergozii*, ils ont observé une phase rapide et une phase lente. Ils ont expliqué le mécanisme rapide par l'adsorption, la chélation et l'échange d'ions. La

phase lente semble être différente parmi les espèces et a été expliquée par des processus biologiques (translocation des métaux vers les parties aériennes) ou chimiques (précipitation du métal sur la racine de la plante). Certaines plantes ont développés des mécanismes d'accumulation des métaux lourds tels que la formation de complexes de coordination (coordination complex) entre les métaux lourds et les acides organiques (citrate, oxalate, malate) protéine (metallothionines) petits peptides (glutathions, phytochelatins) et acides aminés (cystéine). Puis, ces complexes sont transportés vers les vacuoles et les parois cellulaires [155].

Il est évident que les résultats de la toxicité et de l'accumulation s'accordent entre eux. A 0.01 mg/L de Cd, *L.gibba* a accumulé dans ses tissus des quantités proches de celles trouvées dans la plante servant de témoin ($p > 0.05$). Il en résulte des taux de croissance comparables.

Cependant, Une concentration de 1 mg/L de Cd a inhibé la croissance de la plante par rapport au témoin et aux autres concentrations testées, particulièrement à 2 et 4 jours, à cause de l'augmentation significative ($p < 0.05$) de la quantité accumulée. Par analogie, Les taux de croissance de la plante traitée par 0.1mg/L de Pb ne sont pas différents des valeurs obtenues à 1 mg/L du fait que les quantités de Pb accumulée dans les tissus de la plante sont proches. De même, le taux de croissance de la lentille d'eau cultivée dans le milieu de culture contaminée par 10 mg/L de Pb dépasse ceux obtenus en présence des autres concentrations testés (0.1 et 1 mg/L) à 6 jours, à cause de la quantité de Pb détectée dans la plante et qui a diminué de manière significative.

Le facteur de bioconcentration (FBC) est un paramètre indispensable pour l'évaluation de la capacité de la plante à accumuler les métaux lourds en fonction de la concentration initiale des métaux lourds.

La concentration ambiante du milieu aquatique est l'un des facteurs critiques qui influence l'efficacité d'absorption des contaminants par les plantes aquatiques [156, 157]. Un bon 'accumulateur', doit avoir la capacité de concentrer les éléments dans ses tissus, avec des valeurs de FBC > 1000 [158]. Dans les conditions de cette étude Les valeurs de FBC montre que *L. gibba* cultivées dans le milieu de culture contaminé séparément par Cd et Pb ainsi que dans le mélange qui associe les différentes concentrations de Cd et 0.1 mg/L de Pb accumulent bien les contaminants. Par ailleurs, cette plante est considérée

comme étant un accumulateur faible de Cd et modéré à faible de Pb dans le milieu de culture co-contaminé par Cd et 1mg/L.

Pour l'ensemble des résultats de l'étude de Verma et suthar [127], les valeurs de FBC sont inférieures à 1000, lors de l'accumulation de Cd et de Pb (2, 5 et 10mg/L) par *L. gibba*. Dans *Lemna minor*, des valeurs de 3560 et de 1800 ont été calculés pour la plante vierge et pré-exposée, respectivement lors de la contamination de la plante par 5 mg/L de Pb [120]. Zhu et al. [159] ont également reporté que les valeurs de FBC de la jacinthe d'eau sont élevées lors de l'accumulation de Cd, Cu, Cr et Se à faibles concentrations externes et diminuent lorsque les concentrations externes augmentent. Des études ont montré une accumulation importante de Cd par la lentille d'eau *L. gibba* (5953) [160] et par *L.trisulca* (3594) [161]. Des valeurs de FBC comprises entre 2125 et 29000 lors de l'accumulation de Cd par six espèces de plantes des zones humides ont été trouvées par Rai et al. [162].

4.6. Conclusion

La contamination des eaux par des métaux lourds indésirables et toxiques est un problème environnemental crucial. Néanmoins, il peut être résolu par la phytoremédiation.

Dans la présente étude, il a été démontré que *Lemna gibba*, cette plante aquatique abondante dans le nord Algérien, est efficace dans l'accumulation de Cd et Pb en présentant une tolérance vis-à-vis de ces éléments soit individuellement ou en mélange. L'utilisation de La lentille d'eau *L. gibba* est très intéressante pour la décontamination des milieux aquatique.

CHAPITRE 5

EFFET DES METAUX LOURDS SUR L'ABSORPTION DES PHOSPHATES ET DES NITRATES PAR LA LENTILLE D'EAU «*L.gibba*»

5.1. Introduction

Le problème de la pollution aquatique par les métaux lourds devient de plus en plus alarmant vu l'industrialisation grandissante de jour en jour. L'eutrophisation est également un problème environnemental mondial qui a pour cause l'excès de nutriments, dans les milieux aquatiques, particulièrement le phosphore et l'azote.

Il est bien connu que le phosphore est l'un des éléments le plus répandu sur terre et est indispensable à tous les organismes vivants [163].

Le phosphore existe sous forme de phosphate. L'orthophosphate est la forme la plus prédominante qui peut être assimilée par les algues et les macrophytes.

Dans les plantes, le phosphore joue un rôle important dans la photosynthèse, le transfert et le stockage de l'énergie, la fabrication des acides nucléiques, les protéines et les carbohydrates [163, 164]. Cependant, un excès de phosphore dans le milieu aquatique provoque une prolifération rapide des algues et cause ainsi le phénomène d'eutrophisation.

L'azote, comme le phosphore est l'un des éléments essentiels pour toute forme de vie [165]. Dans l'environnement aquatique, les formes chimiques les plus utilisées sont l'ammonium (NH_4^+), les nitrites (NO_2^-) et les nitrates (NO_3^-) [166]. Des concentrations excessives des nitrates dans les eaux souterraines ou dans les eaux de surfaces peuvent être à l'origine de problèmes de santé et environnementaux [167].

En raison des nuisances causées par les phosphates et les nitrates, plusieurs méthodes conventionnelles (l'oxydation chimique, la précipitation, l'échange d'ions ...) ont été développées afin d'éliminer le phosphore et l'azote [163, 167]. Ces techniques ont prouvés leur efficacité dans l'élimination de ces éléments, mais se sont avérées coûteuses.

La phytoremédiation utilisant les plantes aquatiques, est une alternative qui en plus de son efficacité dans l'élimination du phosphore et de l'azote, est très intéressante du point de vue économique.

Dans cette partie de l'étude, l'effet du cadmium et du plomb ainsi que leurs associations binaires à différentes concentrations sur l'assimilation des nitrates et des phosphates présents dans le milieu de culture de la lentille d'eau, *L.gibba* a été examiné. De plus, l'évolution de la concentration de Cd et de Pb dans les milieux de culture contaminés individuellement ou avec les mélanges binaires de ces deux contaminants ainsi que l'évolution du pH ont été suivies.

5.2. Matériels et Méthodes

5.2.1 Matériel végétal

La lentille *L. gibba* a été prélevée des cultures mères (décrites au chapitre 4) 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 [117].

5.2.2. Conditions de culture

Trente colonies soit 60 frondes sont cultivées dans des Erlenmeyers en verre de 250 ml de capacité contenant 100 ml de milieu de culture stérile ($\text{pH} = 6,5 \pm 0,1$), sont répartis en plusieurs lots et placés dans une chambre thermostatée avec une photopériode de 16 heures de lumière (3550 Lux) et 8 heures d'obscurité.

5.2.3. 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 de cultures de la lentille d'eau contaminés soit par le cadmium ou le plomb individuellement ou par différentes combinaisons de ces deux contaminants.

Des témoins avec plante ont servi au suivi de l'évolution de la teneur en azote et phosphore dans les échantillons sans contaminants.

5.2.4. Dosage des phosphates et des nitrates

Les concentrations du phosphore et de l'azote dans les différents échantillons du milieu de culture sont déterminées par les méthodes standards (APHA, 2001) [168]. Le taux d'élimination du phosphore et de l'azote par la plante est calculé selon la formule suivante :

$$\% = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (5.1)$$

où

C_0 représente la concentration initiale en $[\text{PO}_4^{3-}]$ ou $[\text{NO}_3^-]$ dans le milieu de culture à l'instant $t=0$.

C_t représente la concentration en $[\text{PO}_4^{3-}]$ ou $[\text{NO}_3^-]$ dans le milieu de culture à l'instant t .

5.3. 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. Des comparaisons entre les moyennes ont été effectuées en fonction du temps et en fonction de la concentration, 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. Des lettres différentes sur les figures indiquent des différences significatives. Les analyses statistiques ont été réalisées par SigmaPlot 11.0.

5.4. Résultats

5.4.1. Effet des métaux lourds sur l'absorption des phosphates et des nitrates

5.4.1.1. Effet individuel de Cd ou de Pb :

a) Capacité d'absorption des phosphates

Les résultats relatifs à l'évolution de la concentration du phosphore, dans le milieu de culture, à différentes concentrations de Cd et de Pb et en fonction de temps en présence de *L. gibba* sont représentés par la figure 5.1.

La concentration des orthophosphates dans tous les traitements avec Cd et Pb diminue considérablement au cours des deux premiers jours. La même évolution est observée dans le témoin.

Pour l'ensemble des résultats, les taux d'élimination (%) (Tableau 5.1) varient entre 68,86 – 97,53%. La réduction des phosphates a atteint des valeurs maximales au quatrième jour. Ainsi, des taux d'élimination de 90,32% et de 97,35% sont obtenus à 1 mg/L de Cd et de Pb respectivement. A 0,1 mg/L les réductions en phosphore sont de 86,15% en présence de Cd et de 88,44% en présence de Pb.

De plus, à 4 jours, dans le milieu de culture contaminé par 1 et 10 mg/L de Pb, la réduction du phosphore a atteint des pourcentages pas moins de 70% par rapport au témoin. Par ailleurs, les concentrations du phosphore dans les solutions contaminées par le cadmium ne sont pas différentes de celles obtenues dans le milieu de culture exempt de Cd (témoins).

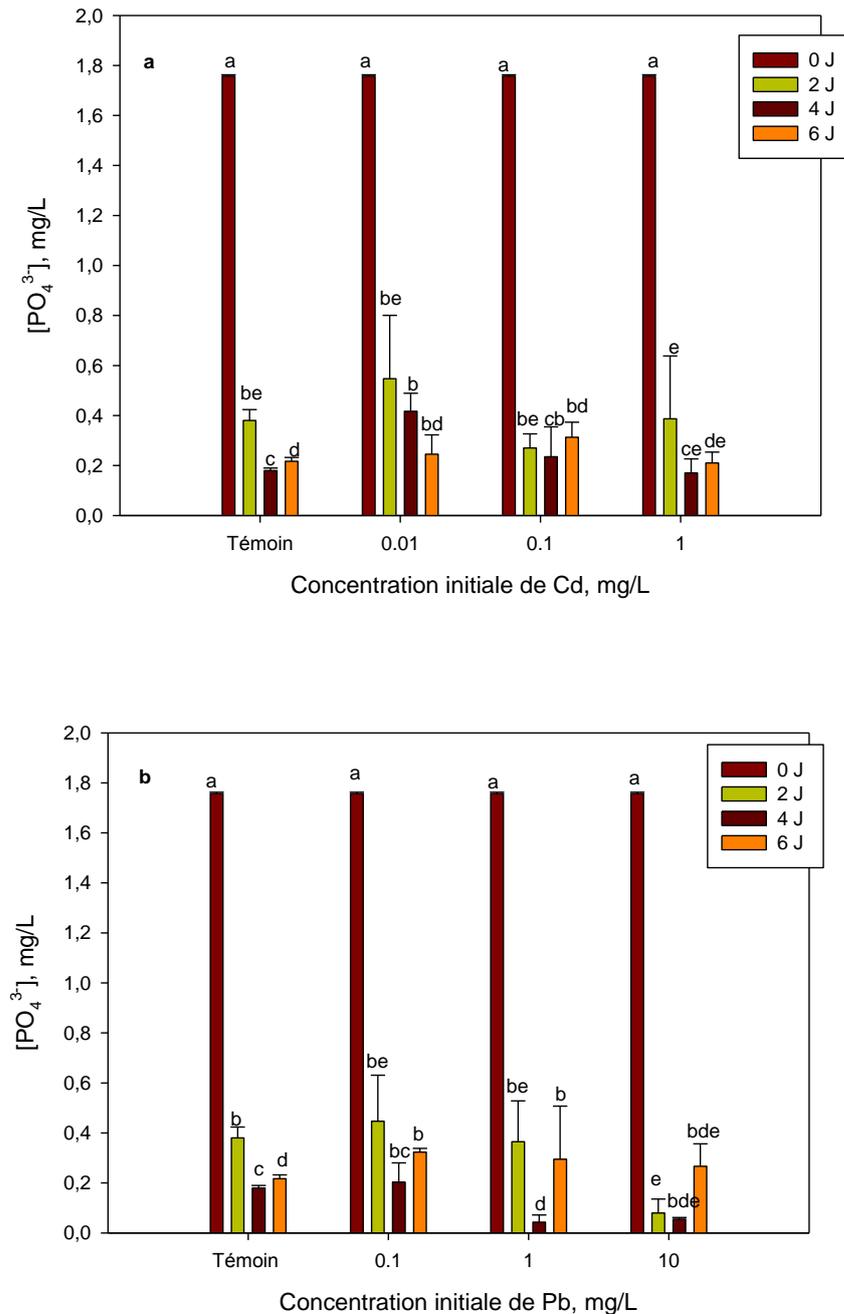


Figure 5.1. Evolution de la teneur en phosphates dans le milieu de culture en présence du (a) cadmium et (b) plomb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, $n=3$)

Tableau 5. 1 : Effet de Cd et de Pb sur l'abattement (%) des phosphates.

Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd				Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Pb			
	0	0.01	0.1	1		0	0.1	1	10
2	78.37	68.87	84.83	77.95	2	78.37	75.50	79.22	95.44
4	89.75	76.26	86.51	90.32	4	89.75	88.44	97.53	96.86
6	87.64	86.06	82.18	88.04	6	87.64	81.61	83.21	84.80

b) Capacité d'absorption des nitrates

L'évolution de la concentration des nitrates dans le milieu de culture à différentes concentrations de Cd et de Pb et en fonction du temps est illustrée par la figure 5.2.

La concentration des nitrates dans tous les traitements et dans les solutions sans contaminants (Témoin) diminue considérablement pendant les deux premiers jours, puis une variation non significative est observée jusqu'à la fin de la durée de l'expérimentation dans les solutions servant de témoin et celles contaminées par 1 mg/L de Pb. Par ailleurs, la concentration des nitrates augmente de manière significative entre le deuxième et le quatrième jour et ce dans le milieu de culture contaminé par 1 mg/L de Cd et 0.1 mg/L de Pb, pour diminuer à nouveau entre le quatrième et le sixième jour. Toutefois, les valeurs de concentrations atteintes lors de cette augmentation restent inférieures aux concentrations initiales.

Pour l'ensemble des résultats, les taux de réduction des nitrates (Tableau 5.2) varient entre 47.22% et 80.91%.

La réduction des nitrates a atteint des valeurs maximales à la fin de la durée de l'expérience. La plus importante élimination des nitrates de 79.31% et 71.18% sont obtenus à 0.01 mg/L de Cd et à 0.1 mg/L de Pb.

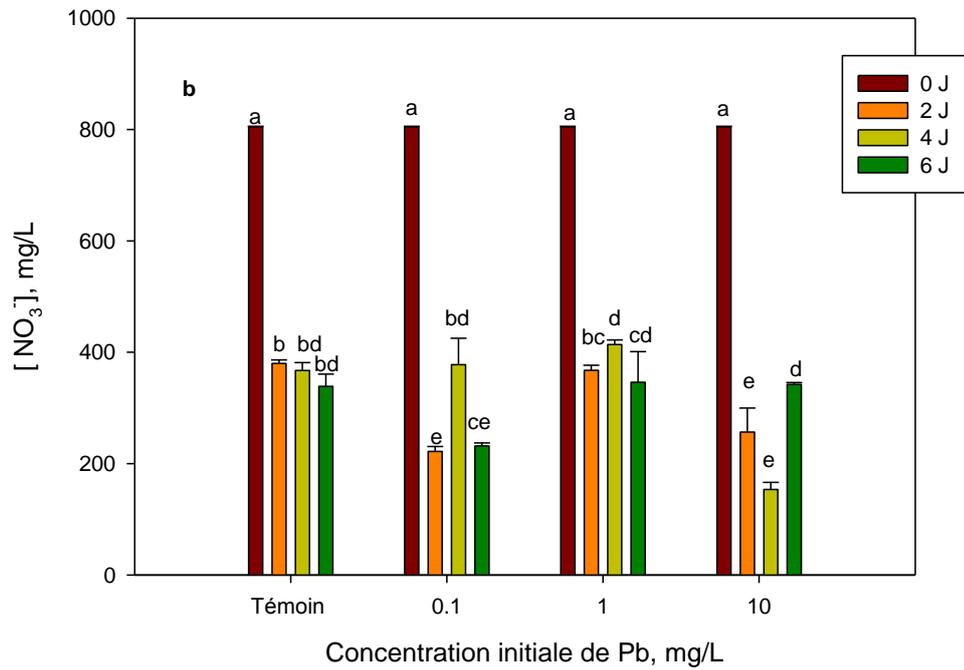
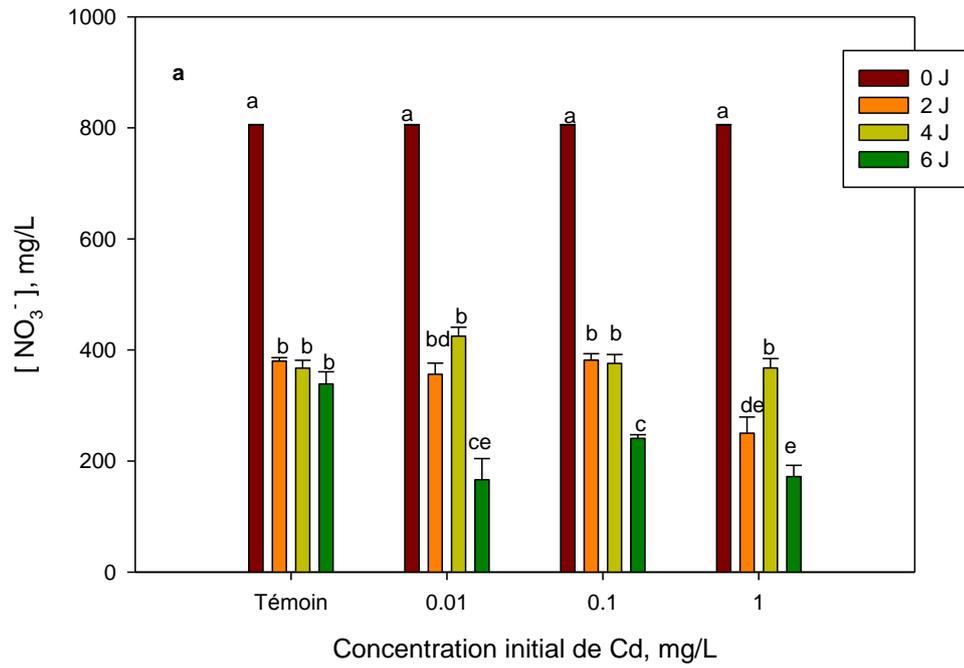


Figure 5.2 : Evolution de la teneur en nitrates dans le milieu de culture en présence de (a) Cd et (b) Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, $n=3$)

Par comparaison avec le témoin, la concentration des nitrates diminue de 50.86% 28.92% et de 49.22% à 0.01, 0.1mg/L et 1 mg/L de Cd respectivement, à la fin de l'expérience (6jours). De même, dans les milieux de culture contaminés par 0.1, 1 et 10 mg/L de Pb, on observe également une réduction maximale des nitrates de 41.58%, 58.16% et 31.55% à 2, 4 et 6 jours respectivement, par rapport au témoin.

Tableau 5.2 : Effet de Cd et de Pb sur l'abattement (%) des nitrates.

Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd				Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Pb			
	0	0.01	0.1	1		0	0.1	1	10
2	52.78	55.7	52.58	68.93	2	52.78	72.41	54.32	68.11
4	54.36	47.22	53.31	54.32	4	54.36	53.11	48.59	80.91
6	57.90	79.31	70.08	78.63	6	57.90	71.18	57.01	57.47

5.4.1.2. Effect combiné de Cd+Pb

a) *Capacité d'absorption des phosphates*

L'évolution de la concentration des phosphates dans le milieu de culture à différentes concentrations de Cd combiné avec 0.1 mg/L de Pb et en fonction du temps est illustrée par la Figure 5.3.

La concentration des orthophosphates décroît considérablement au cours des quatre premiers jours dans les solutions servant de témoins et dans tous les traitements.

Les plus importants taux de réduction obtenus sont de 80%, 89.39%, 87.50% et 88.88% dans la solution témoin et celles co-contaminées par des associations binaires de Pb (0.1 mg/L) combiné à Cd à 0.01, 0.1et 1mg/L respectivement (Tableau 5. 3).

Cependant, dans le mélange contenant la plus grande concentration de Cd (1 mg/L) combiné à 0.1mg/L de Pb, la concentration des phosphates a diminué par rapport au témoin de 70% et de 40 % au deuxième et au huitième jour respectivement.

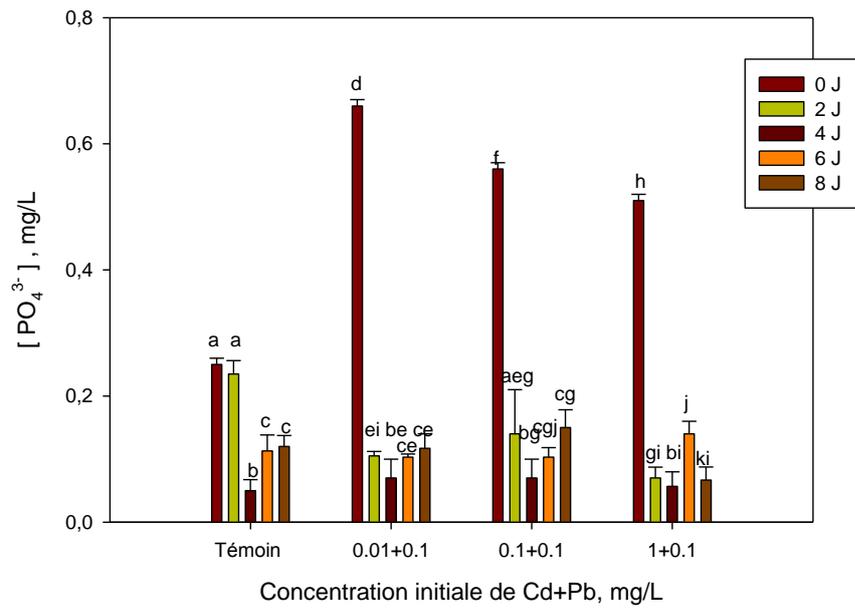


Figure 5.3 : Evolution de la teneur en phosphate dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+ 0.1Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

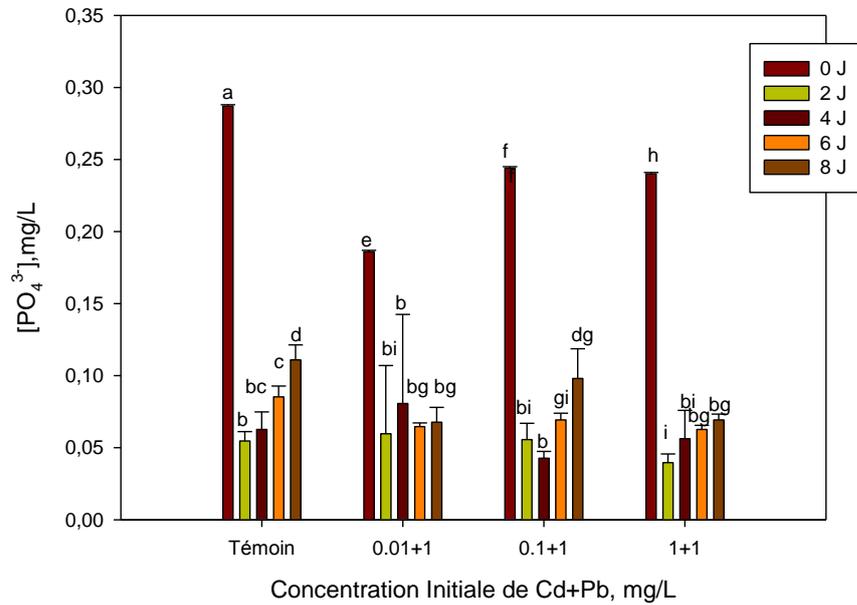


Figure 5.4 : Evolution de la teneur en phosphate dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+ 1Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)

Lors de l'association binaire de la plus faible concentration de Cd (0.01 mg/L) et 0.1 mg/L Pb, la concentration des phosphates est réduite de 55% par rapport au témoin à 2 jours.

Quant aux autres traitements, il n'y a pas de différence significative entre les concentrations des phosphates dans la solution contaminée et la solution témoin.

La concentration des phosphates diminue significativement au bout de 2 jours, lors du traitement binaire du milieu de culture avec Cd (0.01, 0.1 et 1mg/L) et Pb à 1 mg/L (Figure 5.4). Le plus grand taux d'élimination atteint (83.46%) est obtenu dans le milieu traité avec la combinaison de 1mg/L de chaque métal.

Par comparaison avec le témoin, la concentration des phosphates est réduite de 39% et 37% lorsque la concentration de Cd dans le mélange est de 0.01 et 1 mg/L respectivement.

Tableau 5.3 : Effet de Cd+Pb sur l'abattement (%) des phosphates.

Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb				Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb			
	0	0.01+0.1	0.1+0.1	1+0.1		0	0.01+1	0.1+1	1+1
2	6.00	84.09	75.00	86.27	2	80.94	67.90	77.17	83.46
4	80.00	89.39	87.50	88.88	4	78.15	56.21	82.50	76.51
6	54.80	84.39	81.61	72.54	6	70.27	65.21	71.59	73.87
8	52.00	82.27	73.21	86.92	8	61.32	63.60	59.83	71.23

b) Capacité d'absorption des nitrates

Comme le montre la figure 5.5, la concentration des nitrates décroît significativement (38.85%) dans le mélange qui associe 1 mg/L Cd et 0.1 mg Pb/L à la fin de la durée de l'expérimentation. De plus, par comparaison avec le témoin, une réduction de 30% des nitrates est observée. Par ailleurs, il n'y a pas de réduction significative de la concentration des NO_3^- avec le temps dans les solutions sans contaminants et les autres traitements.

La figure 5.6 illustre l'évolution de la concentration des nitrates en fonction du temps dans les milieux de culture co-conatminés par différentes concentration de Cd (0.01, 0.1 et 1mg/L) et 1mgPb/L. Globalement, la concentration des nitrates varie très peu conduisant ainsi à de très faibles taux de réduction.

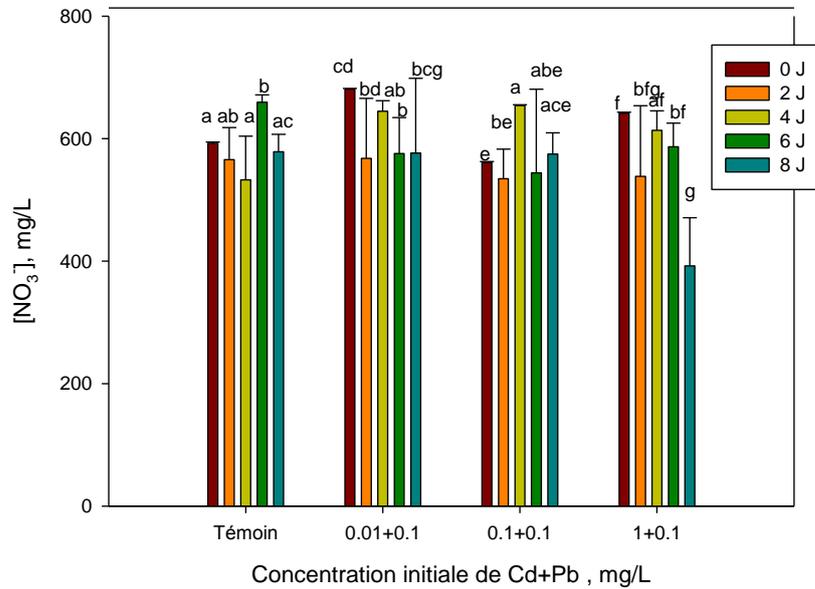


Figure 5.5. Evolution de la teneur en nitrates dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+ 0.1Pb (valeurs moyennes \pm Ecarts- types, n=3)

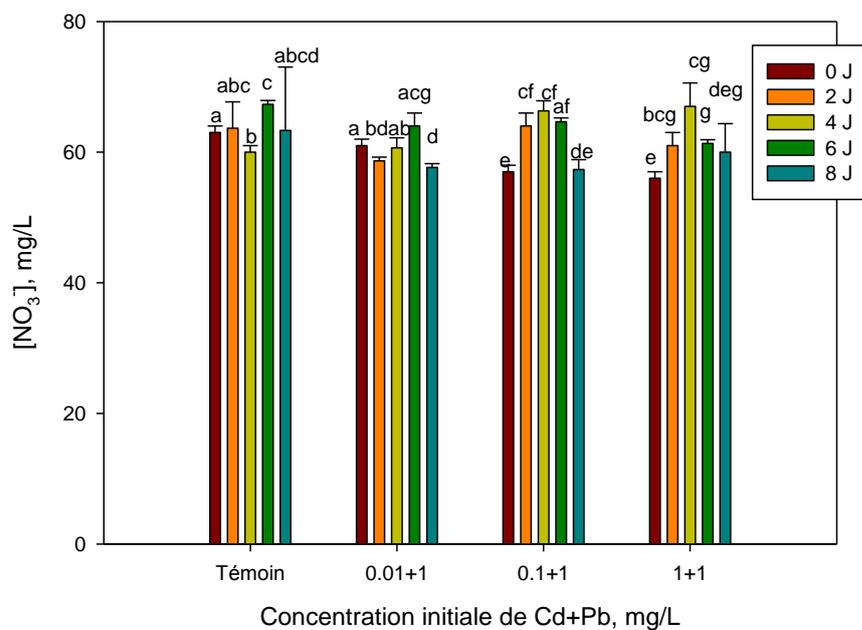


Figure 5.6 Evolution de la teneur en nitrates dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+ Pb (valeurs moyennes \pm Ecarts- types, n=3)

Tableau 5.4 : Effet de Cd+Pb sur l'abattement (%) des nitrates.

Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb				Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb			
	0	0.01+0.1	0.1+0.1	1+0.1		0	0.01+1	0.1+1	1+1
2	4.50	16.64	4.75	16.08	2	0	3.82	0	0
4	10.07	5.33	0	4.37	4	4.75	0.54	0	0
6	0	15.46	3.08	8.57	6	0	0	0	0
8	2.30	15.37	0	38.85	8	0	5.46	0	0

5.4.2. Elimination des métaux lourds du milieu de culture

5.4.2.1. Elimination de Cd ou de Pb à partir du milieu de culture contaminé individuellement

La concentration résiduelle de Cd dans le milieu de culture à différents instants et à différentes concentrations introduites initialement dans le milieu de culture n'a pas pu être déterminée. Cependant, l'évolution de la concentration de Pb dans la solution contaminée par 1 et 10 mg/L de ce contaminant est représentée par la figure 5. 7.

Il ressort, une diminution significative de la concentration de Pb dans le milieu de culture de *L.gibba* pendant les deux premiers jours.

Les taux de réduction de ce métal varient entre 51.9 % et 57% en présence de 1 mg/L et de 78.75% et 86.58% à 10 mg/L (tableau 5.5).

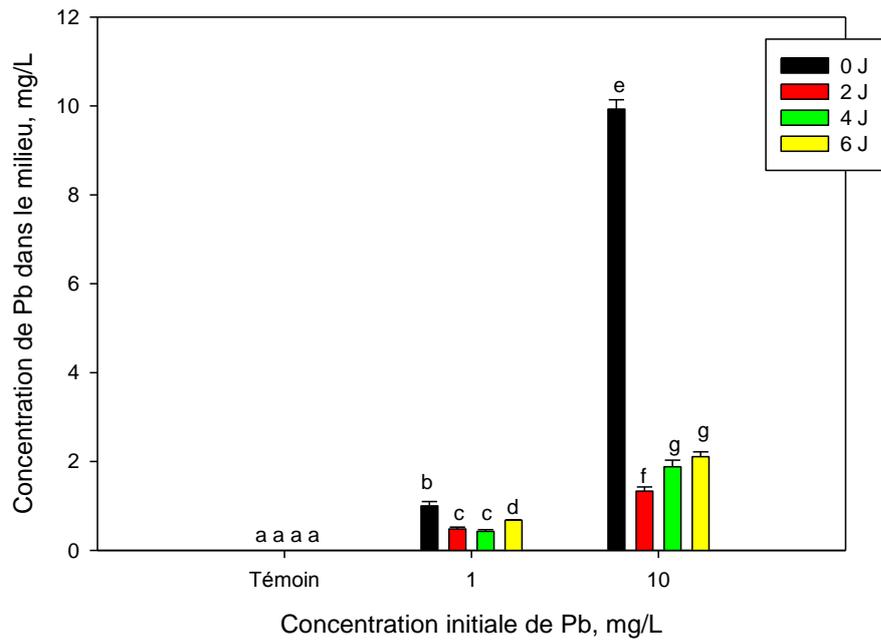


Figure 5.7 : Evolution de la concentration de Pb du milieu de culture (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)

Tableau 5.5 : Pourcentage d'élimination (%) de Cd et de Pb à partir du milieu de culture.

Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd				Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Pb			
	0	0.01	0.1	1		0	0.1	1	10
2	0	n.d	n.d	n.d	2	0	n.d	51.9	86.58
4	0	n.d	n.d	n.d	4	0	n.d	57	81.05
6	0	n.d	n.d	n.d	6	0	n.d	52.10	78.75

5.4.2.2. Elimination de Cd et de Pb à partir du milieu de culture co-contaminé

La variation de la concentration de Cd et de Pb dans le milieu de culture co-contaminé par Cd et 0.1 mg/L de Pb est illustrée par la figure 5.8 et la figure 5.9.

La concentration initiale des métaux lourds diminue de manière significative ($p < 0.05$) dès les deux premiers jours de la contamination. Les pourcentages d'élimination

de Cd et de Pb par *Lemna gibba* à partir des solutions contenant le mélange binaire de Cd+Pb sont regroupés dans le tableau 5.6 et le tableau 5.7.

Il est à constater que la réduction de Cd est comprise entre 6-100%. Les réductions maximales sont de 100% à 0.01 mg/L, 41% à 0.1 mg/L et 16% à 1 mg/L. Quant au Pb, les taux d'élimination sont compris entre 66-100%. Le maximum de Pb (100 %) est éliminée en présence de 0.1 et 1 mg/L de Cd.

La variation de la concentration des métaux dans le mélange de Cd (0.01, 0.1 et 1 mg/L) combiné à 1 mg/L de Pb est représentée par la figure 5.9.

Les résultats révèlent de faibles pourcentages d'élimination de Cd (Tableau 5.6). A 1mg/L de Cd, 27% de ce métal est éliminé. Aux autres concentrations testées, 6% et 0% de Cd sont éliminées à 0.01 et 0.1 mg/L respectivement.

Par ailleurs, l'élimination de Pb (Tableau 5.7) est plus importante. En effet, des pourcentages de réductions de 64% et 73% sont obtenus en présence de 0.1 et 1 mg/L de Cd. La concentration de Pb dans le milieu de culture diminue significativement ($p < 0.05$) entre 0 et 2 jours (Figure 5.10 et Figure 5.11).

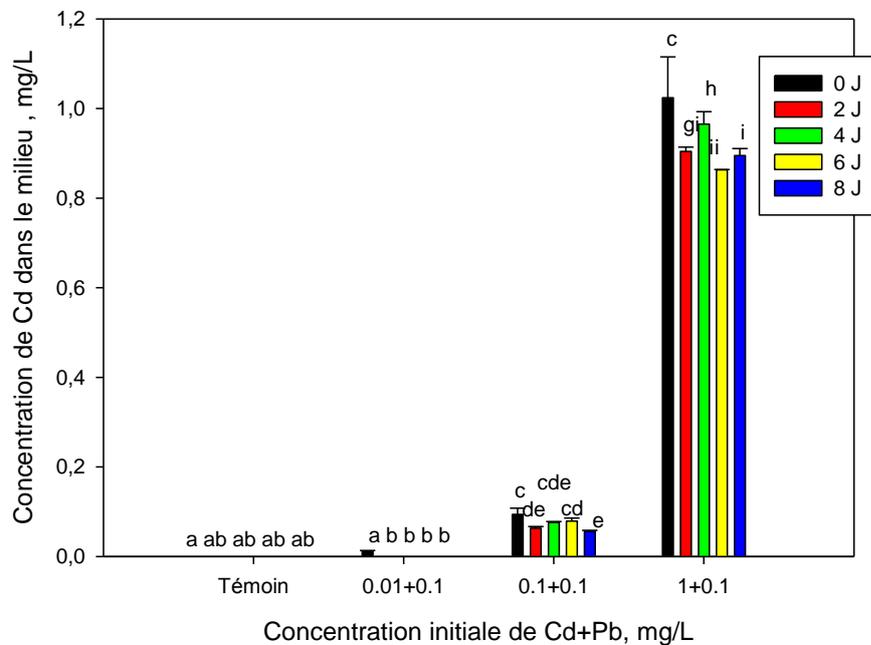


Figure 5.8 : Evolution de la concentration de Cd dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+ 0.1Pb (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)

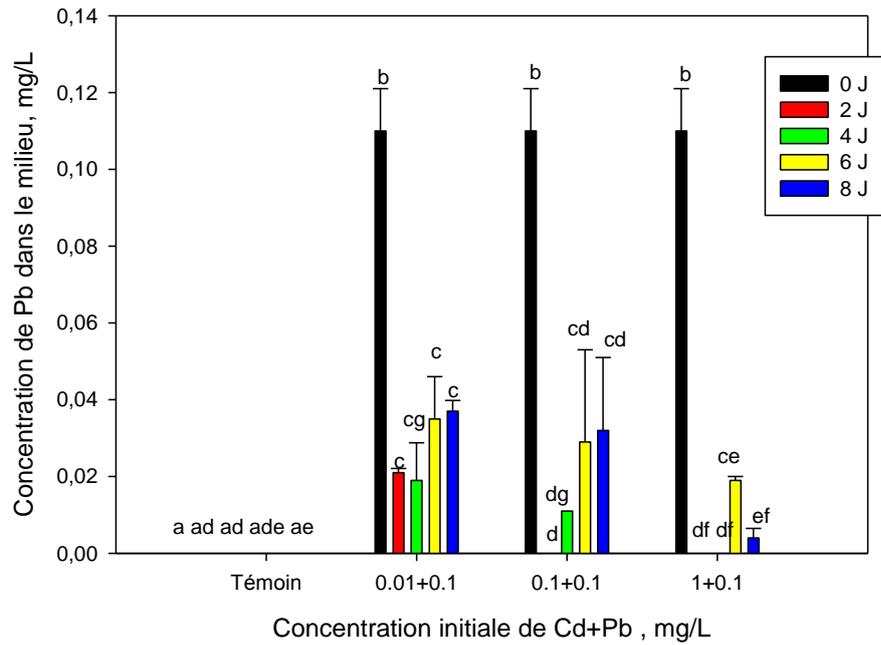


Figure 5.9 : Evolution de la concentration de Pb dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+ 0.1Pb (valeurs moyennes ± Ecart-types, n=3)

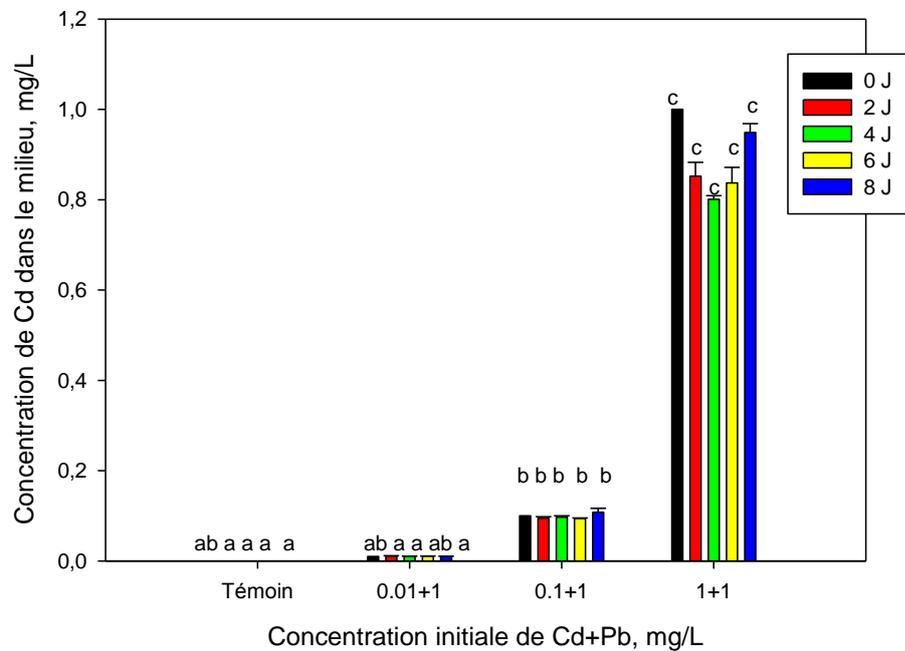


Figure 5.10 : Evolution de la concentration de Cd dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+ 1Pb (valeurs moyennes ± Ecart-types, n=3)

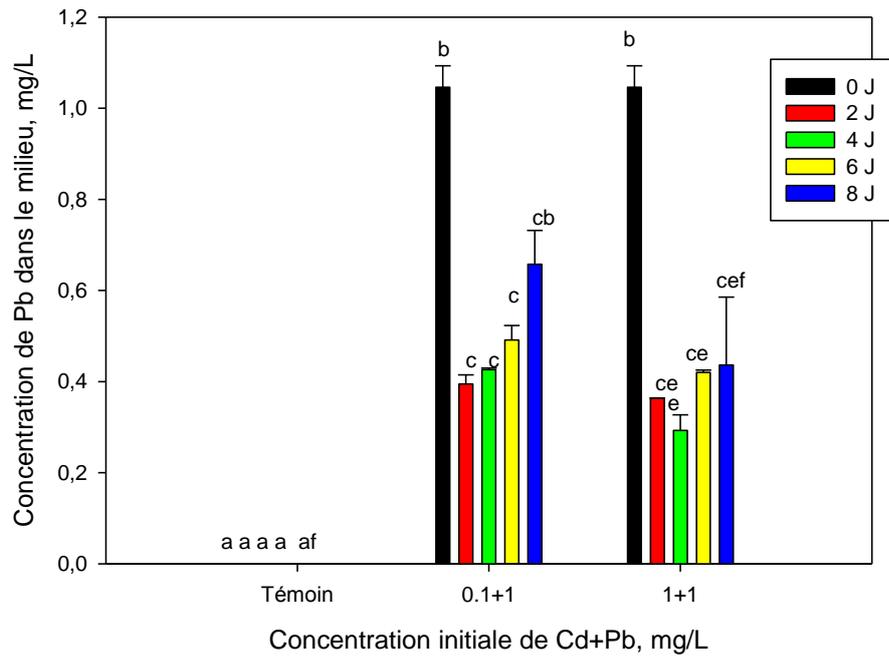


Figure 5.11 : Evolution de la concentration de Pb dans le milieu de culture en présence du mélange binaire Cd+1 Pb (valeurs moyennes \pm Ecarts- types, n=3)

Tableau 5.6 : Pourcentage d'élimination (%) de Cd à partir du milieu de culture co-contaminé par Cd+Pb

Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb				Temps (jours)	Concentration initiale (mg/L) Cd+Pb			
	0	0.01+0.1	0.1+0.1	1+0.1		0	0.01+1	0.1+1	1+1
2	0	100	33	12	2	0	0	5	23
4	0	100	19	6	4	0	0	3	27
6	0	100	16	16	6	0	0	6	24
8	0	100	41	13	8	0	0	0	14

Tableau 5.7 : Pourcentage d'élimination (%) de Pb à partir du milieu de culture co-contaminé par Cd+Pb

Temps (Jours)	Concentration initiale(mg/L) Cd+Pb				Temps (Jours)	Concentration initial (mg/L) Cd+ Pb			
	0	0.01+0.1	0.1+0.1	1+0.1		0	0.01+1	0.1+1	1+1
2	0	81	100	100	2	0	nd	64	67
4	0	83	90	100	4	0	nd	61	73
6	0	68	74	83	6	0	nd	55	62
8	0	66	71	96	8	0	nd	40	60

5.4.3. Suivi de l'évolution du pH

5.4.3.1. Evolution du pH du milieu de culture contaminé individuellement par Cd ou Pb

Les valeurs de pH dans le milieu de culture de *L.gibba*, contaminée par Cd ou Pb sont reportées sur la figure 5.12 et la figure 5.13.

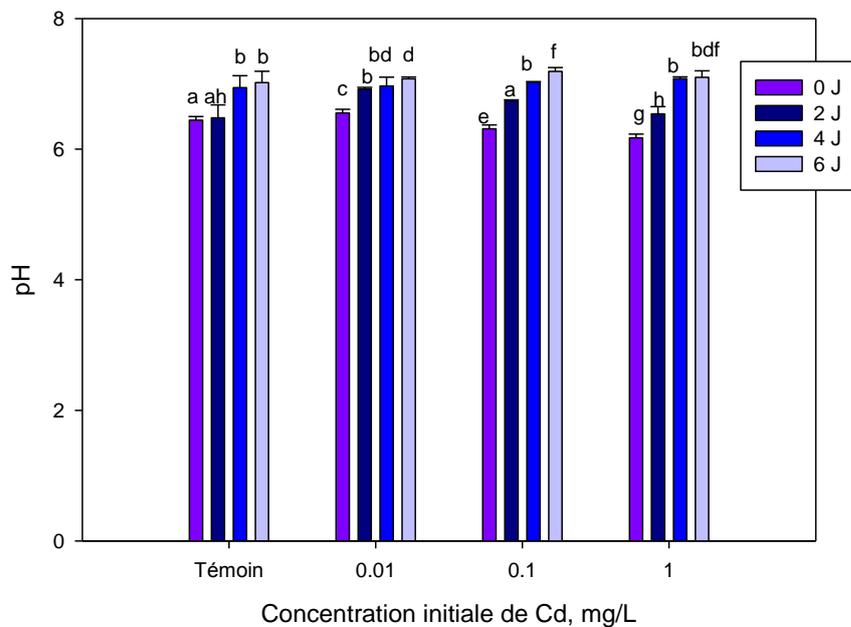


Figure 5.12 : Evolution du pH du milieu de culture contaminé par Cd. (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

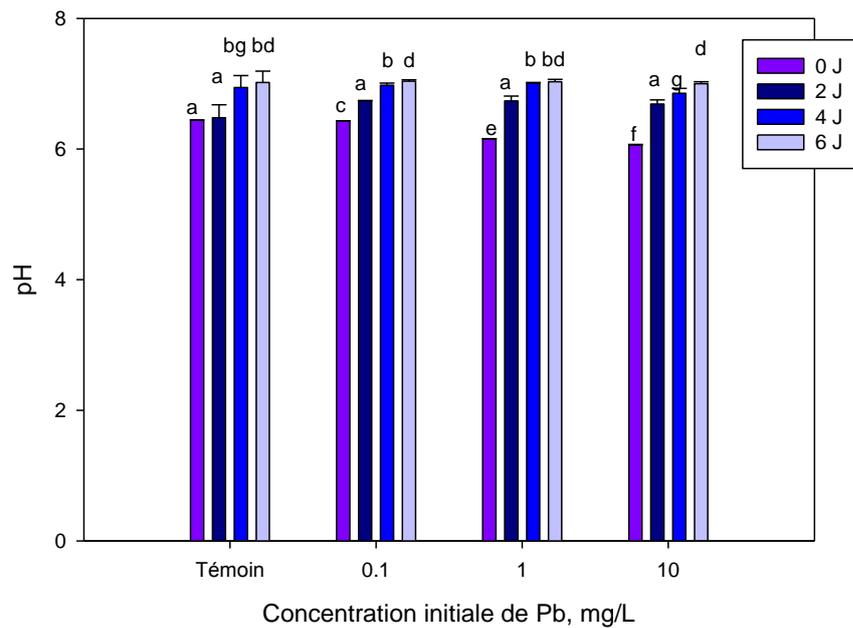


Figure 5.13 : Evolution du pH du milieu de culture contaminé par Pb. (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

Il apparaît nettement, une augmentation graduelle du pH dans le milieu de culture exempt de contaminants (témoin) et dans toutes les solutions nutritives contenant Cd ou Pb.

A la fin de la durée de l'expérience, la variation du pH dans le témoin est de 0.58. Dans le milieu contaminé par 0.01, 0.1 ou 1 mg/L, le pH varie de 0.52, 0.87 et 0.93 respectivement. En présence de 0.1, 1 et 10 mg/L de Pb, la variation est de 0.61, 0.87 et 0.92 respectivement.

L'analyse statistique a montré que la variation du pH dans les milieux contaminés n'est pas significative ($p > 0.05$) par rapport au témoin.

5.4.3.2. Evolution du pH du milieu de culture co-contaminé par Cd et Pb

Les valeurs de pH dans le milieu de culture de *L.gibba* co-contaminé par Cd et 0.1 mg/L de Pb sont représentées par la figure 5.14.

Comme dans le cas de la contamination des milieux nutritifs de la plante par Cd et Pb individuellement, une augmentation significative du pH est observée dans le témoin et dans toutes les solutions contaminées par le mélange binaire Cd+ 0.1mg/L de Pb à la fin de

la durée de l'expérimentation. La variation du pH est de 1.37 dans le témoin et de 1.06, 1.21 et 1.42 lors de l'association de 0.01, 0.1 et 1 mg/L de Cd et 0.1 mg/L de Pb.

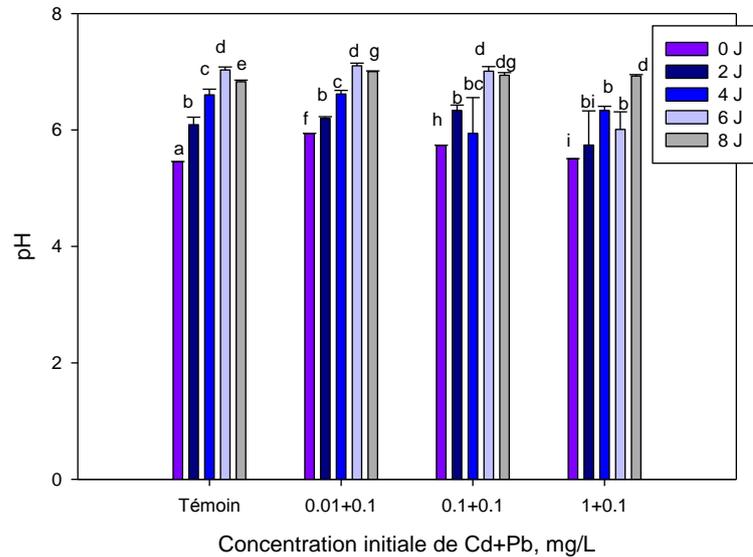


Figure 5.14 : Evolution du pH du milieu de culture co-contaminé Cd +Pb en présence de 0.1 mg Pb/L (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3).

L'évolution du pH dans les solutions co-contaminées par Cd et 1mg/L (Figure 5.15), une diminution du pH de 0.45, 0.23 et 0.32 respectivement dans les solutions contenant un mélange binaire de 0.01, 0.1 et 1 mg/L et 1 mg/L de Pb.

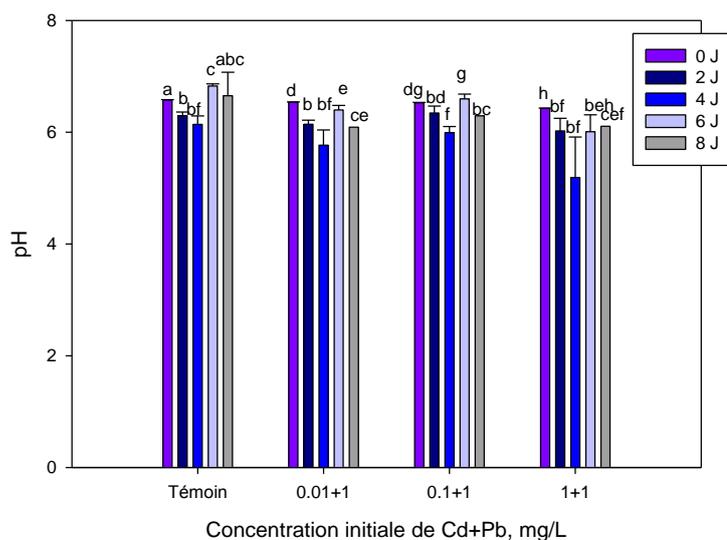


Figure 5.15 : Evolution du pH du milieu de culture co-contaminé Cd +Pb en présence de 1 mgPb/L (valeurs moyennes \pm Ecart-types, n=3)

5.5. Discussion

Plusieurs chercheurs ont évalué les performances des lentilles d'eau dans l'élimination de l'azote et du phosphore. Korner et Vermaat [169] ont montré que ces plantes aquatiques peuvent éliminer 63-99% du phosphore total en trois jours. Ils ont également reporté des taux d'élimination du phosphore allant de 14% à 92.2% dans les eaux usées en utilisant *L. gibba*.

L'étude expérimentale de Vermaat et Hanif [170] a réalisé des taux de réduction de 77% du phosphore total dans les eaux usées domestiques avec les *Lemnacea*. El kheir et al. [171] ont confirmé l'efficacité de *L.gibba* dans l'élimination de la matière en suspension, les nutriments, les sels solubles, la matière organique. Nos résultats concordent avec les leurs.

Dans cette étude, les résultats montrent une réduction importante des nitrates et des phosphates pendant les deux premiers jours de l'expérience. Selon Ozengin [172], le maximum d'élimination des phosphates totaux par les lentilles d'eau (*L. minor*) se produit à 360 minutes alors que le maximum d'élimination des nitrates a lieu à 1440 minutes dans les eaux industrielles et municipales. A partir des résultats de Selvarani et al. [173], il s'est avéré que 0.125 mg/L et 0.250 mg/L et 0.5 mg/L de Glyphosate causent un ralentissement de la réduction des phosphates de 75% à 37.5% par les lentilles d'eau ceci est dû principalement à l'inhibition de la croissance de la plante. Dans cette étude, la croissance relative de la plante augmente avec le temps, même en présence des contaminants. Il en résulte des taux d'éliminations importants.

Avec l'augmentation de la concentration initiale des contaminants dans le milieu de culture, les quantités de Cd et de Pb accumulées dans la plante augmente également sans inhiber considérablement la croissance de la plante. De ce fait, la contamination des solutions par les métaux lourds n'a pas eu d'effet négatif sur l'élimination des nitrates et des phosphates.

A notre connaissance, aucune étude sur l'effet combiné des métaux sur la capacité d'absorption du phosphore et de l'azote par les plantes aquatiques n'a été menée. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les taux d'élimination des phosphates dépassent 80%. De plus, la concentration initiale des mélanges n'a pas d'effet négatif sur l'abattement des phosphates par *L.gibba*. Les traitements de la lentille d'eau par

différentes combinaisons de Cd+Pb et qui ont été accumulées n'ont pas eu d'incidence sur la croissance de la plante favorisant ainsi l'absorption des phosphates.

Contrairement aux phosphates, l'absorption des nitrates par *L.gibba* est très faible par rapport aux expériences où la lentille d'eau a été contaminée individuellement par le Cd ou le Pb.

Il est bien connu que beaucoup d'espèces de plantes telles que la Jacinthe d'eau, *Eichhornia sp.*; *Lemna sp.* et *spirodella sp.*; small water fern-*Azolla sp.*; water lettuce-*Pistia sp.* sont capables d'éliminer les métaux lourds à partir du milieu aquatique et de produire une concentration interne du métal plusieurs fois plus grande que celle de l'environnement [127]. Les plantes aquatiques peuvent être un matériel potentiel dans l'élimination des métaux lourds à partir de l'eau.

L'utilisation de *T.Latifolia* a conduit à l'élimination de 41% et 38% de Cd aux concentrations de 5 mg/L et 7.5 mg/L et 89% (5mg/L) et 84% (7.5mg/L) de Pb [138]. Lu et al. [131], ont trouvé un taux de réduction de 90% lorsque la plante est exposée à 4mgCd/L pour une durée de 12 jours. Yaowakhan et al. [130] ont montré que l'élimination de Pb par *C. demersun*, *H.difformis*, *C. caroliniana*, and *L.hyssopifolia* ont permis la réduction de Pb de 80%, 70%, 50% et 30% au bout de 9 jours d'exposition à 10 mg Pb/L.

Dans une étude conduite par Abdallah [174], il apparaît que *Lemna gibba* est un candidat potentiel dans l'élimination de Cr (95%) et de Pb (84%) après 12 jours d'incubation. La combinaison de 5mgCd/L+5mgPb/L a conduit à l'élimination de 38% de Cd et 87% de Pb et la combinaison de Cd et de Pb à la concentration de 7.5 mg/L chacun, a permis d'atteindre des taux de réduction de 32% de Cd et 80% de Pb [138].

L.gibba est plus efficace dans l'élimination de Pb / Cd à partir des milieux aquatiques.

Les taux de réduction de Cd et de Pb ne diffèrent pas de manière significative lorsque la concentration des métaux varie que ce soit en présence individuelle ou dans le mélange. Ceci suggère que l'élimination des métaux est indépendante de la concentration initiale de Cd et de Pb [137].

Les lentilles d'eau peuvent survivre dans une large gamme de pH et de température (3.5-10.5 et 7-35°C) [144]. Des valeurs de pH inférieures à 3.5 ou supérieures à 10 peuvent limiter la croissance de la plante [175]. Une gamme de pH comprise entre 4.5-7.5 est la

mieux adaptée à la croissance des lentilles d'eau [176, 177]. Le pH initial choisi dans les expériences de cette étude se situe dans la gamme favorisant la croissance optimale de *L.gibba*.

Une augmentation du pH est observée en fonction du temps dans les solutions servant de témoin, celles contaminées par Cd, Pb et Cd+ 0.1Pb. Un résultat similaire est obtenu par Mégateli dans les solutions contaminées par le cuivre [177]. Les résultats ont révélé de faibles variations du pH dans les milieux de culture sans plantes (< 0.4) 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.

5.6. Conclusion

La croissance drastique de la population et la multiplication des industries a eu pour conséquence la dispersion de la pollution dans les milieux aquatiques. En plus de la détérioration des nappes phréatiques causée par le déversement de quantités impressionnantes de métaux lourds toxiques, le phénomène d'eutrophisation n'est pas moins dangereux.

Dans la présente étude, les résultats obtenus suggèrent que le choix de *Lemna gibba* est pertinent dans la mesure où des réductions importantes de nitrates et de phosphates sont réalisées même en présence de contaminants. De plus, la réduction de Cd et de Pb à partir des solutions nutritives est considérable.

CONCLUSION GENERALE

Ce projet de thèse a été orienté vers une problématique de préservation de l'environnement, plus précisément avec comme objectif de dépolluer les milieux aquatiques contaminés par des métaux lourds toxiques tels que le cadmium et le plomb, en faisant appel à des végétaux (phytoremédiation).

Le choix de ces deux éléments (Cd et Pb) est fondé principalement sur le fait qu'ils sont comptés parmi les métaux usuellement déchargés dans les eaux.

La phytoremédiation est une technique relativement récente et des recherches sont en cours afin d'améliorer les performances de cette méthode en approfondissant la compréhension des mécanismes d'accumulation voire d'hyperaccumulation de différents polluants dans les plantes.

Un choix rigoureux de la plante doit se baser sur un certain nombre de critères objectifs, eux-mêmes sélectionnés judicieusement, faisant un compromis entre les avantages et les inconvénients de la culture éventuelle de chacune des plantes dans des contextes bien déterminés. Les critères que doit posséder l'espèce végétale utilisée en phytoremédiation, on cite entre autres : être native, avoir une grande vitesse de croissance, un système racinaire étendu, adaptation aux différents habitats, une grande tolérance et une capacité d'accumuler les polluants dans les parties supérieures.

A la lumière des résultats expérimentaux obtenus, *Lemna gibba*, semble être intéressante pour une culture rationnelle à des fins de dépollution, dans la mesure où elle s'adapte assez bien dans un milieu contaminé par les métaux lourds sélectionnés et leur combinaison, les accumule ce qui permet leur élimination du milieu aquatique, en plus de l'abattement des phosphates et des nitrates, principaux responsables du phénomène d'eutrophisation.

Notre travail s'est articulé autour de deux parties. Les principaux résultats obtenus ont été sélectionnés afin de dégager des conclusions.

Dans la première partie, l'intérêt est porté à la réponse de la plante en terme de croissance, au stress causé par la contamination individuelle ou combiné de Cd et de Pb.

De plus, les quantités des métaux accumulées dans les tissus de la plante ont été déterminées. Il ressort :

- La toxicité des métaux lourds testés à savoir Cd et Pb s'est manifestée par l'inhibition de la croissance de la plante. Ainsi, les concentrations testées de Cd et de Pb ont conduit à des inhibitions du nombre de frondes allant de 0% à 41.78 % et de 5.31% à 35.29% respectivement.

- Lors de la co-contamination de la plante par les différentes combinaisons de Cd+Pb, les inhibitions de la croissance de *L.gibba* sont inférieures à celles obtenues lorsque la plante est exposée au Cd et au Pb individuellement. Ceci signifie que la toxicité observée en présence d'associations binaires Cd+Pb est moins que la somme des toxicités en présence des contaminants seuls. Les résultats de l'étude statistique permettant de déterminer le type d'interaction entre Cd et Pb indique un antagonisme entre les deux contaminants.

- Dans le milieu de culture contaminé par Cd ou par Pb, comme dans le milieu co-contaminé par le mélange Cd+Pb, la lentille d'eau n'a manifesté aucun signe de chlorose ou de senescence. Les frondes de *L.gibba* sont restées vertes et vigoureuses, preuve de sa bonne santé.

- L'analyse des métaux testés dans les tissus de *L.gibba* par spectrométrie d'absorption atomique a permis de détecter des quantités variables de Cd et de Pb, preuve de la capacité d'accumulation des contaminants par cette lentille d'eau.

- En se basant sur l'ensemble des valeurs calculées du facteur de bioconcentration, qui permet d'estimer l'efficacité d'une plante dans la rétention des métaux, il est clair que le choix de *L.gibba* est pertinent pour son utilisation en phytoremédiation, lorsqu'il s'agit de contamination individuelle de la lentille d'eau par Cd ou Pb. En effet, des valeurs supérieures à 1000 sont obtenues, aux concentrations testées de Cd et à 0.1 et 1 mg/L de Pb.

- A la fin de la durée de l'expérimentation, les valeurs de FBC de Pb dépassent celles de Cd. Ceci suggère une grande efficacité d'accumulation de Pb par rapport à Cd.

- La co-contamination de *L.gibba* par l'association de Cd et 0.1 mg/L, favorise l'accumulation de Cd par rapport au Pb alors que dans les mélanges binaires de Cd et 1 mg/L de Pb l'accumulation de Cd ne se produit que dans la solution nutritive co-contaminée par 1 mg/L de chaque métal.

Dans la deuxième partie, l'effet du cadmium et du plomb sur l'abattement des nitrates et des phosphates est examiné. L'évolution de la concentration de Cd et de Pb dans le milieu de culture de la lentille d'eau est également suivie afin de déterminer les taux d'élimination de Cd et de Pb.

Les expériences réalisées en conditions contrôlées indiquent que *L. gibba* s'avère une très bonne candidate pour la phytoremédiation : taux de réduction de l'azote de 60% ; taux de réduction des phosphorates de 80% ; l'élimination du cadmium et du plomb peut atteindre 100% à certaines concentrations lors de leur association

Sur la base des résultats acquis dans cette étude, de nouvelles perspectives sont à envisager pour les futures recherches :

- Dans le milieu aquatique, en plus du cadmium et du plomb, d'autres contaminants métalliques peuvent être rencontrés. Pour cela, il sera important de tester les capacités de tolérance de *Lemna gibba* vis-à-vis de combinaison de plusieurs métaux lourds lors de leur accumulation. Ceci permettrait d'étudier les réponses de la plante à l'association de plusieurs d'entre eux qui pourrait induire une contrainte différente. De plus, un phénomène de compétition entre les différents éléments métallique pourra se produire permettant de déterminer les préférences de cette lentille d'eau.

- Il sera également intéressant d'associer à ses mélanges métalliques, des polluants organiques souvent retrouvés dans les milieux aquatiques tels que les pesticides ou les substances humiques.

- Il est indispensable de valider ces résultats expérimentaux obtenus à l'échelle du laboratoire, dans un milieu naturel.

- Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre l'interaction entre Cd et Pb pour identifier les paramètres qui peuvent expliquer le comportement ou le mécanisme qui peut être amélioré pour augmenter la capacité de cette plante à accumuler Cd et Pb lorsqu'ils sont tous les deux en solution

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations :

AFNOR	association Française de Normalisation
ASc	acide ascorbique
CAT	catalase
C ₀	concentration initiale de [PO ₄ ³⁻] ou de [NO ₃ ⁻] dans le milieu de culture à l'instant t=0, (mg L ⁻¹)
C _t :	concentration de [PO ₄ ³⁻] ou de [NO ₃ ⁻] dans le milieu de culture à l'instant t (mg L ⁻¹)
Cu /Zn-SOD	superoxyde- dismutase à cuivre-Zinc
ETM	Elément trace métallique
Fe-SOD	Superoxyde- dismutase à fer ferreux.
FBC	Facteur de bioconcentration
g	Gramme
GSH	Glutathion
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
Hsp	Protéine de choc thermique
% Inh	Taux d'inhibition de la croissance (%)
ISO	Organisation Internationale de Normalisation
KDA	Kilodalton
mg L ⁻¹	milligramme par litre
mM	millimoles
Mn-SOD	Superoxyde- dismutase à manganèse
MT	metallothionéines
ng	nanogramme
N _t	nombre de colonies moyen à l'instant t, adimensionnel
N ₀	nombre de colonies moyen à l'instant initial adimensionnel
PC	phytochélatine
POX	peroxydase
P _{s0}	Poids sec de la plante à l'instant t=0 (g)

P_{S_t}	Poids sec de la plante à l'instant t (g)
ROS	Formes réactives de l'oxygène
OMS	Organisation mondiale de la santé
SE	Erreur standard
SOD	Superoxyde dismutase
μg	microgramme

Liste des symboles chimiques

Ba Baryum

Cd Cadmium

Cr Chrome

Cu Cuivre

Fe Fer

Hg Mercure

Ni Nickel

Pb Plomb

Se Sélénium

Zn Zinc

APPENDICE B

PROTOCOLE DE PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE HOAGLAND MODIFIE

Tableau B.1 : Concentrations et volumes des réactifs chimiques utilisés dans la préparation du milieu de culture [116].

Solution	Composition chimique	Concentration (g L ⁻¹)	Volume prélevé pour un litre de milieu de culture (ml)
S ₁	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	11.8	100
S ₂	KNO ₃	10.11	5
S ₃	MgSO ₄ .4H ₂ O	12,33	4
S ₄	KH ₂ PO ₄	6.80	1
S ₅	Fe- EDTA  $\left[\begin{array}{l} \text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O} \\ + \\ \text{Na}_2\text{-EDTA} \end{array} \right]$	2.78 (0.5 L) 3.73(0.5 L)	10
S ₆	H ₃ BO ₃ ZnSO ₄ MnSO ₄ .4H ₂ O CuSO ₄ . 7H ₂ O	2.86 0.22 1.55 0.079	1
S ₇	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O Co(NO ₃) ₂ .4H ₂ O NiSO ₄ . 7H ₂ O Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O	0.128 0.049 0.0478 0.017	1

APPENDICE C
COURBES D'ETALONNAGE

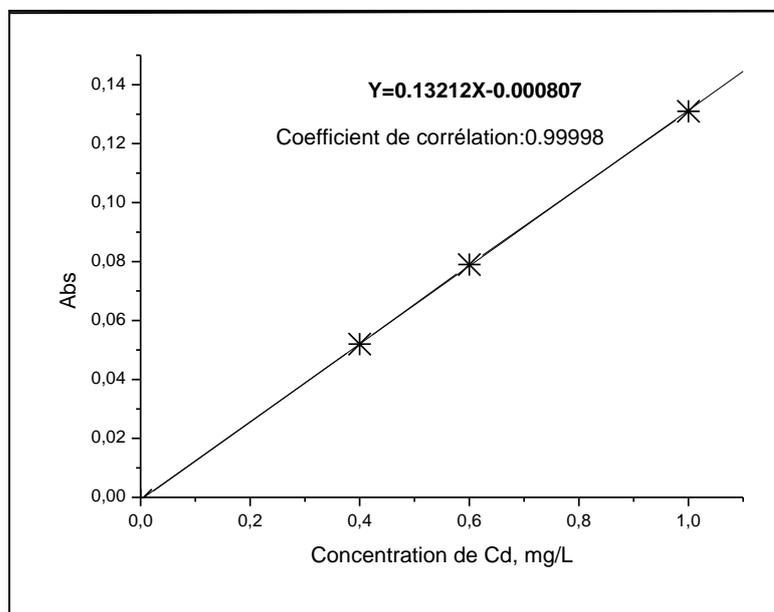


Figure C. 1 : Courbe d'étalonnage pour l'analyse du cadmium par spectrométrie d'absorption atomique.

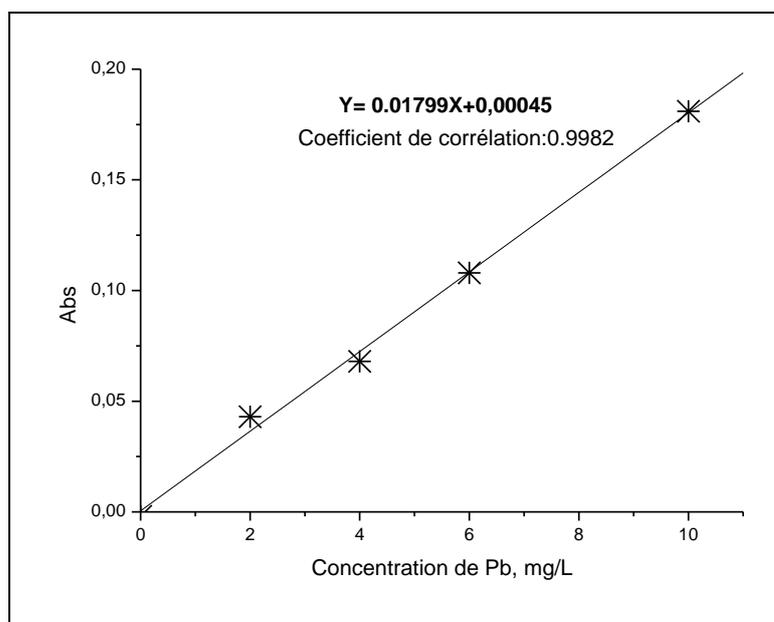


Figure C. 2 : Courbe d'étalonnage pour l'analyse du plomb par spectrométrie d'absorption atomique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Naseem, R.O., Tahir, S.S., “Removal of Pb (II) from aqueous/acidic solution by using Bentonite as an adsorbent”. *Water Research*, 35(16), (2001), 3982-3986.
2. Wang, Q. R., Cui, Y. S., Liu, X. M., Dong, Y. T., Christie, P., “Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China”. *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 38, (2003), 823-838.
3. Abrahams, P.W., “Soils: their implications to human health”. *The Science of the Total Environment* 291, (2002), 1-32.
4. Adriano, D.C., “Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals”. 2nd Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg (2001).
5. NandaKumar, P.B.A., Dushenkov, V., Motto, H., Raskin, I., “Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils”. *Environmental Science and Technology*, 29, (1995), 1232–1238.
6. Barre, K., “The healing power of the seal: the meaning of Inuit health practice and belief”. *Arctic Anthropology*, 31(1), (2005), 1-15.
7. Mukai, H., Tanaka, A., Fujii, T., Zeng, Y., Hong, Y., Tang, J., et al., “Regional characteristics of sulfur and lead isotope ratios in the atmosphere at several Chinese urban sites”. *Environmental Science and Technology*, 35, (2001), 1064-1071.
8. Susarla, S., Victor, F., Medina, V. F., McCutcheon, S.C., “Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination”. *Ecological Engineering*, 18, (2002), 647-658.
9. Vassilev, A., Schwitzguébel, J.P., Thewys, T., van der Lelie, D., Vangronsveld, J., “The use of plants for remediation of metal-contaminated soils”. *The Scientific World Journal*, 4, (2007), 9-34.

10. 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.”. Revue des sciences de l’eau, 10, (2006), 57-87.
11. Thornton, I., In “Metals in the global environment: facts and misconceptions”, Ed. International Council on Metals and the Environment, Ottawa. (1995).
12. Sanita di Toppi, L., Gabbrielli, R., “Response to cadmium in higher plants”. Environmental and Experimental Botany, 41, (1999), 105-130.
13. Loué, A., “Oligo-éléments en agriculture”. Ed. Nathan (ed), (1993), pp 45-177.
14. Kabata-Pendias, A., Pendias, H., “Trace elements in soils and plants”. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C. (2001).
15. Juste, C., “Valorisation agricoles des boues issues du traitement des eaux usées urbaines”. Trib. Cebedeau, 432, (1979), 461-467.
16. Galloo, J.C., Guillermo, R., “Analysis”. 17(10), (1989), 567-580.
17. Viala, A., Bourbon, D., Sauvre, J.M., Seguy, M., Schreiber, E., Vandaele, J., Rev. Pollut. Atmosphérique F.R.A., 82, (1979), 159.
18. W.H.O (World health organization), Regional office for Europe, The hazard to health of persistent substances in water, Helsinki, (1972).
19. Jumarie, C., Fortin, C., Houde, M., Campbell, P., Denizeau, F., “Cadmium uptake by Caco-2 cells: Effects of Cd complexation by chloride, glutathione and phytochelatins”. Toxicology and Applied Pharmacology, 170, (2001), 29-38.
20. Roth, U., Von Roepenack-Lahaye, E., Clemens, S., “Proteome changes in Arabidopsis thaliana roots upon exposure to Cd²⁺”. Journal of Experimental Botany, 57 (15), (2006), 4003-4013.
21. Daud, M.K., Suna, Y., Dawooda, M., Hayat, Y., Variatha, M.T., Wua, Y.-X., Raziuddina, Mishkat, U., Salahuddine, Najeeba, U., Zhua, S., “Cadmium-induced functional and ultrastructural alterations in roots of two transgenic cotton cultivars”. Journal of Hazardous Materials, 161, (2008), 463-473.

22. Nordberg, G., Group, C., "Cadmium and human health: a perspective based on recent studies in China". *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 16, (2003), 307-319.
23. Morlot, M., "Aspects analytiques du plomb dans l'environnement". Ed Lavoisier TEC&DOC, (1996), 483 p.
24. Raskin, I., Ensley, B.D., "Phytoremediation of toxic metals; using plants to clean up the environment". John Wiley and Sons, New York, (2000), 304 p.
25. Sterckeman, T., Douay, F., Proix, N., Fourrier, H., "Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France". *Environmental Pollution*, 107, (2000), 377-389.
26. De Abreu, C.A., De Abreu, M.F., Andrade, J.C., "Distribution of lead in the soil profil evaluated by DTPA and Mehlich-3 solution". *Bragantia*, 57, (1998), 185-882.
27. Gadd, J.M., "Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the Environment". 2000 Raskin. I and Ensley. B.D., John Wiley & Sons, Inc, New York, 304, (2000).
28. Raskin, I., Kumar, N.P.B.A, Dushenkov, S., Salt, D.E., "Bioconcentration of heavy metal by plant". *Current Opinion in biotechnology*, 5, (1994), 285-290.
29. Salt, D.E, Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A, Dushenkov, S., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I., "Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants". *Biotechnology*, 5, (1995), 285-290.
30. Boutin, C., Esser, D., Molle, P., Liénard, A., "Les filtres et lits plantés de roseaux en traitement d'eaux usées domestiques. Perspectives pour le traitement d'eaux pluviales". *Les rendez-vous du GRAIE*, (2000), 1-19.
31. Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., "Phytoremediation". *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, (1998), 643-68.
32. Schnoor, J.L., Licht, L.A., McCutcheon, S.C., Wolfe N.L., Carreira L., "Phytoremediation of organic and nutrient contaminants". *Environmental Science and Technology*, 7A, (1995), 318-323.

33. Schröder, P., Harvey, P.J., Schwitzguébel, J.P., “Prospects for the phytoremediation of organic pollutants in Europe”. *Environmental Science and Pollution Research*, 9, (2002), 1-3.
34. Pilon-Smits, E., “Phytoremediation”. *Annual Review of Plant Biology*, 56, (2005), 15-39.
35. Campos, V.M., Merino, I., Casado, R., Pacios, L.F., Gómez, L., “Phytoremediation of organic pollutants”. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6 (Special issue), (2008), 38-47.
36. Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B., Kochian, L., “Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*”. (*J. & C. Presl*). *Planta*, 214, (2002), 635-640.
37. 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.
38. Cunningham, S.D., Berti, W.R., Huang, J.W., “Phytoremediation of contaminated soils”. *Trends in Biotechnology*, 13, (1995), 393-397.
39. McGrath, S.P., “Phytoextraction for soil remediation”. In R.R. Brooks (ed.) *Plants that hyperaccumulate heavy metals*. CAB Int., Wallingford, UK, (1998), 261-287.
40. De Souza, M.P., Pickering, I.J., Walla, M., Terry, N., “Selenium assimilation and volatilization from selenocyanate-treated Indian mustard and muskgrass”. *Plant Physiology*, 128, (2002), 625-633.
41. Terry, N., Sambukumar, S.V., LeDuc, D.L., “Biotechnological approaches for enhancing phytoremediation of heavy metals and metalloids”. *Acta Biotechnology*, 23, (2003), 281-288.
42. Liao, S.W., Chang, W.L., “Heavy metal phytoremediation by water hyacinth at constructed wetlands in Taiwan”. *Journal of Aquatic Plant Management*, 42, (2004), 60-68.

43. Ran, N., Agami, M., Oron, G., "A pilot study of constructed wetlands using duckweed (*Lemna gibba* L.) for treatment of domestic primary effluent in Israel". *Water Research*, 38, (2004), 2241-2248.
44. Axtell, N.R., Sternberg, S.P.K., Claussen, K., "Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*". *Bioresource Technology*, 89, (2003), 41-48.
45. Maury-Brachet, E., Ribeyre, F., Boudou, A., "Actions and interactions of temperature and photoperiod on mercury accumulation by *Elodea densa* from sediment source". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20, (1990), 141-155.
46. Miretsky, P., Saralegui, A., Cirelli, A. F., "Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metal". *Chemosphere*, 57, (2004), 997-1005.
47. Vincent, G., "Les capacités naturelles d'épuration des écosystèmes aquatiques". *Quatre-Temps*, 20, (1997), 38-41.
48. Larsen, M., Ucisik, A.S., Trapp, S., "Uptake, metabolism, accumulation and toxicity of cyanide in willow trees". *Environmental Science and Technology*, 39, (2005), 2135-2142.
49. Dhir, B., Sharmila, P., Saradhi, P., "Potential of aquatic macrophytes for removing contaminants from the environment". *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39, (2009), 754-781.
50. Rice, P.J., Anderson, T.A., Coats, J.R., "Phytoremediation of herbicide-contaminated surface water with aquatic plants". *ACS Symposium Series* 664, (1997), 133-151.
51. Gao, J., Garrison, A.W., Hoehamer, C., Mazur, C.S., Wolfe, N.L., "Uptake and phytotransformation of organophosphorus pesticides by axenically cultivated aquatic plants". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, (2000), 6114-6120.
52. Mitsou, K., Koulianou, A., Lambropoulou, D., Pappas, P., Albanis, T., Lekka, M., "Growth rate effects, responses of antioxidant enzymes and metabolic fate of the herbicide Propanil in the aquatic plant *Lemna minor*". *Chemosphere*, 62, (2006), 275-284.

53. Tront, J.M., Saunders, F.M., “Role of plant activity and contaminant speciation in aquatic plant assimilation of 2, 4, 5-trichlorophenol”. *Chemosphere*, 64, (2006), 400-407.
54. De Carvalho, R.F., Bromilow, R.H., Greenwood, R., “Uptake of pesticides from water by curly waterweed *Lagarosiphon major* and lesser duckweed *Lemna minor*”. *Pest Management Science*, 63, (2007), 789-797.
55. Cai, X., Liu, W., Jin, M., Lin, K., “Relation of diclofop-methyl toxicity and degradation in algae cultures”. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, (2007), 970-975.
56. Chaudhry, Q., Schröder, P., Werck-Reichhart, D., Grajek, W., Marecik, R., “Prospects and limitations of Phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment”. *Environmental and Science Pollution Research international*, 9, (2002), 4-7.
57. AFNOR (Association Française de Normalisation), *Essais Ecotoxicologiques, “Détermination de l’inhibition de croissance de *Lemna minor*”, norme XP T 90-337, Normalisation Française, AFNOR, Paris, 2, (1996), 437-446.*
58. ISO (Organisation Internationale de Normalisation), *Water Quality, 2001. “Determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*)”. Duckweed growth inhibition test, ISO TC 147/SC 5 N, ISO/CD 20079.*
59. Wahaab, A.R., Lubberding, H.J., Alaerts, G.J., “Copper and chromium (III) uptake by duckweed”. *Water Science and Technology*, 32, (1995), 105-110.
60. Anawar, H.M., Garcia-Sanchez, A., Tari Kul Alam, M., Majibur Rahman, M., “Phytofiltration of water polluted with arsenic and heavy metals”. *International Journal of Environment and Pollution*, 33, (2008), 292-312.
61. Gadgil, K., Kaur, L., Sharma, S., “Simulated studies on lead uptake by *Lemna minor* with varying lead concentrations in different alkaline range”. *Indian Journal of Environmental Protection*, 28, (2008), 961-966.

62. Hurd, N.A., Sternberg, S.P.K., “Bioremoval of aqueous lead using *Lemna minor*”. *International Journal of Phytoremediation*, 10, (2008), 278-288.
63. Baker, A.J.M., 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. (Eds), *Phytoremediation of contaminated soil and water*. Lewis Publishers CRC, Boca Raton, pp. 85–107, (2000).
64. Sulmon, C., Gouesbet, G., Binet, F., Martin-Laurent, F., El Amrani, A., Couée, I., “Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*”. *Environmental Pollution*, 145, (2007), 507-515.
65. INRA, 2009. <http://taste.versailles.inra.fr/inapg/phytoremed/eco/index.htm> [28 juillet 2009].
66. Levitt, J., “Responses of plants to environmental stresses”. Volume II: Water, radiation, salt, and other stresses. Academic Press, New York. (1980)
67. Rengel, Z., (1999) “Heavy Metals as Essential Nutrients”. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 231-251.
68. Morel, J.L., Mench, M., Guckert, A., “Measurement of Pb^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays* L.) roots”. *Biology and Fertility of Soils*, 2, (1986), 29-34.
69. Sharma, P., Dubey, R.S., “Lead toxicity in plants”. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, (2005), 35-52.
70. Blaylock, M.J., Huang, J.W., “Phytoextraction of metals. In “Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment”, Eds. Raskin I., Ensley B.D., New York, (2000), 53-71.
71. Sahi, S.V., Bryant, N.L., Sharma, N.C., Singh, S.R., “Characterization of a lead hyperaccumulator shrub, *Sesbania drummondii*”. *Environmental Science and Technology*, 36, (2002), 4676-4680.

72. 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. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41, (2009) 1665-1677.
73. Arazi, T., Sunkar, R., Kaplan, B., Fromm, H., “A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants”. *The Plant Journal*, 20 (2), (1999), 171-182.
74. Sunkar, R., Kaplan, B., Bouche, N., Arazi, T., Dolev, D., Talke, I.N., Maathuis, F.J., Sanders, D., Bouchez, D., Fromm, H., “Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous Arabidopsis CNGC1 gene confer Pb²⁺ tolerance”. *The Plant Journal*, 24, (2000), 533-542.
75. Wojas, S., Ruszczynska, A., Bulska, E., Wojciechowski, M., Antosiewicz, D.M., “Ca²⁺-dependent plant response to Pb²⁺ is regulated by LCT1”. *Environmental Pollution*, 147, (2007), 584-592.
76. Brunet, J., Repellin, A., Varrault, G., Terryn, N., Zuily-Fodil, Y., “Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems?” *Comptes Rendus Biologies*, 331, (2008), 859-864.
77. Clemens, S., Antosiewicz, D.M., Ward, J.M., Schachtman, D.P., Schroeder J.I., “The plant cDNA LCT1 mediates the uptake of calcium and cadmium in yeast”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, (1998), 12043-12048.
78. Hal, J.L., Williams, L.E., “Transition metal transporters in plants”. *Journal of Experimental Botany*, 54, (2003), 2601-2613.
79. Alloway, B.J., “Soil processes and the behaviour of heavy metals”. In: Alloway, B.J. (Ed.). *Heavy metals in soils*. Chapman & Hall, London, 11-35.;;;;;;
80. Klein, M., Burla, B., Martinoia, E., “The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants”. *FEBS Letters*, 580, (2006), 1112-1122.
81. Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P.A., Samuels, L., Schulz,

- B., Spalding, E.J., Yazaki, K., Theodoulou, F.L., “Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory”. *Trends in Plant Science*, 13, (2008), 151-159.
82. Rea, P.A., “MRP subfamily ABC transporters from plants and yeast”. *Journal of Experimental Botany*, 50, (1999), 895-913.
83. Cobbett, C., Goldsbrough, P., “Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis”. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 53, (2002), 159-182.
84. Mendoza-Cózatl, D.G., Moreno-Sanchez, R., “Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants”. *Journal of Theoretical Biology*, 238, (2006), 919-936.
85. Devi, S.R., Prasad, M.N.V., “Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J., (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 99-116. (1999).
86. Dietz, K.J., Baier, M., Kramer, U., (1999) “Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants”. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). *Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 73-97.
87. Cheng, S., “Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms”. *Environmental Science and Pollution Research*, 10 (4), (2003), 256-264.
88. Lasat, M.M., “Phytoextraction of toxic metals: A Review of Biological Mechanisms”. *Journal of Environmental Quality* 31, (2002), 109-120.
89. Meharg, A.A., “The role of the plasma lemma in metal tolerance in angiosperms”. *Physiologia Plantarum*, 88, (1993), 191-198.
90. Noctor, G., Foyer, C.H., “Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control”. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, (1998), 249-279.
91. Foyer, C.H., Noctor, G., Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signaling. *New Phytologist*, 146, (2000), 358-388.

92. Noctor, G., Arisi, A.C.M., Jouanin, L., Kunert, K.J., Rennenberg, H., Foyer, C.H., "Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants". *Journal of Experimental Botany*, 49, (1998), 623-647.
93. Mendoza-Cózatl, D.G., Loza-Tavera, H., Hernandez-Navarro, A., Moreno-Sanchez, R., "Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants". *FEMS Microbiology Reviews*, 29, (2005), 653-671.
94. Palmiter, R.D., "The elusive function of metallothioneins". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, (1998), 8428-8430.
95. Van Hoof, N.A.L.M., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W.J., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., Karenlampi, S.O., Tervahauta, A.I., "Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench). Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene". *Plant Physiology*, 126, (2001), 1519-1526.
96. Kohler, A., Blaudez, D., Chalot, M., Martin, F., "Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar". *New Phytologist*, 164, (2004), 83-93.
97. Roosens, N.H., Bernard, C., Leplae, R., Verbruggen, N., "Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*". *FEBS Letters*, (2004), 577, 9-16.
98. Zhang, Y.W., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S., "Cloning and characterization of type 2 metallothionein like gene from a wetland plant", *Typha latifolia*. *Plant Science*, 167, (2004), 869-877.
99. Murphy, A., Taiz, L., "Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. Correlation with copper tolerance". *Plant Physiology*, 109, (1995), 945-954.
100. Zenk, H.M., "Heavy metal detoxification in higher plants - a review". *Gene*, 179, (1996), 21-30.
101. Satofuka, H., Fukui, T., Takagi, M., Atomi, H., Imanaka, T., "Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 86, (2001), 595-602.

102. Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.L., Zenk, M.H., “Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)”. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86, (1989), 6838- 6842.
103. De Knecht, J.A., Koevoets, P.L.M., Verkleij, J.A.C., Ernst, W.H.O., “Evidence against a role for phytochelatin in naturally selected increased cadmium tolerance in *Silene Vulgaris* (Moench) Garcke”. New Phytologist, 122, (1992), 681-688.
104. Varga, A., Zaray, G., Fodor, F., Cseh, E.,”Study of interaction of iron and lead during their uptake process in wheat roots by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry” Spectrochimica Acta B, 52,(1997), 1027-1032.
105. Sharma, N.C., Gardea-Torresdey, J.L., Parsons, J., Sahi, S.V., “Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii*”. Environmental Toxicology and Chemistry, 23, (2004b), 2068-2073.
106. Sharma, S.S., Kaul, S., Metwally, A., Goyal, K.C., Finkemeier, I., Dietz, K.J., “Cadmium toxicity to barley (*Hordeum vulgare*) as affected by varying Fe nutritional status”. Plant Science, 166, (2004a), 1287-1295.
107. Ma, J.F., Zheng, S.J., Hiradate, S., Matsumoto, H., “Detoxifying aluminum with buckwheat”. Nature, 390, (1997), 569-570.
108. Harrington, C.F., Roberts, D.J., Nickless, G., “The effect of cadmium, zinc and copper on growth, tolerance index, metal uptake, and production of malic acid, in two strains of the grass *Festuca rubra*”. Canadian Journal of Botany, 74, (1996), 1742-1752.
109. Briat, J.F., Lebrun, M., “Plant responses to metal toxicity”. Plant Biology and Pathology, 1999, 322, 43-54.
110. Bert, V., “Tolérance aux métaux lourds et accumulation chez *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae)”. Thèse : Université des Sciences et Technologies de Lille, UFR de Biologie, (2000).

111. Kramer, U., Cotter-Howells, J.D., Charnock, J.M., Baker, A.J.M., Smith, J.A.C., “Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel”. *Nature*, 373, (1996), 635-638.
112. Chardonnens, A.N., Koevoets, P.L.M., Van Zanten, A., Schat, H., Verkleij, J.A.C., “Properties of enhanced tonoplast zinc transport in naturally selected zinc-tolerant *Silene vulgaris*”. *Plant Physiology*, 120, (1999), 779-785.
113. Dahmani-muller, H., Van Oort, F., Gelie, B., Balabane, M., “Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter”. *Environmental Pollution*, 109, (1999), 1-8.
114. Banzet, N., Richaud, C., Deveaux, Y., Kazmaier, M., Gagnon, J., Triantaphylides, C., “Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells”. *Plant Journal*, 13, (1998), 519-527.
115. Neumann, D., Lichtenberger, O., Gunther, D., Tschiersch, K., Nover, L., Heat-shock proteins induce heavy-metal tolerance in higher plants. *Planta*, 194, (1994), 360-367.
116. Gopal, B., “Water Hyacinth”(Aquatic Plant Studies 1). Elsevier, Amsterdam, Holland, (1987), 471p.
117. 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.
118. Megateli S., Semsari, S., Couderchet, M., “Toxicity and removal of heavy metals (cadmium,copper,and zinc) by *Lemna gibba*”. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72, (2009), 1774-1780.
119. Cottenie, A., Verloo, M., Kiekens, L., Velghe, G., Camerlynck, R., “Chemical analysis of plants and soils”. Laboratory of Analytical and Agrochemistry State University, Ghent. Belgium, (1982), 63p.
120. Rahmani, G.N.H., Sternberg, S.P.K., “Bioremoval of lead from water using *Lemna minor*”. *Bioresource Technology*, 70, (1999), 225-230.

121. Dirilgen, N., “Mercury and lead :Assessing the toxic effects on growth and metal accumulation by *Lemna minor*” *Ecotoxicology and Environmental Safety*,74, (2011), 48-54.
122. Eberius, M., “Observation parameters of the duckweed growth inhibition test:Fron number.Total frond area, dry weight.Lemna tec GmbH, Würselen,Germany,(2001), pp.1-2.
123. Aslan, M., Unlü, M.Y., Türkmen, N., Yilmaz, Y.Z., “Sorption of cadmium and effects on growth, protein content, and photosynthetic pigment composition of *Nasturtium officinale* R Br. And *Mentha aquatica* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71, (2003), 323-329.
124. Bajguz, A., Godlewska-Zyłkiewicz, B., “Protective role of 20-hydroxyecdysone against lead stress in *Chlorella vulgaris* cultures”. *Phytochemistry*, 65, (2004), 711–720.
125. Singh, S., Eapen, S., D’Souza, S.F., “Cadmium accumulation and its influence on lipidperoxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L”.*Chemosphere* 62, (2006), 233–246.
126. Piotrowska, A., Bajguz, A., Godlewska-Zyłkiewicz, B., Zambrzycka, E., “Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) exposed to Cadmium and Lead”. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58, (2010), 594–604.
127. Verma R.,Suthar S., “Lead and cadmium removal from water using duckweed-*Lemna gibba* L. :Impact of pH and initial metal load”. *Alexandria Engineering Journal*. 54, (2015), 1297-1304.
128. Garnczarska, M., Ratajczak, L., “Metabolic responses of *Lemna minor* to lead ions. I. Growth, chlorophyll level and activity of fermentative enzymes”. *Acta physiologiae Plantarum*, 22, (2000), 423-427.
129. Parlak, K.U., Yilmaz, D.D., “Ecophysiological tolerance of *Lemna gibba* L. exposed to cadmium”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 91, (2013), 79-85.

130. Yaowakhan, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Soonthornsarathool, V., "Removal of lead using some aquatic macrophytes". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75, (2005), 723-730.
131. Lu, X., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Homyok, K., "Removal of cadmium and zinc by water hyacinth, *Eichhornia crassipes*". *ScienceAsia*, 30, (2004), 93- 103.
132. Saygideğer, S., "Sorption of cadmium and their effects on growth, protein contents and photosynthetic pigment composition of *Veronica anagallis -aquatica L.* and *Ranunculus aquatilis L.*". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 65, (2000),459-464.
133. Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, B.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, (2006), 1027-1039.
134. John, R., Gadgil, K., Ahmad, P., Sharma, S., "Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza L.*". *Plant Soil and Environment*, 54(6), (2008), 262-270.
135. 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*)" *Plant. Physiology and Biochemistry*, 45, (2007), 62-69.
136. Mishra, V.K., Tripathi, B.D., "Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes". *Bioresource. Technology*, 99, (2008), 7091-7097.
137. Mohan, B.S., Hosetti, B.B., "Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds". *Environmental Pollution*, 98 (2), (1997), 233-238.
138. Alonso-castro, A.J., Carranza-Álvarez, C., "Removal and accumulation of cadmium and lead by *Typha Latifolia* exposed to single and mixed metal solutions". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57, (2009), 688- 696.

139. Saygideğer, S., Doğan, M., “Lead and cadmium accumulation and toxicity in the presence of EDTA in *Lemna minor* L. and *Ceratophyllum demersum* L”. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 73, (2004), 182- 189.
140. Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A., “Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance”. Environmental and Experimental Botany, 52, (2004), 199-223.
141. Fahr, M., Laplaze, L., Bendaou, N., Hocher, V., El Mzibri, M., Bogusz, D., “Effect of lead on root growth”. Frontiers in Plant Science. www. frontiersin.org. doi:10.3389/fpls.2013.00175. (2013)
142. Liu, J., Zhou, Q.X., Sun, T., Ma, L.Q., Wang, S., “Growth responses of three ornamental plants to Cd and Cd-Pb stress and their metal accumulation characteristics”. Journal of Hazardous Materials, 151, (2008), 261-267.
143. Horvat, T., Cifrek, Z.V., Oreščanin, ... ,Tkalec, M., Kozlina, B.P. “Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor*.L”. Science of the Total Environment, 384, (2007), 229-238.
144. Hillman, W.S., “The lemnaceae”. Botanical Review, 27, (1961), 221-287.
145. Prasad, M.N.V., Malec, P., Waloszek, A., Bojko, M., Strzal-ka, K., “Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation”. Plant Science, 161, (2001), 881-889.
146. Vachon, A., Campbell, P.G.C., “Potential of phytochelatins in aquatic plants as biochemical indicators of exposure to toxic metals –a field study (St. Lawrence River, Quebec), in: Proceedings of the 6 th International Conference on Heavy Metals in the environment, Toronto, New York, vol. 2, (1993), pp. 139- 156.
147. Varga, M., Horvatić, J., Čelić, A., (2013) “Short term exposure of *Lemna minor* and *Lemna gibba* to mercury, cadmium and chromium”. Central European Journal of Biology, 8 (11), 1083-1093.

148. Tangahu, B.V., Sheikh Abdullah, S.R., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M., “A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg). Uptake by plants through phytoremediation”. *International Journal of Chemical Engineering*, (2011), p.31.
149. Newete, S.W., Byrne, M.J., “The capacity of aquatic macrophytes for phytoremediation and their disposal with specific reference to water hyacinth”, *Environmental Science and Pollution Research*, 23, (2016), 10630-10643.
150. Sun, Y.B., Zhou, Q.X., Liu, W.T., An, J., Xu, Z.Q., Wang, L., “Joint effects of arsenic and cadmium on plant growth and metal bioaccumulation: A potential Cd-hyperaccumulator and As-excluder *Bidens pilosa* L.”. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 2009, 1023-1028.
151. Drost, W., Matzke, M., Backhaus, T., “Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure”. *Chemosphere* 67, (2007), 36-43.
152. Georgieva, V., Tasev, C., Sengalevitch, G., “Growth, yield, lead, zinc and cadmium content of radish, pea and pepper plants as influenced by level of single and multiple contamination of soil. III. Cadmium”. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 23, (1997), 12-23.
153. Mendoza-Còzalt, O.G., Rangel-González, E., Moreno-Sanchez, R., “Simultaneous Cd²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺. Uptake and accumulation by photosynthetic *Eulgena gracilis*”. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51, (2006), 521-528.
154. Suñe N., Sánchez G., Caffarati S., Maine M.A., “Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes”. *Environmental Pollution*, 154, (2007), 467-473.
155. Hall, J.L., “Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance”. *Journal of Experimental Botany*, 53, (2002), 1-11.
156. Gupta, M., Rai U.N., Tripathi, R.D., Chandra, P., “Lead induced changes in glutathione and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle”. *Chemosphere*, 30, (1995), 2011–2020.

157. Rai, U.N., Chandra, P., “Accumulation of copper, lead, manganese and iron by field of population *Hydrodictyon reticulatum* L., Science of the Total Environment, 116, (1992), 203–211.
158. Zayed, A., Gowthman, S., Terry, N., “Phytoaccumulation of trace elements by wetland Plants. I. Duckweed”. Journal of Environmental Quality, 27, (1998), 715-721.
159. Zhu, Y.L., Zayed, A.M, Qian, J.H., Souza, M., Terry, N.,”Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water hyacinth”. Journal of Environmental Quality, 28, (1999), 339-344.
160. Devi, M., Thomas, D.A., Barber, J.T., Fingerham, M., “Accumulation and physiological and biochemical effects of cadmium in a simple aquatic food chain”. Ecotoxicology and Environmental Safety, 33, (1996), 38-43.
161. Huebert, D.B., Chay, M., “The response of *Lemna trisulca* L. To cadmium”. Environmental Pollution, 80, (1993), 247-253.
162. Rai, U.N., Sinha, S., Triparthi, R.D., Chandra, P., “Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes : Removal of heavy metals”. Ecological Engineering, 5, (1995), 5-12.
163. Kamika I, Momba N.B., “Effect of nickel on nutrient removal by selected indigenous protozoan species in wastewater systems”. Saudi Journal of Biological Sciences, 22, (2015) 147-156.
164. Rychter, A.M., Rao, I.M., “Role of phosphorus in photosynthetic carbon metabolism”. In: Pessaraki, M. (ed), Handbook of Photosynthesis. Taylor & Francis Group, LLC, Tucson, (2005), 123-148.
165. Camargo J.A., Alonso A., “Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assessment”. Environment International, 32, 831–849.
166. Rabalais, N. N., Turner, R.E., Díaz, R.J., Justic D., “Global change and eutrophication of coastal waters. – ICES. Journal of marine Science, 66, (2009), 1528-1537.

167. Akpor, O.B., Momba, M.N., Okonkwo, J.O., “Protozoan biomass relation to nutrient and chemical oxygen demand removal activated sludge mixed liquor”. *Biotechnology Journal*, 3 (8), (2008), 1083–1087.
168. APHA, “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” twentieth. ed., American Public Health Association (APHA), Washington, DC.
169. Korner S., Vermaat, J.E., “The relative importance of *Lemna gibba* L. bacteria and algae for the nitrogen and phosphorus removal in duckweed covered domestic wastewater”. *Water Research*, 32, (1998), 3651-3661.
170. Vermaat, J.E., Hanif, K.M., “Performance of common duckweed species and the waterfern *Azolla filiculoides* on different types of wastewater”. *Water Research*, 32, (1998), 2569-2576.
171. EL-Kheir, W.A., Ismail, G., EL-Nour, F.A., Tawfik, T., Hammad, D., “Assessment of the efficiency of Duckweed (*Lemna gibba*) in wastewater treatment”. *International Journal of agriculture and Biology*, 5, (2007), 681-687.
172. Ozengin, N., Elmaci, A., “Performance of Duckweed (*Lemna minor*. L) on different types of waste water treatment”. *Journal of Environmental Biology*, 28 (2), 2007, 307-314.
173. Selvarani Juliet, A., Padmavathy, P., Srinivasan, A., Jawahar, P., “Performance of Duckweed (*Lemna minor*) on different types of wastewater treatment”. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, 2(4), (2015), 208-212.
174. Abdallah, M.A.M, “Phytoremediation of heavy metals from aqueous solutions by two aquatic macrophytes, *ceratophyllum demersum* and *Lemna gibba* L. *Environmental technology*, 33, (2012), 1609- 1614.
175. Jain, S.K., Vasudevan, P., Jha, N.K., “Removal of some heavy metals, from polluted water by aquatic plants: studies on duckweed and velvet”. *Biological Wastes*, 28, (1989), 115-126.
176. Sobrino, A.S., Miranda, M.G., Alvarez, C., Quiroz, A., Bioaccumulation and toxicity of lead (Pb) in *Lemna gibba* L., (duckweed). *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 45, (2010), 107-110.

177. Mégateli, S., “Etude de la toxicité de trois métaux lourds (cuivre, cadmium et zinc) et d’un fongicide (diméthomprphe) sur une plante aquatique : Perspective d’utilisation en phytoremédiation”. Thèse de doctorat, Université de Blida 1, 2010, 143p.

