

UNIVERSITÉ DE BLIDA 1

Faculté de Technologie

THESE DE DOCTORAT

En Chimie Industrielle

Spécialité : Génie des Procédés

ACTION DES ETMs SUR UNE PLANTE AQUATIQUE, *Lemna gibba* :

PHYSIOLOGIE ET PHYTOREMEDIATION

Par

Melle Soraya DEMIM

Devant le jury composé de Mesdames et Messieurs :

Mr	Abdelmalek	BADIS	Prof., U. Blida 1	Président
Mme	Zineb	SALEM HAMMOUDI	Prof., U.S.T.H.B.	Examinatrice
Mr	Rabeh	BOUARAB	Prof., E.N.P.	Examineur
Mr	Nadji	MOULAI MOSTEFA	Prof., Y.F.M.	Examineur
Mme	Saida	SEMSARI	Prof., U. Blida 1	Directrice de Thèse
Mr	Ali	AOUABED	Prof., U. Blida 1	Co-directeur de Thèse

Blida, 14 Juin 2014

ملخص

تصب كميات كبيرة من المعادن الثقيلة في المحيط المائي بسبب الأنشطة الصناعية والبشرية مما يتسبب في تسمم الحيوانات ، النباتات و الإنسان. يمكن لبعض النباتات أن تكون نافعة جدا حيث يمكن استخدامها كمؤشرات لعملية التسمم و كذلك من أجل إزالة هذه الملوثات.

تضمنت أعمالنا دراسة قدرات نبتة *Lemna gibba* من أجل إزالة المعادن الثقيلة الموجودة في خليط متكون من عناصر معدنية و تحديد التغيرات لبعض العوامل الفزيولوجية لهذا النبات. لقد أجريت التجارب في ظروف مراقبة مخبرية.

الجزء الأول: استعمل مخطط المساحة (RSM) لوصف الآثار الفردية و التفاعلية بين التركيز الأولي Cd^{2+} توحى و بين التركيز الأولي Ni^{2+} ، على مقاييس التسمم للنبتة المائية و على مدى انخفاض هذه المعادن . لقد مكن نموذج حسابي من الدرجة الثانية من جمع الإجابة بالمتغيرين مع الإشارة إلى تأثير كلا المتغيرين الإثنين و تفاعلاتهما. كما أظهر التحليل للتباين، الأهمية النسبية لهذه المتغيرات في إطار الأجوبة. من جهة أخرى، فقد تم إيجاد أيضا تلازم بين النتائج التجريبية وتلك المتوقعة.

الجزء الثاني: أجريت دراسة على المعالجة بواسطة *Lemna gibba* لكميات متزايدة من الكاديوم والنيكل بهدف تحليل الأجوبة الفزيولوجية و البيوكيماوية. إن نتائج تراكم كميات من السكر والأحماض الأمينية و البرولين بالنسبة للمؤشر، توحى بوجود آليات تكيف و ليونة تظهرها هذه النبتة. إن النظم الحركية لتخفيض الكاديوم والنيكل تتم على مرحلتين . إنها سريعة عند بداية المعالجة ثم تكون متبوعة بوتيرات بطيئة. إن هذه الكميات نسبية وهي عكسية تجاه تركيز الكاديوم والنيكل.

الجزء الثالث: أجري اختبار في وسط خالي من الكاديوم والنيكل ، على الآثار القابلة للانعكاس. لقد أظهرت النتائج وجود انخفاض في كمية السكر و الأحماض الأمينية و البرولين مبينة وجود آثار قابلة للانعكاس.

الكلمات المفتاحية : المعادن الثقيلة ، *Lemna gibba* ، دراسة التسمم الإيكولوجي ، المعالجة بواسطة النباتات.

ABSTRACT

Significant amounts of heavy metals are discharged in aquatic environment due to industrial and human activities. This retention in the environment exerts toxic effect on fauna, flora, and human. In this context, plants are interesting. Indeed, plants, which are directly confronted with the toxic compounds of the medium, could be not only used as biomarkers of toxicity, but also as a tool for pollutants removal.

The objective of this research was to investigate the effectiveness of *Lemna gibba* for the phytoremediation of mixed metals and to determine the changes in some of physiological parameters from this plant. The experiments were conducted under controlled conditions.

In the first part, the response surface methodology was used to describe the individual and interactive effects of initial Cd^{2+} concentration and initial Ni^{2+} concentration on the duckweed (growth parameters, photosynthetic pigment), in parallel their removal in the same conditions. A second-order quadratic model can approximate the mathematical relationship between responses and two significant independent variables, which shows the influence of each variable and their interactions. Analysis of variance showed the relative significance of process parameters in responses. High correlation was found between the experimental and predicted results, reflected by R^2 .

In second part, treatment of *Lemna gibba* with increasing cadmium-nickel concentration in the culture medium was investigate to measure physiological and biochemical responses. The results suggested that an adaptation and tolerance mechanisms with increased accumulation of sugar, amino acids and proline compared to the control and heavy metals removal efficiency was drastically reduced along with cadmium -nickel concentration increased. Kinetics of cadmium and nickel was biphasic; it was rapid during the first days and slow during the following.

In the third part, reversibility effects of heavy metals in plants was investigated to perform recovering experiments by following biochemical parameters in cadmium-nickel pre-stressed *lemna gibba* after cadmium-nickel had been removed from the nutrient solution. The results suggested a remedial of effects of heavy metals on the plants resulted in decrease on sugar, amino acids and proline.

Keywords: Heavy metals, *Lemna gibba*, Ecotoxicology, Phytoremediation

RESUME

Les éléments traces (ETMs) sont déversés dans l'environnement aquatique en raison des activités industrielles et humaines. Ces déversements ont un impact toxique sur la faune, la flore et l'homme. Certaines plantes aquatiques peuvent être très utiles en tant qu'indicateurs de toxicité mais également pour l'élimination de ces polluants.

Nos travaux ont consisté en l'étude des capacités de *Lemna gibba* à la phytoremédiation d'un mélange d'ETMs et à déterminer les changements de certains paramètres physiologiques. Les expériences ont été réalisées dans des conditions contrôlées.

Première partie : Le plan de surface a été utilisé pour décrire les effets individuels et interactifs entre la concentration initiale en cadmium et en nickel sur les paramètres écotoxicologiques de la lentille d'eau et sur les taux d'abattement de ces métaux. Un modèle mathématique de second degré a permis de mettre en relation les réponses et les deux variables, en indiquant l'influence de chacune des variables et de leurs interactions. Une analyse de la variance a montré l'importance relative de ces variables dans les réactions. Une forte corrélation a été également trouvée entre les résultats expérimentaux et prédits.

Deuxième partie : La culture à des concentrations croissantes en cadmium-nickel de *Lemna gibba* a été étudiée pour mesurer les réponses physiologiques et biochimiques. Les résultats de l'accumulation des sucres, des acides aminés et de la proline par rapport au témoin indiquent des mécanismes d'adaptation et de tolérance par la plante. Les cinétiques d'abattement des éléments traces sont biphasiques, elles sont rapides en début de traitement suivies de ralentissements. Ces taux sont inversement proportionnels à la concentration cadmium-nickel.

Troisième partie : Les effets réversibles des éléments traces sur *lemna gibba*, après mise en culture de la plante pré-stressée dans un milieu ne contenant pas de cadmium et de nickel, ont été analysés. Les résultats ont montré une réduction de la concentration des sucres, des acides aminés et de la proline indiquant les effets réversibles des éléments traces.

Mots-clés : métaux lourds, *Lemna gibba*, écotoxicologie, phytoremédiation

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce travail de thèse a été possible grâce au soutien de nombreuses personnes. Que chacune trouve dans les premières phrases de cette thèse l'expression de ma profonde reconnaissance et que le Seigneur leur donne longue vie et santé.

Tout d'abord, je tiens à remercier mes deux directeurs de thèse, Madame le Pr. S. Semsari, et Monsieur le Pr. A. Aouabed de m'avoir fait confiance sur ce projet et de m'avoir laissée cette autonomie de travail. Au cours de ces quelques années passées à leur côté ils m'ont inculqué rigueur, méthode et persévérance.

Je remercie vivement les membres du jury, Monsieur A. Badis (Professeur à l'Université de Blida 1), Madame Z. Salem Hammoudi (Professeur à l'Université des Sciences et Technologie Houari Boumediene), Monsieur R. Bouarab (Professeur à l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger) et Monsieur N. Moulai Mostefa (Professeur à l'université Yahia Fares de Médéa) de l'honneur qu'ils me font en acceptant d'évaluer ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Hussein Khellaf de m'avoir ouvert les portes du laboratoire de génie chimique durant ses années de thèse.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur le Dr Nadjib Derouiche du Centre de Recherche en Technologie des Semi-conducteurs pour l'Energétique (CDER) d'Alger.

J'exprime mes vifs remerciements à :

Madame Ouarda Dendene-Badache, Monsieur Tahar Benayad et toute son équipe du laboratoire de la police scientifique d'Alger.

Monsieur Ahmed Mechtaoui de la société Algérienne des eaux et toute son équipe.

Madame Fatima Zibouche et Monsieur Naser Eddine Djillali de l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes.

Madame Amel Benhadji de l'université des Sciences et Technologies Houari Boumediene.

Madame Taoues Lakki de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (Alger).

Monsieur Abdel Kader Hadj Sadok et Monsieur Slim Ouzene de l'Université de Blida 1.

Madame Hassiba Laribi de l'Université de Blida 1.

Monsieur Smail Mégatli de l'Université de Blida 1.

Mademoiselle Rachida Imessaoudene, Monsieur Tahar Moussi, Mr Rachid Dahmouche de l'Université de Blida 1.

Mes remerciements sont adressés plus particulièrement à mes parents, mes frères et mon oncle qui ont su me soutenir, m'encourager, m'aider et me supporter tout au long de ces longues années d'études.

Enfin, je remercie tous ceux et celles qui ont agi dans l'ombre et participé discrètement à l'accomplissement de cette thèse.

TABLE DES MATIERES

Résumé	
Remerciements	
Table des matières	
Liste des figures	10
Liste des tableaux	12
Liste des abréviations	13
Liste des symboles chimiques	15
INTRODUCTION GENERALE	16
CHAPITRE 1	
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	18
1.1. Introduction	18
1.2. Origines des éléments traces	19
1.3. Propriété biologiques des ETMs	20
1.4. Biodisponibilités et spéciation des éléments traces dans les systèmes aquatiques	21
1.4.1. Biodisponibilité	21
1.4.2. Spéciation	22
1.5. Impact des éléments traces sur l'environnement aquatique	23
1.6. Prise en charge des ETMs par les plantes aquatiques	23
1.7. Effets du stress métallique sur les plantes aquatiques	26

1.7.1. Toxicité	26
1.7.2. Tolérance	26
1.7.2.1. Système anti-oxydatif	26
1.7.2.2. Autres mécanismes de tolérance	28
1.8. Phytoremédiation	30
1.8.1. Définition	31
1.8.2. Différents mécanismes de phytoremédiation	31
1.8.3. Potentiel épuratoire des macrophytes aquatiques	32
1.8.3.1. Macrophytes	32
1.8.3.1.1. Lentilles d'eaux	33
1.8.3.1.2. <i>Lemna gibba</i>	34
1.8.3.2. Intérêts des macrophytes	34
1.8.4. Avantages et inconvénients de la phytoremediation	35
1.9. Présentation des ETMs étudiés	35
1.9.1. Cadmium	35
1.9.1.1. Propriétés	35
1.9.1.2. Rôle biologique et toxicité	37
1.9.2. Nickel	38
1.9.2.1. Propriétés	38
1.9.2.2. Rôle biologique et toxicité	38
CHAPITRE 2	
EFFET DU MELANGE CADMIUM-NICKEL SUR <i>L.gibba</i> :	
ECOTOXICOLOGIE ET POUVOIR D'ELIMINATION	40
2.1. Introduction	40
2.2. Matériel et méthodes	42
2.2.1. Matériel végétal	42

2.2.2. Contamination aux ETMs	42
2.2.3. Plan d'expérience	43
2.2.4. Paramètres de croissance	45
2.2.5. Extraction et dosage des pigments photosynthétiques	46
2.6. Dosage des ETMs dans le milieu de culture	46
2.3. Résultats	47
2.3.1. Paramètres de croissance	47
2.3.2. Pigments photosynthétiques	54
2.3.3. Elimination des ETMs	61
2.4. Discussion et conclusion	66
2.4.1. Paramètres écotoxicologiques	66
2.4.2. Réduction des ETMs	70
CHAPITRE 3	
COMPORTEMENT DE <i>L.gibba</i> AU CADMIUM-NICKEL	73
3.1. Introduction	73
3.2. Matériel et méthodes	74
3.2.1. Matériel végétal	74
3.2.2. Développement des expériences	75
3.2.2.1. Contaminations aux ETMs	75
3.2.2.2. Réversibilité des effets du stress métallique sur <i>L.gibba</i>	75
3.2.3. Analyse biochimique	75
3.2.3.1. Extraction et dosage des sucres totaux solubles	76
3.2.3.2. Extraction et dosage des acides aminés	76
3.2.3.3. Extraction et dosage de la proline	77
3.2.4. Dosage des ETMs	77
3.2.5. Analyse statistique des résultats	77

3.3. Résultats	77
3.3.1. Effets du cadmium-nickel sur <i>L.gibba</i>	78
3.3.1.1. Effet sur le taux de sucre	78
3.3.1.2. Effet sur le taux des acides aminés	81
3.3.1.3. Effet sur le taux de proline	85
3.3.1.4. Effet sur l'élimination des ETMs du milieu	89
3.3.2. Effets réversibles du mélange cadmium-nickel sur <i>L.gibba</i> ?	93
3.3.2.1. Effet sur le taux de sucre	93
3.3.2.2. Effet sur la concentration des acides aminés	96
3.3.2.3. Effet sur la teneur en proline	98
3.3.2.4. Effet sur la teneur en ETMs dans le milieu de culture	101
3.4. Discussion et conclusion	101
3.4.1. Effets du cadmium-nickel sur <i>L.gibba</i>	101
3.4.1.1. Paramètres biochimiques	101
3.4.1.2. Réduction des ETMs	106
4.2. Effet réversible du mélange cadmium-nickel sur <i>L.gibba</i>	108
CONCLUSION GENERALE	111
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	116
APPENDICES	137

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Prise en charge des métaux par des organismes aquatiques - mécanismes généraux	25
Figure 1.2	Enzymes impliquées dans la défense oxydative	27
Figure 1.3	Transport d'éléments traces dans la cellule (exemple du cadmium et du zinc)	29
Figure 2.1	Réponses observées en fonction des réponses prédites (a) TCR et (b) MF/MS.	52
Figure 2.2	Surface des réponses TCR (a) et MF/MS (b) en fonction de X_1 et X_2	53
Figure 2.3	Réponses observées en fonction des réponses prédites (a) C_{chl_a} , (b) C_{chl_b} et (c) C_{car}	59
Figure 2.4	Surface des réponses C_{chl_a} (a), C_{chl_b} (b) et C_{car} (c) en fonction de X_1 et X_2	60
Figure 2.5	Réponses observées en fonction des réponses prédites (a) $R_{Cd^{2+}}$ et (b) $R_{Ni^{2+}}$	65
Figure 2.6	Surface des réponses pour Cd^{2+} (a) et $R_{Ni^{2+}}$ (b) en fonction de X_1 et X_2	66
Figure 3.1	Evolution de la teneur en sucre en fonction du temps	79
Figure 3.2	Concentration des sucres solubles en fonction des traitements appliqués.	81
Figure 3.4	Evolution de la concentration des acides aminés en fonction du temps.	83
Figure 3.5	Concentration en acides aminés en fonction des traitements appliqués.	84
Figure 3.6	Evolution des teneurs en proline en fonction du temps	86

Figure 3.7	Concentration de la proline en fonction des traitements appliqués.	88
Figure 3.8	Evolution des taux d'abattement cadmium et nickel en fonction du temps.	90
Figure 3.9	Evolution des taux d'abattement en fonction des traitements appliqués.	93
Figure 3.10	Concentration des sucres en fonction du temps	95
Figure 3.11	Concentration des acides aminés en fonction du temps	97
Figure 3.12	Concentration de la proline en fonction du temps	100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Spéciation chimique des métaux	22
Tableau 2.1	Facteurs étudiés et niveaux de variation en unité centrée réduite et en unité réelle.	44
Tableau 2.2	Construction d'un plan composite centré réduit pour deux facteurs	44
Tableau 2.3	Réponses des essais TCR et MF/MS	47
Tableau 2.4	Effets principaux et interaction sur les réponses : TCR et MF/MS	48
Tableau 2.5	Analyse ANOVA pour les réponses : TCR et MF/MS	50
Tableau 2.6	Réponses des essais C_{chl-a} , C_{chl-b} et C_{car}	54
Tableau 2.7	Effets principaux et interaction sur les réponses : C_{chl-a} , C_{chl-b} et C_{car}	55
Tableau 2.8	Analyse ANOVA pour les réponses : C_{chl-a} , C_{chl-b} et C_{car}	57
Tableau 2.9	Réponses des essais $R_{Cd^{2+}}$ et $R_{Ni^{2+}}$	61
Tableau 2.10	Effets principaux et interaction sur les réponses : $R_{Cd^{2+}}$ et $R_{Ni^{2+}}$	62
Tableau 2.11	Analyse ANOVA pour les réponses : $R_{Cd^{2+}}$ et $R_{Ni^{2+}}$	63
Tableau 3.1	Concentrations cadmium et nickel dans le milieu de culture.	75

LISTE DES ABREVIATIONS

A	Site de liaison membranaire (cas du transport facilité du complexe anionique)
A'	Densité optique
ADN	Acide désoxyribonucléique
As	Arsenic
Asc	Acide ascorbique
AO	Acide organique
CAT	Catalase
CCD	Plan composite centré réduit
Cchl _a	Concentration en chlorophylle a
Cchl _b	Concentration en chlorophylle b
Ccar	Concentration en caroténoïdes
Coef.	Coefficient de régression
ddl	Degré de liberté
EDTA	Ethylènediamine tétra-acétate
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
ETMs	Eléments traces métalliques
F	Coefficient de Fisher
g	Gravité
GABA	Acide gamma-amino butyrique
Glc	Glucose
Gln	Glutamine
Glu	Acide glutamique
GPx	Peroxydase
GRd	Glutathion réductase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion sous forme oxydé

j	Jour
Leu	Leucine
M	Métal
ML_n^0	Complexe métallique neutre
MC	Moyenne des carrés
MF	Masse fraîche
MS	Masse sèche
MTs	Métallothionéines
M^{z+}	Ion métallique libre
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH	Dihyronicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF	Nombre de frondes
NTA	Nitrilotriacétate
O_2^-	Radical peroxyde
OH^{\cdot}	Radical Hydroxyle
P	Probabilité
PCs	Phytochélatines
R^2	Coefficient de corrélation
R^2_{aj}	Coefficient de corrélation ajusté
$R_{Cd^{2+}}$	Taux d'élimination du cadmium
$R_{Ni^{2+}}$	Taux d'élimination du nickel
RSM	Plan de surface de réponse
SAA	Spectroscopie d'absorption atomique
SE. Coef	Erreur standard de coefficient
SOD	Superoxyde dismutase
SS	Somme des carrés
TCR	Taux de croissance relative
X	Site de liaison membranaire (cas du transport facilité du cation)
Z	Anion

LISTE DES SYMBOLES CHIMIQUES

Ca	Calcium
Cd	Cadmium
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
Ge	Germanium
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
Hg	Mercure
HgCl ₂ ⁰	Chlorure de mercure
Ni	Nickel
Pb	Plomb
Sb	Antimoine
Se	Sélénium
Si	Silicium
Te	Tellure
U	Uranium
Zn	Zinc

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La contamination des eaux de surface et profondes par les éléments traces métalliques (ETMs) constitue un problème environnemental majeur à l'échelle de la planète. Bien que les éléments traces métalliques soient présents à l'état naturel dans les eaux par des événements géochimiques naturels, l'homme avec ses activités est responsable de la libération et de la dispersion d'une importante quantité de ces éléments par les industries, les eaux usées, les engrais et les pesticides. Le milieu aquatique d'eau douce constitue le premier réceptacle de ces rejets.

Les ETMs sont des micropolluants de nature à entraîner des nuisances même quand ils sont rejetés à faibles concentrations ($\mu\text{g/l}$), ces dernières sont souvent compensées par un effet volume compte tenu de l'importance des débits des eaux rejetées. La rémanence et la bioaccumulation des ETMs dans les organismes aquatiques posent un sérieux problème écologique [1]. En effet, les ETMs se concentrent au fur et à mesure le long de la chaîne trophique par le phénomène de bioaccumulation et de biomagnification [2], d'où des conséquences néfastes sur l'environnement et la santé humaine.

Suite à ces constats, pour protéger l'environnement et l'homme en particulier, des règlements et des législations au plan national et international sont mis en place. Sur le plan national, la législation Algérienne a légiféré dans ce cadre. Les décrets exécutifs n° 06-141 du 19 avril 2006 [3] et n°09-209 du 11 juin 2009 [4] ont fixé des normes aux rejets industriels contenant divers polluants y compris les ETMs. Et selon l'arrêté interministériel du 22 janvier 2006 [5] et les décrets n°11-125 du 22 mars 2011 [6] et n° 11-219 du 12 juin 2011 [7] des valeurs seuils de polluants métalliques dans les eaux de consommation ont été imposées.

Dans ce contexte de préservation des ressources naturelles et de la protection de l'homme que s'inscrit notre étude. L'objectif majeur est la dépollution des eaux

contaminées par des ETMs par un procédé écologique : la phytoremédiation. La phytoremédiation est définie par l'utilisation des capacités naturelles des plantes à absorber les contaminants, organiques ou minéraux, présents dans leurs milieux de développement et de les immobiliser, les accumuler voir les transformer. Cette technique est considérée comme prometteuse pour traiter de grandes surfaces et de grands volumes d'eau contaminée.

Le travail expérimental réalisé a été consacré à l'estimation d'une part du pouvoir de phytoremédiation d'une espèce autochtone, *Lemna gibba*, vis-à-vis d'un mélange binaire cadmium-nickel et d'autre part à l'estimation de l'impact de ce mélange sur la physiologie et la biochimie de cette dernière.

Le premier volet traitera d'une façon globale des effets du mélange binaire cadmium-nickel sur les paramètres écotoxicologiques de *L. gibba*, principalement les paramètres de croissance et de la concentration des pigments photosynthétiques, et de son pouvoir à réduire ces métaux contenus dans le milieu de culture.

Le deuxième volet comporte deux parties distinctes et complémentaires. La première partie sera consacrée à l'évaluation de certains paramètres biochimiques (sucres, acides aminés et proline) de la plante en réponse à la présence de cadmium-nickel dans le milieu de culture et à la cinétique d'élimination de ces éléments. La deuxième partie sera consacrée à l'estimation de la réversibilité probable des effets des ETMs sur les plantes pré-stressées et remises en culture dans un milieu normal ne contenant pas de cadmium-nickel par la détermination de ces mêmes réponses biochimiques et par la détermination de la concentration de cadmium-nickel dans les milieux de culture renouvelés.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1. Introduction

La dénomination “éléments traces métalliques (ETMs)” ou simplement “élément-trace” est souvent confondue à celle de métal lourd, de micropolluant métallique ou encore d’oligo-élément [8].

Le terme de micropolluant métallique implique trois notions : élément à caractère métallique, élément polluant (accumulation au-delà d’un certain seuil dans le milieu revêt un danger pour les organismes) et enfin élément-trace.

D’un point de vue chimique, les métaux sont des éléments de la classification périodique formant des précipités insolubles avec les sulfures. Ils sont caractérisés par l’existence d’un réseau métallique à l’état solide et par une tendance à s’oxyder. Ils sont au nombre de 68 éléments naturels. Sous leurs formes élémentaires pures, ils présentent les caractéristiques physiques communes suivantes : bonne conductivité électrique et thermique, haute densité, malléabilité et ductilité [8]. D’autres éléments dits métalloïdes, Si, Ge, As, Se, Sb et Te, sont assimilés aux métaux pour leurs caractères métalliques partiels [9].

D’un point de vue physique, le terme métaux lourds désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou métalloïdes, caractérisés par une masse volumique supérieure à 6 g.cm^{-3} (parfois la définition donne une limite de 4,5 ou $5,0 \text{ g.cm}^{-3}$) [10].

Ces éléments sont présents naturellement dans la croûte terrestre et dans tous les organismes vivants à des concentrations très faibles et variables selon les milieux et les organismes. Lorsque leur teneur est inférieure à un pour mille en moyenne dans la croûte terrestre ce sont des éléments traces de la croûte. Lorsque leur concentration est inférieure à 0,1 pour mille dans les êtres vivants, certains auteurs donnant une limite de 1 % dans les plantes, ils sont qualifiés d’éléments-traces des êtres vivants. De ce fait, ils sont désignés par le terme « éléments traces métalliques » [11].

Les oligo-éléments sont des éléments-traces indispensables aux êtres vivants. Ils sont carencés si la concentration de ces éléments dans leurs tissus est inférieure à un seuil. Les oligo-éléments ne sont pas les mêmes pour les animaux et pour les plantes [8].

1.2. Origines des éléments traces

On distingue généralement deux origines aux éléments-traces ; une origine naturelle et une origine anthropique.

a. Origines naturelles

On identifie plusieurs sources naturelles de métaux dans un cycle géochimique naturel non perturbé : l'altération naturelle des roches présentes à la surface terrestre, les émanations volcaniques et les fentes sous-marines hydrothermales [12, 13].

b. Origines anthropiques

Les principales sources des pollutions anthropiques de ces métaux sont les activités industrielles, minières, agricoles et urbaines mais aussi les quantités croissantes de déchets domestiques [13 - 16].

– Activités industrielles

Les activités industrielles sont une source variée de pollution métallique, telles : industries de traitement de surface (Cd, Zn, Ni, Cr), les produits industriels en fin de vie (déchets), les effluents de garage, teintureries, lavage de voitures ...

– Activités agricoles

De nombreux fertilisants organiques et minéraux employés en agriculture contiennent des métaux, par exemple :

Les fumiers contiennent du Zn et du Cu ;

Les boues urbaines issues du traitement des eaux usées épandues sur les terres agricoles comme fertilisant contiennent du Zn, du Pb, du Cu, du Cr et du Cd ;

Les engrais à base de chaux peuvent être riches en Pb, et dans une moindre mesure en Zn, Cu et Cd ;

Les engrais phosphatés contiennent également du Zn, Cu et Cd ;

Les pesticides et certains fongicides sont également riches en métaux tels que le Cu, l'As, le Hg, le Pb et le Zn ;

- Activités urbaines et domestiques

Les activités domestiques et urbaines sont aussi des sources de contamination en ETMs dont les modes de dispersion sont variés : fumées, égouts, voiture...

Les fumées de combustibles fossiles ;

Les combustions d'huiles, de papiers, de déchets organiques urbains (incinération d'ordures ménagères), les décharges et les émissions automobiles ;

Les particules résultant de l'usure des pneus et des freins sont aussi une source d'accroissement des teneurs en Cu, Pb, Zn, Cr, Ni ou Cd dans l'environnement ;

Les eaux de ruissellement urbaines (voiries/parking) ainsi que les rejets d'eaux usées (effluents domestiques (excréments...), produits cosmétiques, produits médicaux et de nettoyage...) jouent un rôle dans les flux de pollution arrivant dans les canaux car elles sont chargées en polluants tels le Cd, le Zn et le Cu.

1.3. Propriétés biologiques des ETMs

Parmi les ETMs, on distingue les éléments métalliques dits « essentiels » des éléments dits « non essentiels ».

Les éléments métalliques essentiels sont des oligoéléments (ex. Zn, Mn, Cu). Ils jouent un rôle prépondérant dans les fonctions physiologiques de la faune et la flore. Ils sont nécessaires au développement des organismes vivants. Ce caractère essentiel est lié à leurs rôles de cofacteurs et de biocatalyseurs (catalyseurs enzymatiques) dans un grand nombre de molécules biologiques. La bioaccumulation des métaux essentiels est donc un processus naturel, exigé par tous les organismes vivants afin de satisfaire à leurs besoins métaboliques ; ils sont indispensables à faibles concentrations mais sont toxiques à fortes concentrations [17].

Les éléments non essentiels (ex. Cd, Pb, Hg), sont des éléments pour lesquels aucune fonction physiologique n'a été identifiée à ce jour. Ils sont toxiques à de très faibles concentrations [17]. Ils sont qualifiés de contaminants stricts [8]. Ces éléments créent un stress oxydant dans les cellules où ils s'accumulent, entraînant un dysfonctionnement des organes (inhibition de croissance, atteintes au cycle de reproduction, motilité réduite) et parfois la mort de l'organisme [12]. Certains de ces éléments toxiques sont assimilés à la place des éléments essentiels par analogie et sont ainsi intégrés dans des cycles biologiques (ex. Cd/Zn) [18].

L'exposition aiguë des organismes vivants à une dose élevée d'élément-trace (qu'il soit oligo-élément ou contaminant strict) ou l'exposition chronique par l'accumulation dans les tissus entraînent des effets de toxicité. Le passage de la fonction d'oligo-élément à celle d'élément toxique dépend de la nature, de la teneur et de la disponibilité de l'élément et du milieu considéré [8].

1.4. Biodisponibilité et spéciation des éléments-traces dans les systèmes aquatiques

Les apports et les flux de plusieurs métaux traces dans les écosystèmes aquatiques ont fortement augmenté notamment à cause de l'expansion des activités anthropiques [19, 20]. A partir de leurs points d'émission, les ETMs vont emprunter différentes voies de dispersion pour se retrouver dans le milieu aquatique. Les cheminements pris par les ETMs dépendent de leur mode d'introduction (rejets directs dans les rivières, dans l'atmosphère ou sur le sol) ainsi que de leur forme physique (solide, liquide ou gazeuse) [21].

1.4.1. Biodisponibilité

La biodisponibilité métallique est un concept qui résume l'aptitude d'un métal à être transféré du milieu aquatique vers le compartiment interne des organismes [22]. Ce transfert s'effectue essentiellement par absorption. La biodisponibilité est corrélée essentiellement au métal et à l'organisme vivant considéré. Le métal est dit bioaccessible s'il est sous une forme environnementale disponible (spéciation, dissolution) pour être en contact avec l'organisme et s'absorber sur la paroi biologique. Il est ensuite dit biodisponible à partir du moment où il est absorbé,

bioaccumulé, bioconcentré par l'organisme avec la possibilité d'être distribué, métabolisé, éliminé, accumulé, détoxifié et actif envers les sites d'action toxique [23].

1.4.2. Spéciation

La spéciation d'un métal définit sa répartition parmi différentes formes physiques ou chimiques [24]. La « spéciation physique » d'un métal fait appel à sa distribution entre des formes particulaires (>200 nm), colloïdales (10–200 nm) ou dissoutes (< 10 nm), alors que la « spéciation chimique » d'un élément renvoie surtout à son implication dans la formation de divers complexes de coordination (Tableau 1.1) [12].

Tableau 1.1 : Spéciation chimique des métaux [12].

Forme	Exemples
Ion métallique libre	$\text{Al}^{3+}(\text{H}_2\text{O})_6$ $\text{Cu}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_6$
Hydroxo-complexes	AlOH^{2+} , $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, $\text{Al}(\text{OH})_4^-$, FeOH^{2+} , $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$, $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$, $\text{Cu}(\text{OH})_2^0$
Complexes simples inorganiques	AlF^{2+} , AlF_2^+ CdCl^+ , CdCl_2^0 , CdCl_3^- HgCl_2^0 , HgOHCl^0 CuCO_3^0 CdSO_4
Complexes simples organiques	
- Synthétiques	Cu-EDTA^{2-} Cd-NTA^-
- Naturels	Cd-alanine Cd-citrate
Complexes polymères organiques	$\text{Al, Fe, Cu, Pb ou Hg - acide fulvique ou humique}$

Les transformations entre ces différentes espèces métalliques impliquent des réactions de complexation (formation de liaisons faibles) ou des réactions d'oxydation/réduction, ces réactions sont réversibles. Cette spéciation est largement déterminée par la chimie du milieu (ex. : pH, dureté, salinité, concentration en matière organique dissoute) dans lequel le métal se trouve et à son affinité aux ligands disponibles plutôt qu'à sa forme initiale rejetée dans le milieu récepteur [12, 25].

1.5. Impact des éléments traces sur l'environnement aquatique

Comparés aux polluants organiques, les ETMs ne peuvent être dégradés par des processus chimiques ou biologiques dans les milieux aquatiques [19, 20, 26] mais s'accumulent dans les organismes aquacoles [20, 27].

Au-delà de l'observation des effets des ETMs à l'échelle individuelle, l'accumulation des ETMs dans l'environnement aquatique amène à la perturbation du fonctionnement des écosystèmes naturels (populations et communautés). En effet, il arrive parfois que les effets des métaux soient indirects, c'est-à-dire transmis via la chaîne trophique. La contamination par les métaux peut perturber les réseaux trophiques en modifiant la diversité taxonomique, la structure et la taille des communautés [25]. La concentration des ETMs se trouve augmentée au fur et à mesure des absorptions dans la chaîne alimentaire par la coexistence de deux phénomènes, la bioaccumulation et la biomagnification. Le polluant présent dans les algues, les végétaux et les microorganismes est ingéré par un herbivore, lui-même proie pour un carnivore, lui-même proie d'un super carnivore (animal ou homme). En bout de chaîne, on se trouve donc avec un consommateur final ayant bioaccumulé différentes formes solubles de ces métaux [28].

1.6. Translocation des ETMs dans les plantes aquatiques

Quatre étapes sont observées lors de l'interaction entre les ETMs et les organismes vivants, en l'occurrence les plantes aquatiques [12] :

- Advection ou diffusion du métal (et de ses complexes) de la solution vers la surface biologique ;

- Diffusion du métal au travers de la couche protectrice externe ;
- Complexation du métal à des sites physiologiques dans la couche protectrice ;
- Internalisation du métal : la réponse biologique globale comprendra la bioaccumulation du métal (sorption, internalisation) ainsi que les effets induits par le métal bioaccumulé sur des processus variés (photosynthèse, respiration, croissance, etc...).

En s'approchant de la surface du végétal, le métal rencontrera une couche protectrice composée de polysaccharides. Les macromolécules présentes dans cette couche renferment une variété de groupements fonctionnels, dominés par l'oxygène comme atome donneur (groupements $-C(O)OH$, $-P(O)OH$ ou $-C(OH)$). Plusieurs de ces groupements fonctionnels peuvent se dissocier, générant une matrice de sites chargés négativement. Le passage du métal à travers ces sites pour atteindre la barrière membranaire est possible.

Le métal rencontrera une grande diversité des sites potentiels de liaisons dans la membrane, lesquels se divisent en deux classes distinctes :

- Des sites physiologiquement inertes où le métal peut se lier sans perturber les fonctions cellulaires normales.
- Des sites physiologiquement actifs où en se liant, le métal affecte le métabolisme de la cellule. La liaison du métal peut affecter soit le métabolisme cellulaire directement dans le cas où le site de liaison correspond à un enzyme clé intégré à la membrane cellulaire. Soit indirectement si le site de liaison correspond plutôt à un site de transport des métaux vers l'intérieur de la cellule.

Il est important de souligner la nature hydrophile des espèces métalliques. Cette propriété contraste avec le caractère lipophile des barrières biologiques que devront franchir les espèces métalliques. À quelques exceptions près (exemple $HgCl_2^0$), les métaux cationiques et leurs complexes ne pourront traverser les membranes biologiques par simple diffusion. La prise en charge des métaux fera appel au transport facilité impliquant des transporteurs protéiques intégrés dans la membrane. Trois mécanismes de prise en charge par la membrane ont été identifiés (Figure 1.1) [12, 25] :

- (i) transport passif : simple diffusion d'un complexe métallique neutre (ML_n^0) et lipophile à travers la bicouche-lipidique (ex. : $HgCl_2^0$) ;
- (ii) transport facilité du cation (M^{Z+}) : implique un transporteur transmembranaire protéique ou un canal transmembranaire ;
- (iii) transport facilité d'un complexe métallique anionique ($M^{Z+}-Z$) : implique un transporteur d'anions relativement peu sélectif, c'est le transport accidentel de l'anion avec le métal qui est associé.

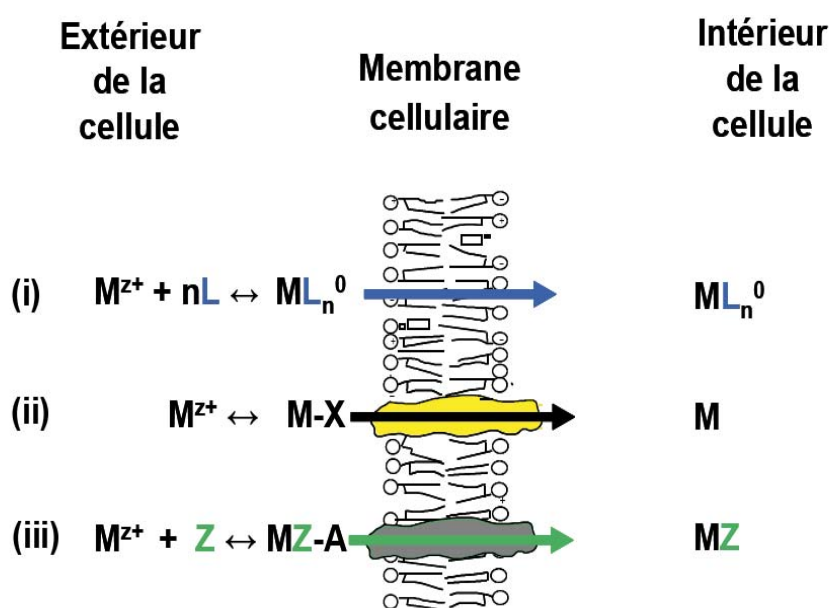


Figure 1.1 : Prise en charge des métaux par des organismes aquatiques - mécanismes généraux [25].

Généralement, la voie ii prédomine aussi bien pour les métaux essentiels (pour lesquels il existe des systèmes de transport conçus pour assurer/contrôler la prise en charge de ces oligo-éléments nutritifs essentiels) que pour les métaux non essentiels comme le Cd ou le Pb. Ces derniers réussissent à « tromper » les systèmes de transport cationique présents à l'interface membranaire [12].

Une fois le cytosol atteint, le métal peut réagir avec une grande diversité de sites de complexation intracellulaires avec diverses conséquences métaboliques [12].

1.7. Effets du stress métallique sur les plantes aquatiques

1.7.1. Toxicité

La toxicité des ETMs sur les plantes aquatiques est observée à plusieurs niveaux : morphologiques, physiologiques et biochimiques [27, 29]. Le premier effet observable est une inhibition de la croissance s'accompagnant souvent de nombreux autres indices de dysfonctionnement tels : chlorose foliaire, importantes lésions nécrotiques, jaunissement progressif, ... [19, 30, 31].

L'inhibition de la croissance des plantes par les ETMs peut être la conséquence de plusieurs faits :

- Perturbation de l'activité de certaines enzymes intervenant dans des processus physiologiques essentiels au développement : la photosynthèse et la respiration [30 – 35].
- Induction d'un stress oxydatif par la formation exagérée d'espèces oxygénées réactives (ERO) telles : les radicaux peroxydes (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles (OH^\cdot) [36]. Ces ERO endommagent les composés cellulaires (protéines, lipides, acides nucléiques) conduisant à des altérations des structures cellulaires, à la mutagenèse et à la mort cellulaire [12, 37 – 39]. Les ERO perturbent aussi le transport des électrons dans les mitochondries et les chloroplastes [38].
- Restriction de la nutrition minérale et modification du statut hydrique [40, 41].

1.7.2. Tolérance

Pour réduire le stress métallique, les plantes aquatiques ont développé plusieurs mécanismes de défense.

1.7.2.1. Système anti-oxydatif

Pour se protéger des effets délétères des ERO, produits en excès par la présence des ETMs, les végétaux ont développé des systèmes de défense contre

les atteintes des radicaux libres. Ces mécanismes font appel à des molécules enzymatiques et/ou à des molécules non enzymatiques.

a. Molécules anti-oxydantes enzymatiques

Trois types d'enzymes antioxydants sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène, il s'agit des superoxydes dismutases, des catalases et des peroxydases [12, 37, 38]. Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l'anion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (Figure 1.2).

Les **superoxydes dismutases** (SOD) métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène moins réactif.

Les **catalases** (CAT) agissent en synergie avec les SOD puisque leur rôle est de catalyser la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

Les **peroxydases** (GPx) permettent comme les catalases la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Cependant à la différence des catalases, les GPx nécessitent la présence d'un substrat particulier pour réaliser leurs activités, il s'agit de l'acide ascorbique (Asc) et du glutathion (GSH).

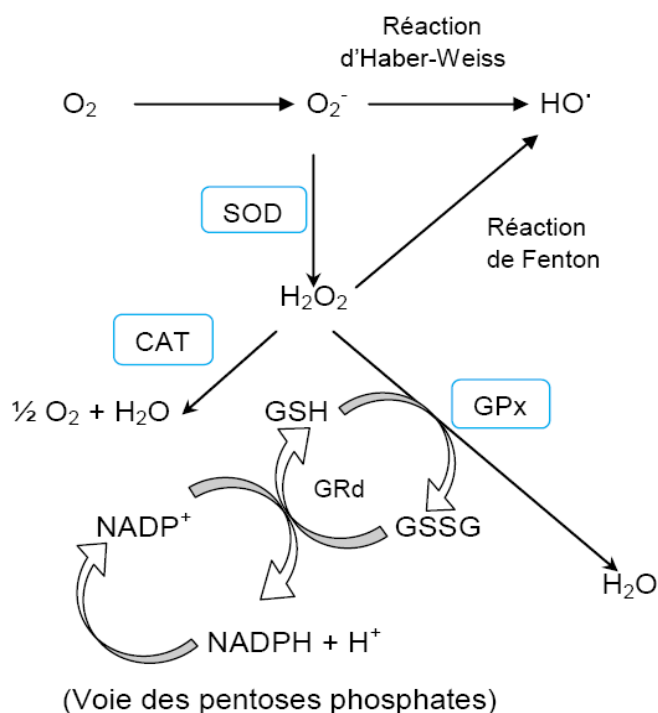


Figure 1.2 : Enzymes impliquées dans la défense oxydative [12].

b. Molécules anti-oxydantes non enzymatiques

Divers molécules non enzymatiques ont été décrites dans la littérature pour leurs rôles dans la défense anti-oxydante. Ses antioxydants non enzymatiques agissent comme réducteurs ou capteurs de radicaux. Ils renforcent l'action des enzymes décrites précédemment (SOD, CAT et GPx). Parmi les composants non enzymatiques impliqués dans l'élimination des ERO figurent :

- Les réducteurs à fonction thiol libre : ils jouent un rôle très important, tel le glutathion (GSH). Ce dernier est présent majoritairement à l'état réduit dans les cellules. Une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un stress oxydatif. Le GSH agit comme donneur d'électrons permettant d'éliminer les espèces réactives comme OH• mais surtout comme substrat des glutathion-peroxydases pour la réduction des peroxydes [12, 37].
- Les vitamines D et E : ils participent également à l'élimination des espèces réactives de l'oxygène à différents niveaux [12].
- Les pigments caroténoïdes, les acides aminés (cystéines et proline), les polyphénols et certains flavonoïdes (anthocyanines) [37, 38, 42, 43].

1.7.2.2. Autres mécanismes de tolérance

D'autres systèmes peuvent être mis en œuvre par la plante pour faire face à ce stress métallique, tels la chélation et la séquestration.

a. Chélation et complexation des ETMs

La chélation est un processus physico-chimique qui conduit à la formation d'un complexe entre un ion métallique positif et une substance organique. Le complexe formé, le chélat, est alors transporté dans la vacuole. Le transport est assuré par un transporteur spécifique complexé à un métal.

Quatre groupes de ligands intracellulaires permettant la chélation des ETMs ont été identifiés : Les métallothionéines (MTs), les phytochélatines (PCs), les acides organiques et les acides aminés libres.

- Les **métallothionéines** (MTs) sont des protéines caractérisées par leur forte proportion de résidus cystéines, par leur contenu élevé en cations métalliques (essentiellement Cu et/ou Zn) et par leur forte affinité pour les métaux [44]. Selon Yang et al. [45] et Shah et Nongkynrih [44], les métallothionéines ont un rôle essentiel dans la modulation des effets toxiques des métaux et tout spécialement du cadmium. Néanmoins, la synthèse des MTs ne constitue pas une réponse spécifique puisque ces protéines s'accumulent également en réponse à d'autres stress, chocs thermiques par exemple. Ainsi, la synthèse des MTs dans des situations variées suggèrent que ces protéines seraient impliquées dans le contrôle général de l'homéostasie cellulaire plutôt que dans les réponses spécifiques aux ETMs [46, 47].
- Les **phytochélatines** (PCs) sont des peptides courts, classées dans une petite famille apparentée aux MTs avec lesquelles elles partagent des similarités de structure (riches en cystéine) et de fonction. Ils forment des complexes avec les métaux et peuvent également fonctionner comme des « navettes » (transporteurs) pour faciliter le transport des métaux au travers du tonoplaste jusqu'à la vacuole [42, 44]. Les complexes phytochélatines-métaux sont moins toxiques pour le métabolisme cellulaire de la plante que les ions métalliques libres [8]. Les phytochélatines peuvent également jouer un rôle important dans l'homéostasie cellulaire des ions métalliques [42, 44] (Figure 1.3).

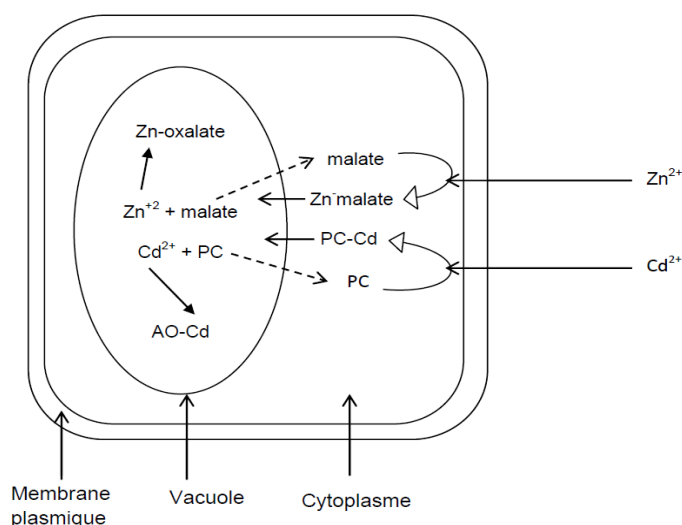


Figure 1.3 : Transport d'éléments traces dans la cellule (exemple du cadmium et du zinc) [42]

- Les **acides organiques** présentent un autre groupe de chélateurs naturels. Sous cette dénomination sont classés des molécules diverses tels des acides dicarboxyliques (acides fumarique, malique, oxalique) ou des acides tricarboxyliques (acide citrique). Ces molécules sont clairement impliquées dans les phénomènes d'hyperaccumulation [44, 45, 48, 49]. Ces composés forment des complexes avec les métaux et les acheminent du tonoplaste jusqu'à la vacuole [42]. Le malate, selon Prasad et Hagemeyer [42], est souvent présent en grande concentration dans les plantes résistantes au Zn. Probablement, il agit comme un transporteur du Zn durant le transport tonoplastique jusqu'à la vacuole. Une fois dans la vacuole, le Zn se lie à des composés tels le citrate, les phytates ou l'oxalate, tandis que le malate retourne dans le cytoplasme (Figure 1.2).
- Les **acides aminés** libres comme la proline, l'histidine et la cystéine s'accumulent lors d'un stress métallique et pourraient être impliqués dans la chélation de divers métaux lourds [43, 44].

b. Compartimentation vacuolaire

Une autre hypothèse pouvant expliquer le phénomène de tolérance serait attribuée à la séquestration des ETMs dans la vacuole [44, 45]. Les ETMs sont chélatés dans le cytoplasme cellulaire puis transportés vers la vacuole où ils seront séquestrés. En effet, le pH vacuolaire provoquerait la dissociation du complexe (chélat-ETMs) ; les ions métalliques seraient alors pris en charge par d'autres acides organiques présents dans cette organite, tel le citrate ou l'oxalate [8, 50].

1.8. Phytoremédiation

Les effets écotoxicologiques des ETMs sur l'environnement aquatique en général et sur l'homme en particulier incitent à trouver des moyens spécifiques pour réduire au maximum leurs charges dans l'environnement.

Plusieurs méthodes physico-chimiques (coagulation, adsorption, osmose inverse, etc.) sont appliquées. Ces méthodes présentent deux inconvénients majeurs : le coût des opérations et la genèse de sous produit plus toxique à l'environnement. Pour parer à ces inconvénients la phytoremédiation trouve sa place dans la dépollution des sites contaminés par les ETMs.

1.8.1. Définition

Le terme phytoremédiation est composé du préfixe grec « phyto » qui signifie plante et du mot latin « remedium » qui fait référence à l'élimination d'un mal [51]. La phytoremédiation est une approche de décontamination des sols, des eaux et des airs de polluants organiques et inorganiques par l'utilisation de plantes [52, 53]. Cette technique a pour but d'éliminer, de contenir ou de rendre moins toxique les contaminants environnementaux réduisant le risque de dégradation des écosystèmes naturels [53,54]. Elle tire profit de l'énergie solaire pour extraire et concentrer certains ETMs de l'environnement. Ce procédé comprend plusieurs types.

1.8.2. Différents mécanismes de phytoremédiation

La remédiation par les plantes comprend plusieurs mécanismes [44, 45, 53] :

- **La phytoextraction ou phytoaccumulation**

Les plantes absorbent et concentrent les divers polluants provenant des sols ou des eaux dans leurs parties récoltables (feuilles, tiges, racines). Ce terme est employé dans le cas des métaux lourds et des composés organiques avec l'utilisation de plantes accumulatrices et/ou hyperaccumulatrices qui sont capables de tolérer et d'accumuler ces polluants.

- **La phytostabilisation ou rhizofiltration**

Cette méthode réduit la mobilité des contaminants. Les plantes adsorbent par les racines les polluants du sol et de l'eau de surface en les retenant localement et réduisant leur biodisponibilité. C'est une méthode efficace pour empêcher la dispersion des polluants dans les eaux de surface et/ou souterraines.

- **La phytodégradation**

Les polluants provenant des sols et des eaux souterraines sont dégradés par les organismes de la rhizosphère de la plante. On parle alors de **rhizodégradation ou de bioremédiation**.

- La **phytotransformation**

Certaines plantes produisent des enzymes capables de dégrader des substances organiques absorbées ou adsorbées. Celles-ci sont transformées en substances moins toxiques ou non toxiques par la métabolisation des contaminants dans les tissus des plantes. Ce type de traitement est appliqué aux eaux de surfaces et souterraines.

- La **phytovolatilisation**

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.

- Elimination des contaminants aériens par absorption des composés organiques volatiles par les feuilles de plantes.

1.8.3. Potentiel épuratoire des macrophytes aquatiques

1.8.3.1. Macrophytes

Les macrophytes sont des plantes aquatiques macroscopiques [55]. Ce sont des organismes vivants autotrophes capables de réaliser en présence de l'énergie solaire la synthèse de leurs composés organiques à partir des éléments nutritifs prélevés dans le milieu.

Les macrophytes aquatiques ont une remarquable plasticité morphologique et physiologique. Ils occupent de très grandes surfaces dans les écosystèmes aquatiques colonisant préférentiellement les secteurs peu profonds, on parle alors de proliférations végétales. L'architecture de ces espèces est dépendante des gradients de facteurs mésologiques fréquemment observés dans les cours d'eau comme la lumière, la vitesse du courant et les nutriments disponibles dans le milieu [56].

Les macrophytes d'eau douce regroupent plusieurs embranchements : les charophytes, les bryophytes, les pteridophytes et les spermaphytes [56, 57]. En fonction de leurs fixations aux substrats et leurs positions le long du gradient hydrométrique, les macrophytes sont classés en [58] :

- Macrophytes libres :

Ce sont des plantes flottantes non accrochées au substrat et occupent des endroits abrités.

- Macrophytes accrochés :

On distingue 3 catégories dans ce groupe :

- o Les macrophytes émergents proches des plantes terrestres (exemple les roseaux)
- o Les macrophytes à feuilles flottantes, pétioles longs et cuticule épaisse, colonisants de faibles profondeurs (exemple les nénuphars).
- o Les macrophytes submergés peuplent diverses profondeurs (exemple l'Elodea).

Dans les lagunes, les macrophytes dont la biomasse est souvent importante interviennent amplement dans la structure et le fonctionnement de l'écosystème. Par la photosynthèse, ils participent à l'équilibre des écosystèmes lagunaires. L'absorption de gaz carbonique (CO₂) dissous et la libération d'oxygène (O₂) permettent aux macrophytes la production primaire de substances organiques à partir des nutriments [58]. Ces populations contribuent également à l'équilibre des milieux lagunaires grâce à [59] :

- leurs participations aux cycles de la matière, en particulier ceux du carbone, de l'azote et du phosphore, dans la colonne d'eau et les sédiments ;
- leurs fonctions de support, d'habitat, d'abri, de lieu de ponte et de nurseries à beaucoup d'animaux ;
- la fonction de ressource trophique directe pour certaines espèces (oursins, quelques gastéropodes, etc.) ou de ressource trophique indirecte ;
- la stabilisation des sédiments par les phanérogames, en particulier les zostères.

1.8.3.1.1. Lentilles d'eaux

Les lemnacées ou lentilles d'eau sont des macrophytes monocotylédones d'organisation simple, sans tige ni feuille, flottant généralement librement à la surface de l'eau. Elles ont l'aspect de très petites lames vertes ou frondes thalloïdes munies ou non sur le dessous d'une ou plusieurs racines filiformes non ramifiées. Elles présentent la particularité de pouvoir flotter sur l'eau grâce à la présence de lacunes

aériefères. La floraison est rare et presque indiscernable. Elles se multiplient par bourgeonnement végétatif des petits thalles [60]. La famille des lemnacées comprend 4 genres : *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* et *Wolffiella* [60]. La détermination des différentes espèces dépend de leur forme (composée ou orbiculaire, plane ou convexe), de leur taille, du nombre de nervures, de la présence et du nombre de racines [60].

Les lemnacées sont capables de former des tapis plus ou moins denses à la surface de l'eau. Des développements mono-spécifiques sont ainsi observables, mais le plus souvent les lentilles d'eau vivent en association avec d'autres plantes comme les phanérogames, les cryptogames, ou le plus souvent avec d'autres lemnacées [60].

1.8.3.1.2. *Lemna gibba*

Lemna gibba, est un macrophyte aquatique vasculaire de petite taille appartenant à la famille des lemnacées. Les membres de cette famille sont des angiospermes monocotylédones flottant à la surface des eaux calmes ou justes au-dessous [61, 62]. Cette lentille se trouve principalement dans les eaux stagnantes douces (étangs, lacs, eau stagnante et cours d'eau calmes), peut proliférer dans les sites mésotrophes à eutrophes voire saumâtres. *L. gibba* tolère assez bien la pollution [63].

Lemna gibba se différencie des spécimens du genre *Lemna* par sa taille de 2 à 6 mm ; la forme de ses frondes rondes et bombées ; la couleur vert clair des frondes et une racine par fronde [60].

1.8.3.2. Intérêts des macrophytes

Les caractéristiques de l'écologie des macrophytes permettent de les utiliser en tant que bioindicateur de la qualité du milieu environnant. Certains paramètres mesurés sur les peuplements de macrophytes permettent de développer des indicateurs de qualité du milieu en fonction de différents types de perturbations engendrées par les activités humaines (ex : eutrophisation, contamination chimique) [59].

En effet, il a été prouvé le pouvoir des macrophytes à assimiler et à accumuler différents composants chimiques dans les eaux [64 – 69]. Certaines espèces de macrophytes présentent de fortes capacités de bioaccumulation des métaux lourds (plomb, cadmium, nickel,...) et peuvent ainsi être utilisées en tant que biointégrateurs dans les milieux aquatiques ou pour séquestrer les métaux lourds lors des étapes de traitement des eaux [70, 73].

Leurs forts pouvoirs de tolérance, d'accumulation des ETMs et la production importante de biomasse les rendent intéressantes pour une utilisation en phytoremédiation.

1.8.4. Avantages et inconvénients de la phytoremédiation

La phytoremédiation est une « technologie verte ». Elle présente des avantages écologiques et économiques. La qualité biologique et la structure écologique des sites traités sont respectées. Sa mise en œuvre à grande échelle ne requiert pas d'équipements coûteux ou de personnel hautement spécialisé et est relativement simple à mettre en œuvre. Son avantage majeur reste son faible coût par rapport aux méthodes classiques de décontamination des eaux. Le coût de la phytoremédiation cité dans la littérature est rare, variable et approximatif.

Cependant, l'efficacité de cette technique est limitée par le type et la concentration des ETMs dans le milieu, par la physiologie des plantes remédiatrices et le climat. Un climat défavorable limite la croissance des plantes et la production de biomasse. !

1.9. Présentation des ETMs étudiés!

1.9.1. Cadmium

1.9.1.1. Propriétés

Le cadmium est un métal lourd, blanc argent légèrement bleuté [74]. Il est peu répandu dans la croûte terrestre. Il ne se trouve pas à l'état élémentaire dans la nature. Il est généralement présent dans des minerais de zinc ou de plomb [75].

Les caractéristiques physiques du cadmium sont une grande résistance à la corrosion, un point de fusion bas et une bonne conductivité de l'électricité. Ces produits dérivés ont une bonne résistance aux fortes températures [76].

Il présente des caractéristiques chimiques proches de celles du calcium, en particulier le rayon ionique (rayon ionique $\text{Ca}^{2+} = 0,97 \text{ \AA}$ et $\text{Cd}^{2+} = 0,99 \text{ \AA}$), facilitant ainsi sa pénétration dans les organismes [76].

Dans l'eau, le cadmium provient de l'érosion naturelle, du lessivage des sols (engrais phosphatés), des décharges industrielles et des traitements des effluents industriels et des mines [77 – 79].

Dans les systèmes aquatiques, le cadmium en solution se trouve sous différentes formes selon sa spéciation physique et chimique, on distingue [80] :

- Des formes dissoutes :

Dans les milieux aquatiques il peut être sous formes libres (Cd^{2+}) ou sous forme de complexe (cadmium-composé). Ces composés (ligands) sont de nature minérale ou organique.

- Des formes colloïdales :

Ces formes sont observées lorsqu'il se fixe à des oxydes de fer, de manganèse, des hydroxydes, des carbonates, des argiles ou de la matière organique colloïdale.

- Des formes particulières :

Ces formes sont observés lorsqu'il intègre une structure cristalline de minéraux détritiques par liaison à une fraction d'origine organique (carbonates, restes d'organismes, pelotes fécales), par précipitation avec différentes fractions minérales (carbonates, phosphates, oxydes et hydroxydes de fer ou de manganèse, sulfures) et par adsorption sur des phases de différentes natures (argiles, matière organique, oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse).

Les spéciations du cadmium dans l'environnement sont gérées par diverses variables physico-chimiques du milieu : salinité, pH, potentiel redox, caractéristiques sédimentologiques, nature géochimique des particules, concentration en chlorures [81].

1.9.1.2. Rôle biologique et toxicité

Contrairement à de nombreux métaux le cadmium n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants [82, 83]. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques proches de celles du calcium lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus [74].

Au sein des milieux aquatiques continentaux d'eau douce, ce xénobiotique est considéré comme un des métaux les plus toxiques et représente un risque pour les organismes aquatiques. La toxicité du métal est attribuée principalement à la perturbation de certaines métallo-enzymes, le Cd^{2+} se substituant aux métaux essentiels tels le zinc, le cuivre et le calcium. L'évaluation du risque, exprimée en termes de facteurs de transfert ou de niveaux de bio-accumulation doit prendre en compte la spéciation de cet élément [74].

Aujourd'hui, ce métal est présent dans tout l'environnement et l'homme y est exposé. Une exposition chronique au cadmium présente des risques chez l'homme même à de faibles concentrations, il tend à s'accumuler dans l'organisme. Les principaux sites d'accumulation et de toxicité sont les reins et le foie. Il s'accumule dans d'autres organes tels la rate, le cerveau, les poumons, le muscle, le sang [77]. Il peut être la cause d'autres affections telles l'insomnie, l'anémie, la rhinite, l'emphysème non hypertrophique et l'ostéoporose [84]. Il est aussi considéré comme un agent carcinogène par l'agence internationale de recherche sur le cancer [84]. Il a été mis en cause pour divers type de cancer (rein, foie, poumon, sang, estomac, prostate). Selon Waalkes [85], la toxicité du cadmium est liée à la perturbation du métabolisme du zinc et secondairement à d'autres éléments essentiels tels le calcium, le fer et le cuivre. Aussi, des toxicités aiguës liées à une exposition de dose élevée en cadmium ont été observées. Le phénomène de toxicité aiguë a été observé la première fois en 1950 au Japon, chez des riziculteurs âgés de 40 à 60 ans, ayant consommé l'eau de boisson et du riz contaminés par les rejets d'une usine de métaux non ferreux dans le bassin de la rivière Jintsu. Un syndrome d'une insuffisance rénale associé à une ostéoporose et une ostéomalacie ont été observées [81].

1.9.2. Nickel

1.9.2.1. Propriétés

Le nickel pur est un métal gris-blanc qui possède des propriétés métalliques typiques. Présent dans la croûte terrestre avec une teneur massique moyenne se situant entre 0,008 et 0,02 % [86]. Présent dans la nature en tant que constituant trace d'une grande variété de minéraux particulièrement ceux qui contiennent beaucoup de fer et de magnésium comme l'olivine et les pyroxènes [87].

Les caractéristiques physiques du nickel sont : une conductivité électrique et une conductivité thermique élevées, un point de fusion à 1452 °C. Le nickel peut être étiré, laminé, forgé et poli. Résistant à l'action de l'air et de l'eau aux températures comprises entre -20 à 30 °C. Donc utilisé comme revêtement électrolytique de protection. Magnétique mais pas autant que le fer [88]. Résistant à l'oxydation et à la corrosion. Entre dans la composition d'alliages avec le fer, le cuivre, l'aluminium, le cadmium, etc.

Les sources de contamination en nickel des milieux aquatiques sont : l'oxydation de la pyrite contenant du nickel substitué au fer et les eaux résiduaires de certaines industries telles l'industrie des alliages, des aciers inoxydables, des tanneries et des batteries [87,89].

Dans les eaux douces le nickel est sous forme de particules et sous formes dissoutes. Certains paramètres peuvent influencer le transport, le devenir et la biodisponibilité du nickel en eau douce tels le pH, le potentiel d'oxydoréduction, la force ionique et le type et la concentration des ligands organiques et inorganiques [90]. Cependant la forme dominante en eau douce, a un pH inférieur à 8, est l'ion Ni^{2+} [88].

1.9.2.2. Rôle biologique et toxicité

Le nickel à faible concentration est un élément essentiel pour les organismes aquatiques. Néanmoins, il existe des différences importantes de sensibilité au nickel entre les taxons. Parmi les effets non létaux aigus et chroniques chez les poissons et les invertébrés on a observé des dommages aux tissus, des effets génotoxiques et une réduction de la croissance. Certains champignons, microorganismes et

invertébrés (p. ex., des chironomidés) sont relativement tolérants au nickel, parmi les invertébrés relativement sensibles on compte les mollusques, les crustacés et les *Daphnia* spp [91].

Chez l'homme, le Ni peut être considéré comme un métal essentiel : sa carence altère le métabolisme du glucose et détruit la tolérance à cette ose. Il est aussi un facteur de croissance. Cependant, il peut également être toxique à forte dose. L'intoxication aigue accidentelle par voie orale provoque essentiellement des troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées, douleurs abdominales), des céphalées, et une asthénie associée parfois à une bradycardie et à une légère hypothermie [8]. Des allergies cutanées, des fibroses pulmonaires, des troubles rénaux et cardio-vasculaires peuvent être observés suite à une exposition chronique [92].

CHAPITRE 2

ETUDE DE L'EFFET DU MELANGE CADMIUM- NICKEL SUR *L. gibba* : ECOTOXICOLOGIE ET POUVOIR D'ELIMINATION

CHAPITRE 2

ETUDE DE L'EFFET DU MELANGE CADMIUM-NICKEL SUR *L. gibba* : ECOTOXICOLOGIE ET POUVOIR D'ELIMINATION

2.1. Introduction

La pollution des eaux par les métaux lourds est devenue un enjeu majeur au cours des deux dernières décennies. De grandes quantités de métaux lourds sont déversées dans les milieux aquatiques par les activités industrielles et humaines [20]. Les métaux lourds ne sont pas biodégradables et leurs présences dans les ruisseaux et les lacs conduit à leurs bioaccumulations dans les organismes vivants. Ce qui génère des problèmes écologiques et physiologiques de la faune et de la flore et par voie de conséquence l'homme se trouve lui aussi exposé avec tout ce qu'elle peut engendrer comme toxicité [26, 93 - 95].

De ce fait, il est impératif d'éliminer les ETMs présents dans les eaux par des traitements appropriés et adaptés [93]. Les méthodes conventionnelles de traitement de ce type de pollution sont diverses, exemple : la précipitation, l'échange d'ions, l'électrolyse, l'adsorption, l'osmose inverse, etc. [93, 96 - 100]. Cependant, ces méthodes présentent plusieurs inconvénients principalement : la difficulté de traiter de grands volumes à faible concentration métallique, les rendements d'élimination varient en fonction de l'espèce métallique et du procédé, la mise en place de moyen de nettoyage, de traitement des sous produits issus de ces procédés et enfin le coût des opérations [67, 101, 102].

Pour parer aux inconvénients des procédés physico-chimiques une technologie verte peut être appliquée, il s'agit de la phytoremédiation. Cette technique utilise des plantes à des fins de dépollution de tout type de polluants notamment les ETMs. Cette technique présente l'avantage majeur d'être écologique et peu coûteuse [65, 93]. La phytoaccumulation nécessite l'absorption des ETMs par les racines et leurs translocations vers les parties aériennes.

La phytoremédiation par les plantes aquatiques se déroule en deux étapes. La première étape est la bioabsorption des ETMs : processus rapide et réversible. La seconde étape est la bioaccumulation et la séquestration des ETMs : processus lent et irréversible [102, 103]. Plusieurs espèces de macrophytes aquatiques sont utilisés pour la dépollution des eaux par les ETMs [20, 26, 30, 72, 93, 104]. Les plantes aquatiques employées en phytoremédiation doivent être à la fois hyperaccumulatrice et tolérante. Ses propriétés sont déterminées par l'absorption, la translocation, la séquestration intracellulaire, la modification et/ou la dégradation chimique des polluants et par le développement de mécanisme de détoxification pour accroître la tolérance à ce stress [43, 65]. Il faut tenir compte aussi des besoins spécifiques des plantes en certains éléments et à faibles concentrations, ceux sont des micronutriments essentiels. Au-delà d'une certaine concentration ils deviennent toxiques et provoquent des troubles métaboliques et des inhibitions de croissance [13, 51], rejoignant ainsi les ETMs qui n'ont aucun rôle métabolique et qui provoquent des dommages aux plantes.

Deux ETMs ont été sélectionnés pour cette étude, il s'agit du cadmium et du nickel. Ces métaux sont retrouvés dans diverses utilisations, telles les engrais phosphatés, l'exploitation minière, les pigments, les stabilisants, les alliages et les batteries de cadmium–nickel. Ces métaux sont présents dans les eaux résiduaires rejetées dans les milieux aquatiques [84, 96, 105 – 107]. L'intoxication de l'homme par le cadmium peut provoquer une affection rénale, hépatique et des troubles du système respiratoire. Il peut être aussi à l'origine de certains type de cancer tel que le cancer du poumon [77, 84]. Quand à l'intoxication de l'homme par le nickel, des manifestations sans gravité peuvent être observées telles des nausées, des vomissements et de la diarrhée. D'autres troubles plus graves ont été rapportés tels la fibrose pulmonaire, l'œdème rénal, la dermatite de la peau et les troubles gastro-intestinaux [105 – 107]. Par conséquent, il est impératif de traiter les eaux contenant ces deux ETMs.

Notre travail a consisté en l'étude des effets écotoxicologiques du cadmium et du nickel sur une plante aquatique, *L. gibba*, et sur l'évaluation de son pouvoir à réduire ces métaux présents dans le milieu de culture. Le choix de cette plante s'est fait pour trois raisons :

- Espèce autochtone Algérienne ;
- Un bio-indicateur écologique [19] ;
- Capacité avérée d'accumuler les ETMs [19, 101].

Le plan expérimental suivi s'inspire des plans de surface (RSM) avec l'application de la méthode des plans composites centrés réduit (CCD). Cette approche a pour but principal de déterminer les effets de chacun des facteurs (concentration initiale en Cd^{2+} et concentration initiale en Ni^{2+}) mais également les effets d'interactions entre facteurs pour chaque réponse étudiée qu'elle soit d'ordre toxicologique ou d'ordre élimination des ETMs.

2.2. Matériel et méthodes

2.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est la lentille d'eau : *Lemna gibba*. Cette lentille d'eau a été récupérée d'une culture stock au département de biologie, de l'Université Saâd Dahlab de Blida (1). Une fois au laboratoire (laboratoire Génie des Procédés, Département Chimie industrielle, Université de Blida 1, les plantes ont été lavées dans trois bains successifs d'eau distillée, puis remis dans des bacs en PVC de 2000 mL, contenant un milieu nutritif minéral (pH 6,5) pour constituer la culture stock. Le milieu minéral utilisé est le milieu de Chollet [108], de composition (mg/l) : KNO_3 : 202 ; KH_2PO_4 : 50,3 ; K_2HPO_4 : 427,8 ; K_2SO_4 : 17,4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 49,6 ; CaCl_2 : 11,1 ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 6 ; H_3BO_3 : 5,72 ; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 2,82 ; ZnSO_4 : 0,6 ; $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0,043 ; $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,008 ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 0,054. Toutes les cultures sont maintenues dans une chambre à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une photopériode de 16h /8h (lumière / obscurité) ; le milieu est renouvelé deux fois par semaine.

2.2.2. Contamination aux ETMs

Les conditions de culture des essais contaminés par les métaux lourds, milieu nutritif, température et photopériode, sont identiques à celles utilisées pour la constitution des cultures stock.

Des récipients en PVC de 500 mL de capacité ont été utilisés, remplis de 200 mL en milieu nutritif contaminé par le cadmium ($\text{CdSO}_4 \cdot 8/3 \text{ H}_2\text{O}$) et le nickel ($\text{NiSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$). 100 frondes de *L. gibba* sont prises au hasard et mises en culture dans ces récipients contaminées pendant 4 jours. Tous les récipients ont été couverts avec des films transparents percés. Les composés métalliques utilisés sont tous de qualité analytique.

2.2.3. Plan d'expérience

Le plan d'expérience utilisé pour la réalisation de ce travail s'inspire du modèle des plans de surface. Ce type de plan permet à la fois une bonne gestion du processus expérimental et une optimisation du processus. Cette méthode vise à déterminer d'une façon quantitative la variation d'une réponse vis-à-vis des facteurs sélectionnés. Dans l'intervalle expérimental, La variation de la réponse en fonction des facteurs étudiés se traduit par un polynôme. L'avantage majeur de cette technique réside dans le fait que le nombre d'expérience est réduit d'où un gain de temps et d'argent. La réduction du nombre des essais n'influe en aucun cas sur la qualité des résultats, les essais sont structurés et organisés dans une matrice.

L'ensemble des expériences, destiné à évaluer l'effet des facteurs (concentration initiale en Cd^{2+} et concentration initiale en Ni^{2+}) et de leurs interactions, est regroupé dans une matrice selon un plan composite centré des plans de surfaces. Le plan est basé sur un plan factoriel complet (2^2), trois points centraux et des points en étoiles. Les points en étoiles sont choisis selon le modèle de l'isovariance par rotation. Chaque facteur est étudié à 5 niveaux. La matrice est sous forme codée, où chaque variable est convertie en une valeur codée selon l'équation suivante [109, 110] :

$$X = \frac{x_i - x_0}{\delta x} \quad (2.1)$$

X_i est la valeur codée de la variable, x_i est la valeur réelle de la variable, x_0 est la valeur du point central et δx est la variation entre les niveaux haut et bas.

Les valeurs de haut et de bas niveau sont codés -1 et +1, le point central est codé 0 et les points en étoile sont codés -1,414 ou + 1,414 [111]. Les variables codées et les

variables naturelles correspondantes aux conditions expérimentales sont définies dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Facteurs étudiés et leurs niveaux de variation en unité centrée réduite et en unité réelle.

Facteurs (mg/l)	symbole	Niveau				
		-1,414	-1	0	+1	+1,414
Concentration initiale en Cd^{2+}	X_1	0,038	0,1	0,25	0,4	0,46
Concentration initiale en Ni^{2+}	X_2	0,39	0,5	0,75	1	1,10

La construction de la matrice est réalisée par un logiciel, JMP 9.0.2 (SAS Institute), où 11 essais sont nécessaires (Tableau 2.2). L'ordre des essais est aléatoire.

Tableau 2.2 : Construction d'un plan composite centré réduit pour deux facteurs.

Essai	Facteurs	
	X_1	X_2
1	-1	-1
2	-1	1
3	1	-1
4	1	1
5	-1.41	0
6	1.41	0
7	0	-1.41
8	0	1.41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Les données obtenues à la suite de ce plan sont soumises à une analyse de régression et modélisées sous forme d'un polynôme de second degré (Equation 2.

2), où on exprime la variation de la réponse en fonction des différents facteurs étudiés. L'estimation des coefficients de régression est réalisée par la méthode des moindres carrés [112].

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (2.2)$$

Y est la réponse prévue, X_i , X_i^2 , X_j sont des variables indépendantes à valeurs codées ; β_0 est la constante, β_i est l'effet linéaire, β_{ii} est l'effet quadratique et β_{ij} est l'effet de l'interaction.

Il est également important de vérifier la pertinence du modèle développé. Une analyse statistique comprenant l'analyse de la variance a été étudiée pour juger de la fiabilité et de la qualité du modèle et donc des expériences réalisées. Ce type d'analyse permet aussi d'identifier et d'apprécier le rôle individuel et interactif des variables sur la réponse [110].

2.2.4. Paramètres de croissance

La croissance des lentilles d'eau a été suivi par le dénombrement des frondes (NF) et par le rapport masse fraîche / masse sèche des plantes (MF / MS).

La croissance des plantes a été suivie par le dénombrement des frondes au début (J_0) et en fin de traitement (J_4). Tous les thalles visibles ont été comptés. La croissance a été définie par le taux de croissance relative (TCR) selon Mkandawire et al. [113] :

$$TCR = \frac{(\ln FN_{t_n} - \ln FN_{t_0})}{(t_n - t_0)} \quad (2.3)$$

FN_{t_n} est le nombre de frondes au temps t_n (4j), et FN_{t_0} est le nombre de frondes au temps t_0 (0j).

Le poids frais et le poids sec ont été déterminés en fin d'expérience (4 jours). Détermination du poids frais, avant la pesée les plantes sont rincées à l'eau distillée 3 fois puis placées sur du papier absorbant pour éliminer l'excès d'eau. Une fois pesées, les plantes sont séchées à 60 °C durant 2 jours, le poids sec est déterminé. Le rapport masse fraîche / masse sèche (MF/MS) a été calculée pour chaque essai.

2.2.5. Extraction et dosage des pigments photosynthétiques

Les pigments photosynthétiques (chlorophylle a, b et caroténoïdes) ont été mesurés selon la méthode de Lichtenthaler [114]. Cinquante mg de plante séchée (pour chaque essai), sont broyés dans de l'acétone à 80%. Le broyage est répété plusieurs fois afin d'extraire la totalité des pigments. L'extrait obtenu est centrifugé à 2500 g pendant 5 min. La densité optique de la totalité du surnageant est mesurée à 645, à 662 et à 470 nm.

Les concentrations en chlorophylle a, en chlorophylle b et en caroténoïdes sont exprimées en µg/mL et déterminées à l'aide des formules suivantes [114] :

$$C_{chl a} (\mu\text{g/mL}) = 11,24 A'_{662} - 2,04 A'_{645} \quad (2.4)$$

$$C_{chl b} (\mu\text{g/mL}) = 20,13 A'_{645} - 4,19 A'_{662} \quad (2.5)$$

$$C_{carot} (\mu\text{g/mL}) = \frac{(1000 A'_{470} - 1,90 C_{chl a} - 63,14 C_{chl b})}{214} \quad (2.6)$$

$C_{chl a}$ et $C_{chl b}$ sont les concentrations en chlorophylle a et b ; C_{carot} est concentration en caroténoïdes.

2.6. Dosage des ETMs dans le milieu de culture

Les concentrations en Cd et Ni dans le milieu de culture avant et après traitement ont été dosées par spectroscopie d'absorption atomique (SAA) à flamme (Perkin Elmer) au laboratoire Centrale de Police Scientifique (Département Sécurité Alimentaire/ Environnement). Tous les prélèvements (avant et après traitement) ont été acidifiés avec du HCl à 2% [115]. Le taux d'élimination des ETMs est déterminé par la formule suivante [116] :

$$R(\%) = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \quad (2.7)$$

R est le taux d'élimination de l'ETM (Cd^{2+} ou Ni^{2+}) ; C_0 est la concentration initiale en ETM dans le milieu de culture avant traitement ; C_1 est la concentration finale en ETM dans le milieu de culture en fin de traitement.

2.3. Résultats

L'approche CCD a été adoptée pour l'étude des effets individuels et des interactions entre variables sélectionnées sur les réponses : paramètres de croissance, pigment photosynthétique et taux d'élimination des métaux lourds. Les réponses expérimentales (TCR, MF / MS, C_{chloa} , C_{chlob} , C_{car} , $R_{\text{Cd}^{2+}}$ et $R_{\text{Ni}^{2+}}$) en fonction des variables indépendantes (X_1 et X_2) sont présentées dans les paragraphes qui suivent. Les résultats sont analysés en utilisant le logiciel JMP version 9.0.2 (SAS Institute) et la relation entre la réponse Y et les variables X est déterminée.

2.3.1. Paramètres de croissance

L'influence des métaux sur les paramètres de croissance de *L. gibba* : le taux de croissance (TCR) et rapport masse fraîche/masse sèche (MF/MS) ont été déterminés comme mentionnés dans le paragraphe 2.2.4. Les résultats sont cités dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Réponses des essais TCR et MF/MS.

Essai	Paramètres de croissance	
	TCR (j^{-1})	MF/MS
1	0,05	54,19
2	0,044	49,63
3	0,023	51,94
4	0,04	36,95
5	0,07	58,27
6	0,035	40,66
7	0,018	56,18
8	0,03	44,54
9	0,027	35,35
10	0,025	38,83
11	0,03	39,72

Les effets de chaque facteur (X_1 et X_2) et les effets d'interaction sont déterminés et cités dans le Tableau 2.4. Ils sont déterminés par la méthode des moindres carrés à partir des résultats des essais.

Tableau 2.4 : Effets principaux et d'interaction sur les réponses : TCR et MF/MS.

Facteur	Effet	Coef.	SE. Coef
<u>TCR (d⁻¹)</u>			
Constante	0,05466	0,02733	0,00203
X_1	-0,02012	-0,01006	0,00124
X_2	0,006992	0,003496	0,00124
X_1X_2	0,0115	0,00575	0,00175
X_1^2	0,025666	0,012833	0,00148
X_2^2	-0,002834	-0,001417	0,00148
<u>MF/MS</u>			
Constante	75,933334	37,966667	1,421622
X_1	-9,958576	-4,979288	0,870562
X_2	-9,002862	-4,501431	0,870562
X_1X_2	-5,215	-2,6075	1,231161
X_1^2	10,6308334	5,3154167	1,036176
X_2^2	11,5258334	5,7629167	1,036176

A partir des valeurs des coefficients, le modèle mathématique de second degré peut être donné pour chacune des réponses comme suit :

$$\begin{aligned} \text{TCR} = & 0,02733 - 0,01006 X_1 + 0,003496 X_2 + 0,00575 X_1 X_2 \\ & + 0,012833 X_1^2 - 0,0014166 X_2^2 \end{aligned} \quad (2.8)$$

$$\begin{aligned} \frac{\text{MF}}{\text{MS}} = & 37,9666 - 4,979287 X_1 - 4,5014307 X_2 - 2,6075 X_1 X_2 + 5,315416 X_1^2 \\ & + 5,762916 X_2^2 \end{aligned} \quad (2.9)$$

Selon Sereshti et al. [117], le signe d'un coefficient (+ ou -) définit le sens de la relation entre l'effet et la réponse. Le signe (+) signifie une augmentation de la réponse quand le facteur passe du niveau bas au niveau haut alors que le signe (-) indique une baisse de la réponse quand le facteur passe du niveau bas au niveau haut. La valeur absolue des coefficients traduit les effets moyens des facteurs.

Dans le cas du TCR, nous observons : le facteur linéaire X_2 , l'interaction des facteurs X_1X_2 et l'effet quadratique X_1 exercent un effet positif alors que le facteur linéaire X_1 et l'effet quadratique X_2 exercent un effet négatif. Pour le rapport MF/MS, nous observons : le facteur linéaire X_1 et X_2 et l'interaction des facteurs X_1X_2 exercent un effet négatif alors que le facteur quadratique X_1 et X_2 exercent un effet positif.

De ces résultats, on peut déduire que le signe positif du coefficient représente un effet synergique tandis que le signe négatif indique un effet antagoniste.

L'analyse statistique des coefficients de régression est nécessaire pour déterminer leurs significativité. Pour ce faire, on fait appel au test de probabilité (valeur-P) [118]. La valeur-P est définie par la probabilité P de rejeter l'hypothèse H_0 qui qualifie de non significatif l'élément qui lui est associé [112]. Si elle est inférieure à 0,05 on conclut que l'effet est significatif [119]. Dans le cas de non significativité, les termes concernés peuvent être exclus du modèle.

Le tableau 2.5 présente l'analyse statistique des coefficients. Nous remarquons dans le cas du TCR que tous les coefficients dans le modèle (2.8) sont significatifs avec une valeur- P inférieure à 0,05 à l'exception de celui correspondant au terme X_2^2 . Dans le cas de MF/MS, tous les facteurs du modèle (2.9) sont statistiquement significatifs avec une valeur-P inférieure à 0,05 à l'exception de celui correspondant au terme X_1X_2 .

Il convient alors d'éliminer des modèles mathématiques les éléments non significatifs. Les modèles s'écriraient alors comme suit :

$$\begin{aligned} \text{TCR} = & 0,02733 - 0,01006 X_1 + 0,003496X_2 + 0,00575X_1X_2 \\ & + 0,012833 X_1^2 \end{aligned} \quad (2.10)$$

$$\begin{aligned} \frac{\text{MF}}{\text{MS}} = & 37,9666 - 4,979287X_1 - 4,5014307X_2 + 5,315416 X_1^2 \\ & + 5,762916 X_2^2 \end{aligned} \quad (2.11)$$

L'analyse de la variance (ANOVA) est considérée comme essentiel pour tester de manière absolue la significativité du modèle postulé [120]. L'analyse de l'ANOVA a été réalisée et illustrée au tableau 2.5.

Tableau 2.5 : Analyse ANOVA pour les réponses : TCR et MF/MS.

Source	Analyse statistique				
	SS	ddl	MC	F ₀	P
<u>TCR</u>					
Modèle	0,0021	5	0,0004	34,52	0,0007
X ₁	0,00081	1	0,00081	65,43	0,0005
X ₂	0,0001	1	0,0001	7,90	0,0375
X ₁ .X ₂	0,00013	1	0,00013	10,68	0,0222
X ₁ ²	0,0010	1	0,0010	75,13	0,0003
X ₂ ²	0,000011	1	0,000011	0,91	0,3826
Résidus	0,000062	5	0,000012		
Lack of fit	0,000049	3	0,000016	2,59	0,2907
Erreur pure	0,000013	2	0,000006		
Total	0,022	10			
<u>MF/MS</u>					
Modèle	656,22	5	131,24	21,64	0,0021
X ₁	198,35	1	198,35	32,71	0,0023
X ₂	162,10	1	162,10	26,73	0,0036
X ₁ .X ₂	27,20	1	27,20	4,48	0,0877
X ₁ ²	159,55	1	159,55	26,31	0,0037
X ₂ ²	187,543	1	187,543	30,93	0,0026
Résidus	30,31	5	6,06		
Lack of fit	19,65	3	6,55	1,22	0,4782
Erreur pure	10,66	2	5,33		
Total	686,53	10			

On constate pour les deux réponses TCR et MF/MS que la valeur de F de la régression est élevée, elle est respectivement de 34,52 et 21,64. La probabilité associée à la détermination de ce F est dans les deux cas inférieure à 0,05, elle est respectivement de 0,0007 et 0,0021. Ces résultats indiquent que les variations de la réponse sont expliquées par les équations de régression.

L'adéquation du modèle est testée par l'analyse statistique du manque d'ajustement (lack of fit). Le lack of fit définit l'écart systématique entre le modèle réel et le modèle postulé. Le manque d'ajustement serait significatif si le modèle n'est pas bien ajusté aux expériences. En règle générale, le modèle est validé si la variance due au manque d'ajustement est non significative. C'est-à-dire si la valeur-F est très faible et la valeur de P est supérieure à 0,05 [121].

L'analyse du tableau 2.5 permet d'observer une faible valeur de F pour TCR et MF/MS, elle est respectivement de 2,59 et de 1,22. La valeur-P est supérieure à 0,05, elle est respectivement de 0,29 et de 0,478 pour TCR et MF/MS. Cette analyse indique que la variance due au manque d'ajustement est non significative validant ainsi le modèle.

Ces résultats indiquent que les modèles postulés de second degré sont significatifs et représentatifs de la relation : réponse- variable.

La qualité du modèle polynomial peut être aussi estimée par la détermination des coefficients de régression (R^2 et $R^2_{\text{ajusté}}$). R^2 est la fraction de la variation des réponses expliquées par le modèle et R^2_{aj} est la fraction de la variation des réponses expliquées par le modèle ajusté au degré de liberté [117].

A partir des résultats de l'ANOVA, on estime respectivement les valeurs R^2 et R^2_{aj} à 0,971 et 0,943 pour RGR et à 0,955 et 0,911 pour FW/DW. Plus de 95 % des variables sont expliquées par les modèles mathématiques. Ses résultats présentent une forte corrélation entre les valeurs observées et prédites par les modèles (Figure 2.1). Ces figures (2.1 a et b) montrent bien une relation linéaire entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites par les modèles mathématiques.

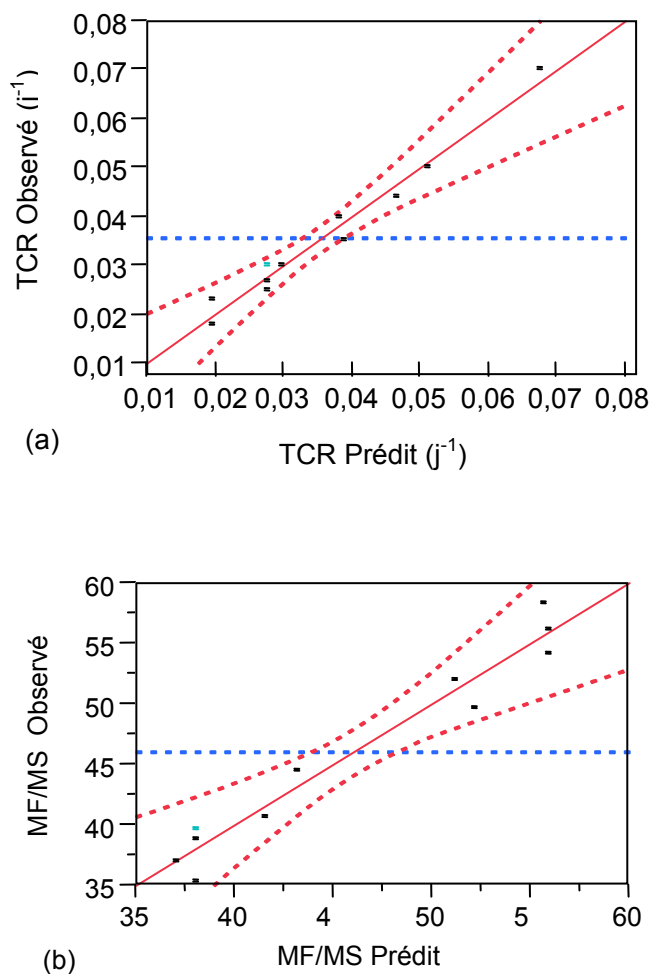


Figure 2.1 : Réponses observées en fonction des réponses prédites :

(a) TCR et (b) MF/MS.

Par ailleurs, à partir de ses modèles mathématiques, on peut obtenir les surfaces de réponses pour chacune des réponses étudiées. Les surfaces de réponses sont des représentations graphiques en trois dimensions représentant la relation entre la réponse et les variables étudiées. Cette méthode analyse la nature géométrique de la surface, détermine les minima et les maxima des réponses et enfin détermine l'importance des coefficients des équations de régression [122].

La Figure 2.2 illustre les surfaces de réponses pour chaque cas étudié TCR et MF/MS. Elles sont obtenues par la variation simultanée des deux facteurs X_1 et X_2 entre -1,414 et +1,414.

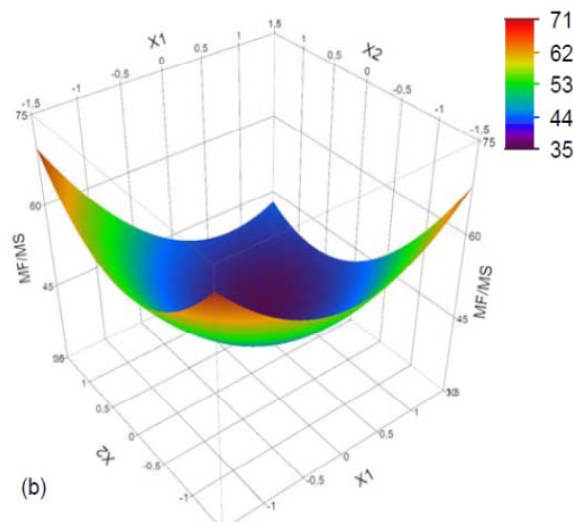
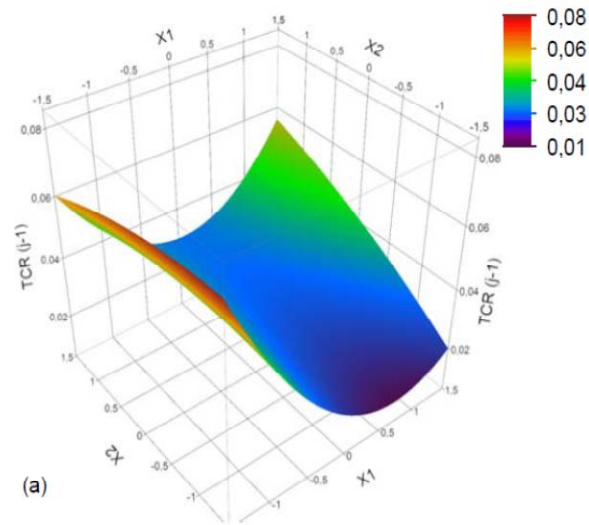


Figure 2.2 : Surface de réponses TCR (a) et MF/MS (b) en fonction de X_1 et X_2 .

D'une manière générale, nous remarquons que l'allure des surfaces sont différentes pour les deux réponses TCR et MF/MS. La Figure 2.2(a) montre que le maximum de TCR ($0,507 \text{ j}^{-1}$) est obtenu pour un X_1 de $-0,97$ et un X_2 de $-0,587$, le taux minimum ($0,013 \text{ j}^{-1}$) est obtenu pour un X_1 de $0,611$ et un X_2 de $-1,39$. Concernant le rapport MF/MS, la Figure 2.2(b) indique que le maximum ($60,91$) est obtenu pour un X_1 de $-0,98$ et un X_2 de $-1,33$. Le minimum de ce rapport ($35,76$) est obtenu pour un X_1 de $+0,77$ et un X_2 de $-0,79$.

2.3.2. Pigments photosynthétiques

Les concentrations des pigments photosynthétiques (C_{chla} , C_{chlb} et C_{car}) ont été déterminées à partir des relations 2.4, 2.5 et 2.6. Les réponses pour chaque essai réalisé sont illustrées dans le Tableau 2.6.

Tableau 2.6 : Réponses des essais C_{chla} , C_{chlb} et C_{car} .

Essai	Concentrations des pigments photosynthétiques ($\mu\text{g/g MS}$)		
	C_{chla}	C_{chlb}	C_{car}
1	4280,29	3773,45	1836,01
2	4214,02	2984,83	1270,01
3	2465,42	2474,09	994,07
4	3250,56	3515,57	1357,66
5	4757,14	3563,99	1475,23
6	2450,69	3058,32	1128,57
7	2847,70	2846,96	1567,31
8	3252,58	3317,56	1365,44
9	4458,82	4352,21	1402,10
10	4294,56	4492,36	1503,02
11	4495,95	4455,13	1454,29

Les effets de chaque facteur (X_1 et X_2) et les effets d'interaction sont déterminés et listés dans le tableau 2.7.

Tableau 2.7 : Effet principaux et d'interaction sur les réponses : C_{chla} , C_{chlb} et C_{car} .

Facteur	Effet	Coef.	SE. Coef
<u>C_{chla}</u>			
Constante	8832,88	4416,443	102,1789
X_1	-1510,0358	-755,01785	62,57157
X_2	322,8642	161,43209	62,57157
X_1X_2	425,705	212,8525	88,48956
X_1^2	-699,7558	-349,8779	74,47506
X_2^2	-1253,5308	-626,7654	74,47506
<u>C_{chlb}</u>			
Constante	8866,4666	4433,2333	46,45709
X_1	-370,9364	-185,4681	28,44904
X_2	229,59722	114,7986	28,44904
X_1X_2	915,05	457,525	40,23302
X_1^2	-1126,9396	-563,4697	33,86113
X_2^2	-1355,8346	-677,917	33,86113
<u>C_{car}</u>			
Constante	2906,2734	1453,1366	32,09142
X_1	-311,1354	-155,5677	19,6519
X_2	-121,97432	-60,9871	19,6519
X_1X_2	464,795	232,3975	27,79198
X_1^2	-161,08666	-80,54333	23,39044
X_2^2	3,3883334	1,6941	23,39044

A partir des valeurs des coefficients, le modèle mathématique de second degré peut être donné pour chacune des réponses comme suit :

$$C_{chla}(\mu\text{g/gMS}) = 4416,443 - 755,01785X_1 + 161,43209X_2 + 212,8525X_1X_2 - 349,8779X_1^2 - 626,7654X_2^2 \quad (2.12)$$

$$C_{chlb}(\mu\text{g/gMS}) = 4433,2333 - 185,4681X_1 + 114,7986 X_2 + 457,525X_1X_2 - 563,4697X_1^2 - 677,9172X_2^2 \quad (2.13)$$

$$C_{car} (\mu\text{g/gMS}) = 1453,1366 - 155,5676X_1 - 60,9871X_2 + 232,3975X_1X_2 - 80,5433X_1^2 + 1,6941X_2^2 \quad (2.14)$$

De ces résultats, nous observons que le facteur linéaire X_2 et l'interaction X_1X_2 exercent un effet positif que ce soit pour C_{chla} que pour C_{chlb} alors que le facteur linéaire X_1 et les facteurs quadratiques X_1 et X_2 exercent un effet négatif sur ces mêmes réponses. Dans le cas de C_{car} , les facteurs linéaire X_1 et X_2 et le facteur quadratique X_1 exercent un effet négatif alors que l'interaction X_1X_2 et l'effet quadratique X_2 exercent un effet positif.

Ces observations indiquent que le signe positif du coefficient représente un effet synergique, tandis qu'un signe négatif est synonyme d'un effet antagoniste.

L'analyse statistique des coefficients est listée dans le tableau 2.8. Nous remarquons dans le cas C_{chla} tous les facteurs sont statistiquement significatifs avec une valeur-P inférieure à 0,05 à l'exception de X_1X_2 . Alors que pour C_{car} , tous les facteurs sont statistiquement significatifs avec une valeur-P inférieure à 0,05 sauf X_2^2 . Dans le cas de C_{chlb} , tous les facteurs sont statistiquement significatifs avec une valeur-P inférieure à 0,05.

De ce fait, les éléments non significatifs peuvent être éliminés des équations de régression (2.12 et 2.14), et on peut alors écrire ses équations de la manière suivante :

$$\begin{aligned} C_{chla}(\mu\text{g/gMS}) &= 4416,443 - 755,01785X_1 + 161,43209X_2 \\ &- 349,8779X_1^2 - 626,7654X_2^2 \end{aligned} \quad (2.15)$$

$$\begin{aligned} C_{car} (\mu\text{g/gMS}) &= 1453,1366 - 155,5676X_1 - 60,9871X_2 \\ &+ 232,3975X_1X_2 - 80,5433X_1^2 \end{aligned} \quad (2.16)$$

L'analyse de l'ANOVA a été réalisée et exposée (tableau 2.8). On remarque pour chaque réponse, C_{chla} , C_{chlb} et C_{car} que la valeur de F des équations de régression est élevée, elles sont respectivement de 46,85, 143,10 et 31,07. La probabilité associée à la détermination de ce F est dans les trois cas inférieure à

0,05, elle est respectivement de 0,0003, <0,0001 et 0,0009. Ces résultats indiquent que les variations des réponses sont expliquées par les équations de régression.

Tableau 2.8 : Analyse ANOVA pour les réponses : C_{chla} , C_{chl-b} et C_{car} .

Source	Analyse statistique				
	SS	ddl	MC	F_0	P
<u>C_{chla}</u>					
Modèle	7337878,3	5	1467576	46,85	0,0003
X_1	4560415,7	1	4560415,7	145,60	<,0001
X_2	208482,6	1	208482,6	6,66	0,0494
$X_1 \cdot X_2$	181224,7	1	181224,7	5,78	0,0612
X_1^2	691282,2	1	691282,2	22,07	0,0053
X_2^2	2218361,7	1	2218361,7	70,8253	0,0004
résidus	156608,0	5	31322		
Lack of fit	133635,40	3	44545,1	3,88	0,2118
Erreur pure	22972,64	2	11486,3		
Total	7494486,3	10			
<u>C_{chl-b}</u>					
Modèle	4632600,0	5	926520	143,10	<,0001
X_1	275187,5	1	275187,5	42,50	0,0013
X_2	105429,8	1	105429,8	16,28	0,0100
$X_1 \cdot X_2$	837316,5	1	837316,5	129,32	<,0001
X_1^2	1792931	1	1792931	276,91	<,0001
X_2^2	2595229,3	1	2595229,3	400,82	<,0001
résidus	32373,9	5	6475		
Lack of fit	21833,72	3	7277,91	1,3810	0,4461
Erreur pure	10540,207	2	5270,10		
Total	4664973,9	10			

<u>C_{car}</u>					
Model	480017,04	5	96003,4	31,07	0,0009
X ₁	193610,37	1	193610,37	62,66	0,0005
X ₂	29755,47	1	29755,47	9,63	0,0268
X ₁ .X ₂	216034,39	1	216034,39	69,92	0,0004
X ₁ ²	36633,76	1	36633,76	11,86	0,0184
X ₂ ²	16,21	1	16,21	0,0052	0,9451
Résidus	15447,88	5	3089,6		
Lack of fit	10353,47	3	3451,16	1,35	0,4513
Erreur pure	5094,42	2	2547,21		
Total	495464,93	10			

Le tableau 2.8 montre une faible valeur de F pour le lack of fit pour chaque cas C_{chl_a}, C_{chl_b} et C_{car}. Elle est respectivement de 3,88, 1,38 et 1,35, accompagnée d'une probabilité supérieure à 0,05 (0,2118, 0,4461 et 0,4513). Ceci signifie que la variance due au manque d'ajustement est non significative, validant ainsi le modèle.

Cette analyse indique que les modèles postulés de second degré sont significatifs et représentatifs de la relation : réponse- variable.

A partir des résultats expérimentaux obtenus, les coefficients de corrélations R^2 et R^2_{adj} ont été déterminés. Le R^2 de C_{chl_a}, C_{chl_b} et C_{car} est respectivement de 0,979, 0,993 et 0,968. Le R^2_{adj} pour chaque réponse (C_{chl_a}, C_{chl_b} et C_{car}) est respectivement de 0,958, 0,986 et 0,937. Ces coefficients indiquent ainsi que plus de 95% des variables sont expliquées par le modèle mathématique. Ces résultats indiquent une forte corrélation entre les valeurs observées et prédites (Figure 2.3). La figure (2.3) montrent bien une relation linéaire entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites par les relations mathématiques.

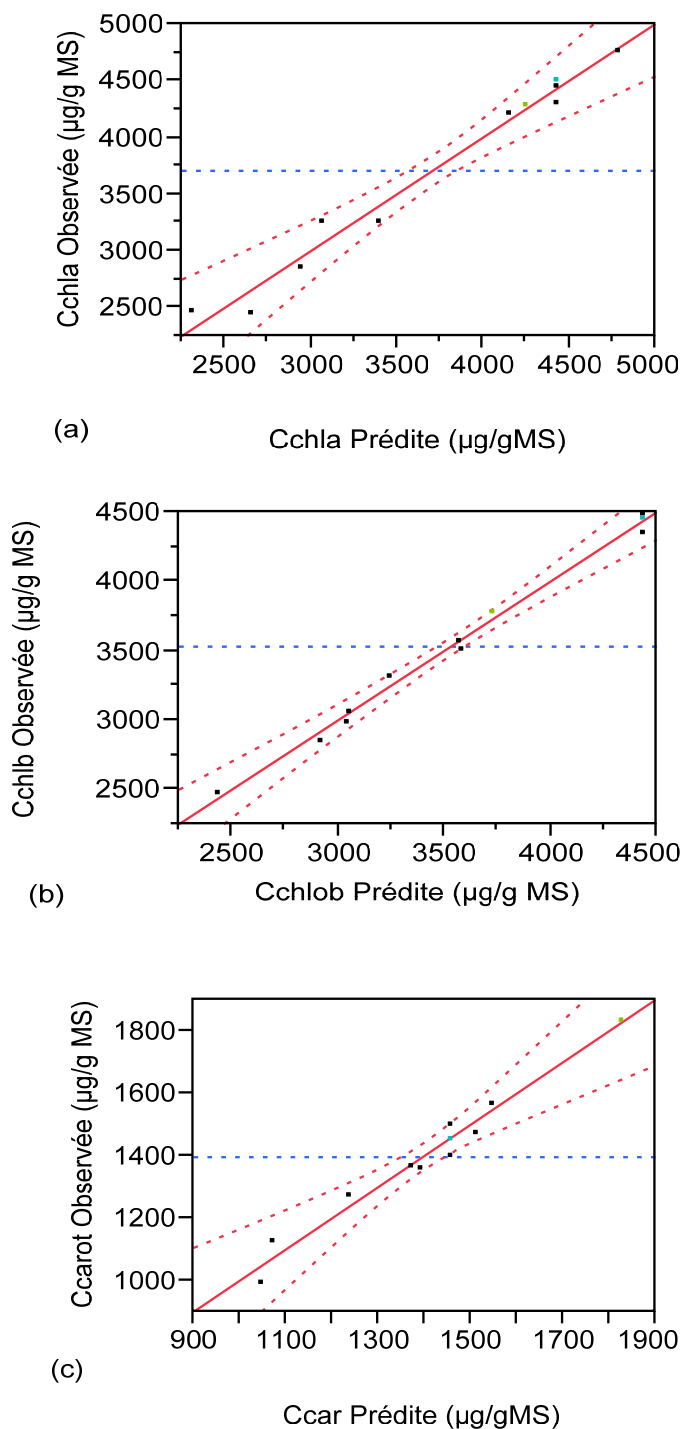


Figure 2.3. Réponses observées en fonction des réponses prédites pour les réponses : (a) C_{chl_a} , (b) C_{chl_b} et (c) C_{car} .

A partir de ces modèles on peut obtenir les surfaces de réponses pour chacune des réponses C_{chl_a} , C_{chl_b} et C_{car} . Les surfaces de réponses sont illustrées dans la Figure 2.4. Elles sont obtenues par la variation simultanée des deux facteurs X_1 et X_2 entre -1,414 et +1,414.

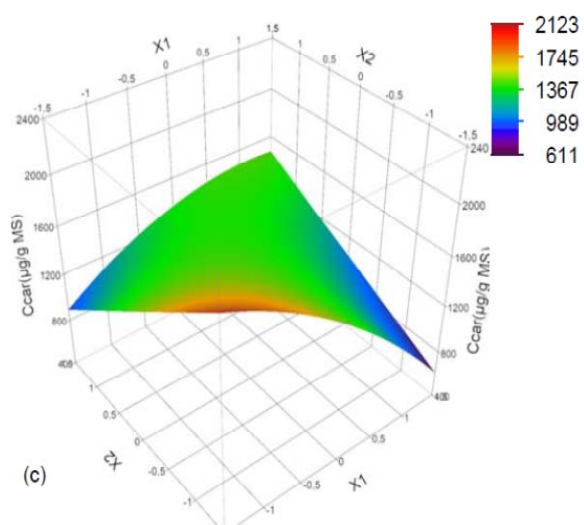
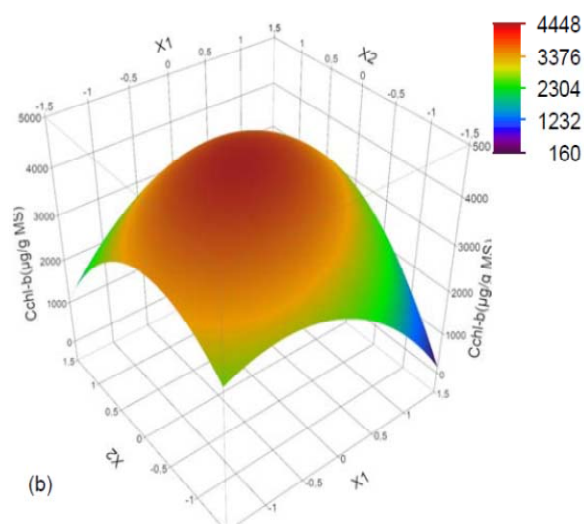
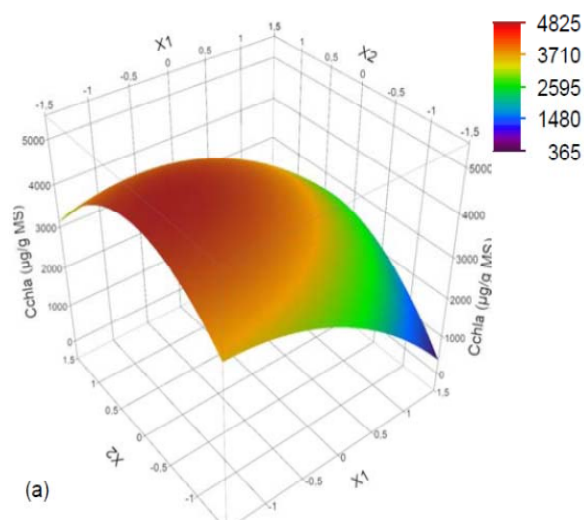


Figure 2.4 : Surface de réponses C_{chl_a} (a), C_{chl_b} (b) et C_{car} (c) en fonction de X_1 et X_2

Nous remarquons que l'allure des surfaces est différente pour les trois cas, soulignant le caractère singulier de chaque réponse au traitement. A titre d'exemple, lorsque X_1 et X_2 prennent la valeur de 0, la valeur de C_{chl_a} est de 4416,44 $\mu\text{g}/\text{MS}$, celle de C_{chl_b} est de 4433,2 $\mu\text{g}/\text{MS}$ et en fin celle de C_{car} est de 1453,1 $\mu\text{g}/\text{MS}$.

2.3.3. Elimination des ETMs

Le taux d'abattement de Cd^{2+} et Ni^{2+} ($R_{\text{Cd}^{2+}}$ et $R_{\text{Ni}^{2+}}$) ont été déterminés à partir de la relation 2.7 . Ces réponses sont mentionnées dans le tableau 2.9.

Tableau 2.9 : Réponses des essais $R_{\text{Cd}^{2+}}$ et $R_{\text{Ni}^{2+}}$.

Essai	Taux d'abattement (%)	
	$R_{\text{Cd}^{2+}}$	$R_{\text{Ni}^{2+}}$
1	76,09	60,5
2	69,16	48,53
3	30,25	50,43
4	61,18	38,68
5	80,28	59,7
6	48,25	38,41
7	23,33	63,32
8	47,21	44,81
9	33,09	25,73
10	28,5	24,28
11	27,63	28,16

Les effets de chaque facteur (X_1 et X_2) et les effets d'interaction sont déterminés et indiqués au tableau 2.10.

Tableau 2.10 : Effets principaux et d'interaction sur les réponses : $R_{Cd^{2+}}$ et $R_{Ni^{2+}}$

Facteur	Effet	Coef.	SE. Coef
<u>$R_{Cd^{2+}}$</u>			
Constante	59,48	29,74	3,7862
X_1	-24,7793151	-12,3896	2,3186
X_2	14,44285497	7,2214	2,3186
X_1X_2	18,93	9,465	3,2790
X_1^2	39,22625	19,6131	2,7597
X_2^2	10,23125	5,1156	2,7597
<u>$R_{Ni^{2+}}$</u>			
Constante	52,11333	26,0566	1,4052
X_1	-12,5071	-6,2535	0,8605
X_2	-12,47427	-6,2371	0,8605
X_1X_2	0,11	0,055	1,2169
X_1^2	21,98583	10,9929	1,0242
X_2^2	26,99583	13,4979	1,0242

A partir des valeurs de ces coefficients, le modèle mathématique de second degré peut être déterminé pour chacune des réponses comme suit :

$$R_{Cd^{2+}}(\%) = 29,74 - 12,3896X_1 + 7,2214X_2 + 9,465X_1X_2 + 19,6131X_1^2 + 5,1156X_2^2 \quad (2.17)$$

$$R_{Ni^{2+}}(\%) = 26,0566 - 6,2535X_1 - 6,2371X_2 + 0,055 X_1X_2 + 10,9929X_1^2 + 13,4979X_2^2 \quad (2.18)$$

De ces résultats, nous observons dans le cas de $R_{Cd^{2+}}$ que le facteur linéaire X_1 exerce un effet négatif sur la réponse alors que le facteur linéaire X_2 , l'interaction X_1X_2 et l'effet quadratique de X_1 et X_2 exercent un effet positif. Dans le cas de $R_{Ni^{2+}}$, les facteurs linéaires X_1 et X_2 exercent un effet négatif alors que l'effet d'interaction

ainsi que l'effet quadratique de X_1 et X_2 exercent un effet positif. Nous déduisons que le signe positif du coefficient représente un effet synergique tandis qu'un signe négatif indique un effet antagoniste.

L'analyse statistique des coefficients est citée au tableau 2.11. Nous remarquons dans le cas de $R_{Cd^{2+}}$ que tous les facteurs sont statistiquement significatifs avec une valeur-P inférieure à 0,05 à l'exception de l'effet quadratique X_2 . Pour le cas $R_{Ni^{2+}}$, tous les facteurs sont statistiquement significatifs avec une valeur-P inférieure à 0,05 sauf l'interaction X_1X_2 .

Tableau 2.11 : Analyse ANOVA pour les réponses : $R_{Cd^{2+}}$ et $R_{Ni^{2+}}$

Source	Analyse statistique				
	SS	ddl	MC	F_0	P
<u>$R_{Cd^{2+}}$</u>					
Modèle	4178,48	5	835,70	19,43	0,0027
X_1	1228,03	1	1228,03	28,55	0,0031
X_2	417,19	1	417,19	9,70	0,0264
$X_1.X_2$	358,34	1	358,34	8,33	0,0343
X_1^2	2172,28	1	2172,28	50,51	0,0009
X_2^2	147,78	1	147,78	3,44	0,1230
Résidus	215,04	5	43,008		
Lack of fit	197,83	3	65,94	7,66	0,1176
Erreur pure	17,21	2	8,61		
Total	4393,52	10			
<u>$R_{Ni^{2+}}$</u>					
Modèle	1957,84	5	391,57	66,10	0,0001
X_1	312,86	1	312,86	52,81	0,0008
X_2	311,21	1	311,21	52,54	0,0008
$X_1.X_2$	0,012	1	0,012	0,0020	0,9657
X_1^2	682,41	1	682,41	115,20	0,0001
X_2^2	1028,86	1	1028,86	173,68	<,0001
Résidus	29,62	5	5,92		
Lack of fit	21,93	3	7,311	1,9020	0,3628
Erreur pure	7,69	2	3,84		
Total	1987,46	10			

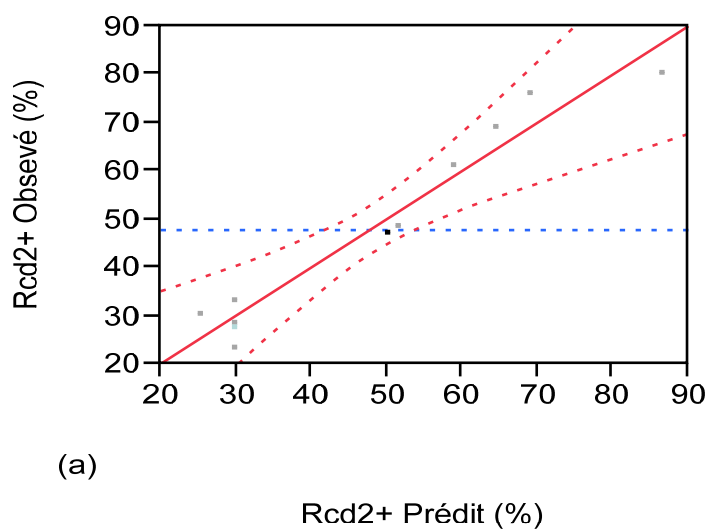
De ce fait, les éléments non significatifs sont éliminés des équations de régression (2.17 et 2.18), et on peut alors écrire ses équations de la manière suivante :

$$R_{Cd^{2+}}(\%) = 29,74 - 12,3896X_1 + 7,2214X_2 + 9,465X_1X_2 + 19,6131X_1^2 \quad (2.19)$$

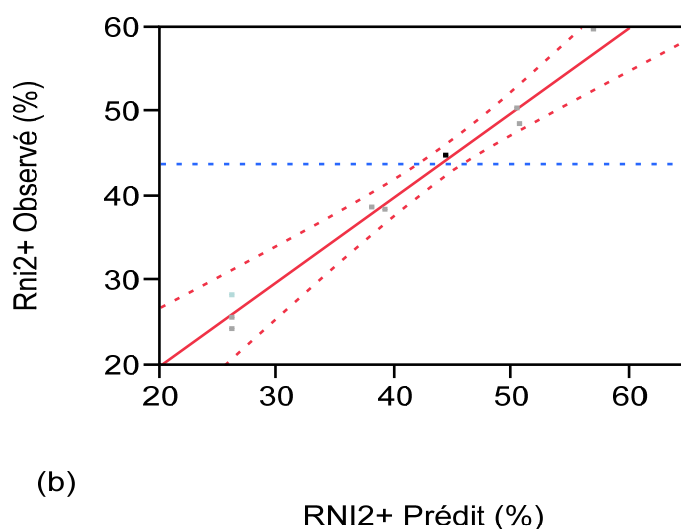
$$R_{Ni^{2+}}(\%) = 26,0566 - 6,2535X_1 - 6,2371X_2 + 10,9929X_1^2 + 13,4979X_2^2 \quad (2.20)$$

L'analyse de l'ANOVA a été réalisée et exposée au tableau 2.11. On constate pour chaque réponse, $R_{Cd^{2+}}$ et $R_{Ni^{2+}}$, que la valeur F calculée est élevée, elle est respectivement de 19,43 et 66,10. La probabilité associée à la détermination de cette valeur-F dans les deux cas est inférieure à 0,05, elle est respectivement de 0,0027 et 0,0001. Ces résultats indiquent que les variations de la variable réponse sont expliquées par les équations de régression. Le tableau 2.11 montre pour chaque cas, $R_{Cd^{2+}}$ et $R_{Ni^{2+}}$, une faible valeur de F pour le lack of fit. Elle est respectivement de 7,66 et 1,90 et accompagnée d'une probabilité supérieures à 0,05. Cette probabilité est respectivement de 0,118 et 0,36. Ceci signifie que la variance due au manque d'ajustement est non significative, validant ainsi le modèle. Cette analyse indique que les modèles postulés de second degré sont significatifs et représentatifs de la relation : réponse- variable.

Les coefficients de corrélation R^2 et R^2_{aj} ont été déterminés à partir des résultats expérimentaux obtenus. Le R^2 pour $R_{Cd^{2+}}$ et $R_{Ni^{2+}}$ est respectivement de 0,951 et 0,985. Le R^2_{aj} pour chaque réponse ($R_{Cd^{2+}}$ et $R_{Ni^{2+}}$) est respectivement de 0,902 et 0,970. Ces coefficients indiquent ainsi que plus de 95% des variables sont expliquées par le modèle mathématique. Ces résultats indiquent une forte corrélation entre les valeurs observées et prédites (Figure 2.5). Ces figures montrent bien une relation linéaire entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites par la relation mathématique.



(a)



(b)

Figure 2.5. Réponses observées en fonction des réponses prédites pour les réponses : (a) $R_{Cd^{2+}}$ et (b) $R_{Ni^{2+}}$

Egalement des surfaces de réponses peuvent être représentées à partir des modèles de régression. Les surfaces de réponses pour chaque cas $R_{Cd^{2+}}$ et $R_{Ni^{2+}}$ sont illustrées dans la Figure 2.6, elles sont obtenues en faisant varier simultanément X_1 et X_2 entre -1,414 et +1,414.

Nous observons un taux de plus de 90 % d'élimination de Cd^{2+} pour une valeur X_1 de -1,333 et X_2 de -1,075. Dans le cas $R_{Ni^{2+}}$, le maximum d'abattement (70 %) est atteint pour une valeur de X_1 de -1,333 et X_2 de -1,075.

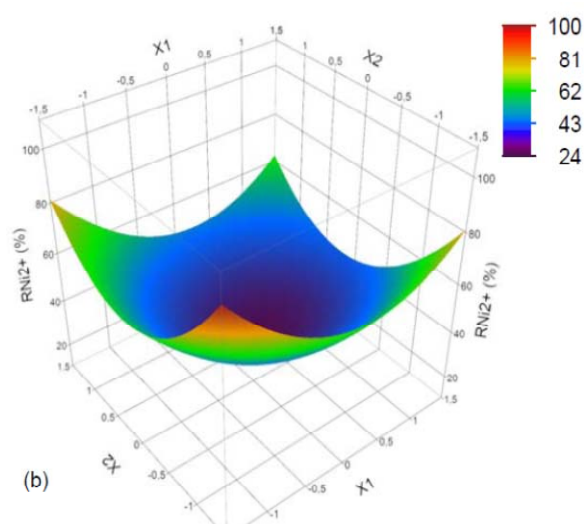
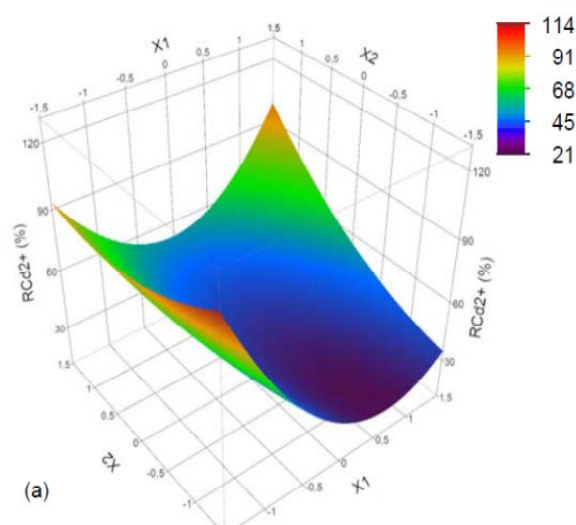


Figure 2.6 : Surface de réponses pour Cd^{2+} (a) et $\text{R}_{\text{Ni}^{2+}}$ (b) en fonction de X_1 et X_2 .

2.4. Discussion et conclusion

2.4.1. Paramètres écotoxicologiques

La toxicité des ETMs résulte d'une altération des processus vitaux tels le transport et le métabolisme. Cette toxicité se mesure par plusieurs paramètres tels le nombre de frondes, la masse de la biomasse, le taux de croissance, le taux de mortalité [30, 31, 113, 123], les teneurs en pigments photosynthétiques et la fluorescence chlorophyllienne [29, 106, 124].

Dans le cadre de ce travail, la réponse de *L. gibba* au stress métallique induit par le mélange cadmium-nickel a été estimée par l'analyse des paramètres de croissance (taux de croissance et rapport MF/MS) et de la teneur en pigments photosynthétiques. Le suivi de ces paramètres a été réalisé pour chaque essai après une durée de culture de quatre jours.

La réduction de croissance est une des réponses la plus fréquente et la première observable lorsque des plantes sont soumises à un stress [125]. Celle-ci peut se manifester par une réduction de la vitesse de croissance, une réduction de la biomasse, une altération du statut hydrique. Le taux de croissance relatif mesure l'évolution du nombre de frondes en fonction du temps et le rapport masse fraîche/masse sèche définit le statut hydrique de la plante.

La concentration en pigments photosynthétiques est un autre élément clé qui indique l'état physiologique des plantes. En effet les pigments jouent un rôle prépondérant dans la photosynthèse. Ils permettent l'assimilation de l'énergie lumineuse et la synthèse de la matière organique nécessaire à son développement et à sa croissance, mais aussi la protègent contre une multitude de facteurs [126]. En effet, les caroténoïdes jouent le rôle de pigments photosynthétiques secondaires mais participent particulièrement à la protection contre le stress oxydant [127, 128]. L'action antioxydante des caroténoïdes repose sur leur capacité à piéger l'oxygène singulet [129] et à neutraliser les radicaux peroxy. Ces pigments liposolubles (principalement β -carotènes) participent également à la prévention de la production d'ERO, soit par la désactivation des chlorophylles triplet, soit par la dissipation de l'excès énergétique au travers du cycle des xanthophylles [130].

Les résultats acquis ont montré que les paramètres mesurés varient d'un essai à un autre.

Nous observons des différences significatives des valeurs TCR et MF/MS en fonction des traitements, indiquant ainsi l'effet des traitements sur les réponses. De même, pour les teneurs en pigments photosynthétiques nous observons des différences en fonction des traitements appliqués. Ces observations dénotent les effets toxiques des mélanges cadmium-nickel sur les plantes. Ces observations corroborent avec la littérature où l'apport de contaminant métallique à un milieu de culture présente un risque potentiel pour le développement et la croissance des plantes [27, 30, 131].

Mégatli et al. [27] ont étudié l'effet individuel de trois métaux à différentes concentrations (cadmium [10^{-4} – 10^{-3} mg/l], cuivre [10^{-4} – 10^{-1} mg/l] et zinc [10^{-2} – 50 mg/l] sur une plante aquatique *L. gibba* durant dix jours de culture. Ils observent une inhibition de la croissance de la biomasse en fonction de la concentration du métal. Une inhibition plus importante est enregistrée aux fortes concentrations en métaux. Appenroth et al. [30] ont observé lors de la culture de *Spirodela polyrhiza* et de *Lemna minor* sur un milieu contenant du nickel (0 – 100µM) durant 7 jours de culture une augmentation du nombre de frondes pour des valeurs en nickel inférieures à 4µM. Au-delà de cette valeur, une réduction du nombre de frondes est observée. Ils observent également une réduction de la concentration des chlorophylles a et b et une légère stabilité des caroténoïdes en fonction des concentrations en nickel dans le milieu. Ils remarquent aussi que la chlorophylle a est plus sensible que la chlorophylle b. Uruc- Parlak et DemirezenYilmaz [131] ont observé une réduction de la teneur en chlorophylle chez *L. gibba* exposée à différentes concentration en cadmium durant sept jours. Cette réduction est plus importante pour des concentrations en cadmium supérieure à 5 mg/l.

La réduction du taux de croissance peut être la conséquence de plusieurs phénomènes telle la perturbation de l'activité de certaines enzymes intervenant dans des processus physiologiques essentiels au développement (photosynthèse, respiration) ou encore l'induction d'un stress oxydatif pouvant conduire à la mort cellulaire [50, 132].

Selon Yang et al. [133], les ETMs exercent un effet direct sur la biosynthèse de la chlorophylle. Une réduction des teneurs en pigment est attribuée à l'effet toxique des contaminants sur l'activité de l'acide δ-aminolévulinique deshydratase, enzyme clé dans la voie de biosynthèse de la chlorophylle [35, 134]. D'autres travaux invoquent le rôle des ERO, produits en excès par la présence des ETMs. L'oxydation des chlorophylles par les ERO inhibe la photosynthèse [30].

Küpperet al. [135] ont observé la substitution de l'ion Mg^{2+} présent dans les molécules de chlorophylles par d'autres ETMs (Cu, Zn, Cd, Hg, Pb ou Ni) provoquant une rupture de la molécule. Ce phénomène a été observé chez *L. minor* et d'autres plantes aquatiques. Selon Young [128], la chlorophylle a et les caroténoïdes semblent être plus sensibles au stress que la chlorophylle b, un faible taux de dégradation de la chlorophylle b a été enregistré.

Wolterbeck et Verberg [136] ont observé que les métaux à haut pouvoir toxique sont les plus électronégatifs. En effet Charles et al. [137] ont constaté que le cuivre est plus toxique que l'uranium. D'une part, le Cu est plus électronégatif et d'autre part par sa forte capacité à se lier aux ligands des surfaces cellulaires par des liaisons covalentes.

L'utilisation des plans de surface, plus particulièrement le plan centré réduit, nous a permis d'apprécier l'effet individuel du cadmium et du nickel et l'effet d'interaction entre ces deux métaux sur les biomarqueurs étudiés. Une modélisation de l'évolution de ces réponses en fonction de ces deux variables a pu être réalisée pour une meilleure compréhension du mécanisme.

Dans le cas des paramètres de croissance, nous avons remarqué que l'augmentation de la concentration initiale en cadmium a un effet négatif sur le taux de croissance et sur le rapport MF/MS alors que l'augmentation de la concentration initiale en nickel a un effet positif sur le taux de croissance et un effet négatif sur le rapport MF/MS. Un effet d'interaction entre les deux variables est observé, il est positif dans le cas du TCR et négatif dans le cas de MF/MS. De même que les résultats montrent la non linéarité des réponses en fonction des variables par la présence des termes quadratiques.

Concernant la teneur en pigments chlorophylliens, nous avons observé un effet négatif lors de l'augmentation de la concentration initiale en cadmium sur la teneur en chlorophylle a et b. Un effet positif de l'augmentation de la concentration initiale en nickel a été observé. Un effet d'interaction positif entre ces deux variables a été observé pour ces mêmes réponses. Pour la concentration en caroténoïdes, nous avons remarqué que l'augmentation de la concentration en cadmium et de la concentration en nickel engendrent un effet négatif sur cette teneur. Un effet d'interaction positif entre ces deux métaux est observé. Aussi, nous avons constaté la non linéarité de ces réponses en fonction des variables.

Le signe positif observé définit un effet synergique des variables sur les réponses quand au signe négatif il indique un effet antagoniste sur les réponses.

Globalement, les réponses des paramètres de croissance et des concentrations en pigments photosynthétiques sont dépendantes de l'espèce métallique et de sa concentration dans le milieu de culture mais aussi par la

présence d'une autre espèce métallique dans le même milieu. Ces observations corroborent avec ceux de la littérature [19, 20, 138].

Dirilgen [20], en utilisant un plan d'expérience, a étudié la toxicité d'un mélange binaire (Pb^{2+} et Hg^{2+}) sur *L. minor*. Un effet additif entre les facteurs étudiés sur le taux de croissance a été observé. Demim et al. [138], par l'utilisation d'un plan d'expérience, ont étudié l'effet de cinq métaux (Cd^{2+} , Cr^{6+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} et Ni^{2+}) sur la croissance et la concentration des pigments photosynthétiques d'une plante aquatique *L. gibba*. Ils ont observé des effets antagonistes et synergiques des facteurs sur les réponses et ont observé l'effet combiné type et concentration du métal sur ces réponses. Horvat et al. [19] ont étudié la toxicité d'une eau usée contenant sept ETMs (Pb, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu et Zn) sur *L. minor* et ont conclu que la réponse de tolérance ou d'intoxication est dépendante de la concentration des ETMs. Ils observent également une inhibition de la croissance durant les 7 premiers jours d'exposition. Au-delà de cette durée une diminution d'inhibition de croissance est observée. Ils attribuent cette situation à des mécanismes de détoxification développés par la plante. Ils ont constaté également que le Cu et le Ni étaient plus toxiques que le Pb.

2.4.2. Réduction des ETMs

Le pouvoir de *L. gibba* à éliminer le cadmium et le nickel a été estimé par l'analyse des concentrations initiales et finales de ces derniers dans le milieu de culture. Les taux d'abattement ont été déduits.

Les résultats acquis ont montré le pouvoir de *L. gibba* à réduire la charge métallique et que les taux d'abattements sont variables en fonctions des essais. Ces résultats indiquent l'effet de la concentration des ETMs du milieu sur les taux d'abattement.

Les résultats confirment le pouvoir des plantes aquatiques à réduire les divers polluants métalliques. Ces observations sont similaires à la littérature [101, 139, 140].

L'application des plans de surface par la méthode des plans centrés réduits nous a aidé à estimer l'effet individuel du cadmium et du nickel ainsi que celui de

l'interaction entre ces derniers sur les taux d'abattement. Suite aux résultats obtenus une modélisation des réponses en fonction de ces deux variables a été possible.

Dans le cas du taux d'abattement du cadmium, nous avons remarqué que l'augmentation de la concentration initiale en cadmium a un effet négatif sur cette réponse alors que l'augmentation de la concentration initiale en nickel a un effet positif. Un effet d'interaction positif entre les deux variables est observé.

Pour le taux d'abattement du nickel, nous avons remarqué que l'augmentation de la concentration initiale en cadmium et celle en nickel ont un effet négatif sur cette réponse. Un effet d'interaction positif entre les deux variables est observé.

Pour les deux réponses, nous avons observés la présence des termes quadratiques, qui indique la non linéarité des réponses en fonction des variables.

Le signe positif observé définit un effet synergique des variables sur les réponses quant au signe négatif il indique un effet antagoniste sur les réponses.

Le taux d'élimination des ETMs (Cd^{2+} et Ni^{2+}) est dépendant du type de métal et de sa concentration dans le milieu de culture d'une part et d'autre part par la présence conjointe d'une autre espèce métallique. Ces observations corroborent ceux de la littérature [20, 26, 101, 141].

Miretzky et al. [101] ont étudié l'élimination simultanée de plusieurs métaux lourds Fe, Cu, Zn, Mn, Cr et Pb) par trois espèces aquatiques (*P. stratiotes*, *S. intermedia* et *L. minor*). Ils ont noté des taux d'élimination élevés pour chaque métal et ont constaté que le taux d'élimination des métaux est dépendant de la concentration initiale du métal. Dirilgen [20] a étudié l'accumulation simultanée du plomb et du mercure par *L. minor*. Il a conclu à un effet antagoniste entre les métaux et à l'importance de l'effet conjoint (concentration x type métal) sur l'accumulation des métaux. Monferran et al. [26] ont étudié l'élimination simultanée du Cr^{6+} et du Cu^{2+} par *P. pusillus* et ont observé que la bioaccumulation du Cr^{6+} est significativement augmentée en présence du Cu^{2+} , indiquant un effet synergique. Demim et al. [141] ont étudié l'élimination de cinq métaux (Cd^{2+} , Cr^{6+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} et Ni^{2+}) par une plante aquatique *L. gibba*. Ils ont observé des effets antagonistes et synergiques des facteurs sur les réponses de même qu'une relation entre le type de métal et sa concentration.

Ces résultats montrent clairement le pouvoir des plantes aquatiques à réduire les polluants métalliques. Cependant les rendements d'épuration sont variables. La capacité des plantes aquatiques à accumuler les différentes espèces métalliques est liée surtout à l'affinité de la plante au métal considéré et à la présence simultanée de plusieurs ETMs. La présence de plusieurs métaux dans un milieu crée des compétitions d'absorption [71, 140]. Selon Prasad et al. [32] l'interaction antagoniste entre les métaux peut être liée à une similitude d'affinité de deux métaux aux mêmes ligands présents à la surface des cellules, réduisant ainsi le nombre de sites de liaisons pour chaque métal.

Toute fois, d'autres facteurs peuvent également influencer l'élimination des ETMs par les plantes aquatiques, tels la densité de la plante ([89, 102] et le temps d'exposition [26, 142, 143].

CHAPITRE 3
COMPORTEMENT DE *L. gibba* AU CADMIUM-NICKEL

CHAPITRE 3

COMPORTEMENT DE *L. gibba* AU CADMIUM-NICKEL

3.1. Introduction

La présence des ETMs dans les milieux aquatiques, générés par les activités humaines et industrielles [20], causent de sérieux problèmes écologiques [19, 20, 98]. Selon Yılmaz et Parlak [36], les milieux aquatiques sont plus sensibles que les milieux terrestres. Les ETMs sont à l'état soluble dans ces milieux facilitant leurs adsorptions et leurs accumulations par les organismes aquatiques. Les plantes aquatiques représentent le premier point de contact direct avec les métaux.

Les plantes aquatiques ont de grande capacité à accumuler et à tolérer de grandes concentrations en ETMs et elles sont considérées comme des bioindicateurs idéaux de contamination métallique [144]. L'accumulation des ETMs dans les macrophytes est influencée par plusieurs facteurs d'ordre biologique lié à la plante (espèce et âge) et d'ordre environnemental (température, salinité et pH du milieu et concentration des ions métalliques). Cependant, cette accumulation est particulièrement liée à la concentration des ETMs dans les sédiments et les eaux [145] et à la spéciation du métal [144].

Les ETMs jouent un rôle important dans le métabolisme des plantes, certains sont considérés comme des micronutriments essentiels et d'autres comme toxiques. Les micronutriments essentiels jouent un rôle clé de cofacteurs enzymatiques. Au-delà d'une certaine concentration ils deviennent toxiques [146]. Des inhibitions de croissance et des atteintes de la structure cellulaire ont été observées [13, 51, 147].

Les activités biochimiques et physiologiques des plantes sont affectées de plusieurs manières par les ETMs.

Certains se lient au groupement sulphydril de certaines enzymes provoquant leurs inhibitions [148]. D'autres provoquent un déséquilibre de transport de certains

métaux essentiels tel que Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} en altérant la translocation et/ ou la substitution de ces éléments. Aussi, ils affectent la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO), telle l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle d'une manière exagérée. A l'état physiologique normal, les plantes produisent des ERO continuellement lors des processus métaboliques et sont soumis à un contrôle métabolique. En condition de stress, notamment en présence des ETMs, l'augmentation de leurs concentrations est observée et n'est plus soumise au contrôle antioxydant de la plante créant un stress oxydatif [149, 150]. Au niveau cellulaire, les cibles privilégiées des ERO sont l'ADN, les phospholipides membranaires et les pigments photosynthétiques [37, 151].

Face à ce stress plusieurs mécanismes de défense et de tolérance sont mis en place par les plantes. Certains sont d'ordre enzymatiques tels la superoxyde dismutase, la peroxydase et la catalase [131,150, 152] et d'autres non enzymatiques, les métabolites antioxydants tels l'acide ascorbique, le glutathion, le polyhydroxyphénol, les sucres solubles et les acides aminés (histidine, proline) [150, 153 – 155].

Notre étude a consisté à évaluer le comportement de la lentille d'eau, *L. gibba*, face à un mélange binaire cadmium-nickel. Des paramètres biochimiques de la plante (sucre, acides aminés et proline) ont été mesurés et les concentrations en ces ions ont été déterminées.

L'étude comportera deux parties distinctes et complémentaires :

- La première consiste à observer l'effet direct du mélange métallique sur *L. gibba*,
- La deuxième à pour but d'examiner le comportement des *L. gibba* pré-stressées cultivées dans de nouvelles conditions normales : milieu nutritif sans cadmium et de nickel.

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé ainsi que les conditions de culture sont identiques à ceux du chapitre 2 (2.2.1).

3.2.2. Développement des expériences

3.2.2.1. Contamination aux ETMs

Des récipients en PVC d'une capacité de 500 mL ont été utilisés. 100 frondes de *L. gibba* ont été cultivées dans 200 mL de milieu nutritif contaminé par le cadmium et le nickel selon les concentrations définies dans le Tableau 3.1 et durant 4 jours chacune. Les pourcentages des concentrations en cadmium et en nickel ont été choisis dans l'intervalle de concentration étudié au chapitre 2. Ces concentrations ont été sélectionnées pour avoir de bon taux d'abattement et ne générant pas une toxicité très élevée. Tous les récipients ont été couverts par des verres de montres pour éviter toute évaporation du milieu de culture.

Tableau 3.1. Concentrations en cadmium et en nickel dans le milieu de culture.

Concentrations (%)	Essais	Composition (mg/l)	
		Cd ²⁺	Ni ²⁺
0	Témoin	0	0
10	Traitement 1(T1)	0,08	0,46
25	Traitement 2 (T2)	0,143	0,57
50	Traitement 3 (T3)	0,25	0,75

3.2.2.2. Réversibilité des effets du stress métallique sur *L. gibba*

Après quatre jours de contamination dans les mêmes conditions que cités précédemment (3.2.2.1), les plantes sont récupérées, rincées dans trois bains d'eau distillée puis remis dans un milieu nutritif (milieu de Chollet) sans cadmium et sans nickel. Deux cultures d'une durée de quatre jours sont réalisées successivement dans un milieu ne contenant pas de cadmium et de nickel.

3.2.3. Analyse biochimique :

Les plantes sont prélevées après traitement, rincées à l'eau distillée et séchées à 60°C durant 48 heures.

3.2.3.1. Extraction et dosage des sucres totaux solubles

Le contenu en sucres solubles est déterminé selon la méthode de Dubois [156]. 3 mL d'éthanol à 80% sont versés dans des tubes à essai contenant 100 mg de matière sèche (plantes séchées). Après incubation à température ambiante durant 48 heures, les tubes sont portés au bain Marie à 70°C pour évaporer l'alcool. Après refroidissement, 20 mL d'eau distillée sont ajoutés aux tubes. A 1 mL de cet extrait est ajouté 1 mL de solution de phénol à 5%. Après une faible agitation, 5 mL d'acide sulfurique concentré sont ajoutés. Après homogénéisation, le mélange est laissé à température ambiante 15 mn puis remis au bain marie à 30°C durant 30 mn. L'absorbance du chromogène est mesurée à 490 nm. La concentration en sucre est alors déterminée en référence à une courbe d'étalonnage établie à partir de solution de glucose. Les résultats sont exprimés en μ moles d'équivalent glucose/g MS.

3.2.3.2. Extraction et dosage des acides aminés

Le contenu en acides aminés est déterminé selon la méthode de Yemm et Cocking [157]. 3 mL d'éthanol à 80% sont versés dans des tubes à essai contenant 100 mg de matière sèche. Après incubation à température ambiante durant 48 heures, les tubes sont portés au bain Marie à 70°C pour l'évaporation de l'alcool. Après refroidissement, 20 mL d'eau distillée sont ajoutés aux tubes. 200 μ l de cet extrait sont mélangés à 500 μ l de tampon citrate (160 mM, pH 4,6). Après homogénéisation, 1 mL du mélange réactionnel ninhydrine-acide ascorbique est ajouté (la solution de ninhydrine est préparée extemporanément (0,575 g de ninhydrine dans 60 mL d'éthanol à 70 %), additionné de 2 mL d'acide ascorbique (1%, p/v)). Les tubes sont agités, fermés et placés au bain-marie à 100°C pendant 20 min. Une fois refroidis dans de la glace pilée, 3 mL d'éthanol à 70 % sont ajoutés et l'ensemble est agité. L'absorbance du chromogène est mesurée à 570 nm. La concentration en acides aminés est déterminée en référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution de leucine. Les résultats sont exprimés en μ moles d'équivalent leucine/g MS.

3.2.3.3. Extraction et dosage de la proline

La concentration en proline est déterminée selon la méthode de Trolls et Lindsley [158] simplifiée par Rascio et al. [159]. 100 mg de plantes séchées placés dans des tubes à essai fermés contenant 2 mL de méthanol à 40% sont chauffés 1 h au bain-marie à 85°C. Une fois refroidis, 1 mL de la solution d'extraction est ajouté à 1 mL d'acide acétique, 25 mg de ninhydrine et 1 mL du mélange (eau distillée- acide acétique- acide orthophosphorique de densité 1,7) (120, 300, 80 : v / v / v). L'ensemble est porté à ébullition 30 mn au bain-marie. Après refroidissement 5 mL de toluène sont ajoutés. L'ensemble est vortexé, deux phases se forment. La phase supérieure contenant la proline est récupérée. L'absorbance du chromogène est mesurée à 520 nm. La concentration en proline est déterminée en référence à une courbe d'étalonnage établie à partir d'une solution de proline. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{moles/g MS}$.

3.2.4. Dosage des ETMs

Les concentrations en cadmium et en nickels dans le milieu de culture sont déterminées à des intervalles de temps réguliers. Le dosage est réalisé comme cité précédemment dans le chapitre 2 (cf. 2.6.).

3.2.5. Analyse statistique des résultats

Les résultats présentés sont les moyennes de trois expériences indépendantes avec trois répétitions. Les valeurs obtenues correspondent aux moyennes \pm erreur standard. L'analyse statistique a été réalisée par le test de student et l'analyse de la variance ANOVA en utilisant le logiciel Statistica 8.0 (Stat Soft. Inc.).

3.3. Résultats

Les résultats sont présentés en deux parties, l'une traitera des effets combinés cadmium-nickel et l'autre abordera l'effet réversible supposé des ETMs.

3.3.1. Effet du cadmium-nickel sur *L. gibba*

3.3.1.1. Effet sur le taux de sucre

La détermination de la concentration des sucres en présence et en absence des éléments métalliques chez *L. gibba* a été réalisée à des intervalles de temps réguliers de 24 heures durant 4 jours. L'évolution des concentrations des sucres en fonction du temps est illustrée à la Figure 3.1.

Nous remarquons dans le cas du lot témoin une faible augmentation de la concentration des sucres en fonction du temps. Cette concentration passe de 20,20 à 22,30 μmol équivalent glc/g MS, équivalant à une augmentation de l'ordre de 9,42 %. Cette faible augmentation est statistiquement significative ($p= 0,003931$).

Traitement 1 (T1) : nous remarquons à la figure 3.1 (a) que la concentration des sucres augmente graduellement en fonction du temps. Elle évolue de 22,10 à 26,60 μmol équivalent glc/g MS, soit une augmentation de 20,36 %.

Comparé au témoin, l'analyse statistique permet de constater une différence très significative entre les valeurs des concentrations enregistrées et celles du lot traité (T1) quelque soit le temps d'exposition : p est inférieure à 0,05. La valeur p pour chaque jour d'exposition, J1, J2, J3 et J4, est respectivement de 0,023387, 0,000058, 0,000023 et 0,000019.

Traitement 2 (T2) : nous remarquons à la Figure 3.1 (b) que la concentration des sucres augmente progressivement en fonction du temps pour passer de 23,5 à 29 μmol équivalent glc/g MS, soit une augmentation de 23,71%.

Comparé au témoin, l'analyse statistique permet de constater une différence très significative entre les valeurs des concentrations enregistrées et celles du lot traité (T2) pour les quatre jours de traitement : p inférieure à 0,05. Pour le premier, le deuxième, le troisième et le quatrième jour la probabilité est respectivement de 0,001422, 0,000200, 0,000095 et 0,000004.

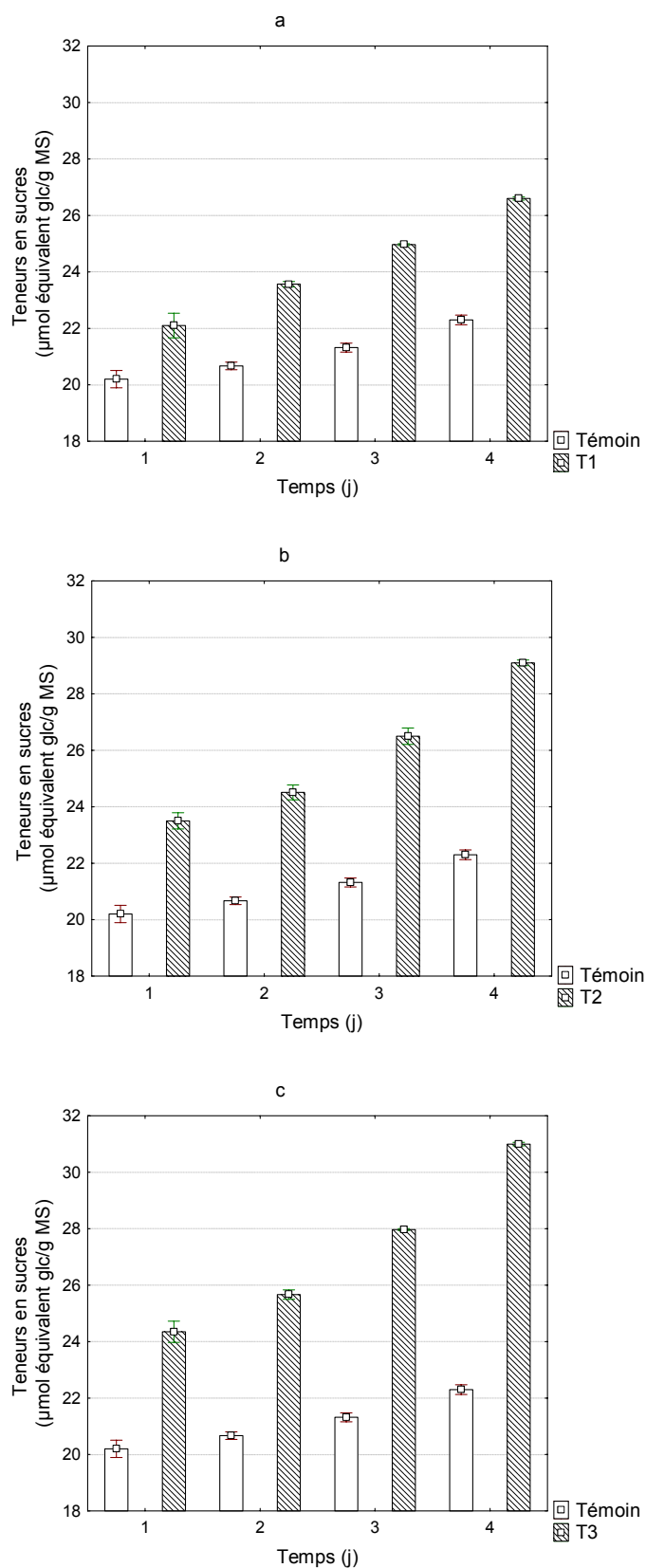


Figure 3.1 : Evolution de la teneur des sucres en fonction du temps.

(a) T1 : 0,08 mg/l Cd^{2+} et 0,46 mg/l Ni^{2+} , (b) T2 : 0,143 mg/l Cd^{2+} et 0,57 mg/l Ni^{2+} et (c) T3 : 0,25 mg/l Cd^{2+} et 0,75 mg/l Ni^{2+} .

Traitement 3 (T3) : nous remarquons à la Figure 3.1 (c) une augmentation graduelle de la concentration des sucres en fonction du temps. Cette concentration passe de 24,35 à 31 μmol équivalent glc/g MS, soit une augmentation de 27,31 %. Comparé au témoin, l'analyse statistique permet de constater une différence très significative entre les valeurs des concentrations enregistrées et celles du lot traité (T3) pour les quatre jours de traitement : p inférieure à 0,05. Pour le premier, le deuxième, le troisième et le quatrième jour la probabilité est respectivement de 0,001015, 0,000020, 0,000002 et 0,000001.

En conclusion, nous observons une accumulation significative de la concentration des sucres en fonction du temps d'exposition aux ETMs.

L'évolution de la concentration des sucres en fonction des traitements (témoin, T1, T2 et T3) pour chaque jour de traitement est illustrée par la Figure 3.2.

Entre le témoin et les traitements T1, T2 et T3, nous observons :

- à j1 (Figure 3.2 (a)) une augmentation de la concentration des sucres pour les trois cas étudiés. Elle est respectivement de 9,41, 16,34 et 20,54%.

- à j2 (Figure 3.2 (b)) une augmentation de la concentration des sucres pour les trois cas étudiés. Elle est respectivement de 14,04, 18,64 et 24,20 %.

- à j3 (Figure 3.2 (c)) une augmentation de la concentration des sucres pour les trois cas étudiés. Elle est respectivement de 17,13, 24,35 et 31,20%.

- à j4 (Figure 3.2 (d)) une augmentation de la concentration des sucres pour les trois cas étudiés. Elle est respectivement de 19,28, 30,5 et 39%.

Une augmentation de l'accumulation des sucres en fonction des traitements appliqués est observée.

Pour confirmer ces observations une analyse ANOVA des effets des traitements, avec un risque d'erreur fixé à 5%, a été réalisée. Les valeurs de la probabilité sont respectivement de 0,000179, 0,000000, 0,000000 et 0,000000 pour chaque durée de traitement. L'effet significatif des traitements est observé.

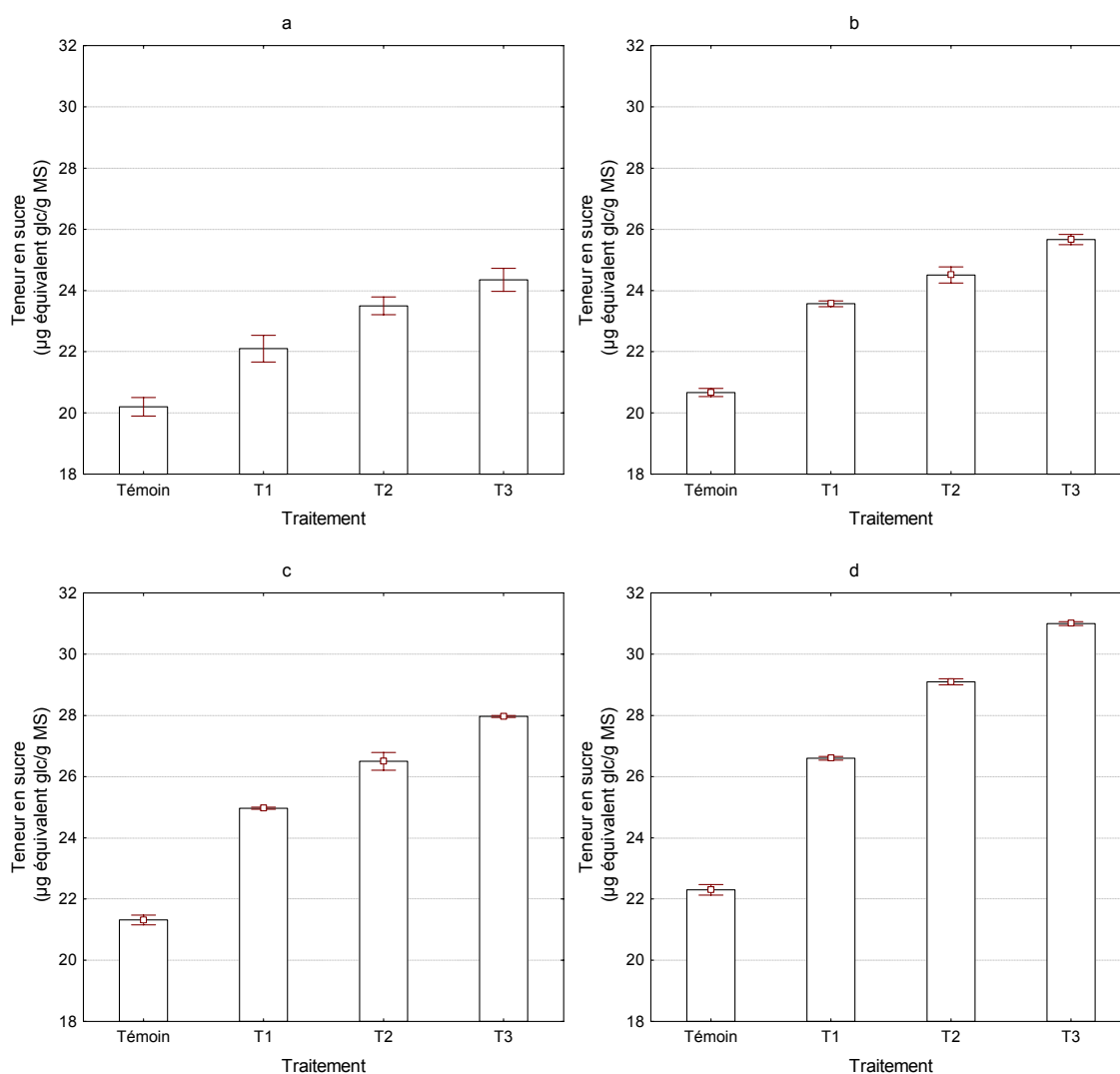


Figure 3.2. Concentration des sucres solubles en fonction des traitements appliqués.

(a) j1, (b) j2, (c) j3 et (d) j4. T1 : 0,08 mg/l Cd^{2+} et 0,46 mg/l Ni^{2+} ;

T2 : 0,143 mg/l Cd^{2+} et 0,57 mg/l Ni^{2+} , T3 : 0,25 mg/l Cd^{2+} et 0,75 mg/l Ni^{2+} .

3.3.1.2. Effet sur le taux des acides aminés

La détermination de la concentration des acides aminés en présence et en absence des éléments métalliques chez *L. gibba* a été réalisée à des intervalles de temps réguliers de 24 heures durant 4 jours. Les résultats des teneurs en acides aminés solubles en fonction du temps sont illustrés à la Figure 3.4.

D'après la Figure 3.4, nous remarquons une augmentation très modérée de la concentration des acides aminés dans le lot témoin, cette concentration évolue de

10,33 à 11 μmol équivalent leu/g MS, équivalant à une augmentation de la concentration de l'ordre de 6,5%. Cette augmentation modérée est statistiquement non significative ($p = 0,205106$).

Traitement (T1) : nous remarquons à la Figure 3.4 (a) que la concentration des acides aminés libre augmente progressivement en fonction du temps, elle passe de 11,86 à 14,68 μmol équivalent leu/g MS, soit une augmentation de 23,77%.

Comparé au témoin, l'analyse statistique permet de constater une différence très significative entre les concentrations enregistrées et celles du lot traité (T1) quelque soit le temps d'exposition : p est inférieure à 0,05. La valeur- p pour chaque jour d'exposition, J1, J2, J3 et J4, est respectivement de 0,029938, 0,004563, 0,009299 et 0,000433.

Traitement 2 (T2) : nous remarquons à la Figure 3.4 (b) que la concentration des acides aminés augmente progressivement en fonction du temps. Elle passe de 11,93 à 15,68 μmol équivalent leu/g MS, soit une augmentation de 31,43%.

Comparé au témoin, l'analyse statistique permet de constater une différence très significative entre les concentrations enregistrées et celles du lot traité (T2) : $p < 0,05$. Pour le premier, le deuxième, le troisième et le quatrième jour la probabilité est respectivement de 0,023248, 0,004238, 0,000021 et 0,000014.

Traitement 3 (T3) : nous remarquons à la Figure 3.4 (c) une augmentation graduelle de la concentration des acides aminés en fonction du temps. Cette concentration passe de 12,66 à 17,22 μmol équivalent leu/g MS, soit une augmentation de 36%.

Comparé au témoin, l'analyse statistique permet de constater une différence très significative entre les concentrations enregistrée et celles du lot traité (T3) : $p < 0,05$. Pour le premier, le deuxième, le troisième et le quatrième jour la probabilité est respectivement de 0,008385, 0,000526, 0,000008 et 0,000003.

En conclusion, une augmentation de la concentration des acides aminés est observée durant le temps d'exposition.

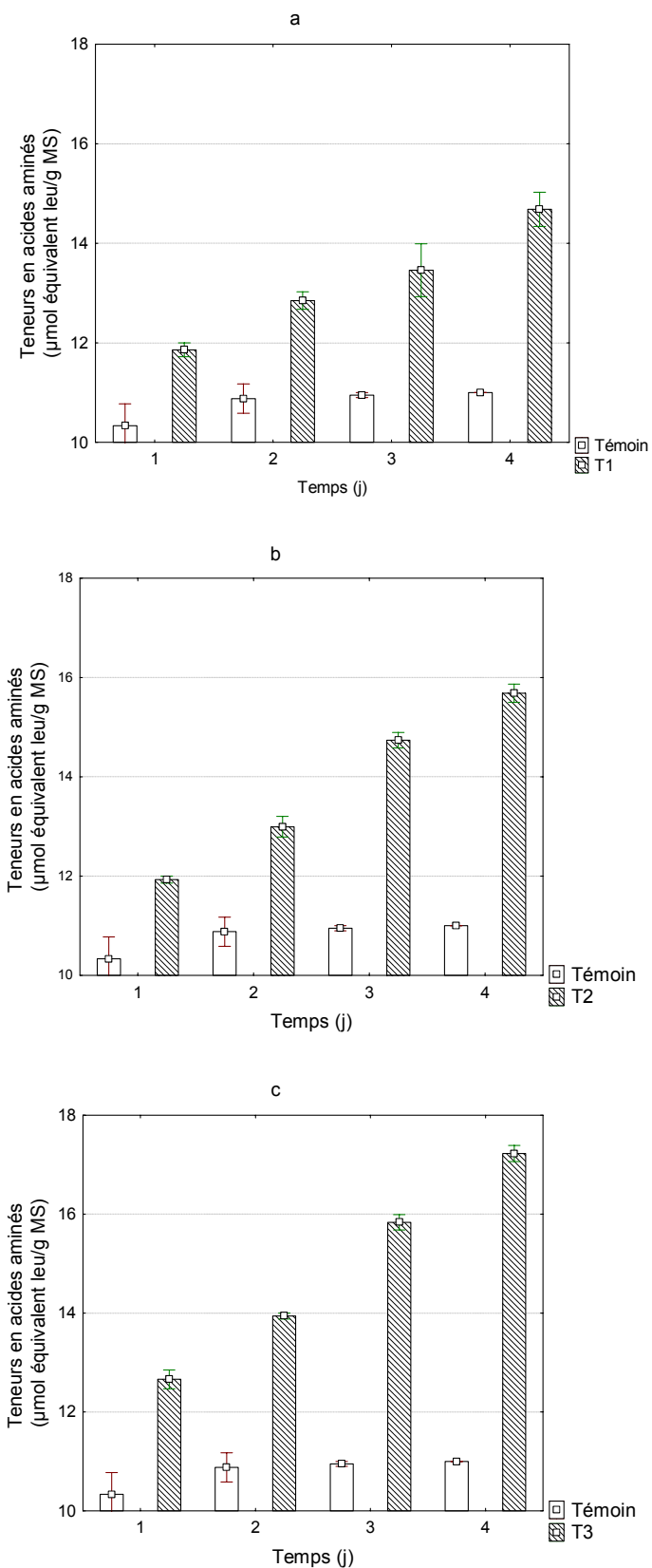


Figure 3.4. Evolution de la concentration des acides aminés en fonction du temps.

(a) T1 : 0,08 mg/l Cd²⁺ et 0,46 mg/l Ni²⁺, (b) T2 : 0,143 mg/l Cd²⁺ et 0,57 mg/l Ni²⁺

et (c) T3 : 0,25 mg/l Cd²⁺ et 0,75 mg/l Ni²⁺.

L'évolution de la concentration des acides aminés en fonction des traitements (témoin, T1, T2 et T3) pour chaque jour de traitement est illustrée à la Figure 3.5.

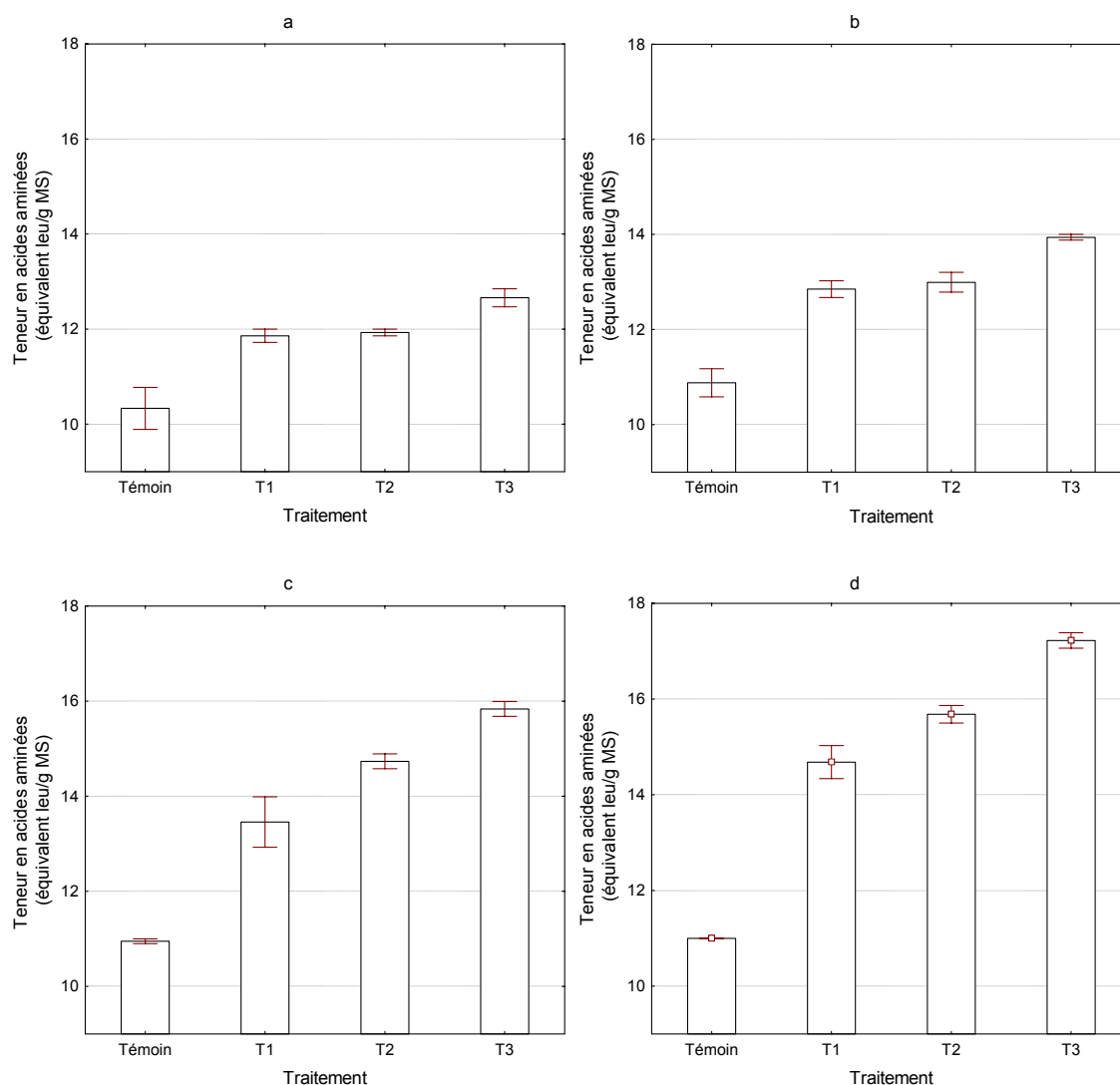


Figure 3.5. Concentration des acides aminés en fonction des traitements appliqués.

(a) j1, (b) j2, (c) j3 et (d) j4. T1 : 0,08 mg/l Cd^{2+} et 0,46 mg/l Ni^{2+} ;

T2 : 0,143 mg/l Cd^{2+} et 0,57 mg/l Ni^{2+} , T3 : 0,25 mg/l Cd^{2+} et 0,75 mg/l Ni^{2+} .

Entre le témoin et les traitements T1, T2 et T3, nous observons :

- à j1 (Figure 3.5 (a)) une augmentation de la concentration des acides aminés pour les trois cas étudiés, elle est respectivement de 14,81, 15,48 et 22,55%.

- à j2 (Figure 3.5 (b)) une augmentation de la concentration des acides aminés pour les trois cas étudiés, elle est respectivement de 18, 19,4 et 28 %.

- à j3 (Figure 3.5 (c)) une augmentation de la concentration des acides aminés pour les trois cas étudiés, elle est respectivement de 23, 34,5 et 44,56%.

- à j4 (Figure 3.5 (d)) une augmentation de la concentration des acides aminés pour les trois cas étudiés, elle est respectivement de 33,45, 42,54 et 56,54%.

Selon ces résultats, nous constatons une augmentation de la concentration des acides aminés proportionnelle aux traitements appliqués.

L'analyse de l'ANOVA des effets des traitements sur le taux d'acides aminés, avec un risque d'erreur de 5%, a été réalisée. Pour chaque durée de traitement, 1, 2, 3 et 4 jours, la valeur de la probabilité est respectivement de 0,001204, 0,000036, 0,000013 et 0,000000. L'effet significatif des traitements est observé.

3.3.1.3. Effet sur le taux de proline

La détermination de la concentration de la proline en présence et en absence des éléments métalliques chez *L. gibba* a été réalisée à des intervalles de temps réguliers de 24 heures. Les résultats des teneurs en proline en fonction du temps sont illustrés à la Figure 3.6.

Nous remarquons dans le cas du lot témoin une faible augmentation de la concentration en proline en fonction du temps. Cette concentration passe de 0,43 à 0,46 $\mu\text{mol/g}$ MS équivalant à une augmentation de l'ordre de 7 %. Cette faible augmentation est statistiquement significative ($p= 0,001324$).

Traitement 1(T1) : nous remarquons à la Figure 3.6 (a) que la concentration en proline augmente progressivement en fonction du temps. Elle évolue de 0,48 à 0,56 $\mu\text{mol/g}$ MS, soit une augmentation de 16,66 %.

Comparé au témoin, l'analyse statistique permet de constater une différence très significative entre les concentrations enregistrées et celles du lot traité (T1) quelque soit le temps d'exposition : p est inférieure à 0,05. La valeur p pour chaque jour d'exposition, J1, J2, J3 et J4, est respectivement de 0,000348, 0,000504, 0,000051 et 0,000006.

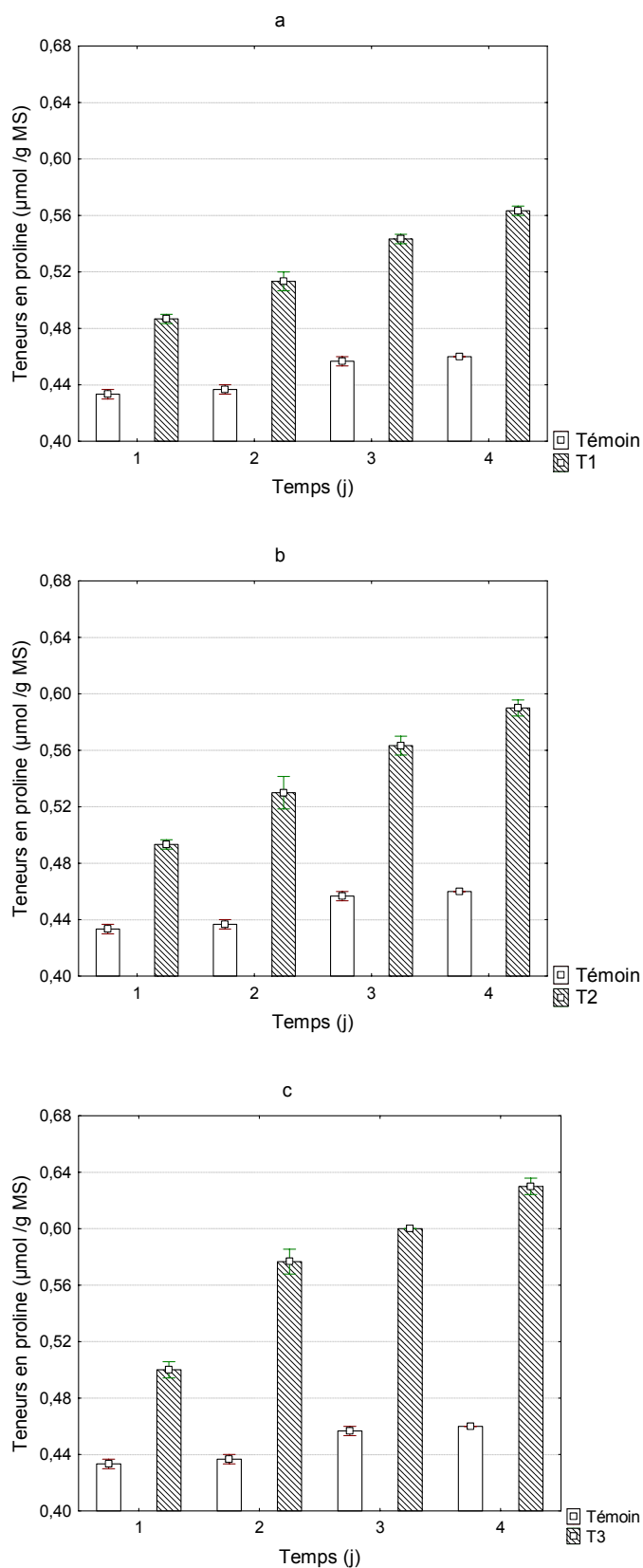


Figure 3.6. Evolution des teneurs en proline en fonction du temps.
 (a) T1 : 0,08 mg/l Cd^{2+} et 0,46 mg/l Ni^{2+} , (b) T2 : 0,143 mg/l Cd^{2+} et 0,57 mg/l Ni^{2+}
 et (c) T3 : 0,25 mg/l Cd^{2+} et 0,75 mg/l Ni^{2+} .

Traitement 2 (T2) : nous remarquons à la Figure 3.6 (b) que la concentration en proline augmente progressivement en fonction du temps. Elle passe de 0,49 à 0,59 $\mu\text{mol/g MS}$, soit une augmentation de 20,4%.

Comparé au témoin, l'analyse statistique permet de constater une différence très significative entre les concentrations enregistrées et celles du lot traité (T1) quelque soit le temps d'exposition : p est inférieure à 0,05. Pour le premier, le deuxième, le troisième et le quatrième jour la probabilité est respectivement de 0,000220, 0,001482, 0,000139 et 0,000023.

Traitement 3 (T3) : nous remarquons à la Figure 3.6 (c) une augmentation graduelle de la concentration en proline en fonction du temps. Cette concentration passe de 0,50 à 0,63 $\mu\text{mol /g MS}$, soit une augmentation de 26 %.

Comparé au témoin, l'analyse statistique permet de constater une différence très significative entre les concentrations enregistrées et celles du lot traité (T1) quelque soit le temps d'exposition : $p < 0,05$. Pour le premier, le deuxième, le troisième et le quatrième jour la probabilité est respectivement de 0,000562, 0,000120, 0,000002 et 0,000008.

Nous observons une augmentation significative de la concentration de la proline en fonction du temps d'exposition.

L'évolution de la concentration de la proline en fonction des traitements (témoin, T1, T2 et T3) pour chaque jour de traitement est illustrée par la Figure 3.7.

Entre le témoin et les traitements T1, T2 et T3, nous observons :

- à j1 (Figure 3.7 (a)) une augmentation de la concentration en proline pour les trois cas étudiés. Elle est respectivement de 11,63, 14 et 16,28 %.

- à j2 (Figure 3.7 (b)) une augmentation de la concentration en proline pour les trois cas étudiés. Elle est respectivement de 18,60, 23,25 et 32,5 %.

- à j3 (Figure 3.7 (c)) une augmentation de la concentration en proline pour les trois cas étudiés. Elle est respectivement de 20, 24,44 et 33,33 %.

- à j4 (Figure 3.7 (d)) une augmentation de la concentration en proline pour les trois cas étudiés. Elle est respectivement de 21,74, 28,26 et 37%.

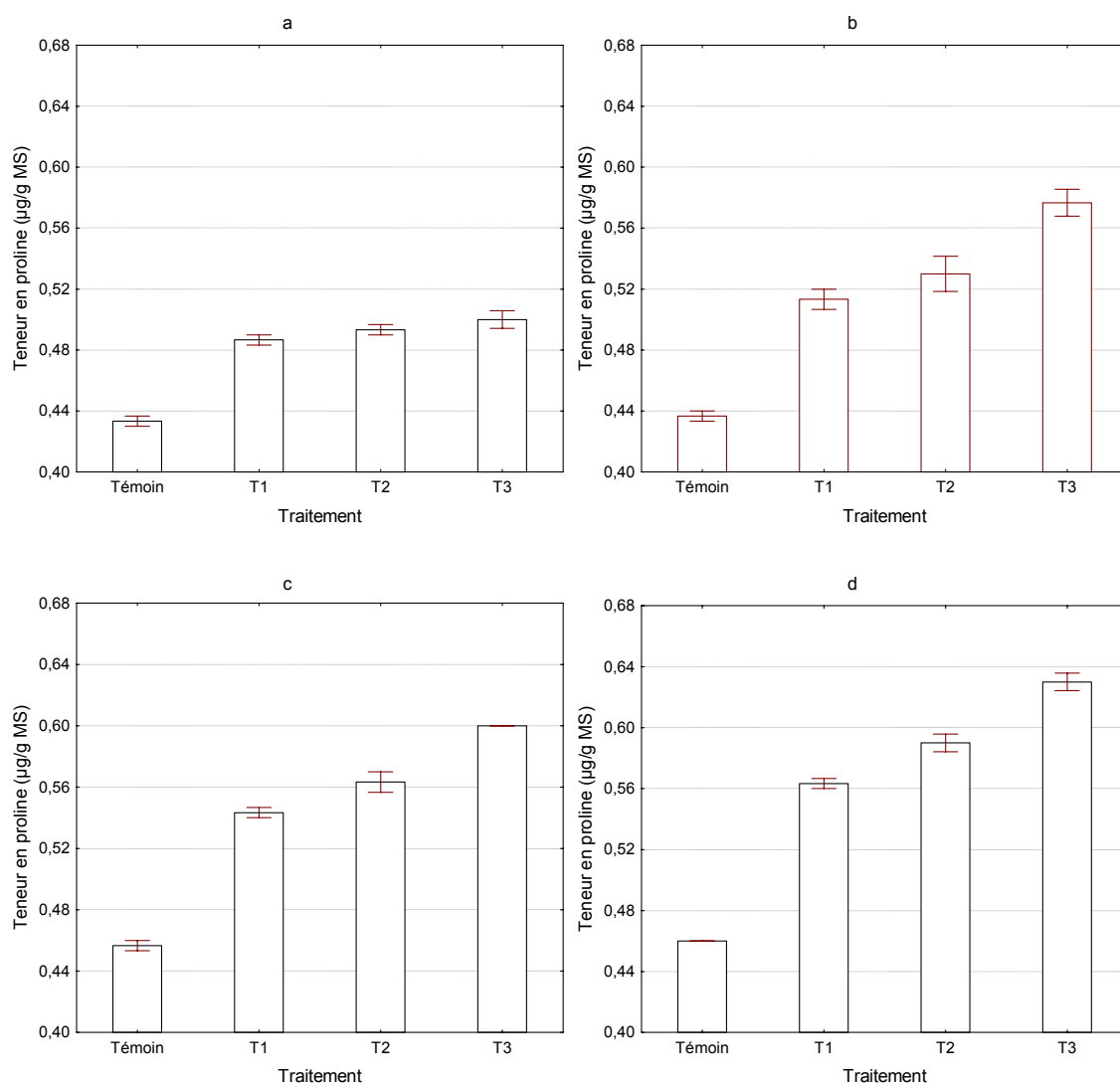


Figure 3.7. Concentration de la proline en fonction des traitements appliqués.

(a) j1, (b) j2, (c) j3 et (d) j4. T1 : 0,08 mg/l Cd^{2+} et 0,46 mg/l Ni^{2+} ;

T2 : 0,143 mg/l Cd^{2+} et 0,57 mg/l Ni^{2+} , T3 : 0,25 mg/l Cd^{2+} et 0,75 mg/l Ni^{2+} .

En conclusion, une augmentation de la concentration en proline est observée en fonction des traitements appliqués.

L'analyse de l'ANOVA des effets du traitement sur le taux de proline, avec un risque d'erreur de 5%, a été réalisée. Pour chaque durée du traitement, 1, 2, 3 et 4 jours, la valeur de la probabilité est respectivement de 0,000010, 0,000015, 0,000000 et 0,000000. L'effet significatif des traitements est observé.

3.3.1.4. Effet sur l'élimination des ETMs du milieu

Le suivi de la concentration des ETMs dans le milieu de culture a été réalisé à des intervalles de temps régulier durant quatre jours, les taux d'abattement des ETMs ont été déduits. Pour chaque cas étudié (T1, T2 et T3), la figure 3.8 illustre l'évolution des taux d'abattement de cadmium et nickel en fonction du temps

Nous observons d'une manière générale, quelque soit le traitement considéré (T1, T2 et T3), une progression des taux d'abattelements des ETMs en fonction du temps.

Traitement 1 (T1) (Figure 3.8 (a)) :

- Dans le cas du $R_{Cd^{2+}}$, le taux d'abattement passe de 37,71 à 70,33%, soit une augmentation de 86%. Entre le premier et le deuxième jour une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 50% est observée et statistiquement significative, $p= 0,000052$. Entre le deuxième et le troisième jour, on enregistre une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 19,46 %, cette augmentation est statistiquement significative, $p= 0,001041$. Entre le troisième et le quatrième jour, une augmentation de l'ordre de 5,50% est observée et statistiquement significative avec une probabilité de 0,017704. De ces observations, nous déduisons que le taux d'abattement est plus important aux deux premiers jours de traitement qu'au troisième et quatrième jour.

- Dans le cas du $R_{Ni^{2+}}$, Le taux d'abattement passe de 31,5 à 66,93%, soit une augmentation de 112,48%. Nous observons entre le premier et le deuxième jour une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 58,44%, cette augmentation est statistiquement significative, $p= 0,000052$. Entre le deuxième et le troisième jour, on enregistre une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 19,83 %, cette augmentation est statistiquement significative, $p= 0,001052$. Enfin entre le troisième et le quatrième jour, une augmentation de l'ordre de 12,85% est observée, cette augmentation est statistiquement significative avec une probabilité de 0,001980.

Nous déduisons que le taux d'abattement est plus important aux deux premiers jours de traitement qu'au troisième et quatrième jour.

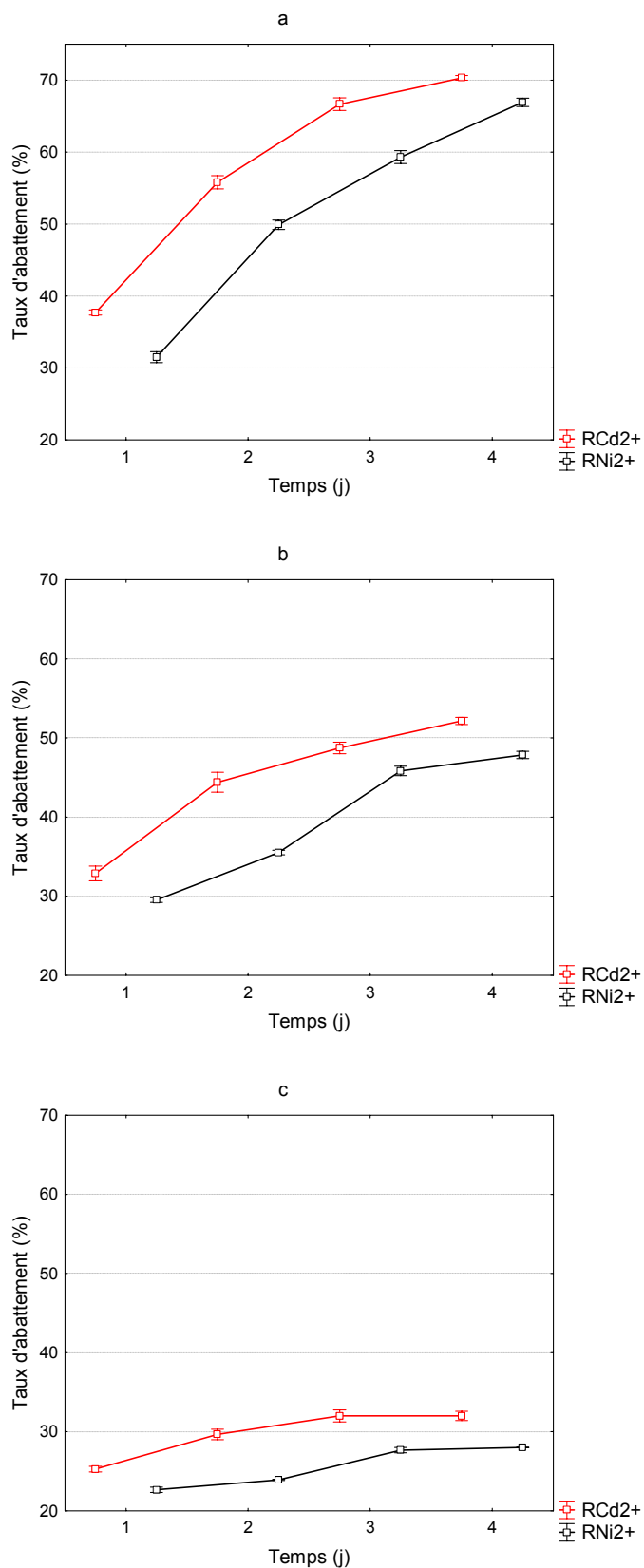


Figure 3.8. Evolution des taux d'abattement cadmium et nickel en fonction du temps.

(a) T1 : 0,08 mg/l Cd^{2+} et 0,46 mg/l Ni^{2+} , (b) T2 : 0,143 mg/l Cd^{2+} et 0,57 mg/l Ni^{2+} et

(c) T3 : 0,25 mg/l Cd^{2+} et 0,75 mg/l Ni^{2+} .

Traitement 2 (T2) (Figure 3.8 (b)) :

- Pour le $R_{Cd^{2+}}$, Le taux d'abattement passe de 32,88 à 52,15%, soit une augmentation de 58,61%. Nous observons entre le premier et le deuxième jour une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 35,07%, cette augmentation est statistiquement significative, $p= 0,001818$. Entre le deuxième et le troisième jour, on enregistre une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 9,75 %, cette augmentation est statistiquement significative, $p= 0,041464$. Entre le troisième et le quatrième jour, une augmentation de l'ordre de 7 % est observée, cette augmentation est statistiquement significative avec une probabilité de 0,017366.

De ces observations, nous déduisons que le taux d'abattement est plus important aux premiers jours de traitement (j1 et j2) qu'au troisième et quatrième jour.

- Pour le $R_{Ni^{2+}}$, Le taux d'abattement passe de 29,52 à 47,86%, soit une augmentation de 62,13%. Nous observons entre le premier et le deuxième jour une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 20,32%, cette augmentation est statistiquement significative, $p= 0,000126$. Entre le deuxième et le troisième jour, on enregistre une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 29 %, cette augmentation est statistiquement significative, $p= 0,000102$. Entre le troisième et le quatrième jour, une augmentation de l'ordre de 4,43% est observée, cette augmentation est statistiquement non significative avec une probabilité de 0,055663.

Nous déduisons que le taux d'abattement est en augmentation graduelle jusqu'au troisième jour de traitement, au-delà l'augmentation n'est plus significative.

Traitement 3 (T3) (Figure 3.8 (c)) :

- Pour le $R_{Cd^{2+}}$, Le taux d'abattement passe de 25,82 à 32 %, soit une augmentation de l'ordre de 24 %. Nous observons entre le premier et le deuxième jour une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 14,87%, cette augmentation est statistiquement significative, $p= 0,004437$. Entre le deuxième et le troisième jour, on enregistre une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 7,89 %, cette augmentation est statistiquement non significative, $p= 0,082794$. Entre le troisième et le quatrième jour, aucune augmentation n'est observée, la valeur de la probabilité est de 1.

Nous déduisons que le taux d'abattement est plus important au premier jour de traitement puis diminue progressivement pour atteindre une valeur fixe au bout du troisième jour.

- Pour le $R_{Ni^{2+}}$, Le taux d'abattement passe de 22,66 à 28 %, soit une augmentation de 23,56%. Nous observons entre le premier et le deuxième jour une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 5,56%, cette augmentation est statistiquement significative, $p= 0,021653$. Entre le deuxième et le troisième jour, on enregistre une augmentation du taux d'abattement de l'ordre de 15,64 %, cette augmentation est statistiquement significative, $p= 0,000398$. Entre le troisième et le quatrième jour, une très légère augmentation de l'ordre de 1,23% est observée, cette augmentation est statistiquement non significative avec une probabilité de 0,373901.

De ces constats, nous déduisons que le taux d'abattement est en augmentation graduelle jusqu'au troisième jour de traitement au-delà l'augmentation n'est plus significative.

La Figure 3.9 illustre l'évolution des taux d'abattelements de cadmium et nickel en fonction des traitements (T1, T2 et T3) pour chaque jour de traitement. Nous remarquons globalement quelque soit la réponse considérée ($R_{Cd^{2+}}$ ou $R_{Ni^{2+}}$) : les taux d'abattement les plus élevés sont observés pour les plus faibles concentrations en ETMs dans le milieu de culture.

Les analyses de l'ANOVA des effets des traitements sur le taux de réduction de cadmium et de nickel ont été réalisées avec un risque d'erreur fixé à 5%. Dans le cas de $R_{Cd^{2+}}$, la valeur de la probabilité est de 0,000043 pour un jour et de 0,000000 pour les trois derniers jours, indiquant l'effet significatif des différents traitements sur le taux d'abattement du cadmium. Pour $R_{Ni^{2+}}$, nous observons des probabilités respectives de 0,000022 et 0,000004 pour le premier et le deuxième jour de traitement et de 0,000000 pour les deux dernier jours, ce qui traduit un effet significatif des différents traitements sur le taux d'abattement de nickel.

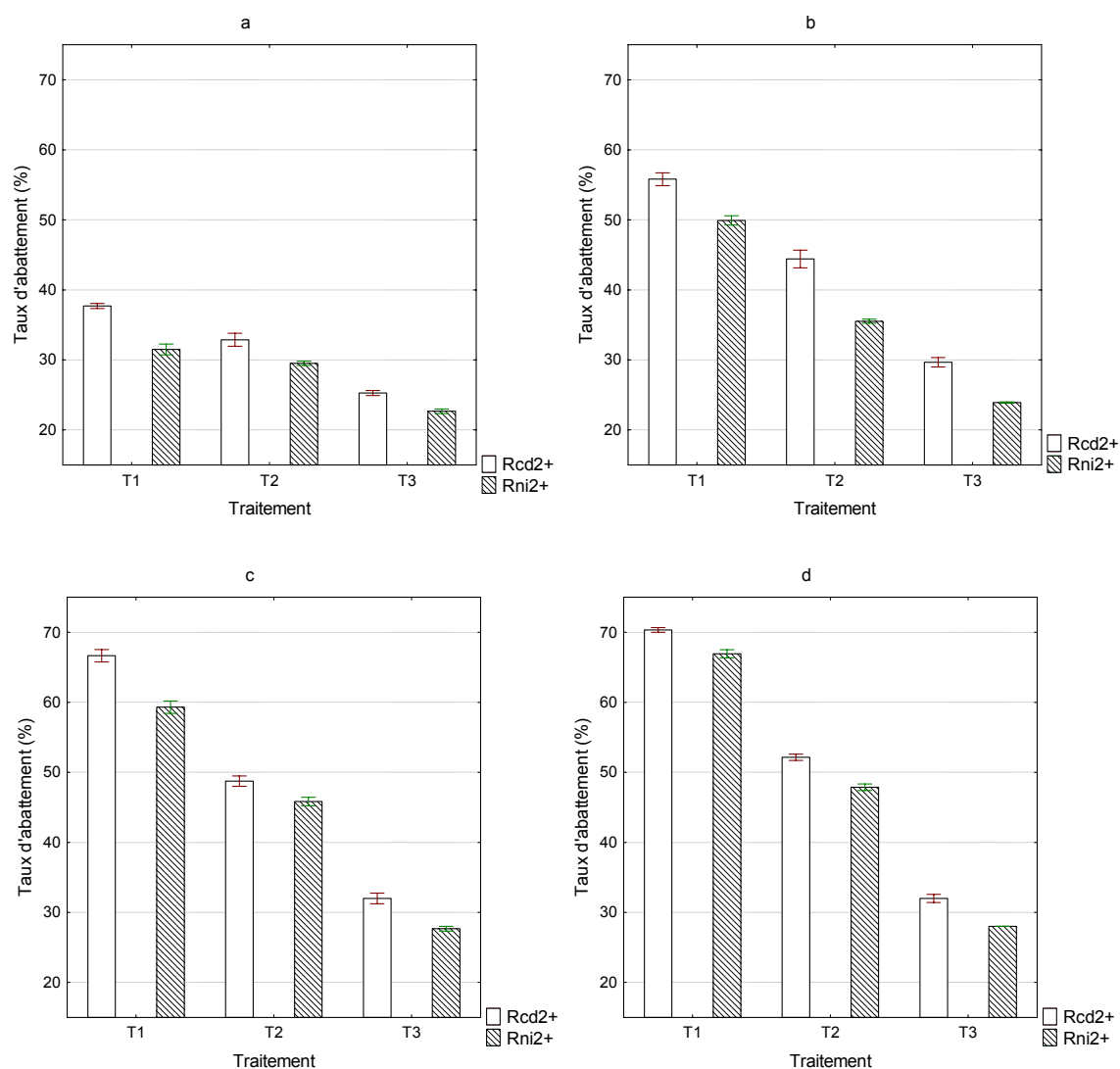


Figure 3.9. Evolution des taux d'abattement en fonction des traitements appliqués.

(a) j1, (b) j2, (c) j3 et (d) j4. T1 : 0,08 mg/l Cd²⁺ et 0,46 mg/l Ni²⁺ ;

T2 : 0,143 mg/l Cd²⁺ et 0,57 mg/l Ni²⁺, T3 : 0,25 mg/l Cd²⁺ et 0,75 mg/l Ni²⁺.

3.3.2. Effet réversible du mélange cadmium-nickel sur *L. gibba*

3.3.2.1. Effet sur le taux de sucres

La détermination de la concentration des sucres en condition normale chez *L. gibba* a été réalisée après 4 jours et 8 jours de renouvellement du milieu nutritif pour chaque cas. Les résultats des teneurs des sucres en fonction du temps sont illustrés à la Figure 3.10.

Nous observons d'une manière globale au quatrième et au huitième jour une réduction de la teneur en sucres quelque soit le prétraitement considéré.

Figure 3.10 (a) cas des plantes stressé par le traitement 1 et remises en culture dans un nouveau milieu sans ETMs, nous remarquons :

- Entre le premier et le huitième jour (renouvelé le cinquième jour) une diminution de la concentration des sucres de 12,37%.
- Entre le premier et le quatrième jour une diminution de la concentration des sucres de 10,85%. Cette diminution est statistiquement significative, $p=0.000054$.
- Entre le cinquième et le huitième jour on enregistre une très faible diminution de la concentration des sucres de 1,69%. Cette diminution est statistiquement non significative, $p=0,316375$.

Figure 3.10 (b) cas des plantes stressé par le traitement 2 et remises en culture dans un nouveau milieu sans ETMs, nous remarquons :

- Entre le premier et le huitième jour (renouvelé le cinquième jour) une diminution de la concentration des sucres de 19,38%.
- Entre le premier et le quatrième jour une diminution de la concentration des sucres de 18,45 %. Cette diminution est statistiquement significative, $p=0,000149$.
- Entre le cinquième et le huitième jour on enregistre une très faible diminution de la concentration des sucres de 1,14%. Cette diminution est statistiquement non significative, $p=0,533591$

Figure 3.10(c) cas des plantes stressé par le traitement 3 et remises en culture dans un nouveau milieu sans ETMs, nous remarquons :

- Entre le premier et le huitième jour (renouvelé le cinquième jour) une diminution de la concentration des sucres de 18,71%.
- Entre le premier et le quatrième jour une diminution de la concentration des sucres de 11,13 %. Cette diminution est statistiquement significative, $p=0,000325$.
- Entre le cinquième et le huitième jour on enregistre une diminution de la concentration des sucres de 8,53 %. Cette diminution est statistiquement significative, $p=0,009910$.

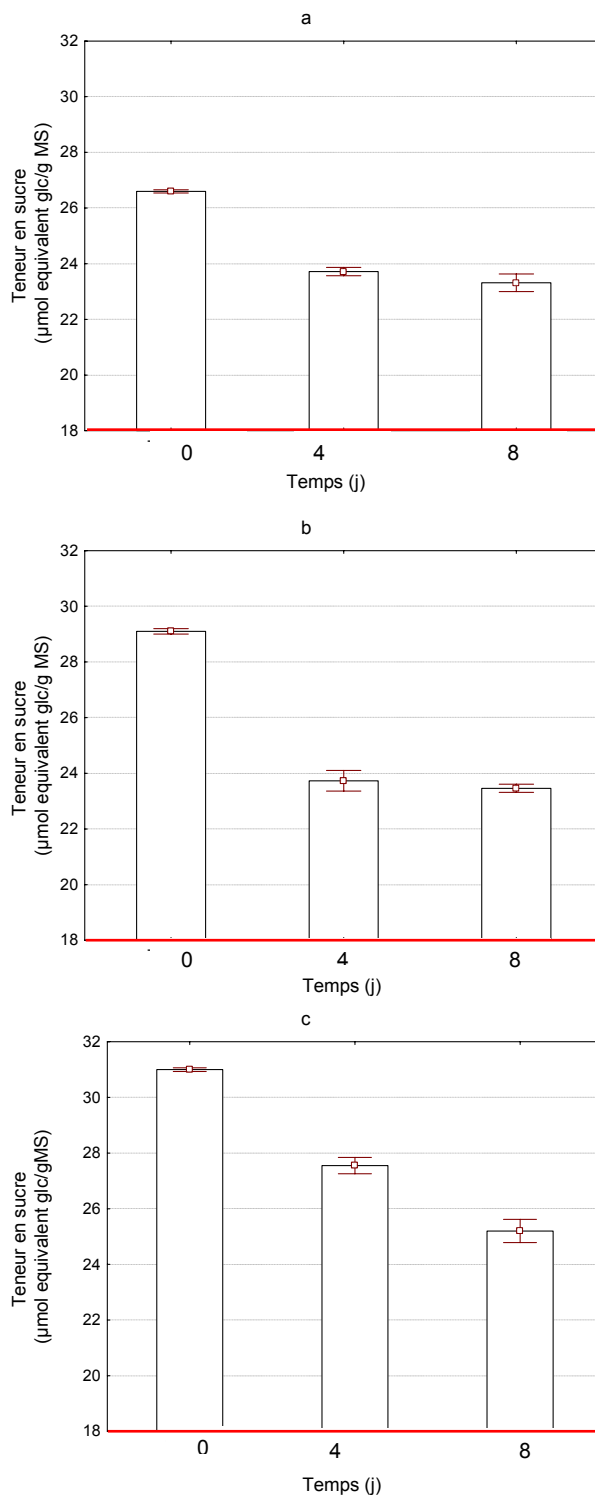


Figure 3.10. Concentration des sucres en fonction du temps.

Plantes soumises (a) à : T1 (0,08 mg/l Cd^{2+} et 0,46 mg/l Ni^{2+}) puis remises dans un milieu nutritif sans Cd^{2+} et sans Ni^{2+} , (b) T2 (0,143 mg/l Cd^{2+} et 0,57 mg/l Ni^{2+}) puis remises dans un milieu nutritif sans Cd^{2+} et sans Ni^{2+} et (c) T3 (0,25 mg/l Cd^{2+} et 0,75 mg/l Ni^{2+}) puis remises dans un milieu nutritif sans Cd^{2+} et sans Ni^{2+} .

3.3.2.2. Effet sur la concentration des acides aminés

La détermination de la concentration des acides minés en condition normale chez *L. gibba* a été réalisée après 4 jours et 8 jours de renouvellement du milieu nutritif pour chaque cas. Les résultats des teneurs en acides aminés en fonction du temps sont illustrés dans la Figure 3.11.

D'après la Figure 3.11, nous observons d'une manière globale une réduction de la teneur en acides aminés en fonction du temps (4 et 8 jours) quelque soit le prétraitement appliqué.

Figure 3.11(a) cas des plantes stressé par le traitement 1 et remises en culture dans un nouveau milieu sans ETMs, nous remarquons :

- Entre le premier et le huitième jour (renouvelé le cinquième jour) une diminution de la concentration des acides aminés de 22,71 %.
- Entre le premier et le quatrième jour une diminution de la concentration des acides aminés de 19,71 %. Cette diminution est statistiquement significative, $p= 0,002100$.
- Entre le cinquième et le huitième jour on enregistre une faible diminution de la concentration des acides aminés de 3,74 %. Cette diminution est statistiquement non significative, $p= 0,183406$.

Figure 3.11(b) cas des plantes stressé par le traitement 2 et remises en culture dans un nouveau milieu sans ETMs, nous remarquons :

- Entre le premier et le huitième jour (renouvelé le cinquième jour) une diminution de la concentration des acides aminés de 25,25 %.
- Entre le premier et le quatrième jour une diminution de la concentration des acides aminés de 20,85 %. Cette diminution est statistiquement significative, $p= 0,000356$.
- Entre le cinquième et le huitième jour on enregistre une diminution de la concentration des acides aminés de 5,56 %. Cette diminution est statistiquement non significative, $p= 0,080294$.

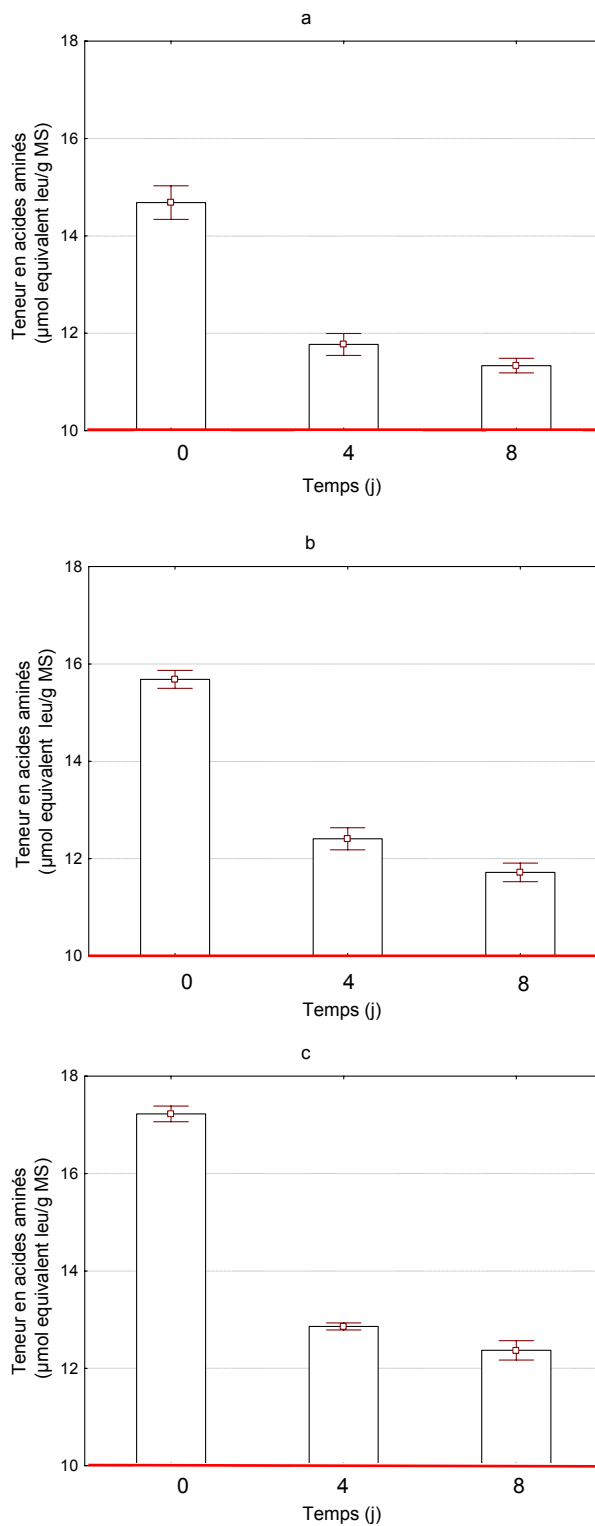


Figure 3.11 : Concentration des acides aminés en fonction du temps.

Plantes soumises (a) à : T1 (0,08 mg/l Cd^{2+} et 0,46 mg/l Ni^{2+}) puis remises dans un milieu nutritif sans Cd^{2+} et sans Ni^{2+} , (b) T2 (0,143 mg/l Cd^{2+} et 0,57 mg/l Ni^{2+}) puis remises dans un milieu nutritif sans Cd^{2+} et sans Ni^{2+} et (c) T3 (0,25 mg/l Cd^{2+} et 0,75 mg/l Ni^{2+}) puis remises dans un milieu nutritif sans Cd^{2+} et sans Ni^{2+} .

Figure 3.11(c) cas des plantes stressé par le traitement 3 et remises en culture dans un nouveau milieu sans ETMs, nous remarquons :

- Entre le premier et le huitième jour (renouvelé le cinquième jour) une diminution de la concentration des acides aminés de 28,16 %.
- Entre le premier et le quatrième jour une diminution de la concentration des acides aminés de 25,32 %. Cette diminution est statistiquement significative, $p= 0,000016$.
- Entre le cinquième et le huitième jour on enregistre une faible diminution de la concentration des acides aminés de 3,81 %. Cette diminution est statistiquement non significative, $p= 0,081195$.

3.3.2.3. Effet sur la teneur en proline

La détermination de la concentration de la proline en condition normale chez *L. gibba* a été réalisée après 4 jours et 8 jours de renouvellement du milieu nutritif pour chaque cas. Les résultats des teneurs en proline en fonction du temps sont illustrés dans la Figure 3.12.

D'après la Figure 3.12, nous observons d'une manière globale une réduction de la teneur en proline en fonction du temps (4 et 8 jours) quelque soit le prétraitement appliqué.

Figure 3.12 (a) cas des plantes stressé par le traitement 1 et remises en culture dans un nouveau milieu sans ETMs, nous remarquons :

- Entre le premier et le huitième jour (renouvelé le cinquième jour) une diminution de la concentration en proline de 19,52 %.
- Entre le premier et le quatrième jour une diminution de la concentration en proline de 17,75 %. Cette diminution est statistiquement significative, $p= 0,000029$.
- Entre le cinquième et le huitième jour on enregistre une faible diminution de la concentration en proline de 2,16 %. Cette diminution est statistiquement non significative, $p= 0,101192$.

Figure 3.12(b) cas des plantes stressé par le traitement 2 et remises en culture dans un nouveau milieu sans ETMs, nous remarquons :

- Entre le premier et le huitième jour (renouvelé le cinquième jour) une diminution de la concentration en proline de 22 %.
- Entre le premier et le quatrième jour une diminution de la concentration en proline de 20,90 %. Cette diminution est statistiquement significative, $p= 0,000050$.
- Entre le cinquième et le huitième jour on enregistre une faible diminution de la concentration en proline de 1,42 %. On observe un maintien de la concentration en proline. Aucune différence significative n'est observé ($p= 0,116117$).

Figure 3.12(c) cas des plantes stressé par le traitement 3 et remises en culture dans un nouveau milieu sans ETMs, nous remarquons :

- Entre le premier et le huitième jour (renouvelé le cinquième jour) une diminution de la concentration en proline de 23,28 %.
- Entre le premier et le quatrième jour une diminution de la concentration en proline de 22,16 %. Cette diminution est statistiquement significative, ($p= 0,000037$).
- Entre le cinquième et le huitième jour on enregistre une faible diminution de la concentration en proline de 2,7 %. Cette diminution est statistiquement significative, ($p= 0,047421$).

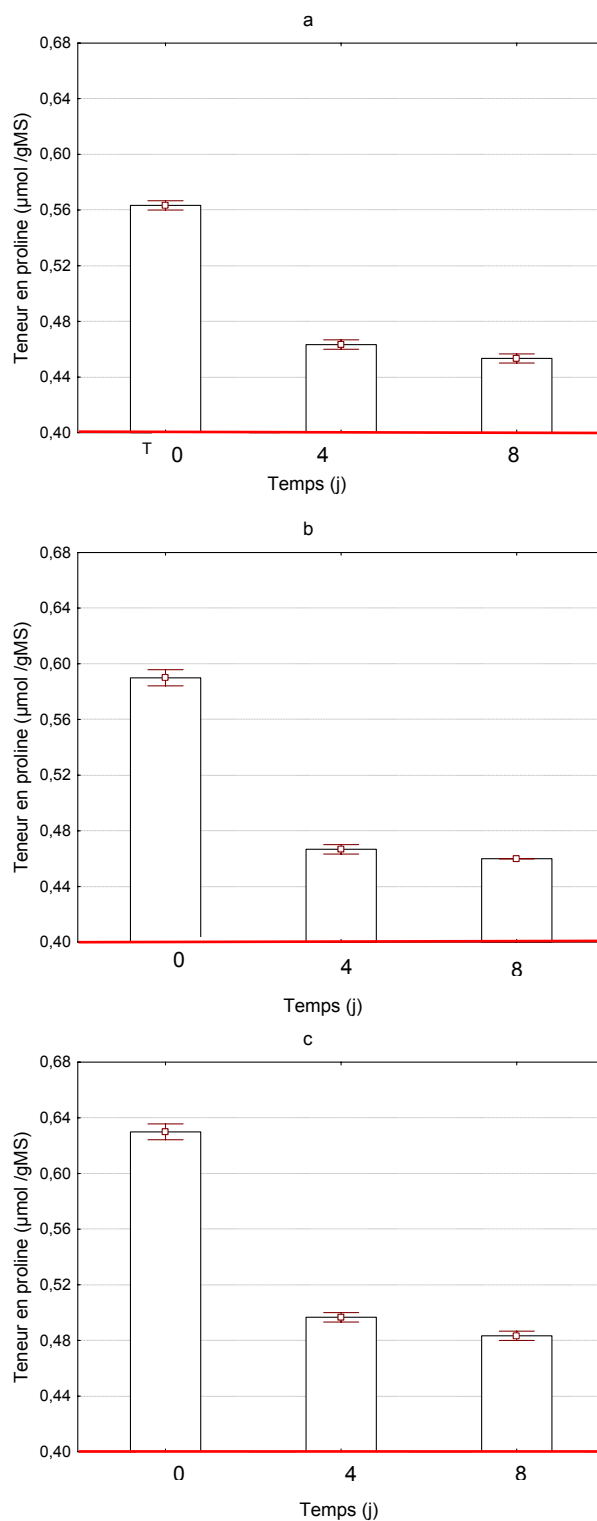


Figure 3.12. Concentration de la proline en fonction du temps.

Plantes soumises (a) à : T1 (0,08 mg/l Cd^{2+} et 0,46 mg/l Ni^{2+}) puis remises dans un milieu nutritif sans Cd^{2+} et sans Ni^{2+} , (b) T2 (0,143 mg/l Cd^{2+} et 0,57 mg/l Ni^{2+}) puis remises dans un milieu nutritif sans Cd^{2+} et sans Ni^{2+} et (c) T3 (0,25 mg/l Cd^{2+} et 0,75 mg/l Ni^{2+}) puis remises dans un milieu nutritif sans Cd^{2+} et sans Ni^{2+} .

3.3.2.4. Effet sur la teneur en ETMs dans le milieu de culture

La détermination de la concentration de cadmium et de nickel dans le nouveau milieu nutritif a été estimée par SAA. Aucune concentration n'a pu être décelée quelque soit le milieu analysé.

3.4. Discussion et conclusion

3.4.1. Effet du cadmium-nickel sur *L. gibba*

3.4.1.1. Paramètres biochimiques

Les ETMs ont des cibles et des effets variables sur les organismes. Les variations de toxicité des éléments métalliques sont dues principalement aux propriétés physiques et chimiques propres à chacun. Elles déterminent la disponibilité, l'absorption, le transport, le stockage mais également l'internalisation de ces molécules dans la plante. Cependant, ces molécules activent des voies spécifiques ou générales de réponses au stress pour limiter les dommages cellulaires. La mesure de la concentration de certains métabolites, notamment les sucres, les acides aminés et la prolins, permet d'évaluer la réponse d'un végétal à la présence des ETMs dans un milieu.

Le cadmium et le nickel ont des effets biologiques différents chez la plante. Le cadmium ne joue aucun rôle métabolique (Pokorny et *al.*, 2004) alors que le nickel à faible concentration (0.01–5 µg/g MS) est un micronutriment [160]. Le nickel est un constituant d'une enzyme l'uréase. L'uréase est la seule enzyme connue pour contenir du nickel chez les plantes supérieures. Cette dernière joue un rôle dans le recyclage de l'azote issu de l'urée [161].

Les essais de contamination de *L. gibba* ont été réalisés durant 4 jours selon le protocole cité en 3.2.2.1. A l'issue de ces essais, nous avons observé une accumulation significative en sucre, en acides aminées et en proline durant le temps d'exposition de *L. gibba* à des concentrations variées de cadmium-nickel. Les teneurs les plus élevées en ces métabolites ont été enregistrées pour les concentrations les plus élevées en cadmium-nickel.

Dans le cas des sucres, nous avons observé une très légère augmentation de la concentration de ce métabolite au cours du temps chez le témoin. Néanmoins,

cette augmentation est statistiquement significative. Celle-ci peut être liée à la croissance des plantes et à son métabolisme. Selon Smith et Stitt [162], les niveaux endogènes de sucres solubles, de même que leur nature varient en fonction de divers paramètres, tels que l'organe, l'âge, le cycle jour/nuit, et les conditions environnementales. Les niveaux endogènes de sucre représentent des variations métaboliques au niveau des systèmes de production ou d'utilisation de ces composés carbonés, ils indiquent un équilibre entre la photosynthèse et la croissance des plantes [163]. Cependant, ces amplitudes de variations restent limitées en comparaison de celles obtenues en présence d'un stress. En présence de cadmium-nickel, une augmentation significative de la concentration en sucres au cours du temps d'exposition a été observée. Cette augmentation est proportionnelle à la concentration du mélange cadmium-nickel. Ces observations sont en accord avec de nombreux travaux portant sur des plantes et des ETMs variés [164 – 166].

Samarakoon et al. [164] ont observé une accumulation significative des sucres chez *Phaseolus vulgaris* exposé à 400 μM de cobalt, à 200 μM de nickel et de zinc durant 4 jours. Cette accumulation est plus élevée au delà de un ou deux jours d'exposition. Verma et Dubey [165] ont noté une augmentation de la concentration des sucres chez *Oryza sativa* L. exposée au cadmium à des concentrations de 100 et 500 μM durant 5 et 20 jours. De même qu'ils ont observé des perturbations dans le métabolisme des sucres. Ils ont observé une augmentation de l'activité de l'enzyme invertase acide et de l'enzyme sucrose synthétase et une diminution de l'enzyme sucrose phosphate synthétase. Mishra et Dubey [166] ont étudié l'effet du nickel (200 et 400 μM) sur la teneur en sucre de deux espèces de riz Indien durant 5 et 20 jours de culture. Ils observent une augmentation significative du taux de sucre accompagné d'une hausse d'activité de l'enzyme invertase acide et de l'enzyme sucrose synthétase. Ces résultats mettent en évidence les troubles du métabolisme des sucres .

Toutefois, ces observations sont en opposition avec les travaux de Mishra et Tripathi [93]. Ces derniers observent lors de la culture d'*Eichhornia crassipes* dans un milieu contenant du zinc et du chrome durant 11 jours de culture une réduction de la concentration en sucre. Ils attribuent cette réduction aux fortes concentrations en métaux dans la plante qui inhibent le métabolisme des sucres.

L'accumulation des sucres chez les plantes est observée également sous l'effet d'autres types de stress tel le stress thermique [167] et le stress hydrique [168]

Selon Jouve et al. [167], les sucres ont des rôles multiples dans le développement et la croissance des plantes mais jouent également un rôle important lors des divers stress. On leur attribue un rôle de molécules signales. Les glucides sont une source d'énergie et un squelette carboné que les plantes utilisent pour survivre à des conditions environnementales défavorables dont les ETMs. Lors d'un stress, cette source de carbone se trouve augmentée car la cellule l'utilise pour faire face à ses besoins énergétiques, initier la production de métabolites secondaires et reconstruire ses tissus [146]. Aussi, les glucides jouent un rôle d'osmorégulateur et protègent les macromolécules durant la déshydratation [167]. Cependant, selon Samarakoon et al. [164], Verma et Dubey [165] et Mishra et Dubey. [166] les fluctuations des teneurs en sucres observées sont liées à un dysfonctionnement du métabolisme et non à un système de défense et de tolérance. Verma et Dubey [165] et Mishra et Dubey [166] ont observé une hausse d'activité de l'enzyme invertase acide et de l'enzyme sucrose synthétase, signifiant un dysfonctionnement de métabolisme.

En ce qui concerne la concentration des acides aminés, nous avons observé une très légère augmentation chez le témoin. Celle-ci est statistiquement non significative. Cette légère hausse peut être la résultante du développement et de la croissance des plantes. Selon Coruzzi et Zhou [169], les acides aminés jouent des rôles fondamentaux dans une multitude de processus métaboliques incluant notamment la synthèse protéique, le métabolisme hormonal, la croissance cellulaire, la production d'énergie, la synthèse de nucléobases et la biosynthèse de l'urée. Certains acides aminés ont un rôle majeur dans la signalisation cellulaire, cas du glutamate et du GABA (acide gamma-amino butyrique) [170]. D'autres peuvent permettre l'adaptation à des changements environnementaux [171]. Enfin les acides aminés sont également impliqués dans la sénescence des plantes [172].

Lorsque les plantes ont été soumises au stress métallique, nous avons enregistré une hausse très significative de la concentration des acides aminés durant le temps d'exposition par rapport au témoin. Celle-ci est d'autant plus élevée que la

concentration en cadmium-nickel est plus élevée. Ces constats sont similaires à ceux de la littérature [173, 174].

Shahbaz et al. [173] ont remarqué une augmentation significative de la concentration en acides aminés chez le Chou Chinois exposé au cadmium (2 – 10 μM) en culture hydroponique durant 7 jours. Chaffei-Houari [174] ont observé une augmentation de la concentration en acides aminés solubles chez *Solanum lycopersicum* suite à une exposition au cadmium (CdCl_2 : 0 - 50 μM) durant 7 jours. Aussi ils notent particulièrement l'augmentation de certains acides aminés tel gln et glu (précurseurs de certains acides aminés)

Une hausse de la concentration en acides aminés a été observée dans d'autres cas de stress tel le stress salin [175] et le stress hydrique [176].

Hall [43] et Sharma et Dietz [177] attribuent aux acides aminés une fonction de tolérance et de détoxification. D'après Rauser [48] et Shanker et al. [178], les acides aminés ont un rôle très important dans la chélation des ETMs. Les acides aminés jouent aussi un rôle dans la détoxification des espèces réactives à l'oxygène, préviennent les dommages engendrés par le stress oxydative, régulent le pH intracellulaire et jouent un rôle d'osmorégulation [179 - 181]. Par ailleurs, Sharma et Dietz [177] suggèrent que l'accumulation des acides aminés suite au stress métallique est une réponse adaptative à ce stress et peut être liée à la dégradation de certaines protéines sensibles au stress ou alors à la synthèse de nouveaux acides aminés.

Dans le cas de la proline, nous avons observé dans le cas du lot témoin une très faible accumulation de la proline durant le temps de culture. Cependant cette accumulation est statistiquement significative. Cette observation est similaire aux travaux de Parlak et Yilmaz [131], où ils observent une augmentation de la concentration en proline durant le temps de culture du témoin. Cette faible augmentation pourrait résulter des conditions de la culture et /ou au métabolisme de la plante. !

La proline est un acide aminé qui joue un rôle essentiel dans la résistance au stress, sa concentration est augmentée. En effet, nous avons enregistré une hausse très significative de la concentration en proline durant le temps d'exposition aux ETMs par rapport au témoin. Celle-ci est d'autant plus élevée que la concentration

en cadmium-nickel est plus élevé. Ces observations sont semblables à ceux de la littérature [132, 150, 182].

Dinakar et al. [182] ont constaté une accumulation de la proline suite à l'exposition de *Arachis hypogaea* L. au cadmium (25, 50 et 100 μM CdCl_2) durant 10 et 25 jours. Quelque soit la durée d'exposition, il observe une forte accumulation dans le cas où la concentration en cadmium est de 100 μM de CdCl_2 . Yilmaz et Parlak [150] ont aussi observé une accumulation de la proline proportionnelle à la concentration en cadmium (0 – 20mg/l) chez *Groenlandia densa*. Parlak et Yilmaz [131] ont étudié l'effet du cadmium (0 – 20 mg/l) sur la teneur de la proline sur *L. gibba* durant 7 jours. Ils notent une augmentation de la teneur en proline proportionnelle à la concentration en cadmium dans le milieu de culture. Cependant Megatli et al. [27] remarquent que l'augmentation de la proline face au stress métallique est une accumulation transitoire. En effet, lors de l'exposition de *L. minor* au cadmium (10^{-3} et 10^{-1} mg/l), au zinc (10^{-1} et 30 mg/l) et au cuivre (10^{-4} et 10^{-1} mg/l) durant 10 jours de traitement, ils observent durant les quatre premiers jours de traitement une augmentation progressive de la proline, elle atteint son maximum au quatrième jour. Au-delà, une diminution progressive de cet acide aminé est observée, rejoignant des valeurs semblables à ceux du témoin. Quant à Jhon et al. [183], ils observent lors de l'exposition de *Lemna polyrrhiza* au cadmium et au plomb durant 30 jours une augmentation de la teneur en proline pour les concentrations de moins de 20 mg/l, au-delà (30 et 40 mg/l) ils observent une diminution de la concentration en proline par rapport à celles observées aux faibles concentrations. Les observations d'Ozturk et al. [184] rejoignent celle de Jhon et al. [183]. Lors de leurs travaux portant sur la réponse biologique de *Nasturtium officinale* R. Br en présence de différentes concentrations en arsenic (1, 3, 5, 10 et 50 μM) durant 7 jours, Ils remarquent une augmentation de la concentration en proline pour toutes les concentrations étudiées par rapport au témoin. Cependant, la teneur la plus élevée en proline est observée pour la concentration en As (III) de 5 μM , pour les concentrations de 10 et 50 μM la teneur en proline est plus faible en comparaison à celle de 5 μM en As (III).

Schat et Vooijs, [185] suggèrent que l'accumulation de la proline en condition de stress métallique est due à un déficit hydrique provoqué par les ETMs par contre

Kastori et al. [186] et Yang et al. [133] attribuent l'augmentation de la concentration de la proline à l'accumulation des ETMs plutôt qu'au déficit hydrique.

Toutefois, la proline n'est pas seulement un indicateur de stress métallique, sa concentration se voit augmenté dans d'autres types de stress tels le stress salin [175, 181, 187], le stress thermique [168, 188], le stress hydrique [176] et le stress des radiations UV [189].

L'augmentation de la teneur en proline face au divers stress est lié aux rôles qu'elle joue dans la stabilisation des membranes et des protéines de structures, au maintien de l'hémostase cellulaire, au piégeage des espèces réactives de l'oxygène [133, 147, 181, 184, 190], protège les enzymes de la dégénérescence [147, 184] et régule le pH intra cellulaire [190].

3.4.1.2. Réduction des ETMs

Dans le chapitre 2, nous avons démontré les capacités de *L. gibba* à réduire la charge polluante présente dans le milieu de culture et l'impact du mélange métallique sur les taux d'abattelements du cadmium et du nickel. La mesure des taux d'abattelements des deux ETMs a été réalisée par la mesure des concentrations en début et en fin de traitement. Dans cette partie on s'intéresse à étudier les cinétiques d'élimination des ETMs en fonction du temps et en fonction des concentrations de ces éléments. Des mesures au cours du temps d'exposition ont été réalisées.

Les résultats obtenus à la suite de ces essais mettent en évidence une cinétique d'élimination des deux ETMs en fonction du temps. Celle-ci est réalisée en deux phases, une phase initiale rapide suivie d'une phase de ralentissement (voir linéaire). Nous avons observé des taux d'abattelements de cadmium et de nickel élevés durant le premier et le deuxième jour d'exposition. Au-delà, une diminution de ces rendements est observée. Des équilibres des taux d'abattelements de cadmium et de nickel ont été observés au troisième jour et au quatrième jour. En effet dans le cas du cadmium aucune évolution du taux d'abattement n'est observée entre le troisième et le quatrième jour. Pour le nickel on a observé une légère augmentation non significative entre le troisième et le quatrième jour. Cette observation corrobore avec plusieurs travaux [26, 27, 67, 93].

Mishra et Tripathi [93] ont étudié l'évolution de la concentration du chrome et du zinc dans une eau naturelle contaminée par ces éléments en mono-contamination durant onze jours de culture d'*Eichhornia crassipes*. Ils ont observé des taux d'abattement élevés durant les premiers jours d'exposition (entre 1 et 4 jours), au-delà les taux d'élimination étaient très faibles voir linéaire dans certains cas. Mégatli et al. [27] ont étudié l'élimination du cadmium, cuivre et zinc par *L. gibba* durant 10 jours d'exposition. Ils ont observé des taux de réduction de ces métaux de l'ordre de 60% durant les deux premiers jours d'exposition suivi d'une diminution qui atteint des valeurs d'abattement de 10 et 20 % au huitième jour et au-delà. Sasmaz et Obek [67] ont étudié l'accumulation du cuivre et de l'or par *L. gibba* durant sept jours de culture. Ils ont constaté les grandes capacités de cette plante à réduire ces deux métaux d'une part et ont observé des taux d'élimination très importants dès les premiers jours d'exposition et ont noté qu'au sixième jour une très nette réduction de ces taux est observée. Monferrán et al. [26] ont eux aussi observé une cinétique d'élimination d'ETMs (chrome et cuivre) en fonction du temps chez *Potamogeton pusillus*. En mono-contamination et en contamination binaire durant 15 jours, ils observent des taux d'abattements très élevés durant les quatre premiers jours d'exposition, au-delà ils observent une réduction de ces taux d'abattement voir dans certains cas un plateau est observé.

Toutes ces constats confirment que l'élimination des ETMs par les plantes aquatiques est une cinétique dépendante du temps. Elle est réalisée en deux phases, une phase initiale rapide suivie d'une phase de ralentissement (voir linéaire). Selon Veglio et Beolchini [191], La phase initiale est caractérisée par l'accumulation rapide et réversible des ETMs gouvernée par le phénomène de biosorption. La seconde phase plus lente est liée au transport des métaux à travers la membrane cytoplasmique vers le cytoplasme cellulaire (phénomène de bioaccumulation).

Les résultats obtenus mettent aussi en évidence l'effet significatif de la concentration des ETMs dans le milieu de culture sur les taux d'abattements de ses derniers. En effet, nous avons remarqué une diminution des taux d'abattement lorsque la concentration de ces ETMs était plus élevée : les taux d'abattement sont inversement proportionnels à la concentration des ETMs dans le milieu nutritif. Cette observation est comparable à ceux de la littérature [93,104, 192].

Oporto et al. [104] ont évalué le pouvoir de *L. minor* à réduire la concentration du chrome VI. Ce métal a été additionné à différentes concentrations (0,5 – 2 mg/l) à une eau usée traitée. Des taux d'abattement élevés ont été observés aux plus faibles concentrations en chrome hexavalent. Mishra et Tripathi [93] ont mesuré les capacités d'*Eichhornia crassipes* à réduire la concentration du chrome et du zinc présent en mono solution aux concentrations suivantes 1, 5, 10 et 20 mg/l. Ils ont remarqué des taux d'élimination élevés pour les concentrations de 1 et 5 mg/l en chrome et en cuivre, au delà ils observent une réduction des taux d'abattelements significatifs. Bocuk et al. [192] ont étudié l'élimination du bore présent dans un milieu synthétique à des concentrations de 10, 25, 50, 100 et 150 mg/l par *L. gibba* durant 7 jours. Ils ont observé des rendements d'accumulation inversement proportionnel à la concentration du métal.

Ces observations montrent le pouvoir des plantes à éliminer les ETMs, cette élimination est fonction des concentrations des métaux présents dans le milieu de culture. Selon Sivaci et al. [193], les plantes accumulent les métaux par phénomène d'absorption et cette accumulation est dépendante de son métabolisme. Mishra et Tripathi [93] attribuent cette relation (accumulation en fonction de la concentration) au degré de tolérances des plantes et à la saturation des sites récepteurs par les métaux.

3.4.2. Effet réversible du mélange cadmium-nickel sur *L. gibba*

Les expériences réalisées dans cette partie ont pour but d'estimer le rôle du retrait du cadmium et du nickel du milieu de culture sur les évolutions des paramètres biochimiques (sucres, acides aminés et proline) des plantes pré-stressées et sur la détermination de la concentration de ces métaux dans le nouveau milieu.

Les cultures de plantes pré-stressées dans un nouveau milieu ont été réalisées selon le protocole cité en 3.2.2.2. Les résultats obtenus à la suite de ces travaux nous ont permis d'observer une diminution significative de la teneur en sucres, en acides aminés et en prolines en fonction du temps. Cette diminution est graduelle et continue durant le temps de la culture. Cette observation est analogue pour les trois cas de prétraitements appliqués.

Cette observation dénote l'effet réversible des ETMs sur la concentration des métabolites chez la plante pré-stressée. Cette observation s'accorde avec ceux de la littérature pour d'autres plantes et d'autres métaux [194, 195]. Ces auteurs observent la reprise d'un niveau normal de tous les paramètres physiologique et métaboliques.

Davis et al. [194] ont mis en culture durant six jours *Spirodella polyrrhiza* dans un milieu contenant du bore à des concentrations comprises entre 50 et 100 mg/l, puis remis ces plantes dans un nouveau milieu ne contenant pas ce métal. Ils observent une reprise de la croissance, marquée par un taux de croissances élevé en comparaison à celui des plantes stressées. Ils concluent à la réversibilité des effets de ce métal sur la croissance. Cependant, ils notent que la concentration du métal a une influence sur la réversibilité des effets (degré de toxicité). Chaffei et al. [195] ont étudié la réversibilité probable des effets du cadmium sur des plantules de tomates. Les plantules pré-stressées au cadmium (20 μ M) durant 7 jours ont été récupérées et remises dans un nouveau milieu de culture ne contenant pas de cadmium. Après mesure de plusieurs paramètres physiologiques et métaboliques, notamment les paramètres de croissance et les enzymes impliquées dans le métabolisme du nitrate, durant le stress et après renouvellement du milieu, ils constatent un retour progressif à la normale de tous les paramètres. Ils expliquent le retour à la normal de ces paramètres par un effet de dilution du polluant préalablement accumulé dans la plante pendant la période de traitement dans une masse de tissu de plus en plus grande, entraînant une reprise de l'activité de croissance après retrait du polluant du milieu de culture.

La réversibilité du stress sur la physiologie et la biochimie des plantes a été aussi observée pour d'autre type de stress tels le stress thermique [167] et le stress biotique [196].

Pour ce qui est du retour à la normale des concentrations des métabolites observé dans notre étude ceci peut s'expliquer par l'utilisation de ces derniers dans la reconstitution des tissus cellulaire et la croissance. Selon Jouve et al. [167], la proline accumulée durant le stress constitue une réserve d'azote et de carbone que la plante utilise postérieurement à la période de stress pour sa croissance. Les acides aminés sont aussi utilisés comme des précurseurs pour la synthèse des constituants cellulaires tels les protéines et les enzymes. Ces composés interviennent dans de nombreux processus comme le contrôle de la croissance et le maintien de la

plante. De même, les glucides peuvent constituer une source de carbone non négligeable pour la reconstitution des tissus cellulaires [146].

Concernant la concentration des ETMs dans le nouveau milieu de culture, aucune concentration en cadmium ou en nickel n'a pu être quantifiée quel que soit le pré-traitement appliqué. Il est possible d'émettre deux hypothèses pour expliquer l'absence de cadmium et de nickel dans le milieu renouvelé. La concentration peut être très infime et ne peut être détectée par l'instrument d'analyse utilisé ou alors la plante n'a pas libéré d'ETMs dans le nouveau milieu.

Les travaux de Chaffei et al. [195] ont montré que la quantité de cadmium incorporée dans la plante au terme de la période de traitement métallique est sensiblement constante pendant la période de culture dans le nouveau milieu, alors que la masse de tissus augmente sensiblement. Ceci révèle que le métal reste séquestré dans la plante, il n'y a pas de relargage de cadmium dans le nouveau milieu de culture.

Dans des prochains travaux, il sera impératif de quantifier le cadmium et le nickel dans les plantes pour lever toute ambiguïté.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'objectif du travail réalisé était d'estimer d'une part le pouvoir de phytoremédiation d'une lentille d'eau, *Lemna gibba*, vis-à-vis d'un mélange binaire de cadmium et de nickel et d'autre part estimer l'impact de ce mélange sur la physiologie et la biochimie de cette dernière.

Tout d'abord, le choix du matériel végétal, *L. gibba*, est pertinent pour cette étude. La *L. gibba* est une plante commune à de nombreux écosystèmes aquatiques et très représentative de la flore indigène. Sa reproduction végétative par bourgeonnement permet l'obtention d'une biomasse très élevée, pouvant envahir de grandes surfaces. Elle peut-être récoltée très facilement depuis le milieu naturel et peut être cultivée en laboratoire très aisément. Cette espèce est très réactive à la présence des métaux. Ces capacités à tolérer les élément-traces variés et à des concentrations assez élevées sont avérées.

Pour se rapprocher au mieux des conditions de contamination des biotopes aquatiques, nous avons entrepris de faire cette étude avec un mélange binaire cadmium-nickel. L'environnement aquatique étant toujours contaminé par une variété d'élément-traces et est rarement ou jamais contaminé par un seul élément.

Notre travail a été réalisé en trois parties. Les principaux résultats obtenus ont été sélectionnés pour dégager des conclusions.

La première partie de cette thèse a été dédiée à l'évaluation de l'effet combiné cadmium-nickel sur les propriétés écotoxicologiques (paramètres de croissance et concentration des pigments photosynthétiques) et le pouvoir de phytoremédiation de la plante par une approche globale. L'approche adoptée s'inspire des plans de surface et tout particulièrement le plan centré réduit. Ce type de plan permet d'apprécier au mieux l'évolution des différentes réponses aux différents facteurs

étudiés (concentrations en cadmium et concentration en nickel) mais aussi permet d'apprécier à la fois l'effet individuel de chaque facteur et les effets d'interactions entre facteurs. Une modélisation des réponses en fonction des concentrations des deux métaux a été réalisée.

D'une manière générale,

- Les résultats mettent en évidence les effets des ETMs sur les paramètres écotoxicologiques de la plante : paramètres de croissance et concentration des pigments photosynthétiques.
- Les résultats indiquent le pouvoir de cette plante à réduire considérablement le cadmium et le nickel présents dans le milieu de culture.
- Chaque réponse a pu être modélisée dans un polynôme de second degré.
- les modèles postulés de second degré pour chaque réponse sont significatifs par l'analyse de l'ANOVA. Ces modèles sont représentatifs de la relation : réponse- variable.
- L'analyse de la variance due au manque d'ajustement pour chaque réponse étudiée est non significative, validant ainsi le modèle.
- Tous les modèles postulés sont représentatifs des expériences réalisées (les coefficients de régression sont supérieurs à 0,95) ; indiquant une forte corrélation entre les valeurs observées et prédites.
- Le signe positif des coefficients de régression des modèles mathématiques représente un effet synergique, tandis qu'un signe négatif indique un effet antagoniste.
- L'étude a révélé que toutes les réponses étudiées sont dépendantes de l'espèce métallique et de sa concentration (effet individuel) dans le milieu de culture mais aussi de la présence d'autres espèces métalliques (effet d'interaction).

Ces résultats présentent l'intérêt d'utiliser un plan de surface pour une meilleure compréhension et représentation des phénomènes étudiés : toxicité et taux d'abattement des métaux dans l'intervalle des concentrations choisies. Il ne faut surtout pas perdre de vue que ces résultats sont valables uniquement dans les

intervalles définis des facteurs étudiés et dans les conditions expérimentales instaurées.

La deuxième partie a été consacrée à la compréhension de la réponse biochimique de la plante au stress cadmium-nickel et à la cinétique d'élimination de ces ETMs. Pour ce faire, nous avons choisi trois combinaisons de concentration de cadmium et de nickel dans l'intervalle des concentrations étudiées en première partie (10, 25 et 50% en concentration). Trois métabolites, sucres, acides aminés et proline, ont été sélectionnés pour mesurer leurs rôles dans la tolérance et/ou dans la désintoxication face à la présence de cadmium et de nickel dans le milieu de culture. En parallèle à ces mesures biologiques l'étude des cinétiques d'élimination de ces métaux a été réalisée.

L'exposition de *L. gibba* au mélange binaire cadmium et nickel dans les conditions expérimentales prédéfinies durant 4 jours a permis d'observer :

- Une accumulation des sucres solubles chez les plantes traitées aux ETMs en comparaison au témoin (milieu sans ETMs).
- Une accumulation significative en acides aminés en comparaison au témoin.
- Une augmentation significative de la teneur en proline en comparaison au témoin.
- Ces accumulations de métabolites est fonction de la concentration des ions métalliques (Cd^{2+} et Ni^{2+}) présents dans le milieu de culture.
- Une réduction des ETMs du milieu de culture est fonction du temps. Elle est réalisée en deux phases : une phase initiale rapide (j1 et j2) suivie d'une phase de ralentissement.
- Les taux d'abattelements des deux métaux est inversement proportionnel à leurs concentrations initiales dans le milieu de culture.

Ces résultats témoignent de la mise en place de mécanisme de tolérance et/ou résistance par ces plantes capables de croître sur un milieu pollué (cadmium et

nickel). Et souligne l'importance de l'élimination des métaux dès les premiers moments de culture.

La dernière partie a été consacrée à l'évaluation des effets réversibles probables du cadmium et du nickel sur la concentration de certains métabolites de *L. gibba*. Pour se faire des cultures de lentilles d'eau pré-stressées, préalablement par le cadmium et le nickel dans les mêmes conditions définies dans la partie deux, sur un milieu nutritif normal ne contenant pas de cadmium et de nickel ont été réalisées. Les résultats ont révélé :

- Une diminution de la concentration des sucres.
- Une diminution de la concentration des acides aminés
- Une diminution de la teneur en proline.
- Aucune concentration en cadmium ou en nickel n'a pu être quantifiée dans les milieux renouvelés.

De ces observations, nous pouvons conclure à la réversibilité des effets des ETMs sur la concentration des métabolites jadis augmenté chez la plante stressée. Ce qui signifie qu'une contamination transitoire des milieux par le cadmium et le nickel à certaines concentrations peut ne pas être suivie de conséquences physiologiques négatives. L'incertitude de la présence de cadmium et de nickel dans le nouveau milieu normal nécessite d'autres études plus poussées pour pouvoir conclure.

Enfin, les résultats acquis dans cette thèse permettent d'envisager de nouvelles perspectives pour des études futures :

- L'utilisation des isotopes stables pour la contamination des milieux synthétiques, ouvrira de nombreuses applications dans la compréhension des transferts de métaux du milieu à l'organisme et au sein de l'organisme considéré.

- L'étude de la synthèse et de la régulation des enzymes du métabolisme cellulaire afin de comprendre la signalisation et les cascades de réactions cellulaires et moléculaires induites par les polluants métalliques.
- Suivre l'évolution des conditions physico-chimiques du milieu de culture pour voir l'impact de celui-ci sur le comportement physiologique et le pouvoir de la plante à la phytoremédiation.
- Pour simuler au mieux la réalité des contaminations environnementales, il est nécessaire d'augmenter le nombre de variables (ETMs) et d'ajouter à ces mélanges métalliques des polluants organiques souvent retrouvés dans les milieux aquatiques tels les pesticides.
- Etudier le système en condition réelle (non contrôlé) pour déterminer les facteurs environnementaux qui peuvent diminuer les performances des plantes à réduire la charge polluante et à instaurer les conditions idéales pour cette dernière.
- Développer le procédé en système continu pour un éventuel essai en conditions réelles.
- Etudier le devenir de ces plantes après traitement c'est-à-dire leur valorisation. Et aussi de trouver un moyen approprié pour récupérer les ETMs séquestrés dans la plante.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Schuurmann G., Markert B., "Ecotoxicology, Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects", John Wiley & Sons Inc. and Spektrum Akademischer Verlag, (1998), 900 p.
- [2] Chen C.Y., Stemberger R.S., Klaue B., Blum J.D., Pickhardt C., Folt C.L., "Accumulation of heavy metals in food web components across a gradient of lakes", *Limnol. Oceanogr.*, 2000, 45, 7, 1525 – 1536.
- [3] JORA, "Valeurs limites des rejets d'effluents liquides industriels", Journal officiel de la République algérienne N°26, (23 Avril 2006), 6p.
- [4] JORA, "Modalités d'octroi de l'autorisation de déversement des eaux usées autres que domestiques dans un réseau public d'assainissement ou dans une station d'épuration", Journal officiel de la République algérienne N°36, (21 Juin 2009), 2p.
- [5] JORA, "Proportions d'éléments contenus dans les eaux minérales naturelles et les eaux de sources ainsi que les conditions de leurs traitements ou les adjonctions autorisées", Journal officiel de la République algérienne N°27, (26 Avril 2006), 3p.
- [6] JORA, "Qualité de l'eau de consommation humaine", Journal officiel de la République algérienne N°18, (23 Mars 2011), 4p.
- [7] JORA, "Qualité des eaux superficielles et souterraines destinées à l'alimentation en eau des populations", Journal officiel de la République algérienne N°34, (19 Juin 2011), 3p.
- [8] Tremel-Schaub, A., Feix, I., "Contaminations des sols - Transfert des sols vers la plantes", EDP Sciences, ADEME Ed., Angers, (2005), 413 p.

- [9] Bargagli R., "Trace elements in terrestrial plants. An ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery", Springer, (1998), 324 p.
- [10] Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov S., et Salt D.E., "Bioconcentration of heavy metals by plants". *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5, (1994), 285 - 90.
- [11] Baker, A.J.M., Walker, P.L., "Physiological responses of plants to heavy metals and the quantification of tolerance and toxicity", *Chem. Spec. Bioavailab.*, 1, (1989), 7 - 17.
- [12] Pelletier, E., Campbell, P.G.C., Denizeau, F., "Écotoxicologie moléculaire - Principes fondamentaux et perspectives de développement", Les Presses de l'Université du Québec, Quebec, Canada, (2004), 450 p.
- [13] Sapci, Z., Ustun, E.B., "Interactions between contaminated aquatic environments and element uptake by *Echinodorus amazinocus* and *Cryptocoryneun dulata*" *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 76, (2012), 114 – 125.
- [14] Nriagu JO, Pacyna JM, "Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals", *Nature* 333, (1988), 134 - 139.
- [15] Sorme, L., Lagerkvist, R., "Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm", *Sci. Total Environ.*, 298, (2002), 131 - 145.
- [16] Gagnon C., Saulnier I., "Distribution and fate of metals in the dispersion plume of a major municipal effluent", *Environ. Pollut.*, 124, (2003), 1, 47 - 55.
- [17] Kabata-Pendias, A., Pendias, H., "Trace Elements in Soils and Plants", CRC Press, Boca Ratón, (2001), 413p.
- [18] DeBaar, H.J.W., LaRoche, J. "Trace metals in the oceans: Evolution, biology and global change". *Mar. Sci. front. Eur.*, (2003), 79 -105.
- [19] Horvat, T., Vidaković-Cifrek, Ž., Oreščanin, V., Tkalec, M., Pevalek-Kozlina, B., "Toxicity assessment of heavy metal mixtures by *Lemna minor* L". *Sci. Total Environ.*, (2007), 384, 229 – 238.

- [20] Dirilgen, N., “Mercury and lead: Assessing the toxic effects on growth and metal accumulation by *Lemna minor*”, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74, (2011), 48 – 54.
- [21] Foster, I. D. L., Charlesworth, S. M., “Heavy metals in the hydrological cycle: trends and explanation”, *Hydrol. Process.*, 10, (1996), 227 - 261.
- [22] Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H., “Defining bioavailability and bioaccessibility for the risk assessment and remediation of soils and sediment is complicated”, *Envir. Sci. Technol.*, 38, (2004), 228 - 231.
- [23] McGeer, J., Henningsen, G., Lanno, N., Fisher, R., Sappington, K., Drexler, J., “Issue Paper On The Bioavailability And Bioaccumulation Of Metals”, U.S. Environmental Protection Agency, (2004), 126p.
- [24] Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.G., Muntau, H., Van Leewen, H.O., Lobinski, R., “Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches”, *Pure Appl. Chem.*, 72, (2000), 1453 -1470.
- [25] Pelletier, É., Campbell, P.G.C., “L’écotoxicologie aquatique - comparaison entre les micropolluants organiques et les métaux : constats actuels et défis pour l’avenir”, *J. Water Sci.*, 21, 2, (2008), 173 -197.
- [26] Monferrán, M.V., Pignata, M. L., Wunderlin, D. A., “Enhanced phytoextraction of chromium by the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus* in presence of copper”. *Environ. Pollut.*, 161, (2012), 15 – 22.
- [27] Megateli, S., Semsari, S., Couderchet, M., “Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba*”, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72, (2009), 1774 – 1780.
- [28] Miquel, M. “Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé”, Rapport Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (Dir.), Rapport Sénat n°261, (2001), 360p.
- [29] Ahammed, G. J., Wang, M.-M., Zhou, Y.-H., Xia, X.-J., Mao, W.-H., Shi, K., Yu, J.-Q., “The growth, photosynthesis and antioxidant defense responses of five

vegetable crops to phenanthrene stress”, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 80, (2012), 132 – 139.

[30] Appenroth, K.-J., Krech, K., Keresztes, Á., Fischer, W., Koloczek H., “Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation”, *Chemosphere* 78, (2010), 216 – 223.

[31] Lahive, E., O’Halloran, J., Jansen, M.A.K., “Differential sensitivity of four Lemnaceae species to zinc sulphate. *Environ. Exp. Bot.*, 71, (2011), 25 – 33.

[32] Prasad, M., Malec, P., Waloszek, A., Bojko, M., Strzalka, K., “Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation”. *Plant Sci.*, 161, (2001), 881 – 889.

[33] Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Hitmi, A., “Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L.”, *Chemosphere*, 68, (2007), 1563 - 1575.

[34] Gupta, M., Chandra, P., “Bioaccumulation and toxicity of mercury in rooted-submerged macrophyte *Vallisneria spiralis*”, *Environ. Pollut.*, 103, (1998), 327- 332.

[35] Lafabrie, C., Major, K.M., Major, C.S., Miller, M.M., Cebrián, J., “Comparison of morphology and photo-physiology with metal/metalloid contamination in *Vallisneria neotropicalis*”. *J. Hazard. Mater.*, 191, (2011), 356 – 365.

[36] Yilmaz, D., Uruc-Parlak, K., “Nickel-induced changes in lipid peroxidation, antioxidative enzymes, and metal accumulation in *Lemna gibba*”, *Int. J. Phytorem.*, 13, (8), (2011), 805 – 817.

[37] Nehnevajova, E., Lyubenova, L., Herzig, R., Schröder, P., Schwitzguébel, J.-P., Schmölling, T., “Metal accumulation and response of antioxidant enzymes in seedlings and adult sunflower mutants with improved metal removal traits on a metal-contaminated soil”, *Environ. Exp. Bot.*, 76, (2012), 39 – 48.

- [38] Lei, L., Xiaoping, H., Borthakur, D., Hui, N., “Photosynthetic activity and antioxidative response of seagrass *Thalassia hemprichii* to trace metal stress”, *Acta Oceanol. Sin.*, 31, (3), (2012), 98 – 108.
- [39] Deng, G., Li, M., Li, H., Yin, L., Li, W., “Exposure to cadmium causes declines in growth and photosynthesis in the endangered aquatic fern (*Ceratopteris pteridoides*)”, *Aqua. Bot.*, (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquabot.2013.07.003>
- [40] Ouariti, O., Gouia, H., Ghorbal, M. H., “Responses of bean and tomato Plants to cadmium -growth, mineral nutrition and nitrate reduction”, *Plant Physiol. Bio-Chem.*, 26, (1997), 347 - 354.
- [41] Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley-Whitaker, J., Bleeker, P.M., “The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes”, *J. Exp. Bot.*, 53, (2002), 2381 - 2392.
- [42] Prasad, M.N.V., Hagemeyer, J., “Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems”, Springer Ed., Berlin and New York, (1999), 413 p.
- [43] Hall, J.L., “Cellular mechanism for heavy metal detoxification and tolerance”, *J. Exp. Bot.*, 53, (2002), 1 – 11.
- [44] Shah, K., Nongkynrih, J.M., “Metal hyperaccumulation and bioremediation”, *Biol. Plant.*, 51 (4), (2007), 618 – 634.
- [45] Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., “Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and Phytoremediation”, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 18, (2005), 339 – 353.
- [46] Cobbett, C., Goldsbrough, P., “Phytochelatin and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis”, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, (2002), 159 – 182.
- [47] Ali, H., Khan, E., Sajad, M. A., “Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications”, *Chemosphere*, 91, (2013), 869 – 881.

- [48] Rauser, W.E., "Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins", *Cell Biochem. Biophys.*, 31, (1999), 19 – 48.
- [49] Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD, Wedd AG. "Metal ion ligands in hyperaccumulating plants", *J. Biol. Inorg. Chem.*, 11, (2006), 2 - 12.
- [50] Sanita di Toppi, L., Gabbrielli, R., "Response to cadmium in higher plants", *Environ. Exp. Bot.*, 41, (1999), 105 – 130.
- [51] Ghosh, M., Singh, S.P., "A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products", *Appl. Ecol. Environ. Res.*, 3, (2005), 1 – 18.
- [52] Madrid F., Liphadzi M.S., Kirkham M.B., "Heavy metal displacement in chelate-irrigated soil during Phytoremediation", *J. Hydrol.*, 272, (2003), 107-119.
- [53] Prasad, M.N., "Phytoremediation of Metal-Polluted Ecosystems: Hype for Commercialization", *Russ. J. Plant Physiol.*, 50, (2003), 686 – 700.
- [54] Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., "Phytoremediation", *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 49, (1998), 643 – 648.
- [55] Holmes, N.T.H., Whitton, B.A., "The macrophytic vegetation of the river Tees in 1975: observed and predicted changes" *Freshw. biol.*, 7 (1977), 43 - 60.
- [56] Haury, J., Peltre, M.-C., Muller, S., Thiebaut, G., Tremolieres, M., Demars ,B., Barbe, J., Dutartre, A., Daniel, H., Bernez, I., Guerlesquin, M., Lambert, E., "Les macrophytes aquatiques bioindicateurs des systèmes lotiques - Intérêts et limites des indices macrophytiques. Synthèse bibliographique des principales approches européennes pour le diagnostic biologique des cours d'eau", UMR INRA-ENSA EQHC Rennes & CREUM-Phytoécologie, (2000), 126p.
- [57] Cook , C.D.K. "Water plant of the world", Pitman press, England, (1974), 561p.
- [58] Barbe, J., "Les végétaux aquatiques - Données biologiques et écologiques - Clés de détermination des macrophytes de France" , *Bul. Franc. Piscicul.*, (1984), 1 – 42.

- [59] Lauret, M., Oheix, J., Derolez, V., Laugier, T., "Guide de reconnaissance et de suivi des macrophytes des lagunes du Languedoc-Roussillon, (2011), Ifremer, 148 p.
- [60] Collectif "Biologie et écologie des espèces végétales proliférant en France", Synthèse bibliographique, In Les études de l'Agence de l'eau n°68, (1997), 199 p.
- [61] Wang, W., "Literature review on duckweed toxicity testing", Environ. Res., 52, (1990), 7 - 22.
- [62] Hillman, W.S. "The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature", The Bot. Rev., 27, (1961), 221 - 287.
- [63] American Public Health Association (APHA), Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th edition, Washington, D.C., (1992), 1268 p.
- [64] Brain, R. A., Wilson, C. J., Johnson, D. J., Sanderson, H., Bestari, K. J., Hanson, M. L., Sibley, P. K., Solomon, K. R., "Effects of a mixture of tetracyclines to *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum* evaluated in aquatic microcosms", Environ. Pollut., 138, (2005), 425 – 442.
- [65] Zhang, C.Y., Werth, C.J., Webb, A.G., "Investigation of surfactant-enhanced mass removal and flux reduction in 3D correlated permeability fields using magnetic resonance imaging", J. Contam. Hydrol., 100, (2008), 116 – 126.
- [66] Kielak, E., Sempruch, C., Mioduszevska, H., Klocek, J., Leszczyński, B., "Phytotoxicity of Roundup Ultra 360 SL in aquatic ecosystems: Biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant", Pest. Biochem. Physiol., 99, (2011), 237 –243.
- [67] Sasmaz, A., Obek, E., "The accumulation of silver and gold in *Lemna gibba* L. exposed to secondary effluents", Chem. der Erde, 72, (2012), 149 – 152.
- [68] Park, J.-S., Brown, M. T., Han, T., "Phenol toxicity to the aquatic macrophyte *Lemna paucicostata*", Aquat. Toxicol., 106 – 107, (2012), 182 – 188.

- [69] Seeland, A., Oehlmann, J., Müller, R., “Aquatic ecotoxicity of the fungicide pyrimethanil : Effect profile under optimal and thermal stress conditions”, *Environ. Pollut.*, 168, (2012), 161 - 169.
- [70] Dhir, B., Sharmila, P., Pardha Saradhi,P., Abdul Nasim,S. “Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater” , *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 72, (2009), 1790 – 1797.
- [71] Mishra, V.K., Tripathi, B.D., “Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes”, *Bioresour. Technol.*, 99, (2008), 7091 – 7097.
- [72] Srivastava, S., Shrivastava, M., Suprasanna, P., D’Souza, S.F., “Phytofiltration of arsenic from simulated contaminated water using *Hydrilla verticillata* in field conditions”. *Ecol. Eng.*, 37, (2011), 1937 – 1941.
- [73] Bharti,S., Kumar, B. T., “Phytoremediation of the coalmine effluent”, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 81, (2012), 36 – 42.
- [74] Martin-Garin, A., “Cadmium 109 et environnement”, rapport IRSN, (2004), 14 p.
- [75] Copaux, H.E., Perpérot, H., “Chimie minérale : description des éléments chimiques et leurs propriétés”, Armand colin, Paris, tome I, (1925), 202 p.
- [76] Borchardt, T., "Relationship between carbon and cadmium uptake in *Mytilus edulis*", *Mar. Biol.*, 85, (1985), 233 - 244.
- [77] Alslaibi, T. M., Abustan , I., Ahmad, M. A., Abu Foul, A., “Cadmium removal from aqueous solution using microwaved olive stone activated carbon”, *J. Environ. Chem. Eng.*, (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2013.06.028>
- [78] Siripornadulsil, S., Siripornadulsil, W., “Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: Potential for microbial bioremediation”, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 94, (2013), 94 – 103.

- [79] Prapagdee, B., Chanprasert, M., Mongkolsuk, S., "Bioaugmentation with cadmium-resistant plant growth-promoting rhizobacteria to assist cadmium phytoextraction by *Helianthus annuus*", *Chemosphere*, 92, (2013), 659 – 666.
- [80] Cossa, D., Lassus, P., "Le cadmium en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie", Editions Ifremer, Plouzané, France, 16, (1989), 111p.
- [81] Gonzalez, J. L., Chiffoleau, J. F., Miramand, P., Thouvenin, B. "Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire", Programme scientifique Seine Aval, Editions Ifremer, Plouzané, France, (1999), 31p.
- [82] Price, N. M. et Morel, F. M. M. "Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom." *Nature* 344, (6267), (1990), 658 - 660.
- [83] Lane, T. W. et Morel, F. M. M., "A biological function for cadmium in marine diatoms." *Proc. Nation. Acad. Sci.*, 97(9), (2000), 4627 - 4631
- [84] Filipić, M., "Mechanisms of cadmium induced genomic instability", *Mutation Res.*, 733, (2012), 69 – 77.
- [85] Waalkes, M.P., "Cadmium carcinogenesis in review", *J.Inorg. Biochem.*, 79, (2000), 241 - 244.
- [86] Alcock, R.A., "The Character and Occurrence of Primary Resources Available to the Nickel Industry. Extractive Metallurgy of Nickel and Cobalt", *The Metal. Soc.*, (1988), 67 - 89.
- [87] Avias, J., "Nickel: Element Geochemistry", *The Encyclopedia of Geochemistry and Environmental Sciences*, R.W. Fairbridge (éd.), Van Nostrand Reinhold Co., New York, NY, (1972), 790 - 793.
- [88] Cotton, F.A., Wilkinson, G., "Advanced Inorganic Chemistry: A Comprehensive Text", Wiley-Interscience, New York, NY, (1988).
- [89] Demirezen, D., Aksoy, A., Uruc, K., "Effect of population density on growth, biomass and nickel accumulation capacity of *Lemna gibba* (Lemnaceae)", *Chemosphere*, 66, (2007), 553 – 557.

- [90] Snodgrass, W.J., "Distribution and Behaviour of Nickel in the Aquatic Environment, Nickel in the Environment", J.O. Nriagu (éd.), John Wiley and Sons, New York, NY, (1980), 203-274.
- [91] PISSC (Programme international sur la sécurité des substances chimiques), "*Nickel*, Critères d'hygiène de l'environnement", n° 108, Organisation mondiale de la santé, Genève (Suisse), (1991), 384 p.
- [92] Denkhaus, E., Salnikow, K., "Nickel essentiality, toxicity and carcinogenicity", CRC. CR. REV. ONCOL-HEM., 42, (2002), 35 - 56.
- [93] Mishra, V.K., Tripathi, B.D., "Accumulation of chromium and zinc from aqueous solutions using water hyacinth (*Eichornia crassipes*)", J. Hazard. Mater., 164, (2009), 1059 – 1063.
- [94] Liang, H.M., Lin, T.H., Chiou, J.M., Yeh, K.C., "Model evaluation of the phytoextraction potential of heavy metal hyperaccumulators and non-hyperaccumulators". Environ. Poll., 157, (2009), 1945 – 1952.
- [95] Karatas, M., "Removal of Pb(II) from water by natural zeolitic tuff : Kinetics and thermodynamics". J. Hazard. Mater., 199 – 200, (2012) , 383 – 389.
- [96] Gupta, V. K., Jain, C.K., Ali, I., Sharma, M., Saini, V.K., "Removal of cadmium and nickel from wastewater using bagasse fly ash—a sugar industry waste", Water Res., 37, (2003), 4038 – 4044.
- [97] Saygideger, S., Gulnaz, O., Istifli, E.S., Yucel, N., "Adsorption of Cd(II), Cu(II) and Ni(II) ions by *Lemna minor* L.: effect of physicochemical environment". J. Hazard. Mater., 126 , (2005), 96 – 104.
- [98] Saadat, S., Karimi-Jashni, A., "Optimization of Pb(II) adsorption onto modified walnut shells using factorial design and simplex methodologies", Chem. Eng. J., 173, (2011), 743 – 749.
- [99] Barakat, M.A., Ramadan, M.H., Alghamdi, M.A., Algarny, S.S., Woodcock, H.L., Kuhn, J.N., "Remediation of Cu(II), Ni(II), and Cr(III) ions from simulated wastewater by dendrimer/titania composites", J. Environ. Manage., 1, (17), (2013), 50 - 57.

- [100] Aliabadi, M., Irani, M., Ismaeili, J., Piri, H., Javad Parnian, M., "Electrospun nanofiber membrane of PEO/Chitosan for the adsorption of nickel, cadmium, lead and copper ions from aqueous solution", *Chem. Eng. J.*, 220, (2013), 237 – 243.
- [101] Miretsky, P., Saralegui, A., Cirelli, A.F., "Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires Argentina)", *Chemosphere* 57, (8), (2004), 997 – 1005.
- [102] Khellaf, N., Zerdaoui, M., "Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant *Lemna gibba* L". *Bioresour. Technol.*, 100, (2009), 6137 – 6140.
- [103] Keskinan, O., Goksu, M.Z.L., Yuceer, A., Basibuyuk, M., Forster, C.F., "Heavy metal adsorption characteristics of a submerged aquatic plant (*Myriophyllum spicatum*)", *Process Biochem.*, 39, (2003), 179 – 183.
- [104] Oporto, C., Arce, O., Van den Broeck, E., Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C., "Experimental study and modelling of Cr (VI) removal from wastewater using *Lemna minor*". *Water Res.*, 40, (7), (2006), 1458 – 1464.
- [105] Akhtar, N., Iqbal, J., Iqbal, M., "Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana* : characterization studies". *J. Hazard. Mater.*, B 108, (2004), 85 – 94.
- [106] Maleva, M. G., Nekrasova, G. F., Malec, P., Prasad, M.N.V., Strzałka, K., "Ecophysiological tolerance of *Elodea canadensis* to nickel exposure", *Chemosphere*, 77, (2009), 392 - 398.
- [107] Coman, V., Robotin, B., Ilea, P., "Nickel recovery/removal from industrial wastes: A review", *Resour. Conserv. Recycl.*, 73, (2013) 229 – 238.
- [108] Chollet, R., "Screening of inhibitors (antimetabolites) of the biosynthesis or function of amino acids or vitamins with a *Lemna* assay. In: *Target Assay for Modern Herbicides and Related Phytotoxic Compounds*", (Böger, P. and Sandmann, G., Eds.). Lewis Publisher, London, UK., (1993), 143 – 149.

- [109] Yetilmezsoy, K., Demirel, S., Vanderbei R.-J., “Response surface modeling of Pb(II) removal from aqueous solution by *Pistacia vera* L.: Box–Behnken experimental design”, *J. Hazard. Mater.*, 171, (2009), 551 – 562.
- [110] Bajpai, S., Gupta, S.K., Dey, A., Jha, M.K., Bajpai, V., Joshi, S., Gupta, A., “Application of Central Composite Design approach for removal of chromium (VI) from aqueous solution using weakly anionic resin: Modeling, optimization, and study of interactive variables”, *J. Hazard. Mater.*, 227– 228, (2012), 436 – 444.
- [111] Koo, N., Jo, H.-J., Lee, S.-H., Kim, J.-G., “Using response surface methodology to assess the effects of iron and spent mushroom substrate on arsenic phytotoxicity in lettuce (*Lactuca sativa* L.)”, *J. Hazard. Mater.*, 192, (2011), 381 – 387.
- [112] Hasan, S.H., Srivastava. P., Talat, M., “Biosorption of lead using immobilized *Aeromonas hydrophila* biomass in up flow column system: factorial design for process optimization”. *J. Hazard. Mater.*, 177, (2010), 312–322;
- [113] Mkandawire, M., Taubert, B., Dudel, E. G., “Limitations of growth-parameters in *Lemna gibba* bioassays for arsenic and uranium under variable phosphate availability”, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 65, (2006), 118 – 128.
- [114] Lichtenthaler, H.K., “Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes”, *Methods in Enzymol.*, 148, (1987), 350 – 382.
- [115] Rodier ,J., Legube, B., Merlet, N., Brunet ,R., “L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer”, Collection: Technique et Ingénierie, Dunod (2009), 1600 p.
- [116] Tanhan, P., Kruatrachue, M., Pokethitoyook, P., Chaiyarat, R., “Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]”. *Chemosphere* 68, (2007), 323 – 329.
- [117] Sereshti, H., Heravi Y. E., Samadi, S., “Optimized ultrasound – assisted emulsification microextraction for simultaneous trace multielement determination of heavy metals in real water samples by ICP-OES”, *Talanta*, 97, (2012), 235 – 241.

- [118] Singh, K. P., Gupta, S., Singh, A. K., Sinha S., “Optimizing adsorption of crystal violet dye from water by magnetic nanocomposite using response surface modeling approach”. *J. Hazard. Mater.*, 186, (2011), 1462 – 1473.
- [119] Srinivasan, A., Viraraghavan, T., “Oil removal from water by fungal biomass : a factorial design analysis”, *J. Hazard. Mater.*, 175, (2010)695–702.
- [120] Sen,R., Swaminathan, T., “Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production”. *Biochem. Eng. J.*, 21, (2004), 141–148.
- [121] Mojiri, A., Abdul Aziz, H., Zaheb, M.A., Aziz, S.Q., Selamat, M.R.B., “Phytoremediation of heavy metals from urban waste leachate by southern cattail (*typha domingensis*)”. *Inter. J. Scien.Res. Environ. Scien.*, 1,(14), (2013), 63 - 70.
- [122] Prakash, O., Talat, M., Hasan, S.H., Pandey, R. K., “Factorial design for the optimization of enzymatic detection of cadmium in aqueous solution using immobilized urease from vegetable waste”. *Bioresour. Technol.*, 99, (2008), 7565 – 7572.
- [123] Naumann, B., Eberius, M., Appenroth, K.-J., “Growth rate based dose–responserelationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growthinhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St.” *J. Plant Physiol.*, 164, (2007),1656 – 1664.
- [124] Cheng, L.-J., Cheng, T.-S. “Oxidative effects and metabolic changes following exposure of greater duckweed (*Spirodela polyrhiza*) to diethyl phthalate”, *Aqua. Toxicol.*, 109, (2012), 166 – 175.
- [125] Sobkowiak R., Deckert J., “Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cells of soybean” ,*Plant Physiol. Biochem.*, 41, (2003), 767 - 772.
- [126] Richard, D., Giraud, N., Pradere, F., Chevalet, P., Soubaya, T., “Biologie” , Edition dunod ,(2004) , 696 p.

- [127] Halliwell, B., Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chem. Phys. Lipids*, 44, (1987), 327 – 340.
- [128] Young, J.A., “The photoprotective role of carotenoids in higher plants”, *Physiol. Plant*, 83, (1991), 702 – 708.
- [129] Young, A., Britton, G., “Photobleaching in the unicellular green-alga *Dunaliella parva* 19/9”, *Photosynth. Res.*, 25, (1990), 129 – 136.
- [130] Demmig-Adams, B., Adams, W.W., “The xanthophyll cycle”. In JH RG Alscher, eds, ed, *Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, (1993), 91-110.
- [131] Parlak, U.K., Demirezen Yilmaz, D., “Ecophysiological tolerance of *Lemna gibba* L. exposed to cadmium”, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 91, (2013), 79 –85.
- [132] Sandialo, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A., “Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants”, *J. Exp. Bot.*, 52, (2001), 2115 - 2126.
- [133] Yang, Y., Zhang, Y., Wei, X., You, J., Wang, W., Lu, J., Shi, R., “Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress”. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74, (2011), 733 – 740.
- [134] Vajpayee, P., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Ali, M.B., Singh, S.N., “Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L”, *Chemosphere* 41, (2000), 1075 – 1082.
- [135] Kupper,H., Kupper,F., Spiller,M., “In situ detection of heavy metals substituted chlorophylls in water plants”, *Photosynth. Res.*,58, (1998), 123 – 133.
- [136] Wolterbeck, H.T., Verberg, T.G., “Predicting metal toxicity revisited: general properties vs. specific effects”, *Sci. Total Environ.*, 279, (2001), 87 – 115.
- [137] Charles, A.L., Markich, S.J., Ralph, P., “Toxicity of uranium and copper individually, and in combination, to a tropical freshwater macrophyte (*Lemna aequinoctialis*)”. *Chemosphere* 62, (2006), 1224 – 1233.

- [138] Demim, S., Drouiche, N., Aouabed, A., Semsari, S., "CCD study on the ecophysiological effects of heavy metals on *Lemna gibba*". Ecol. Eng., 57, (2013), 302 – 313.
- [139] Peng, K., Luo, C.H., Lou, L., Li, X., Shen, Z., "Bioaccumulation of heavy metals by the aquatic plants *Potamogeton pectinatus* L. and *Potamogeton malainus* Miq. and their potential use for contamination indicators and in wastewater treatment", Sci. Total Environ., 392, (2008), 22 - 29.
- [140] Dhir, B., Srivastava, S., "Heavy metal removal from a multi-metal solution and wastewater by *Salvinia natans*". Ecol. Eng., 37, (2011), 893 – 896.
- [141] Demim, S., Drouiche, N., Aouabed, A., Benayad, T., Couderchet, M., Semsari, S., "Study of heavy metal removal from heavy metal mixture using the CCD method", J. Ind. Eng. Chem., (2013), [http : // dx.doi.org/10.1016 / j . jiec. 2013 .05.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2013.05.010).
- [142] Srivastava, S., Mishra, S., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Gupta, D.K., "Copper induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatins in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle", Aquat. Toxicol., 80, (2006), 405 - 415.
- [143] Monferrán, M.V., Aguado, J.A., Pignata, M.L., Wunderlin, D.A., "Copper induced response of physiological parameters and antioxidant enzymes in the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus*", Environ. Pollut., 157, (2009), 2570 -2576.
- [144] Bonanno, G., Lo Giudice, R., "Heavy metal bioaccumulation by the organs of *Phragmites australis* (common reed) and their potential use as contamination indicators". Ecol. Indic., (2009), doi:10.1016/j.ecolind.2009.11.002
- [145] Lin, Y.X. and X.m. Zhang, "Accumulation of heavy metals and the variation of amino acids and protein in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms in the Dianchi lake", Oceanol. Limnol. Sinica., 21, (1990), 179 - 84.
- [146] Stobrawa, K., Lorenc-Plucińska, G., "Changes in carbohydrate metabolism in fine roots of the native European black poplar (*Populus nigra* L.) in a heavy-metal-polluted environment". Sci. Total Environ., 373, (2007), 157 – 165.

- [147] Xu, J., Zhang, J., Xie, H., Li, C., Bao, N., Zhang, C., Shi, Q., “Physiological responses of *Phragmites australis* to wastewater with different chemical oxygen demands”, *Ecol. Eng.*, 36, (2010), 1341 – 1347.
- [148] Markert, B., Breure, A.M., Zechmeister, H.G., “Bioindicators and Biomonitors – Principles, Concepts and Applications”, Elsevier, Amsterdam, New York, Tokyo. (Eds.), 2003.
- [140] Verma, S., Dubey, R.S., “Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants”, *Plant Sci.*, 164, (2003), 645 – 655.
- [150] Yilmaz, D.D., Parlak, K.U., “Changes in proline accumulation and antioxidative enzyme activities in *Groenlandia densa* under cadmium stress”. *Ecol. Indic.*, 11, (2011), 417 – 423.
- [151] Mishra, R.K., Singhal, G.S., “Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids”. *Plant Physiol.*, 98, (1992), 1 – 6.
- [152] Mohamed, A. A., Castagna, A., Ranieri, A., Sanità di Toppi, L., “Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis”, *Plant Physiol. Biochem.*, (2012), doi:10.1016 / j . plaphy. 2012. 05. 002.
- [153] Costa, G., Spitz, E., “Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free amino acids, protein content of in vitro cultured *Lupinus albus*”, *Plant Sci.*, (1997), 128, 131– 140.
- [154] Zhang, W., Cai, Y., Tu, C., Ma, L. Q., “Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyper accumulating plant”. *The Sci. Total Environ.*, 300, (2002), 167 – 177.
- [155] Mittler, R., “Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance”. *Trends Plant Sci.*, 7, (2002), 405 – 410.

- [156] Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.*, 28, (1956), 350 – 356.
- [157] Yemm, E.W., Cocking E.C., "The determination of amino-acids with Ninhydrin", *Analyst*, 80, (1955), 209 – 213.
- [158] Trolls, IW., Lindsey J., A, "photometric method for the determination of Proline", *J. Biol. Chem.*, 215, (1954), 655 – 660.
- [159] Rascio, A., Sorrentino, G., Cedola, M.C., Pastore, D., Wittner, G., "Osmotic and elastic adjustment of durum wheat leaves under stress conditions", *Genetic Agr.*, 41, (1987), 427 – 436.
- [160] Maheshwari, R., Dubey, R. S., "Nickel-induced oxidative stress and the role of antioxidant defence in rice seedlings", *Plant Growth Regul.*, 59, (2009), 37 – 49.
- [161] Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakely R.L., Zerner, B., "Jack-bean urease (E.C. 3.5.1.5.3). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel", *J. Am. Chem. Soc.*, 97, (1975), 4131 – 4133.
- [162] Smith, A.M., Stitt, M., "Coordination of carbon supply and plant growth", *Plant Cell Environ.*, 30, (2007), 1126 - 1149
- [163] Cross, J.M., Von Korff, M., Altmann, T., Bartzetko, L., Sulpice, R., Gibon, Y., Palacios, N., Stitt, M., "Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions", *Plant Physiol.*, 142, (2006), 1574 - 1588
- [164] Samarakoon, A.B., Rauser, W.E., "Carbohydrate levels and phosphor assimilate export from leaves of *Phaseolus vulgaris* exposed to excess cobalt, nickel and zinc", *Plant Physiol.*, 63, (1979), 1165 - 1169.
- [165] Verma, S., Dubey, R.S., "Effect of cadmium on soluble sugars and enzymes of their metabolism in rice", *Biol. Plant*, 44, (2001), 117 – 123.

- [166] Mishra, P., Dubey, R. S., “Excess nickel modulates activities of carbohydrate metabolizing enzymes and induces accumulation of sugars by up regulating acid invertase and sucrose synthase in rice seedlings”, *Biometals*, 26, (2013), 97 – 111.
- [167] Jouve, L., Engelmann, F., Noirot, M., Charrier, A., “Evaluation of biochemical markers (sugar, proline, malonaldehyde and ethylene) for cold sensitivity in microcuttings of two coffee species”. *Plant Sci.*, 91, (1993), 109 – 116.
- [168] Sperdoui, I., Moustakas, M., “Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress”, *J. Plant Physiol.*, 169, (2012), 577– 585.
- [169] Coruzzi, G.M., Zhou, L., “Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging matrix effects”, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, (2001), 247 – 253.
- [170] Qi, Z., Stephens, N.R., Spalding, E.P., (2006) “Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile”, *Plant Physiol.*, 142, (2006), 963 - 971.
- [171] Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E., Frommer, W.B., “Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant”, *The Plant Cell*, 29, (1996), 1437–1446.
- [172] Ortiz-Lopez, A., Chang, H., Bush, D.R., “Amino acid transporters in plants”, *Bioch. Bioph. Acta.*, 1465, (2000), 275 - 280.
- [173] Shahbaz, M., Parmar, S., Stuver, C. E.E., Hawkesford, M.J., De Kok L. J., “Copper toxicity and sulfur metabolism in Chinese cabbage are affected by UV radiation. *Environ*”, *Exp. Bot.*, (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.04.007>
- [174] Chaffei Haouari, C., Hajjaji Nasraoui, A., Carrayol, E., Lelendais, M., Ghorbel, M. H., Gouia, H., “Foliar nitrogen and changes in free amino acid composition of *Solanum lycopersicum* under cadmium toxicity: kinetics of $^{15}\text{NH}_4^+$ ”, *Braz. J., Plant Physiol.*, (2012), 24(1), 19 - 27.

- [175] Hernandez, S., Deleu, C., Larher, F., “Accumulation de proline dans les tissus foliaires de tomate en réponse à la salinité”, C.R. Acad. Sci. Paris, Sci. vie / Life Sci., 323, (2000), 551 – 557.
- [176] Handa, S., Handa, A.K., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., “Proline Accumulation and the Adaptation of Cultured Plant Cells to Water Stress”, Plant Physiol., 80, (1986), 938 – 945.
- [177] Sharma, S.S., Diestz, K.J., “The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress”. J. Exp. Bot., 57, (2006), 711 – 726.
- [178] Shankers, A.K., Cervantes, C., Losa-Tavera, H., Avdainayagam, S., “Chromium toxicity in plants”, Environ. Int., 31, (2005), 739 – 753.
- [179] Moldes, C. A., Camiña, J. M., Medici, L. O. , Tsai, S. M., Azevedo, R. A., “Physiological effects of glyphosate over amino acid profile in conventional and transgenic soybean (*Glycine max*)”, Pestic. Biochem. Physiol., (2012), doi : 10 . 1016 /j.pestbp.2011.12.004
- [180] Signorelli, S., Arellano, J.B., Melo, T.B., Borsani, O., Monza, J., “Proline does not quench singlet oxygen: evidence to reconsider its protective role in plants”, Plant Physiol. Biochem., 64, (2013), 80 – 83.
- [181] Cheng, T.-S., Hung, M.-J., Cheng, Y.-I., Cheng, L.-J., “Calcium-induced proline accumulation contributes to amelioration of NaCl injury and expression of glutamine synthetase in greater duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.)”, Aqua. Toxicol., 144 – 145, (2013), 265 – 274.
- [182] Dinakar, N., Nagajyothi, P.C., Suresh, S., Damodharam, T. Suresh, C., “Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogaea* L.”, J. Environ. Biol., 30(2), (2009), 289 – 294.
- [183] John R., Ahmad P., Gadgil K., Sharma S. “Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. Plant”, Soil Environ., 54, (2008), 262 – 270.

- [184] Ozturk, F., Duman, F., Leblebici, Z., Temizgul, R, “Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite”. *Environ. Exp. Bot.*, 69, (2010), 167 – 174.
- [185] Schat, H., Vooijs, R., “Multiple tolerance and co-tolerance to heavy metals in *Silene vulgaris* - a co-segregation analysis”, *New Phytol.*, 136, (1997), 489 – 496.
- [186] Kastori, R., Petrovic, M., Petrovic, N., “Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower”. *J. Plant Nutr.*, 15, (1992), 2427 – 2439.
- [187] Jain, M., Mini Jos, E., Arora, D., Y.V.R. Kameshwar Sharma, “Effect of proline on *Triticum aestivum* (wheat) under the drought conditions of salinity”, *J. pharm. Res.*, 7, (2013), 506 - 509
- [188] Lv, W.-T., Lin, B., Zhang, M., Hua, X.-J., “Proline Accumulation Is Inhibitory to *Arabidopsis* Seedlings during Heat Stress”. *Plant Physiol.*, 156, (2011), 1921 – 1933.
- [189] Pardha Saradhi, P., Alia-Arora, S., Prasad, K.V.S.K., “Proline accumulate in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 209, (1995), 1 - 5.
- [190] Zhang, W., Cai, Y., Tu, C., Ma, L. Q, “Arsenic speciation and distribution in an arsenic hyper accumulating plant”. *The Sci. Total Environ.*, 300, (2002), 167 – 177.
- [191] Veglio, F., Beolchini, F., “Removal of metals by biosorption: a review”, *Hydrometallurgy*, 44, (1997), 301 – 316.
- [192] Bökük, H., Yakar, A., Can Türker, O., “Assessment of *Lemna gibba* L. (duckweed) as a potential ecological indicator for contaminated aquatic ecosystem by boron mine effluent”, *Ecol. Indic.*, 29, (2013), 538 – 548.
- [193] Sivaci, E.R., Sivaci, A., Sökmen, M., “Biosorption of cadmium by *Myriophyllum spicatum* L. and *Myriophyllum triphyllum* orchard”, *Chemosphere* 56, (2004), 1043 – 1048.
- [194] Davis, S.M., Drake, K.D., Maier, K.J., “Toxicity of boron to the duckweed, *Spirodella polyrrhiza*”, *Chemosphere* 48, (2002), 615 - 620.

[195] Chaffei, C., Gouia, H., Masclaux, C., Ghorbel, M. H., “Réversibilité des effets du cadmium sur la croissance et l’assimilation de l’azote chez la tomate (*Lycopersicon esculentum*)”, C. R. Biologies, 326, (2003), 401 – 412.

[196] Saqrane, S., El ghazali, I., Oudra, B., Bouarab, L., Dekayir, S., Mandi, L., Ouazzani, N., Vasconcelos, V.M., “Detection of microcystin contamination by the measurement of the variability of the in vivo chlorophyll fluorescence in aquatic plant *Lemna gibba*”, Toxicon, 53, (2009) 9 – 14.

APPENDICES

APPENDICE A

PROTOCOLE DE PREPARATION DU MILIEU DE CHOLLET

La préparation de 1 litre de milieu nutritif est réalisée à partir de solutions stocks selon les proportions définies dans le tableau ci-dessous.

Solution	Composition chimique	Concentration (g/l)	Volume prélevé pour un litre de milieu de culture (ml)
S1	KNO_3	40.40	5
	KH_2PO_4	10.06	
	K_2HPO_4	05.76	
S2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	04.96	10
	CaCl_2	01.14	
	H_3BO_3	0.03572	
	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	00.28	
S3	ZnSO_4	00.60	1
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.043	
	$\text{CoCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0.054	
S4	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.20	5
	K_2SO_4	03.48	
S5	$\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$	0.078	1

APPENDICE B

GLOSSAIRE

Alliage : produit de caractères métallique résultant de l'incorporation d'un ou de plusieurs élément, métallique ou non, à un métal.

Analyse de régression : ensemble de tests statistiques permettant de prendre une décision sur un modèle dans sa globalité (test F de Fisher), sur chacun des coefficients (test t de Student) et sur les résidus (test de la normalité des résidus...).

Analyse de variance (ANOVA ou ANAVAR) : test statistique (test F de Fisher) permettant de décomposer la variation d'une réponse à partir des changements des modalités des facteurs et du modèle postulé.

Anémie : diminution de la concentration en hémoglobine du sang, quelle qu'en soit la cause.

Angiosperme : plantes à fleurs.

Asthénie : affaiblissement générale de l'organisme.

Bradycardie : lenteur du rythme cardiaque, normale ou pathologique.

Bryophyte : végétal, le plus souvent terrestre, sans racine ni vaisseaux, mais généralement, pourvu de feuilles, tel les mousses

Charophyte : végétal d'eau douce présentant des caractères à la fois d'algue verte et de mousse, à tige dressé, aux ramifications dichotomiques régulières.

Dermatite de la peau : nom donné à certaines affections de la peau.

Effet moyen d'un facteur : variation de la réponse observée ou modélisée lorsque le facteur change de modalité.

Emphysème : dilatation excessive et permanentes des alvéoles pulmonaires, avec rupture de leurs cloisons.

Fibrose : transformation fibreuse d'un tissu.

Homéostasie : maintient à un niveau constant, par les organismes vivants, des caractéristiques internes (concentration des substances, ...)

Insuffisance rénale : incapacité de l'organe à accomplir totalement sa fonction normale.

Interaction ou couplage : modification de l'effet d'un facteur en fonction de la modalité d'un autre facteur.

Isovariance par rotation : critère propre aux plans d'expérience pour l'étude des surfaces de réponse traduisant le fait que la fonction de variance ne dépende que de la distance au centre du modèle.

Méthode des moindres carrés : méthode mathématique permettant d'obtenir une estimation non biaisée des coefficients par minimisation de la somme des carrés des résidus.

Minéraux détritiques : minéraux résultant de la désagrégation de minéraux préexistant.

Monocotylédone : plante à fleurs dont la graine contient une plantule à un seul cotylédon.

Œdème : accumulation anormale de liquide provenant du sang dans les espaces intercellulaire d'un tissu.

Olivine : péridot de couleur vert-olive, commune dans les basaltes, les gabbros et les péridotites.

Ostéomalacie : déminéralisation des os due notamment à une carence en vitamine D et équivalente chez l'adulte du rachitisme.

Ostéoporose : fragilité diffuse des os due à une déminéralisation par raréfaction de la matrice protéique.

Pétiole : partie rétrécie reliant le limbe d'une feuille à la tige.

Phanérogame : plante vasculaire se reproduisant par des organes bien visible, regroupés en cônes ou en fleurs.

Photosynthèse : processus de fabrication de matière organique à partir de l'eau et du gaz carbonique de l'atmosphère, utilisant la lumière solaire comme source d'énergie et qui produit un dégagement d'oxygène. Activité réductrice permettant la synthèse de trioses phosphate.

Ptéridophytes : végétal cryptogame vasculaire, sans fleurs et aux tissus comportant des vaisseaux conducteurs, tel les fougères.

Pyrite : sulfure de fer, aux cristaux à reflets vert.

Pyroxène : silicate de fer, de magnésium, de calcium, parfois d'aluminium, présent dans les roches magmatiques et métamorphiques.

Résidu : écart entre la valeur observée d'une réponse et sa prévision par le modèle.

Respiration cellulaire : Mécanisme d'extraction d'énergie et de production d'ATP par oxydation.

Rhizome : Tige souterraine souvent horizontale des plantes vasculaires capable de produire des nouvelles plantes par reproduction végétative.

Stress oxydant : Déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants.

Thalles : appareil végétatif des végétaux inférieurs, ou l'on ne peut distinguer ni racine ni tige, ni feuilles.

Xénobiotique : Substance étrangère au milieu naturel ou à l'organisme possédant

Zostères : herbe marine vivace, formant de vastes prairies sous marines littorales.