

UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences de l'Ingénieur
Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Génie des Procédés

ETUDE DE LA CINETIQUE ET MODELISATION DE LA
BIOSORPTION DE QUELQUES METAUX LOURDS : Cd^{2+} ,
 Cu^{2+} et Zn^{2+} PAR LA PLANTE AQUATIQUE *Lemna gibba*

Par

David NDANG EKOUMA

Devant un jury composé de :

M. A.AOUABED	Maître de conférences, U. de Blida	Président
M. O.BOURAS	Maître de conférences, U. de Blida	Examineur
Mme CHAUCHE	Chargé de cours, U. de Blida	Examineur
Mme F. DERNOUNI	Chargé de cours, ENSH de Blida	Examineur
M. S. MEGATELI	Chargé de cours, U. de Blida	Invité
Mme S. SEMSARI	Maître de conférences, U de Blida	Rapporteur

Blida, 2 Mai 2006

RESUME

Certains métaux ont des effets très toxiques à long et court terme dans l'eau. Il est question de mettre au point une méthode de contrôle de la toxicité de certains cations métalliques tels que le Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} , moyennant l'étude de la biosorption de ces métaux sur une plante aquatique. Ainsi à l'instar d'autres types de lenticules, la *Lemna gibba* (lentille d'eau) et la *Lemna minor* et la *Lemna gibba* font l'objet de notre étude en vue d'optimiser dans un premier temps le milieu de culture in vitro, dans un second temps de déterminer et de définir l'impact de ces métaux (Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}) sur leur croissance.

La caractérisation, l'identification et l'évaluation des risques de la pollution que représentent les sources de pollution en générale, et celle des métaux en particulier, sont des tâches essentielles et indispensables pour la protection de l'environnement.

Sur le plan expérimental, il est intéressant de quantifier et modéliser le procédé de rétention qui représenterait l'adsorption et éventuellement la précipitation de certains cations métalliques sur les biocénoses aquatiques.

Pour cette étude, la plante aquatique *Lemna gibba* a été sélectionnée pour réaliser la biosorption de Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} .

SUMMARY

Certain metals have very toxic long and short time effects in water. It is thus question of making a point the method of control of the toxicity of certain metallic cations such as Cd^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} , by means of study of biosorption of these metals by aquatic plants. Apart from others types Duckweeds "*Lemna gibba*" and "*Lemna minor*" will be the objective of our study in view of optimising fast in a culture *in vitro* and secondly to determine and define the impact of this metals: Cd^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} and their spread.

The characterisation, identification and evaluation of pollutant risks that represent the sources of pollution in general and those of metals in particular are essential marks indispensable for the protection of the environment.

On the experimental plan, it is interesting to quantify and model the process of retention that represent adsorption and possibly precipitation of certain cations on aquatic biocenoses. For this study we choose aquatic plants *Lemna gibba* to realise the adsorption of Cd^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} .

REMERCIEMENTS...

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à ma directrice de thèse Madame **S.SEMSARI** Maître de Conférence au niveau du Département de Chimie Industrielle de la Faculté des Sciences de l'ingénieur de l'Université Saad Dahlab de Blida de m'avoir fait bénéficier de vos compétences scientifiques et de votre investissement au cours de ces deux années de recherche. Votre encadrement scientifique ainsi que votre expertise de chimiste m'a permis de mieux comprendre l'importance des précautions nécessaires à prendre afin de réaliser un travail d'initiation à la recherche. En dehors de vos qualités scientifiques, j'ai aussi pu profiter de vos qualités humaines dans le dévouement que vous avez porté sur mon travail malgré les contraintes. Trouvez ici l'expression de ma vive gratitude, pour m'avoir orienter et soutenu dans le cadre de ce travail très intéressant et enrichissant.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur **S.MEGATLI** Chargé de cours au Département des Sciences Agronomiques de l'Université Saad Dahlab de Blida pour son soutien moral, technique et matériel sans faille tout au long de mon travail. Les mots me manquent pour vous adresser mes remerciements.

Je souhaite particulièrement remercier Monsieur **A.AOUABED**, Maître de Conférence au Département de Chimie Industrielle de la Faculté des Sciences de l'ingénieur de l'Université Saad Dahlab de Blida pour m'avoir honoré par sa présence comme président du jury à ma soutenance.

Je tiens à remercier particulièrement Madame **CHAOUCHE**, Chargé de cours au Département des Sciences Agronomique de l'Université Saad Dahlab de Blida, Monsieur **O.BOURAS**, Maître de Conférence au Département de Chimie Industrielle de la Faculté des Sciences de l'ingénieur de l'Université Saad Dahlab de Blida et Madame **F.DERNOUNI**

chargé de cours à l'Ecole Nationale Supérieure d'Hydraulique de Blida pour avoir accepté de faire partie du jury de ma soutenance.

Je tiens à exprimer ma gratitude à :

- Monsieur **A. KHALIFA**, Maître de Conférence au Département de Chimie Industrielle de la Faculté des Sciences de l'ingénieur de l'Université Saad Dahlab de Blida.

- Monsieur **S. SEGHOOR**, conseiller au Ministère de l'Enseignement Supérieur, de m'avoir tous les deux encourager à continuer ma formation en Post-Graduation.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **S.OUZZANE**, Maître de Conférence au Département de Chimie Industrielle de la Faculté des Sciences de l'ingénieur de l'Université Saad Dahlab de Blida, de m'avoir soutenu moralement et aider dans les démarches administratives durant toute cette période.

J'adresse également mes remerciements à :

- Tout le personnel du Laboratoire d'analyse des eaux de l'**Agence Nationale de Recherche Hydraulique** de Bir-Mourad-Rais, pour leur contribution dans la réalisation des analyses chimiques et leur soutien.

- Monsieur **ABDELMALEK** et Monsieur **H.MOUSAOUI** du Laboratoire d'Analyse Fonctionnelle du Département de Chimie Industrielle de la Faculté des Sciences de l'ingénieur de l'Université Saad Dahlab de Blida.

- Mademoiselle **I. NZANG NDONG**, pour son soutien moral et matériel sans faille durant toute la période de ma formation en Post-Graduation.

- Monsieur **G. DE BELAIR** Maître de Conférence, ancien professeur à l'Université d'Annaba.

Et 1000 Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

TABLE DES MATIERE

RESUME	
REMERCIEMENTS	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION	10

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. NOTIONS DE TOXICOLOGIE ET D'ECOTOXICOLOGIE	
1.1 Ecotoxicologie	13
1.2 La toxicologie	15
1.3 Principales formes d'intoxication	18
1.4 Les agents toxiques et l'environnement	20
1.5 Paramètres de détection de l'état de l'environnement d'un écosystème	21
1.6 Notion de biomonitoring	23
1.7 Utilisation des plantes aquatiques comme bio indicateur	25
2. GENERALITE SUR LES LENTILLES D'EAU	
2.1 Systématique	28
2.2 Description de la <i>Lemna</i>	30
2.3 Ecologie de lentilles	33
2.4 Facteurs internes	35
2.5 Facteurs climatiques	37
2.6 Utilisation des lenticules comme bioindicateur	37
3. LES METAUX LOURDS ET LEURS IMPACTS SUR L'ENVIRONNEMENT	
3.1 Notion de polluant métallique	43
3.2 Origine des éléments de traces métalliques dans l'environnement	44
3.3 Devenir des métaux lourds dans le milieu aquatique	47

3.4 Effet des métaux lourds sur l'homme et son environnement	49
3.5 Biosorption des métaux lourds par la plante	62
3.6 Phénomène physiologique de décontamination	70
3.7 Mécanismes de réparation cellulaires	75
3.8 Les paramètres influant sur les mécanismes d'accumulation des métaux	76
3.9 Indice d'évaluation de la qualité des effluents en relation avec les plantes	80

4. CONCEPT DE LA MODELISATION DE LA BIOSORPTION

4.1 Généralités	88
4.2 Concept et formulation d'un modèle classique	89
4.3 Planification des expériences	91
4.4 Notion de modélisation des réponses	94
4.5 Différents types des plans	95
4.6 Postulation d'un modèle	96

PARTIE II

5. MATERIEL ET METHODE

5.1 Matériel et méthodes	99
5.2 Optimisation de la croissance de la <i>Lemna minor</i> et la <i>Lemna gibba</i>	103
5.3 Tests de toxicité ou bioessais	104
5.4 Analyse physico-chimique	107
5.5 Analyse des métaux lourds	107
5.5 Etude statistique	108
5.7 Principe de modélisation de la cinétique de bio sorption des métaux lourds testés (Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}) par la plante <i>Lemna gibba</i> :	108

PARTIE III

6. RESULTATS ET DISCUSSION

6.1. Optimisation de la croissance de la <i>Lemna minor</i> et de la <i>Lemna gibba</i>	110
6.2 .Tests de toxicité	116
6.3. Effets de la toxicité du Cd^{2+} , Cu^{2+} et du Zn^{2+} sur l'aspect physico-chimique du milieu de culture de <i>Lemna gibba</i>	118
6.4. Effet du Cd, Cu et le Zn sur l'état écophysiological de la <i>Lemna gibba</i>	129
6.5. Etude de la biosorption du Cd^{2+} , Cu^{2+} , et Zn^{2+} sur la <i>Lemna gibba</i>	135

7. MODELISATION ET SIMULATION DE LA BIOSORPTION DE LA LEMNA GIBBA

7. I Introduction	139
7 .2 Principe	139

7.3 Etude de modélisation de biosorption du cadmium par La <i>Lemna gibba</i>	141
7.4 Simulation : cas du cadmium	144
7.5 Etude de modélisation de biosorption du cuivre par La <i>Lemna gibba</i>	145
7.6 Simulation : cas du cuivre	147
7.7 Etude de modélisation de biosorption du zinc par La <i>Lemna gibba</i>	148
7.8 Simulation : cas du zinc	149
CONCLUSION GENERALE	151
LISTE DES ABREVIATIONS	155
APPENDICES	156
REFERENCES	179

LISTES DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure n° 1.1 : Dimension spatio- temporelles des échelles d'études en écotoxicologie	15
Figure n° 2.1 : Chronologie théorique des effets induits par l'introduction d'un polluant dans le milieu naturel	18
Figure n° 3.1 : Représentation schématique des différents types de paramètres mesurables dans le milieu physique et à différents niveaux d'organisation biologique pour l'évaluation de l'environnement	22
Figure n° 4.2 : Arbre phylogénétique évolutif des lemnacées	30
Figure n° 5.2 : Anatomie de la lenticule	30
Figure n° 6.2 : Reproduction sexuée chez la <i>Lemna</i>	32
Figure n° 7.3 : Evolution des teneurs en cadmium chez les <i>Ceratophyllum</i>	54
Figure n° 8.3 : Exemple de biomagnification	64
Figure n° 9.3 : Schéma récapitulatif du modèle de l'ion libre (k1, K2 et K3 sont des vitesses de réactions)	66
Figure n° 10.3 : Schéma d'entrée du cadmium dans la cellule végétale	71
Figure n° 11.3 : Voies de synthèse du PC	72
Figure n° 12.3 : Séquestration des ions métallique dans le complexe. Ici, trois ions Cd liés à 4 phytochélatines par les atomes de soufre (S) de la cystéine. Les ronds noirs figurent les groupes carboxyles	73
Figure n° 13.3 : Interconnexion des voies de biosynthèse de la chlorophylle et de la proline	84
Figure n° 14.4 : Schéma conceptuel type d'un modèle de bioaccumulation d'un organisme	89
Figure n° 15.4 : Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre -1 et +1	93

Figure n° 16.4 : Les domaines de tous les facteurs formant le domaine d'étude	93
Figure n° 17.4 : Modèle mathématique	95
Figure n° 18.5-20.5 : Différents sites de prélèvement de l'échantillonnage	99-100
Figure n° 21.6-22.6 : Evolution du nombre de colonies en fonction du temps à différentes dilutions	110-111
Figure n° 23.6-28.6 : Evolution du nombre de colonies en fonction de la lumière à différents éclairages	117-120
Figure n°29.6-31.6 : Variation de la concentration de phosphate contenu dans le milieu de culture de <i>Lemna</i> en fonction de temps	119-120
Figure n° 32.6-34.6 : Conductivités prélevées en fonction du temps	124-125
Figure n° 35.6-37.6 : Variation de la dureté en présence des métaux et en fonction du temps	127-128
Figure n°38.6, 39.6 : Evolution de la concentration en proline en fonction du temps	134
Figure n°40.6-A, B , C : Variation de la concentration de métaux dans le milieu et de ses taux retenus sur la plante en fonction de temps	136-137
Figure n° 41.7 : Evolution du pourcentage de rétention en fonction du temps à différents pH : cas du cadmium	144
Figure n°42.7 : Courbe d'isoréponse par intervalle cas du cadmium	145
Figure n° 43.7 : Evolution du taux de rétention en fonction du temps à différents pH : cas du cuivre	147
Figure n° 44 .7 : Courbe de niveau	147
Figure n° 45.7 : Evolution du taux de rétention en fonction du temps à différents pH : cas du zinc	149
Figure n° 46.7 : Courbe de niveau pour l'échantillon contaminé	149
Tableau n° 1.3 : Rapport en éléments de traces métalliques des sources anthropiques et naturelles dans l'environnement en tonnes/an	46
Tableau n° 2.3 : Quelques espèces chimiques du cadmium dans les eaux naturelles en fonction de leurs tailles	50
Tableau n° 3.3 : Concentration en cuivre dans l'eau et les plantes	58
Tableau n° 4.3 : Valeurs sanitaires et environnementales utilisées et concentrations sans effet prévisibles pour l'environnement	61

Tableau n° 5.3 : Classes de qualité écophysiologicals	87
Tableau n°6.5 : Les concentrations choisies pour les bio-essais	105
Tableau n° 7.6-9.6 : Taux d'inhibitions et leur écart-type :	116- 117
Tableau n°10.6-12.6 : Quantités de phosphate absorbées (%), les écart-types, taux d'inhibition et le test de significativité à 0,05 (au 10 ^{ième} jour) des métaux	121- 123
Tableau n° 13.6 : Classe de qualité écophysiologicals pour l'indice de stress (Is) dans le cas de notre étude	130
Tableau n°14.6-16.6 : Valeurs moyennes de l'indice de stress \pm écart-types pour les différentes durées de test. Cas du cadmium	130 et 132
Tableau n° 17.7 : Variables codées	140
Tableau n° 18.7 : Facteurs selon les niveaux	140
Tableau n° 19.7 : Différents matrices d'expérience pour les deux réponses en Cd ²⁺	142
Tableau n° 20.7 : Sources de dispersions et modèles mathématiques : cas du cadmium	142
Tableau n° 21.7 : Localisation d'un optimum pour chaque concentration en cadmium	145
Tableau n° 22.7 : Sources de dispersions et modèles mathématiques : cas du cuivre	146
Tableau n° 23.7 : Localisation d'un optimum pour la concentration la cuivre	148
Tableau n° 24.7 : Sources de dispersions et modèles mathématiques : cas du zinc	148
Tableau n° 25.7 : Localisation des optimums en fonction des facteurs	150
Tableau n° 26.7 : Tableau comparatif des réponses	150

INTRODUCTION

Il est admis que l'un des problèmes majeurs de ce siècle est la prévention de la qualité de l'environnement. En effet, les rejets des substances d'origines naturelles ou de synthèses constituent l'un des plus importants facteurs de dégradation de la biosphère par l'homme. Cependant, les écosystèmes aquatiques, récepteurs directs de ces rejets, révèlent des taux élevés de concentration en polluants supérieures aux charges naturelles et sont par conséquent l'objet de programmes de surveillance qui cherchent à quantifier et prévenir l'impact des pollutions [1].

Les mesures chimiques font preuve de beaucoup de limites étant donné qu'elles ne nous renseignent pas sur les effets de mélange de contaminants et ne permettent pas de prédire une éventuelle pollution dans un écosystème aquatique ou de détecter les différentes molécules chimiques à caractère toxique existantes et rejetées dans le milieu naturel [2]. En plus, ces méthodes physico-chimiques classiques telles que la précipitation, l'échange d'ion, le traitement électrochimique et la floculation s'avèrent onéreuses et peu performantes surtout lorsqu'il s'agit de solutions peu concentrées en métaux dissous [2].

Ainsi depuis 1970, les lemnaées ont suscité l'attention des chercheurs en raison de leur grand potentiel d'absorber les contaminants minéraux et organiques résiduels émanant des activités anthropiques [3].

En 1975, Goldberg a proposé le suivi des concentrations des contaminants dans les organismes vivants pour la surveillance des milieux aquatiques. Son principe est basé sur le fait que les organismes concentrent les contaminants du milieu dans lequel ils se trouvent [4], [5], [6], [7], [8].

D'autres travaux ont mis en évidence la capacité qu'ont certains végétaux aquatiques à accumuler les éléments métalliques à de très fortes concentrations à proximité de sites miniers et industriels [9], [10], [11], [12]. Cette propriété de bioaccumulation a

suggéré l'utilisation de ces plantes pour l'évaluation et la surveillance des métaux dans l'eau [13], [14].

L'intérêt croissant porté actuellement à ces biomatériaux est basé sur l'application de leurs capacités d'accumulation en éléments traces métalliques comme étant une technologie adaptée à la nouvelle donne de réduction des polluants métalliques déversés dans l'environnement aquatique [14].

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche dont l'objectif principal est la modélisation de la bioaccumulation des métaux lourds chez les lentilles d'eau et l'utilisation de cette plante aquatique pour la biosurveillance des eaux. L'étude de la capacité qu'ont les lentilles à accumuler les contaminants est en effet, d'un intérêt considérable pour la compréhension des phénomènes écotoxicologiques et l'interprétation de la bioaccumulation *in vitro*.

La problématique de ce travail consiste à :

- Obtenir une biomasse rapide, selon les conditions de culture adéquates pour la *lemna gibba*.
- Vérifier la viabilité et la pérennité des *Lemna gibba* pour la réalisation des bios tests.
- Réaliser des tests de toxicités sur la *Lemna gibba* en présence du Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} .
- Evaluer l'état physiologique de la plante.
- Modéliser la cinétique de la bioaccumulation des contaminants par la plante.

Nous, nous sommes proposé à cet effet de réaliser les travaux qui constituent notre étude autour des chapitres suivants :

- Une synthèse bibliographique au cours de laquelle a été traitée la présentation des généralités sur l'écotoxicologie, des propriétés des lentilles, des métaux lourds (Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}) dans l'environnement et du concept de modélisation.
- Matériels et méthodes.
- Essais sur la réalisation d'une culture *in vitro* afin d'obtenir une biomasse optimale pour la réalisation des biotests.
- L'évaluation des effets des métaux étudiés sur :

1. le taux de phosphore de la *Lemna gibba*. contenu dans les milieux de culture contaminés par le cadmium, le cuivre et le zinc.
 2. La dureté des milieux de culture contaminés par les mêmes métaux.
 3. La physiologie de la plante :
 - Analyse de la chlorophylle A.
 - Analyse de la proline contenue dans la biomasse.
- En dernière étape, la modélisation et la simulation de la bioaccumulation par la plante des métaux lourds étudiés, en fonction des paramètres temporels.

CHAPITRE 1

NOTIONS DE TOXICOLOGIE ET D'ECOTOXICOLOGIE

1.1 Ecotoxicologie

La fin des années 60 est soldée de la prise de conscience de l'ampleur et de la gravité de la pollution de l'écosphère, ce qui est à l'origine de l'intensification des recherches consacrées aux problèmes de pollution des milieux naturels et de la mise en place d'une subdivision au sein des sciences écologiques [15], [16], [17].

Le champ et la finalité de l'écotoxicologie seront alors résolus à l'étude des polluants directement ou indirectement toxiques, excluant d'importantes catégories de polluants dont les effets écologiques ne résultent pas de phénomènes de toxicité (pollution par gaz à effet de serre, pollutions thermiques des eaux, pollutions des eaux continentales par les phosphates). Une prévision des impacts potentiels de la pollution d'un écosystème donné (ou d'une fraction de l'écosystème - individu, population et communauté) par un produit chimique nouveau ou par un effluent complexe d'origine industrielle est mis en oeuvre [2] ; [18].

1.1.1 Définition de l'écotoxicologie

L'écotoxicologie selon RAMADE ,1979 est définie comme étant la science de l'étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents contaminants naturels ou artificiels produits par l'activité anthropogénique, ainsi leurs mécanismes d'action et leurs effets sur les organismes vivants dans la biosphère.

L'écotoxicologie est aussi défini comme la discipline qui étudie les conséquences écologiques de la pollution de l'environnement par les substances toxiques [18].

On assimile la toxicologie aquatique à une partie de l'écotoxicologie qui traite des écosystèmes aquatiques [19].

1.1.2 Intérêt de l'écotoxicologie

La détermination de la concentration d'un toxique dans un écosystème donné n'est pas souvent suffisante pour la protection de l'environnement. De plus, l'extension spatio-temporelle des programmes de biosurveillance quantitative des toxiques peut se révéler coûteuse. De ce fait, les méthodes analytiques écotoxicologiques les plus simples, rapides et fiables sont nécessaires en vue de fournir des informations supplémentaires sur les risques potentiels dus aux toxiques donnés [19].

Les tests de toxicité ou bio essais représentant l'aspect analytique des études écotoxicologiques, permettent d'établir les relations entre les quantités de toxiques absorbées et les différents effets biologiques sur les organismes des milieux naturels. L'action des substances toxiques sur les organismes vivants peut se traduire par divers effets physiologiques dont le plus important est la mort des organismes, mais aussi des troubles physiologiques (stérilité, ralentissement de la croissance ... etc) [19].

En outre, le polluant est un produit chimique ou tout autre produit étranger du milieu existant à des niveaux différents c'est-à-dire supérieurs ou inférieurs à des doses admissibles à la normale dans n'importe quelle composante de l'environnement. Cependant, la différence qui existe entre les produits synthétiques de l'activité anthropique et la pollution naturelle réside dans le fait que tout rejet humain quel soit est considéré comme anormal tandis que, pour les substances naturelles (cas des cyanotoxines libérées lors d'un boom algale), il sera difficile d'établir la normalité car leur concentration varie d'un lieu à l'autre et en fonction du temps [20].

L'usage des Xénobiotiques, qui sont des composés étrangers à un organisme particulier et n'intervenant pas dans le métabolisme normal permet de mettre en évidence les perturbations biochimiques telle que l'introduction de substance spécifique en présence d'un agent toxique donné qui, en général, précède la mortalité des organismes ou des troubles de la croissance [21].

1.1.3 Ecophysiologie

La relation entre la physiologie et l'écologie donne naissance à l'écophysiologie. Les toxiques déversés dans l'écosystème donnent à leur tour la notion d'écotoxicologie. On peut alors évaluer les risques et créer une méthode de gestion de l'environnement. (figure n°1.1) [22].

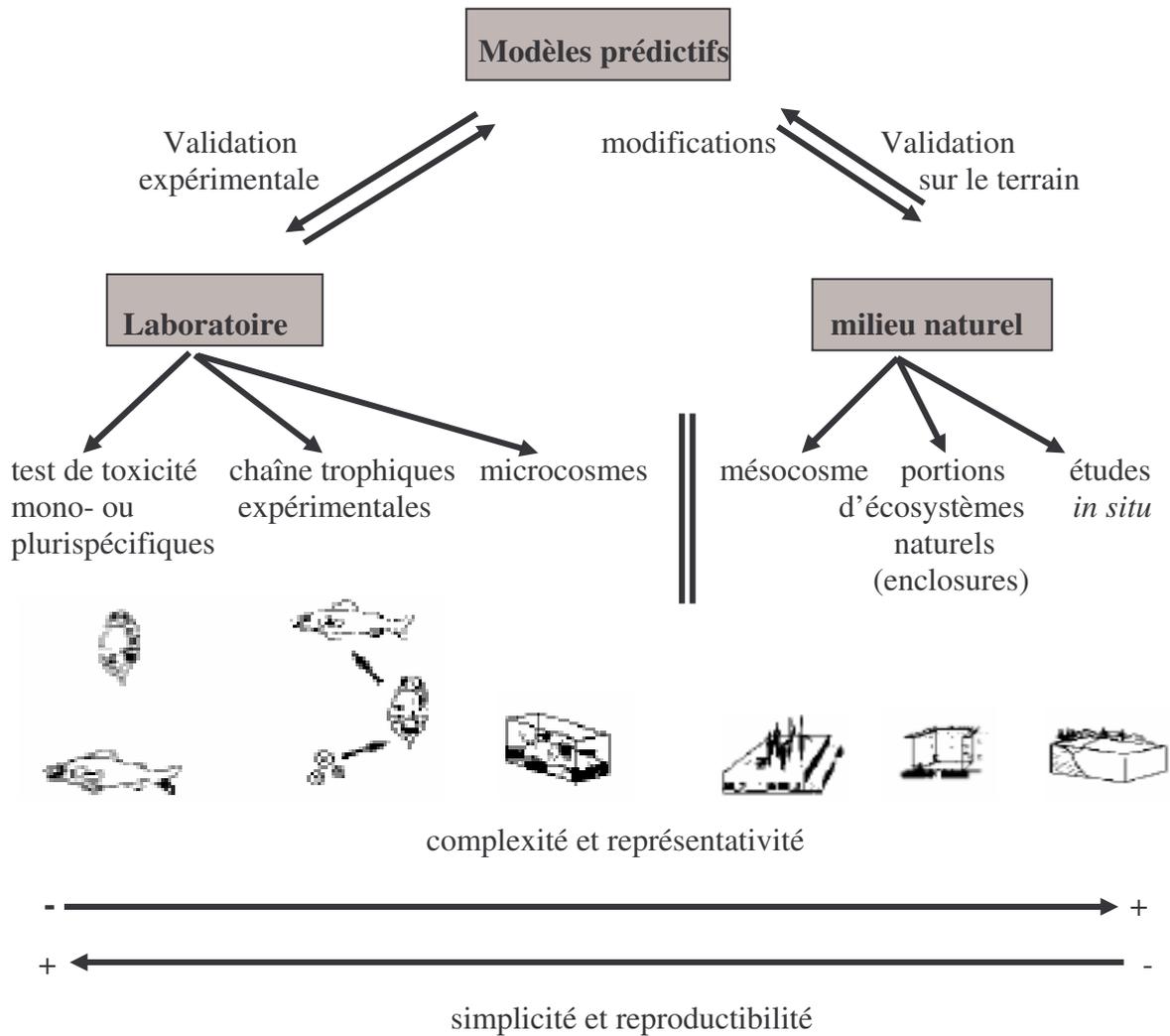


Figure n° 1.1 : Dimension spatio temporelle des échelles d'études en écotoxicologie (Lawerys, 1992).

1.2 La toxicologie

1.2.1 Définition

Le terme toxicologie désigne « *l'ensemble des investigations destinées à évaluer la toxicité des polluants sur les espèces vivantes* » [23]. TRUHAUT, (1974) définit la toxicologie comme « *la discipline qui étudie les substances toxiques ou poisons c'est-à-dire les substances qui provoquent des altérations ou perturbations des fonctions de l'organisme conduisant à des effets nocifs donc le plus grave, de toute évidence, est la mort de l'organisme en question* ». De ces définitions, il en vient à conclure que la notion de la toxicité est liée à l'ensemble des organismes vivants dans un écosystème. Son

objectif étant de définir les doses dangereuses, des seuils admissibles de concentration en produits nocifs [2].

LAWERYYS, (1992) définit la toxicologie comme étant la science qui traite les poisons. Cette science a pour objet d'étudier les modes d'action des poisons tant sur le plan analytique qu'au point de vue physiologique et biochimique [23].

Selon le rapport de l'académie des sciences (1998) la toxicologie s'intéresse aux effets néfastes que peuvent avoir les composés d'origine chimique ou biologique sur les êtres vivants.

1.2.2 Historique

Le mot toxicologie provient du grec « toxicon » qui veut dire « arc », ou l'utilisation des flèches empoisonnées représentait une de premières applications intentionnelles d'une substance toxique ; cependant, ce n'est qu'au début du XVIII ième siècle que la toxicologie devient réellement une discipline scientifique. En 1814, « ORFILA », à Paris, publie un des premiers traités en français : « traité des poisons du règne minéral, végétal et animal ». C'est à cette époque qu'ont été mis au point les tests scientifiques pour détecter et doser les poisons ainsi que leurs applications [22]. Bien que les effets de certains poisons aient été connus des grecs et des romains dans l'antiquité et que leurs emplois à des fins criminelles aient été poursuivis au cours du moyen age et de la renaissance, l'étude scientifique des substances toxiques ne débutera qu'au 19^{ième} siècle. A cette époque, l'intérêt au développement des tests spécifiques a vu le jours et s'orientait dans la détection et le dosage des poisons pour leur application dans le domaine de la médecine légale [22]. Ce n'est qu'au cours de ces derniers et surtout grâce au développement de la biochimie et de la physiologie que la toxicologie s'est orientée vers une connaissance du métabolisme et des mécanismes d'action toxique [22].

Le fait que ces applications soient faites dans un écosystème « *qui est un ensemble des organismes vivants, animaux, ou végétaux, terrestres ou aquatiques, vivants sur un territoire donné limité* » relève du domaine de l'écotoxicologie et donc le toxique est un facteur important de ce système [24] [25].

La toxicologie trouve son objectif dans l'étude de la contamination par un agent nocif quelconque (état solide, gazeux, liquide), de son devenir dans le milieu biologique [25].

1.2.3 Définition d'un toxique

Une substance est dite toxique lorsque sa présence à une concentration donnée dans le milieu considéré ou bien son absorption à une dose donnée, entraîne chez les organismes vivants des perturbations du fonctionnement de la fonction métabolique ou physiologique susceptible d'aboutir à la mort [26].

Le toxique est une substance qui provoque des altérations des fonctions de l'organisme au niveau moléculaire, cellulaire ou de l'organisme à une certaine dose donnée [26].

1.2.4 Manifestation de la toxicité

La toxicité est la manifestation quantitative ou qualitative des concentrations des produits nocifs donnés dans un milieu, ou son absorption se fait à des doses données. Ce qui entraîne des conséquences directes sur les organismes vivants du milieu.

Elle a diverses manifestations auprès de ces organismes vivants. Ces manifestations peuvent être des stress pour les plantes, des troubles des fonctions physiologiques et métaboliques chez des organismes supérieurs pouvant aboutir à la mort.

En réalité, toute substance est toxique potentiellement mais elle n'acquiert ce rôle, qu'après absorption au delà d'une dose seuil chez les organismes vivants [23].

En général, les essais de toxicité chronique sont beaucoup plus difficiles à réaliser que ceux de la toxicité aigue.

Selon cette toxicité, l'étude des polluants de type métallique retiendra notre attention. Ainsi, il y a lieu de faire une ébauche de compréhension sur les mécanismes qui accompagne la toxicité des polluants.

Séquence chronologique

Des événements biologiques affectant les organismes exposés aux polluants chimiques de l'environnement

Présence et effets

à différents niveaux d'organisation biologique

Signal

recherché

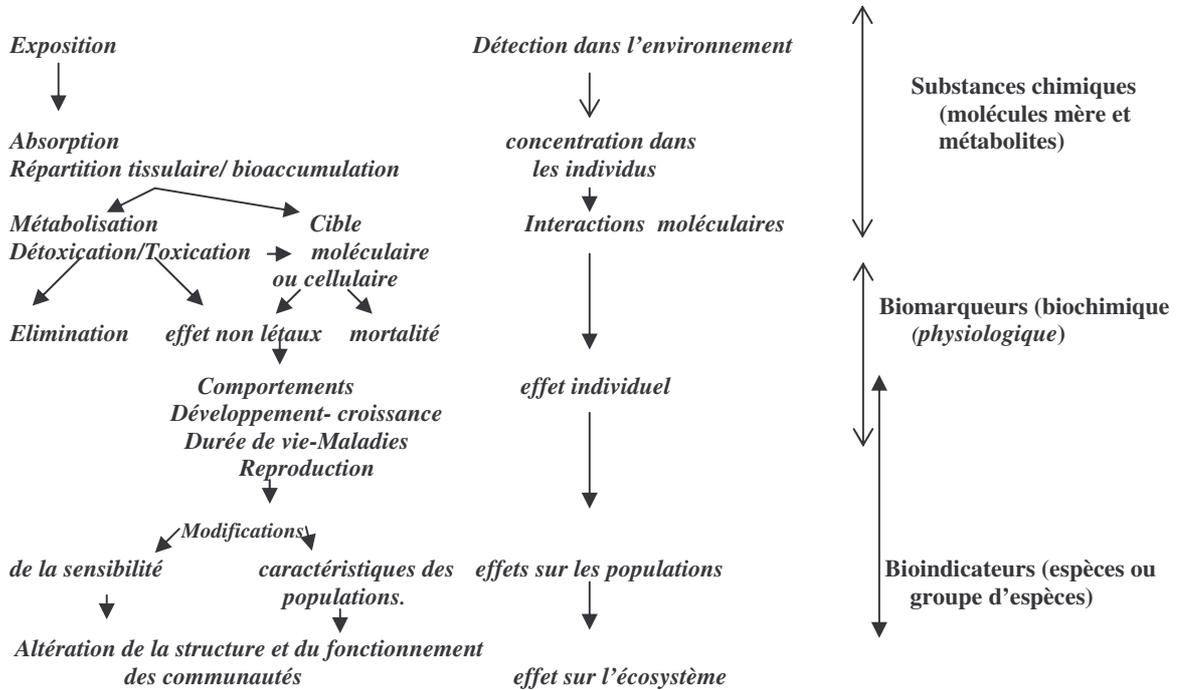


Figure n°2.1 : *Chronologie* théorique des effets induits par l'introduction d'un polluant dans le milieu naturel (Ramade et al., 1998).

1.3 Principales formes d'intoxication

On peut résumer cette manifestation de deux manières [27] :

- *Indirectement* : par accumulation tout au long d'une chaîne alimentaire (bioaccumulation). l'apparition des effets toxiques se faisant vers la fin de la chaîne trophique (absorption radiculaire chez les plantes, digestion chez les Animaux).
- *Directement* : au niveau d'une espèce.

L'évaluation de la toxicité conduit à définir trois approches basées sur les facteurs, doses et durée. Pour une même substance toxique, les êtres vivants peuvent présenter des troubles physiologiques variés selon les quantités absorbées et la durée d'exposition.

On distingue en général trois formes d'intoxication qui sont mesurées en fonction de leur gravité [23].

a) *toxicité aiguë* : elle est la manifestation la plus spectaculaire de la nocivité d'un poison. Elle résulte d'une exposition ou d'une absorption de courte durée pouvant entraîner une mort certaine dans l'immédiat. Ces essais sont généralement réalisés sur des organismes jeunes pendant une période de 24 à 76 h et est déterminée par une CL_{50} pour les poissons et d'un CE_{50} pour les algues et crustacés [27].

Le test de toxicité aigue constitue l'essai de référence classiquement mis en œuvre par exemple par les normes ISO et AFNOR. Ce test, qui permet, d'une part, une classification du degré de toxicité des substances ou des effluents considérés nocifs, constitue une étape préliminaire précédant le test chronique et d'autre part, de mieux prévoir la gamme de concentrations à considérer lors du test prolongé [23], [21], [28].

b) *toxicité sub-aiguë* : elle résulte de l'exposition fréquente ou répétée sur une période de plusieurs jours ou semaines [21]. Dans cette forme de toxicité, une proportion significative de population peut survivre à l'intoxication, bien que présentant des signes cliniques liés à l'absorption du toxique [27]. Dans ce contexte, l'admission de doses ou du maintien de l'organisme dans le milieu renfermant une concentration définie en substance à étudier pendant des durées définies atteint moins de 10% de la durée de vie de l'organisme étudié [23], [27].

c) *toxicité chronique* : Elle suppose une exposition continue des très faibles quantités du contaminant sur un espèce à une longue période. Cette exposition peut aller de plusieurs jours à toute une vie, voire davantage selon le cycle reproductif de l'organisme à étudier [29]. Cette forme de toxicité résulte de l'effet cumulatif de certaines substances qui vont être partiellement ou totalement retenu dans un organisme vivant du fait de leur liposolubilité ou de leur affinité chimique. Cet effet est capable de provoquer des manifestations toxiques ainsi que des bouleversements physiques, chimiques et physiologiques de l'espèce [22].

Le test de toxicité chronique sur *Daphnia magna* met en évidence, sur une durée de 21 jours, les effets de substances sur la survie ou mortalité, la croissance, la ponte, le physiologie, la cytologie, la production d'oxygène. Tous ces paramètres ont fait l'objet de discussions de différentes organisations internationales [30], [16].

d) Accoutumance

L'accoutumance est la disparition des modifications induites par des substances toxiques après une certaine période d'exposition ; il faut alors augmenter les doses pour produire les mêmes effets [31].

On peut considérer l'accoutumance comme un stade dangereux de l'intoxication chronique avec modification morphologique.

1.4 Les agents toxiques et l'environnement

Il existe plusieurs facteurs capables de transformer le métabolisme des polluants responsables des effets toxiques. Ces facteurs peuvent être regroupés suivant : [32]

1.4.1 Le composé lui-même [32]

- son état, qu'il soit solide liquide ou gazeux.
- sa solubilité
- sa dissociation

1.4.2 Le milieu

1.4.2.1 Le pH

Comme la toxicité est liée à l'état soluble ou non soluble d'un produit, elle est par conséquent liée au pH du milieu renfermant le produit.

Le pH détermine, en partie, la solubilité des éléments et par conséquent leur accumulation dans les organismes, et joue ainsi le rôle essentiel dans la biodisponibilité des métaux lourds [33]. La diminution du pH pour les solutions métalliques, augmente la solubilité des sels métalliques qui favorisent le passage ou la pénétration de ceux-ci dans les membranes cibles. Ce qui explique l'augmentation de la toxicité de la même solution ayant un pH neutre [33].

1.4.2.2 la température

La pénétration des toxiques dans l'organisme récepteur peut être favorisée par une élévation de température, étant donné que celle-ci entraîne une augmentation des métabolismes au niveau des organismes aquatiques [33].

1.4.2.3 la concentration en oxygène dissous

La diminution de l'oxygène dissous augmente la toxicité en accélérant les mouvements respiratoires de la plante, favorisant ainsi la pénétration des toxiques présents dans l'eau [33].

- *Le gaz carbonique*

Le gaz carbonique dissous agit en modifiant le pH du milieu et favorise la dissociation de certains toxiques, il agit aussi sur le rythme respiratoire des organismes vivants dans l'eau.

- la composition chimique de l'eau (présence de Ca et Mg ainsi que l'alcalinité de l'eau [33].

1.4.3 Action des toxiques sur les organismes vivants

- leur état physiologique

Le mécanisme d'accumulation et de décontamination des polluants dépend de l'état physiologique de l'organisme. Les variations d'accumulation semblent être liées au phénomène d'absorption supplémentaire sur la paroi cellulaire, dans le cas des eaux fortement oxygénées. Par contre, le phénomène d'accumulation des concentrations des métaux lourds dans l'eau n'est pas seulement lié aux paramètres physico-chimiques du milieu mais aussi au choix de l'espèce utilisée.

L'accumulation des polluants diffère en fonction des espèces. Toute espèce n'est pas bon bioindicateur. C'est pourquoi le principal facteur contrôlant les proportions des éléments traces métalliques dans les fractions intra et extracellulaire reste l'espèce utilisée [34].

- leur possibilité d'adaptation, d'accoutumance.

Il est important de remarquer que certains polluants sont souvent acceptés par les éléments d'un écosystème aquatique (cas des algues pour l'autoépuration) qui parfois les utilise sous forme de nutriments [31].

1.5 Paramètres de détection de l'état de l'environnement d'un écosystème

De nos jours, il existe des méthodes chimiques d'analyse très perfectionnées et souvent très coûteuses, permettant généralement d'évaluer l'étendue ainsi que la gravité d'une contamination de l'environnement tout en se basant sur un nombre réduit d'échantillons. Cependant, l'emploi de telles méthodes se révèle insuffisant étant donné qu'elle ne permet pas en même temps de quantifier tous les contaminants présents dans un échantillon. De

plus, la biodisponibilité et les effets toxicologiques de certains polluants peuvent varier en fonction de leur forme physique (espèces métalliques, ou molécule organique ionisable) d'une part, d'autre part, l'existence de l'interaction entre contaminants et les autres éléments abiotiques ou biotiques rendent moins difficiles ces méthodes chimiques d'analyse. C'est pourquoi l'approche biologique a été envisagée [27].

1.5.1 Recours à l'analyse chimique

Plusieurs travaux ont développés de multiples méthodes de mesure de variables biologiques et écologiques qui viennent compléter les analyses chimiques. L'étude des communautés biologiques de l'écosystème aquatique conduit à l'établissement à un état des lieux du fonctionnement de cet écosystème. Ainsi, les différents paramètres mesurables peuvent être identifier à différents niveaux biologiques figure n°3.1.

En outre aucune méthode d'analyse chimique ne permet de quantifier simultanément tous les contaminants dans un échantillon [35].

Par contre certains polluants peuvent avoir des interactions entre eux. Ainsi, si la toxicité du mélange est supérieure à la somme des toxicités de chaque composant, il y a synergie ; si au contraire, la toxicité globale est inférieure, il y a effet antagoniste [35].

Paramètres physico- chimique	Indices	Bioindicateurs	Biomarqueurs
N, P, DCO, DBO, O ₂	Biocénétiques (Indice de diversité)	Espèces indicatrices. (abondances présence ou absence)	Marqueurs biochimique cytologie et physiologie
	Bioaccumulateurs Biocapteurs Marqueurs éthologiques (Réactions comportementales)		

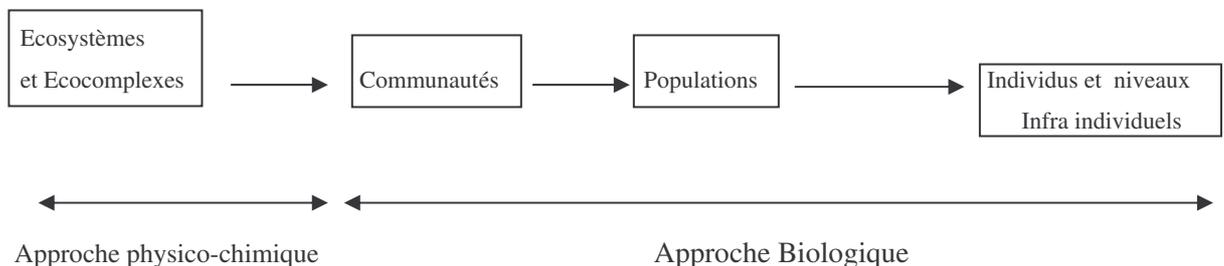


Figure n°3.1 : Représentation schématique des différents types de paramètres mesurables dans le milieu physique et à différents niveaux d'organisation biologique pour l'évaluation de l'environnement (Amiard, 1994).

1.6 Notion de biomonitoring

Dans la vie courante, les humains ainsi que d'autres organismes sont continuellement exposés à deux types de substances : Substances naturelles (celles trouvées dans le sol ou produites par des animaux) et les substances synthétiques (produits pharmaceutiques désinfectants, savons et détergents, aussi bien que les sous-produits de la combustion et d'autres polluants). L'exposition se fait par des contacts directs, d'autres se manifestent par absorption des aliments, ou simplement par respiration de l'air de notre environnement ou par contact avec l'eau ainsi que ses composantes.

Bien que certains recherches aient démontré que le corps humain absorbe des quantités minuscules de substances chimiques provenant de notre environnement (terrestre, aérien ou aquatique), les nouvelles technologies de nos jours ont permis à d'autres chercheurs de détecter et mesurer des concentrations traces des substances environnementales dans notre corps [6].

Le Biomonitoring a pour objectif d'évaluer l'impact de la pollution en fonction du temps à l'un des niveaux de l'édifice biologique d'un écosystème. La difficulté de sa réalisation est la création d'un écosystème voulu (« mésocosme » ou « microcosme ») [36].

1.6.1 Différents types de monitoring

Il existe plusieurs types de monitoring. On peut juste citer le monitoring physiologique (analyse de sang ou d'urine afin de détecter l'alcoolémie d'un individu à un instant t) ou le monitoring chimique qui est d'estimer les quantités de polluants accumulées ou accumulatrices dans une chaîne trophique [36].

Dans le cadre du suivi de l'impact des éléments traces et leurs répartitions dans l'écosystème, les macrophytes aquatiques ainsi que les algues sont beaucoup utilisés [37]. Ainsi, le biomonitoring intervient dans l'étude des échantillons de ces macrophytes ou/ et algues exposées à ces éléments traces afin de détecter la présence d'un bio marqueur d'exposition.

Une série de méthodes regroupant les tests de toxicité, bios test (bio essai) basés sur la détermination de la toxicité létale et chronique s'est développée.

1.6.2 Les biomarqueurs

Selon le National Research Council, 1987 (NRC), un biomarqueur est défini comme étant toute modification biochimique, physiologique et morphologique dans les plantes permettant de mesurer leur exposition à des substances toxiques.

Il est à signaler que l'efficacité d'une espèce et donc d'un biomarqueur dépend du degré d'adaptation au stress environnemental des populations étudiées et de leur homogénéité [16].

1.6.2.1 Biomarqueurs non spécifiques des métaux

Les Biomarqueurs non spécifiques, qui répondent à un ensemble de stress environnementaux, sont sans doute utiles car ils montrent l'existence d'un risque pour le végétal. En dépit de leur manque de spécificité, ces biomarqueurs permettent d'évaluer la phytotoxicité des métaux contenus dans les milieux contaminés, en l'absence d'autres facteurs de stress ou bien si ceux-ci sont constants. Aussi, les interférences entre le prélèvement des métaux par le point d'absorption et les processus métaboliques doivent être étudiés en conditions contrôlées (exemple : chambre de culture) pour obtenir la réponse de plantes-tests à la phytotoxicité. Dans ce cas, les biomarqueurs non – spécifiques ayant les propriétés suivantes : capacité des enzymes liées, directement ou non, aux systèmes antioxydants, perméabilité et composition des membranes, concentration en polyamines, concentration en sucres dans les parties liées aux échanges, fluorescence, et d'autres, peuvent être employées [38].

1.6.3. Les bios essais

Un biotest est le résultat d'une observation comportementale d'un individu ou d'un groupe d'individus homogènes face aux conditions expérimentales bien définies, avec le milieu test [39]. Etant donné les différentes sensibilités face aux toxiques qui font l'objet les taxons, le choix de l'espèce bioindicatrice est très complexe [40]. L'élevage et le maintien des espèces à étudier est donc une opération délicate puisqu'ils doivent refléter avec fidélité les tests envisagés. Dans les effets recherchés, les polluants peuvent se manifester par leur toxicité immédiate ou toxicité « aiguë » ; dans ce cas, les effets observés sont généralement des effets létaux. La toxicité chronique et l'accumulation des substances le long d'une chaîne alimentaire sont décrits par des modifications morphologiques, des

modifications de la croissance, de la reproduction, de l'activité métabolique et ou du comportement [23] ; [41].

En général, les tests biologiques sont nécessaires pour évaluer la toxicité à priori des substances rejetées par des effluents, mais ils doivent être obligatoirement complétés par des études sur le milieu récepteur, portant sur les indicateurs biologiques de l'écologie d'une manière générale [23].

Les tests de toxicité aquatiques peuvent être réalisés suivant trois modalités :

- En milieu statique ; le milieu expérimental n'est pas renouvelé.
- En milieu semi statique ; du fait d'une biodégradation possible et pour éviter l'accumulation de déchets, le milieu expérimental est renouvelé périodiquement.
- En milieu dynamique ; le milieu est renouvelé en permanence [23].

De façon générale, trois précautions doivent être prises dans tout essais toxicologiques.

- Rassembler un échantillon aussi homogène que possible de l'espèce testée par sélection d'individus du même sexe, du même âge et du même poids.
- Utiliser une technique d'administration du toxique qui assure une normalisation des conditions expérimentales pendant toute la durée du test.
- Recueillir avec discernement les données numériques des expériences et les analyser avec une méthode statistique appropriée [23].

1.7 Utilisation des plantes aquatiques comme bioindicateur

Si la démonstration de l'existence de relation doses réponse a été établit au laboratoire pour de nombreux biomarqueurs et de nombreux toxiques, la mise en place des méthodes biologiques permettant l'évaluation de l'impact des polluants dans l'environnement donne souvent des résultats parfois difficiles à interpréter [38]. Les quelques facteurs qui concourent à cette difficulté sont :

- L'existence des voies de contaminations variées et l'interférence de divers processus biologiques et physico-chimiques font que le niveau d'exposition et la biodisponibilité des substances toxiques donne fréquemment des résultats difficiles à interpréter, même si une relation concentration- réponse a pu être établie au laboratoire et cela ne garantie pas forcément la similarité de l'être in situ.
- Les mécanismes d'adaptation physiologique, voire génétique, à la présence des contaminants peuvent se mettre en place rapidement chez de nombreuses espèces [41].

- L'existence d'un mécanisme de compensation au niveau de la population qui peut masquer les effets des contaminants au niveau individuel [42].

1.7.1 Description des essais

Pour classer les substances dans le cadre du système harmonisé, on peut considérer comme équivalentes les données de toxicité relatives aux espèces d'eau douce et aux espèces marines.

La toxicité aiguë est normalement déterminée à partir d'une CL_{50} concentration létale pour un essai de 96 heures pour les poissons, d'une CE_{50} concentration efficace pour un essai de 48 heures pour les crustacés et/ ou d'une CE_{50} à 72 ou 96 heures pour les algues et les macrophytes [27]. Ces espèces sont représentatives de l'ensemble des organismes aquatiques et les données relatives à d'autres espèces, comme la lentille d'eau (*Lemna*), peuvent aussi être prises en compte si la méthodologie d'essais s'y prête [27].

1.7.2 Essais sur les algues

Les algues sont cultivées et exposées à la substance d'essai dans un milieu enrichi en nutriments. Il convient d'utiliser des essais conformes à la ligne directrice de l'OCDE (algues, essai d'inhibition de la croissance). Les méthodes d'essai normalisées utilisent une densité de cellules dans l'inoculum afin d'assurer une croissance exponentielle sur l'ensemble de l'essai, qui dure généralement de 3 à 4 jours [27].

L'essai algal est un essai à court terme et bien qu'il vise des effets à la fois aigus et chroniques, seule la CE_{50} aiguë est utilisée pour la classification dans le cadre du système harmonisé. Le point final préféré dans cette étude est l'inhibition de la vitesse de croissance algale, car celle-ci ne dépend pas de la conception de l'essai, alors que la biomasse dépend à la fois de la vitesse de croissance de l'espèce testée et de la durée de l'essai, ainsi que d'autres paramètres de conception [27].

1.7.3 Essais sur les macrophytes aquatiques

Les plantes vasculaires les plus couramment utilisées pour les essais de toxicité aquatique sont les lentilles d'eau (*Lemna gibba* et *Lemna minor*). L'essai sur *lemna* est un essai à court terme et, bien qu'il vise des effets à la fois aigus et subchroniques, seule la CE_{50} est utilisée pour la classification dans le cadre du système harmonisé. Les essais durent entre 10 à 14 jours et sont réalisés dans un milieu enrichi en nutriment, semblable à celui utilisé

pour les algues, mais qui peut être plus fort. Le but recherché est d'observer les taux d'inhibition face à l'évolution du nombre de frondes donc de la croissance de la plante [36].

CHAPITRE 2

GENERALITE SUR LES LENTILLES D'EAU

2.1. Systématique

2.1.1 Généralités

Les lemnaées ont suscité l'attention des chercheurs en raison de leur grand potentiel d'enlever les contaminants minéraux résiduels émanant des travaux d'eau d'égout, industries animales intensives ou de la production végétale irriguée intensive. Le besoin des lemnaées d'être parvenu, protégé contre le vent, à maintenir à une densité optimale et à équilibrer des concentrations nutritives dans l'eau peut obtenir des taux de croissance optimaux [3].

Les lentilles d'eau font partie intégrante de notre environnement en couvrant de leur tapis vert une surface des mares, des étangs et des marais [42].

Les espèces de lentilles sont des petites usines aquatiques flottantes trouvées dans le monde entier (portant souvent les noms spécifiques de la région) et souvent vues d'une croissance couvrant des nattes au dessus des eaux des étangs frais ou des eaux saumâtres riches en oligo-éléments. Elles sont toujours des monocotylédones de la famille botanique lemnaeae et sont de plus hautes usines ou macrophytes, bien qu'elles soient souvent confondues avec des algues [3].

Les lentilles se développent aux températures de l'eau entre 6 et 33°C, ils ont des dispositifs structuraux simplifiés. Une feuille de lenticule est plate et ovoïde encore appelée fronde. Beaucoup d'espèces de lentilles ont des racines adventives qui fonctionnent comme un organe de stabilité et qui tendent à se rallonger pendant que des éléments minéraux dans l'eau sont épuisés [3].

Comparé à la plupart des usines, les feuilles de lenticule ont peu de fibre (5% dans la matière sèche des plantes cultivées) car elles n'ont pas besoin de soutenir les structures droites. Les racines, cependant, semblent être plus fibreuses [3].

Des espèces de lentilles sont adaptées à une grande variété de zones géographiques et climatiques. Elles sont trouvées partout, sauf dans les régions désertiques sans eau et les secteurs gelés. Elles se développent mieux dans les tropiques et les zones tempérées. Beaucoup d'espèces peuvent survivre aux extrémités de température [42].

L'habitat normal de la lenticule est la surface de l'eau fraîche ou saumâtre qui est abritée de l'action de vent et de vague. Elles ne survivent pas dans l'eau mobile rapide (> 0.3 m/s) [42].

Les meilleures conditions pour la croissance des lenticules sont les lagunes abritées pour empêcher le vent de souffler les plantes, les eaux usées riches en matière organique, lui fournissant un approvisionnement régulier en aliments. Une couverture dense de lenticule empêche les usines aquatiques submergées de concurrence, qui exigent l'énergie solaire pour la croissance et elles peuvent également souvent exclure des algues des eaux superficielles [3].

2.1.2 Origine des Lemnacées

La plupart des botanistes considèrent les Lemnacées comme des êtres étroitement liés à la famille d'arum (Araceae), et les études comparatives d'ADN de chloroplaste ont confirmées cette affinité taxonomique [43].

Des arbres généalogiques ou des cladogrammes évolutionnaires générés par ordinateur ont été employés pour montrer les rapports taxonomiques des espèces de lenticule chez cette famille. Les cladogrammes sont basés sur des milliers de caractères de données, y compris la morphologie, l'anatomie, les flavonoïdes, les allozymes, et les ordres d'ADN des gènes et des introns de chloroplaste.

2.1.3 Evolution des lentilles

LANDOLT (1986) considère que les deux extrêmes évolutifs des lentilles sont *la Spirodela et la Wolffia*. La ramification la plus récemment évoluée dans la phylogénie de cette famille est la *Wolffia* qui partage les quelques caractères avec le *Spirodela* héréditaire présumé et est placé le plus loin dans l'arbre évolutionnaire (cladogrammes figure n°4.2) La *Spirodela* est la forme la plus primitive des lentilles.

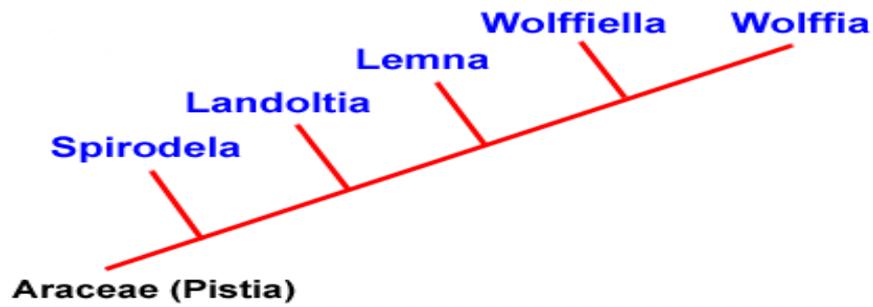


Figure n°4.2 : arbre phylogénétique évolutif des lemnacées (*Landolt, 1986*).

2.1.4 Anatomie d'une usine de lentille

L'anatomie d'une usine est formée par les murs de cellules qui donnent à l'usine son cadre structural. En étudiant le cadre de l'usine, on finit par comprendre comment elle est organisée et se développe (figure n°5.2.)

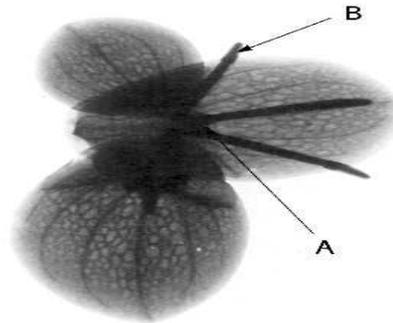


Figure n° 5.2 : Anatomie de la lenticule (*Landolt, 1986*).

A = tissu couvrant le point d'attachement des racines,

B = coiffe de racine.

2.2 Description de la *lemna gibba*

La *Lemna gibba* est une espèce relativement thermophile, elle vit dans les eaux stagnantes ou faiblement courantes. Aussi, elle est connue pour sa tolérance importante au sel et à la pollution des eaux [44].

Cet hydrophile libre nageant à racines plongeant librement dans l'eau est confiné aux eaux eutrophiques à pH neutre ou basique. Cette espèce est considérée comme indicatrice de pollution [44].

Dans certaines conditions, en particulier en hiver, et au printemps les frondes de *Lemna gibba* ne développent pas de gibbosité importante à la face inférieure et restent plates, elles sont dans ce cas confondues avec *lemna minor* [45].

La distinction entre les deux espèces s'effectue grâce à une observation minutieuse des cellules à la face inférieure.

2.2.1 Fiche d'identification de la *Lemna gibba*

La lentille d'eau douce ou « lentille bossue » ou encore « lentille d'eau gibbeuse » a pour nom scientifique *Lemna gibba*. C'est une plante se propageant principalement par voie végétative ou par bourgeonnement des petites feuilles appelées frondes, ovales et arrondies (2 à 5 mm de longueur) réunies par 2, 3 ou 4 convexes au dessous (comme gonflées), spongieuses et réticulées entre 40 à 50 réseaux de 0,2 à 0,7 mm. Son habitat est constitué des étangs d'eau douce, marais et jets silencieux. Elle se développe également dans les marais légèrement saumâtres. Elle est de type vivace [46].

2.2.2 Morphologie de la *Lemna gibba*

Les *Lemna gibba* peuvent se reconnaître par leurs différentes formes. En observant une vue latérale d'une usine de bourgeonnement, on peut apercevoir le dessous gonflé avec des espaces aériens agrandis appelés aerenchyma.

Aussi, les observations d'une vue dorsale permettent de constater qu'il existe des stamens dépassant des poches de bourgeonnement qui fleurissent lorsque la *Lemna gibba* est mure. Il arrive aussi d'apercevoir des fruits se développant (utricule) dépassant de la poche de bourgeonnement latéral [46].

2.2.3 Mode de reproduction

En général, les *Lemna gibba* ont une multiplication végétative très active, elles bourgeonnent à l'infini alors que leurs inflorescences restent cachées sous la lame foliacée. Les nouvelles frondes apparaissent sous la fronde primitive de part et d'autre du « nœud ». Les frondes filles peuvent demeurer un certain temps solidaires de la plante mère et forment de petites colonies. Les *Lemna gibba* à cet effet ont deux types de reproductions qui se composent en reproduction asexuée et sexuée [46].

2.2.3.1 Reproduction sexuelle

La figure n°6.2 montre deux *Lemna gibba* côte à côte. Sur l'usine gauche on peut apercevoir deux stamens s'approchant d'une poche de bourgeonnement latérale d'une autre *Lemna gibba* (usine à droite). Sur l'usine droite on aperçoit un ovaire en maturation (pistil) dépassant la poche de bourgeonnement. Le contact entre les usines adjacentes avec des stamens de pollen et les stigmas réceptifs a pu avoir comme conséquence la pollinisation. Ce phénomène dans les lemnacées est connu en tant que pollinisation de contact et constitue un mode de reproduction sexuelle qui assure la croissance de la plante [46].



Figure n° 6.2 : reproduction sexuée chez la *Lemna* (Wayne A, 2001).

En se référant à une vue dorsale de *Lemna gibba* en pleine floraison, on constate que deux stamens et un modèle court projettent d'une poche de bourgeonnement latérale à la base de l'usine. Le gynoeceum se compose d'un pistil simple avec un stigma concave d'un modèle mince et soutient à la base l'ovaire d'un ou deux ovules. La fleur bisexuelle est incluse dans une spathe membranaire de « saclike » dans la poche de bourgeonnement [46].

2.2.3.2 Reproduction asexuelle

Le modèle de la reproduction asexuelle : Pendant que chaque nouvelle fronde mûrit, elle lance les nouvelles frondes de formation. Chaque fronde fille est toujours initiée comme bourgeon dans La zone *meristemique* le long de l'axe central de sa mère ou elle émerge alors *de la poche* du côté de la mère où il a été lancé. Chaque nouvelle fronde est reliée à sa fronde de mère par une bande de tissu appelée *stipule* ou pied. La stipule se prolonge pendant que la fronde mûrit. Quand la fronde fille atteint la pleine maturité, la stipule interrompt sa croissance pour libérer un nouveau faisceau. À ce moment-là de la croissance des lentilles, la nouvelle fronde libérée a déjà initié de nouvelles filles [46]. Les *Lemna gibba* ont la propriété de se reproduire à une très grande vitesse en extrayant

très efficacement les nitrates et autres éléments nutritifs de l'eau pour les convertir en protéines, si bien qu'une colonie peut doubler de poids en 18 heures seulement [46].

2.2.4 Rôle des Racines des lentilles

Il semble évident de croire que les lentilles absorbent la plupart du temps l'eau et leurs aliments nutritifs par l'intrados de la fronde, et non par les racines, étant donné la physiologie des plantes.

Dans l'eau, les longues racines de lenticule deviennent empêtrées entre elles. Si on essaye de prendre une colonie d'usine ou de fronde, souvent, il en résulte qu'on doit prendre plusieurs autres dont les racines sont empêtrées avec le premier. LANDOLT (1986) précise qu'une racine de lenticule fournit la stabilité à la subsistance d'aide orienté de plantes individuelles dans l'eau pendant qu'ils rencontrent la turbulence de vent et d'eau.

Étant donné que les racines jouent le rôle de stabiliser la lenticule, les frondes sont donc des lieux de toutes absorption [47].

2.3 Ecologie de lentilles

2.3.1 Facteurs atmosphériques

Comme les autres plantes aquatiques, la vie des lenticules en général et de la lenticule bossue (*Lemna gibba*) en particulier est très dépendante de l'eau et des mécanismes biologiques permettant sa croissance. La plante entière a la capacité d'absorber l'eau et sa circulation au sein du végétal se réalise selon divers processus [47] :

- par capillarité externe : la gibbosité externe des parois est un élément favorable à la circulation ainsi qu'à la rétention de l'eau ;
- par capillarité interne ;
- par la structure même des parois.

Cependant il est important de noter que ce sont des organismes avec moins ou sans racines, ainsi les apports extérieurs (nutritif ou aqueux) dépendent principalement des frondes en relation avec le milieu atmosphérique ou aquatique dans lequel ils vivent [47].

Il existe également des échanges entre le milieu atmosphérique et la plante. Celle-ci capte du CO₂ pour libéré du O₂ selon le phénomène de la photosynthèse.

2.3.2 La lumière

Les lenticules sont des végétaux chlorophylliens, autotrophes dont l'utilisation du carbone et la lumière constituent pour elles le facteur énergétique fondamental lui permettant de réaliser la photosynthèse. Chaque espèce possède ses propres exigences face à l'intensité d'éclairage, qui présente pour chacune d'elle, un minimum, un optimum et un maximum [48].

2.3.3 Le pH

Des taux de croissance des colonies des lenticules seront réduits à des extrémités de pH et de température [3]. Les lenticules trouvent dans leur support, les ions minéraux nécessaires à leur nutrition. L'abondance de certains ions peut favoriser la croissance de certaines espèces de lenticules au détriment des autres [48]. L'apport de ces ions est lié au pH du milieu. La lenticule, cet hydrophile survit à des pH neutre ou basique [44]. Ces pH peuvent aller de 5 à 9 mais se développe mieux à des pH étant entre 6.5 à 7.5. L'ammoniaque, sous forme ionisée est le meilleur substrat préféré la lenticule. Un pH alcalin décale l'équilibre ammonium-amoniaque vers l'état non ionisé et le résultat donne la libération de l'ammoniac libre qui est toxique pour la lenticule aux concentrations élevées [3].

2.3.4 Rôle physico-chimique

La vie dans le milieu aquatique ne peut se faire sans la présence des plantes. Qu'elles soient largement feuillues, comme les renoncules, qu'elles soient microscopiques comme les innombrables espèces d'algues du plancton, elles sont indispensables en raison de leur propriété essentielle qui est la fonction chlorophyllienne [49].

Dans la biocénose aquatique, le rôle des organismes chlorophylliens est primordial dans la production de la matière vivante ; grâce à leur pigment, ils fixent l'énergie lumineuse et transforme le carbone du gaz carbonique en matière vivante que les organismes animaux consomment. En outre, l'oxygène libéré par les plantes, lors du phénomène de la photosynthèse, est utilisé par tous les êtres aquatiques et notamment les poissons [50].

En effet, les plantes restent les meilleurs agents d'épuration de l'eau par leur production d'oxygène qu'elles fournissent au processus d'oxydation, par l'utilisation des sels dissous qu'elles éliminent (nitrates). L'auto épuration des rivières permet à celles-ci de retrouver leur pureté quelques kilomètre après la réception des effluents polluants, les algues et les

autres plantes aquatiques donnent toute leur efficacité aux lagunes d'oxydations d'eau usées riches en azote [50].

En outre, la végétation intervient dans l'équilibre carbonates dans l'eau, l'absorption du gaz carbonique par les plantes transforme les bicarbonates en carbonates et relève le pH de l'eau [50].

2.4 Facteurs internes

2.4.1 Age de la population

Au cours du cycle végétatif, la plante absorbe les éléments chimiques en quantité différente selon les périodes considérées. Pendant ces périodes végétatives, la croissance peut être éphéméroïde c'est-à-dire pour une courte durée (de l'ordre de quelques semaines) pour certaines plantes, d'autres peuvent boucler un cycle annuel complet [51], [3].

2.4.2 Azote

La concentration en azote augmente durant la formation de l'appareil foliaire et décroît en suite, d'abord rapidement, puis lentement, jusqu'à la floraison. A la mort des feuilles et des tiges, l'azote migre et s'accumule dans les organites de réserves [51].

2.4.3 Phosphore

Son évolution est comparable à celle de l'azote. A la fructification, l'accumulation, au niveau des parties aériennes, est moins importante ; par la suite, la migration rapide vers les organes de réserve [52]. Les lentilles accumulent efficacement le phosphore.

Le phosphore est un élément constitutif nécessaire de la matière vivante, il fait partie de la composition de l'acide adénosine triphosphorique (ATP), des acides nucléiques, les lipides phosphorés. Ainsi, le phytoplancton trouve alors l'approvisionnement du phosphore dans le milieu aquatique dans lequel il se trouve. Selon les travaux de KAIN et FOGG (1960), la quantité moyenne de phosphore nécessaire par les cellules des *Prorocentrum micans* est de l'ordre de 29µg. Cette absorption du phosphore est fonction du volume de la cellule [51].

Il est possible d'avoir une variation du rapport azote/ phosphore (N/P) à l'intérieur d'une même espèce : KETCHUM et REDFIELD (1949) ont obtenu pour la plante *Chlorella pyrenoidosa* un rapport N/P de 5,6 pour une culture normale, de 30,9 pour les cultures déficientes en phosphore et 2,9 pour les cultures déficientes en azote [58].

Il est nécessaire de connaître sous quelle forme le phytoplancton absorbe le phosphore. En effet, le phosphore est essentiellement absorbé sous la forme d'ions orthophosphates, de l'acide ortho-phosphorique H_3PO_4 , les ions acides $H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-} existant dans le milieu aquatique [51] ; [52].

En dehors du phosphore minéral, le phytoplancton peut aussi utiliser le phosphore organique sous la forme des glycérophosphates. Les travaux de SOLORZANO et STRICKLAND (1969) ont montrés que 30% d'orthophosphates cellulaire se trouvaient sous forme de polyphosphates.

Les polyphosphates peuvent être hydrolysés plus vite qu'ils ne sont utilisés et donnent des phosphates qui s'accumulent dans le milieu [52].

2.4.3.1 Importance du pH par rapport aux phosphores dans la plante

La solubilité des sels est fonction, dans la plus part des cas, du milieu dans le quel il se trouve. Ainsi, les pH acides permettent donc une grande solubilisation des sels dans la solution.

Le phosphate tricalcique est bien moins soluble que le phosphate mono calcique. Lorsque le milieu est acide, on peut passer de l'ion PO_4^{3-} à l'ion HPO_4^{2-} avec l'apport des ions H^+ du milieu. Le pH du milieu influe également sur le développement des plantes. Les très bas pH (<4) provoquent des lésions des tissus, avec nécrose et perte de sels. Aux pH physiologiques compris entre (4 à 9), une baisse du pH du milieu stipule l'absorption des anions tels que le $H_2PO_4^-$, NO_3^- et inhibe automatiquement l'absorption des cations [52]; [197].

2.4.4 Potassium

Il y a une seule période d'assimilation intense à la formation de l'appareil foliaire. La décroissance est alors constante. On n'observe pas de stockage dans les organes de réserves [52].

2.4.5 Calcium, Sodium, magnésium

En général leur accumulation est plus importante au printemps et à l'automne, mais selon les données de certaines espèces [51].

2.5. Facteurs climatiques

Le facteur climatique est également important mais le caractère phénotypique des espèces (*Gibba*, *Minor*, *Wolffia*...) étudiées doit être pris en compte.

L'étude montre que les plantes des zones froide, ont un optimum de température pour l'initialisation, l'élongation et la production des racines inférieures à celui des plantes des zones chaudes. Les tissus sont mieux adaptés à l'assimilation des éléments (la capacité d'absorption du phosphore est supérieur quelle que soit la température étudiée) [51].

D'après les observations que nous avons notées sur le site de *Beni Tamou* (Blida – Algérie), la *Lemna gibba* apparaît au printemps pratiquement au mois Février et disparaît le plus souvent vers la fin du mois de juillet. En principe, cette plante se manifeste en fonction du climat de la région dans laquelle elle se trouve. Ce qui n'est pas le cas avec la *Lemna minor*.

2.5.1 Biogéographie

Les lenticules sont présentes dans toutes les régions du globe, de l'équateur aux terres arctiques et le littoral. Quelques unes sont présentes dans le monde entier et porte le nom de la région dont elles proviennent. De ce fait, elles sont dites cosmopolites [49].

Comme les bryophytes, certaines lenticules sont des organismes résistants au pouvoir colonisateur indéniable, peuvent être des indicateurs de variations passées mais plus couramment, elles sont utilisées en tant qu'indicatrices de l'état de santé des écosystèmes, aptitudes détaillées dans le paragraphe suivant [49].

On retrouve les lentilles dans plusieurs régions d'Algérie, notamment dans les régions de La Calle, Annaba, Lac Tanga à El Kala, Constantine, Alger, Tiaret, Tlemcen, Bouira, Ben Azouz [53].

Récemment la plante a été trouvé également dans la région de Beni Tamou (Wilaya de Blida).

2.6 Utilisation des lenticules comme bioindicateur

Il est sans doute admis que l'un des problèmes majeur de ce siècle est la prévention de la qualité de l'environnement. Les rejets des substances d'origine naturelle ou de synthèse constituent l'un des plus importants facteurs de dégradation de la biosphère par l'homme. L'une des caractéristiques essentielles de la pollution d'origine humaine consiste en la dispersion, volontaire ou involontaire, de certaines substances (pesticides, hydrocarbure,

etc.) ou éléments (métaux par exemple), qui sont susceptibles de contaminer divers compartiments de la biosphère (atmosphère, hydrosphère, lithosphère), y compris dans des endroits très éloignés de leurs site initial d'émission. Actuellement, il n'existe pas d'écosystèmes exempts de traces de l'activité de l'homme, car même les zones vierges de toute colonisation humaine sont contaminées par les polluants apportés par le mouvement des masses atmosphériques ou par les courants marins et océaniques [2].

La question, à savoir pourquoi surveiller la qualité de l'environnement trouve alors sa réponse, étant donné qu'il y a eu une nette évolution de la dégradation de l'écosystème des années durant [2].

Aussi, étant le réceptacle direct d'effluents industriels, recevant en plus des retombées atmosphériques et les pollutions diffuses provenant de sols contaminés, les systèmes aquatiques sont des milieux très exposés. Ces pollutions sont préjudiciables à l'équilibre écologique du milieu aquatique et présentent un risque environnemental et sanitaire [48].

La contamination de la biosphère en micropolluants métalliques est devenue de plus en plus un fait admis dans les pays industrialisés. S'ajoutent à celle-ci, la pollution des milieux par des composés organiques répandus dans les écosystèmes par le biais de diverses sources (agriculture intensive, industrie électrique...) ainsi que la présence d'éléments radioactifs (radionucléides) émis par les centrales et les accidents nucléaires. Désormais, de plus en plus de micropolluants minéraux (cadmium, mercure, zinc...), de composés organiques (HAP, PCB...) et de radionucléides (^{137}Cs , ^{60}Co , ^{54}Mn ...) induisent une contamination chronique d'un nombre croissant d'écosystèmes aquatiques continentaux [48].

Divers compartiments biologiques et physiques susceptibles d'accumuler les ETM (éléments traces métalliques) ont été étudiés :

- les sédiments qui par leur capacité de stockage des polluants présentent un danger pour les écosystèmes [55],
- les plantes phanérogames [56],
- les plantes cryptogames comme par exemple le lichen aquatique

La problématique revient sur le comment surveiller l'environnement. Les nombreuses méthodes permettant de surveiller la qualité de l'environnement peuvent être réparties en deux catégories, clairement distinctes :

La détection des polluants et éventuellement leur quantification, dans les milieux physiques et biologiques, d'une part et l'évaluation des effets des polluants sur les

organismes vivants, d'autre part. Après plusieurs années d'utilisation de ces différentes méthodologies, il apparaît qu'aucune d'entre elles n'est exclusive et ne peut, à elle seule, fournir des informations fiables et complètes sur l'état de l'environnement. En d'autres termes, c'est l'association judicieuse de ces différentes approches qui permettent d'évaluer de façon précise l'état des milieux et des organismes [2].

Dans les années 1970, des études ont mis en évidence que certains végétaux aquatiques accumulaient les éléments métalliques à de très fortes concentrations à proximité de sites miniers [9], [10], [11], [12]. Cette propriété de bioaccumulation a suggéré l'utilisation des plantes aquatiques pour la surveillance des métaux dans un état de traces dans l'eau [57]. La mise en évidence de la bioaccumulation de composés organiques par les lenticules aquatiques est plus récente, datant de 1981 [58].

2.6.1 Plantes aquatiques (*Lemna gibba*) comme bioindicateur

« Un indicateur biologique (ou bioindicateurs) est un organisme ou un ensemble d'organismes qui - par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques - permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées » [20].

La plus part des espèces utilisées pour la bioindication des milieux aquatiques appartiennent la plupart du temps à la classe des *Bryopsida*, mais certains chercheurs, utilisent aussi les Sphaignes et les Hépatiques comme bioaccumulateurs [59], [60], [61] [62].

Les études récentes sont orientées vers des nouvelles plantes aquatiques, il s'agit des lenticules. Au départ, c'était l'utilisation de la *Lemna polyrhiza* et progressivement la *Lemna gibba* et la *Lemna minnor* ce, en fonction de leurs adaptations physiologiques et de leurs croissances exponentielles. L'utilisation de ces plantes aquatiques en tant que bioindicateurs des eaux et particulièrement des métaux lourds dans la surveillance des systèmes aquatiques n'a cessé de croître depuis les premiers essais d'Empain en Belgique en 1973 [63].

Les lentilles présente aussi un autre avantage qui est d'utiliser de nombreux composés organiques et peuvent croître même en l'absence de lumière [42].

2.6.1.1 Caractéristiques des ces plantes bioindicateur

Les espèces bioindicatrices présentent, de par leur mode de vie et/ ou leurs caractéristiques physiologiques et métabolique, la capacité de bioaccumuler certains contaminants directement à partir du milieu ambiant ou par d'autres voies, jusqu'à des niveaux nettement supérieurs au niveau de contamination du milieu physique. Deux processus sont responsables de la bioaccumulation de xénobiotiques dans les organismes : d'une part la bioconcentration qui est un transfert direct à partir du milieu environnant (eau, sédiments, particules en suspensions, etc.) et d'autre part la bioamplification qui résulte du transfert de molécules chimique par voie trophiques [23], [64]. L'accumulation de certains polluants par les organismes bioaccumulateurs facilite leur mise en évidence et leur quantification par des méthodes chimiques et /ou physiques en procédant à l'analyse d'échantillon de milieux naturels par les micropolluants, notamment au travers des réseaux de biosurveillance. Ce qui fait des plantes aquatiques de bons bioindicateurs [64].

Les espèces servant à la bioindication sont des plantes aquatiques, la plupart du temps immergées, elles sont ainsi le reflet des eaux dans lesquelles elles se situent. D'après LOPEZ *et al.*, 1997 et SAMECKA-CYMERMAN *et al.*, 2000, ces organismes permettent d'obtenir une évaluation globale de la qualité environnementale du milieu (étude des réactions physiologiques liées au stress) et des concentrations environnementales de polluants particuliers (analyses des tissus) [65]. Cette dernière application est favorisée par le fait que de nombreuses plantes aquatiques résistent à la toxicité de certains polluants [66] et les accumulent dans leurs tissus [57], [67] [68].

2.6.1.2. Types de bioindication

Deux types de bioindication sont considérés:

- l'étude des peuplements naturels, par la présence ou l'absence, la prolifération ou disparition d'espèces indicatrices renseigne sur la qualité globale du milieu. Cette approche ne sera pas développée dans cette synthèse.
- l'étude des réponses physiologiques de certaines espèces indicatrices à des changements du milieu renseigne sur la qualité du milieu dans lequel elles se trouvent, de façon générale (études de la variation de la teneur en pigments, des réactions enzymatiques) et de façon précise (étude de la bioaccumulation des substances toxiques) [68].

Ainsi de nombreuses études se sont succédées et ont mis en évidence la faculté des lentilles à accumuler rapidement les polluants, particulièrement les métaux, et par conséquent à informer sur le niveau de contamination métallique des eaux. On entendra par le terme de bioaccumulation, l'addition de deux phénomènes, l'adsorption des polluants à la surface de la plante et l'absorption, l'accumulation des polluants dans les cellules. Il est difficile de distinguer ces deux phénomènes lors d'une mesure de la concentration totale en un élément. Ainsi, les bryophytes par exemple, en accumulant les polluants au niveau de leurs parois et dans leurs cellules, vont les rendre plus facilement détectables dans l'environnement [59] [69], [70], [71], [37]. Mais le recours à ces organismes vivants, ne se restreint pas seulement à une mesure de pollution comme le font les analyses chimiques sur sédiments ou dans l'eau, cette méthode apporte des informations sur un potentiel de biodisponibilité du polluant dans l'écosystème, la fraction biodisponible étant la part de la concentration totale d'un polluant à être captée par un organisme vivant. La fraction biodisponible d'une substance est difficile à appréhender et peu prévisible. En plus de sa dispersion dans les différents compartiments de l'environnement, la fraction biodisponible d'un polluant sera fonction de facteurs abiotiques (dégradation liée aux UV, aux processus chimiques...) et de facteurs biotiques (biodégradation par des microorganismes) [69], [70].

Ainsi la bioaccumulation est le processus par lequel les organismes vivants accumulent des substances chimiques directement à partir de l'environnement (air, eau, sol) et de leur nutrition. La bioaccumulation diffère en fonction des organismes.

Les lenticules ainsi que les bryophytes possèdent les qualités suivantes en tant que bioaccumulateurs de polluants [71] :

- elles n'ont pas de racines, ce qui les préserve de l'influence de leur substrat et leur permet de refléter uniquement la qualité de l'eau en établissant un échange direct entre les feuilles et l'eau ; elles n'ont pas de système vasculaire, ce qui limite les transferts internes des polluants dans l'organisme ;
- elles se développent pratiquement toute l'année et leurs peuplements sont très stables dans le temps et l'espace ; les espèces sont communes, abondantes et largement réparties géographiquement à travers le globe [71], [72], [81].
- elles résistent à de fortes concentrations en métaux et à des pollutions importantes. Elles possèdent une forte capacité d'accumulation des polluants : leurs facteurs de bioaccumulation sont souvent les plus élevés de tous les compartiments de l'écosystème aquatique [74] ;

- leur collecte, leur manipulation, leur transport et leur conservation sont aisés (les individus sont de taille réduite ce qui facilite l'échantillonnage) elles accumulent très rapidement (de quelques heures à quelques jours) un grand nombre de micropolluants et se décontament (pour les métaux) en quelques semaines à quelques mois [74], [75], [76], ce qui permet la détection des pollutions accidentelles [77].

CHAPITRE 3

LES METAUX LOURDS ET LEURS IMPACTS SUR L'ENVIRONNEMENT

3.1 Notion de polluant métallique

Un métal est un élément chimique, issu le plus souvent d'un minerai doté d'un éclat particulier, bon conducteur de chaleur et d'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité, pour former des alliages utilisés par l'homme depuis l'Antiquité.

Si les métaux sont souvent indispensables au déroulement des processus biologiques (oligo-éléments), nombre d'entre eux peuvent s'avérer contaminants pour diverses formes de vie, lorsque leur concentration dépasse un seuil, lui-même fonction de l'état physico-chimique (spéciation) de l'élément considéré. C'est le cas du fer (Fe), du cuivre (Cu), du zinc (Zn), du nickel (Ni), du cobalt (Co), du vanadium (V), du sélénium (Se), du molybdène (Mo), du manganèse (Mn), du chrome (Cr), de l'arsenic (As) et du titane (Ti) [78]. D'autres ne sont pas nécessaires à la vie et peuvent être même préjudiciables comme le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd) et l'antimoine (Sb) [79]. L'appellation « éléments en traces métalliques » (ETM) ou par extension « éléments traces » est communément utilisée pour désigner les éléments métalliques naturels tableau périodique, caractérisés par une masse volumique est supérieure à 4,5 g/cm³. Etant donné qu'il existe des éléments non métalliques dont la masse volumique répond à cette définition, ce terme s'est donc vu remplacé par l'appellation « d'élément trace métallique ». Ce qui dissipe toute incompréhension sur la définition des métaux lourds [80].

Les utilisations des métaux sont multiples et très diversifiées, depuis les additifs de plomb dans les carburants jusqu'aux sels d'argent de l'industrie photographique, au nickel ou au cadmium des batteries d'accumulateurs, au zinc des gouttières ou au chrome des aciers inoxydables, au cuivre de l'industrie électrique ou à l'arsenic des produits phytosanitaires. Les sources de contamination le sont par conséquent aussi. Durant toutes les phases d'élaboration, d'utilisation et/ou de recyclage de ces produits, des métaux sont rejetés dans l'environnement, soit directement dans les eaux continentales ou marines, soit dans

l'atmosphère transportés par les vents, associés aux aérosols avant de se déposer par voie sèche ou humide à la surface de la terre ou de l'océan [79].

Ainsi, les métaux traces sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, à la fois parce qu'ils sont naturellement présents (sources naturelles) ou parce que certaines activités de l'homme favorisent leur dispersion (source anthropique). Enfin, ils présentent un danger potentiel pour le consommateur de produits marins du fait de leur possibilité de concentration dans les espèces marines, de leur élimination difficile et de leur large répartition dans le milieu aquatique [79].

3.2 Origine des éléments de traces métalliques dans l'environnement

Les métaux traces sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, à la fois parce qu'ils sont naturellement présents : sources naturelles ou parce que certaines activités de l'homme favorisent leurs dispersions : sources anthropiques.

Le flux des éléments de traces métalliques peut provenir des sources naturelles (de l'érosion des roches, des sols et les émissions volcaniques) ou des activités anthropogéniques (industrie, transport, agriculture). Ils constituent un danger potentiel pour le consommateur des produits marins du fait de leur élimination difficile et de leur large diffusion dans ce milieu [79].

3.2.1 Les activités anthropogéniques

Un grand nombre de pollution ont pour origine, la source anthropique. Ils peuvent résulter des industries, les transports, l'agriculture, les décharges de déchets ménagers, Les exploitations minières, corrosion de canalisations etc.... [39].

L'entrée de ces éléments dans le milieu aquatique peut résulter des déversements directs ou indirects des polluants des industries telles que des fonderies par exemple qui dégagent des émissions gazeuses (As, Hg, Mo, Se Pb, Cu, Ni, Zn, Cd, non ferreux) et (Cr, Ni, Mn ferreux) qui contaminent le milieu aquatique, par les eaux de pluie (forme indirecte). La contamination directe passe par le biais des déversements dans le milieu aquatique des effluents des usines telles les cimenteries qui émettent des Ta, Cr, Pb. Il en résulte de même pour les industries de traitement de surface (cadmiage, zingage, galvanisation, chromage, étamage, nickelage, anodisation de l'aluminium) qui peuvent rejeter des effluents liquides contenant du Cr, Zn, Cd. Les transports sont également à l'origine de la pollution anthropique. Car on peut observer une contamination en Pb et Cd sur une bande

de 10 à 20 m le long de l'axe routier. Dans les décharges de déchets ménagers, les métaux lourds sont régulièrement présents [39].

Des études de lixiviats (effluents liquides) ont montré qu'il restait 99,9% du stock des métaux dans la décharge au bout de 30 ans. Le pH, le potentiel redox, la présence de sulfures, la complexation sont des facteurs qui influencent grandement la possibilité de retrouver ces métaux dans les milieux aquatiques. On peut classer les métaux lourds par leur degré de toxicité [80] :

- les éléments relativement peu toxiques ou rarement toxiques quelque soit leurs mobilités et leur solubilités sont l'aluminium, le calcium, magnésium etc.
- les éléments toxiques mais relativement mobiles sont le cadmium, mercure, cuivre, nickel, zinc, chrome, etc.
- les éléments toxiques mais souvent peu solubles sont le titane, baryum, tungstène, etc.

Cette mobilité et solubilité peuvent être différentes selon le milieu considéré. La facilité de transfert dans la phase aqueuse de ces éléments traces métalliques est déterminée par ordre de leur mobilité. Ainsi, on a : Ni > Zn > Cd > Cr > Pb > Cu [80].

3.2.2 Agriculture

L'épandage d'engrais peut amener des métaux tels que Sr, Ba, Mn, F, Zn, Cd provenant des craies phosphatées et des phospho-gypses. L'origine des minerais phosphatés joue un rôle prépondérant : 200 mg.L⁻¹ de cadmium dans les gisements d'Idaho (aux Etats Unis), 100 ppm dans certains gisements d'Afrique de l'ouest mais 1 ppm seulement en provenance de Kola (Russie) [80].

Les effluents d'élevage peuvent également apporter du Cu, Zn et Mn. En effet, les rations alimentaires des porcs, volailles et des bovins sont enrichies en Cu (35 à 175 mg.L⁻¹) et en Zn (150 à 250 mg.L⁻¹) et se retrouvent intégralement dans les lisiers et fumiers [80].

Les produits phytosanitaires sont aussi un vecteur des éléments de traces métalliques tel le cuivre (c'est le cas de la bouillie Bordelaise : sulfate de cuivre additionné de chaux) qui est utilisé comme fongicide. L'étain et l'arsenic peuvent également entrer dans la formulation de certains pesticides [80].

3.2.3 Les exploitations minières

Les éléments métalliques sont en concentration très importante sur les sites miniers. Lorsque les métaux sont inclus dans les minerais, ils sont peu altérables donc peu mobiles.

Les risques résultent de l'érosion des sulfures qui, par oxydation à l'air, forment de l'acide sulfurique et se solubilise ainsi en métal [80] ; [82].

Il existe des sites dans l'Est de la Belgique (Plombières, la Calamine, ...). Ce sont les terrains dits calaminaires avec une faune et flore spécifiques [80].

3.2.4 Sources naturelles

Parmi les importantes sources naturelles, l'activité volcanique, l'altération des continents et les incendies de forêts sont cités. La contribution des volcans peut se présenter sous forme d'émissions volumineuses mais sporadiques dues à une activité explosive, ou d'émissions continues de faible volume, résultant notamment de l'activité géothermique et du dégazage du magma . Les principales sources de mercure atmosphérique, par exemple, proviennent du dégazage des terres et des océans [80]. On peut résumer cette origine dans le tableau n° 1.3:

Tableau n°1.3 : rapport en éléments de traces métalliques des sources anthropiques et naturelles dans l'environnement en tonnes/an (*Tonneau et al., 2003*).

Eléments	Flux anthropiques (1)	Flux naturel (2)	Rapport (1)/ (2)
As	150	90	1,7
Cd	43	4,5	9,6
Cr	7810	810	9,6
Cu	9162	375	24,4
Pb	3665	180	20,4
Hg	17,8	0,9	19,8
Ni	1134	255	4,4
Zn	7467	540	13,8

On constate que les rapports sont tous supérieurs à 1 donc que le risque de contamination des cycles biogéochimiques par les activités humaines est très grand. L'influence de celles-ci est marquée par une augmentation de la concentration en métaux dans les sédiments des rivières et des lacs (liée à leur faible solubilité aux pH habituels des eaux (5 à 9)).

Dans le sol, la pollution est plus sournoise puisque ce compartiment a la propriété de fixer les métaux. On risque donc d'observer des effets de bioaccumulation [80]. Compte tenu de la toxicité des métaux lourds, il importe de savoir ce qu'ils deviennent dans l'environnement.

3.3 Devenir des métaux lourds dans le milieu aquatique

3.3.1 Généralités

La répartition des métaux lourds dans l'environnement aquatique se fait entre différents compartiments de cet environnement. L'eau, les solides en suspension et les sédiments peuvent exister sous forme de complexes, de particules ou en solutions [39]. En d'autres termes le devenir des éléments de traces dépend de leurs natures et de leurs propriétés, ainsi que des paramètres physico-chimiques du milieu qui conditionnent leur répartition sous ses différentes formes [22]. Les compartiments se subdivisent en phase stationnaire qui implique les sédiments et la phase circulante qui concerne les fractions particulaires et dissoutes des éléments de traces métalliques. Les fractions dissoutes correspondent à leur tour aux fractions du métal restant dans l'eau après filtration même si elles ne sont pas représentatives dans la biomasse aquatique. En outre, la répartition et la distribution des métaux dans le milieu aquatique sont caractérisés par la dilution, l'advection, la dispersion, la sédimentation et l'adsorption/désorption [22].

Il existe par ailleurs l'intervention de certains processus chimiques comme la spéciation selon diverses formes solubles par exemple qui sont régies par les constantes d'instabilité des différents complexes, et par les propriétés physico-chimiques de l'eau tel que le pH, les ions dissous, et la température [39].

3.3.2 La spéciation

L'étude de la mobilité des éléments traces métalliques passe par la **spéciation** c'est à dire l'étude de la distribution des espèces chimiques présentes dans la solution. Le Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , et Cr^{3+} peuvent former des cations hydratés ou des hydroxydes complexes hydratés. L' As^{3+} , Cr^{6+} , As^{5+} , Se^{4+} et Se^{6+} forment des oxyanions. Les conditions redox et de pH conditionnent les formes présentes (cas du Chrome) [22].

Au cours de la distribution des éléments traces métalliques dans le milieu aquatique, le stockage permanent ou temporaire des métaux se fait dans les sédiments, aussi bien dans l'environnement marin que dans les eaux douces [39]. L'activité microbienne et le processus de réduction par oxydation peuvent modifier les propriétés des sédiments et influencer sur la composition de l'eau interstitielle. Concernant les eaux naturelles, la matière organique que renferme celle-ci affecte également la capacité d'absorption des sédiments

[81], et les matières en suspensions [82]. La complexation des métaux par les acides humiques empêche ceux-ci de libérer les sulfures, les hydroxydes et les carbonates [83] ; [84]. L'activité des sédiments par les organismes ramène également les sédiments en surface, ou une fraction appréciable du métal sera libérée.

Par cette analyse, on comprend mieux que les éléments traces métalliques se distribuent et agissent en milieu aquatique en fonction de leurs propriétés et des facteurs du milieu.

Les nombreuses transformations des métaux dans les milieux aquatiques passent par la réduction (par processus biochimique interposé), méthylation, diméthylation et par l'oxydation d'espèces de métaux isolées. Les processus biochimiques sont effectués par des micro-organismes et par des algues. D'après JERNELOV (1975), la méthylation du mercure se produit au moment où il y a contact entre les micro-organismes et des ions mercures alors qu'ils consomment des substances organiques (peut être aussi pour As, Sn et le Pb) [39].

Le fait que les métaux lourds soient absorbés par la faune et la flore peut provoquer une augmentation de concentration du métal dans l'organisme. Si la phase d'excrétion est lente, il est possible d'avoir un phénomène d'accumulation biologique. Il a été démontré que quelques métaux, comme le mercure, subissent une amplification biologique au cours de leur progression dans la chaîne alimentaire [39].

3. 3.3 Répartition géographique des polluants en Afrique

L'Afrique continentale « en voie de développement » subit également la pollution de ces eaux liée aux différentes pollutions (anthropogéniques et naturelle). On tentera de citer quelques exemples.

Depuis 1985, l'OMS a essayé d'élaborer certains critères de la qualité des eaux potables dont la plus part des polluants se révélait être des métaux. La FAO, de son côté, a planifié les limites admissibles de certains polluants dans les eaux, les poissons et les produits de pêches [85].

Des études récentes ont montrés qu'il existe une forte concentration en pesticides et en métaux lourds dans des sédiments marins ainsi que sur quelques biotes de plans d'eau intérieurs des zones côtières. Une forte concentration en métaux lourds a été observée dans les zones côtières de l'Egypte [84].

Dans de nombreux pays Africains, les activités minières sont à l'origine d'importants apports de métaux lourds dans l'environnement, c'est le cas du mercure en Algérie,

l'Arsenic en Namibie et Afrique du sud, l'étain au Nigeria et au RDC et le cuivre en Zambie [39].

Cependant des études pour un plan d'action ont été effectuées pour la préservation des cotes méditerranéennes de cette pollution [84].

BERNHARD et RENZONI (1977) ont élucidé quelques concentrations en mercure dans les sédiments ainsi que dans les organismes benthiques des côtes méditerranéennes en étudiant les concentration de cette substance dans les poissons pélagiques et dans les organismes benthiques, ainsi que dans les sédiments [84].

TOMA *et al* (1981) ont montrés que la dispersion des métaux absorbés par des fractions fines des sédiments de la partie ouest du plateau continental du Nil peuvent être classé suivant l'ordre d'abondance dont la distribution s'apparentait à celle du transport des sédiments [84].

FAHMY (1981) a étudié la distribution saisonnière des métaux lourds dissous et en particules dans la colonne d'eau de la branche de « Damiette » du Nil. El-RAYIS et SAAD (1985) ont estimé la contribution des métaux lourds se déversant du Nil dans la Méditerranée orientale en établissant les concentrations de métaux dissous dans les eaux de surface et les eaux subsuperficielles le long de la branche de « Rosette ». L'abondance relative a été $Zn > Fe > Cu > Mn > Cd$ [84].

3.4 Effet des métaux lourds sur l'homme et son environnement

Les métaux lourds à faibles doses ne constituent pas toujours un danger pour l'organisme. Quelques métaux lourds, comme Zn, Cu, Mn et Fe, sont même indispensables à la croissance et au bien-être des organismes vivants, y compris de l'homme [80], mais leur toxicité réside dans les fortes doses. Cependant, il existe aussi certains métaux lourds comme le Pb, le Hg, le Cd qui ne sont pas indispensables aux activités métaboliques et manifestent des propriétés toxiques. Ils sont difficilement ou pas biodégradables et présentent la faculté de bioaccumulation dans les organismes ce qui amplifie leur toxicité tout en s'apparentant à d'autres micropolluants (PCB, pesticides, dioxines). Certains sont cancérigènes, d'autres ont une action sur la synthèse de l'hémoglobine, sur les reins ou sur le système nerveux central [80].

3.4.1 Généralités sur les effets toxiques des métaux lourds Cd, Cu et Zn

La toxicité des éléments d'une manière générale vis-à-vis du monde environnant varie suivant plusieurs facteurs dont principalement la forme sous laquelle se trouve l'élément et

les espèces cibles. Les caractéristiques physiques et chimiques du milieu, la dureté de l'eau, la température, le pH, la concentration en oxygène dissous et en gaz carbonique, effets synergiques et antagonistes en raison de la présence de composés minéraux constituent des paramètres à prendre en considération face à la toxicité des éléments de traces métalliques [29].

3.4.2 Effets du Cadmium

3.4.2.1 Propriétés fondamentales

Le cadmium en tant que métal a une résistance élevée face à la corrosion, son point de fusion est bas ; il est un bon conducteur de courant et ses dérivées ont une bonne résistance à la température. Son rayon ionique facilite la pénétration de ce métal dans les organismes [87] ; [88]. Le cadmium est en milieu aquatique sous différentes formes physiques (dissoute, colloïdale, particulaire) et chimique (minérale ou organique). La transformation du cadmium peut être liée à un ensemble de variables physico-chimiques du milieu dans lequel il se trouve (salinité pH, potentiel redox, caractéristiques sédimentologues, nature géochimiques des particules, concentration en chlorure) [80], [89]. On peut distinguer les trois formes de cadmium, dont les seuils sont fixés arbitrairement en fonction de leur taille tableau n°2.3.

Tableau n°2.3 : quelques espèces chimiques du cadmium dans les eaux naturelles en fonction de leurs tailles (*Cossa et Lassus, 1989*)

Solution vraie	<ul style="list-style-type: none"> - ions libres - Complexes inorganiques - Complexes organiques Exemple : Cd^{2+} , $CdCl^+$
Colloïdales	<ul style="list-style-type: none"> - Colloïdales minéraux - Complexes organiques de poids moléculaire élevé Exemple : $CdCO_3$, CdS , $Cd-Ac$. Humiques
Particulaires	<ul style="list-style-type: none"> - Précipités inorganiques et organiques - organismes vivants Cd absorbé sur les particules et les organismes

- Les formes dissoutes (<1nm) du cadmium sont présents en milieu aquatique sous la forme d'espèces libre Cd^{2+} . Ces espèces forment des complexes avec des composés minéraux ou organiques (ligands ou complexant). A pH = 8, la quasi-totalité du cadmium est présent sous forme Cd^{2+} . Plus la salinité augmente, plus la

concentration en Cd^{2+} diminue [90] pour des pH supérieurs à 8, le cadmium précipite avec les bicarbonates. En outre lorsque les eaux côtières ou continentales rencontrent les eaux de mer, le cadmium est complexé par les chlorures, les chloro-complexes pour former des formes très stables (CdCl^+ , CdCl_2 , CdCl_3^- et CdCl_4^{2-}) [90].

- Pour une salinité faible, l'espèce CdCl^+ devient majoritaire dans le milieu alors qu'en milieu marin, l'espèce CdCl_2 est majoritairement présente [91].
- On rencontre le cadmium sous la forme formes colloïdales (de 450 à 1 nm) lorsqu'il se fixe à des oxydes de fer, des carbonates, des argiles ou de la matière organique colloïdale [91].
- Il se trouve sous la forme particulaire ($> 0,45 \mu\text{m}$) par intégration dans la structure cristalline des minéraux détritiques (bruit de fond géochimique), par liaison à une fraction organique (carbonates, restes d'organismes, pelotes fécales), par précipitation avec différents fractions minérales (carbonates, phosphates, oxydes et hydroxydes de fer ou de manganèse, sulfures) et par absorption sur des phases de différentes natures (argiles, matières organique, oxydes et hydroxydes de fer et de manganèse) [89].

3.4.2.2 Origine du cadmium

- Ce métal assez rare est toujours associé à l'état naturel au zinc dans les minerais de zinc (Blende) (0,01 à 0,05%) dont les sous produits de la métallurgie du zinc donne en moyenne 3 kg de cadmium par tonnes de zinc. Le cadmium est également trouvé dans des minerais de plomb et de cuivre ainsi que dans des phosphates naturels (mines de Jordanie et de la Tunisie). Les concentrations naturelles du cadmium dans les rivières et les mers atteignent l'ordre de microgramme par litre. Les agents de contamination sont essentiellement les rejets industriels notamment ceux de la galvanoplastie, les engrais phosphatés et les insecticides, l'électronique, et en métallurgie (traitement des surfaces par cadmiage) et dans l'industrie des plastiques (stabilisateurs de polymères) [29].
- Le cadmium secondaire est produit par recyclage d'accumulateurs Ni/Cd, alliages Cu/Cd, poussières d'aciéries incinération d'ordures ménagères [29].

3.4.2.3 Cycle, sources naturelles et anthropiques

Le cadmium est aussi un métal volatilisable, émettant des vapeurs bien en dessous de son point d'ébullition, il contribue donc, par ses fumées et ses poussières à la pollution de l'air [92]. Le cadmium particulaire de la croûte terrestre provient des émanations volcaniques. Cependant des activités industrielles (raffinage des métaux non ferreux, combustion du charbon et produits pétroliers, la métallurgie de l'acier) constituent les principales source des rejets. Il est accumulé dans les sols, par l'emploi des engrais super phosphatés qui favorise son passage dans les végétaux et dans les eaux. Le taux normal de cadmium dans l'eau est de $1\mu\text{g/L}$, mais il peut aller jusqu'à $20\mu\text{g.L}^{-1}$ selon le JECFA (Joint Expert Committee for Food Additives) comité mixte FAO/OMS [80] ; [87].

3.4.2.4 Propriétés biologiques et toxicité

Le cadmium, contrairement à d'autres métaux n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas être biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants. Il arrive parfois que le cadmium remplace le zinc dans des systèmes enzymatiques carencés en zinc chez les planctons [93], [94].

Le cadmium présente un risque pour le consommateur même à des faibles doses. Il tend à s'accumuler dans le cortex rénal sur de très longues périodes (50 ans) ou il entraîne une perte anormale de protéine par les urines (protéinurie) et provoque des disfonctionnement urinaire chez des personnes âgées. Chez l'homme, le phénomène de toxicité aigue est connue depuis 1950 sous el nom de syndrome d'Itai-Itai définit par l'association d'une insuffisance rénale avec ostéoporose (déminéralisation et fragilisation des os) et ostéomalacie (déminéralisation et déformation des os). Son nom provient des cris poussés par les malades riziculteurs âgés de 40 à 60 ans, du bassins de la rivière *Jintsu au Japon*, intoxiqué par l'eau de boisson et de la consommation du riz contaminés par les rejets d'une usines des métaux non ferreux[93], [94].

Selon le JECFA (Joint Expert Committee for Food additives) ou comité mixte FAO/OMS, la dose tolérable recommandée hebdomadairement (DHT) est de $7\mu\text{g}$ de cadmium par kilogramme de poids corporel et par semaine. En dehors des boissons et la nourriture, le tabagisme est aussi une source importante de contamination au cadmium selon une étude épidémiologique. Le règlement de la CE n°466/2001 fixe la quantité maximale de cadmium dans les denrées alimentaires à 1 mg.kg^{-1} poids humide). Par contre, le cadmium ne présente aucune toxicité aigue pour les organismes aquatiques marins à des

doses susceptibles d'être rencontrées dans le milieu. Au niveau subléta¹, des concentrations de 0,05 à 1,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, il n'existe pas d'intoxication en tant que tel, cependant il peut avoir un dysfonctionnement physiologique tel que les anomalies dans le développement embryonnaire et larvaire de certaines espèces, apparition des stress inhibant la croissance [80].

Dans les milieux aquatiques, le cadmium est transféré aux sédiments et absorbé par les organismes évoluant dans et sur les vases. Le cadmium est considéré plus toxique encore que le mercure pour la vie marine. Il se concentre dans la chaîne des poissons, qui sont particulièrement sensibles au cadmium.

JECFA (*Joint Expert Committee for Food Additives*) recommande également une tolérance pour des doses admissibles hebdomadairement (DHT) de $7\mu\text{g de Cd}^{2+}.\text{kg}^{-1}$ de cadmium par aussi bien chez les humains que chez les poissons.

L'effet toxique du cadmium sur les plantes aquatiques est remarquable par le ralentissement de leur croissance ou par un brunissement des feuilles qui au bout de quel que temps se solde par une disparition totale de la flore aquatique. Il est à signaler que cette mortalité est fonction de la concentration de cadmium se trouvant dans le milieu aquatique des affluents [93], [94].

MC LEAN et JONES (1975) ont étudiés le pouvoir d'assimilation respectif de la partie des transplants des macrophytes dans les sédiments chargés en métaux lourds.

Des plantes de *Lemna* ont été cultivées en laboratoire sur un support de Hoagland modifié, il a été constaté que cette plante peut être utilisé pour réduire les teneurs en cadmium du milieu aquatique [52].

Les travaux de GOMMEZ et MUNTAU (1976) sur le cadmium chez les *Myriophyllum spicatum* et les *Lemna*, ont montrés que ces plantes pouvaient accumulé le métal jusqu'à 20 ppm [52].

¹ Effets sublétaux: qui ne provoquent pas la mort des individus mais des dysfonctionnement métaboliques ou physiologiques.

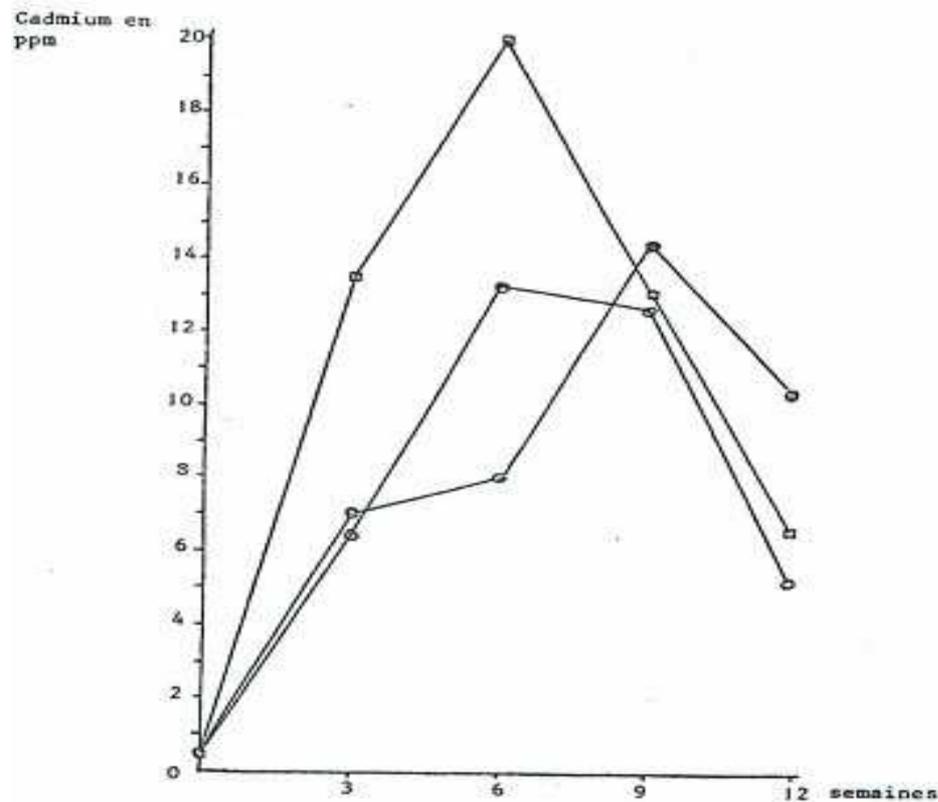


Figure n°7.3 : Evolution des teneurs en cadmium chez les *ceratophyllum* (Mayes, 1975)

Selon les travaux GOMMEZ et MUNTAU, 1976 ce métal présente des affinité particulières avec les matières organiques dans les sédiments, la complexation est très intense avec la matière humiques selon les travaux GOMMEZ et MUNTAU, 1976. La *Lemna* a une grande potentialité de rétention en cadmium [52].

3.4.3 Effets du cuivre

3.4.3.1 Propriétés fondamentales

Le cuivre, ce métal ductile et malléable de couleur rouge-brun est reconnu pour sa résistance à la corrosion. Il est considéré comme un élément essentiel à la biologie des plantes, des animaux et de l'homme. Le cuivre est indispensable au métabolisme de la plante et des êtres vivants [92].

L'ion cuivre forme de nombreux complexes stables avec des ligands minéraux, comme les chlorures ou l'ammonium, ou encore avec des ligands organiques [95] [96]. Les différentes

formes du cuivre peuvent être influencées par plusieurs paramètres, selon de nombreux processus :

- complexation avec des ligands organique (groupe $-NH^2$, $-SH$, et dans la moindre mesure avec le groupe $-OH$) ou minéraux [95] [96] ;
- adsorption sur des oxydes métalliques, des argiles ou des matières organiques particulières [95] [96] ;
- bioaccumulation, présence des cations de compétition (Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+}), présence des sels (OH^- , S^{2-} , PO_4^{3-} , CO_3^{2-}) [95] [96] ;
- échange entre les sédiments et l'eau [95] [96].

Les formes de $CuSO_4$, $Cu(OH)_2$ et $CuCl_2$ du cuivre sont solubles dans l'eau tandis que les oxydes cuivreux Cu_2O ne le sont pas. La majorité de cuivre est diffusée dans l'eau sous la forme particulaire et tend à se déposer, à précipiter ou à s'adsorber sur la matière organique, au fer hydraté, aux oxydes de manganèse ou aux argiles. On trouve 40 à 90% de cuivre particulaire dans l'eau [95].

Les caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, dureté, teneur en autres inorganiques) agissent sur le degré de dissociation entre les formes métalliques et les formes ioniques [95].

3.4.3.2 Origine du cuivre

Le cuivre est extrait d'une grande variété de minerais et existe à l'état natif. On le rencontre souvent sous la forme de sulfures CuS et Cu_2S dans les tétrahédrite et l'énargite et sous forme d'oxyde. La teneur de cuivre dans les minerais varie entre 0,5 à 5%. Elle est de 0,01% dans les roches volcaniques ainsi qu'à 0,0055% dans les roches cristallines. Il est obtenu par le broyage de minerais sulfurés, enrichissement par flottation ou par lessivage acide des minerais oxydés suivi d'une fusion et d'un raffinage électrolytique ou thermique [97].

Le cuivre est l'un des métaux les plus utilisé en raison de ses propriétés physiques et sa conductibilité électrique et thermique. Il est beaucoup utilisé dans la métallurgie, la fabrication des alliages de bronze (avec étain), de laiton ou de joaillerie (avec l'or et l'argent). Il est très utilisé dans la fabrication du matériel électrique (fils, enroulement des moteurs, transformateurs), dans la plomberie, dans les équipements industriels, dans l'automobile et en chaudronnerie. L'acétate de cuivre est souvent utilisé comme catalyseur

dans la fabrication du caoutchouc, comme pigments pour les céramiques et les teintures, comme fongicide et comme insecticide. Le chlorure de cuivre est utilisé comme désodorisant, désulfurant ou purifiant, fixateurs pour la photographie. Il est également utilisé pour la production des couleurs dans les compositions pyrotechniques ou encore pour la conservation du bois et le raffinage des métaux. La forme hydratée est utilisée comme fongicide, herbicide ou bactéricide [97].

3.4.3.3 Cycle, sources naturelles et anthropiques

Le cuivre est présent dans l'environnement de manière simultanée. Sa concentration dans l'écorce terrestre est estimée à environ 70 mg.kg^{-1} . Le transport par le vent des poussières de sol des éruptions volcaniques, les décompositions végétales, les feux de forêts et les aérosols marins constituent les principales sources d'exposition naturelles. Les principales sources anthropiques sont l'industrie du cuivre elle-même, l'industrie du bois l'incinération des ordures ménagères, la combustion de charbon, d'huile et d'essence de fabrication de fertilisants phosphatés.

Il a été prouvé que le milieu plus exposé au cuivre est le sol. Des 97% du cuivre libéré dans l'environnement, le taux dans l'air est estimé à 0,04% et 3% pour les eaux [95]. La contamination des sols est liée au broyage des minerais de cuivre, les boues des usines de traitement des eaux usées, les déchets de la galvanoplastie, l'industrie du fer et de l'acier.

Le plus souvent, le taux de cuivre contenu dans l'eau provient de l'érosion des sols par les cours d'eau avec 68%, de la contamination par les sulfates de cuivre 13%. L'agriculture est aussi un facteur de pollution au cuivre par l'utilisation des divers fongicides à base de cuivre. En d'autres termes, le cuivre connu pour ses propriétés fongicides affecte l'écosystème aquatique par le biais des ruissellements et de l'érosion des terrains cultivables [97].

3.4.3.4 Propriétés biologiques et toxicité du cuivre

Le cuivre est un élément essentiel chez l'homme, les animaux ainsi que les végétaux. Il est impliqué dans des nombreuses voies métaboliques, notamment pour la formation d'hémoglobine dans le cas des humains et la maturation des polynucléaires de neutrophiles. De plus, il est le cofacteur spécifique de nombreuses enzymes et métalloprotéines de structure intervenant dans le métabolisme oxydatif, la respiration cellulaire, la pigmentation [98]. La toxicité du cuivre vis-à-vis des organismes d'un

environnement dépend de ses formes chimiques et son état oxydatif. La concentration létale en 48h pour 50% de larves de truites plates serait de 1 à $3\mu\text{g.L}^{-1}$ et les inhibitions de croissance du phytoplancton se produisent à partir de $4\mu\text{g.L}^{-1}$. Le cuivre est naturellement présent dans les cours d'eau à des concentrations variant entre 0.001 et $0,020\text{ mg.L}^{-1}$. Mais au dessus de ce seuil, il est susceptible d'altérer la faune et la flore marine, il diminue plus de 50% de l'activité photosynthétique des algues en deux ou trois jours [51]. Le cuivre peut être à l'origine des perturbations au niveau des populations phytoplanctoniques.

En général, les concentrations toxiques du cuivre pour les poissons sont très variables. Cette variation des doses toxiques peut s'expliquer par le fait que certains facteurs ont une influence sur la toxicité du cuivre tels le pH et la mesure de la dureté de l'eau. A la suite d'intoxication aigue du poisson par le cuivre, on peut observer des perturbations des mécanismes d'osmo-régulation [51].

Chez les poissons d'eau douce, est examinée une diminution de la concentration en Na^+ du sérum sanguin, tandis que chez les poissons d'eau de mer, il se produit un mécanisme inverse ou la concentration du sérum sanguin en Na^+ augmente. Il se produit par la même occasion un ralentissement de l'activité des cellules et une concentration en cuivre dans le foie, les muscles et l'os operculaire [99].

Selon les travaux d' ALLENDY (1965) sur trois espèces de *Lemna*, il a été montré qu'il n'y avait pas de corrélation entre le cuivre contenu dans les plantes et les teneurs en cet élément dans l'eau. Les teneurs mesurées chez *Lemna* variaient de 3 à 100 mg.L^{-1} et généralement ces teneurs en cuivre décroissaient en fin de cycle végétatif.

Cet élément chimique a souvent été mesuré de par l'utilisation du sulfate de cuivre dans le contrôle algal : SUTTON et BLACKBURN (1971) ont dosé le cuivre chez *Hydrilla*, après une application de sulfate de cuivre. Ils ont trouvé que les teneurs augmentaient dans les tissus végétaux parallèlement aux concentrations en cuivre présentes dans l'eau normale et ils ont ensuite constaté un relargage du métal [52].

Ce phénomène a été également constaté par HUTCHINSON (1975) ou les teneurs de 60 ppm en cuivre tombaient à 5 mg.L^{-1} après cinq mois pour remonter progressivement dans le milieu. Ce phénomène a été également été mis en évidence pour les *Lemna* [52]. Le tableau n°3.3, extrait de l'ouvrage de HUTCHINSON, fournit une synthèse des différentes teneurs trouvées dans la littérature pour cet élément chimique.

Tableau n°3.3 : Concentration en cuivre dans l'eau et les plantes (Hutchinson, 1975)

Espèces	Concentrations moyennes en cuivre (ppm)		Facteurs de concentration
	dans l'eau	dans les plantes	
<i>Ceratophyllum demersum</i> Reimer et Toch (1969)	0,0083	1,52	183
Cowgill (1974)	0,016	3,23	202
<i>Utricularia sp.</i> Reimer et Toch (1969)	0,017	4,01	236
<i>Lemna minor</i> Reimer et Toch (1969)	0,012	3,58	298
<i>Lemna gibba</i> Allenby (1968)	0,047	3	64
<i>Lemna spirodela</i> Varenko et Chuiko (1971)	0,0036	1,56	433

Le cuivre réduit la photosynthèse d'une algue de 50% en deux à trois jours. Les lésions visibles apparaissent dans un délai de dix jours après la mise en contact de l'algue avec la solution de cuivre. Le cuivre sous forme sulfaté est le métal le plus souvent utilisé pour la réduction de la propagation des algues au niveau des barrages [100].

3.4.4 Effets du zinc

3.4.4.1 Propriétés fondamentales

Le zinc est un élément chimiquement métallique bleuâtre, cristallin, insoluble dans l'eau, mais soluble dans l'alcool, les acides et les bases. Il est ductile à forte température et cassant à températures ordinaires. Le zinc est indispensable au métabolisme des êtres vivants (oligo-élément) ; en particulier comme coenzyme. On rencontre le zinc sous différentes formes ; sous la forme hydraté ($Zn(H_2O)_n^{2+}$), complexé par les ligands organiques (acides fulviques et humiques).

Les composés solubles du zinc ont des propriétés toxiques assez marquées. On peut signaler de temps à autre des empoisonnements par les sulfates de zinc, bien que la saveur de ceux-ci reste remarquable [99].

L'empoisonnement des sels de zinc est souvent accidentel, le sulfate de zinc est le plus important des sels de zinc par sa toxicité. On le désigne sous les noms de « couperose blanche » ou de « vitriol blanc » [99].

3.4.4.2 Utilisations

Le zinc également est présent dans l'écorce terrestre, souvent associé au plomb et au cadmium dans les minerais, avec une teneur variant de 4 à 20%. Le minerai principal est la blende, le sulfure de zinc (ZnS). Il est produit suivant le processus hydro métallurgique ou encore pyrométallurgique.

Le zinc est le plus souvent utilisé pour les revêtements des protections des métaux contre la corrosion (galvanoplastie, métallisation, traitement par immersion). Le zinc est aussi utilisé pour des différents alliages (laiton, bronze, alliages légers), dans la construction immobilière, les équipements pour l'automobile, les chemins de fer et dans la fabrication des produits laminés ou formés [99].

3.4.4.3 Cycle, sources naturelles et anthropiques

Le zinc, sous la forme de sulfure, est assez uniformément distribué dans les roches magmatiques (40 à 120 mg.kg⁻¹). Sa concentration est très peu élevée dans des sédiments argileux (80 à 120mg.kg⁻¹). Il est également transporter dans l'atmosphère à partir du vent sous forme de fines particules du sol, des éruptions volcaniques, des feux de forêts et des émissions d'aérosols marins [99].

Par contre, la contribution anthropique de zinc dans l'environnement, prend son origine dans les mines industrielles (traitement minerai, raffinages, galvanisation du fer, gouttières de toitures, piles électriques, pigment, matière plastiques, caoutchouc), des épandages agricoles et des activités urbaines (trafic routier, incinération d'ordures). Les polluants à base du zinc peuvent aussi provenir de la dissolution des anodes destinées à la protection des coques de bateaux contre la corrosion [99].

3.4.4.4 Effets sur l'environnement

Tout comme le cuivre, le zinc est un oligo-élément nécessaire à la vie des organismes vivants mais en quantité faible. Pour des concentrations de l'ordre de 0,05 mg.L⁻¹, le zinc réduit l'activité de la microflore des rivières. Le zinc est un métal toxique vis-à-vis des bactéries, des protozoaires, les huîtres, les œufs et les larves de poissons [92].

3.4.4.5 Effets sur l'homme

Généralement, on peut trouver dans le corps humain d'un adulte une quantité de 2 g de zinc, pour cela il constitue un élément nutritif pour le corps humain [51]. L'absorption du zinc a lieu au niveau de l'intestin grêle, après administration par voie orale ou après inhalation, le zinc s'accumule successivement dans le cerveau, les poumons, l'estomac, les intestins, le foie, le cœur et les reins [51]. Le zinc intervient au niveau de la croissance, du développement osseux et cérébral, de la reproduction, du développement fœtal, du goût et de l'odorat, des fonctions immunitaires et de la cicatrisation des blessures [16]. La quantité maximale de cet oligo-élément chez l'homme est de l'ordre 25 mg/jour.

Les expériences effectuées sur les animaux ont montrés que des concentrations de zinc de 400 à 600 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ sont toxiques pour les rats. De telles concentrations occasionnent des troubles au niveau des poumons et du foie et entraîne une mort de 10% des animaux contaminés [101].

3.4.4.6 Effets sur les végétaux

Le zinc perturbe l'écosystème forestier et aquatique et favorise la décomposition de la matière organique ainsi que le recyclage de nutriments. Sa toxicité pour les organismes aquatiques n'en fait pas un contaminant prioritaire, bien qu'il s'agisse, à des fortes concentrations, sur la reproduction des organismes végétatifs aquatiques.

En outre, le zinc est un cofacteur des diverses enzymes par conséquent son absence provoque des troubles dans le métabolisme des plantes d'où la perturbation de la croissance. En teneur plus abondant que le cuivre (70 à 210 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), il a été démontré par les travaux de RIEMER et TOTH (1969) que la *Lemna* pouvait accumuler jusqu'à (500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ maximum et 350 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ moyenne) [52].

Les travaux de REIMER et TOTH ont montrés que la plante *Cabomba caroliniana* pouvait absorber 750 à 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en zinc et que la *Lemna minor* avait la capacité d'absorber 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ maximum et 370 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ [52].

L'effet de la contamination des métaux lourds dépend à la fois de l'espèce végétale et de l'élément chimique considéré ou encore du rapport des concentrations entre certains métaux. Ainsi des forts taux des oligo-éléments inhibent la croissance des végétaux aquatiques. En outre il existe une rétention préférentielle parmi ces différents métaux. Un niveau très élevé en zinc entraîne une diminution de l'incorporation de cadmium par la plante [102].

3.4.4.7 Réglementation arrêtée

Des réglementations ont été imposées selon la gravité de toxicité de contaminants tel que le cadmium, le cuivre et le zinc dans l'environnement, visant à limiter les émissions ou réduire les usages (tableau n°4.3).

Tableau n°4.3: Valeurs sanitaires et environnementales utilisées et concentrations sans effet prévisibles pour l'environnement (**PNEC : prévisible Non Effect Concentration**) (Casas, 2005)

		Cadmium		Cuivre	Zinc
		Valeurs	dates		
Qualité des eaux de consommation	France	5 μ g.L ⁻¹	03/91	2mg.L ⁻¹	12/01
	Union Européenne	5 μ g.L ⁻¹	11/98	2mg.L ⁻¹	1/98
	OMS	3 μ g.L ⁻¹	96	1mg.L ⁻¹	96
Qualité de l'air	France				
	Union Européenne			Non concerné	Non concerné
	OMS	0,5 μ g/m ³ /an	00		
Valeurs moyennes Dans les milieux Biologiques	Sang	5-10 μ g.L ⁻¹	OMS	800-1200 μ .L ⁻¹	7,7-23 μ mol.L ⁻¹
	Urine	4 μ g.L ⁻¹	OMS	30-60 μ g.L ⁻¹	0,1-1,2mg.j ⁻¹
	cheveux,	1-2mg.kg ⁻¹	OMS	8,9mg.g ⁻¹	
	Placenta	10mg.kg ⁻¹	OMS	50 μ g.kg ⁻¹ .j ⁻¹	
Concentration Sans effet prévisible Pour l'environnement	Eau douce	0,17 μ g.L ⁻¹		1,6 μ g.L ⁻¹	8,6 μ g.L ⁻¹
	Eau marine	56-85mg.L ⁻¹		0,8 μ g.L ⁻¹	8,6 μ g.L ⁻¹
	Sédiment			0,8 μ g.L ⁻¹	
	Sol			2,7mg.kg ⁻¹ p.s	
	prédateurs	160 μ g.kg ⁻¹ p.frais		5,7mg.kg ⁻¹ p.s	21mg.kg ⁻¹
Seuils denrées		5mg.kg ⁻¹ p.sec			
		0,05-0,01 p.f			

Remarque: Les valeurs de PNEC dans le biota ou PNEC prédateurs donnent une concentration à ne pas dépasser dans les proies des organismes supérieurs (poissons, oiseaux, mammifères) afin d'éviter un empoisonnement secondaire de la chaîne trophique.

Les valeurs du PNEC (Prévisible Non Effet Concentration) dans le biote ou PNEC prédateurs donnent une concentration à ne pas dépasser dans les proies des organismes supérieurs (poissons, oiseaux, mammifères).

L'ensemble forme un écheveau particulièrement complexe composé de:

- quatre niveaux de réglementation: nationale (avec 4 niveaux internes: lois, décrets, arrêtés, circulaires), communautaire (règlements, directives et décisions

européennes), international (conventions internationales type convention Marpol) et mondial (recommandations de OMS).

quatre types d'intervention ou de « normes » plus ou moins rigoureuses: « valeurs » ou « teneurs limites », « valeurs guides », « objectifs » ou « recommandations ». Il est à noter que ce qui est communément appelé « norme » n'est en réalité le plus souvent qu'une recommandation ou une valeur objective, une exigence devant être satisfaite à un moment donné. D'un point de vue réglementaire, la norme est la seule à avoir une valeur légale et doit être suivie [91].

3.5 Biosorption des métaux lourds par la plante

3.5.1 Généralité

Selon la publication de la division de l'Environnement de l'OCDE, la bioaccumulation est l'une des propriétés intrinsèques des substances chimiques qui déterminent leur danger potentiel pour l'environnement. La bioaccumulation et la bioconcentration entraînent une charge corporelle qui peut ou non conduire à des effets toxiques. Il convient à cet effet d'établir une distinction entre la bioconcentration, biomagnification et la bioaccumulation. La bioconcentration est définie comme le résultat net de l'absorption, de la transformation et de l'élimination d'une substance dans un organisme, résultant d'une exposition via l'eau [27], tandis que la bioaccumulation englobe toutes les voies d'expositions (air, eau, sédiments /sol et aliments) [102],

En général, les oligo-éléments ne sont toujours pas néfastes pour les plantes aquatiques, au contraire, ils sont utilisés comme nutriments. Cependant lorsque leur teneur dans l'eau dépasse les quantités admissibles, ils deviennent des inhibiteurs de croissance des plantes et tendent à faire disparaître la flore aquatique. Ce sont des hormétiques [49]. Certaines études ont montrées les corrélations existant entre la concentration des polluants dans l'eau et les concentrations mesurées dans la faune et la flore aquatique.

De plus en plus d'écosystèmes sont contaminés par des éléments de traces métalliques et certaines plantes et aquatiques constituent la porte d'entrée de ces métaux dans la chaîne trophique pouvant s'amplifier et causer des dégâts irréversibles.

C'est pourquoi une évaluation des effets des ces métaux lourds, pour une interprétation des données de bioaccumulation, paraît prépondérante dans la répartition des xénobiotiques (extra et intracellulaire) de la cellule végétale [49].

3.5.2 Définition

3.5.2.1 Bioaccumulation

La bioaccumulation est le processus par lequel un organisme vivant absorbe une substance à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il l'excrète ou la métabolise. Elle désigne donc la somme des absorptions d'un élément par voie directe *et alimentaire* par les espèces animales aquatiques ou terrestres [29].

Face à la complexité et l'immensité des problèmes écotoxicologiques, il semble que les termes de transfert et d'accumulation sont fortement liés et que le premier représente un changement d'état du second. Les transferts représentent le flux de contaminants entre les différents compartiments abiotiques et biotiques et l'accumulation représente la quantité stockée dans chacun des compartiments. La bioaccumulation est donc le résultat des processus par lesquels le contaminant entre dans l'organisme et des processus de décontamination, une combinaison des mécanismes d'excrétion vers l'environnement et de biotransformation endogène [102].

Ainsi, le concept de la bioaccumulation résulte de la balance entre le processus de capture, de stockage ou d'assimilation et d'excrétion d'une substance par un organisme, due à une exposition via l'eau, la nourriture, les sédiments et l'air [103]. La bioaccumulation est un phénomène capital qui exprimé par la différence entre la quantité des métaux qui pénètrent au travers des barrières biologiques des micro-organismes et celle qui est éliminée vers le milieu extérieur. La pénétration, le stockage dans l'organe cible et l'élimination sont sous la dépendance des facteurs abiotiques du milieu, de la nature du contaminant et des caractéristiques physiologiques et biochimiques de l'organisme ou de l'espèce considérée.

3.5.2.2 Biomagnification

La biomagnification étant l'accumulation et le transfert de substances par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire, entraînant une augmentation des concentrations internes dans les organismes situés à des niveaux plus élevés de la chaîne trophique (figure n° 8.3).

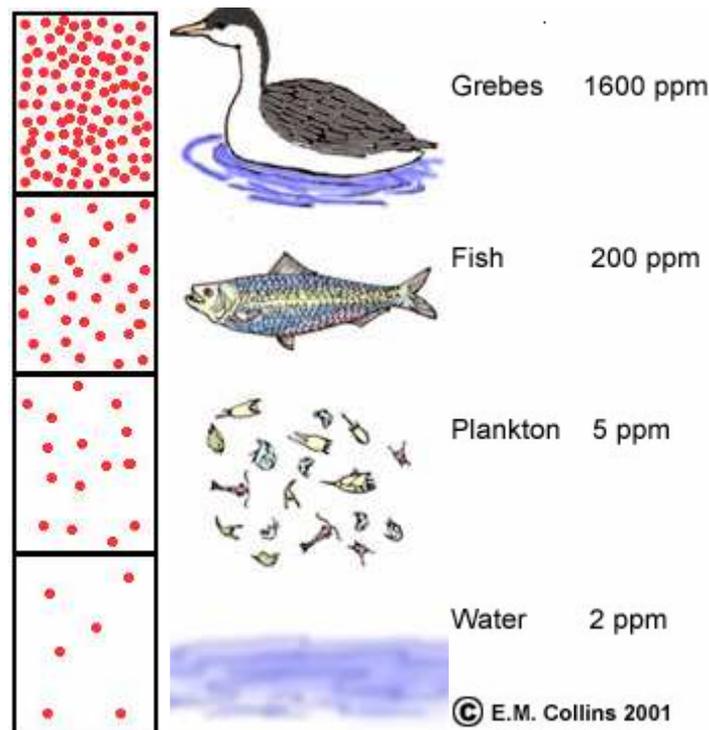


Figure n°8.3 : Exemple de biomagnification (Collin., 2001).

3.5.2.3 Bioconcentration

Certains éléments métalliques tels que le cuivre et le zinc à des faibles concentrations, agissent comme nutriments pour la plante, mais à des concentrations élevées, ils deviennent des inhibiteurs de la croissance des organismes. Ce sont des métaux dits hormétiques.

De nombreux travaux ont mis en évidence les propriétés accumulatrices des *Lemna* pour les métaux lourds : le Plomb, manganèse, cadmium, chrome et le zinc [104], argent et or [105], mercure [106], arsenic [107], cuivre cobalt, nickel et baryum [72]. HARVEY *et* FOX (1973) ont cultivé la *Lemna* en aquarium contenant des effluents industriels en conditions contrôlées (T= 24°C, éclairage 1100 lux) sur 10 jours sans renouvellement du milieu. Par rapport au témoin sans lentille, on constate une épuration de l'azote et du phosphore.

En général, le mécanisme d'intoxication est lié à trois stades différents allant de l'exposition aux toxiques, le passage des toxiques à travers les membranes et la cinétique du toxique dans l'organisme récepteur [25].

Ce mécanisme d'intoxication par biosorption est un phénomène physico-chimique très complexe qui détient très peu d'informations. Le plus souvent, ce mécanisme

d'intoxication est lié à la composition chimique de la paroi cellulaire, la nature des cations ainsi qu'aux caractéristiques physico-chimiques du milieu réactionnel tel que l'échange d'ions, la complexation, l'attraction électrostatique, les micro précipitations, le pH du milieu ou la précipitation [33].

Il est également le processus du cation passif liant par la biomasse morte ou vivante, et représente de manière potentiellement rentable la rétention des métaux toxiques des eaux usées industrielles. Il faut spécifier que cette rétention est fonction des espèces en présence du toxique et peut être utilisé efficacement dans une certaines gammes de concentrations (environ 100 mg/L) [108].

Les biosorbants sont des matériaux complexes et variables. La composition des murs des cellules à laquelle des ions en métal sont liés, dépend non seulement de l'espèce biosorbants, mais également des états environnementaux et de sa croissance [109].

3.5.3 Rôle des parois cellulaires dans le mécanisme de décontamination

Les parois cellulaires sont des macromolécules, siège des réactions de bio sorption. Les composants importants de la paroi cellulaire sont : l'acide peptidoglycan, les polysaccharides, l'acide uronique, l'acide teichoic et les protéines [110], qui sont principalement carboxylique, hydroxyle et les groupes phosphatés [111], [112]. La plus part de ces molécules sont des polyélectrolytes qui portent des groupes chargés carboxylique, phosphatés, hydroxyle ou amine [113]. La présence des emplacements anioniques et cationiques donne à la paroi des plantes aquatique ces propriétés amphotères et selon le pH, les groupes sont protoniques ou déprotoniques [114]; [115].

La composition chimique de la paroi des cellules, la présence et la disponibilité des emplacements du métal liants sont non seulement associées à l'espèce, mais dépendent également des états de croissance de la cellule. En résumé, les groupements chimiques chargés négativement contenant des protéines sulfurées, oxygénées et nitrogénées sont des sites de fixations pour les cations [116]. Les réactions d'échanges se font par l'emplacement d'un cation lié à un site immobile extracellulaire chargé négativement, par un autre cation. Les liaisons électrostatiques qui forment sont non sélectives et réversibles, le phénomène est rapide et passif. La surface cellulaire se comporte alors comme une résine échangeuse d'ions [117].

En outre, l'influence de l'acidité des eaux sur le processus d'accumulation entraîne une compétition entre protons et cations accumulés par la plante.

Afin d'exercer son action, une molécule toxique doit entrer en interaction avec son récepteur ou site spécifique d'action, correspondant à une entité structurale composée de constituants ayant une complémentarité avec le groupement de la molécule toxique [49].

Le plus souvent, les interactions entre toxiques et récepteurs sont très spécifiques. Ainsi BABICH *et al.*, 1982, trouvent que les métaux lourds tels que le Cr et le Pb présentent une grande affinité pour les enzymes à groupement (SH) et interfèrent avec leur activité [92].

Le transport de l'ion métallique dans la cellule et dans les organes de stockage se fait par déplacement, par affinités successives (jusqu'au puits cinétique ou jusqu'à l'excrétion). La vitesse d'assimilation sera fonction de la réaction la plus lente (réaction limitante), qui est souvent le transfert intracellulaire. Ainsi, il apparaît un modèle appelé le modèle de l'ion libre (FIAM) qui traduit l'interaction d'un métal suivant les trois étapes [92] :

- diffusion du métal à l'interface de la membrane biologique ;
- réaction de complexation avec le site de surface ;
- transport à travers la membrane.

De ce modèle de l'ion libre, on peut prendre en compte l'hypothèse selon laquelle la biodisponibilité du métal décroît selon deux processus :

- Diminution de l'activité de l'ion libre en solution conséquence de la diminution de la fixation de métal sur les sites biologiques récepteurs.
- Une augmentation importante de la toxicité de certains métaux (Cd, Zn) en présence de métabolites du poids moléculaires de l'organisme [90] ; [118].

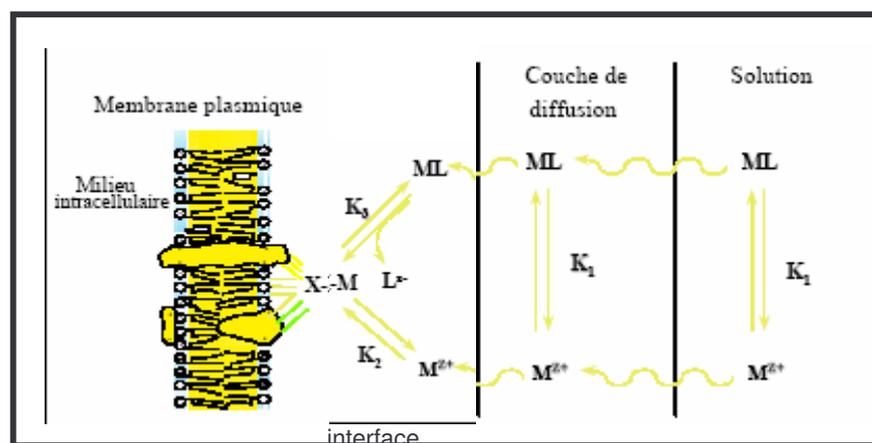


Figure n°9.3 : schéma récapitulatif du modèle de l'ion libre (k_1 , K_2 et K_3 sont des vitesses de réactions) (Campbell, 1995).

3.5.3.1 Mécanisme de biosorption proprement dit

Le mécanisme d'intoxication peut se résumer par trois grandes phases par [92] :

- *L'exposition d'un organisme au toxique.*

L'exposition d'un organisme au toxique est liée à la perméabilité des différentes barrières membranaires, muqueuses ou de la peau de celui-ci. Le toxique étant un produit capable de déclencher une modification délétère sur l'organisme ou sur la cellule [25].

- *La cinétique du toxique dans l'organisme : absorption, destruction, métabolisme, excrétion.*

Une substance toxique, avant d'exercer son action au niveau de l'organe cible, doit être absorbée par l'organisme et transportée au niveau du récepteur. De ce fait, les parois de la cellule de certaines plantes aquatiques ont un grand nombre de groupement chimique chargés négativement contenant des protéines sulfurées, oxygénées et nitrogénées [116], qui constituent des sites de fixation pour les cations. Cette fixation est assujettie à une certaine affinité entre des cations polyvalents et cations monovalents. Les cations polyvalents ont une meilleure affinité que les cations monovalents [117]. A concentration molaire égale, les éléments de traces métalliques à forte affinité comme le Cd et le Pb sont accumulés préférentiellement que les éléments à faible affinité tels que le calcium et le magnésium [74].

Des études ont démontrées que la cinétique d'échange d'ions entre l'eau et la plante aquatique se passe par fixation des éléments de traces métalliques en quelques heures après le contact avec la solution pour atteindre un état stationnaire durant trois jours [69].

Les travaux de PICKERING en 1969 ont montrés, trois processus successifs d'absorptions intracellulaire du zinc décrits de la manière suivante :

- Une étape rapide d'absorption du métal dans l'espace libre de la membrane cellulaire après le processus de fraction intercellulaire. Cette étape n'est pas influencée par la lumière et la température [119].
- Une seconde étape de 90 min représente la pénétration au travers des zones externes du protoplasme, appelé fraction extracellulaire. Cette étape est peu influencée par la lumière et température [119].
- Une troisième étape, qui dure plusieurs jours et correspondant à l'accumulation intracellulaire (énergie dépendante) dans les vacuoles de la plante sous forme soluble et insoluble ; c'est la fraction intracellulaire. Cette étape est influencée par la lumière et la température [119].

Des études récentes ont montrées par une méthode d'élution séquentiel pour le cas du cuivre que la fraction intracellulaire (Cu_{int}) est localisée dans le fluide contenu dans les parois qui entourent les cellules, une fraction échangeable ou extracellulaire (Cu_{exch}) correspond au métal lié aux sites d'échanges à la surface de la paroi et une fraction intracellulaire situé à l'intérieur de la cellule ($Cu_{rés}$) [119].

D'autre part, une étude sur les *Rhynchoségium riparioides* a montré qu'après un certain temps environ 21 jours d'exposition au cuivre ($2,96 \mu M$ Cu), celui-ci se repartie proportionnellement en 14% de $Cu_{rés}$, 47% de Cu_{int} , 39% de Cu_{exch} . Et que pendant 14 jours de plus environ ($0,14 \mu M$ Cu), 60% de Cu total a été éliminé. Cette expérience montre que l'élimination du Cu se situe au niveau de la partie Cu_{exch} et dans la moindre mesure du Cu_{int} [119].

Tandis que l'existence de la fraction résiduelle $Cu_{rés}$ conduit à « l'effet mémoire » qui confère à la plante la capacité de conserver une empreinte d'une éventuelle pollution accidentelle, même dans le cas où celle-ci n'est plus détectable [120], des chercheurs émettent l'hypothèse que l'entrée des éléments de traces métalliques dans les différents compartiments intracellulaires et extracellulaires entraîne une perte d'éléments précédemment retenus dans ces comportements. Et des phénomènes de compensation se mettent en place [121].

- *Passage membranaire des toxiques*

1) Les phases d'infiltrations du toxique dans un organe sont les suivantes :

- Le passage au travers des pores sous l'action d'un gradient de concentration.
- La diffusion non ionique est le mode de passage privilégié des molécules liposolubles qui doivent s'incorporer à la partie lipidique de la membrane pour passer d'un milieu à l'autre, la vitesse de transport étant directement proportionnelle à l'importance du gradient de concentration [122].
- La pinocytose, processus complexe, au cours duquel la membrane d'une cellule s'invagine dans le cytoplasme libre dans ce dernier, en se renfermant sur elle-même, des vésicules contenant du liquide extracellulaire renfermant du toxique [122].

2) La biotransformation

Dans un organisme, la majorité des substances étrangères subit des transformations métaboliques ; en effet, l'introduction d'un produit étranger dans un système vivant déclenche un processus biochimique d'autodéfense qui tend à métaboliser le produit et mobiliser de ce fait un réseau enzymatique de neutralisation [122].

3) Capture

La capture se fait par la pénétration des molécules exogènes pendant, le processus physiologique, à travers les barrières séparant l'environnement interne de l'organisme avec le milieu externe. Lors de la contamination, ces barrières montrent des propriétés biologiques liées à leur structure et aux conditions physico-chimiques de l'environnement (température, pH, électrolytes, etc...). La membrane plasmique est la structure primaire impliquée dans ce processus [123].

A cet effet, les caractéristiques de l'interface de la cellule – environnement aquatique ont une influence remarquable sur la forme des éléments traces métalliques accumulés. Généralement, les organismes aquatiques sont soumis à des concentrations en métaux de traces allant de l'ordre de ng.L^{-1} dans l'océan ouvert, à des niveaux approchant le $\mu\text{g.L}^{-1}$ dans les zones côtières, et la capture des éléments de traces métalliques en solution se fait généralement par diffusion passive sans aucun effort ou dépense énergétique [123], [36]. Ainsi, les formes métalliques liposolubles ou à faible polarité, peuvent traverser la membrane par diffusion passive. Celle-ci peut être facilitée (diffusion par gradients de concentration, déplacement dans un champ électrique, présence de solvants, transport par canaux spécifiques aux cations essentiels) en utilisant des protéines de transport associées à la membrane.

Le métal sous forme d'ion libre a une grande importance dans le contrôle de la capture métallique d'autant plus qu'il se présente comme l'espèce métallique dissoute la plus biodisponible [90]. Ainsi, le Cd^{2+} par exemple, passerait par la voie d'un canal protéique non spécifique sur la membrane cellulaire.

Plusieurs études au laboratoire montre que l'assimilation est proportionnelle aux ions libres (M^{2+}) dans la solution et non à la concentration total du métal en solution et relève de la bioconcentration. En principe la majorité des ions métalliques ne traversent la membrane plasmique hydrophobes que grâce à un ligand transporteur. Ces ligands constituent le

système de « piégeage cinétique » dont l'efficacité dépend de leur synthèse et de la force de liaison avec le métal [124] ; [125].

4) La dynamique du toxique ou de ses métabolismes dans l'organisme.

3.5.3.2 Accumulation

C'est le processus par lequel les organismes vivants accumulent des polluants lié directement à l'environnement abiotique. Cette bioconcentration caractérise la pollution car à un certain seuil de concentration ou lorsque la moyenne de celle-ci dans un organisme est supérieure à celle de l'environnement, certains végétaux aquatiques meurent [126].

Le facteur bioconcentration (BCF) permet d'évaluer le taux de la concentration d'un élément dans un organisme. Il est aussi appelé le facteur d'enrichissement et se calcul par :

$$\boxed{BCF = C_m / C_e} \quad \text{où}$$

C_m : est la concentration en métal dans la plante en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec de la plante.

C_e : est la concentration en métal dissous dans l'eau en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Une étude a montré qu'à partir de facteurs de bioconcentration, un gradient d'accumulation préférentiel pour les métaux pouvait s'établir de manière suivante :

$\text{Zn} < \text{Cd} < \text{Cu} < \text{Mn} < \text{Pb} < \text{Al} < \text{Fe}$ [126].

3.6. Phénomène physiologique de décontamination

3.6.1. Généralités

Selon les travaux de BROWN et WHITERHEAD, 1986 et de BROWN et WELLS., 1990, l'insertion dans les compartiments intracellulaire des plantes aquatiques des composés métalliques ont eu deux effets toxiques majeurs [127] ; [128] :

- des lésions membranaires ;
- une réduction substantielle de la photosynthèse.

Chez de nombreux végétaux, l'augmentation de la concentration en métaux dans la plante se traduit par une production des polypeptides complexant les métaux ; ceux – ci sont en général répertorié comme étant des phytochélatines. Ces polypeptides jouent un rôle dans le contrôle homéostatique de la concentration en ions métallique chez les végétaux [129].

Ils pourraient être impliqués dans les mécanismes de tolérance aux métaux exprimés par des lignés des cellules et des plantes [130].

Par ailleurs, les plantes répondent à la toxicité des métaux par divers mécanismes. Un mécanisme de décontamination implique la chélation des éléments de traces métalliques dans les cellules par une famille des ligands peptidiques, ces phytochélatines (PC) qui sont capables de lier le Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} et le Ag^+

On entend ici par la phytochélatines un ensemble de dipeptides ($\gamma\text{-Glu-Cys}$) qui équivalent aux méthallothionéines, protéines qui sont directement liées au phénomène de désintoxication des éléments de traces métalliques chez les animaux [131]. D'après les études récentes ils sembleraient que le glutathion (GSH), soit le précurseur de la synthèse des phytochélatines.

3.6.2 Décontamination par la cellule végétale

ZENK, 1996 a proposé une méthode pour la biosynthèse et le recyclage des complexes PC/métal pour les plantes supérieures. Les ions métalliques comme le Cd^{2+} entrent dans la cellule du végétal à travers la paroi cellulaire perméable. La PC synthétase qui catalyse la transformation des GSH en PC est alors activée. Le complexe Cd^{2+}/PC est entraîné dans les vacuoles. A l'intérieur de la vacuole, siège de ces échanges, le complexe Cd^{2+}/PC est éventuellement dissocié. Le métal est ensuite stocké à cet endroit pendant que le peptide PC se dégrade [132].

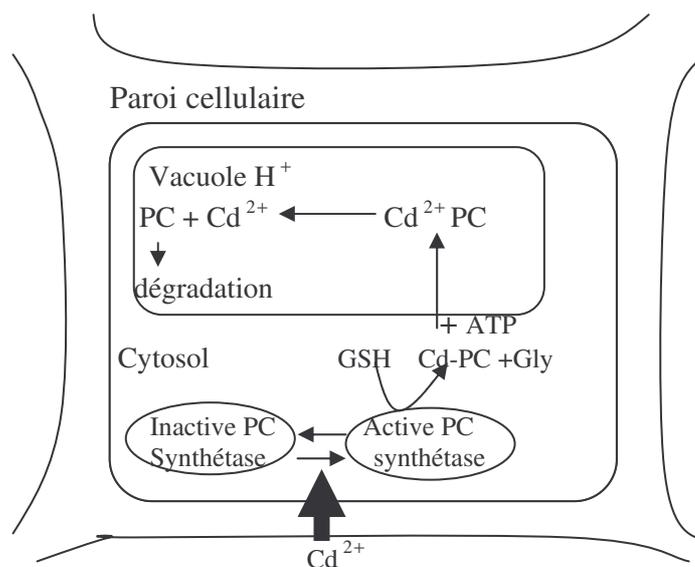


Figure n°10.3 : Schéma d'entrée du cadmium dans la cellule végétale (Zenk, 1996).

3.6.3 Les mécanismes de la phytoaccumulation cellulaire : La phytotolérance

La phytoaccumulation est une propriété liée à la phytotolérance de la plante face aux ions métalliques. Ainsi, il avait été montré que l'augmentation des métallothionéine (MT) par introduction et stimulation d'un gène, fait augmenter l'expression des phytochélatines (PC) dans le cas de la phytotolérance des cellules en culture au cadmium (Cd). Par contre la même expérience sur une plante supérieure ne donne aucun résultat sur l'efficacité. Ce ci s'explique par le phénomène de biosynthèse et de dégradation des phytochélatines [133].

3.6.3.1 Biosynthèse et devenir des phytochélatines

Etant donné qu'il n'existe aucune preuve de l'intervention de métallothionéine dans la phytotolérance. Il est vrai que la surexpression de cette molécule provoque une amélioration de la tolérance des cellules en culture. Mais l'observation de mutants cad1 (déficients pour la synthèse de PC) nous révèle une hypersensibilité au cadmium non compensée par les métallothionéines. D'où le doute quant à l'importance des métallothionéines dans l'hypertolérance chez les plantes [132].

3.6.3.2 L'enzyme de synthèse de Phytochélatine (PC)

La phytochélatine est synthétisée par une enzyme, la gamma-glutamylcystéine dipeptidyl transpeptidase (ou phytochelatine synthase), qui réalise la réaction suivante à partir de la glutathion (GSH) fournissant des groupements gamma-Glu-Cys-Gly.

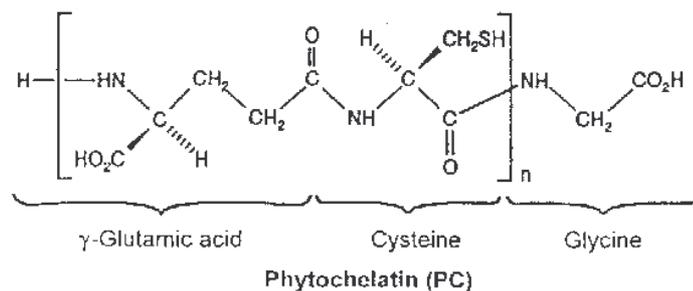


Figure n°11.3 : voies de synthèse du PC (Zenk, 1996)..

C'est une réaction strictement dépendant de la présence des ions métalliques. Ces ions métalliques inactivés sont « chélatés » par des molécules de PC comme représenté sur la figure n°12.3 et 13.3 [132].

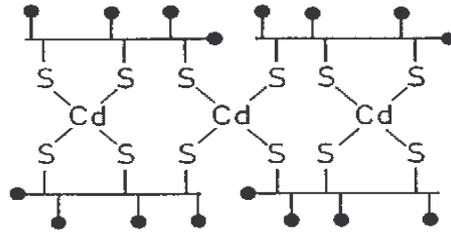


Figure n°12.3 : Séquestration des ions métallique dans le complexe. Ici, trois ions Cd liés à 4 phytochélatines par les atomes de soufre (S) de la cystéine. Les ronds noirs figurent les groupes carboxyles (Zenk ,1996).

3.6.3 .3 Le transport dans la vacuole

Le complexe formé est alors capté et transporté dans la vacuole. Le transport est assuré par un transporteur spécifique de PC et également de PC complexé ; le passage vers la vacuole est ATP-dépendant, c'est-à-dire qu'il nécessite l'hydrolyse énergétique d'une molécule d'ATP [132].

De plus, un autre type de transporteur intervient, mais dans une moindre mesure. Il s'agit d'un transporteur antiport ion métallique et H⁺ : la translocation des protons (ions H⁺) de la vacuole vers le cytoplasme entraîne celle des ions métalliques en sens inverse. Cette translocation passive (ne nécessitant pas d'énergie) permet le transport des ions métalliques vers l'intérieur de la vacuole à contre-courant de leur gradient de concentration. Seulement, à côté de ce phénomène il est nécessaire de réalimenter la différence d'acidité entre les deux compartiments car c'est le moteur de l'antiport ; ce qui nécessite de l'énergie. Dans tous les cas, il s'agit d'un transport actif (nécessitant dépense d'énergie) des ions métalliques complexés vers la vacuole [132].

3.6.3 .4 Devenir du complexe

Dans certains cas, le complexe va être stabilisé par addition de sulfides. Dans le cas contraire, le complexe est dégradé. A l'arrivée dans la vacuole si le complexe n'est pas protégé il est attaqué par l'acidité de la vacuole et les PC libèrent les ions métalliques. Le métal ainsi libéré peut se lier à des acides organiques. Les molécules de PC, quant à elles, sont dégradées en acides aminés qui migrent vers le cytoplasme. Ainsi, les molécules de PC, une fois leur rôle accompli, ne vont pas aller perturber le bon fonctionnement des enzymes du métabolisme cellulaire dont l'activité nécessite des ions métalliques [132].

3.6.3 .5 Fonctionnement des phytochélatines

Les plantes doivent réaliser un équilibre entre :

Prélever et laisser libre une quantité faible d'ions métalliques nécessaire au métabolisme ; pouvoir inactiver l'excès d'ions métalliques qui est toxique pour le métabolisme (sensibilité d'enzymes...). Les phytochélatines sont responsables de la tolérance aux ions métalliques. Non seulement elles empêchent les ions en excès de circuler librement dans le cytoplasme en formant des complexes avec ceux-ci ; mais aussi, elles sont les responsables de leur séquestration vacuolaire puisqu'elles disposent d'un transporteur qui leur est spécifique [132].

3.6.3 .6 Niveau de sensibilité et concentration en PC

Dans une publication (RUFUS *et al.*, 1997) on peut lire : « *l'hypertolérance aux métaux n'est pas due à une hyperaccumulation de PC* ». En effet, la concentration en phytochélatine chez les plantes tolérantes ne diffère pas des plantes normales, sensibles. Mais, la présence de PC est indispensable à la tolérance même à des niveaux normaux de Cd : si on inhibe le bon fonctionnement du gène PC on provoque l'hypersensibilité de la plante [133].

L'étude comparative d'individus appartenant à des populations de *Silene vulgaris* sensibles ou tolérantes au cadmium a montré que les plantes sensibles synthétisent plus de phytochélatines que les plantes tolérantes, pour une même concentration en cadmium dans le milieu [134]. En d'autres termes, la phytoaccumulation est liée à la phytotolérance de la plante vis à vis des ions métalliques. L'étude des mécanismes de la phytoaccumulation passe par l'étude de la phytotolérance car ces deux domaines se chevauchent largement [186].

De plus, les plantes peuvent limiter l'assimilation d'un métal toxique en maintenant des niveaux élevés en calcium intracellulaire [135]. En plus, selon les travaux de JACOBSON *et al.*, 1960 , le calcium modifie la perméabilité des surfaces cytoplasmiques, ce qui entraîne une diminution de l'accès de certains cations monovalents à divers sites d'absorption, et par conséquent freine la bioaccumulation des l'éléments métalliques. Ce rôle protecteur est aussi remarquable pour les ions magnésiums chez les lentilles. En plus, la concentration en cadmium inhibant de moitié la croissance de la plante C_{50} et les concentrations en phytochélatines sont pratiquement identiques. Ce qui prouve que c'est la concentration en cadmium dans la cellule qui est responsable de l'expression du

biomarqueur et non celles du milieu. Aussi, La chélation d'ions métalliques par des ligands spécifiques de forte affinité diminue la concentration en ions métalliques libres. Ainsi, leur phytotoxicité est réduite [135].

3.7 Mécanismes de réparation cellulaires

Certains métaux tel que le cuivre (Cu) sont à l'origine de dégâts causés à la membrane plasmique. Par conséquent, les plantes hyper accumulatrices de ces métaux doivent avoir comme propriété parallèle :

- soit un système de réparation de la membrane,
- soit un système de résistance de la membrane à l'attaque des métaux [132].

3.7.1 La phytoextraction

La phytoextraction est la propriété qu'ont les plantes à pouvoir accumuler des quantités importantes de polluants. Elles deviennent des plantes hyperaccumulatrices conséquence d'une autre propriété de la plante ; la phytotolérance développée par ces plantes au cours de l'évolution, dans les conditions hostiles et toxiques des sites métallifères [136].

Environ 400 espèces de plantes sont reconnues comme étant des hyper accumulateurs de métaux lourds, la majeure partie d'entre elles (300 espèces) accumulant même le Nickel. Une plante est dite hyperaccumulatrice à partir d'une concentration dépendant du métal. [136].

3.7.2 Le comportement des métaux dans un système eau-plantes

Dans le cadre de la phytoremédiation, il est indispensable d'estimer la biodisponibilité d'un élément en trace, afin de connaître la quantité de métal potentiellement extractible, et le rendement de cette méthode. Ainsi, il est nécessaire de bien connaître la réponse des plantes hyperaccumulatrices à la charge du milieu, de même que la capacité de prélèvement du métal par ces plantes en fonction des facteurs de culture, et, enfin, les relations entre la plante hyperaccumulatrice et la mobilité du métal dans le milieu aquatique [135].

3.7.2.1 Bioaccumulation du cadmium

Lors de la bioaccumulation du cadmium, la pénétration du métal dans la cellule se fait de façon linéaire dès les premiers temps d'exposition et est proportionnelle à sa concentration dans l'eau [137] ; [138] [139] ; [140].

Selon BORCHARDT (1982 et 1985), en marquant les algues au cadmium 109 et l'eau avec du cadmium 115 on se rend compte de la prépondérance de la voie dissoute par rapport à la voie particulaire et montre seulement 1% de la quantité de cadmium peut être lié à la voie particulaire [88].

La biodisponibilité des espèces de cadmium dissous dépend des mécanismes de capture. La diffusion passive ou facilitée via les canaux en Ca^{2+} à travers la bicouche lipidique semble être le processus de capture le plus fréquent [124]. Les formes ionisées avec des chlorures et des hydroxydes doivent être considérées principalement.

Il n'y a pas de données convaincantes permettant d'évaluer une biomagnification du cadmium dans les réseaux trophiques. Au contraire, il semble qu'une diminution des concentrations avec l'augmentation du niveau trophique soit la situation la plus couramment observée [65].

3.7.2.2 Bioaccumulation du cuivre et du zinc

Le cuivre et le zinc sont des oligo-éléments indispensables à faibles doses pour la vie d'un grand nombre d'organismes. L'accumulation du cuivre et du zinc est donc régulée pour des nombreuses espèces aquatiques [140]. Les entrées de cuivre et de zinc se font préférentiellement sous la forme ionique (Cu^{2+} et Zn^{2+}) par des protéines de transport membranaire [141].

Le zinc peut s'accumuler dans les organismes aquatiques et créer une toxicité cependant, les valeurs du FBC décroissent en montant dans la chaîne trophique. On peut expliquer cela par une régulation importante au sein des organismes « supérieurs » et par conséquent le potentiel de biomagnification demeure faible [97].

3.8 Les paramètres influant sur les mécanismes d'accumulation des métaux

Le mécanisme de contamination et de décontamination sont superposés dans le temps et leur importance relative varie selon les modalités de la contamination (doses administrées, voie d'entrées, etc...), selon les niveaux d'accumulation dans l'organismes et selon les

facteurs physico-chimiques du milieu environnant [142] ; [143] [124]. La notion de bioaccumulation résulte des divers mécanismes agissant simultanément ou avec un décalage de temps. La capacité de bioaccumulation est fonction de l'espèce considérée, le stade de développement des individus, les caractéristiques écologiques du système et les propriétés du contaminant [123].

Les interactions entre les contaminants et les barrières physiologiques sont sujet d'une meilleure compréhension dans les phénomènes écotoxicologiques, particulièrement la bioaccumulation et les transferts à travers la chaîne trophique. Ces interactions sont assujetties aux contraintes de l'environnement tel que le pH, la température etc... [123].

3.8.1 Paramètre environnemental

L'un des paramètres de l'environnement qui peut influencer l'accumulation des polluants est le climat (température, lumière). WEHR et WHITTON, (1983) ont montré que l'influence des saisons sur l'accumulation des éléments métalliques de traces était aussi fonction des espèces [71]. D'après les travaux de MOUVET, 1979 ; VRAY *et al.*, 1992 il a été remarqué que les périodes estivales améliorent la faculté d'accumulation des métaux par les mousses. En effet, l'influence de la saison sur la contamination a prouvé que la température jouerait un rôle significatif sur l'accumulation des éléments de traces métalliques [144] [76].

NUÑEZ OLIVERA *et al.*, (2001) ont mis en évidence une tendance annuelle saisonnière des concentrations en éléments (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Na) dans les Mousses. Ils ont montrés que ces éléments étaient plus élevés dans les plantes en automne qu'au printemps. Les faibles concentrations résulteront de la dilution interne des éléments, en effet la croissance des tissus est alors plus importante que l'absorption des éléments [145] ; [146].

NUÑEZ *et al.*, (2001) suggèrent que cette prévision en éléments permet aux plantes aquatiques de croître dans les périodes plus défavorables et éviter le déficit d'éléments nutritifs [147].

- La charge métallique : la concentration en éléments dans les eaux et leurs biodisponibilité influent sur la bioaccumulation des polluants. Il peut également arrivé que la bioaccumulation soit plus importante qu'une concentration élevée en éléments. Cela semble s'expliqué dans certain cas par une action toxique des métaux vis-à-vis de certaines plantes aquatiques (lentilles, Bryophytes) liée à l'effet du pH sur la spéciation des éléments [147]. Ainsi, la solubilité de certains

métaux peut augmenter dans des conditions acides et induit une diminution de la bioaccumulation [148].

- Les matières en suspension (MES) : La mesure d'accumulation réalisée sur les plantes aquatiques peut être perturbé par les MES (phytoplancton, argiles, sables etc...) qui sont susceptible d'absorber une partie de la micropollution [149].

3.8.2 Les paramètres Biologiques

- la physiologie des organismes : Les cinétiques d'accumulation et de décontamination des polluants ainsi que la croissance des organismes sont des paramètres à prendre en considération étant donné qu'ils peuvent influencer les processus d'accumulation qui eux dépendent à leur tours aux paramètres de l'environnements selon LOPEZ et CARBALLEIRA, 1993 [187]. Ces mécanismes sont dépendant de l'état physiologique de l'organisme d'où l'effet positif sur la bioaccumulation de la lumière et des conditions estivales [68]. Il apparaît une grande différence de fluctuations biologiques pour une même plante aquatique par rapport aux différents métaux. Des études de SIEBERT et al., 1996 ont montrés que dans les même conditions expérimentale, le Plomb avait un coefficient de variation plus fort soit 71% que celui du zinc soit 13% [150]. Ces résultats semblent être liés à des variations dans les phénomènes d'absorption sur les parois cellulaires et / ou dans le cas d'eaux fortement oxygénées à une absorption supplémentaire de précipités d'oxyhydroxydes de manganèse et de fer sur les frondes, qui eux-même absorbent les éléments de traces métalliques. Ainsi, les phénomènes d'accumulations, la concentration du métal dans l'eau joue un rôle moindre par rapport à l'espèce utilisée [121].
- La variabilité inter espèces : L'accumulation des polluants diffère d'une espèce à une autre. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser une seule espèce pour une analyse de biosurveillance [151].

3.8.3 Influence de l'acidité des eaux sur l'accumulation des éléments traces métalliques

Le pH joue un rôle important dans la biodisponibilité des éléments de traces métalliques. Il détermine la solubilité des éléments et par conséquent leur accumulation dans les organismes. Il est aussi important de spécifier que l'accumulation réside en partie dans les échanges cationiques. Or, certains éléments de traces métalliques n'ont pas cette forme et

par conséquent ne sont pas, ou moins bien, ou mieux accumulées par les lentilles. A cet effet, on peut citer les métaux tel que le Chrome VI anionique, les formes organiques du mercures et de l'Arsenic. L'acidité des eaux influe de plusieurs manières sur le processus d'accumulation puisqu'elle induit une compétition entre protons et pool cationique accumulés par la plante.

CAINES *et al.*, 1986 ont montrés qu'une augmentation en ions hydrogène dans le milieu s'accompagnait d'une diminution de la concentration des métaux dans les plantes aquatiques. De façon similaire, d'autres ont trouvé que les *scapania undulata* accumulaient plus préférentiellement les Al, Ca et Mn en milieu neutre qu'en milieu acide [86] ; [152].

D'autres part, il a été mis en évidence le fait que l'accumulation augmentait avec des valeurs de pH croissant. D'autres études montrent que certaines espèces telles que les *Scapania nemorosa* L sont très dépendantes du pH (gamme optimale 4,5-6).

CLAVERI dans les Vosges en 1993 a montré que le Mn et Al étaient inhibés par l'augmentation des concentrations en protons. Par ailleurs, les cations métalliques peuvent former des complexes en présence des substances chélatrices tels que l'EDTA et réduire la biodisponibilité dans le milieu aquatique. A des pH acides, ces métaux sont dissous, ce qui les rend de nouveau disponibles pour les organismes, de ce fait le processus d'accumulation est augmenté [97].

CARBALLEIRA *et al.*, 2001 ont démontrés que le cadmium peut se libérer de leurs sites de fixation des parois cellulaires de la plante par un contrôle du pH. En effet, un faible pH peut entraîner une libération rapide de Cd des sites de fixations. Tandis qu'une acidité moyenne entraîne au niveau des compartiments extracellulaires une compétitivité des ions Cd^{2+} par des ions H^+ sur les sites d'échanges cationiques de la paroi cellulaire et sur les surfaces externes de la membrane cellulaire. Ces sites de fixations semblent être dépendants de la concentration et de l'affinité relative de chaque élément [60].

Par contre selon WELLS et BROWN, 1990 la libération des ions Cd^{2+} situés à l'intérieur de la cellule serait plutôt du à une altération des mécanismes de transports membranaire liées au pH. Il est cependant difficile de déterminer, parmi les paramètres cités ci-dessus, les quels ont plus d'impact sur le processus d'accumulation dans les milieux aquatiques acidifiés [128].

3.9 Indice d'évaluation de la qualité des effluents en relation avec les plantes Aquatiques

3.9.1 Généralités

Pour remédier à la pollution chimique et métallique dans des milieux aquatiques, il est indispensable de connaître les méthodes de détections, d'évaluation ou du suivit de celle-ci par les organismes aquatiques.

Il existe alors des méthodes tels les biomarqueurs utiliser pour donner l'alarme vis-à-vis d'un stress généralisé ou particulier et le suivi de l'indice écophysologique qui est une méthode simple basé sur l'observation visuelle du comportement de la plante face à un polluant et aussi du suivie de l'activité photosynthétique de la plante [38]. Ainsi, l'utilisation des lentilles dans la biosurveillance des eaux est un atout important dans la mesure ou cette plante vasculaire peut se répandre sur toute la surface des milieux aquatique à une vitesse exponentielle. A cet effet, elle garantit une meilleure homogénéité sur les surfaces polluées par cette expansion. Le fait que la lentille soit facile à conserver où à ramasser et à subir des traitements analytiques constituent un autre atout considérable dans la voie de cette biosurveillance [38].

SAWICKI et DENHOLM, 1984 ont montré que la majorités des organismes sont soumis de façon permanente à des stress qui peuvent être aussi bien de nature physique, chimique que biologique. Certains prennent leurs origines des sources « naturelles » telles que les toxines alimentaires, d'autres des activités humaine telle l'industrie, l'agriculture [192].

Le stress se définit à cet effet comme étant « *l'ensemble des réactions non spécifiques physiologique, métaboliques, comportementales à un agent physique ou chimique agressif provoquant une réaction chez un organisme* ». Pour assurer leur pérennité, l'espèce doit alors s'adapter à ces stress. La résistance à celui-ci devient automatiquement une conséquence héréditaire [38] ; [192].

Pour la majorité des plantes, le stress peut être provoqué par :

- un niveau de lumière trop élevé provoquant une photo inhibition,
- des élévations ou baisse de température brusque à des degrés considérables,
- un déficit hydrique (stress hydrique),
- stress oxydant
- des radiations en UVB,
- un manque ou excès en éléments nutritifs,

- une sénescence naturelle
- l'introduction des éléments non désirables dans le milieu aquatique tels que les métaux lourds.

Chez les plantes vasculaires, il est possible qu'à un certain seuil de stress, il ne soit pas détectable morphologiquement ou dans un autre cas, le stress peut engendrer des effets visibles, détectables. Dans le cas où le stress engendre des effets non détectables, il pourrait s'agir d'un stress lié à des réponses biochimiques telles que l'induction enzymatique du métabolisme de la plante ou à des réponses physiologiques telles que les altérations photosynthétiques, de la respiration, des transports d'ions ou des métabolites. Lorsque les effets d'un stress sont détectables, on parle de réponses précoces. Le changement de coloration, l'apparition de nécrose sont le résultat d'un ensemble de perturbations métaboliques de ce stress [49].

3.9.2 Le stress oxydant

Le stress dans le cas des plantes vasculaires est lié à l'activité photosynthétique. Il provient des espèces réactives de l'oxygène (ERO) c'est-à-dire des radicaux O_2^* , OH^* , ROO^* , RO^* et ses dérivés non radicalaires H_2O_2 , $HOCl$, O_2 singulet, O_3 . On les appelle des ERO qui sont constamment produites chez les organismes vivants telle que les radiations ionisantes. Les polluants peuvent également générer ces ERO et induire automatiquement le stress aux systèmes biologiques. Le stress résulte alors du déséquilibre lié aux dommages oxydatifs entre la production de ces ERO et leur élimination par les organismes [153].

Le plus souvent, les ERO peuvent provenir des molécules organiques (HAP) libérées par les huiles et carburant dans le milieu aquatique [153].

Les stress oxydants causés par les ERO peuvent être éliminés par les anti-oxydants qui ne sont autres que les enzymes impliquées dans le mécanisme de protection de la plante tels que la superoxyde dismutase, métalloprotéine, présente dans les chloroplastes et le cytoplasme de la cellule végétale [49].

Tous ces enzymes régulent le processus de défense contre des procédés oxydants incontrôlés, ce afin de réduire les effets toxiques.

La peroxydase et l'ascorbate peroxydase, par contre sont des enzymes qui métabolisent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

Le peroxydase peut catalyser une oxydo- réduction par la formation d'un complexe enzyme- H_2O_2 selon la réaction : $2OH^- \rightarrow H_2O_2 + 2e^-$ en $H_2O + O_2$ [154]. Autre enzyme telle que la glutathion réductase génère le glutathion réduit (GSH) de sa forme oxydée (GSSG). Ces activités enzymatiques servent de bio marqueur biochimique du stress oxydant et peuvent être mesurées par des méthodes spectrophotométriques UV [134].

Aussi, l'augmentation croissante des concentrations des métaux dans les végétaux induit automatiquement la production de polypeptides complexant les métaux et ceux-ci sont répertoriés comme étant des phytochélatines [129].

Plusieurs auteurs ont montrés l'existence d'une relation mettant en relief le lien entre le métabolisme du glutathion et la synthèse des phytochélatines figure n°12.3, ainsi que la dépendance temporaire du niveau d'exposition de la concentration en phytochélatines et l'intoxication à court terme par les métaux tels que le cuivre, cadmium et du zinc à travers la synthèse du Glutathion [129] ; [153].

Une baisse de *GSH* et du rapport *GSH/GSSG* peut renseigner un niveau du stress oxydant. L'une des fonction biologique du *GSH* est l'élimination de produits dérivés de l'oxygène qui sont hautement réactionnels et donc toxiques pour la cellule. Et l'anion superoxyde O_2^* est transformé en oxygène et peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase puis le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est éliminé par la catalase ou la glutathion peroxydase selon la réaction : $2 G-S-H + H-O-OH \rightarrow G-S-S-G + 2 H_2O$ [154].

Ces molécules peuvent être utilisées comme biomarqueurs du stress oxydant. Car « *il révèle un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental induit par l'exposition présent ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant* » [38].

Ces biomarqueurs sont révélateurs du dysfonctionnement de l'état physiologique ou même des lésions chez des espèces étudiées et renseignent sur l'état de santé d'un écosystème [134].

Il a été montré que les plantes sensibles en polluants métalliques synthétisent plus de phytochélatines que les plantes tolérantes, pour les mêmes expositions en cadmium dans le milieu [155].

Toutefois, il est démontré que ce sont les concentrations dans les plantes qui sont responsables de l'expression du biomarqueurs et non ceux se trouvant dans le milieu et que la synthèse du phytochélatines est fonction du métal [155].

La phytochélatines synthétase comme l'indique la figure n°14.3. ci-dessus, est un biomarqueur potentiel des ions métalliques dans la plante.

En somme, les dommages oxydatifs résultent d'un déséquilibre entre la production des ERO et leur élimination par la plante. Ainsi, les antioxydants sont synthétisés afin de pallier à ces dommages. Ces molécules sont utilisées comme biomarqueurs de stress oxydant et les antioxydants en sont les responsables de l'élimination des stress causés par les ERO [155]. On cite les quelques enzymes impliquées dans ces mécanismes de protection tel que : Les superoxyde dismutase, les métalloprotéine présente dans les chloroplastes et le cytoplasme Et la phytochélatines est un autre candidat en tant que biomarqueurs d'exposition aux métaux [155].

3.9.3 Suivi du Stress par la chlorophylle

Selon les travaux de CARBALLEIRA et *al.*, (1998) il a été montré qu'une exposition à des températures assez élevées (30°C pendant 2 jours) ou l'introduction à des doses élevées des polluants dans le milieu de croissance chez certaines plantes a un impact immédiat sur la photosynthèse et la respiration [60].

Grâce à la synthèse chlorophyllienne et la respiration, il est possible d'évaluer l'état physiologique d'une plante et réaliser une étude sur la biosurveillance. Actuellement, l'évaluation de la résistance de certaines plantes faces aux polluants métalliques est réalisable grâce au rapport de la chlorophylle « a » de formule générale $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ et son produit de dégradation (phéophytine) appelé « indice de stress » [60] ; [156] ; [193].

La chlorophylle "a" existe en deux variantes selon les protéines qui lui sont associées et peut absorber suivant les longueurs d'ondes de l'ordre de 665nm à 700nm [159] ; [193].

3.9.4 Synthèse de la proline

La proline est synthétisée à partir du glutamate. Cette synthèse de la proline est une voie qui, tout en n'étant pas la plus complexe, souligne le nombre important d'étapes que peut nécessiter la synthèse de certains acides aminés, à fortiori si ceux-ci sont cycliques : la première réaction est catalysée par la γ -glutamate kinase qui phosphoryle le glutamate en γ -glutamylphosphate, ce qui correspond à la première réaction de synthèse de la

glutamine ; la seconde réaction fait intervenir le NADH,H^+ et déphosphoryle le γ -glutamylphosphate en glutamate γ -semialdéhyde, qui est un intermédiaire ; la troisième réaction est spontanée, ne faisant intervenir aucune enzyme : c'est la cyclisation du glutamate γ -semialdéhyde en base de Schiff interne ; enfin, une réductase forme la proline qui, selon les organismes, utilise le NADH,H^+ ou le NADPH,H^+ [157], [159].

3.9.4.1 Mécanisme de formation de la proline et de la chlorophylle

La proline $\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2$ de formule ainsi que la Chlorophylles sont synthétisées à partir de l'acide glutamique par le biais de l'acide 5 carboxylique1 pyrroline (P5C) selon le mécanisme de la figure n° 15.3 :

A/ Cytoplasme

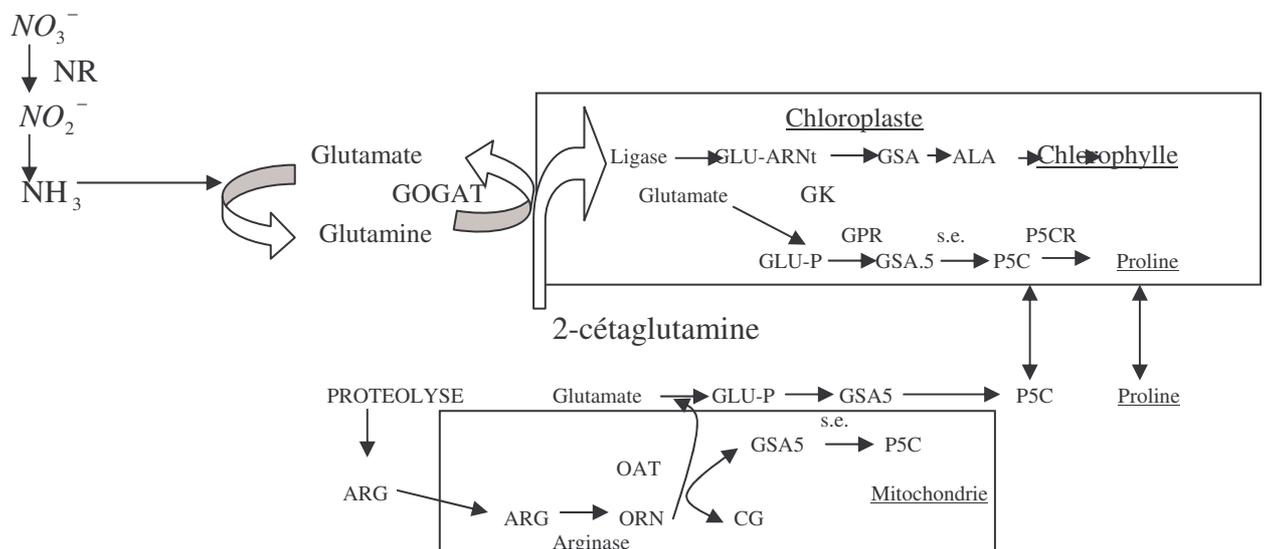


Figure n°13.3 : Interconnexion des voies de biosynthèse de la chlorophylle et de la proline. ALA : Alamine, ARG : Argénine, CG : cétaglutarate, GLU-P : Glutamyl phosphate, GLU-ARNt : Glutamyl-ARNt, GOGAT : Glutamate synthétase, GS : Glutamine synthétase, GSA1 : Glutamate 1-semialdéhyde, GSA5 : Glutamate 5-semialdéhyde, ORN : Ornithine, P5C : Pyrroline 5-carboxylase, GK : Glutamyle Kinase, GPR : Glutamyle phosphate réductase, OAT : Ornithine-aminotransferase, P5CR : pyrroline 5-Carboxylate réductase, NIR : Nitrite réductase, NR : Nitrate réductase, s.e. : sans enzyme.

La synthèse de la proline ainsi que la synthèse chlorophyllienne font intervenir le glutamate, selon un mécanisme qui se déroule aussi bien dans le chloroplaste que dans les mitochondries. En d'autres termes le glutamate est un précurseur de l'accumulation de la proline et de la pigmentation chlorophyllienne. Parfois un stress subi par la plante peut engendré une compétition de cet élément [158].

3.9.4.2 Suivi du stress par la proline

Un autre élément peut permettre le suivi de l'état éco-physiologique d'une espèce dans un milieu aquatique. Il s'agit d'un acide aminé spécifique ; la proline.

La proline comme la chlorophylle par certains tests peuvent révéler un état de stress d'une plante [157].

Selon les travaux de JONES *et al.* (1980), l'osmorégulation implique une augmentation des acides aminés de façon très significative [159].

Des conditions particulières voient donc apparaître des proportions assez importantes des aminoacides, indice de déviation du métabolisme azoté. Car il n'existe pas d'excrétion susceptible d'éliminer les produits en excès, s'accumulant dans les vacuoles [154]. En outre, certaines carences donnent naissance à des accumulations des aminoacides particuliers. C'est ainsi que la menthe poivrée accumule l'Asparagine par manque de K ou de Ca et l'Arginine par manque de S [154].

Selon les travaux de mlle CHAMPIGNY, la lumière génère des aminoacides (de 60 à 50000 lux par rapport à l'obscurité) telles que les α -alamines, de la sérine, de la glycine etc...

Le froid par exemple (travaux sur le Chou de mlle LE SAINT) entraîne une accumulation de proline qui est une réponse à la résistance à celui-ci. Parmi les acides aminés pouvant être accumulés, la proline est l'un des plus remarquables indicateurs des stress hydrique et osmotiques. En dehors de l'osmorégulation, d'autres facteurs tel la température, l'introduction d'un polluant dans un écosystème aquatique peut engendrer une modification de la proline contenue dans l'espèce végétale vivant dans ce milieu [154].

L'accumulation de la proline, induite par le stress, est due à trois facteurs complémentaires :

- Stimulation de sa synthèse.
- inhibition de son oxydation.
- et/ou altération de la biosynthèse des protéines.

3.9.5 Impact des Xénobiotiques sur les éléments essentiels de la cellule

Selon les études menées par BROWN, 1982, il a été prouvé que l'introduction des métaux traces dans les plantes aquatiques génère des pertes importantes en K (probablement à cause des propriétés de la membrane) et en Mg intercellulaire (probablement lié au remplacement des cations sur les sites de liaisons extracellulaires) [119] ; [198].

Le potassium comme le magnésium étant solubles dans la cellule, sont émis lorsque la perméabilité de la membrane plasmique est altérée. Et de cette façon, il se comporte comme révélateur du changement de perméabilité de la membrane [119]. Etant donné que l'accumulation d'un élément résulte de la diminution d'un autre élément du fait de la capacité si limitée qu'a la plante à absorber les sels minéraux, le magnésium est distribué de façon identique au niveau extra et ou intracellulaire et révèle les besoins de la cellule [119]. Le suivi de l'état physiologique résulte de la conséquence immédiate de cet exclusion du magnésium et du calcium par l'introduction d'un élément de traces métalliques (xénobiotique) dans le milieu intracellulaire [66].

3.9.5.1 Indice écophysologique

L'indice écophysologique révèle le contrôle des communautés et du facteur écologique par leur présence, l'absence, prolifération ou et de la disparition. On peut les étudier de façon multivariable. Il est possible de caractériser chaque espèce par un coefficient de toxiphobie en considérant sa projection sur un gradient de pollution Cette indice global de la qualité des eaux peut être défini comme étant une fonction de chaque espèce présente et son coefficient de toxiphobie [58].

$$Ib = \sum ni = \sum RR_{jk} * ij$$

Où RR_{ijk} représente le recouvrement relatif de l'espèce j dans la station k

ij est le coefficient de toxiphobie de l'espèce j,

Ib comme indice de la qualité des eaux basées sur les populations de la plante aquatique à étudier dans la station k.

Cet indice a été créé à partir des données obtenues sur la Sambre et de la Meuse.

3.9.5.2 Indice GIS

Il existe cependant d'autres indices telles que le GIS (Groupement d'Interet Scientifique) des eaux qui s'inspirent des différents indices antérieurs étrangers ainsi que des travaux de biotypologie des cours d'eaux. Cet indice prend en compte le fonctionnement d'un peuplement, la distribution et l'abondance des espèces et autres paramètres. Il s'intéresse à 245 taxons aquatiques et supra aquatiques et sa formule est [155] :

$$GIS = \frac{1}{n} \left(\sum_i CS_i \right) \quad \text{où } n : \text{ est le nombre d'espèces}$$

CS_i : correspond à la cote spécifique (de 0 = mauvais à 10 = bon)
i : l'indice de 1 à n

3.9.5.3 L'indice de stress

L'une des méthodes les plus rapides en ce qui concerne l'évaluation de l'indice de stress est celle de LOPEZ *et* CARBALLEIRA, 1989. Elle dérive de celle de PENUELAS, 1984 et concerne tous les végétaux. Elle est basée sur les réactions des pigments chlorophylliens provoquées par le stress. Les chercheurs utilisent le rapport chlorophylle a sur la phéophytine a. Il est à noter que la phéophytine est une molécule issue de la dégradation de la chlorophylle. Cette dégradation résulte de la perte de l'atome central de magnésium (Mg) support de la chlorophylle. Elle peut être provoqué *in vitro* par des acides de manière rapide. Cet indice s'évalue par le rapport DO_{665}/DO_{665a} , proportionnel au rapport chlorophylle a sur la phéophytine a, correspondant à l'indice physiologique [60]. Les mesures sont effectuées sur quelques extraits de matière végétale fraîche en acétone acidifiée. Une extraction des pigments est réalisée sur les frondes de lentilles dans l'acétone à 90%. Puis l'extrait est centrifugé et analysé avec un spectroscope UV-Visible à 665 nm. L'addition de l'acide chlorhydrique à 1 M à l'échantillon, donne immédiatement de la phéophytine. Le rapport Chla/Phéo permet d'obtenir pour la rose un spectre [60].

A partir d'une étude comparative sur le contenu en pigments et la réponse au stress de cinq espèces de bryophytes aquatiques, LOPEZ *et* CARBALLEIRA (1989) ont déterminé les classes limites de qualité écophysiological pour *Fontinalis antipyretica* (Tableau 5.3) [60].

Tableau n°5.3 : Classes de qualité écophysiological pour le rapport D665/D665a pour *Fontinalis Antipyretica* (López et Carballeira, 1989)

Stress	Stress intermédiaire	Stress faible	Stress nul
IS ≤ 1,55	1,55 ≤ IS ≤ 1,6	1,6 ≤ IS < 1,65	IS > 1,65

3.9.5.4 Indice de contamination

L'indice de contamination est le rapport entre la concentration en métal maximale et la concentration minimale selon MOUVET, 1984. Il permet de comparer sur un même site des niveaux de bioaccumulation

$$IC = \text{Concentration maxi} / \text{Concentration min}$$

CHAPITRE 4

CONCEPT DE LA MODELISATION DE LA BIOSORPTION

4.1 Généralités

Il est évident que l'approche de l'étude de la bioaccumulation éléments traces métalliques via l'eau se passe par des modèles mathématiques qui permettent une ébauche d'explication des phénomènes qui se déroulent entre le polluant et la biomasse. Mais leurs limitations et les conditions d'usage qui les accompagnent sont très peu connues.

Ce chapitre tentera d'expliquer les quelques modèles susceptibles d'être utilisées pour la recherche de l'optimisation de la biosorption de métaux lourds par la *Lemna gibba*.

L'analyse faite sur les réactifs biologique se base sur l'identification de l'entité (n'importe laquelle) à étudier de façon homogène en fonction de l'entité transportée à partir ou vers ce compartiment [160]. En d'autres termes, on fixe l'étude écotoxicologique sur les compartiments qui peuvent être d'une part l'environnement (site expérimental), ou un organisme (poissons, algues) ou une partie spécifique d'un organisme (les frondes des plantes vasculaire, ou des racines des mousses). Le contaminant à cet effet devient l'entité à transporter. Le choix du compartiment dépend exclusivement de l'échelle spatiale et/ou temporelle du problème étudié en dépit du système dans lequel il est décrit [160]. Pour décrire par exemple le transfert de contaminant à travers une chaîne trophique, le poisson pourra être écrite comme compartiment unique.

La formulation du modèle dépend d'une bonne connaissance de la cinétique de biosorption des polluants sur le compartiment à étudier. Il existe plusieurs méthodes de modélisation de la cinétique de biosorption [160] :

- Les modèles classiques tel que le modèle de Langmuir ou Freundlich
- *Modèle linéaire*
- Les modèles récents basés sur la planification des expériences.

4.2 Concept et formulation d'un modèle classique

Les modèles classiques font appel à une étude des polluants sur un compartiment à étudier dans un milieu spécifique. Ces modèles décrivent les flux des contaminants entre les compartiments. Un compartiment étant un milieu homogène dans lequel un composé transite à travers ses limites avec simplement un taux de pénétration (adsorption K_{ad}) et un taux d'élimination (K_e) [161] ; [162] ; [163]; [1].

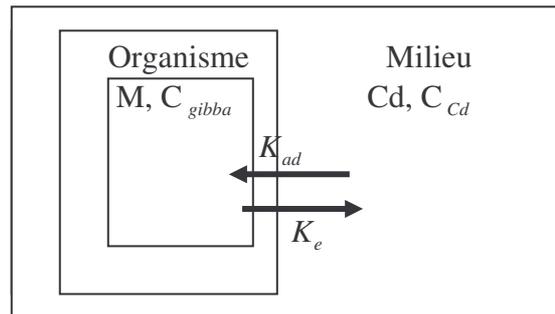


Figure n°14.4 : Schéma conceptuel type d'un modèle de bioaccumulation d'un organisme.

4.2.1 Modèle de LANGMUIR

Les isothermes d'équilibre d'adsorption sont généralement utilisées pour évaluer l'affinité d'un solide vis-à-vis des espèces organiques, inorganiques et minérale, dans une solution aqueuse. Après études d'isothermes, on peut être emmené à choisir le type de modèle : Un exemple, la *gibba* est représenté ici par un compartiment unique ou l'accumulation suit une cinétique d'équilibre de premier ordre. On va utiliser le modèle de Langmuir exprimé par l'équation :

$$q_e = \frac{x}{M} = \frac{Q_o \cdot b \cdot C_e}{1 + b \cdot C_e} \quad \text{Avec :}$$

q_e : Quantité adsorbée par unité de masse d'adsorbant ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

M : Quantité de la substance adsorbante (g)

C_e : Concentration de la substance dissoute dans la solution ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

X : Quantité de la substance adsorbée ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$).

b : Constante relative à l'énergie d'adsorption et est définie comme suite :

$$b = b_o \cdot \exp(-\Delta H / RT) \quad \text{avec :}$$

b_o : Constante relative à l'énergie.

ΔH : Energie d'adsorption

R : Constante de gaz parfait (kcal.mol⁻¹).

T : Température (K).

La forme linéaire de l'équation de *LANGMUIR* s'écrit :

$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_{\max}} \cdot \frac{1}{b \cdot C_{eq}} + \frac{1}{q_{\max}}$ Le modèle cinétique qui atteste l'équation de Langmuir peut être

résolu suivant une régression non linéaire par un logiciel (Matlab 6.0 ou Mathématica v.3.0) afin de déterminer les constantes du taux de réactions Kad (h⁻¹) et Ke (m_{eq}.h.kg⁻¹).

4.2.1.1 Etat d'équilibre

Lorsque à l'exposition, les facteurs environnementaux et physiologiques affectant la capture et la perte de contaminants et les maintiennent constants pour un temps suffisamment long, les organismes peuvent atteindre un état d'équilibre. Ces conditions d'état d'équilibre reflètent les limites du modèle cinétique quand l'accumulation est exactement balancée par les pertes. L'approche traditionnelle de concentration (modèle de partition d'équilibre) évalue la concentration en éléments traces

Selon REINFELDER *et al.*, 1998, sous ces conditions simplifiées, l'état d'équilibre de la plante peut être décrit par un facteur de bioconcentration pour des expositions aqueuses [164]:

$$FBC = \frac{C_{Gibba}}{C_{eau}}$$

Avec FBC : facteur de bioconcentration (ml.g⁻¹) ;

C_{Gibba} : concentration en contaminant dans l'organisme (µg.g⁻¹) ;

C_{eau} : concentration en contaminant dans l'eau environnante (µg.mL⁻¹).

Il est important de noter que la biosorption est un processus rapide avec l'équilibre atteint pour un temps très bref parfois quelques minutes [165]:

4.2.2 Modèle de FREUNDLICH

D'autre part après étude d'isotherme, on peut amener à choisir le modèle de Freundlich

dont l'équation qui exprime ce modèle s'écrit : $q_e = \frac{X}{m} = K \cdot C_e^n$

X : Quantité de la substance adsorbée (mg.g⁻¹).

m : Quantité de la substance adsorbante (g).

C_e : Concentration de la substance dissoute dans la solution (mg.L^{-1}).

K et n : Constante d'adsorption (avec $n > 1$ et compris entre 2 et 10)

q_e : Quantité adsorbée par unité de masse d'adsorbant (mg.g^{-1}).

La forme linéaire de cette équation s'écrit :
$$\text{Ln}q_e = \frac{\text{Ln}x}{m} = \text{Ln}K + \frac{1}{n}\text{Ln}C_e \quad (2)$$

Selon le modèle de FREUNDLICH, l'explication physique de K désigne la capacité relative d'adsorption et n l'intensité de la réaction [166]. Il est à signaler que la quantité adsorbée par une masse d'adsorbant donnée est fonction de la concentration de la solution à l'équilibre [167].

Ce modèle constitue une distribution exponentielle des sites d'énergies caractéristiques des surfaces hétérogènes avec adsorption sur monocouche immobile.

4.2.3 Modèle linéaire

Le modèle le plus simple à utiliser est le modèle linéaire caractérisé par l'équation :

$q_e = K_d.C_e$. Avec K_d étant le coefficient de partage (g.L^{-1}).

On évalue la bioaccumulation des contaminants, à partir des modèles cinétiques tenant compte de la physiologie de l'organisme à étudier. Elle est fonction des flux entrant et sortants contenant dans la phase dissoute [168], [169], [170]. A cet effet la cinétique de bioaccumulation nécessite des connaissances sur l'efficacité des captures à partir de l'eau (efficacité d'absorption et de désorption). Ces modèles sont très flexibles et applicables aux environnements variés. Ils peuvent être utilisés pour interpréter les données de surveillance et prédire les niveaux de contamination des individus [171], [169]. Ce sont les vitesses de ces mécanismes physiologique de contamination et décontamination qui déterminent la dynamique de la bioaccumulation dans le cas de la *gibba* ou des *algues* [172].

4.3 Planification des expériences

4.3.1 Généralités

Le terme plan d'expériences vient de l'anglais « Design Of Experiments » ou encore la « DOE » qui se traduit par « conception des expériences ». La méthode des plans d'expériences englobe aussi bien la séquence d'essais à réaliser que l'analyse algébrique et statistique des résultats. L'efficacité d'un plan d'expériences en termes d'informations

acquises et de la fiabilité de ces informations, est supérieure à toute autre séquence d'essais non structurée de même volume [173].

Les plans d'expériences ne sont pas une découverte récente, la chronologie ci après nous la montre bien en rappelant quelques travaux effectués dans le domaine :

-En 1925 ; travaux de FISHER en appliquant les DOE en agronomie.

-Travaux de *Taguchi* dans les années 60.

-Dans les années 70, sont introduites les DOE dans le secteur industriel.

-Vers les années 80 avec la révolution de l'informatique, ont été développés des logiciels commerciaux spécialisés de DOE en gestion de la qualité, et introduit les méthodes de TAGUCHI [173].

L'optimisation d'une réponse commence par le choix de la méthode expérimentale, c'est-à-dire la planification. La méthodologie expérimentale et l'optimisation constituent un même ensemble, mais avant d'optimiser une fonction de réponse, il faut commencer par le choix de la méthodologie expérimentale. Il faut donc planifier l'expérimentation [174] [181].

Les méthodes classiques ne prennent pas en compte les interactions entre facteurs, lesquelles sont omniprésentes.

Les essais, selon ces méthodes, ne permettent pas également de considérer la variabilité des grandeurs observées, induite par une multitude de sources de fluctuations. Celle-ci disperse les résultats d'essais et les rend incertains, voir faux [175].

Tandis que l'expérimentation factorielle permet, en faisant varier ensemble et de façon raisonnée toutes les variables étudiées d'obtenir le minimum d'essais [174].

Un DOE adapté est celui qui fournit l'information désirée avec l'effort expérimental minimal.

Un plan d'expériences est avant tout une stratégie optimale pour ;

- Un nombre minimal d'essais
- La prédiction avec un maximum de précision
- La modélisation.

4.3.2 Méthodologie de la planification d'expériences :

Les plans d'expériences constituent « un essai technologique d'utilisation maximale des données ». Cette méthode permet de tirer d'un nombre d'essais donné un maximum

d'informations crédibles concernant l'influence des facteurs. Elle permet de maximiser le rapport « informations recueillies / nombre d'essais réalisés ».

Cette méthode offre la possibilité de quantifier et de hiérarchiser les effets d'un grand nombre de facteurs du système étudié et cela avec un nombre d'essai relativement faible, c'est-à-dire dans un minimum de temps et de coûts [175].

Elle permet également d'obtenir la meilleure précision possible sur la modélisation des résultats. Cette méthode des plans d'expériences est basée sur des règles mathématiques strictes et elle exige une démarche rigoureuse de la part de l'expérimentateur. Cette science de l'organisation des essais et de la modélisation des résultats expérimentaux nécessite une méthodologie adaptée, précise et une mise en œuvre rigoureuse [176].

4.3.3 Terminologie :

4.3.3 1-Facteur

On entend par facteurs, toutes les variables que l'on veut étudier. Généralement les facteurs varient entre deux bornes; la borne inférieure et la borne supérieure. On dit que les facteurs varient entre le niveau bas (borne inférieure que l'on note le plus souvent par -1) et le niveau haut (borne supérieure que l'on note le plus souvent par +1).

L'ensemble de toutes les valeurs que peut prendre le facteur entre le niveau bas et le niveau haut, s'appelle le domaine de variation du facteur [177].

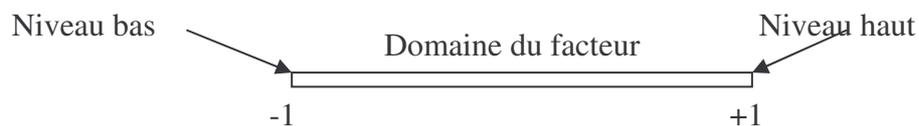


Figure n°15.4 : Le domaine de variation du facteur est constitué de toutes les valeurs comprises entre -1 et $+1$ (Goupy, 1999).

La réunion des domaines de variation de chaque facteur est défini dans le domaine d'étude, décrit par la figure 19.4.

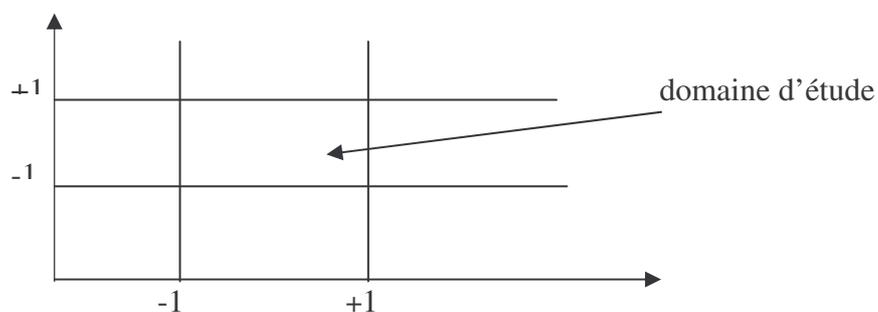


Figure n°15.4 : Les domaines de tous les facteurs formant le domaine d'étude (Goupy, 1999).

Il existe deux types de facteurs : contrôlé ou non contrôlé, qualitatif ou quantitatif.

-Un facteur contrôlé : C'est un facteur que l'on peut maîtriser, gérer, modifier.

-Un facteur non contrôlé : Il sera soit un facteur considéré comme non retenu pour l'étude car non influant et laissé à sa valeur habituelle, soit un facteur inconnu que l'on subit au cours de l'expérimentation.

Un facteur quantitatif : Il se traduit par une grandeur numérique mesurable, qui peut être une vitesse, une température, une intensité, etc.

Un facteur qualitatif : Il ne peut pas donner lieu à une quantification directe ; on peut seulement identifier ses différents niveaux qui peut être une marque, un procédé, une méthode, un fournisseur [178].

L'effet d'un facteur est le changement de réponse provoqué par un changement de niveau dans l'un des facteurs.

L'interaction entre facteurs caractérise le couplage des effets de plusieurs facteurs sur la réponse [175].

4.3.3.2 Réponse

On entend par réponse toute grandeur mesurée après chaque expérience. Cette grandeur intéresse l'expérimentateur et est mesurée à chaque expérience [179]. Ces réponses peuvent être :

-Réponses quantitatives continues, comme un rendement, une viscosité, poids, caractéristiques mécaniques, ...etc.

-Réponses qualitatives relative à la qualité d'une expérience (bonne ou mauvaises).

Le choix des réponses est un problème indépendant de la théorie des plans d'expériences.

4.3.3.3 Surface de réponses

En l'absence de toute information sur la fonction, qui lie la réponse aux facteurs, on peut se donner à priori, une loi d'évolution. Il s'agit d'un modèle postulé.

4.4 Notion de modélisation des réponses

4.4.1 Lois de comportement

Dans la théorie des plans d'expériences, on suppose toujours que la réponse est liée aux facteurs expérimentaux contrôlables par une fonction plus ou moins complexe. La forme la plus générale de ce modèle mathématique est [179] :

$$Y = f(A, B, C, \dots, Z, W).$$

Ou :

-Y désigne la réponse à expliquer ou la grandeur d'intérêt.

-A, B, C, ...Z sont les facteurs explicatifs de nature quantitative ou qualitative.

-W représente les variables aléatoires à effets faibles et homogènes engendrant une variabilité naturelle de la réponse, qu'on appelle généralement « bruit de fond ».

On peut décrire un modèle par le schéma représenté dans la figure n°20.4

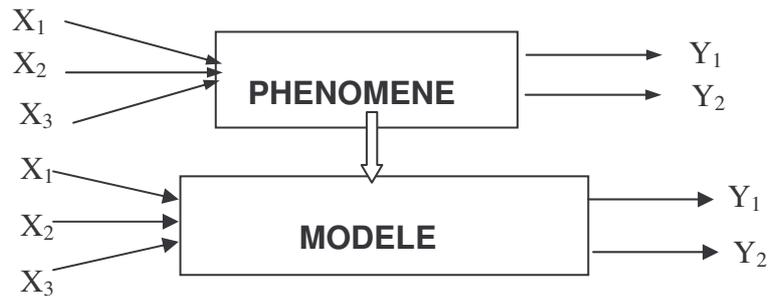


Figure n° 17.4 : Modèle mathématique (Kanek et al., 2001)

Une symbolisation de modèle, en vue de préciser les facteurs et les interactions étudiées, est nécessaire.

Par convention, nous symboliserons :

Le terme constant par la lettre I.

Les facteurs par leurs lettres génériques A, B, C, ...

Les interactions entre deux facteurs tels que A et B par AB.

Les interactions entre trois facteurs tels que A, B, C par ABC [179].

EXEMPLES :

Cas de trois facteurs : A, B, C ;

-Sans interaction : $Y = I + A + B + C$

-Avec interaction : $Y = I + A + B + C + AB + AC + BC + ABC$

4.5 Différents types de plans d'expérience

4.5.1 Plan factoriel

Un plan d'expérience factoriel est un plan où les niveaux de tous les facteurs, qualitatifs ou quantitatifs sont codés. C'est un plan qui contient toutes les combinaisons possibles des

niveaux des facteurs, chaque combinaison étant répétée le même nombre de fois [176] [177].

4.5.2 Plan factoriel orthogonal

Un plan d'expérience P est orthogonal et équilibré vis-à-vis d'un modèle M donné ; si est seulement si : Pour chaque couple d'action disjointes de niveau possible du modèle M est présente un même nombre de fois dans le plan d'expériences P. On dira alors que P est orthogonal et équilibré vis-à-vis du modèle M, et on écrira symboliquement $P \perp M$. [176] ; [177].

4.5.3 Plan non conventionnel

On entend par plan non conventionnel tout plan qui s'écarte des plans classiques pour une raison ou une autre. Il se peut qu'au cours de l'expérimentation, les niveaux prévus n'aient pas été respectés et que les points d'expériences soient décalés par rapport aux sommets. Le plan non conventionnel peut aussi être réalisé lorsque le nombre de points expérimentaux lié aux nombres d'essais est limité. Car les plans classiques nécessitent un certain nombre d'essais à réalisés. Lorsqu'une expérimentation conduite sans précaution et pour laquelle les points d'expérience seraient situés n'importe où dans le domaine expérimental on parle alors de plan non conventionnel [177].

4.5.4 Plan de Doelhart

Ces plans ont été imaginés pour interpréter les réponses obtenues avec un modèle du second degré tout en effectuant un minimum d'essais. Ces plans se prête bien à l'étude séquentielle des facteurs [177].

Il existe autres plans d'expériences tels que le plan : **Box-Behnken** ; **Roquemore** ; **D-optimaux** ; **le plan de Mélange**.

La construction du plan d'expériences nécessite la connaissance :

1. du type de modèle-plan correspondant à la stratégie adoptée,
2. du modèle symbolique [175].

4.6. Postulation d'un modèle

4.6.1. Postulation d'un modèle linéaire sans interactions

Le modèle linéaire sans interaction est donné par l'expression suivante [176]:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3$$

4.6.2 Postulation d'un modèle linéaire avec toutes les interactions

Afin de quantifier les impacts de tous les facteurs par leurs effets linéaires et leurs interactions, on passe au modèle qui prend en considération toutes leurs interactions.

$$Y = b_0 + b_A X_A + b_B X_B + b_C X_C + b_{AB} X_A X_B + b_{AC} X_A X_C + b_{BC} X_B X_C + b_{ABC} X_A X_B X_C$$

Le calcul des coefficients à partir de la matrice d'expérience se fait de la manière suivante [176].

4.6.3 Tests de validité du modèle

4.6.3.1. Analyse de la Variance (ANAVAR)

L'analyse de la variance est une technique statistique qui a pour but d'interpréter les coefficients relatifs à chaque action du modèle.

Elle a pour principe de comparer pour chaque action du modèle :

- Une estimation de la variance de la réponse Y, associé à l'action correspondante et ce à partir des effets de cette dernière.
- Une estimation de la variance de la variabilité naturelle de la réponse Y, soit à partir des résidus, soit à partir des répétitions. Ainsi on fait appelle au test de Fisher qui consiste à comparer pour un niveau de confiance donnée généralement 95% ou 99% [176] ; [178] ; [180].

4.6.3.2. Analyse des résidus

L'analyse de la variance s'appuie sur l'hypothèse de la normalité de la loi de la variabilité naturelle de la réponse. Lorsque le plan est répété uniformément, une hétérogénéité de la variance se traduit par plusieurs combinaisons présentant une dispersion plus importante généralement que les autres [176].

Pour examiner l'homogénéité de la variance, la normalité des résidus et détecter d'éventuels résultats aberrants, plusieurs graphes sont utilisés :

- Le graphe représentant la réponse observée en fonction de la réponse estimée :

Dans certaines parties du graphe, les écarts par rapport à la première bissectrice peuvent être plus importants. Cela traduit soit des résultats aberrants, soit un défaut d'adéquation du modèle.

- Le graphe représentant les résidus en fonction de la réponse estimée :

On peut repérer sur ce graphe, soit des résultats suspects, associés à des résidus anormaux, soit une variance non homogène fonction du niveau de la réponse.

Ce genre de situation peut être imputé soit à l'influence d'un facteur perturbateur bruit ou bloc ou incident lors des essais, soit à la nature même de la réponse quand celle-ci ne suit pas une loi normale de variance homogène[176].

4.6.3.3 Validation du modèle

Il s'agit de vérifier si le modèle estimé explique correctement la variation de la réponse observée. Le modèle sera considéré comme adéquat si pour une combinaison donnée, l'écart entre la réponse moyenne observée et la réponse moyenne prédite est acceptable.

L'adéquation du modèle discret portera sur les combinaisons du plan réalisé et celle du plan complet non présentes dans le plan réalisé.

En outre, lorsque la somme des carrés des écarts d'ajustement est comparée aux carrés moyens et que le résultat de la somme des deux est égal à la dispersion totale, on peut dire que le modèle est prédictible. Les ordinateurs et les logiciels sont programmés pour réaliser tous ces calculs et l'expérimentateur à la seule responsabilité d'interpréter les résultats du calcul [176].

4.6.3.4 Modèle du second degré

Le modèle du second degré est la relation mathématique utilisée pour analyser et interpréter les résultats des plans utilisés. Il permet de mettre en évidence les courbures des surfaces de réponse dues à la non linéarité des influences des facteurs. Ainsi, ces modèles sont constitués d'une part linéaire comprenant les effets linéaires des facteurs et leurs interprétations, et d'une part quadratique traduisant l'effet non linéaire [177].

4.6.3.5 Expression du modèle

Le modèle du second degré pour deux facteurs avec interaction s'écrit :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2 \quad \text{Avec :}$$

Part linéaire avec interactions Part quadratique

a_0 : Coefficient constant

x_1, x_2 : termes du premier degré

x_1x_2 : termes rectangles

x_1^2, x_2^2 : termes carrés

CHAPITRE 5

MATERIELS ET METHODES

5.1 Matériel et méthodes

5.1.1 L'échantillonnage de la plante

L'échantillonnage s'est fait pendant la période de printemps ou trois sites ont servi à la sélection des espèces utilisées :

- Le site de BEN AZOUZ situé à l'Est de l'Algérie plus précisément dans la région d'EL KALA et le site de BENI TAMOU situé dans la région de Blida pour l'échantillonnage de la *Lemna gibba*.
- Le site du jardin d'EL HAMMA (situé à Alger) pour l'échantillonnage de la *Lemna minor*.

La transplantation, des échantillons prélevés de leur milieu naturel au laboratoire, a été réalisée à des températures ambiantes (25°C).

La culture stock est gardée dans un milieu artificiel dont la composition est proche à celui du milieu naturel.



Figure n°18.5 : Site de Ben-Azouz
(EL KALA, Annaba)



Figure n°19.5 : Site du Jardin d'essai
d'EL Hamma (Alger)



Figure n°20.5 : Site de Beni Tamou (Blida)

5.1.2 Préparation du milieu de culture

Les réactifs que nous citerons pour la préparation des milieux de culture sont tous de pureté analytique reconnues et proviennent des firmes consignées dans le tableau en appendice B. L'eau de dilution utilisée pour préparer ces derniers est une eau distillée de très bonne qualité (conductivité $< 13 \mu\text{S}/\text{Cm}$ et de $\text{pH} = 5,5$).

Des solutions stocks sont préalablement préparées dans des flacons opaques de deux litres de capacité. Ces solutions stocks sont conservées à 4°C à l'obscurité à l'exception de celle contenant le sulfate de fer (FeSO_4) qui est préparée au moment du lancement de la culture de la plante.

Le milieu HAOGLAND [182] est le milieu de culture utilisé dont la composition et les proportions sont préparées à partir de :

a. Solution de base

- Solution (S1): 11,8g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- Solution (S2) : 10,11g de KNO_3 dans 1000 ml d'eau distillée.
- Solution (S3) : 12,33g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- Solution (S4) : 6,8g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée.

b. Solution d'oligo-éléments

- Solution I :

- 2,86 g de H_3BO_4 dans 1000 ml d'eau distillée.
- 1,55 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.

- 0,22 g de $Zn SO_4 \cdot 7H_2O$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- 0,079 g de $Cu SO_4 \cdot 7H_2O$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- Solution II :
- 0,128 g de $(NH_4)_6Mo_7 \cdot 24H_2O$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- 0,229 g de NH_4VO_3 dans 1000 ml d'eau distillée.
- 0,049g de $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- 0,0478 g de $NiSO_4 \cdot 7H_2O$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- 0,017 g de $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ dans 1000 ml d'eau distillée.

La préparation se fait en mélangeant 100ml de S1, 5 ml de S2, 4 ml de S3, avec 1 ml des solutions I, II et S4. Le volume obtenu est complété à 1 litre avec l'eau distillée.

On ajuste le pH de la solution ainsi préparée à une valeur de $6 \pm 0,1$ (à l'aide des solutions d'acide chlorhydrique HCl à 1N ou de la soude NaOH à 1 N). Le milieu ainsi préparé est considéré comme étant le milieu *Haogland* standard (H).

5.1.3 Méthodologie de culture de *Lemna*

5.1.3.1 Stérilisation du matériel de culture

A/ Verrerie :

Toute la verrerie en pyrex® (Cristallisoirs, Erlen, Béchers, Fioles etc....) utilisée pour les expérimentations est lavée à l'eau du robinet, rincée à plusieurs reprises avec l'eau distillée, ensuite plongée dans l'eau acidulée (pH= 2,03) pendant 24 heures.

Après 24 heures de trempage elle est rincée avec l'eau distillée.

Une fois lavée et rincée, cette verrerie est introduite dans l'étuve pendant 20 minutes à 120°C (stérilisation par voie sèche).

Après refroidissement et couverture avec du papier aluminium cette verrerie est placée dans la hotte sous radiation UV.

Les accessoires tels que les embouts, les spatules subissent une stérilisation par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes (stérilisation par voie humide).

5.1.3.2 Protocole de stérilisation du milieu de culture et de la plante

Les milieux de cultures ainsi que l'eau distillée ayant servi à la culture des plantes sont introduites dans des flacons hermétiquement fermés puis autoclavés à 120°C pendant 20 minutes (stérilisation par voie humide).

5.1.3.3 La plante

Le protocole de stérilisation de la plante comporte les étapes suivantes :

- Trempage dans l'eau distillée stérile pendant 20 à 30 minutes.
- Trempage rapide (environ 10 secondes) dans l'éthanol dilué (3 à 5 gouttes d'éthanol dans 100ml d'eau distillée stérilisée)
- Trempage dans l'hypochlorite de sodium dilué (0,5 ml dans 100 ml) pendant 2 à 4 minutes.
- Rinçage avec de l'eau distillée stérilisée.
- Incubation dans les milieux de culture préalablement stérilisée selon le protocole décrit dans le paragraphe n° **5.1.3.2**.

Ce cycle de désinfection permet d'éviter d'éventuels apparitions des micro-organismes en particulier des algues pouvant vivre en symbiose avec la plante.

5.1.3.4 La salle de culture :

La culture est réalisée dans une chambre thermostatée (à 22 ± 5 °C) ou une photopériode de 16 heures d'éclairage et 8 heures d'obscurité est imposée.

5.1.4 Procédure de culture

Un bac de dix litres de capacité a servi aux cultures stocks pour chaque espèce. Les cultures filles prélevées du bac pour l'initiation de la culture sont transplantées au laboratoire dans des récipients en pyrex (Cristallisoirs et des Erlen-mayer), pour la réalisation du test d'optimisation de la croissance de la plante ainsi que pour les tests de toxicité. Chaque récipient est couvert d'un film plastique adhérent, transparent. Ce film protecteur légèrement troué est utilisé afin d'empêcher certains dépôt solides dans les solutions de cultures.

Le test pour la croissance des deux espèces (*Lemna minor* et *Lemna gibba*) a été réalisé dans un premier temps dans des cristallisoirs de 500ml de capacité. Dix colonies ont été

sélectionnées pour le lancement de la culture dans 200 ml de la solution du milieu de culture.

Une même densité de plantes a été utilisée dans un second temps pour le test de la croissance de la plante dans des Erlen de 250 ml de capacité ou dix colonies de deux feuilles ont servi pour initier la culture dans 200 ml du milieu de culture.

Un choix porté sur les Erlen-meyers s'est imposé pour la réalisation des tests de toxicités tout le long de notre travail.

5.1.4.1 la durée de culture

Nos tests (effet de la dilution du milieu de culture, effet de la lumière sur la croissance de la plante et les tests de toxicité) ont été réalisés durant une période de dix jours.

5.2. Optimisation de la croissance de la *Lemna minor* et la *Lemna gibba*

5.2.1 Méthode de suivi de la croissance

Le suivi du développement des feuilles (colonies) est effectué tous les deux jours. En effet, nous démarrons nos cultures avec un nombre de feuilles initiale égale à 20 ce qui correspond à dix colonies. Les tests ont lieu dans des cristallisoirs et des Erlen-meyers contenant respectivement 500 ml et 200 ml de milieu de culture H, H/10, H/100 respectivement.

Il est à signaler que chaque étude de la croissance a fait l'objet de trois répétitions.

5.2.2 Effet de la dilution du milieu sur la croissance.

5.2.2.1 Objectif

Il a été envisagé de tester l'effet de la dilution du milieu H préparé à partir du milieu de *Haogland* afin de déterminer le milieu le plus favorable à la croissance des espèces étudiées.

5.2.2.2 Méthodologie

A partir du milieu de culture H deux milieux sont préparés :

Milieu dilué dix fois (H/10) :

Milieu dilué cent fois (H/100) :

Une fois préparés, et après ajustement du pH à 6, ces milieux sont stérilisés par voie humide par autoclaves à 120°C pendant 20 minutes.

Les manipulations de culture des plantes sont effectuées en salle blanche sous une hotte à flux laminaire horizontal. Ces moyens mis en œuvre permettent d'éviter la contamination des cultures par des micro-organismes.

5.2.2.3 Effet de la lumière

Vu l'importance de la lumière sur la croissance des plantes d'une manière générale et particulièrement des plantes aquatiques, l'effet de la luminosité a été étudié. En effet, des cultures lancées dans les mêmes conditions décrites par le paragraphe **5.4.3** ont été exposées à différents éclairages à savoir :

- Un premier lot composé de neuf Erlen-meyers contenant chacun 200 ml de milieu de culture et 15 colonies à 0 lux.
- Un deuxième lot composé de neuf Erlen-meyers contenant chacun 200 ml de milieu de culture et 15 colonies sous un éclairage de 2666 lux.
- Un troisième lot composé de neuf Erlen-meyers contenant chacun 200 ml de milieu de culture et 15 colonies sous un éclairage de 4000 lux.

De même le nombre de colonie a été déterminé chaque deux jours.

5.2.2.4 Evaluation du taux de croissance des *Lemna*

L'évaluation du taux de croissance de la *Lemna gibba* en présence du cadmium, cuivre et zinc à différentes concentrations a été calculée selon la formule suivante :

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

Où

N_t : Le nombre de colonie moyen à l'instant t

N_0 : Le nombre de colonie moyen à l'instant t = 0 jour

5.3 Tests de toxicité ou bioessais

5.3.1 Objectif :

La contamination par différentes concentrations en métaux lourds (Cd, Cu et Zn) des milieux de cultures contenant la *Lemna gibba* a pour objectif d'étudier, dans des

conditions contrôlées, l'effet de ces métaux sur la croissance, le processus de biosorption et le comportement de cette plante aquatique vis-à-vis de ces métaux toxiques.

Deux gammes de concentrations ont été testées :

- des concentrations élevées rarement retrouvées dans le milieu naturel.
- des concentrations faibles.

La gamme de concentration testée est regroupée dans le tableau n°6.5.

Tableau n°6.5 : Les concentrations choisies pour les bio-essais (mg.L^{-1})

Nombre d'essais	Cd^{+2}	Cu^{+2}	Zn^{+2}
N°1	0,5	$1,4 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-1}$
N° 2	1	10^{-1}	12,8

L'impact de l'exposition de ces métaux sur la physiologie de la *Lemna gibba* a été évalué à partir de :

- 1 - L'indice éco physiologique.
- 2- D'un biomarqueur : un acide aminé (Proline).

5.3.2 Mesure de l'indice écophysique ou de stress

5.3.2.1 Principe

L'indice de stress correspond au rapport de la chlorophylle a à son produit de dégradation la phéophytine a totale.

Le protocole utilisé est inspiré des travaux de LOPEZ *et al.*, [187]:

Pour chaque mesure, une biomasse fraîche (≈ 230 mg en poids frais) est prélevée tous les deux jours sur chaque échantillon. Cette biomasse est broyée à l'aide d'un mortier en céramique dans 5 ml d'acétone à 90% (pour Analyses, Panreac QUIMICA SA), puis placée dans des tubes Greiner® de capacité de 50 mL contenant 15 ml d'acétone recouvert de papier d'aluminium, pendant 24 heures à l'obscurité à 5 °C.

L'extrait obtenu est centrifugé à 3000 tours par minutes pendant 10 minutes à 20 °C (centrifugeuse Eppendorf®).

Les absorbances à 665 et 750 nm ont été déterminées par un spectrophotomètre (MINI – UV spectrometer SHIMADZU). Le réglage du spectrophotomètre est assuré par une solution d'acétone 90% (Blanc) LOPEZ et *al.*, [187].

La conversion de la chlorophylle en phéophytine a est réalisée par l'ajout de 10 µl d'acide chlorhydrique concentré à 3 ml d'extrait. Après deux minutes une mesure de l'absorbance à 665 et 750 nm est à nouveau réalisée.

Le rapport étudié DO665/DO665a, qui est la densité optique de l'extrait à 665 nm acidifier et non acidifier est corrigé par une lecture à 750 nm LOPEZ et *al.*, [187].

Ainsi le rapport étudié est le suivant :

$$IS = (DO665-DO750) / (665a-750a)$$

5.3.3 Dosage de la proline

5.3.3.1 Principe

Le principe de dosage de la proline consiste à son extraction de la matière végétale par l'alcool méthylique à 80%. La proline et l'hydroxyproline réagissent en milieu acide et à chaud avec la Nihydrine pour donner un composé rose soluble dans les solvants organiques à noyau, tel que le toluène ou le benzène sensible à une longueur d'onde de 528nm [183]:

5.3.3.2 Extraction au méthanol

Une prise d'essai de la matière végétale fraîche prélevé est mélangée et agitée énergiquement dans de méthanol à une température de 80°C pendant une heure.

De l'acide acétique et de la Nihydrine sont ajoutés à l'extrait obtenu. Après homogénéisation, ces extraits sont placés dans l'eau bouillante (100°C) pendant 30 minutes entraînant l'apparition d'une coloration rose.

Après refroidissement, 5 ml de toluène sont ajoutés, deux phases bien distinguées apparaissent. La phase supérieure contenant la proline est récupérée et une lecture de l'absorbance à 528 nm est effectuée.

5.4. Analyse physico-chimiques

5.4.1 Dosage du phosphore (ISO 5667-3)

5.4.1.1 Principe de la méthode

Le principe est basé sur la réaction des phosphates (PO_4^{3-}) avec le molybdate d'ammonium en présence d'un catalyseur (le tartrate d'antimoine de potassium) en milieu acide. Le complexe phospho-molybdique développe une coloration bleue en présence d'acide Ascorbique mesurable à 880 nm.

5.4.2 La conductivité

La conductivité des milieux de cultures à différents instants est mesurée par un conductimètre type (Conductivity-meter 4520 JENWAY)

5.4.3 Le pH

Le pH des milieux de culture à différents instants est mesuré par un pH-mètre de type (HANNA Instruments)

5.4.4 Dureté

Les alcalino-terreux présents dans l'eau forment un complexe avec le sel disodique de l'Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique (E.D.T.A). La disparition des dernières traces d'éléments à doser est décelée par le virage d'un indicateur spécifique de la dureté totale, le murexide qui se combine avec le calcium. La méthode complexométrique utilisé est inspirée de RODIER, 1984 (Appendice E).

5.5. L'analyse des métaux lourds

L'analyse des métaux lourds testés (Cd, Cu et Zn) ont été effectuées par un spectrophotomètre d'absorption atomique équipée d'un système de correction automatique. L'étape de traitement de l'échantillon est réalisée au Laboratoire de Chimie du département d'Agronomie de l'université de Blida et l'analyse des échantillons a été faite au Laboratoire de Spectrophotométrie de l'Agence National de Recherche Hydraulique (ANRH) d'Alger.

Les longueurs d'ondes de mesure sont 228,8, 213 et 324,8 nm pour le cadmium, le zinc et le cuivre respectivement.

5.5.1. Evaluation du taux d'inhibition

Le taux d'inhibition de la croissance de la *Lemna gibba* en présence du cadmium, le cuivre et le zinc à différentes concentrations a été calculé selon la formule suivante :

$$\%I = \frac{\Delta N_t - \Delta N}{\Delta N_t} \times 100$$

Où

ΔN_t : L'accroissement moyen du nombre de fronde observé dans les récipients témoins

ΔN : L'accroissement moyen du nombre de frondes observé pour chacune des concentrations d'essai.

5.5.2 Taux de rétention des métaux lourds (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+})

Le taux de rétention des métaux lourds testés (Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}) est calculé par la formule de GJENGEDAL et al [102] suivante :

$$\%R = (C_0 - C_t) / C_0 * 100$$

Où

C_0 : représente la concentration initiale du métal

C_t : représente la concentration du métal à l'instant t

5.6. Etude statistique

Un traitement statistique des résultats obtenus a été réalisé en utilisant le logiciel STATISTICA 5.1 où les moyennes arithmétiques et les écart-types ont été déterminés. Les tests student-Fisher ont été également appliqués grâce au même logiciel.

Le niveau de signification adopté pour tous les tests est 0,05.

5.7 Principe de modélisation de la cinétique de bio sorption des métaux lourds testés (Cd, Cu et Zn) par la plante *Lemna gibba* :

5.7.1 Etude d'un model par planification d'expérience

Pour une meilleure exploitation des résultats obtenus, une modélisation par une méthode statistique basée sur la planification des expériences où une régression multilinéaires (**Multiple Linear Regression**)» a été utilisée.

Les variables expliquées du modèle préconisé sont symbolisées par « Y » et les variables explicatives exprimées par « X » :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2$$

Où :

Le but recherché dans la méthode de plan d'expérience est de réaliser une exploitation maximale de nos résultats et d'en tirer le maximum d'informations de pouvoir simuler le phénomène en fonction des facteurs mise en jeux.

La procédure à suivre :

5.7.2 Le choix des facteurs

Le choix de facteurs dépend du degré d'influence sur la biosorption. Ils sont sélectionnés en fonction de leurs effets sur la rétention des métaux par *Lemna gibba*.

A cet effet, on prendra comme facteurs :

1. Facteurs variables : le temps et le pH
2. La réponse : les taux de rétentions correspondant aux différentes concentrations des différents métaux (Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}).

Les facteurs étudiés, dans notre dispositif expérimental, sont le temps avec six niveaux allant de 0 à 10 et le pH également avec six niveaux compris entre 5 et 10.

CHAPITRE 6

RESULTATS ET DISCUSSIONS

6.1. Optimisation de la croissance de la *Lemna minor* et de la *Lemna gibba*

6.1.1-Effet de la dilution du milieu de culture sur la croissance :

Les variations des taux de croissance des deux espèces *Lemnacées* : *Lemna minor* et *Lemna gibba* en fonction du temps à différentes dilutions du milieu de culture sont illustrées par les figures n° 21.6 et 22.6 :

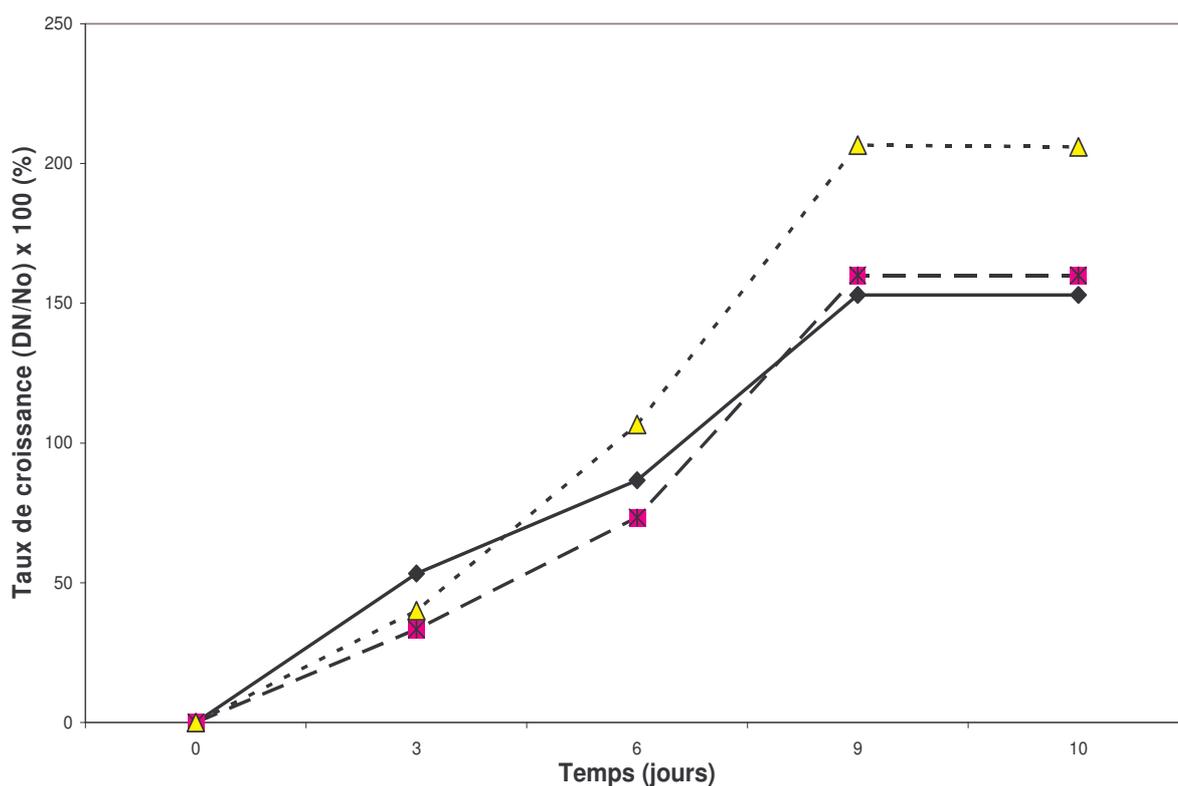


Figure 26.6: Evolution du taux de croissance en fonction du temps à différentes dilutions du milieu de culture : Cas de la *Lemna minor*

—◆— H : milieu de culture Haogland
 - - ■ - - H/10 : milieu de culture Haogland dilué 10 fois
 ▲ H/100 : milieu de culture Haogland dilué 100 fois

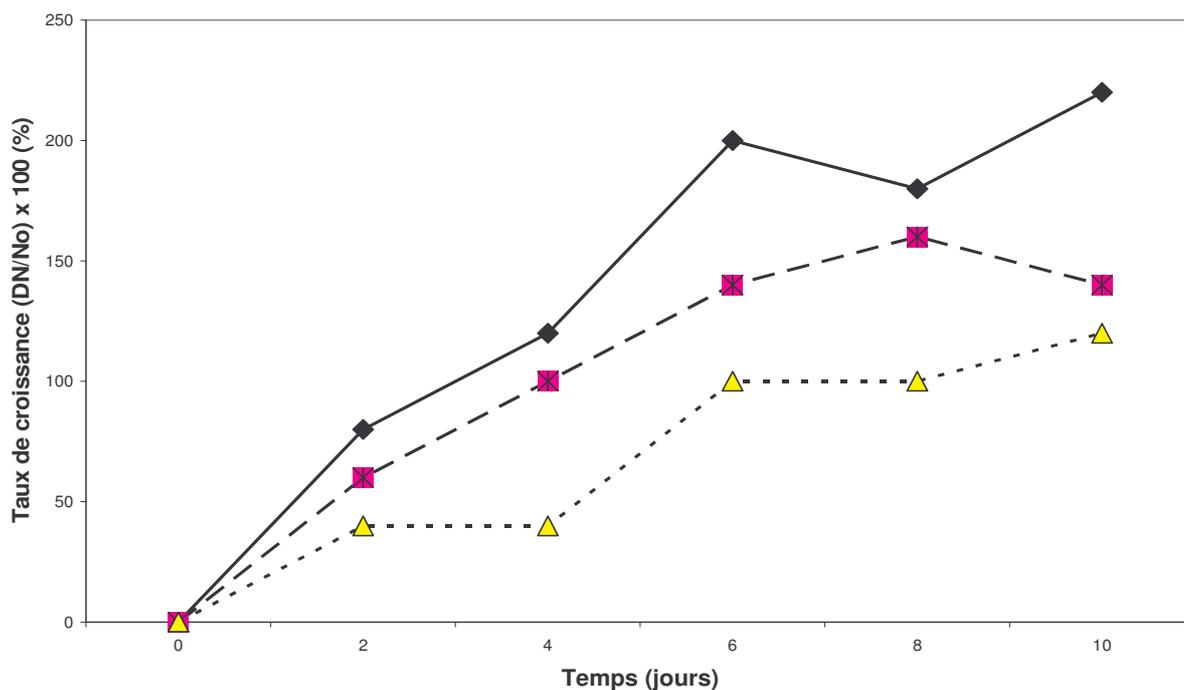


Figure 22.6 : Evolution du taux de croissance en fonction du temps à différentes dilution du milieu de culture : Cas de la *Lemna gibba*.

—◆— H : milieu de culture Haogland
 - - -■- - H/10 : milieu de culture Haogland dilué 10 fois
▲..... H/100 : milieu de culture Haogland dilué 100 fois

Les résultats de la figure 21.6 montrent une augmentation de la croissance de la *Lemna minor* plus marquée durant huit jours avec 160% pour les deux milieux H et H/10. Les taux de croissance de la plante dans ces deux milieux sont identiques entre le 8^{ième} et le 10^{ième} jour.

Le milieu de culture *Haogland* dilué 100 fois (H/100) s'avère le plus favorable en terme de croissance pour cette espèce où un pourcentage de 206% a été enregistré (figure n°21.6).

Néanmoins les colonies obtenues dans les deux premiers milieux sont caractérisées par une meilleure pigmentation comparativement aux plantes cultivées dans le milieu de culture (H/100).

Contrairement à la *Lemna minor*, la *Lemna gibba* a montré une bonne croissance dans le milieu de culture H où le taux de croissance est de 220% après dix jours de culture (figure n°22.6).

Cette différence de comportement peut-être expliquée par la différence de physiologies des deux espèces étudiées.

Au cours de ces expériences, nous avons enregistré un développement d'algues microscopiques dans le milieu de culture dilué 100 fois (H/100) avec des faibles pigmentations des frondes malgré les conditions de stérilisation préconisées durant cette phase d'expérimentation.

Nos observations relatives à la *Lemna minor* sont similaires à ceux obtenus par CHENG et al [184] qui ont montrés que la production augmente avec l'augmentation de la dilution [185].

6.1.2 Effet de la lumière sur la croissance de la *Lemna gibba* et *Lemna minor*

Afin de compléter les tests entrepris sur la croissance des deux espèces de *Lemna* en comparant leurs croissances dans les milieux de culture H, H/10 et H/100. Une étude de l'influence de la lumière sur le développement de ces plantes est réalisée. L'évolution des taux de croissance en fonction de l'intensité lumineuse pour la *Lemna minor* et la *Lemna gibba* à différentes dilutions du milieu Haogland H, H/10 et H/100 est illustrée par les figures n°:23-33.6

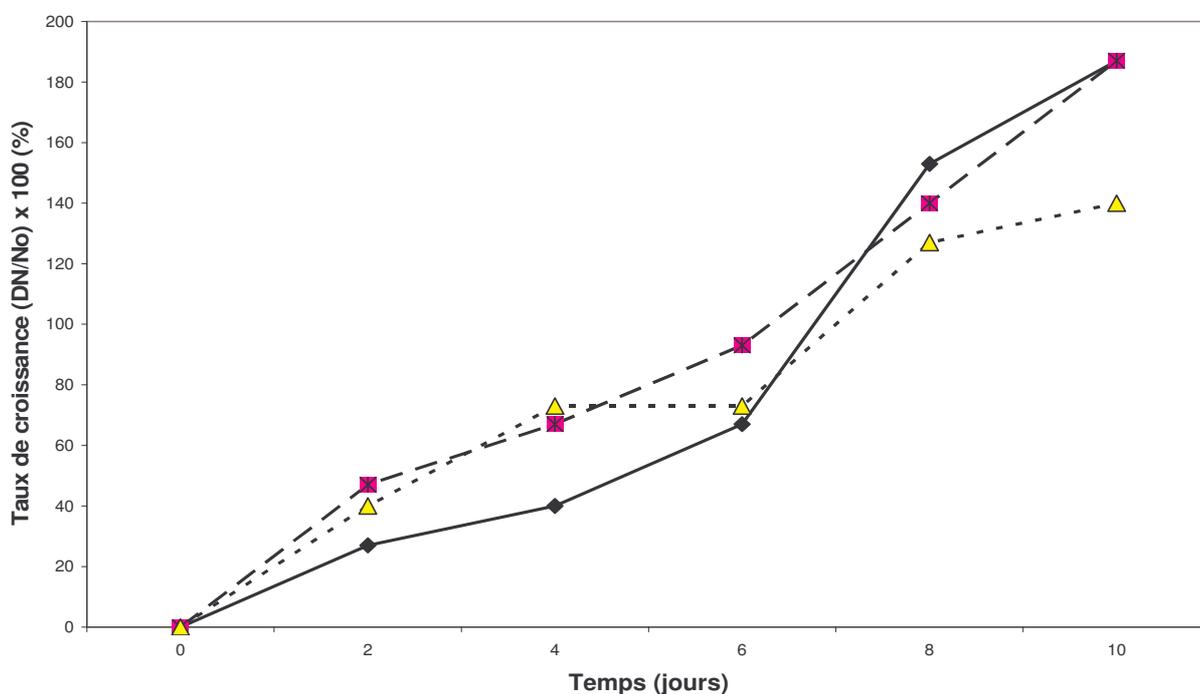


Figure n°23.6 : Evolution du taux de croissance en fonction du temps à un éclairage de 0 lux : Cas de la *lemna minor*.

—◆— H : milieu de culture Haogland
 - - ■ - - H/10 : milieu de culture Haogland dilué 10 fois
 ▲ H/100 : milieu de culture Haogland dilué 100 fois

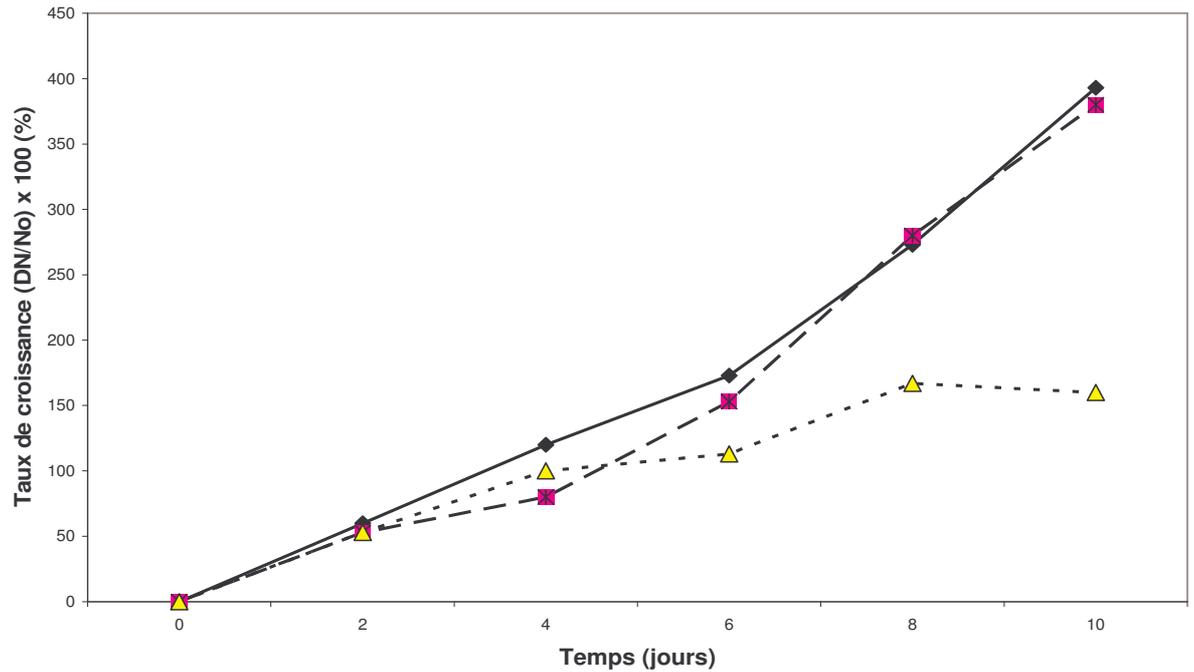


Figure n°24.6 : Evolution du taux de croissance en fonction du temps à un éclairage de 2666 lux : Cas de la *lemna minor*.

—◆— H : milieu de culture Haogland
 - - -■- - H/10 : milieu de culture Haogland dilué 10 fois
▲..... H/100 : milieu de culture Haogland dilué 100 fois

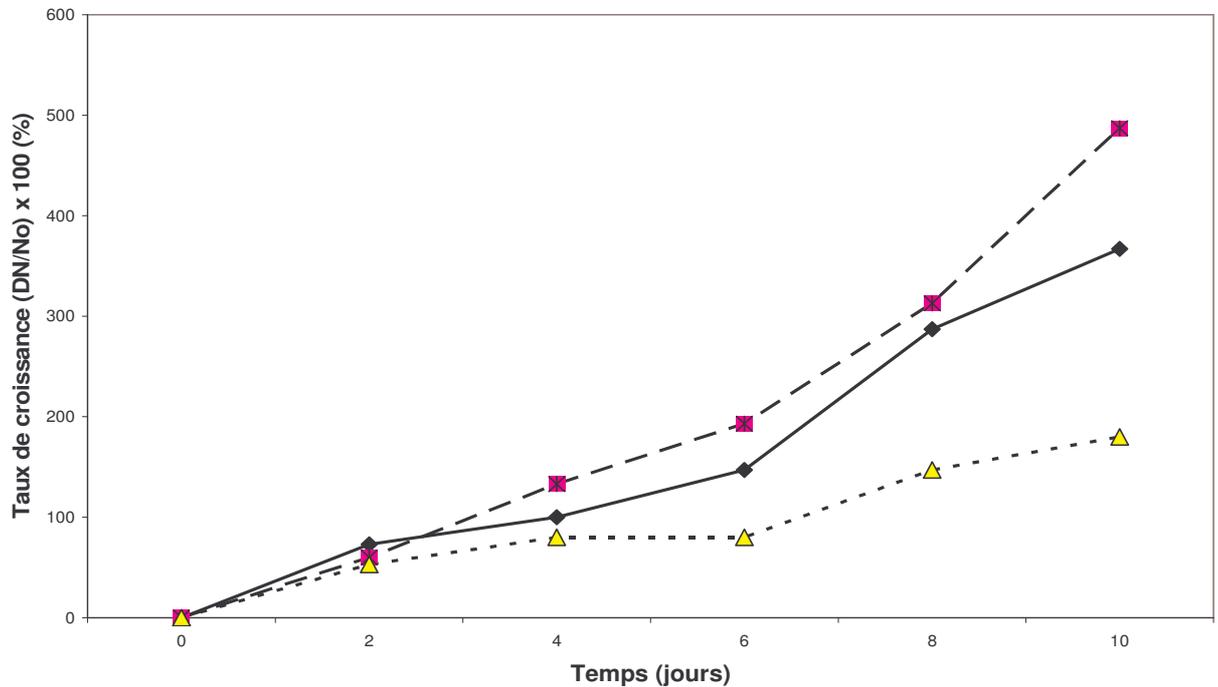


Figure n° 25.6: Evolution du taux de croissance en fonction du temps à un éclairage de 4000 Lux : Cas de la *Lemna minor*.

—◆— H : milieu de culture Haogland
 - - -■- - H/10 : milieu de culture Haogland dilué 10 fois
▲..... H/100 : milieu de culture Haogland dilué 100 fois

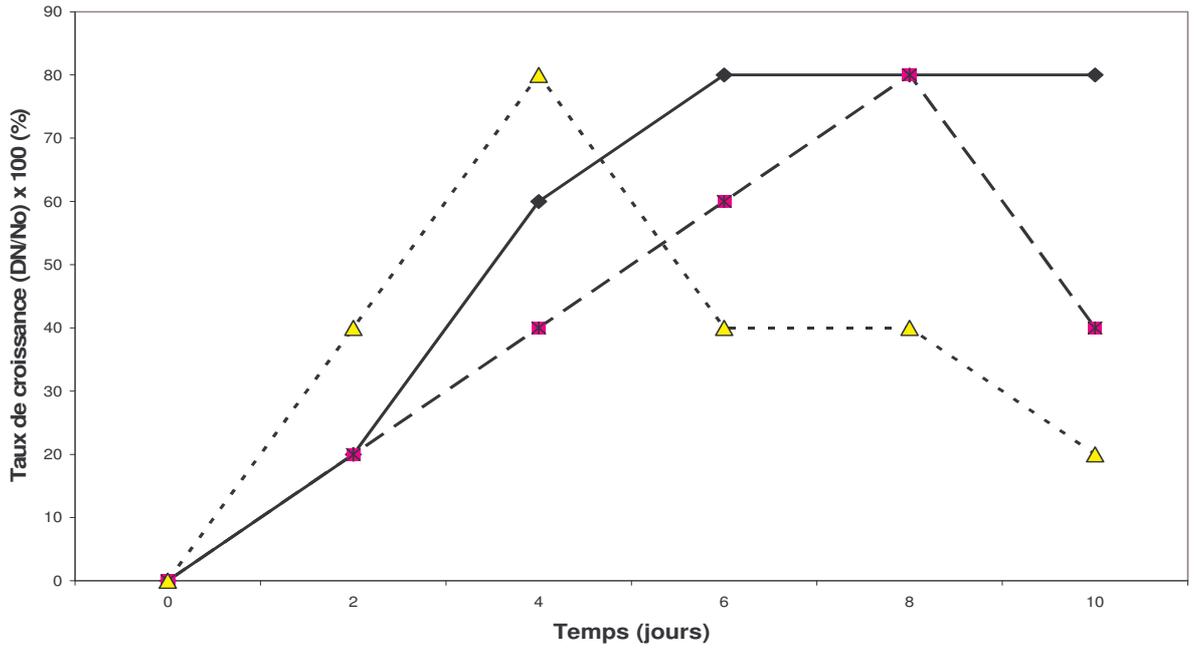


Figure n°26.6 : Evolution du taux de croissance en fonction du temps à un éclairage de 0 lux : Cas de la *Lemna gibba*.

—◆— H : milieu de culture Haogland
 - - -■- - H/10 : milieu de culture Haogland dilué 10 fois
▲..... H/100 : milieu de culture Haogland dilué 100 fois

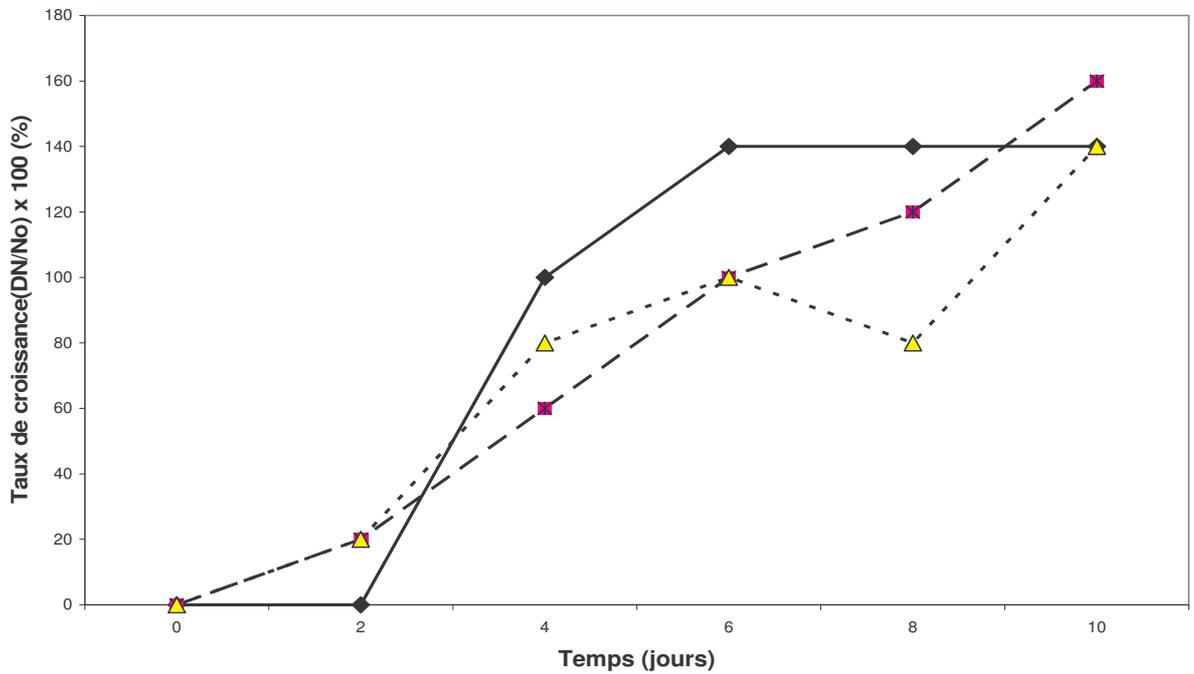


Figure n°27.6 : Evolution du taux de croissance en fonction du temps à un éclairage de 2666 lux : Cas de la *Lemna gibba*

—◆— H : milieu de culture Haogland
 - - -■- - H/10 : milieu de culture Haogland dilué 10 fois
▲..... H/100 : milieu de culture Haogland dilué 100 fois

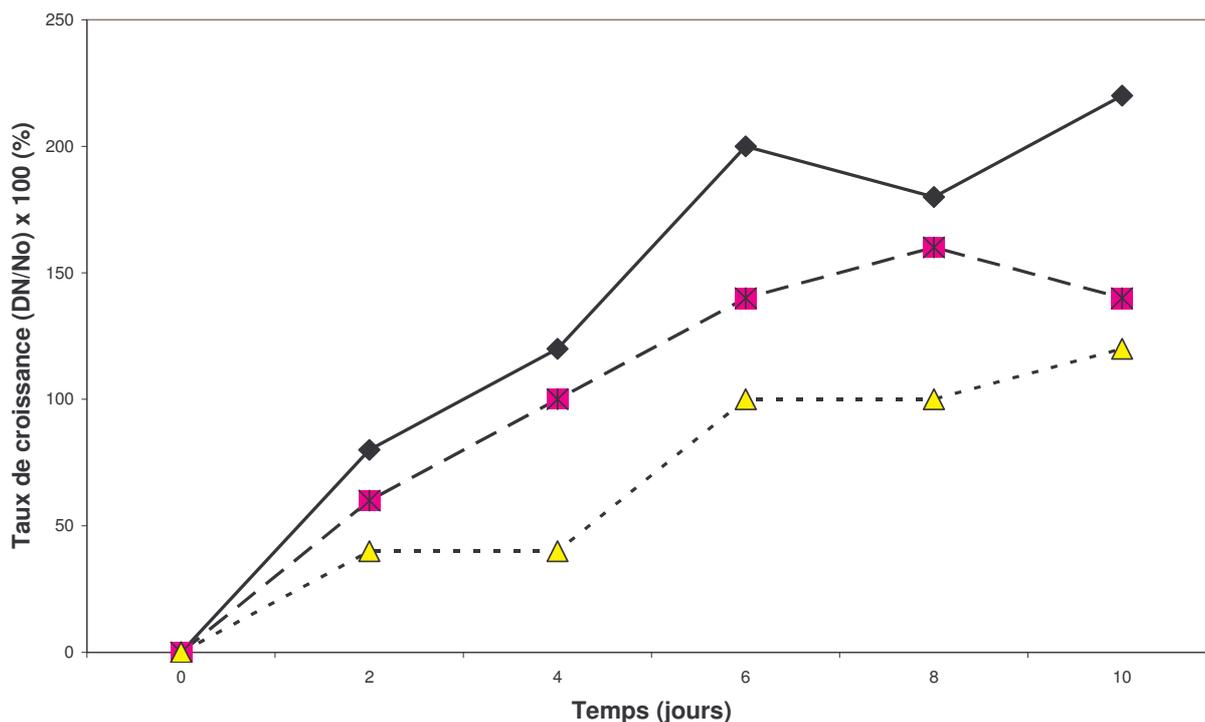


Figure n°28.6 : Evolution du taux de croissance en fonction du temps à un éclairage de 4000 lux : Cas de la *Lemna gibba*.

—◆— H : milieu de culture Haogland
 - - * - - H/10 : milieu de culture Haogland dilué 10 fois
▲..... H/100 : milieu de culture Haogland dilué 100 fois

Ces résultats permettent de conclure que la lumière :

- a un effet significatif sur le taux de croissance des deux espèces où une croissance significative a été observée pour les milieux moins dilués à un éclairage de 4000 Lux (figure n° 25.6 et 28.6) (des taux d'augmentation variant de 367 à 487 % pour la *Lemna minor* et d'environ de 220 % pour la *Lemna gibba* lorsque la luminosité passe de 2666 à 4000 Lux).
- a un effet moins prononcé sur la croissance de la *Lemna gibba* (figure n°25.6 et 28.6) dans le milieu de culture très dilué (H/100) avec un taux de croissance maximal de 120 %.

Une étude similaire, sur l'optimisation de la croissance de la *Lemna gibba*, réalisée par Chabane (2005) a montré que l'ajout du glucose pour des concentrations testées de 0,25 et 1 % en mg.L^{-1} , dans la composition du milieu de culture comme substance stimulatrice de la croissance, nuit à la croissance et au développement des *lemna* en favorisant la prolifération des algues symbiotiques.

Suite aux contaminations par des algues observées dans les milieux de culture, sur les essais réalisés dans des cristallisoirs de capacité de 500ml, ces récipients sont remplacés par des erlens de 250ml, dans lesquels de rares contaminations algales ont été observées.

La *Lemna gibba* a été choisie pour la réalisation de toute la suite du travail expérimental pour les raisons suivantes :

- Pour sa tolérance à l'éclairage.
- Sa bonne croissance, sans la prolifération des algues dans les milieux de culture.
- Pour la taille de ses frondes qui est plus grande que celle de la *Lemna minor* et qui pourrait constituée des sites d'adsorption plus importants que ceux de la *Lemna minor* d'autant plus que les deux espèces se nourrissent à travers les frondes[184].

6.2 Tests de toxicité

6.2.1 Etude de l'impact de la contamination des milieux de culture par Cd^{2+} , Cu^{2+} , et Zn^{2+} sur la croissance de la *Lemna gibba*

Les résultats des taux d'inhibition de la croissance de la *Lemna gibba* en fonction du temps à différentes concentrations en cadmium, cuivre et en zinc, calculés comme indiqué au chapitre 5.2.2.4 sont représentés dans les tableaux 7.6, 8.6 et 9.6 :

Tableau n °7.6 : taux d'inhibitions et leurs écart-types : cas du cadmium

[Cd ²⁺](mg.L ⁻¹)	0,5	1
Temps (jours)		
▼	I ± E.T (%)	I ± E.T (%)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	15,38 ± 4,7	16,6 ± 4,70
4	20,3 ± 3,33	26,66 ± 8,39
6	40,00 ± 13,6	75,00 ± 29,42
8	41,50 ± 14,15	83,33 ± 34,27
10	42,86 ± 14,9	92,86 ± 36,95
P =	0,05	0,04

I : correspond aux taux d'inhibition ± écart-type.

E.T : Ecart type

P < 0,05 : différence significative par rapport au témoin

Les résultats du tableau 7.6 montrent que le cadmium réduit significativement (P<0,05) le développement de la plante où un taux d'inhibition de 75 ± 29 % a été enregistré au 6^{ème} jour pour une concentration de 1 mg.L⁻¹ ; pour 0,5 mg. L⁻¹ aucune inhibition significative n'est observée.

Tableau n°8.6 : taux d'inhibitions et leurs écart-types : cas du cuivre

[Cu ²⁺] (mg.L ⁻¹)	0,014	0,1
Temps (jours)		
▼	I ± E.T (%)	I ± E.T (%)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	0,00 ± 0,0	0,00 ± 0,0
4	0,00 ± 0,00	20,00 ± 10,00
6	35,00 ± 14,93	65,00 ± 28,69
8	58,33 ± 22,83	79,17 ± 35,09
10	75,00 ± 28,97	85,71 ± 37,64
P=	0,08	0,05

I : correspond aux taux d'inhibition ± écart-type.

E.T : Ecart type

P < 0,05 : différence significative par rapport au témoin

Les résultats relatifs aux taux d'inhibitions de la croissance de la plante par rapport à la contamination de cuivre montrent que cet effet n'est significatif qu'à partir du 6^{ième} jour pour une concentration de 0,1 mg.L⁻¹ de Cu²⁺ où un taux de 65 ± 28,6 % a été enregistré (tableau n° 8.6). Par ailleurs, pour la gamme de concentrations testées en cuivre et contrairement au cas du cadmium, la plante présente une certaine résistance justifiée par des taux d'inhibition n'excèdent pas les 85 % et ce après une durée d'exposition de 10 jours (Tableau n°8.6).

On peut rejoindre l'hypothèse de SALT et al [186] qui stipule que certaines plantes telles que l'espèce *Silene vulgaris*, ou encore les *Myriophyllum spicatum* et les *Lemna* sont phytotolérants au cuivre [52], [186].

Tableau n°9.6: taux d'inhibitions et leur écart-type : cas du zinc

[Zn ²⁺] (mg.L ⁻¹)	0,63	12,8
Temps (jours)		
▼	I ± E.T (%)	I ± E.T (%)
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
2	0,00 ± 0,0	27,27 ± 12,21
4	0,00 ± 0,0	53,33 ± 21,81
6	15,00 ± 7,50	75,00 ± 28,62
8	16,66 ± 8,00	91,66 ± 33,46
10	16,66 ± 7,40	100 ± 35,89
P =	0,45	0,04

I : correspond aux taux d'inhibition ± écart-type.

E.T : Ecart type

P < 0,05 : différence significative par rapport au témoin

Dans le cas du zinc, les résultats des taux d'inhibition de la croissance de la plante donne la valeurs de 75 ± 28 pour une concentration de $12,8 \text{ mg.L}^{-1}$ ce, à partir du 6^{ème} jour.

Une inhibition totale de $100 \pm 35\%$ est observée au bout de dix jours d'exposition pour une même concentration en zinc. Cependant, l'étude statistique a montré un effet significatif ($p < 0.05$) pour la même concentration de 12.8 mg.L^{-1} .

Ces observations permettent de conclure que :

- pour les concentrations testées de cadmium et de cuivre, ces derniers se sont montrés plus toxiques vis-à-vis de la *Lemna gibba* que le zinc.

Certains métaux sont à l'origine de la destruction de la membrane plasmique. Par conséquent, les plantes hyperaccumulatrices contenues dans les milieux de culture pauvre en sels minéraux se voient inhibées de leur croissance. Ces détériorations cellulaires sont fonction des caractéristiques des parois cellulaires de la plante, des propriétés physico chimique du milieu ainsi que du type de toxicité métallique testé [141] ; [133].

6.3 Effets de la toxicité de Cd^{2+} , Cu^{2+} et de Zn^{2+} sur certains paramètres physico-chimiques du milieu de culture de *Lemna gibba*

6.3.1 Effet de Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} sur le phosphore contenu dans les milieux de culture de *Lemna gibba*

L'analyse des quantités de phosphore sous forme de PO_4^{3-} dans les milieux de cultures est réalisée sur les solutions expérimentales échantillonnées tous les 02 jours et ce pendant 10 jours. Un témoin a été considéré pour chaque série de tests de toxicité. L'évolution de la concentration en phosphates en présence des concentrations métalliques Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} et en fonction du temps est représentée par les figures 34.6, 35.6 et 36.6 :

L'assimilation du phosphate est influencé par les valeurs du pH, en d'autres termes, lorsque les pH sont compris entre 4 et 9, une baisse de pH vers des valeurs plus acides entraîne une diminution de la pénétration des cations, comme s'il y avait une compétition. Pour les anions, le phénomène inverse est cité par HELLER [154]. L'assimilation des éléments minéraux présents dans les milieux de culture est souvent stimulée, ou inhibée par des mécanismes métaboliques de la plante entre autres, les milieux contenant des toxiques [154].

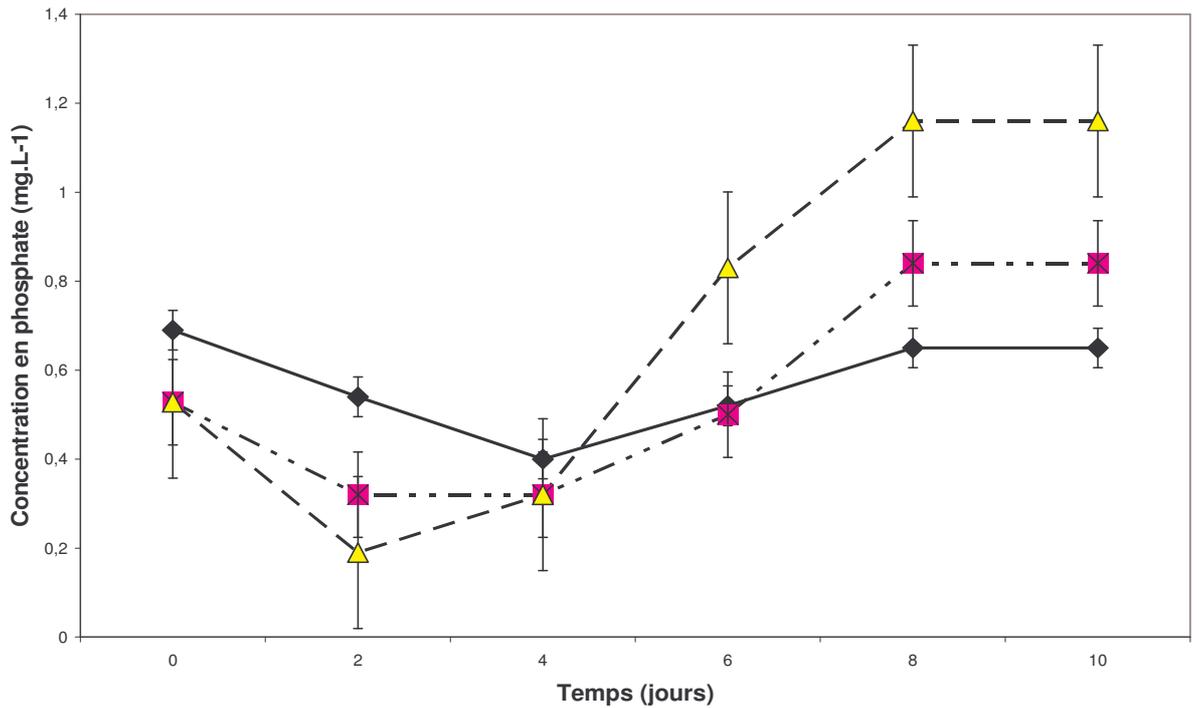


Figure n°29.6 : Variation de la concentration des phosphates contenues dans les milieux de culture de *Lemna gibba* en fonction du temps : cas du cadmium

—●— Témoin -■- 0.5mg.L-1 -▲- 1 mg.L-1

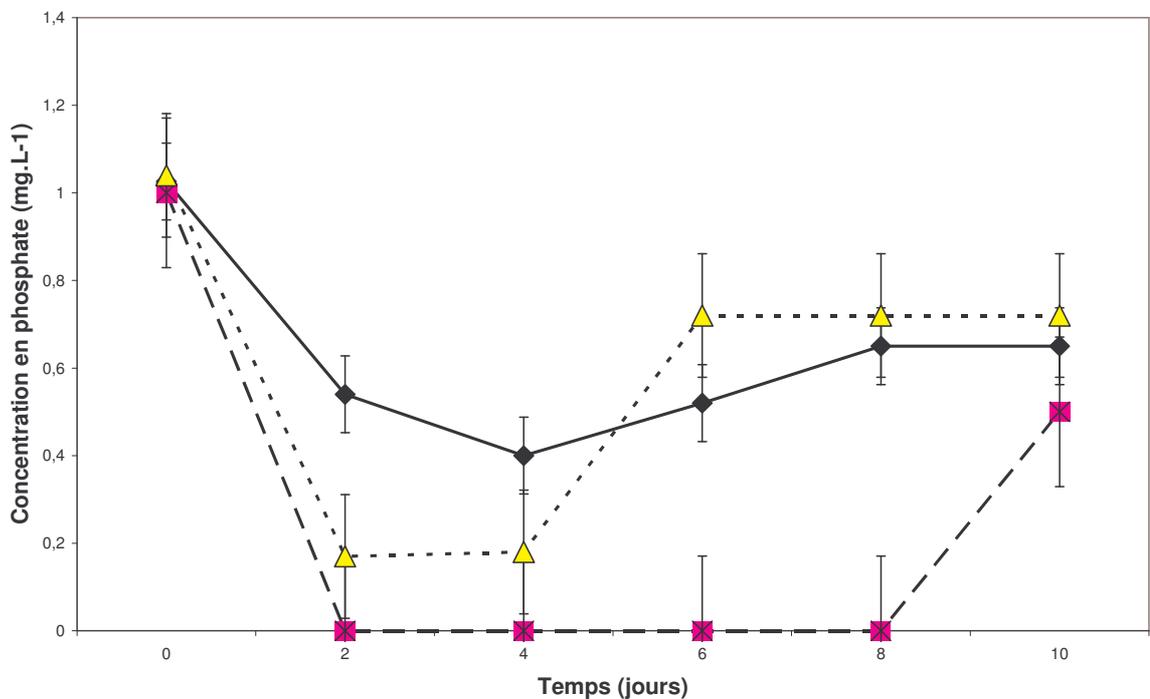


Figure n° 30.6 : Variation de la concentration des phosphates contenues dans les milieux de culture de *Lemna gibba* en fonction du temps : cas du cuivre.

—●— témoin -■- 0.014mg.L-1 -▲- 0.1mg.L-1

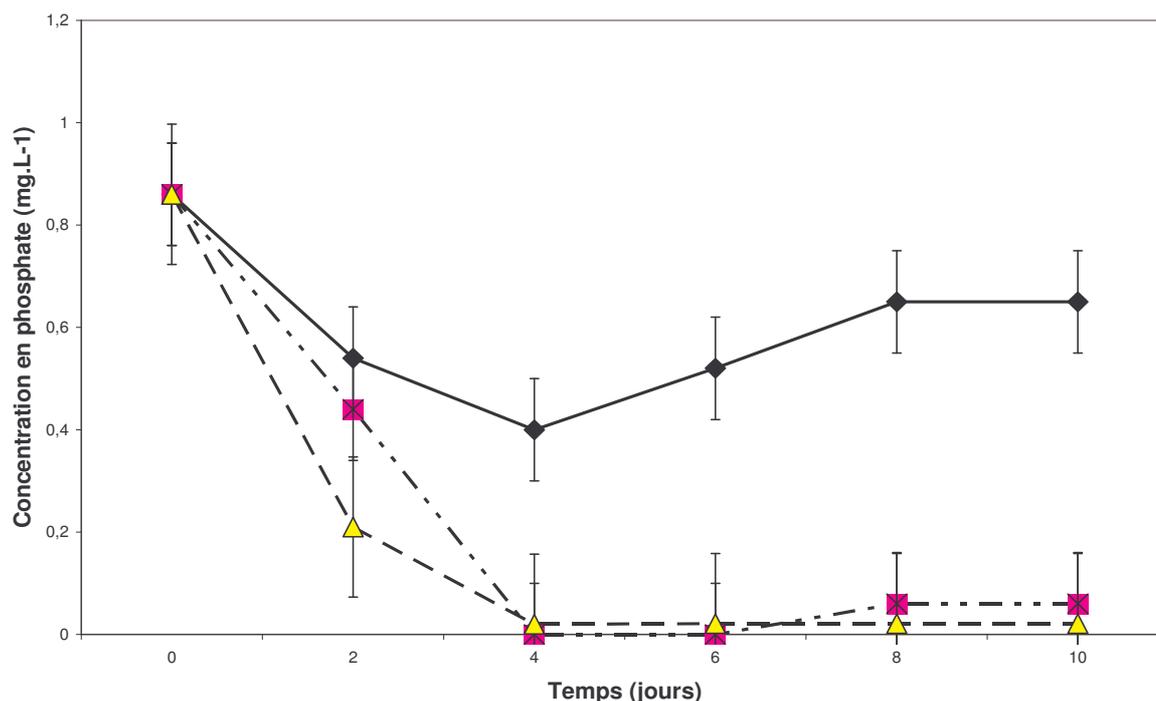


Figure n°31.6 : Variation de la concentration des phosphates contenues dans les milieux de culture de *Lemna gibba* en fonction du temps : cas du zinc.

—●— témoin —■— 0,6 mg.L⁻¹ - -▲- - 12,8 mg.L⁻¹

Selon les figures n° 29.6, 30.6 et 31.6, il apparaît que la quantité de phosphate dans le témoin et les solutions contenant le cadmium, le cuivre et le zinc diminue. Cette diminution devrait correspondre à l'assimilation des PO_4^{3-} par la plante.

Les résultats relatifs à l'assimilation des phosphates par les *Lemna gibba* dans les milieux de culture contaminés montrent que les quantités de phosphates décroît dans l'ensemble des milieux et ce, à partir de 0 jour au 4^{ème} jour pour le cadmium, le cuivre et le zinc. Cette absorption continue jusqu'à épuisement total de cet élément dans certains milieux de culture tels que ceux contaminés pour 0,014 mg.L⁻¹ en cuivre et 0,63 mg.L⁻¹ en zinc) (figure n° 30.6 et 31.6).

Les quantités maximales de PO_4^{3-} assimilées aux jours 2 et 4 sont mentionnées dans les tableaux n°10.6, 11.6 et 12.6. A ces valeurs sont joints les taux d'inhibition correspondants aux concentrations métalliques et aux différents temps d'échantillonnage.

Nous remarquons que les taux de phosphates absorbées par la biomasse végétale augmentent en fonction du temps pour 2 et 4 jours, puis les quantités de phosphates assimilées deviennent moins importantes pour les durées d'essais de 6 et 8 jours. Pour $\text{Cd}^{2+} = 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ et 1 mg.L^{-1} et $\text{Cu}^{2+} = 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, l'augmentation des taux de PO_4^{3-} pour le témoin est moins prononcée de celle des solutions contenant le cadmium et le cuivre.

Pour le zinc, les taux de PO_4^{3-} absorbés par la plante augmentent avec l'augmentation de la durée d'expérience. Nous précisons que l'élévation des taux de PO_4^{3-} absorbés est en rapport avec l'augmentation des taux d'inhibition de la croissance (Tableau 8.6 et 9.6).

Cette observation permet de conclure que la mort du végétal provoque le retour en solution des PO_4^{3-} contenu dans les tissus des frondes de la *Lemna gibba*. Bien que les taux d'inhibition de la croissance atteignent 100% dans le cas du zinc au 10^{ème} jour d'expérience, les phosphates contenus dans le végétal ne semblent pas être remis en solution.

Tableau n°10.6 : Quantités de phosphate assimilées (%), les écart-types, taux d'inhibition et le test de significativité à 0,05 (au 10^{ème} jour) : Cas du cadmium.

Cd^{2+}	Témoin (0 mg.L ⁻¹)	0,5 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹
m ± E.T (0 jour)	0	0	0
pH à 0 jour	7,4	7,1	7,5
% d'inhibition	0	0	0
m ± E.T (2 jours)	21,73 ± 0,2	32,39 ± 0,2	64,01 ± 0,03
pH à 2 jours	6,3	6,86	6,8
% d'inhibition	0	15,38 ± 4,7	16,6 ± 4,70
m ± E.T (4 jours)	42,02 ± 0,3	32,39 ± 0,2	39,39 ± 0,3
pH à 4 jours	6,86	7,28	7,36
% d'inhibition	0	20,3 ± 3,33	26,66 ± 8,39
m ± E.T (6 jours)	24,63 ± 0,4	5,30 ± 0	0 ± 0
pH à 6 jours	6,76	7,13	6,98
% d'inhibition	0	40,00 ± 13,6	75,00 ± 29,4
m ± E.T (8 jours)	5,79 ± 0,98	0 ± 0	0 ± 0
pH à 8 jours	6,27	7	6,91
% d'inhibition	0	37,50 ± 14,15	83,33 ± 34,27
m ± E.T (10 jours)	5,79 ± 0,98	0 ± 0	0 ± 0
pH à 10 jours	6,28	7,01	6,92
% d'inhibition	0	42,86 ± 14,9	92,86 ± 36,9
P =	-	-	-

m ± E.T : quantités de phosphates assimilés en pourcentage et les l'écart type correspondant

% d'inhibition : pourcentage d'inhibition de la croissance

P < 0,05 : différence significative par rapport au témoin au 10^{ème} jour

Tableau n°11.6 : Quantités de phosphate assimilées (%), les écart-types, taux d'inhibition et le test de significativité à 0,05 (au 10^{ième} jour) : Cas du cuivre.

Cu²⁺	Témoin (0 mg.L⁻¹)	0,014 mg.L⁻¹	0,1 mg.L⁻¹
m ± E.T (0 jour)	0	0	0
pH à 0 jour	6,28	6,22	6,20
% d'inhibition	0	0	0
m ± E.T (2 jours)	47,36 ± 0,26	100 ± 0,7	80,43 ± 0,6
pH à 2 jours	6,23	6,19	6,20
% d'inhibition	0	0	0
m ± E.T (4 jours)	61,10 ± 0,34	100 ± 0,5	82,69 ± 0,49
pH à 4 jours	6,17	6,16	6,09
% d'inhibition	0	0	20 ± 10
m ± E.T (6 jours)	49,32 ± 0,3	100 ± 0,5	30,76 ± 0,4
pH à 6 jours	6,27	6,14	5,87
% d'inhibition	0	35 ± 10	65 ± 28
m ± E.T (8 jours)	36,64 ± 0,2	100 ± 0,4	30,76 ± 0,3
pH à 8 jours	6,27	6,10	6,4
d'inhibition	0	58,3 ± 22	79,17 ± 35
m ± E.T (10 jours)	36,64 ± 0,2	100 ± 0,3	30,76 ± 0,2
pH à 10 jours	6,28	6,7	6,8
%d'inhibition	0	75 ± 28	85,7 ± 37
P =		0,016	0,5

m ± E.T : quantités de phosphates assimilé en pourcentage et les l'écart type correspondant

% d'inhibition : pourcentage d'inhibition de la croissance

P < 0,05 : différence significative par rapport au témoin au 10^{ième} jour

Tableau n°12.6 : Quantités de phosphate assimilées (%), les écart-types, taux d'inhibition et le test de significativité à 0,05 (au 10^{ième} jour) : Cas du zinc

Zn ²⁺	Témoin (0 mg.L ⁻¹)	0,6 mg.L ⁻¹	12,8 mg.L ⁻¹
m ± E.T (0 jour)	0	0	0
pH à 0 jour	6,5	6,20	6,6
% d'inhibition	0	0	0
m ± E.T (2 jours)	37,20 ± 0,26	48,83 ± 0,23	75,58 ± 0,4
pH à 2 jours	6,8	6,03	6,7
% d'inhibition	0	0	27,27 ± 12
m ± E.T (4 jours)	53,48 ± 0,34	100 ± 0,18	97,67 ± 0,45
pH à 4 jours	6,6	6,3	6,5
% d'inhibition	0	0	53,3 ± 21
m ± E.T (6 jours)	49,32 ± 0,3	100 ± 0,3	92,94 ± 0,3
pH à 6 jours	6,2	6,4	6,3
% d'inhibition	0	35 ± 10	75 ± 28
m ± E.T (8 jours)	24,42 ± 0,23	100 ± 0,31	93,02 ± 0,3
pH à 8 jours	6,5	6,48	6,7
d'inhibition	0	16,66 ± 8	91,6 ± 33
m ± E.T (10 jours)	36,64 ± 0,2	50 ± 0,3	93,02 ± 0,2
pH à 10 jours	6,8	6,7	6,8
% d'inhibition	0	16,66 ± 7	100 ± 35
P =	-	0,010	0,012

m ± E.T : quantités de phosphates assimilé en pourcentage et les l'écart type correspondant

% d'inhibition : pourcentage d'inhibition de la croissance

P < 0,05 : différence significative par rapport au témoin au 10^{ième} jour

En effet, les concentrations résiduelles de phosphates dans les milieux de cultures demeurent proches de 0 mg.L⁻¹ pour les temps d'expériences égaux à 4, 6 et 8 jours et ce, pour les concentrations en zinc 0,6 et 12,8 mg.L⁻¹. Cette constatation laisse penser que le zinc affecte la croissance et le développement de la plante sans la destruction qui entraînerait la libération des phosphates. Le cadmium et le cuivre affectent le développement de la plante et les nécroses observées sur le feuillage doivent atteindre les compartiments des tissus renfermant les phosphates en induisant un retour des PO₄³⁻ en solution.

Outre l'impact de la présence des cations métalliques dans les milieux de cultures, notre travail a permis de trouver des taux d'assimilation des phosphates légèrement supérieurs

aux taux trouvés par ALAERT et al [184] qui avait démontré que les *Lemna* pouvaient retenir 77% de phosphore total. De même, le travaux de CHENG et al [185] ont montrés une rétention du taux de phosphore par la *Lemna* dans des influents des eaux de porcs atteignant de taux de 79 à 88 % de rétention.

6.3.2 La conductivité dans les milieux de culture de *Lemna gibba* contaminés

La mesure de la conductivité dans les milieux de cultures contaminés par le cadmium, le cuivre et le zinc est effectuée pour 0, 2, 4, 6, 8 et 10 jours.

La conductivité est liée à la mobilité des ions dans les milieux de culture de la plante, en d'autres termes elle nous permet d'évaluer la minéralisation des solutions de cultures contaminées. L'objectif de ce travail est d'essayer d'établir une relation entre la toxicité de certains cations métalliques et la conductivité, la dureté et le taux de phosphates dans les milieux à étudier [185]. Selon RODIER [201], une eau est dite de conductivité faible lorsque celle-là est comprise entre 100 à 200 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ et de conductivité moyenne lorsqu'elle est entre 200 à 333 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Les représentations graphiques des variations des conductivités des milieux de cultures témoins et contaminés par le cadmium, le cuivre et le zinc sont données par les figures n° 32.6, 33.6 et 34.6

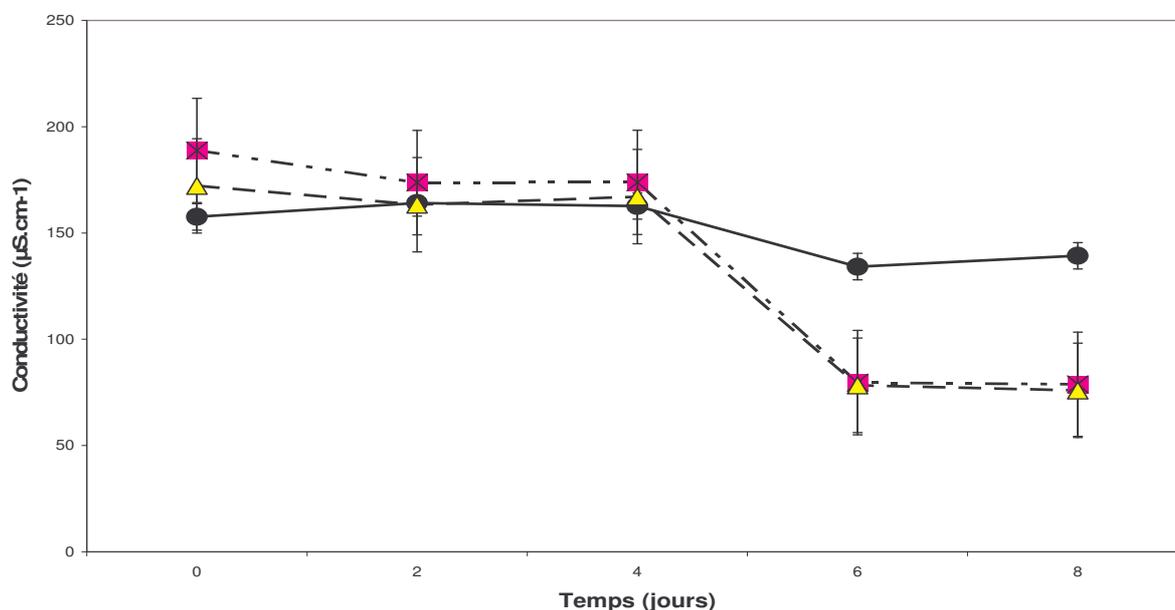


Figure n°32.6 : Conductivités du milieu de culture en fonction du temps et en présence du cadmium.

—●— Témoin —■— 0.5 mg.L⁻¹ —▲— 1 mg.L⁻¹

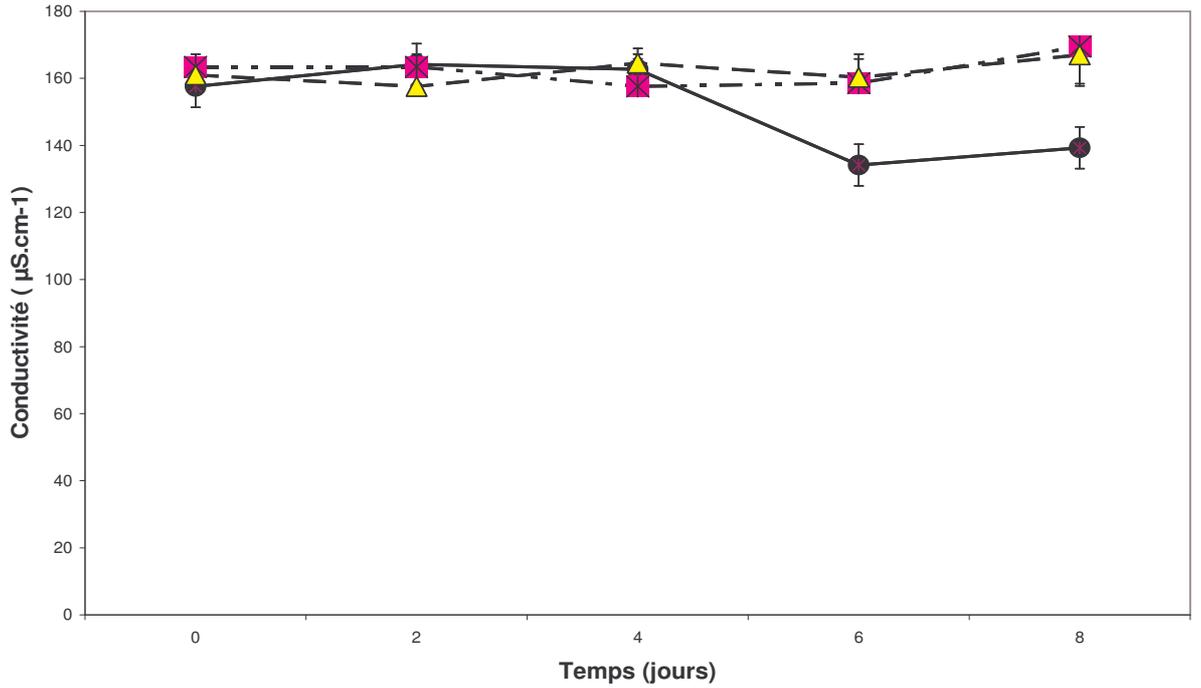


Figure n° 33.6 : Conductivités du milieu de culture en fonction du temps et en présence de cuivre

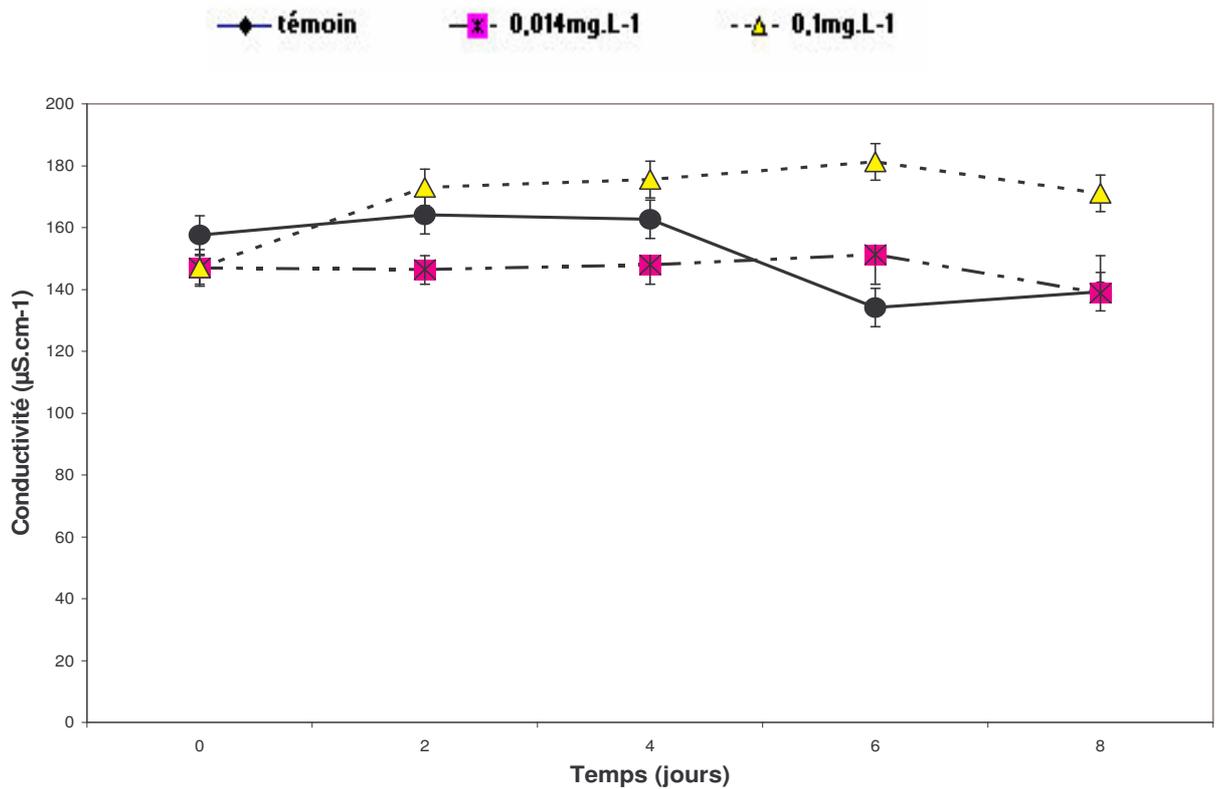


Figure n°34.6 : Conductivités du milieu de culture en fonction du temps et en présence de zinc

témoin
 0,6 mg.L-1
 12,8 mg.L-1

Nous remarquons que la conductivité des milieux expérimentaux contenant 0,5 et 1 mg.L⁻¹ de cadmium varie de manière significative par rapport à la conductivité du milieu témoin. Dans ce cas, la conductivité chute de 200 à 85µS. cm⁻¹. Cette baisse pourrait être induite par la complexation des ions cadmium avec les cations électrolytiques entrant dans la composition du milieu de culture. Toutefois, il semble que les ions Cu²⁺ et Zn²⁺ ne forment pas de complexes avec les ions du milieu de culture, ce qui permet d'observer une conductivité constante dans le temps dans le cas du témoin et de toutes les concentrations de Cu²⁺ et Zn²⁺. Par conséquent, la conductivité ne constitue pas un indice de stress fiable pour la détection de la toxicité métallique dans l'eau.

6.3.3 La dureté des milieux de culture de *Lemna gibba*

Tout comme la conductivité, la dureté totale est un aspect qualitatif du milieu de culture contaminé pour le cadmium, le cuivre et par le zinc. En effet, la dureté d'un milieu est affectée par la toxicité d'une substance dans l'eau [180]. Il a été montré selon les études de DAVIES et al [85] et STENDAHL et al [189] ; que la toxicité des métaux traces métalliques étaient inversement proportionnelle à la dureté de l'eau. En outre, il est aussi admis que dans les milieux ayant une dureté élevée, le calcium inhibe l'adsorption du cadmium par voie d'osmorégulation et réduit l'effet toxique du métal [189], [85].

D'autres études montrés que la toxicité des métaux lourds vis-à-vis des organismes aquatiques était inversement proportionnelle à la salinité de l'eau en raison de la complexation de cations métalliques par des anions inorganiques tels que des chlorures (formation des CdCl⁺) [90] ; [194] ; [195] ou encore à l'alcalinité, en raison de la complexation des cations métalliques par les carbonates (CO₃⁻) et des bicarbonates (HCO₃⁻) [117] ; [196] ;[197].

Les figures n° 35.6, 36.6 et 37.6 présentent l'évolution de la dureté des milieux de cultures contaminés en Cd²⁺ Cu²⁺ et Zn²⁺ en fonction du temps.

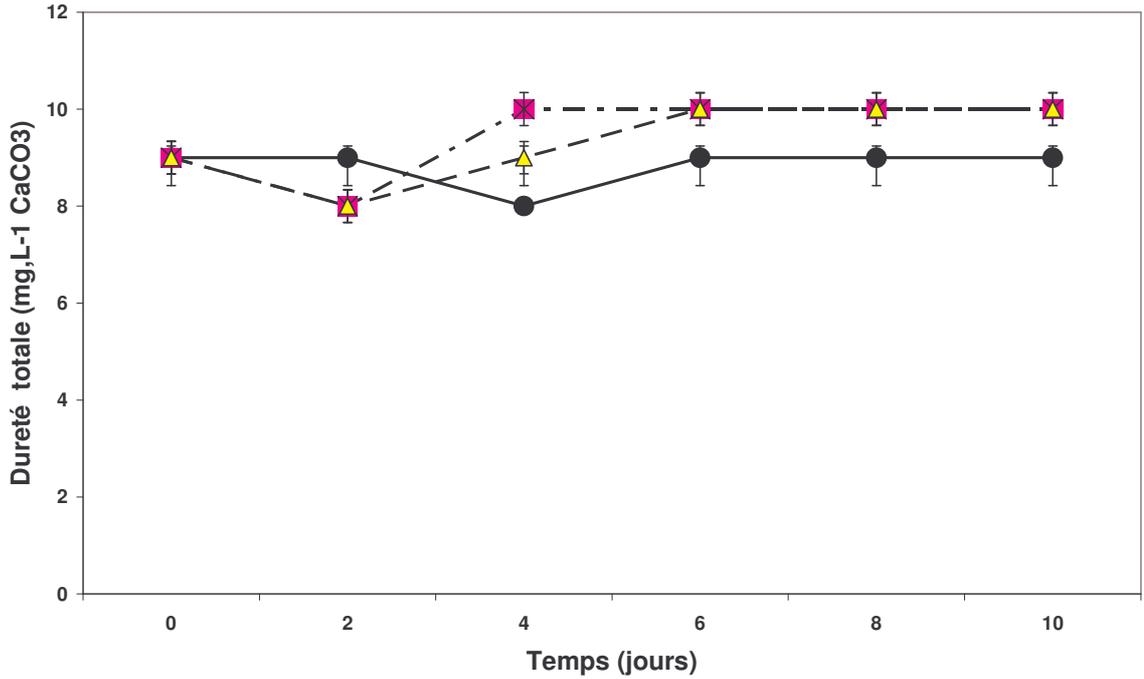


Figure n° 35.6 : Variation de la dureté en présence du cadmium et en fonction du temps : Cas du cadmium.

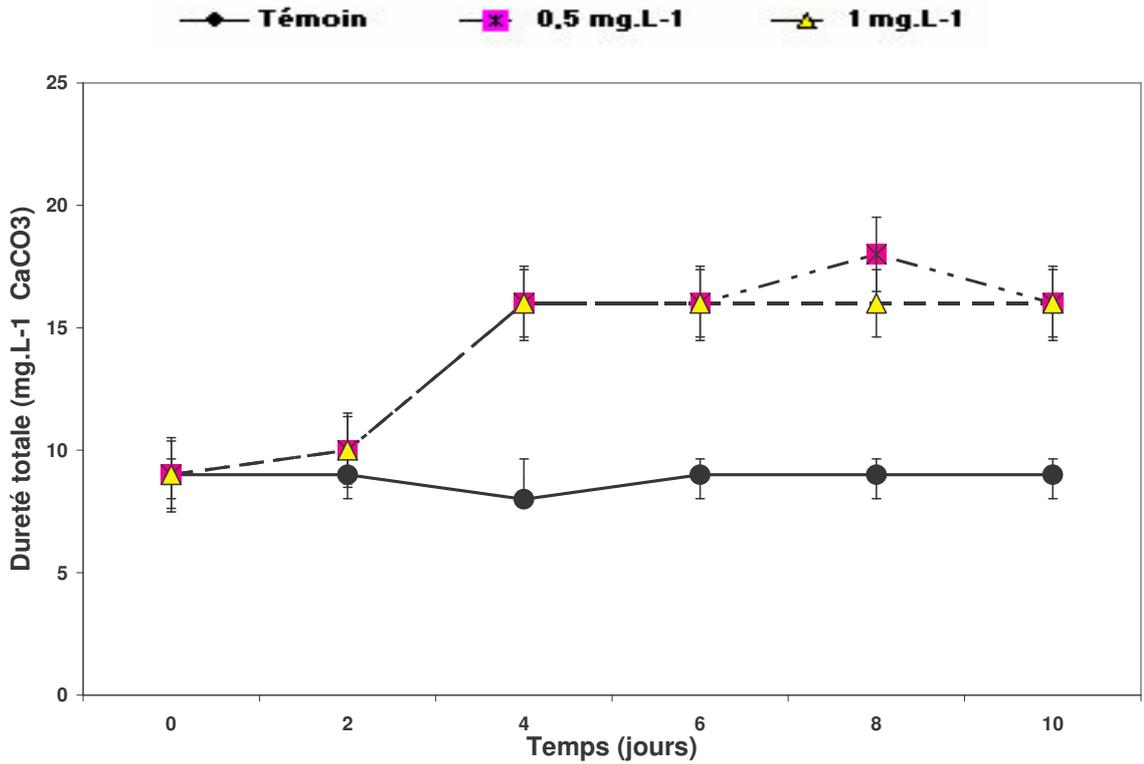


Figure n° 36.6 : Variation de la dureté en présence du cuivre et en fonction du temps : Cas du cuivre.

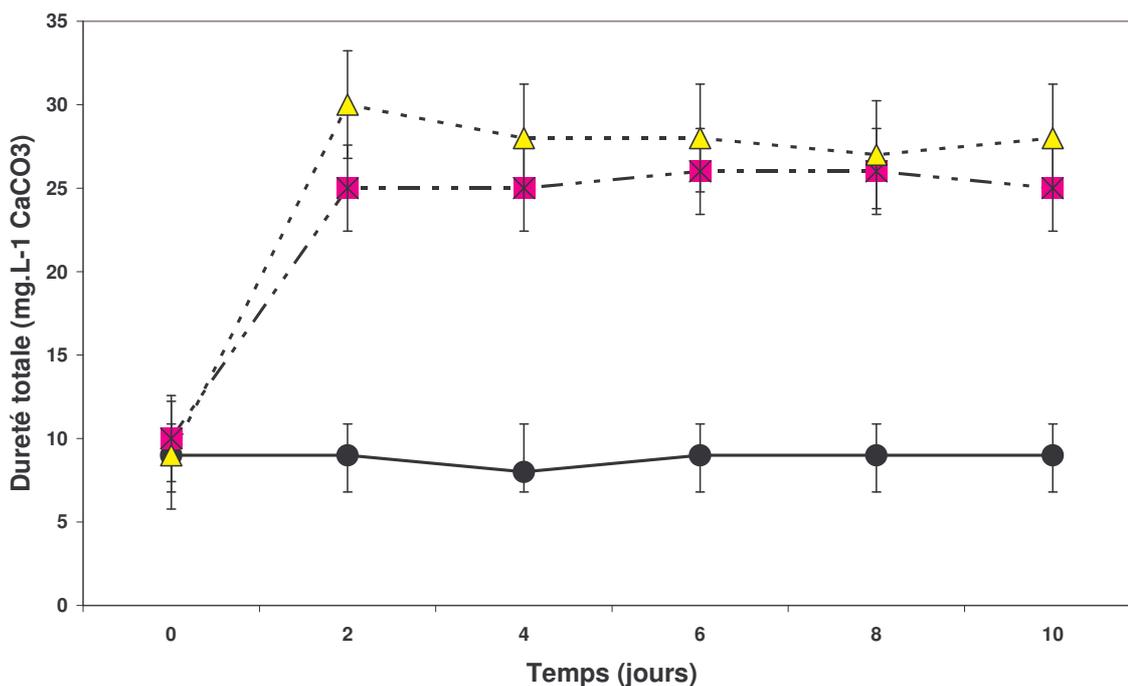


Figure n° 37.6 : Variation de la dureté en présence du zinc et en fonction du temps :
Cas du zinc

—●— témoin -x- 0,6 mg.L⁻¹ -Δ- 12,8 mg.L⁻¹

Les figures (36.6 et 37.6) montrent que la dureté des milieux témoins reste pratiquement constante et comprise entre 8 et 10 mg.L⁻¹ de CaCO₃ pour les essais de 02, 04, 06, 08 et 10 jours. Cette observation permet de conclure que bien que la plante absorbe les ions Ca²⁺ et Mg²⁺, leurs concentrations dans les milieux ne varient pas en fonction du temps car les quantités initiales de la dureté totale dans les milieux nutritifs sont initialement dans l'ordre de 8 à 9 mg.L⁻¹ de CaCO₃ dans le milieu de culture à t= 0. Etant donnée que la biomasse végétale est faible, l'assimilation des cations Ca²⁺ et Mg²⁺ par la plante devrait être négligeable par rapport à celle du concentré nutritif.

En présence de Cd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺, la dureté des milieux expérimentaux croit par rapport à celle des témoins. Cette constatation nous laisse affirmer que la toxicité métallique modifie la dureté des solutions testées. Cette dureté varie respectivement pour :

- Cd²⁺ de 9 à 10 mg.L⁻¹ de CaCO₃
- Cu²⁺ de 9 à 16 mg.L⁻¹ de CaCO₃
- Zn²⁺ de 9 à 30 mg.L⁻¹ de CaCO₃.

La dureté croit de manière très significative ($P < 0,05$) dans les solutions de zinc. L'apport de Ca²⁺ et Mg²⁺ (qui représentent de la dureté) dans certains milieux de culture est toute fois globalement constant pour toutes les durées de tests (02, 04, 06, 08 et 10 jours).

Il est possible qu'une compétition soit établie entre les ions des métaux lourds et les ions calcium ou magnésiums, notamment entre le cadmium et le calcium [40], ou entre le cuivre et le calcium [167], pour la fixation de ceux-ci sur les sites de liaisons biomoléculaires de la plante.

Les travaux de JOHNSTON ET PROTOR [135], ont montré que l'assimilation d'un métal toxique peut être limitée en maintenant des niveaux élevés en calcium ou en magnésium intracellulaire. JACOBSON et al [198], ont prouvés que le calcium modifie la perméabilité des surfaces cytoplasmiques, ce qui entraîne la diminution de l'accès de certains cations des sites d'adsorptions et freine la bioaccumulation des éléments métalliques. Ce rôle protecteur est aussi remarqué pour les ions magnésiums chez les lentilles [135] ; [198].

Nos résultats montrent que l'adsorption et l'absorption des métaux Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} est réalisé aux différentes concentrations de ces cations en provoquant une inhibition du développement de la plante. A cet effet, nous rappelons que les concentrations respectives de cadmium, cuivre et de zinc égale à : 1 ; 0,1 et 12,8mg.L⁻¹ induisent des taux d'inhibition de la croissance de la plante égaux à :

- $75,00 \pm 29,4$ à 6 jours pour le cadmium
- 65 ± 28 à 6 jours pour le cuivre
- $75,58 \pm 0,4$ à 2 jours pour le zinc

Cette inhibition de la croissance contribue au blocage de l'assimilation de Ca^{2+} et Mg^{2+} pour la biomasse végétale. L'élévation de la dureté des milieux combinés pourrait démontrer l'état de stress d'un milieu aqueux contenant des cations métalliques. L'idéale serait de réaliser plusieurs essais afin de quantifier de manière fiable, l'augmentation de la dureté des solutions contaminées et d'en déduire un modèle mathématique qui exprimerait l'accroissement de la dureté en fonction des taux d'inhibition de la croissance.

6.4 Effet du cadmium, cuivre et le zinc sur l'état écophysiological de la *Lemna gibba*

6.4.1 Effet du Cd^{2+} , Cu^{2+} , et du Zn^{2+} sur la synthèse de la chlorophylle « a »

La variation de l'indice écophysiological DO665/DO665a définie dans le chapitre matériel et méthode au paragraphe 5.3.2. en fonction des différentes concentrations de Cd^{2+} , Cu^{2+} et de Zn^{2+} des milieux de culture est donnée dans les tableaux 20, 21 et 22. Cet indice des stress est le rapport de la densité optique de la chlorophylle « a » sur son produit

de dégradation, la phéophytine « a ». Cet indice évolue parallèlement au taux de chlorophylle « a » contenu dans la plante. Plus l'indice de stress est élevé, plus la quantité de chlorophylle « a » est importante dans la plante synonyme d'activité photosynthétique, et donc d'un bon état physiologique du végétal.

A partir d'une étude comparative sur le contenu en pigments chlorophylliens des plantes contenues dans les échantillons témoins et les réponses aux stress générés par le contact de la plante avec les milieux de culture contaminés par le Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} , les classes limites de la qualité écophysio-logique, pour la *Lemna gibba*, seront déterminées comme au paragraphe 10.5.3 chapitre 3.

Selon l'étude statistique et les observations faites sur les plantes cultivées dans le milieu témoin, le tableau n°13.6 présente les valeurs des indices de stress par classe de qualité écophysio-logique inspiré de la méthode de CARBALLEIRA [59].

Tableau n° 13.6 : Classe de qualité écophysio-logique pour l'indice de stress (**Is**) dans le cas de notre étude.

Stress	Stress intermédiaire	Stress faible	Stress nul
IS ≤ 1,05	1,05 < IS ≤ 1,36	1,36 < IS < 1,5	IS > 1,5

Les tableaux 14.6 15.6 et 16.6 présentent les valeurs moyennes des indices de stress (**Is**) des plantes dans les milieux nutritifs témoins et contaminés.

Tableau n°14.6 : Valeurs moyennes de l'indice de stress ± écart-types pour les différentes durées de test. Cas du cadmium

Cd ²⁺ en mg.L ⁻¹	témoin	0,5	1
	DO665/DO665a	DO665/DO665a	DO665/DO665a
Jours	IS ± E.T	IS ± E.T	IS ± E.T
2	1,07 ± 0,2	2,4 ± 0,08	0,7 ± 0,01
4	1,54 ± 0,6	2,35 ± 0,07	1,00 ± 0,04
6	1,43 ± 0,5	1,96 ± 0,6	1,00 ± 0,03
8	1,32 ± 0,4	1,90 ± 0,5	0,97 ± 0,01
10	1,18 ± 0,5	1,88 ± 0,4	0,82 ± 0,04

Is: correspond aux valeurs moyennes de l'indice de stress

E.T : correspond à l'écart type

Les résultats de l'indice de stress pour les témoins montrent que ceux –ci (**IS** ± **E.T**) sont relativement supérieurs à 1,5 ce qui indique les conditions d'un stress nul. La chute de l'indice de stress (**IS**) observée pour les plantes contenues les milieux de cultures témoins (tableau 14.6) est vraisemblablement due à l'épuisement progressif des oligo-éléments indispensable à la croissance des plantes. Ces résultats montrent également que l'indice de stress des témoins (**IS** ± **E.T**) et ceux des milieux contaminés par 0,5 mg.L⁻¹ de Cd²⁺ se caractérisent par des valeurs de (**IS**) (**IS** ± **E.T**) signifiant un stress faible, avec une probabilité se situant à la limite de la valeur significative (cas du milieu de culture contaminé par 0,5 mg.L⁻¹ de Cd²⁺). Les observations visuelles contredisent ces résultats. En effet, on observe une décoloration des plantes dans le milieu de culture contenant 0,5 mg.L⁻¹ de Cd²⁺. Toutefois, une coloration acceptable est observée dans le milieu de culture témoin.

Le milieu de culture contaminé par 1mg.L⁻¹ de cadmium a donné des indices de stress faibles correspondant à des taux d'inhibition de la plante élevés. Ces taux d'inhibition sont égaux à :

- 75 % ± 29,42 ; le 6^{ième} jour pour un indice de stress (**IS**) de 1,00 ± 0,03
- 83,33 % ± 34,27 le 8^{ième} jour pour un indice de stress (**IS**) de 0,97 ± 0,01

Les observations de ces tests permettent de conclure que l'indice de stress est un paramètre qui correspond à des taux d'inhibition de la croissance dépassant 70%.

Cependant, pour les essais avec 0,5 mg.L⁻¹ de Cd²⁺, les valeurs des indices de stress obtenus (**IS** > 1,5) ne nous renseigne pas sur les inhibitions de la croissance. Les taux d'inhibition de la croissance obtenus pour 0,5 mg.L⁻¹ de Cd²⁺ sont respectivement pour les jours 2, 4, 6, 8, 10 à 0 ; 15,38 ± 4,7 ; 20,3 ± 3,33 ; 40,00 ± 13,6 ; 37,50 ± 14,15 ; 42,86 ± 14,9 n'excédant pas 50 %. Par conséquent, de faibles indices de stress correspondent à la destruction totale du végétal. Dans le cas des inhibitions partielles de la croissance (taux d'inhibition < 50%), l'indice de stress indique des stress faibles ou nul, car la biosynthèse de la chlorophylle n'est pas totalement inhibée.

Tableau n°15.6 : Valeurs moyennes de l'indice de stress \pm écart-types pour les différentes durées de test : Cas du cuivre.

Cu ²⁺ en mg.L ⁻¹ Jours	témoin	0,014	0,1
	DO665/DO665a	DO665/DO665a	DO665/DO665a
	IS \pm E.T	IS \pm E.T	IS \pm E.T
2	1,07 \pm 0,2	1,6 \pm 0,6	0,2 \pm 0,02
4	1,54 \pm 0,6	1,4 \pm 0,7	0,2 \pm 0,02
6	1,43 \pm 0,5	1,23 \pm 0,2	0,2 \pm 0,01
8	1,32 \pm 0,4	1,05 \pm 0,4	0,17 \pm 0,1
10	1,18 \pm 0,5	1,05 \pm 0,4	0,14 \pm 0,1

Is: correspond aux valeurs moyennes de l'indice de stress

E.T : correspond à l'écart type

Tableau n°16.6 : Valeurs moyennes de l'indice de stress \pm écart-types pour les différentes durées de test : Cas du zinc

Zn ²⁺ en mg.L ⁻¹ Jours	témoin	0,6	12,8
	DO665/DO665a	DO665/DO665a	DO665/DO665a
	IS \pm E.T	IS \pm E.T	IS \pm E.T
2	1,07 \pm 0,2	1,08 \pm 0,2	1,05 \pm 0,01
4	1,54 \pm 0,6	1,15 \pm 0,1	1 \pm 0,06
6	1,43 \pm 0,5	1,37 \pm 0,3	1,03 \pm 0,07
8	1,32 \pm 0,4	1,30 \pm 0,3	0,88 \pm 0,3
10	1,18 \pm 0,5	1,28 \pm 0,2	0,74 \pm 0,4

Is: correspond aux valeurs moyennes de l'indice de stress

E.T : correspond à l'écart type

Les résultats des tableaux 15.6 et 16.6 montrent un stress prononcé respectivement pour 0,1 mg.L⁻¹ de Cu²⁺ et 12,8 mg.L⁻¹ de Zn²⁺. Nous remarquons également que ces indices de stress baissent dans tous les cas, ce qui correspond bien à un épuisement de l'activité de

la biosynthèse de la chlorophylle d'une part dans le cas du témoin à partir du 6^{ième} jour et d'autre part à la destruction du végétal par la présence des cations métalliques dans les cas de milieux de vie de la plante contaminés.

Il est reporté que les métaux toxiques influent sur la concentration en pigments chlorophylliens [156] ; [192]. Ce qui est vraisemblablement les cas pour les plantes contenues dans les milieux de culture contenant 1 mg.L⁻¹ de cadmium, 0,1 mg.L⁻¹ de cuivre, et 12,8 mg.L⁻¹ de zinc où les observations visuelles sont en accord avec les résultats des tests ainsi que les taux d'inhibition de la croissance obtenus.

6.4.2 Effet du Cd²⁺ et Cu²⁺ sur la biosynthèse de la proline au niveau de la *Lemna gibba*.

Certaines plantes synthétisent et accumulent les aminoacides (exemple la proline), lorsqu'elles sont soumises à un stress [159] ; [199]. Nous rappelons que des conditions particulières tel qu'une température élevée (50000 lux), l'introduction d'un polluant dans le milieu de vie de la plante où une salinité élevée du milieu nutritif font apparaître des proportions assez importantes de ces aminoacides, indice de déviation du métabolisme azoté. Puisqu'il n'existe pas d'excrétion susceptible d'éliminer les produits en excès, ils s'accumulent alors dans les vacuoles [154].

La proline peut également intervenir dans la régulation du pH cytoplasmique [154].

Dans cet étape, le suivi de l'évolution de la quantité de proline dans la *Lemna gibba* cultivée dans les différents milieux contaminés par le cadmium et le cuivre à différentes concentrations est réalisé en fonction du temps. Les cinétiques d'accumulation de la proline au niveau de la *Lemna gibba* n'ont été considérées que pour les essais introduisant la toxicité du cadmium et du cuivre.

L'examen des figures n° 38.6 et 39.6 présentent les variations de la proline \pm écart types contenue dans la plante.

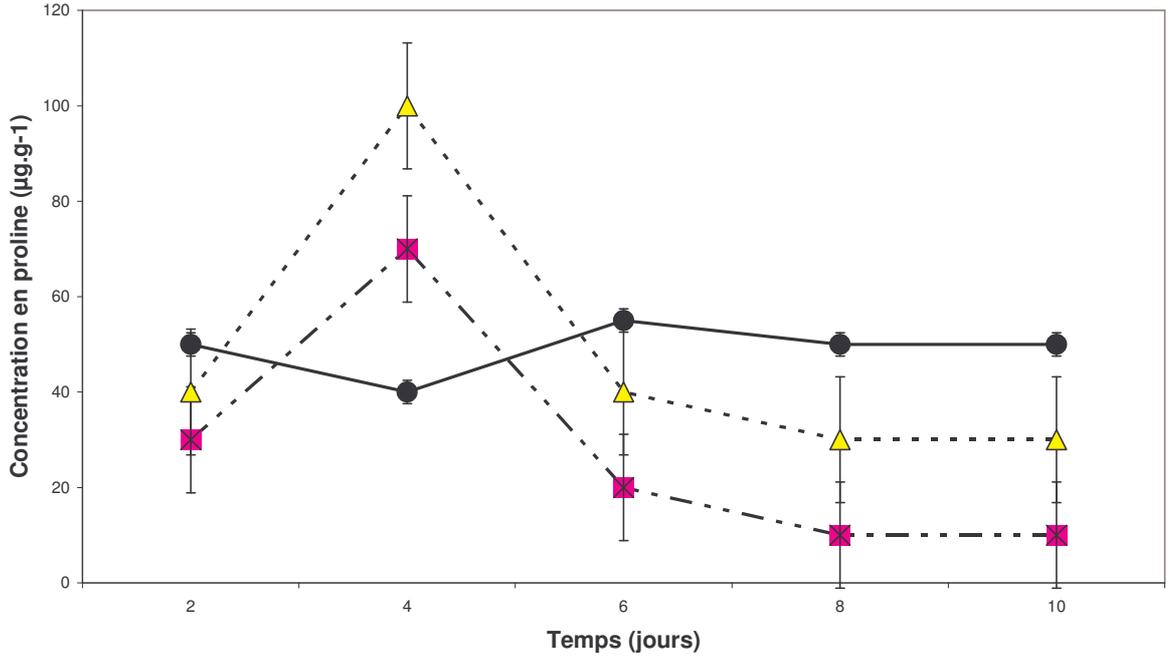


Figure n°38.6 : Evolution de la concentration de la proline dans la plante en présence de cadmium et en fonction du temps.

● Témoin ✖ 0.5 mg.L-1 ▲ 1 mg.L-1

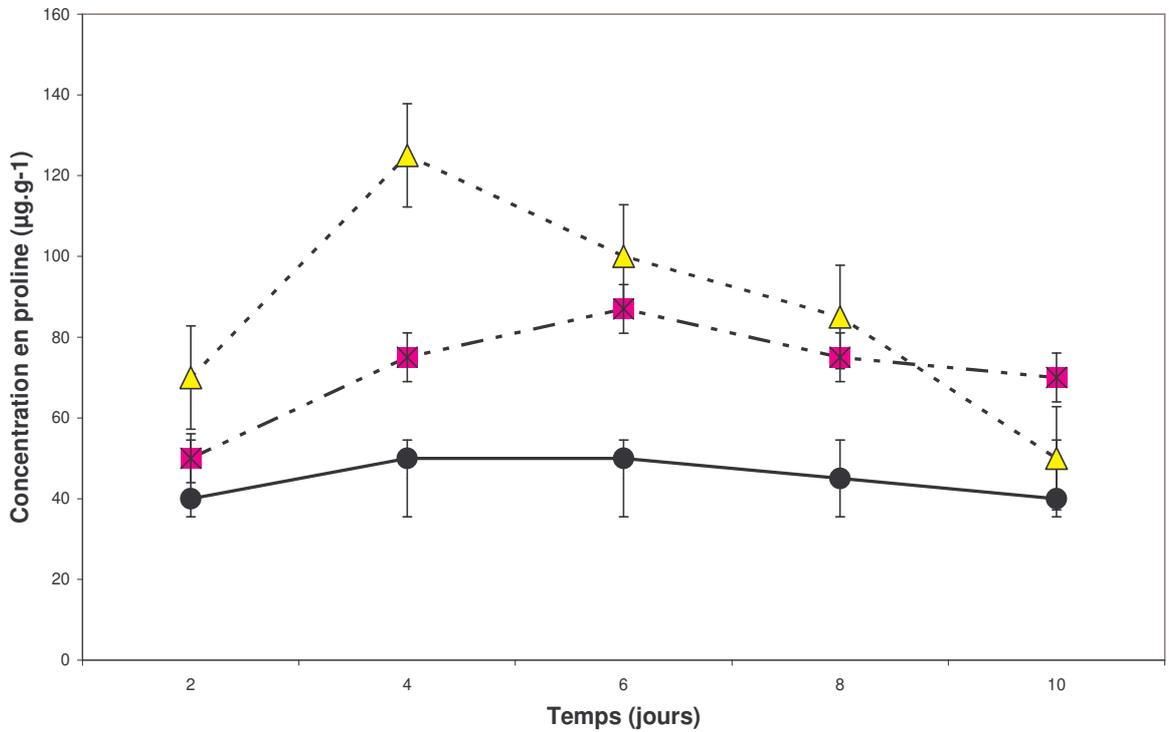


Figure n°39.6 : Evolution de la concentration de la proline dans la plante en présence de cuivre et en fonction du temps.

● témoin ✖ 0,014mg.L-1 ▲ 0,1mg.L-1

Des cinétiques différentes où les concentrations en proline accumulées dans la plante sont fonctions des concentrations en métal testées Cd^{2+} et Cu^{2+} et du temps d'exposition dans les différents milieux de cultures. En effet, les concentrations de 1mg.L^{-1} en cadmium et de $0,1\text{mg.L}^{-1}$ en cuivre induisent une augmentation de la teneur en proline entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour avec des valeurs maximales respectivement égales à : $100 \pm 0,4$ et $125 \pm 0,8\ \mu\text{g.g}^{-1}$ respectivement) (**tableau n° 14 ; Appendice n°F**).

Parallèlement à cette augmentation de la teneur en proline, il a été enregistré de faibles indices éco physiologiques (stress important) indiquant la possibilité d'existence d'une corrélation entre ces deux paramètres pour les concentrations de 1mg.L^{-1} en cadmium et $0,1\text{mg.L}^{-1}$ en cuivre. Cependant, les chutes d'indices de stress observées sont compensées par une accélération de la synthèse de la proline [129] ; [156].

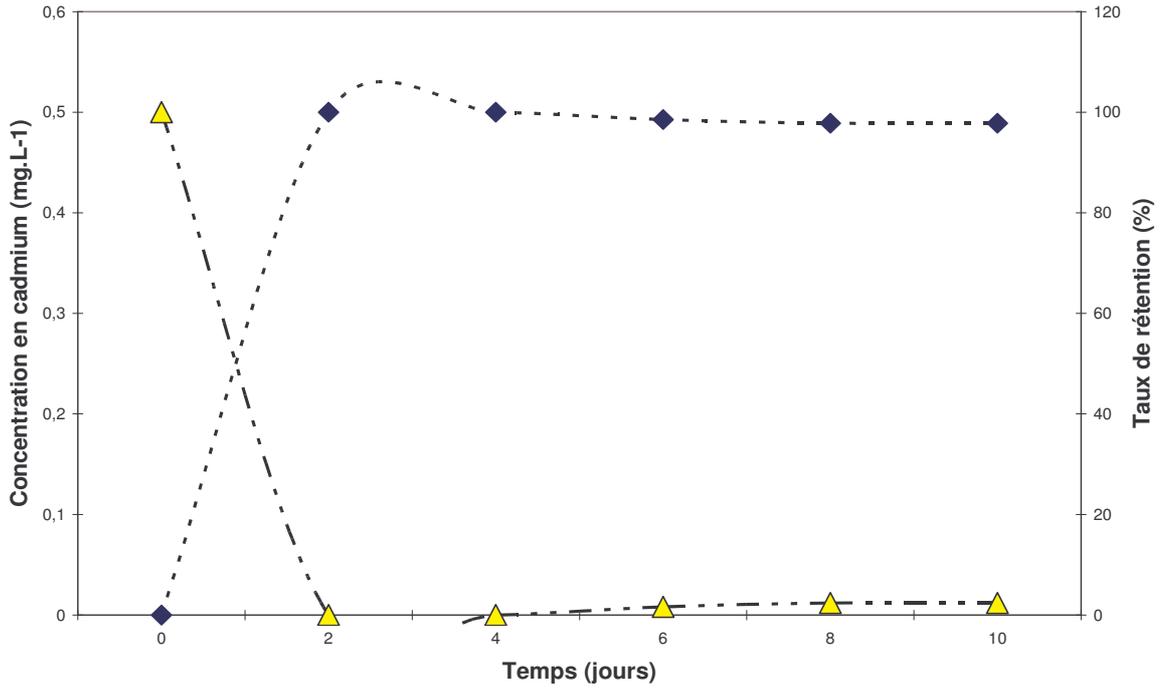
Ces résultats suggèrent l'existence d'une relation vraisemblable entre la biosynthèse des pigments Chlorophylliennes (Indice de stress) et la synthèse de la proline, ce qui laisse croire qu'il existe une interaction entre ces deux composés ; résultant de la disponibilité de leur précurseur commun, le glutamate [193] ; [158].

Malgré ces évolutions, l'analyse statistique montre que l'effet de la contamination par ces métaux lourds sur la synthèse de la proline de la *Lemna gibba* pour les concentrations testées reste non significatif.

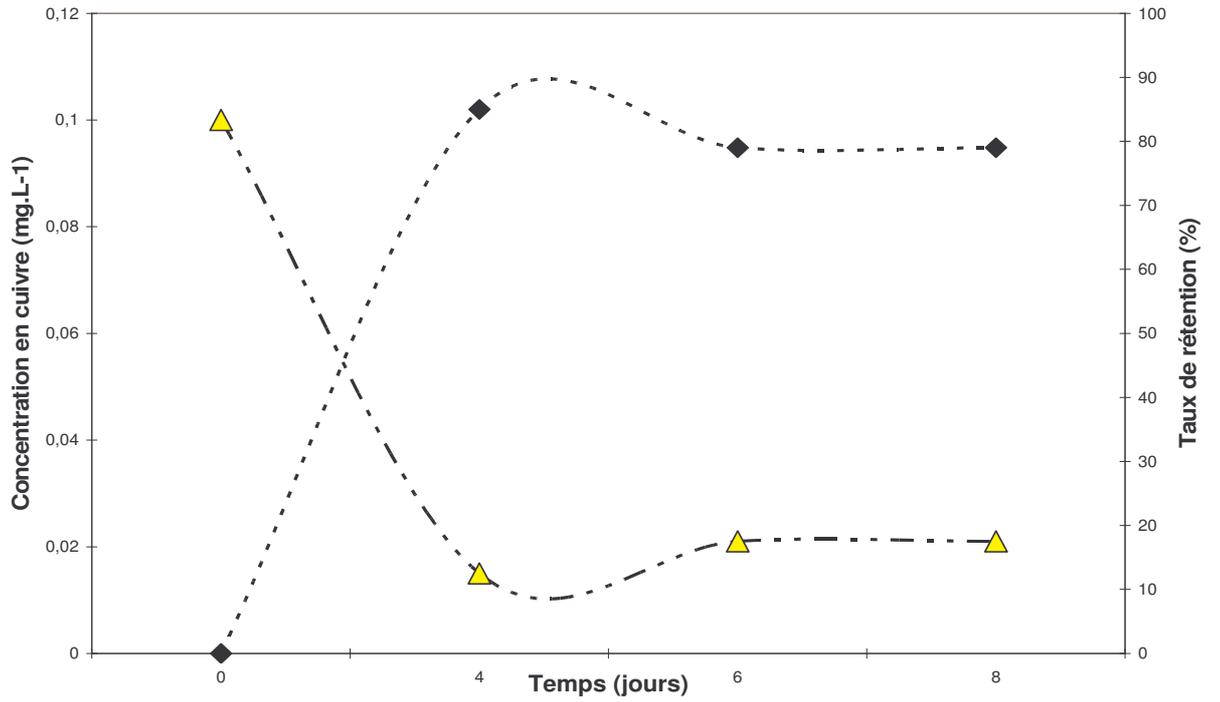
6.5 Etude de la biosorption du Cd^{2+} , Cu^{2+} , et Zn^{2+} sur la *Lemna gibba*

Les variations des concentrations en Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} dans les milieux de culture contaminés ainsi que les quantités de métaux retenus correspondants, exprimés en pourcentage sont représentées par les figures 40.6 ; 41.6 et 42.6.

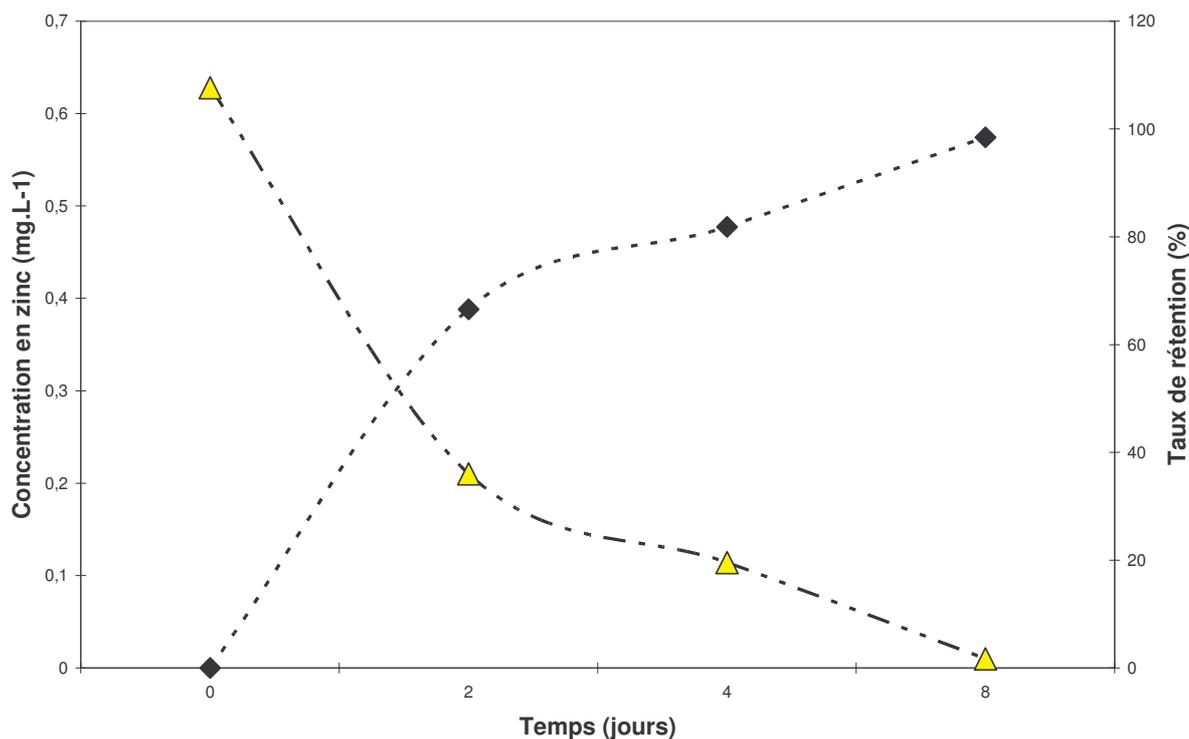
L'analyse des concentrations métalliques est effectuée par absorption atomique, sur les solutions de culture tous les deux jours, les quantités de métaux retenus sont déterminées selon la formule de GJENGEDAL et al [102], citée au paragraphe 4.2 chapitre 5.



A: $[Cd^{2+}] = 0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ à $6,8 \leq \text{pH} < 7,2$



B: $[Cu^{2+}] = 0.1 \text{ mg.L}^{-1}$ à $6,09 \leq \text{pH} < 6,27$



C: $[\text{Zn}^{2+}] = 0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ à $6,4 \leq \text{pH} < 6,48$

Figure n°41.6-A, B, C: Variation de la concentration des métaux dans le milieu et de ses taux retenues sur la plante en fonction du temps


 : Courbe représentant la variation de la concentration

 : Courbe représentant la variation du taux de rétention

Les figures n°40.6-A, B, C ; montre que les concentrations résiduelles de cadmium, cuivre et de zinc chutent respectivement de 0,5 à 0 mg.L⁻¹ au 2^{ième} jour avec un taux d'inhibition de $15\% \pm 4,7$; de 0,1 à 0,013 mg.L⁻¹ au 4^{ième} jour pour un taux d'inhibition de $20\% \pm 10$ et de 0,6 à 0 mg.L⁻¹ au 8^{ième} jour pour un taux d'inhibition de $75\% \pm 28,62$. Cette observation permet d'exprimer les taux maximum d'adsorption de cadmium, cuivre et de zinc qui sont respectivement égaux à 100% ; 85% et 100% et sont obtenus pour différents temps d'exposition de la plante aux toxiques.

Ces taux de rétentions relativement élevées incitent à indiquer le pH de précipitation des métaux en général et de : Cd^{2+} , Cu^{2+} , et Zn^{2+} en particulier, qui est compris entre $7 < \text{pH} < 10,5$.

Nous précisons qu'une fraction de cadmium pourrait précipiter à pH égal à 6,8. Donc nous utiliserons le terme rétention pour l'adsorption du métal sur la plante et sa fraction qui précipite.

La cinétique de rétention du zinc par *Lemna gibba* est différente de celle observée dans le cas du cadmium et du cuivre. Le taux de rétention maximal du zinc dans le milieu de culture pour une concentration de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ est obtenu au bout de 08 jours soit environ 98% à un pH de 6,7.

Selon les travaux de TAYLOR et al [195], il a été démontré que la quantité de cations métalliques absorbée par la plante dépend essentiellement de la taille et de la forme de la cellule ou encore d'une espèce à une autre.

CARBALLEIRA et al [59], ont montrés que les sites de fixation des métaux sur la paroi cellulaire semblent être dépendants du pH du milieu, de la concentration du métal et de l'affinité relative de chaque élément avec la cellule végétale.

En définitive, il a été observé que la biosorption maximale de ces trois métaux Cd^{2+} , Cu^{2+} et le Zn^{2+} par la *Lemna gibba* se produit à des intervalles de temps différents et autour d'un pH compris entre 6,09 et 7,3 (cas du cadmium). Par contre, les études mené par CHOJNOCKA et al [54], sur la biosorption des ions Cr^{2+} , Cd^{2+} et du Cu^{2+} par des algues ont montré que cette biosorption s'obtenait à des pH neutres pour un intervalle de temps de 01 heure à 24 heures [54]. Les pH trouvés dans notre cas ne s'écarte pas trop des pH de CHOJNOCKA et al [54].

Il ressort que la phytoaccumulation de la *Lemna gibba* est plus élevé vis à vis du cadmium que du cuivre et du zinc pour un temps plus court [186]. Ce qui peut être expliqué par la forte affinité de chélation de la phytochélatine (PC) avec les ions Cd^{2+} par rapport aux ions Cu^{2+} et Zn^{2+} [186]. La complexité des processus d'accumulation des métaux chez les plantes aquatiques en particulier, le degré d'assimilation ainsi que le degré de rétention varient d'une espèce à une autre [127] et dépendent des propriétés biochimique de chaque éléments [121]; [128]. Ces résultats sur le phénomène des variations de la biosorption semblent être liés aux propriétés qu'ont chaque métal par rapport à la paroi cellulaire [121].

Les tests de toxicité ont été effectués sur une période de 10 jours ou on a examinée : La croissance de la plante, la variation des PO_4^{3-} , de la dureté et l'aspect physiologie de la plante en présence des métaux lourds (Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}).

Nous, nous sommes proposé le choix de : $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd^{2+} , de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cu^{2+} et de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de Zn^{2+} pour suivre la cinétique de la biosorption de ces métaux par la plante et faire une modélisation et simulation de la rétention de ces métaux afin de comparer les résultats obtenus expérimentalement avec les résultats de la simulation.

CHAPITRE 7

MODELISATION ET SIMULATION DE LA BIOSORPTION DU Cd^{2+} , Cu^{2+} , ET DU Zn^{2+}

7.1 Introduction :

Selon les objectifs de notre étude, il est question de suivre la cinétique de biosorption du cadmium, du cuivre et du zinc sur une période de 10 jours et ce, tous les deux jours. Une modélisation de la biosorption par les plans d'expériences ou le plan non conventionnel a été adoptée. Une simulation est considérée pour estimer les taux de rétention à des temps plus réduits. Les taux de rétentions trouvés par simulation seront comparés avec ceux trouvés expérimentalement.

Pour une meilleure exploitation des résultats expérimentaux relatives à la cinétique de biosorption des trois métaux testés, on utilisera la méthode statistique d'analyse des données qui consiste en une « Régression multiple (**Multiple Linear Regression**) où les variables expliquées du modèle préconisé sont symbolisées par « **Y** » et les variables explicatives exprimées par « **X** ».

Le but recherché dans la méthode des plans d'expériences est de réaliser une exploitation maximale des résultats obtenus et de pouvoir simuler le phénomène de biosorption en fonction des facteurs mise en jeux.

7.2 Principe :

Le plan non conventionnel est une démarche qui permet la réalisation d'un modèle avec un minimum d'essai. Le modèle mathématique ainsi calculé, doit expliquer au mieux, les résultats obtenus au cours des essais. Il servira par la suite, à faire des prévisions dans tout le domaine d'étude, à suivre l'évolution de la réponse prédite, à évaluer et interpréter les effets des facteurs et leurs interactions.

7.2.1 Le choix des facteurs

Les facteurs étudiés, dans notre dispositif expérimental, sont le temps avec six niveaux allant de 0 à 10 ainsi que le pH avec six niveaux compris entre 5 et 10. Ils sont sélectionnés en fonction de leur capacité éventuelle à agir sur la rétention des métaux par la

plante, en d'autres termes, il s'agit de déterminer leurs degrés d'influence sur le taux de biosorption.

7.2.2 Nature des facteurs

- Facteur 1 : le temps ; varie entre [0 –10] jours.
- Facteur 2 : le pH ; varie entre [5 – 10].

7.2.3 Réponses :

- Les différents pourcentages de rétention des métaux étudiés (Cd^{2+} , Cu^{2+} et le Zn^{2+}) par la plante constituent les réponses Y et varient entre [0 –100%].

7.2.4 Elaboration du modèle mathématique

7.2.4.1 Les variables codées :

Dans ce contexte, nous étudierons l'influence de ces facteurs deux à deux, afin de déterminer leurs influences sur la biosorption. Les tableaux n°17.7 et 18.7 regroupe les facteurs avec leurs niveaux ainsi que les variables codées.

Tableau n° 17.7 : Variable codées

variables codées (X_j)	Facteurs	niveau (-1)	niveau (+1)
X_1	1	0	10
X_2	2	5	10

Tableau n° 18.7 : Facteurs selon les niveaux

Facteurs/ X_j	-1	0	+1
1	0	5	10
2	5	7,5	10

Une fois tous les éléments qui constituent la méthode sont définis, on passe à l'application direct de celle-ci après vérification de la moindre variabilité des réponses.

7.2.4.2. Application des plans d'expériences :

La matrice adoptée et une exploitation des résultats expérimentaux sont données par le Logiciel (Hide1., 2003). L'expérience est effectué aux centres des domaines, ce qui se traduit par : $X_1 = X_2 = 0$ où le temps $t = 5$ jours et le $\text{pH} = 7,5$ ce qui se traduit par :

$$\begin{aligned} [X_1 = 0, t = 5] \\ [X_2 = 0, \text{pH} = 7,5] \end{aligned}$$

7.2.5 Exploitation des résultats :

7.2.5.1 Modèle linéaire avec interactions :

Le model linéaire à priori postulé selon le logiciel pour toutes les réponses sera écrit sous la forme :

$$Y = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + a_{12}x_1x_2 + a_{11}x_1^2 + a_{22}x_2^2$$

Dans ce model, 06 coefficients sont inconnus, ce qui donne 06 essais à réaliser pour les déterminer.

Les coefficients du modèle ; a_0 , a_1 , a_2 , a_{12} , a_{11} , a_{22} nous seront immédiatement fournis par le logiciel HIDE 1 et correspondent à :

a_0 : est une constante, c'est la valeur de la réponse pour le point central du domaine d'étude

a_1 : est l'effet du facteur 1, le temps ;

a_2 : est l'effet du facteur 2, le pH ;

a_{12} : est l'interaction entre les facteurs 1 et 2 (temps et le pH)

On effectuera une étude au cas par cas afin de présenter un model spécifique à ces cas dont les facteurs doivent correspondre aux réponses.

7.3 Etude de la modélisation de la biosorption du cadmium sur La *Lemna gibba*

L'échantillon contaminé en cadmium dont la valeur de la concentration est de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ sera examiné en fonction des deux facteurs : Le temps et le pH.

Les pourcentages de rétention du métal par la plante dans le milieu contaminé de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cadmium constituent la réponse qui est symbolisés par « Y ».

La matrice d'expérience de la réponse correspondante à l'échantillon contaminé en cadmium ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$), résultante de la simulation est :

Tableau n°19.7 : Différents matrices d'expérience pour les deux réponses en Cd^{2+}

Echantillon contaminé par 0,5 mg.L ⁻¹ de Cd ²⁺			
N°d'essai	Facteur A : (temps)	Facteur B : (pH)	Réponse Y _{exp} (%)
1	-1	0,24	0
2	-0,6	-0,25	100
3	-0,2	-0,08	100
4	0,2	-0,15	98,54
5	0,6	-0,2	97,81
6	1	-0,19	96

A travers cette matrice d'expérience, on peut écrire les modèles mathématiques correspondants aux réponses que sont les pourcentages de rétention des métaux à étudier par la plante. Le schéma à suivre sera à suivre :

- Le calcul des coefficients et leurs écart-types ;
- Les tests statiques : Analyse de la variance et le diagramme des résidus ;
- Une étude des effets des facteurs et interactions ;
- le tracé des surfaces de réponse et des courbes d'iso réponses.

La matrice de calcul est une matrice (6,6) puisqu'il y a 6 essais et 6 coefficients dans le modèle postulé. Une fois les facteurs introduits dans l'ordinateur, le logiciel calcul les coefficients et leurs écart-types qui seront donnés dans les tableau n° 20.7 cas du cadmium, tableau n° 22.7 dans le cas du cuivre et tableau n° 24.7 dans le cas du zinc.

7.3.1 Modèles et Dispersions

Le modèle mathématique correspondant à cette réponse, ainsi que les sources de dispersions sont données par le tableau n° 20.7

Tableau n°20.7 : Sources de dispersions et modèle mathématique : Cas du cadmium.

Termes du modèle	Coefficients du modèle de l'échantillon contaminé par 0,5 mg.L ⁻¹ de Cd ²⁺						
	termes	erreur	Sources de dispersion	Somme des carrés	Carrés moyens	d.d.l	
Constante	69,57	± 0,00	Résiduelle	0	0	5	
x_1	-40,18	± 0,00	Expliqué	8091,507	1618,30	5	
x_2	-373	± 0,00	Total	8091,507	1618,30	5	
$x_1 \cdot x_2$	-147	± 0,00	R ²	1			
x_1^2	+4,5	± 0,00	R ² _{ajusté}	1			
x_2^2	-1042	± 0,00					

Modèle linéaire correspondant : $Y = 69,57 - 40,18X_1 - 373X_2 - 147X_1X_2 + 4,5X_1^2 - 1042X_2^2$

Selon le tableau 20.7, il apparaît clairement que pour l'ensemble des réponses, l'erreur relative d'estimation est nulle. Les coefficients trouvés pour ces modèles permettent d'établir les modèles prédictifs du second degré avec interaction correspondant à nos essais.

On constate également que la somme des carrés résiduels plus la somme des carrés expliqués est égale à la somme des carrés total (tableau n° 20.7). Ce ci nous ramène sur la validité des modèles postulés.

La prédiction de notre modèle est envisageable lorsqu'un certain nombre de critère est rempli. Les résultats donnés par le logiciel selon les données de nos essais, montre que R^2 et R^2 ajusté donne une valeur égale à 01 conséquence d'une matrice carrée.

7.3. 2. Qualité des modèles

7.3.2.1. Analyse résiduelle

L'étude de la qualité des modèles vise à évaluer le degré de leur ajustement et la précision de leur prédiction.

Les résidus correspondent à la différence que l'on observe entre les valeurs prédites avec les valeurs effectivement mesurées. Lorsque les résidus sont distribués de façon aléatoire et que cela ne laisse apparaître aucune relation précise avec les réponses prédites, on peut se convaincre que le modèle du second degré est acceptable. Ce qui est le cas avec les différents diagrammes de dispersion de nos modèles (figures 10 ; annexe G), témoigne de cette dispersion, pour les échantillons contaminés de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cadmium.

7.3.2.2. Ecart d'ajustement

Les figures n° 11 et 12 appendice H, représente le graphe des valeurs prédites en fonction des valeurs observées ou les écarts sont tout à fait acceptables. Cette figure représente les réponses observées en fonction des réponses prédites. Elle montre pour l'ensemble des réponses une distribution très étroite des points le long de la première bissectrice, ce qui reflète les faibles valeurs d'écarts résiduels. L'ensemble des observations faites à l'issue de cette analyse, permet de certifier l'adéquation du modèle.

On peut considéré que le modèle mathématique du second degré correspondant à notre essai de biosorption de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cadmium est un modèle acceptable pour représenter les résultats du plan d'expérience. Ce modèle permettra de faire des prévisions dans leur domaine d'études.

7.4 Simulation : cas du cadmium

7.4.1 Etude des impacts des effets des facteurs et des interactions sur le taux de la phytoaccumulation

La classification des facteurs et leurs interactions selon leur influence ou leur importance est donnée par la figure n°48.7. On peut prédire la réponse en précisant l'impact d'un facteur par rapport à un autre. Dans le cas étudié, les effets et interactions par régression linéaire seront examinés avec les valeurs de pH fixées.

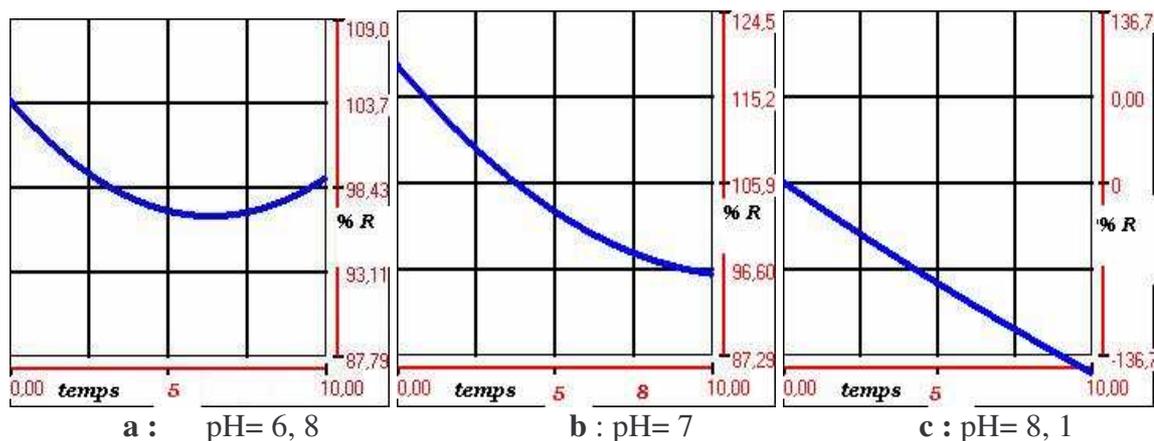


Figure n°41.7: Evolution du pourcentage de rétention en fonction du temps à différents pH : Cas du cadmium à $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

Ces résultats permettent de conclure que la rétention est étroitement liée au pH et au temps. En effet, pour le cas de la contamination de cadmium à $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ (figure n° 41.7).

- Une rétention optimale de 96 % pour un temps compris entre 0 à 2 jours est obtenue pour un pH de 6,8 pour une concentration de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cadmium (a), alors qu'une rétention comparable est observée pour un pH de 7 pour un temps assez long (6 à 7 jours) (b). Par ailleurs, pour une augmentation du pH à 8, aucune rétention n'est enregistrée ce qui signifie qu'on ne se trouve plus dans la zone optimale (c).

7.4.2 Courbes d'isoreponses

La courbe d'isoreponse représentant le taux de rétention optimal en fonction des paramètres considérés est donnée par la figure n°42.7. On trouve par simulation, une rétention optimale dans le milieu considéré à des temps et pH optimum.

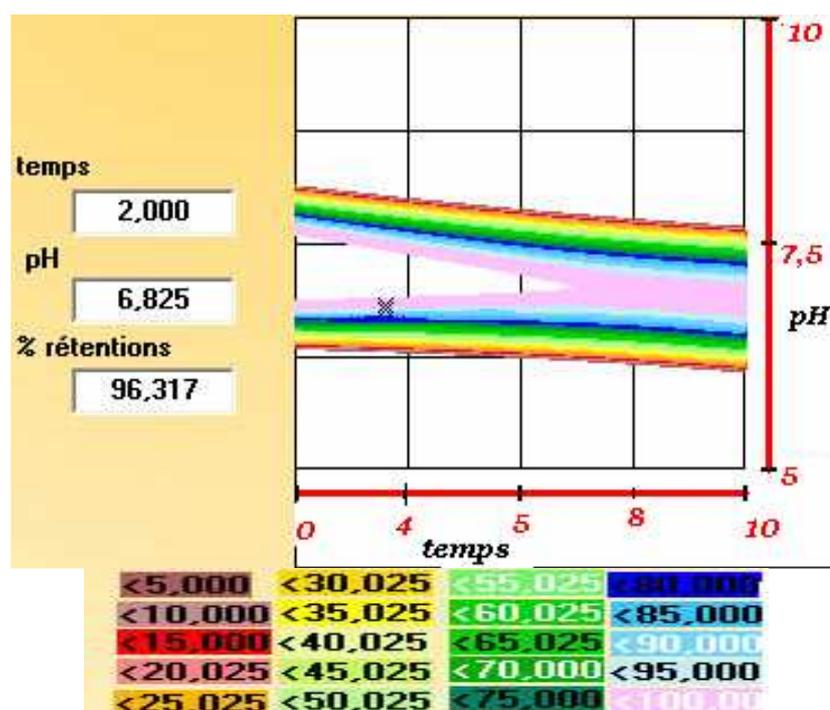


Figure n°42.7: courbe d'isoréponse par intervalle ($Y_{\max} = 100$; Pas = 5) :
Cas du cadmium à $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$.

Chaque couleur correspond à une réponse sachant que les deux axes représentent respectivement l'axe des temps et des pH.

7.4.3 Localisation d'un optimum : D'après les calculs du logiciel, l'optimum qui correspond à la biosorption maximale avec les conditions optimales des tous les facteurs, est la combinaison suivante :

Tableau n° 21.7 : Localisation d'un optimum pour chaque concentration en cadmium

Localisation d'un optimum			
concentration	Facteur 1 : (temps)	Facteur 2 : (pH)	Réponse Y (%)
$0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd^{2+}	[0-2]	6,8	96

7.5. Etude de la modélisation de la biosorption du cuivre par *La Lemna gibba*

7.5.1 Modèles et Dispersions

Le modèle mathématique correspondant à cette réponse, ainsi que les sources de dispersions sont données par le tableau n°22.7 :

Tableau n°22.7 : Sources de dispersions et modèles mathématiques : Cas du cuivre.

Termes du modèle	Coefficients des modèles de l'échantillon contaminé à 0,1 mg.L ⁻¹ de Cu ²⁺					
	termes	erreur	Sources de dispersion	Somme des carrés	Carrés moyens	d.d.l
Constante	86,46	± 0,00	Résiduelle	0	0	5
x_1	13,30	± 0,00	Expliqué	6178	1235	5
x_2	18,44	± 0,00	Total	6178	1235	5
$x_1 \cdot x_2$	-28,67	± 0,00	R ²	1		
x_1^2	-85	± 0,00	R ² ajusté	1		
x_2^2	-116,8	± 0,00				

Modèle linéaire correspondant : $Y = 86,46 + 13,30X_1 + 18,44X_2 - 28,67X_1X_2 - 85,4X_1^2 - 116,8X_2^2$

- Les coefficients établis permettent d'obtenir les modèles prédictifs du second degré avec interaction correspondant à nos essais.
- On constate également que la somme des carrés résiduels plus la somme des carrés expliqués est égale à la somme des carrés total (tableau n° 22.7) pour le modèle établi.

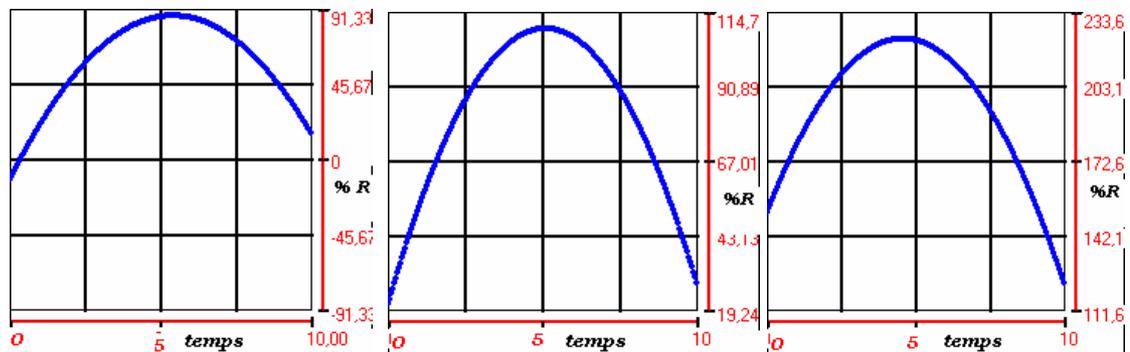
7.5.2 Qualité des modèles

Comme précédemment, la qualité du modèle est présentée par des diagrammes dispersions, le graphe illustrant les valeurs prédites en fonction des valeurs observées (figures n°12 et 13 appendices H). Il ressort de ces informations que la dispersion est faite de façon aléatoire. Cela ne laisse apparaître aucune relation précise avec les réponses prédites, on peut se convaincre que le modèle du second degré est acceptable. Les graphes des réponses observées en fonction des réponses prédites confirment une distribution très étroite des points le long de la première bissectrice, ce qui reflète les faibles valeurs des résidus. L'ensemble des observations faites à l'issue de cette analyse, permet de certifier l'adéquation des modèles retenus. Les résultats présentés par le logiciel en fonction des données de nos essais, montre entre autre que R² et R² ajusté donne une valeurs égale à 1. Ce qui nous permettrons d'utiliser ces modèles pour les prévisions dans leurs domaines d'étude respectifs.

7.6. Simulation : cas du cuivre

7.6.1- Etude des impacts des effets des facteurs et des interactions sur le taux de la phytoaccumulation : Cas du cuivre

La figure n°43.7 présente les effets et interactions par régression linéaire lorsque les pH sont fixés.



a: pH =6

b: pH =6, 37

c: pH= 7

Figure n° 43.7: évolution du pourcentage de rétention en fonction du temps à différents pH cas du cuivre à $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

Les observations liées l'évolution du pourcentage de rétention en fonction du temps et du pH sont :

- Pour une contamination de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de cuivre on enregistre un taux de rétentions égal à 55% pour une durée de 02 jours pour un pH égal à 6 (a). Toute fois, pour un temps compris entre 2 et 4 jours, on atteint une valeur proche de 90%. Par contre, lorsque le pH passe à 6,37, le taux de rétention augmente également pour atteindre une valeur de 85% pour un temps copris entre 2 à 3 jours (b). Par ailleurs, une augmentation du pH à 7, aucune rétention n'est enregistrée ce qui signifie qu'on ne se trouve plus dans la zone optimale (c) (figure n°43.7).

7.6.2 Courbes d'isoréponses

La courbe d'isoréponse représentant le taux de rétention optimal en fonction des paramètres considérés (temps et pH) est donnée par la figure n°44.7.

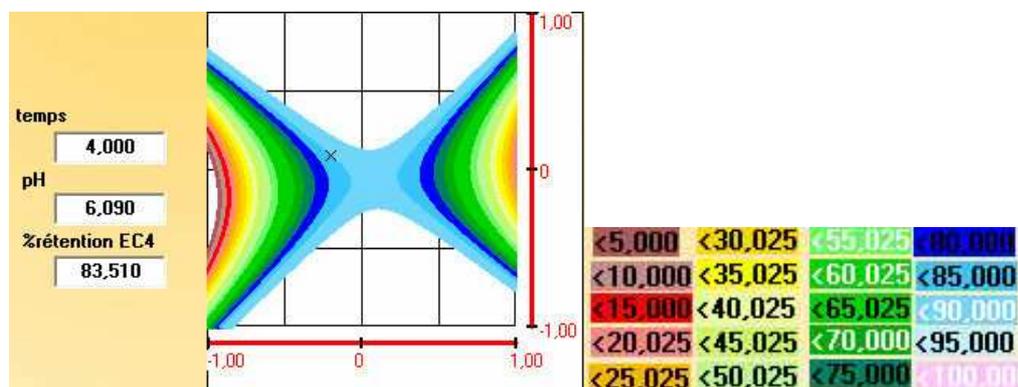


Figure n° 44.7 : courbe de niveau (Ymax =90% ; Pas=5).

7.6.3 Localisation d'un optimum : D'après les calculs du logiciel, l'optimum qui correspond à la biosorption maximale avec les conditions optimales des tous les facteurs, est la combinaison suivante :

Tableau n° 23.7 : Localisation d'un optimum pour la concentration de cuivre

Localisation d'un optimum			
concentration	Facteur 1 : (temps)	Facteur 2 : (pH)	Réponse Y (%)
0,1 mg.L ⁻¹	[2-4]	6,09	83,51

7.7 Etude de modélisation de biosorption du zinc par La *Lemna gibba*

7.7.1 Modèles et Dispersion

Les modèles mathématiques correspondant à ces trois réponses, ainsi que les sources de dispersions sont donnés par le tableau n° 24.7 :

Tableau n°24.7 : sources de dispersions et modèles mathématiques : Cas du zinc.

Termes du modèle	Coefficients des modèles de l'échantillon contaminé à 0,6 mg.L ⁻¹ de Zn ²⁺					
	termes	erreur	Sources de dispersion	Somme des carrés	Carrés moyens	d.d.l
Constante	506	± 0,00	Résiduelle	0	0	5
x_1	257,4	± 0,00	Expliqué	5793	1158,77	5
x_2	-2541,6	± 0,00	Total	5793	1158,77	5
$x_1 \cdot x_2$	-724,1	± 0,00	R ²	1		
x_1^2	-28,98	± 0,00	R ² _{ajusté}	1		
x_2^2	3757,82	± 0,00				

Modèle linéaire correspondant : $Y = 506 + 257X_1 - 2541,6X_2 - 724X_1X_2 - 28X_1^2 + 3757X_2^2$

Selon le tableau 24.7 Les coefficients établis pour ces modèles permettent d'obtenir les modèles prédictifs du second degré avec interaction correspondant à nos essais. On observe plus ou moins les mêmes caractéristiques de ces modèles établis en fonctions des données de l'essai du zinc.

7.7.2 Diagramme de dispersion des deux réponses

On constat que l'ensemble de ces diagrammes Figure n°14 et15 appendice H montre une dispersion aléatoire. Ce qui nous emmène à dire que ces modèles établis pour chacune des réponses expliquent bien les résultats expérimentaux et d'affirmer que ces modèles pour les prévisions dans leurs domaines d'étude respectifs sont prédictibles dans le cas du zinc.

7.8 Simulation : cas du zinc

7.8.1 Etude des impacts des effets des facteurs et des interactions sur le taux de la phytoaccumulation

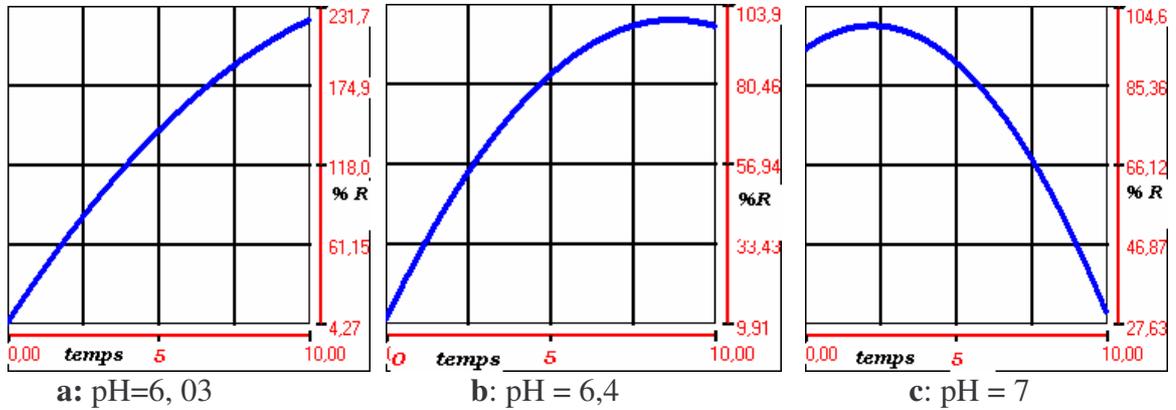


Figure n°45.7: évolution du pourcentage de rétention en fonction du temps à différents pH (à 0,6 mg.L⁻¹)

- Dans la figure n° 45.7-a, on peut estimer le maximum de rétention pour un pH égal à 6,03 soit 69% de rétention et ce au deuxième jour. L'augmentation du pH à 6,4 entraîne automatiquement une diminution du taux rétention soit à un pourcentage égal à 57% au 2^{ième} jour. On remarque pour un pH égal à 6,4 que le taux de rétention augmente en fonction du temps pour atteindre une valeur de 80% au jour 5 (figure n° 45.7-b).

En revanche, pour un pH égal à 7, on obtient une rétention plus élevée pour une même durée (figure n° 45.7-c).

7.8.2 Courbes d'isoréponses

La simulation permet d'obtenir les courbes de niveau ainsi que le graphe des réponses en fonction des valeurs prédites et sont donnés par les figures n° 46.7.

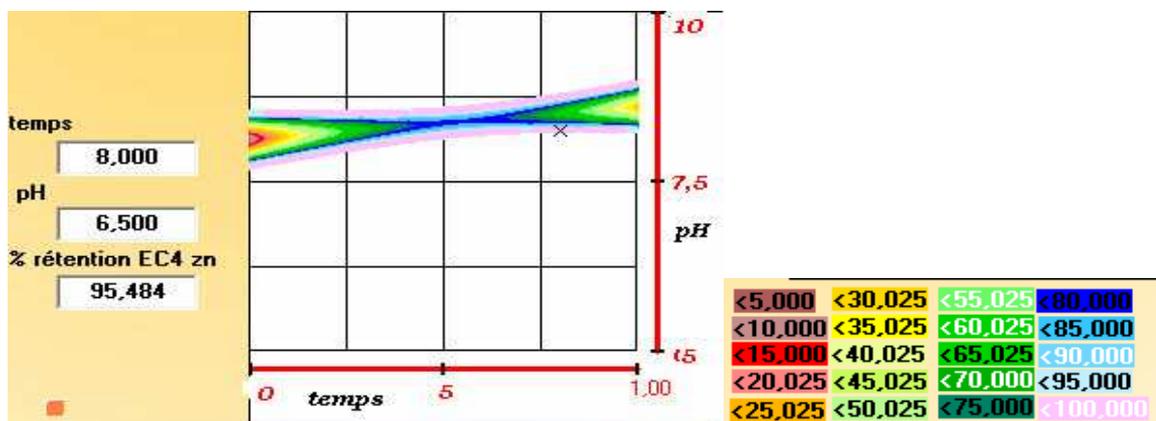


Figure n°46.7: courbe de niveau pour l'échantillon contaminé à 0,6 mg.L⁻¹

7.8.3 Localisation d'un optimum : D'après les calculs du logiciel, les optimums qui correspondent à la biosorption maximale avec les conditions optimales des tous les facteurs, sont les combinaisons suivantes :

Tableau n° 25.7 : Localisation des optimums en fonction des facteurs.

Localisation d'un optimum			
concentration	Facteur 1 : (temps)	Facteur 2 : (pH)	Réponse Y (%)
0,6 mg.L ⁻¹	8	6,5	95

On s'aperçoit que les résultats obtenus par les modèles sont très proches aux résultats trouvés expérimentalement (tableau 31.1).

Tableau 26.1 : tableau comparatif des réponses

Optimums			
concentrations	Réponses théoriques	Réponses expérimentales	Ecart moyen
0,5 mg.L ⁻¹ Cd ²⁺	96%	100%	4%
0,1 mg.L ⁻¹ Cu ²⁺	83%	85%	1%
0,6 mg.L ⁻¹ Zn ²⁺	95%	100%	5%

Il est donc envisageable d'utiliser ce modèle pour estimer les prévisions des résultats trouvés sur l'expérimentation. Aussi, de tels modèles permettent d'envisager les résultats sur les expériences menées *in vivo*.

Le modèle linéaire avec les interactions prises en considération était assez représentatif, pour pouvoir simuler le phénomène de bioaccumulation. Les écarts moyens relatifs entre les pourcentages expérimentaux et ceux obtenus par la prédiction de tous les essais sont acceptables soit 5% maximal, sachant l'écart relatif est acceptable pour un modèle est de l'ordre de 5%.

Discussion et Conclusion générale

L'objectif de ce travail était dans un premier temps de montrer que la *lemna gibba* est un outil adapté pour la biosurveillance active des cours d'eau. Dans un second temps de réaliser un modèle de bioaccumulation des métaux lourds : Cd^{2+} , Cu^{2+} , et Zn^{2+} à travers cette plante. Deux grands axes ont été distingués pour réaliser cette étude : L'optimisation de la culture en vue d'une bioindication de la qualité des eaux et une approche modélisatrice de l'absorption, voir rétention de ces métaux (adsorption et précipitation).

Une première étude bibliographique du processus de phytoremédiation a permis de comprendre les interactions « *Environnement-Métaux- lemna* », ce qui a été clairement mis en évidence.

Le choix du milieu de culture et de la plante ont été une étape primordiale à l'élaboration d'une stratégie expérimentale permettant la mise en évidence d'un outil de suivi de la qualité des eaux, et de la modélisation de la biosorption.

De ce fait, l'analyse des variations spatio-temporelles de la croissance de la *lemna*, en lien avec les paramètres environnementaux (pH, milieu nutritif, luminosité...) nous a favorisé à l'estimation des besoins de cette plante à assurer sa croissance, et les conditions physiologiques.

Ainsi les résultats trouvés nous ont conduit à conclure les constatations suivantes :

- Les différentes contaminations en particulier les contaminations algales inhibent la croissance de la *Lemna*. En effet, une stérilisation de la plante avant toute culture s'avère indispensable. Cependant un cycle de stérilisation a été déterminé.
- A des pH faibles, la croissance de *Lemna* est ralentie.
- Développement optimal dans un milieu minéral dilué (Milieu de **Haogland., 1938** dilué 10 fois) sous une forte luminosité. Ces conditions ont donné des colonies présentant un aspect physiologique remarquable (forte pigmentation, taille des frondes assez grandes, des racines longues.)

Une résistance appréciable de la plante étudiée vis-à-vis des polluants métalliques : Cadmium, cuivre et le zinc a été testée.

Il a été très intéressant d'intégrer l'effet même du contaminant sur la physiologie de la plante. C'est ainsi que la simulation de la physiologie de l'organisme a mis en relief l'état du milieu à travers celle de la plante (écophysiologie).

Ainsi en tant qu'indicateur de la qualité des eaux, le suivi de l'état physiologique de cette plante a été important et joue un rôle prépondérant dans la qualité de la mesure obtenue. L'utilisation de l'indice de stress D665/665a a été proposée pour caractériser cet état physiologique de la plante ou un rapport élevé signifie que la concentration en chlorophylle a est plus importante que son produit de dégradation (phéophytine a) et par conséquent est synonyme d'un bon état de santé de la plante. Cet indice détecte précisément les variations de l'activité photosynthétique en présence d'un polluant donné. Il a été montré que les fortes concentrations en cadmium et en cuivre induisaient des faibles indices de stress dont les proportions sont :

- Cadmium (1 mg.L^{-1}) : Indice de Stress (IS) égal à $0,97 \pm 0,01$ pour une valeur de IS $> 1,5$ de stress nul et un taux d'inhibition de la croissance maximal égal à 92 %
- Cuivre ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) : Indice de Stress (IS) égal à $0,2 \pm 0,02$ pour une valeur de IS $> 1,5$ de stress nul et un taux d'inhibition de la croissance maximal égal à 85%
- Zinc ($12,8 \text{ mg.L}^{-1}$) : Indice de Stress (IS) égal à $0,88 \pm 0,3$ pour une valeur de IS $> 1,5$ de stress nul et un taux d'inhibition de la croissance maximal égal à 100%

Tout comme l'indice de stress, la proline semble être représentatives de l'état physiologique de la plante donc de la qualité du milieu dans laquelle se trouve la plante.

Nous avons trouvés différentes proportions en proline supérieure aux proportions dans les milieux ne subissant pas de contamination.

Cette aptitude de la *Lemna gibba* à synthétiser et accumuler la proline est une des propriétés de nombreuses espèces de plantes soumises à un quelconque stress. Certains auteurs tel que SINCH *et al.*, 1973 pensent que les quantités accumulées pourraient être liées au niveau de tolérance aux stress. Elle pourrait, également, intervenir dans la régulation du pH cytoplasmique. Cette évolution de la proline s'est avérée proportionnelle aux indices de stress considéré.

A la lumière de ces résultats, ces méthodes basées sur l'utilisation des plantes aquatiques peuvent s'avérer une alternative intéressante pour :

- L'élimination de la pollution métallique.

- La biosurveillance de la qualité des eaux.

Les essais réalisés ont donc montrés que le cuivre est plus toxique mais le cadmium a la rétention la plus élevée. Par conséquent, la rétention n'entraîne pas forcément la toxicité pour de faibles doses en polluants.

Ensuite, l'observation et l'interprétation de la cinétique des différents contaminants nous ont permis d'évaluer le potentiel de rétention qu'on les *lemna* sur les éléments de traces ce, en fonction du temps.

Les cinétiques de contamination du cadmium favorisent la biosorption maximale à une concentration de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$, où le taux de rétention a atteint une valeur de **100%** ce, dès les deux premiers jours, pendant dix jours et pour un taux d'inhibition maximum de **42%**.

Les cinétiques de contamination du cuivre se rapprochent de celle du cadmium pendant les dix jours de test ou l'échantillon contaminé à $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de cuivre approxime une valeur de rétention maximale de **84 %** au bout de 04 jours avec un taux d'inhibition égal à **85%**.

Pour le cas de la contamination du zinc, la rétention maximale pour la concentration examinée de $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinc est atteinte au bout 08 jours avec une valeur de **91,81%** pour un taux d'inhibition égal à **16%**.

A partir de la description de la cinétique de contamination des différents métaux lourds résultant des données expérimentales, une approche sur la formulation du modèle est envisageable. De ce fait, le mécanisme de bioaccumulation associé aux paramètres influençant ce processus nous mène inévitablement sur un outil complémentaire qui est la modélisation mathématique. Ainsi, la connaissance et les observations aboutissant à une meilleure exploitation de nos résultats peuvent être formalisées et quantifiées par des équations mathématiques appelées modèle. La nécessité de trouver un compromis entre la complexité et le réalisme du modèle reste prépondérante.

Compte tenu des objectifs de l'étude et aussi des observations réalisées, le modèle de bioaccumulation choisi suit une régression mathématique linéaire. Il s'agit du modèle basé sur la planification des expériences. Le modèle choisi est un plan non conventionnel qui

sera exécuté par le logiciel HIDE.1. Il reproduit avec réalisme l'évolution temporelle de la bioaccumulation.

Pour le cadmium, le cuivre et le zinc, le modèle de bioaccumulation est bien ajusté et simule parfaitement les cinétiques observées. La cohérence et la justesse ont été mises en évidence. La simulation dans ce cas, nous a permis d'atteindre des valeurs théoriques proches des valeurs expérimentales en fonction des mêmes contraintes temporelles.

Le modèle de régression linéaire (**MRL**) reste réaliste dans tous les cas des tests réalisés pour la contamination de la *Lemna gibba* avec l'atteinte d'un palier d'adsorption dépendant de la concentration introduite dans le milieu et du temps d'exposition. Les effets, les écarts « estimation- observations » ont été moindres.

Le plan non conventionnel qui correspond à notre étude de part la restriction des essais est un modèle constituant un outil pertinent dans la validation et d'optimisation quantitative de la bioaccumulation des métaux lourds étudiés sur la *lemna gibba*. Il reproduit fidèlement l'importance relative des différentes variations temporelles (temps) en fonction du paramètre environnemental (pH).

Une étude plus approfondie sur la complexation du contaminant permettant de comprendre et d'élucider ces effets sur la bioaccumulation n'a pas été bien élucidée dans ce travail, mais sera une approche fort intéressante.

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Association Française de Normalisation
ISO : International Standard Organisation
FAO/FIDA : Fond International pour l'Alimentation
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economiques
N A S: National Academy of Science
NRC: National Research Council
O.I.E: Organisation International de l'Eau.
IMO: International Maritime Organization
ETM: Element trace métallique
D.I.T:
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
GESAMP: Group of Expert on Scientific Aspect of Marine Pollution
JECFA: Joint Expert Committee for Food additives
ASTM: American Society for Testing and Materials
ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
IPCS: International Program on Chemical Safety
PNEC : prévisible Non Effet Concentration
FIAM : model de l'ion libre
MES : matières en suspension
UV: Ultra Violet
DOE : Design Of Experiments
CE : Commission Européenne

APPENDICE A

1. Principe et intérêt des méthodes de culture *in vitro*

La culture *in vitro* consiste en l'utilisation de tout types de matériel végétal (fragment de tige, feuille, fleur ou fronde...) qui croissent dans des conditions artificielle. Ceci implique l'utilisation d'un support de culture favorable à la croissance.

Les objectifs recherchés en utilisant ces méthodes sont :

- Multiplication rapide et intense en si peu de temps ou pour des longues durées.
- L'obtention d'une production homogène, ce qui confère une bonne représentativité pour diverses tests.

2. Présentation des taux de croissance de la *Lemna gibba* et de la *Lemna minor*

Les tableaux 1 et 2 présentent les différents taux de croissance des *Lemna gibba* et *minor* en fonction de la luminosité et des différents dilutions (H, H/10 et H/100).

Tableau n°1 : Taux de croissance de la *L.minor* en fonction de l'éclairage et de la dilution

Taux de croissance		0 lux				
Jours	0	2	4	6	8	10
H	0	27	40	67	153	187
H/10	0	47	67	93	140	187
H/100	0	40	73	73	127	140
Taux de croissance		2666 lux				
Jours	0	2	4	6	8	10
H	0	60	120	173	273	393
H/10	0	53	80	153	280	380
H/100	0	53	100	113	167	160
Taux de croissance		4000 lux				
Jours	0	2	4	6	8	10
H	0	73	100	147	287	367
H/10	0	60	133	193	313	487
H/100	0	53	80	80	147	180

2.1. Observations :

- Croissance optimale avec les taux de croissance max de 487% dans le milieu H/10 pour un éclairage de 2666 et 4000 Lux.

- Présence d'une faible pigmentation et d'un volume des frondes faibles dans les milieux H/10 et H/100 pour un taux d'éclairage de 2666 et 4000 Lux.
- Présence de quelques contaminations des algues à 2666 Lux pour H/10 ; ce qui laisse croire que ce milieu (H/10), à un éclairage de 2666 Lux , favorise le développement biotique du milieu.

Tableau n°2 : Taux de croissance de la *L.gibba* en fonction de l'éclairage et de la dilution

Taux de croissance		0 lux				
Jours	0	2	4	6	8	10
H	0	20	60	80	80	80
H/10	0	20	40	60	80	40
H/100	0	40	80	40	40	20
Taux de croissance		2666 lux				
Jours	0	2	4	6	8	10
H	0	0	100	140	140	140
H/10	0	20	60	100	120	160
H/100	0	20	80	100	80	140
Taux de croissance		4000 lux				
Jours	0	2	4	6	8	10
H	0	80	120	200	180	220
H/10	0	60	100	140	160	140
H/100	0	40	40	100	100	120

2.2. Observations :

- Croissance optimale avec les taux de croissance max de 160 à 220% dans les milieux H et H/10 pour un éclairage de 2666 et 4000 Lux.
- Présence cependant d'une forte pigmentation et d'un volume des frondes important dans les milieux H/10 pour un taux d'éclairage de 2666 et 4000 Lux.
- Absence de contaminations par des algues à 2666 Lux pour H/10 ; ce qui laisse croire que ce milieu (H/10), à un éclairage de 2666 Lux , favorise le développement biotique du milieu.

En prenant en compte l'aspect taille des frondes et qualité de la pigmentation, le choix est porté automatiquement sur la *Lemna gibba* pour un milieu de *Haogland* dilué 10 fois (H/10) et pour un éclairage de 4000 Lux et une

APPENDICE B

1- Origine et qualités des produits

L'origine et la qualité des produits chimiques utilisés dans les manipulations expérimentales sont données dans le tableau 3 :

Tableau n°3: Caractéristiques (origine et qualité) des différents produits chimiques utilisés

Solutions	(g/L)	Provenances	pureté %
Nitrate de Calcium (S_1): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	11, 8	Panreac QUIMICA SA	99
Nitrate de Potassium (S_2): KNO_3	10, 11	Fluka CHEMIKA	99
Sulfate de magnésium (S_3): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12, 33	Panreac QUIMICA SA	99
Dihydrogénophosphate de potassium anhydre (S_4): KH_2PO_4	6, 8	Reidel de Haën	>98
Sulfate de fer (S_5): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,037	Panreac QUIMICA SA	98
<u>Solutions d'oligo - éléments</u> (S_6)			
Acide Borique: H_3BO_4	2,86	Panreac QUIMICA SA	98
Sulfate de manganèse: $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,55	Panreac QUIMICA SA	99,8
Sulfate de zinc: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22	Merck	>98
Sulfate de cuivre: $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,079	NenTech LTD	98
Solution S_7			
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$	0,128	Panreac QUIMICA SA	99
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,229	Fluka CHEMIKA	99
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,049	GmbH Bolab	98,9
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0478	Normapur PROLABO	99
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,017	Rudi pont	99

2- Détermination des pourcentages d'inhibition de la *Lemna gibba*

Le taux d'inhibition de la croissance de la plante immergée dans les milieux nutritifs contaminés par le cadmium, le cuivre et le zinc est donné par les figures 1, 2, 3, 4, 5 et 6. Le tracé est effectué selon une loi normale, et ce à l'aide du logiciel «Excel».

Le traitement des résultats a permis d'établir les équations qui accompagnent la variation de ce taux d'inhibition dans les milieux contaminés à 0,5 et 1 mg.L^{-1} de Cd^{2+} ; 0,014 et 0,1 mg.L^{-1} de Cu^{2+} ainsi que 0,6 et 12,8 mg.L^{-1} de Zn^{2+} .

Cadmium ($0,5 \text{ mg.L}^{-1}$) : $y = -0,374 .x^2 + 8,2025.x - 0,25$; $R^2 = 0,9599$

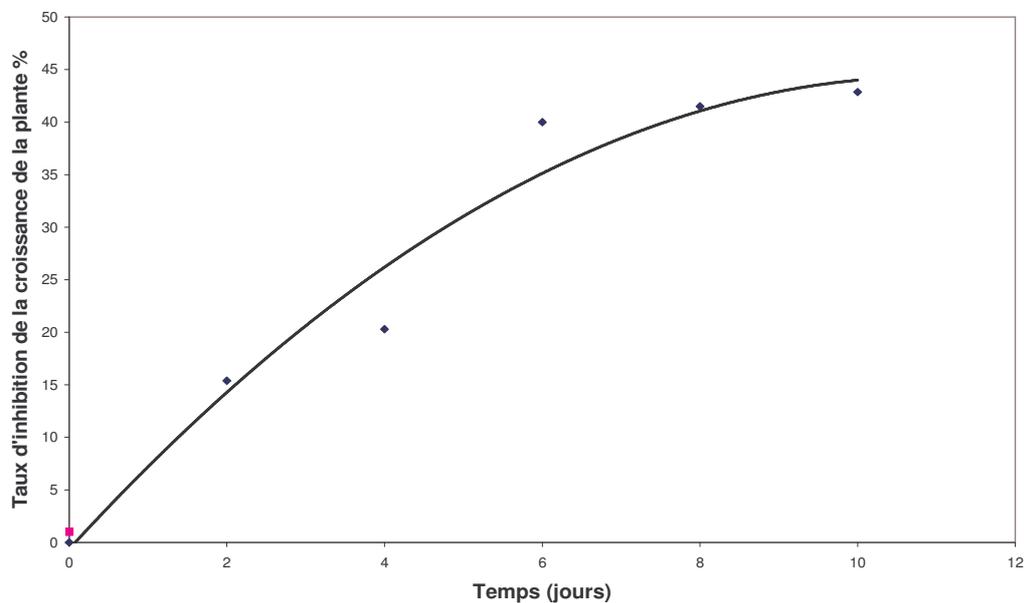


Figure 1 : Variation du taux d'inhibition de la croissance de la plante dans le temps pour $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de cadmium

Cadmium (1 mg.L^{-1}) : $y = -0,189 .x^2 + 12,07.x - 4,3382$; $R^2 = 0,9421$

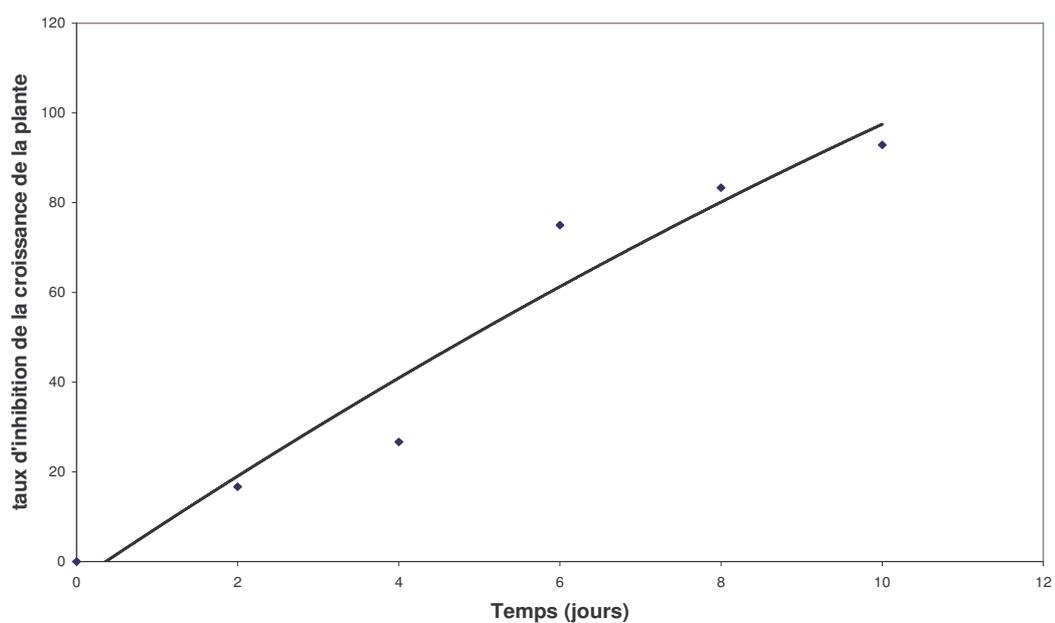


Figure 2 : Variation du taux d'inhibition de la croissance de la plante dans le temps pour 1 mg.L^{-1} de cadmium

Cuivre ($0,014 \text{ mg.L}^{-1}$) : $y = -0,7887 .x^2 + 0,4699.x - 3,213$; $R^2 = 0,9513$

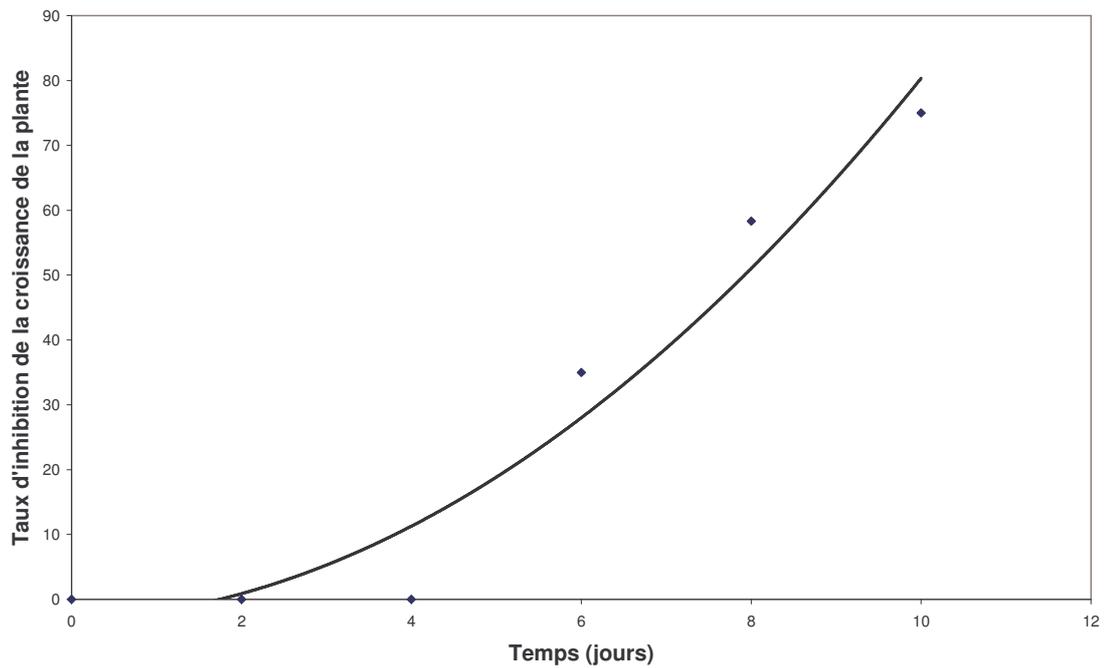


Figure 3 : Variation du taux d'inhibition de la croissance de la plante dans le temps pour $0,014 \text{ mg.L}^{-1}$ de cuivre

Cuivre ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) : $y = -0,0419 .x^2 + 9,739.x - 8,585$; $R^2 = 0,922$

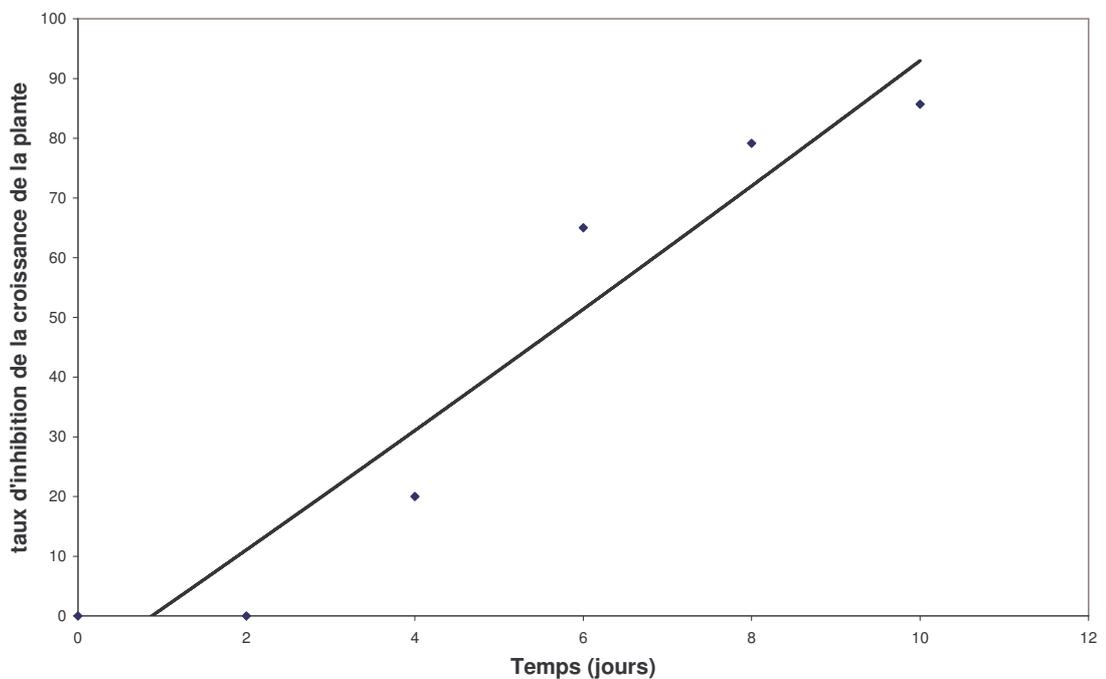


Figure 4 : Variation du taux d'inhibition de la croissance de la plante dans le temps pour $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de cuivre

$$\text{Zinc (0,6 mg.L}^{-1}\text{)} : y = -0,0296 \cdot x^2 + 1,822 \cdot x - 2,1424 ; \quad R^2 = 0,8047$$

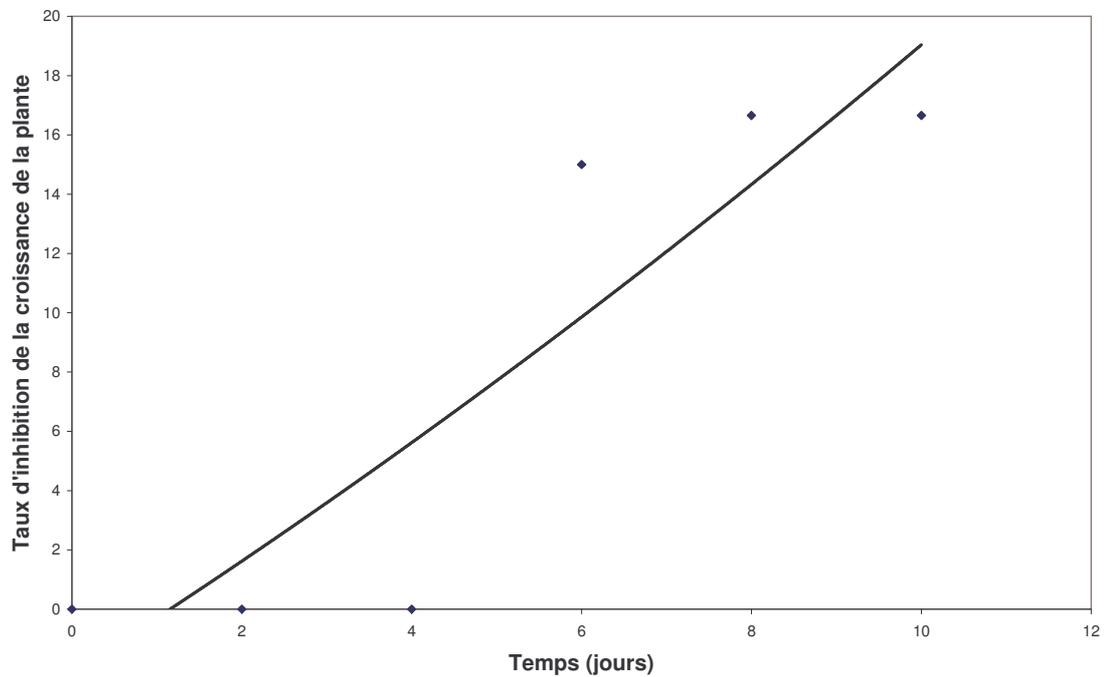


Figure 5 : Variation du taux d'inhibition de la croissance de la plante dans le temps pour $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinc

$$\text{Zinc (12,8 mg.L}^{-1}\text{)} : y = -0,5904 \cdot x^2 + 16,116 \cdot x - 1,0554 ; \quad R^2 = 0,999$$

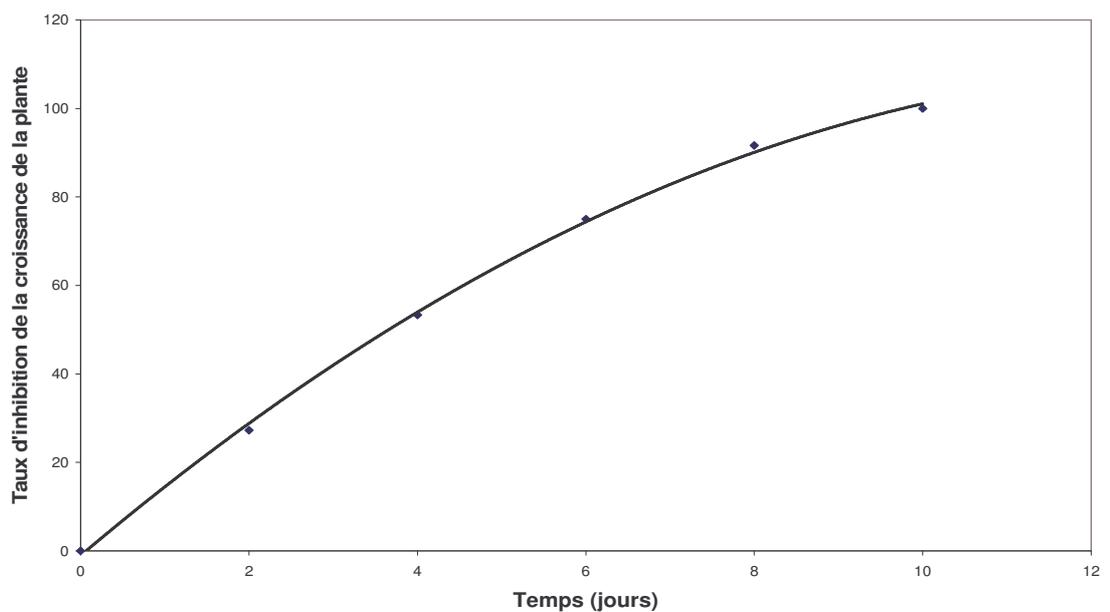


Figure 6 : Variation du taux d'inhibition de la croissance de la plante dans le temps pour $12,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de zinc.

APPENDICE C

Evaluation des paramètres physico-chimiques

Dosage du phosphore par la méthode spectrophotométrique piloté par SKALAR ANALYSIS (Norme Internationale ISO 5667-3) :

1-Principe :

Le principe consiste à mesurer le complexe phospho-molybdique présent dans les échantillons développe une coloration bleue en présence d'acide Ascorbique mesurable à 880 nm.

2-Réactif :

1^{er} : solution molybdate d'ammonium

Acide sulfurique H ₂ SO ₄ (97%).....	40 ml
Molybdate d'ammonium (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O.....	4,8 g
Eau distillée H ₂ O.....	1000ml
FFD6.....	2ml

2^{ième} : Solution de tartrate d'antimoine de potassium

Tartrate K(SbO)C ₄ H ₄ O ₆ , 0,5 H ₂ O.....	300mg
Eau distillée H ₂ O.....	100ml

3^{ième} : Solution d'acide Ascorbique

Acide Ascorbique C ₆ H ₈ O ₆	4,5g
Solution de tartrate d'antimoine de potassium.....	5ml
Eau distillée H ₂ O.....	250ml

Solution mère d'ortho phosphate de potassium à 100ppm P

Di hydrogène de potassium ortho phosphate KH ₂ PO ₄	0,4394g
Eau distillée H ₂ O.....	1000ml

3- Remarques :

- Le tracé des courbes ainsi que l'analyse des résultats est gérées par ordinateur. Les données fournies par le spectrophotomètre sont en Unités Analogiques et converties en Unité Numériques grâce à un enregistreur numérique. Elles sont alors traité par un logicielle (**SKALAR ANALYSIS**).

- Un traceur permet d'avoir des pics qui annoncent le début et la fin de l'analyse. lorsque les pics dépassent 580 Unité Numérique, l'ordinateur peut débiter à faire la collecte des données.
- Les échantillons moins chargés sont analysés directement sans subir de dilution.
- Pour un 1130 UA correspond 5 ppm.
- L'analyseur automatique permet d'analyser les phosphates PO_4^{3-} , nitrites (NO_2^-), Nitrate (NO_3^-), cyanures (CN^-), ammonium (NH_4^+) et de la silice (SiO_2).
- La fiabilité est telle qu'il permet pour des éléments, la détection de traces de l'ordre de $2/1000^{\text{ième}}$ de ppm.
- Possibilité d'analyser simultanément jusqu'à trois éléments sur une seule prise d'essai
- Fiabilité et reproductibilité des résultats dues entre autre au fait que le fluide se déplace dans un système clos (tuyaux) minimisant ainsi le risque de contamination extérieur.

4- Étalonnage

Les données permettant d'obtenir la courbe d'étalonnage sont fournies par ordinateur et sont consignées dans le tableau 4. La gamme étalon est comprise entre 0,4 et 2 $mg.L^{-1}$ de phosphore.

Tableau 4 : Données de la courbe d'étalonnage

	résultat *3,065 r = 0,99899				
PO4					
Concentrations	0,39	0,8	1,2	1,64	1,97
UN	792	1497	2209	2965	3533

UN : Unité Numérique

1 Unité Analogique selon le logiciel SKALAR correspond à 0,2 Unité Numérique et 0,2 UN correspond à 2 $mg.L^{-1}$ de phosphore.

5. Etablissement de la courbe d'étalonnage

Des solutions étalons de concentrations comprises entre 0,4 et 2 $mg.L^{-1}$ en phosphore ont été préparées. L'évolution des unités numériques en fonction de la concentration est représentée par la figure n° 7.

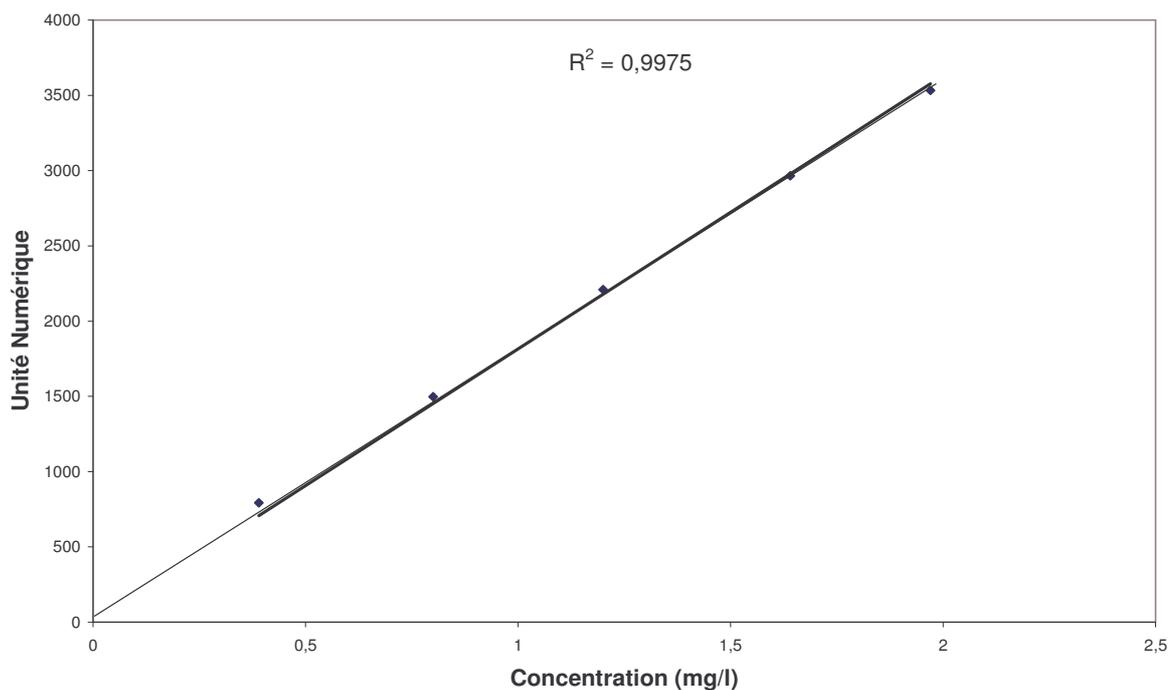


Figure n°7 : Courbe d'étalonnage du phosphate

Les tableaux 5, 6 et 7 donnent les valeurs de concentrations des différents échantillons à analyser.

Tableau n° 5: Variation des concentrations du phosphore en présence de cadmium et en fonction du temps

Phosphore en mg.L^{-1}						
Jours	0	2	4	6	8	10
Témoin	$0,69 \pm 0,4$	$0,54 \pm 0,4$	$0,4 \pm 0,3$	$0,52 \pm 0,2$	$0,65 \pm 0,3$	$0,65 \pm 0,3$
$0,5 \text{ mg.L}^{-1}$	$0,528 \pm 0,3$	$0,32 \pm 0,3$	$0,32 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,5$	$0,84 \pm 0,6$	$0,68 \pm 0,6$
1 mg.L^{-1}	$0,528 \pm 0,5$	$0,19 \pm 0,6$	$0,32 \pm 0,5$	$0,83 \pm 0,8$	$1,16 \pm 0,9$	$1,33 \pm 0,9$

Tableau n° 6: Variation des concentrations du phosphore en présence de cuivre et en fonction du temps

Phosphore en mg.L^{-1}					
Jours	0	2	4	6	8
Témoin	$1,026 \pm 0,4$	$0,54 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,3$	$0,52 \pm 0,2$	$0,65 \pm 0,2$
$0,014 \text{ mg.L}^{-1}$	$1 \pm 0,7$	$0 \pm 0,8$	$0 \pm 0,7$	$0 \pm 0,7$	$0 \pm 0,7$
$0,1 \text{ mg.L}^{-1}$	$1,04 \pm 0,9$	$0,17 \pm 0,9$	$0,18 \pm 0,8$	$0,72 \pm 0,9$	$0,72 \pm 0,9$

Tableau n° 7: Variation des concentrations du phosphore en présence de zinc et en fonction du temps

Phosphore en mg.L ⁻¹			
	Témoin	0,6 mg.L ⁻¹	12,8mg.L ⁻¹
0	0,86 ± 0,6	0,86 ± 0,7	0,86 ± 0,8
2	0,54 ± 0,7	0,44 ± 0,8	0,21 ± 0,9
4	0,4 ± 0,6	0 ± 0,6	0,02 ± 0,7
6	0,52 ± 0,5	0 ± 0,6	0,021 ± 0,8
8	0,65 ± 0,6	0,06 ± 0,7	0,021 ± 0,8
10	0,65 ± 0,6	0,06 ± 0,7	0,021 ± 0,9

On précise que les résultats relatifs au taux de phosphore sont donnés sous forme de phosphate. Sachant que : 30,97 g de P \longrightarrow 95 g de PO₄
 X de l'échantillon \longrightarrow X cherché $\Rightarrow X \cdot \frac{95}{30,97} = X$ cherché

X cherché = 3,06 . X (g) de l'échantillon trouvé.

Les pourcentages d'assimilation de phosphore sont donnés par les tableaux 8, 9 et 10.

Tableau n°8 : Moyenne de rétention du phosphate, les écart-types ainsi que le test de significativité à 0,05 de 02 à 08 jours : Cas du cadmium.

	Témoin	0,5 mg.L ⁻¹	1 mg.L ⁻¹
m ± E.T (2jours)	21,73 ± 0,2	32,39 ± 0,2	64,01 ± 0,03
m ± E.T (4 jours)	42,02 ± 0,3	32,39 ± 0,2	39,39 ± 0,3
m ± E.T (6 jours)	24,63 ± 0,4	5,30 ± 0	0 ± 0
m ± E.T (8 jours)	5,79 ± 0,98	0 ± 0	0 ± 0
m ± E.T (10 jours)	5,79 ± 0,98	0 ± 0	0 ± 0
P < à	-	-	-

Tableau n°9 : Moyenne de rétention du phosphate, les écart-types ainsi que le test de significativité à 0,05 de 02 à 08 jours : cas du cuivre.

	Témoin	0,014 mg.L ⁻¹	0,1 mg.L ⁻¹
m ± E.T (2jours)	47,36 ± 0,26	100 ± 0,7	80,43 ± 0,6
m ± E.T (4 jours)	61,10 ± 0,34	100 ± 0,5	82,69 ± 0,49
m ± E.T (6 jours)	49,32 ± 0,3	100 ± 0,5	30,76 ± 0,42
m ± E.T (8 jours)	36,64 ± 0,23	100 ± 0,44	30,76 ± 0,38
m ± E.T (10 jours)	36,64 ± 0,23	100 ± 0,44	30,76 ± 0,38
P < à	-	0,016	0,5

Tableau n°10: Moyenne de rétention du phosphate, les écart-types ainsi que le test de significativité à 0,05 de 02 à 08 jours : cas du zinc.

	Témoin	0,6 mg.L ⁻¹	12,8 mg.L ⁻¹
m ± E.T (2jours)	47,36 ± 0,26	37,14 ± 0,23	70,59 ± 0,40
m ± E.T (4 jours)	61,01 ± 0,34	100 ± 0,18	77,64 ± 0,45
m ± E.T (6 jours)	49,32 ± 0,3	100 ± 0,35	92,94 ± 0,37
m ± E.T (8 jours)	36,64 ± 0,23	62,38 ± 0,31	97,65 ± 0,33
m ± E.T (10 jours)	36,64 ± 0,23	62,38 ± 0,31	97,65 ± 0,33
P < à	-	0,010	0,012

APPENDICE D

1. Conductivité :

La conductivité d'une eau est la conductance d'une colonne d'eau comprise entre deux électrodes métalliques de 1 cm² de surface et séparées l'une de l'autre de 1 cm. Elle s'exprime en $S.m^{-1} = 10^4 \mu S.cm^{-1} = 10^3 mS.cm^{-1}$.

Application.

1.1.Application

La mesure de la conductivité d'une eau permet d'avoir une idée sur la minéralisation globale d'une eau puisqu'il existe une relation entre la teneur en sels dissous et la conductivité. Les mesures de conductivité ont été prises par un conductimètre électronique.

1.2.Résultats relatifs à nos échantillons

Le tableau 11 donne la variation de la conductivité dans les milieux de culture contaminés par les différents métaux (Cd, Cu et Zn)

Tableau n°11 : Variation de la conductivité des échantillons contaminé en Cd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ et en fonction du temps

Conductivité (µS/cm-1).				
Cd ²⁺	Jours	Témoin	0,5 g.L-1	1 mg.L ⁻¹
	0	157,6 ± 4,6	188,8 ± 10,6	172,2 ± 6,01
	2	164,16 ± 3,4	173,7 ± 8,7	163,7 ± 4,2
	4	162,7 ± 2,8	173,8 ± 7,5	167,1 ± 3,5
	6	134,13 ± 5	79,63 ± 44	78,3 ± 40
	8	139,3 ± 13	78,03 ± 51	75,96 ± 46
	10	139,3 ± 12	78,03 ± 50	79,6 ± 45

Cu ²⁺	Jours	Témoïn	0,014g.L ⁻¹	0,1g.L ⁻¹
	0	157,6 ± 4,6	163,4 ± 0	161 ± 2,8
	2	164,16 ± 4,5	163,4 ± 0,2	157,6 ± 3
	4	162,7 ± 3,4	157,6 ± 3,3	164,5 ± 3,7
	6	134,16 ± 13,9	158,6 ± 3,08	160,3 ± 3,07
	8	139,3 ± 13,8	169,5 ± 4,5	167 ± 3,8
	10	139,3 ± 13,4	169,5 ± 5	167 ± 4
Zn ²⁺	Jours	Témoïn	0,6 g.L-1	12,8g.L ⁻¹
	0	157,6 ± 4,6	147 ± 0,35	147 ± 18
	2	164,16 ± 4	146,5 ± 1	173 ± 15
	4	162,7 ± 3,4	148 ± 0,7	175,56 ± 15,8
	6	134,16 ± 5	151,3 ± 2	181,26 ± 15,2
	8	139,3 ± 6	138,8 ± 4,6	171,1 ± 13,3
	10	139,3 ± 6	138,8 ± 5	171,1 ± 11,8

APPENDICE E

1. Dosage de la dureté totale où titre hydrométrique

La présence des ions Ca²⁺ et Mg²⁺ dans un milieu aqueux quelconque est caractérisé par la dureté totale. Elle est mesurée en mg.L⁻¹ de CaCO₃ ou en °Français. 1°F correspond à 10 mg.L⁻¹ de CaCO₃.

1.2.Principe

Il est basé sur la précipitation du Magnésium sous forme d'hydroxyde et n'intervient pas dans la solution. Toute fois le dosage se fait à un pH compris entre 12 et 13. Par ailleurs l'indicateur choisi, le murexide, ne se combine qu'avec le calcium pour former un complexe rouge. La méthode est identique à la méthode complexométrique.

1.3.Réactifs

- Solution Tampon (pH=13).
- Soude..... 2N.
- Solution d'EDTA (N/50)..... 3,721g.L⁻¹

1.4.Manipulation

Prélever 50ml d'eau à analyser, ajouter 2 ml de soude et une pincée de murexide. En dosant à la burette de précision contenant la solution et l'E.D.T.A (N/50), faire virer du rouge au bleu.

La dureté magnésique est déduite de la différence entre la dureté totale avec la dureté calcique.

1.5.Résultats

La concentration totale en calcium exprimé en milligramme par litre, est donnée par l'expression $C_{Ca} = (V \times 0,4008 \times 1000) / 50$; pour une prise d'essai de 50ml

- C : Concentration en milligramme par litre du calcium.
- V : Volume en ml de l'échantillon la solution prélevé.

Correspondance de la dureté totale en °F sachant que 1°F correspondant à 10 mg.L⁻¹ de CaCO₃

1.6.Résultats relatifs à nos échantillons

Tableau n°12 : Variation de la dureté des échantillons contaminé en Cd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ et en fonction du temps

Duretés (mg.L⁻¹ de CaCo3)				
Cd²⁺	Jours	Témoin	0,5 mg.L-1	1 mg.L⁻¹
	0	90	90	90
	2	90	80	80
	4	80	100	90
	6	90	100	100
	8	90	100	100
	10	90	100	100
Cu²⁺	Jours	Témoin	0,014 mg.L⁻¹	0,1 mg.L⁻¹
	0	90	90	90
	2	90	100	100
	4	80	160	160
	6	90	160	160
	8	90	180	160
	10	90	160	160
Zn²⁺	Jours	Témoin	0,6 mg.L-1	12,8 mg.L⁻¹
	0	90	100	90
	2	90	250	300
	4	80	250	280
	6	90	260	280
	8	90	260	270
	10	90	250	280

APPENDICE F

1. Principe de la préparation de la courbe d'étalonnage de la proline

Le principe de dosage de la proline (MONNEVEUX et NEMMAR (1986) consiste à extraire la proline de la matière végétale par l'alcool méthylique à 80%. La proline et l'hydroxyproline réagissent en milieu acide et à chaud avec la Nihydrine pour donner un composé rose soluble dans les solvants organiques à noyau, tel que le toluène ou le Benzène sensible à une certaine longueur d'onde.

1.1. Préparation des réactifs

Solution A : dans un flacon en verre opaque, on prépare le mélange suivant :

- 300ml d'acide Acétique
- 80ml d'acide ortho phosphorique (d=1,7)
- 120ml d'eau distillée.

Solution B : Soit n le nombre de tubes à doser.

Dans un Erlen on mélange :

- (n+4).25 mg de Nihydrine
- (n+4) ml de la solution A
- (n+4) ml d'acide acétique

On prélève un volume $V_B = 2$ ml de la solution B à laquelle on ajoute des volumes croissants de la solution SII :

Volume à Prélever de la SII (ml)	0	0,1	0,20	0,5	1,0	1,5	2,0
Solution B	2	2	2	2	2	2	2

- ce mélange est porté à ébullition pendant 30 minutes au bain marie
- laissé refroidir et ajouter 5 ml de toluène.
- après agitation au vortex, ajouter une pincée de sulfate de sodium Na_2SO_4 .

Préparation des solutions mères pour la courbe d'étalonnage.

Solution mère S I.

40 mg de proline sont placés dans une fiole de 100 ml puis ajusté avec le méthanol à 40 % jusqu'au trait de jauge.

$$[\text{Proline}] = \frac{40}{100} = 0,4 \text{ mg/ml} = 400 \mu\text{g/ml}$$

Solution mère S II.

Dans une fiole de 100ml, mettre 10 ml de solution mère I puis compléter avec le méthanol à 40% jusqu'au trait.

Le tout est chauffé à 100 °C au bain marie pendant 30 minutes. Après refroidissement, 5ml de toluène sont ajoutés dans chaque tube. Puis on centrifuge au vortex. La phase organique (supérieur) est récupérée puis dosé par colométrie à 528 nm. On fait subir le même procédé pour 1 ml de l'extrait qu'on dose à 528nm.

On détermine la concentration de la proline par le calcul suivant :

$$[\text{proline}] = \frac{400 * VS_{II}}{VS_B} \quad (\mu\text{g/ml}).$$

Tableau n° 13 : Courbe d'étalonnage

SII (ml)	0	0,2	0,20	0,5	1,0	1,5	2,0
$[\text{proline}]$ en ($\mu\text{g/ml}$)	0	40	40	100	200	300	400
DO (528)	0	0,5	1,2	1,5	2,8	4,2	2,8

2. Méthode d'extraction de la Proline

- Peser 100mg de matière végétale fraîche
- Placer cette masse dans un tube à essai
- ajuster 2ml de méthanol à 40%

Le tout doit être chauffé pendant une heure dans un bain à essai à 85 °C. Après refroidissement on fait subir 1 ml le même traitement que le précédemment et on dose à 528nm.

La courbe d'étalonnage est préparée à partir d'une solution mère de 400 $\mu\text{g/ml}$ de concentration en proline, de 2 ml de la solution B et des volumes croissants de la solution SII.

2.1. Evaluation des taux de proline dans la plante

Le tableau 14 présente les taux de proline dans les plantes soumises aux contaminants de cadmium cuivre et de zinc.

Tableau n°14: Variation de la proline dans la plante des échantillons contaminé en Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} et en fonction du temps

Echantillon contaminé par le cadmium					
		Témoin			
Jours	2	4	6	8	10
mg/g de MV	50	40	55	50	50
0,5 mg.L⁻¹ de Cd²⁺					
Jours	2	4	6	8	10
mg/g de MV	30	70	20	10	10
1 mg.L⁻¹					
jours	2	4	6	8	10
mg/g de MV	40	100	40	30	30
Echantillon contaminé par le cuivre					
		Témoin			
Jours	2	4	6	8	10
mg/g de MV	40	50	50	45	40
0,014 mg.L-1 de Cu²⁺					
Jours	2	4	6	8	10
mg/g de MV	50	75	87	75	70
0,1 mg.L-1 de Cu²⁺					
jours	2	4	6	8	10
mg/g de MV	70	125	100	85	50

2.2. Courbe d'étalonnage

Une série de solutions étalons de concentration comprise entre 0 et 300 $\mu\text{g/mL}$ a été préparée. La figure n°8 illustre l'évolution de l'absorbance en fonction de la concentration.

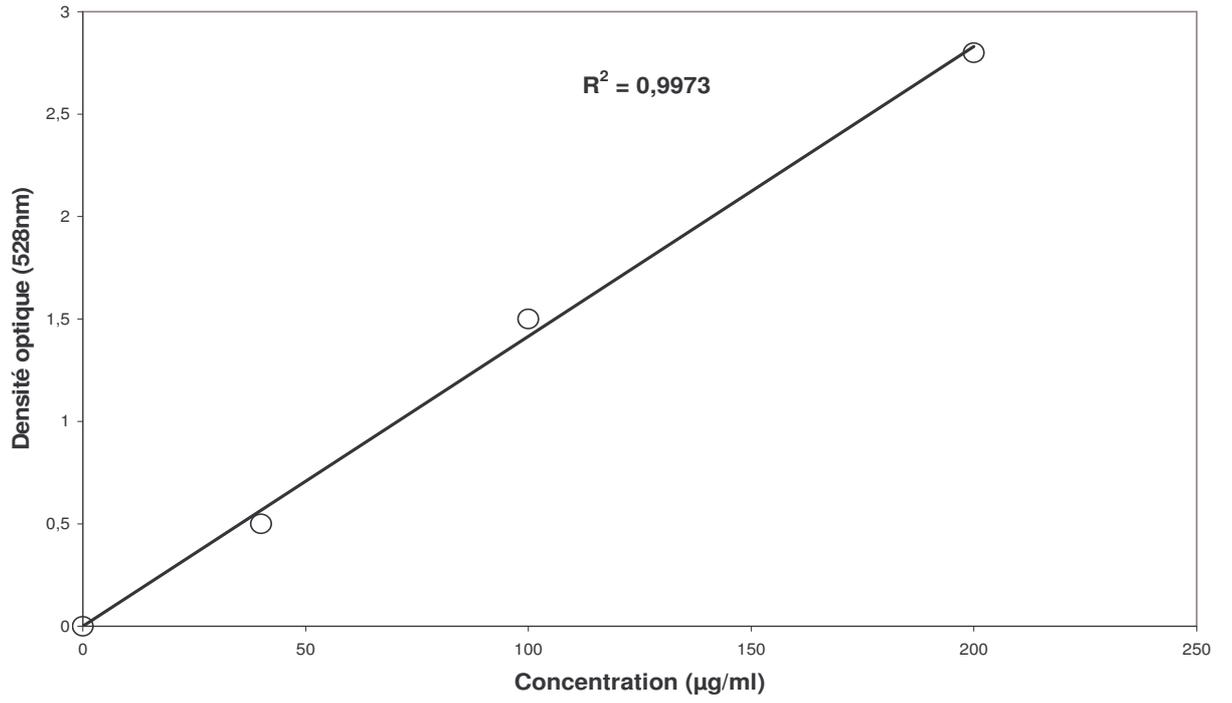


Figure n°8 : Courbe d'étalonnage de la proline

APPENDICE G

Préparation de la solution Standard pour analyse des métaux

1. Contamination des milieux de cultures

La préparation des solutions contaminants se fait de manière suivante :

Exemple on cherche $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de Cd à partir de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, on aura :

$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 308,47 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_{(\text{Cd})} = 112,4 \text{ g.mol}^{-1}$.

Pour une concentration de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ on aura à prélever 1,3 mg Q.S.P 1000 ml.

2. Analyse des métaux.

2.1. Principe :

Une solution contenant de faibles concentrations de métaux est convertie dans une flamme sous forme de vapeur (atomes libres), une source lumineuse émet une radiation caractéristique de l'élément à analyser. Cette radiation est dirigée au travers d'une lentille focalisant le faisceau au travers de la flamme. Un monochromateur reçoit le signal et mesure l'absorbance selon la longueur d'onde voisine à celle émise par de l'élément à analyser. L'échantillon en solution est aspiré par un capillaire dans la chambre d'injection qui conduit au brûleur. L'appareil utilisé a été un **PERKIN ELMER 300**.

2.2. Mode opératoire :

Exemple de dosage du cadmium : Aspiration de l'échantillon acidifier dans la flamme (Air/Acétylène), la mesure est effectuée à une longueur d'onde de 228,8 nm.

2.3. Etalonnage

Les solutions de références (ou standards) sont préparées à l'aide des solutions pour absorption atomique (1000 g/mL), de pureté analytique reconnue. Les dilutions pour demeurer dans la fourchette de linéarité de l'appareil sont comprises entre 0 et 5 g/mL. On prépare :

Tableau n°15 : différentes dilutions pour la courbe d'étalonnage

$V_{\text{Cd}^{2+}}$ (ml)	0,2	0,5	1	2	4
$V_{\text{H}_2\text{O}}$ (ml)	99,8	99,5	99	98	96

1.3. Différentes courbe d'étalonnage des métaux testés.

Tableau n° 16 : Données de la courbe d'étalonnage du cadmium

Cd ²⁺	R ² = 0,992		λ = 228,9 nm		
Concentrations	0,2	0,5	1	2	4
Abs	0,028	0,061	0,126	0,243	0,432

Tableau n° 17: Données de la courbe d'étalonnage du cuivre

Cu ²⁺	R ² = 0,9529		λ = 324nm		
Abs	0,04	0,111	0,213	0,393	0,626
Concentration	0,2	0,5	1	2	4

Tableau n° 18: Données de la courbe d'étalonnage du zinc

Zn ²⁺	R ² = 0,9614		λ = 213nm		
Abs	0,051	0,118	0,213	0,395	0,628
Concentration	0,2	0,5	1	2	4

2.6. Sensibilité de l'appareil

Tableau n°19: Limites de détection et quantification pour les trois métaux

éléments	Limites détection (µg/g)	Teneurs linéaires (ppm)	Absorbances en (nm)
Cd ²⁺	0,10	-	228
Cu ²⁺	1,00	0,09-5	324
Zn ²⁺	1,00	0.018-1	213

2. Variation du taux de rétention des métaux par la plante

Les taux de rétention des métaux correspondant à nos différents métaux testés (Cd, Cu et Zn) sont donnés par le tableau 20.

Tableau n°20 : Variation des taux de rétention de métaux sur la plante

Cd ²⁺					
0,5 mg.L-1	2	4	6	8	10
rétention	100	100	98,4	97,6	95,6
Cu ²⁺					
0,1 mg.L-1	2	4	6	8	10
rétention	79	85	79	79	87
Zn ²⁺					
0,6 mg.L-1	2	4	6	8	10
rétention	65	81	78	100	56,6

Les valeurs correspondantes à l'adsorption de ces métaux sont présentées par le tableau 20. Le tableau 22 présente l'évolution de la croissance de la *Lemna gibba* en présence des métaux et en fonction du temps.

Tableau 21 : Valeurs des concentrations adsorbées dans les milieux de culture

0,5 mg.L⁻¹ de Cd²⁺					
jours	2	4	6	8	10
	0	0	0,008	0,012	0,022
1 mg.L⁻¹ de Cd²⁺					
jours	2	4	6	8	10
	0,27	0,95	0,977	0,986	0,996
0,014 mg.L⁻¹ de Cu²⁺					
jours	2	4	6	8	10
	0,006	0	0,009	0,009	0,013
0,1 mg.L⁻¹ de Cu²⁺					
Jours	2	4	6	8	10
	0,021	0,015	0,021	0,021	0,013
0,6 mg.L⁻¹ de Zn²⁺					
Jours	2	4	6	8	10
	0,21	0,114	0,128	0,00	0,26
12,8 mg.L⁻¹ de Zn²⁺					
Jours	2	4	6	8	10
	10,29	10,34	12,40	12,68	12,68

Le tableau n° 22 : la variation des colonies dans le temps en fonction des différents métaux.

Cd²⁺			Zn²⁺		
Témoin	0,5mg.L⁻¹	1 mg.L⁻¹	témoin	0,6 mg.L⁻¹	12,8mg.L⁻¹
10	10	10	10	10	10
13	11	11	13	13	9,4
15	12	11	15	15	7
20	12	5	20	17	5
24	14	4	24	20	2
28	16	2	28	23	0
Cu²⁺					
Témoin	0,014 mg.L⁻¹	0,1 mg.L⁻¹			
10	10	10			
13	13	13			
15	15	12			
20	13	7			
24	10	5			
28	7	4			

APPENDICE H

Les résultats relatifs aux qualités des modèles mathématiques pour la prévision des résultats expérimentaux fournies le diagramme des résidus en fonction des réponses prédites ou la dispersion est quasi-aléatoire.



Figure n°9: Distribution des résidus en fonction des réponses prédites :
Cas du cadmium à 0,5 mg.L⁻¹

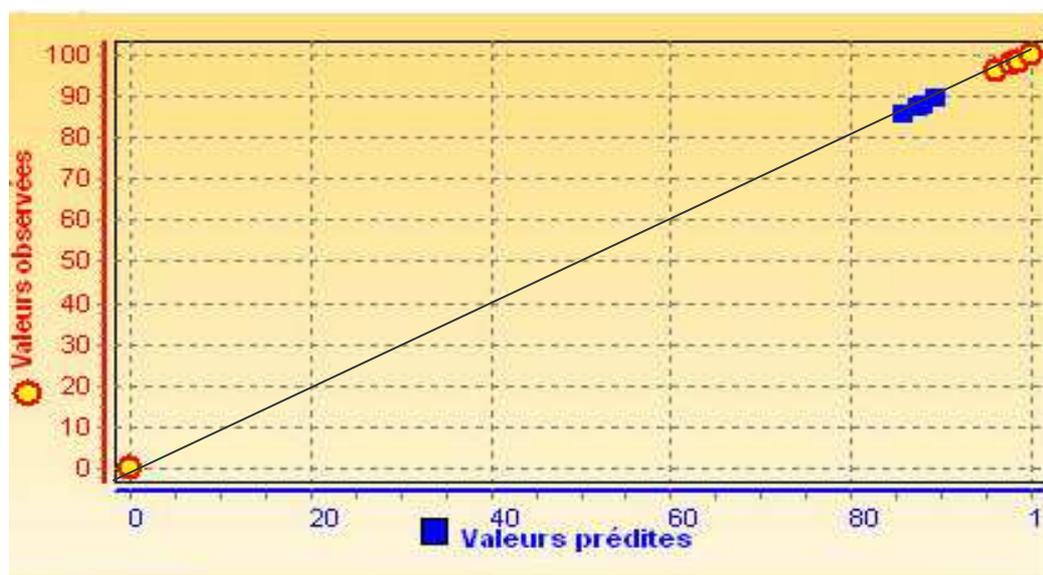


Figure n°10: Courbe des réponses observées en fonction des réponses prédites :
Cas du cadmium à 0,5 mg.L⁻¹

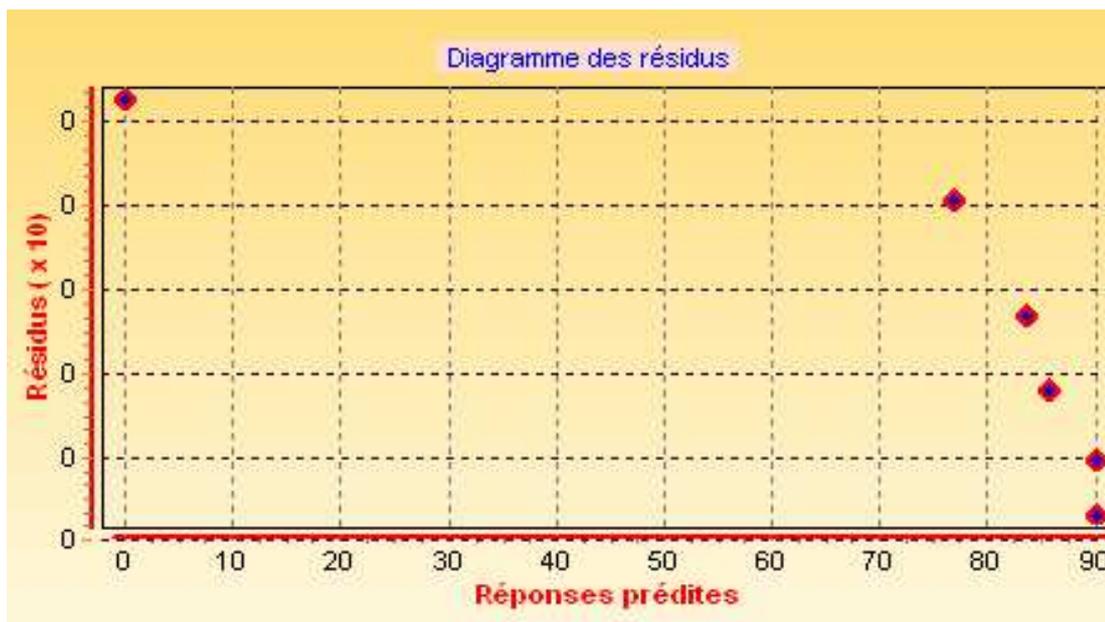


Figure n°11: Distribution des résidus en fonction des réponses prédites :
Cas du cuivre à $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

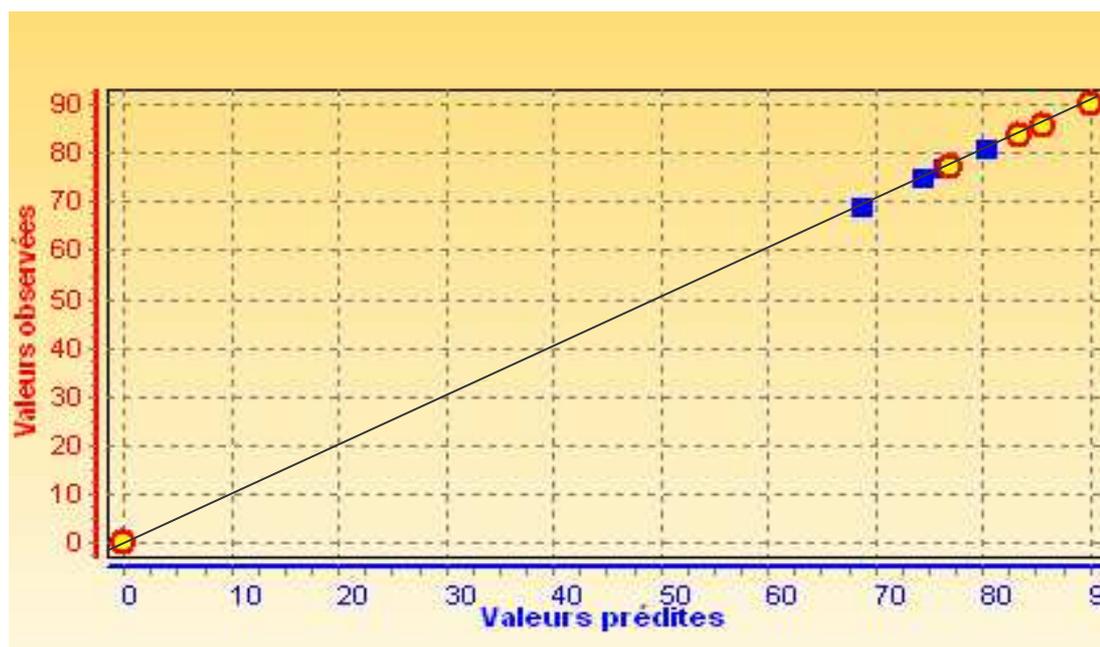


Figure n°12: Courbe des réponses observées en fonction des réponses prédites :
Cas du cuivre à $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$.

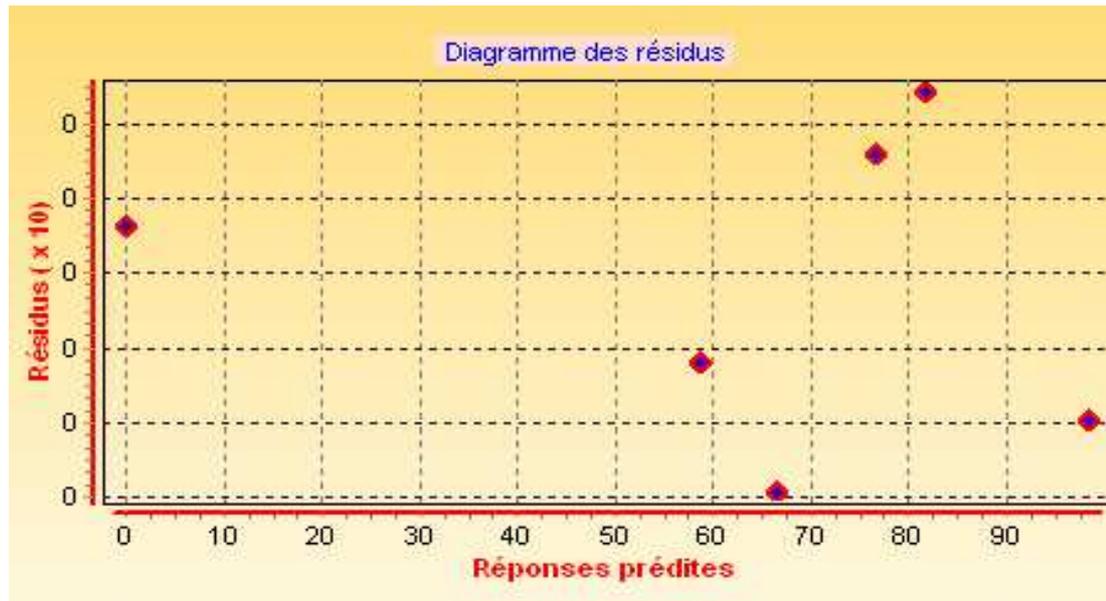


Figure n°13 : Distribution des résidus en fonction des réponses prédites :
Cas du zinc à $0,6 \text{ mg.L}^{-1}$.

REFERENCES

- [1]. **Perry., A. R. R., P. Flammarion, B. Vollat, J. J. M. Bedaux, S. A. L. M. Kooijman et J. Garric.** "Using a biology based model (Debtox) to analyse bioassays in ecotoxicology: opportunities and recommendations." *Environ. Toxicol. Chem.*,(2002), 21(2): 459-465.
- [2].**Amiard-Triquet, C., L.Lagadic, T. Caquet, F.Ramade** «Utilisation de biomarqueurs pour la biosurveillance de la qualité de l'environnement » Ed. Tec et Doc, Paris, 1998, 306p.
- [3]. **Leng, JH Stambolie et R Bell** « lenticule : une source potentielle de fourrage à haute valeur protéique pour les animaux domestiques et les poissons ».Revue N° 1 octobre 1995, Vol 7, 1,2, 3p (13p).
- [4].**Goldberg, E. D.** "The Mussel Watch." *Mar. Pollut. Bull.* **6**: 111-113, 1975.
- [5]. **Goldberg, E. D., V. T. Bowen, J. W. Farrington, G. Harvey, J. H. Martin, P. L. Parker, R. W. Risebrough, W. Robertson, E. Schneider et E. Gamble.** «The Mussel Watch» *Envir. Conserv.*, 1978,. **5**: 101-125.
- [6]. **Philips, D. J. H.** "The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments - a review." *Environ. Pollut.* (1977). **13**: 281-317.
- [7]. **Phillips, D. J. H.** Quantitative aquatic biological indicators: their use to monitor trace metal and organochlorine pollution, Applied Science Publishers, London, (1980).
- [8]. **Philips, D. J. H. et D. A. Segar** "Use of indicators in monitoring conservative contaminants." *Mar. Pollut. Bull.* **17**: 10-17, (1986).
- [9]. **Burton, M.A.S. et Peterson, P.J.,** «Metal accumulation by aquatic bryophytes from polluted mine streams». *Environmental Pollution*, 19(1): 39-46, (1979).
- [10]. **Dietz, F.** « Estimation de la pollution par métaux lourds dans la Somme par l'analyse des bryophytes aquatiques ». *Bulletin Français de Pisciculture* 1976, **48**: 138-142.
- [11]. **McLean, R.O. et Jones, A.K.** «Studies of tolerance to heavy metals in the flora of the rivers Ystwyth and Clarach», Wales. *Freshwater Biology*, **5**: 431-444, 1975.
- [12]. **Whitton, B.A. et Say, P.J.** «Heavy metals. In: B.A. Whitton (Editor), *River Ecology*». Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1975, pp. 286-311.

- [13]. **Empain, A.**, « La végétation bryophytique aquatique et subaquatique de la Sambre Belge, son déterminisme écologique et ses relations avec la pollution des eaux ». *Lejeunia*, 1973, 69: 1-58.
- [14]. **Bishop, P.L.**, « Marine Pollution and its control », Mc Graaw-Hill Book Company, N.Y, (1983), 357p.
- [15]. **Publication de la Direction de l'environnement de l'OCDE** « Guidance Document on transformation/Dissolution of metals and metals compounds in aqueous media ». Publication de la division santé et sécurité de l'OCDE, (2001).
- [16]. **NAS/NRC** «Recommended dietary allowances, National Academy of Science/National Research Council», Washington, (1989).
- [17]. **Saavedra, Y., A. Gonzalez, P. Fernandez et J. Blanco (2003)**. "The effect of size on trace metal levels in raft cultivated mussels (*Mytilus galloprovincialis*)." *The Science of the Total Environment* **318** (1- 3): 1115-1124.
- [18]. **Pailler, F.M.** « Protection de la santé, Hygiène et Environnement- Ecotoxicologie et pollution industrielle », Ed. Frison-Roche, Paris, 1993, 335-367.
- [19]. **Baudo, R.**, «Memorie del Istituto Italiano di Idrobiologia – Ecotoxicological testing with Daphnia», Peters and Bernardi Editors, Verbania Pallanza, (1987), 461-482.
- [20]. **Blandin, P.**, Bioindicateur et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin d'Ecologie*, (1986) ; T.17 (4): 1-309.
- [21]. **Lawerys**, « Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles » Ed. Masson, Paris, (1982) ; 1^{ière} édition, 134 p.
- [22]. **Lawerys**, « Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles » Ed. Masson, Paris, (1992), 2^{ème} édition, 679p.
- [23]. **Ramade, F.**, « Ecotoxicologie » Ed. Masson, Paris, (1979), 194p.
- [24]. **Kintz, P.**, «Toxicologie et pharmacologie Médicolégales ».Editions Scientifiques et Médicales. Elsevier, Nancy, (1998), 9-10.
- [25]. **Rondia, D.**, «Introduction à la toxicology de l'Environnement», Edition Université de Liège Faculté des sciences Appliquées, Liège, (1977), 272p.
- [26]. **Cabridenc, R. et Lundahl, P.**, "Intérêt et limites d'un test daphnie pour l'étude des nuisances des polluants vis à vis de l'environnement", *Technique' Sciences Méthodes*, V.6, n°2, (1974), 340-345.
- [27]. **Publication de la Direction de l'environnement de l'OCDE.**, « Document d'orientation pour l'utilisation du système harmonisé de classification des produits chimiques dangereux pour l'environnement aquatique ». Série de l'OCDE N° 27, Août 2002.

- [28]. **Angelier. E**, « Ecotoxicologie des eaux courantes » Tec et Doc, Paris (2001), 195p.
- [29]. **Ramade.F**, « Précis d'écotoxicologie ». Tec et Doc, Paris (1992).
- [30]. **Publication de la Direction de l'environnement de l'OCDE**. « Harmonized Integrated Hazard Classification system for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances», (1998). ([http:// www.ocde.org/ehs/class/HCL6.htm](http://www.ocde.org/ehs/class/HCL6.htm))
- [31]. **Simmeauer. A.**, « l'eau, la recherche, l'environnement » 3^{ème} journée scientifiques et techniques sur l'environnement : Limoge. France (1979).
- [32]. **M.C.Carre, A. Vulliermet.**, « Tannerie et environnement ». Ed Centre du cuire, lyon (1983). 53p.
- [33]. **Companella. L ; E. Cardarelli, M. Cordatore et L. Patrolecco** « Environmental protection by funggal activity». 9th forum of appl. Biotechnology. Gent (1995), Pp 2545-2553.
- [34]. **Say, P.J., Harding, J.P.C. et Whitton, B.A.**, «Aquatic mosses as monitor of heavy metal contamination in the river Etherow », Great Britain (1981), Environmental pollution, (serie b) 2: 285-307.
- [35]. **Amiard-Triquet, C. et F. Caurant** "Les formes physico-chimiques de stockage des métaux chez les organismes marins." Analisis Magazine **22**(1): 24-26, (1994).
- [36]. **Phillips, D. J. H. et P. S. Rainbow** «Bio monitoring of trace aquatic contaminants», Aldenn Press Ltd, Oxford (1994).
- [37]. **Whitton, B.A., Say, P.J. et Jupp, B.P.**, «Accumulation of zinc, cadmium and lead by the aquatic liverwort *Scapania*». Environmental Pollution (serie b), 3: 299-316. (1982).
- [38]. **Ramade.F, L.Lagadic., T.Caquet., JC Amiard** « utilisation de Biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement » Ed.Tec & Doc, Paris (1998).
- [39]. **Biney. C., A.T. Amuzu, D. Calamari, N. Kaba, I.L. Mbome, H. Naeve O. Ochumba, O. Osibanjo, V. Radegonde et M.A.H. Saad** « pollution dans l'environnement aquatique africain » Archive de Document de la FAO. (1976).
- [40]. **Erickson, R.J., Brooke, L.T., Khahl, M.D., Venter,F.V., Harting, S.L., Markee, T.P. and Spehar, R.L.**, «Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms », Environmental Toxicology and Chemistry, V.17, n°4 (1985), 572-578.
- [41]. **Renmin Gong, Yi Ding, Huijun Liu, Qiuyi Chen, Zhili Liu** , «Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *spirulina maxima* biomass» Art, Chemosphere 58, (2004), 125-130 p.
- [42]. **O.I.E (Office International de l'Eau)**, « Plantes aquatiques utiles ; les lentilles d'eau ou lemnacée » Ed. Tec & doc, Lavoisier France (1984), p 69.

- [43]. **Godfrey HCJ., Partridge. L et Harvey PH** “Clutch size”. *Annu.Rev.Ecol.Syst* (1991), 22: 409-429.
- [44]. **Landolt. Elias.,** «Biosystematic Investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae) », vol. 2, Ed.Veroff. Geobot.Inst.ETH, Stiftung Rubel, Zurich (1986), p.515.
- [45]. **Duvall.,** « *Annales du jardin botanique du Missouri* » vol. 80, (1993).
- [46].**Wayne Armstrong.,** “Treatment of Lemnaceae” **LEMNA Corporation** 1408 Northland Drive Suite 310 St. Paul, Minnesota (2001), 55120, USA.
- [47]. **Landolt. Elias.,** « La famille de Lemnaceae - étude monographique », vol. 1, Ed.Veroff. Geobot.Inst.ETH, Stiftung Rubel, Zurich (1986), 71.p
- [48]. **Peng .C.,** « Mise au point d’un outil diagnostique basé sur l’utilisation de la mousse aquatique *Fontinalis antipyretica* Hedw. en culture pour l’estimation de la qualité des cours d’eau ». Thèse d’Etat Univ de Lille (2003), 149p.
- [49]. **Montegut J.,** « les plantes aquatiques et les plantes de tourbières », tome I. Ed. Pascal Robbe et Nicole Beyt, Paris (1987a), 20p.
- [50]. **Montegut J.,** « Les plantes aquatiques entretien-désherbage », tome IV Ed. Réalisation Pascal et Nicole Beyt, Paris (1987b), 40p.
- [51]. **Blake. G., Dubois. J-P.** « L’épuration des eaux par les plantes aquatiques » *Revue Scientifique* (1974), (p 7-9) 47p.
- [52]. **Hillman W S et Culley DD** « les utilisations de la lenticule ». *Scientifique Américain* 66 (July/August, 1978) : 442-451.
- [53]. **P.QUEZEL et S. SANTA TOME I** « nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques Méridionales » Ed du centre national de la recherche scientifique Paris.
- [54].**Chojnacka Katarzyna, Andrzej Chojnacki, Helena Go´recka.** «Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue–green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process» *Art, Chemosphere* (2004) 59, 75–84 p
- [55]. **André, B. et Lascombe, C.,** « Comparaison de deux traceurs de la pollution métallique des cours d’eau: les bryophytes et les sédiments », *Revue des Sciences de l’Eau* (1985), 6(2): 225-247.
- [56]. **Kovács, M. et Podani, J.,** «Bioindication: a short review on the use of plants as indicators of heavy metals». *Acta Biologica Hungarica* (1986), 37(1): 19-29.
- [57]. **Empain, A.,** «A posterior detection of heavy metal pollution of aquatic habitats». In: J.M. Glime (Editor), *Methods in Bryology*. Hattori Bot. Lab., Mainz (1988), pp. 213-220.
- [58]. **Frisque, G.,** «Accumulation par des bryophytes aquatiques de la Meuse de deux micropolluants: les polychlorobiphényles et le gamma-HCH», Université de Liège (1981).

- [59]. **Carballeira, A. et Lopez, J.** «Physiological and statistical methods to identify background levels of metals in aquatic bryophytes - dependence and lithology». *Journal of Environmental Quality* (2001), 26(4): 980-988.
- [60]. **Everard, M. et Denny, P.**, «Flux of lead in submerged plants and its relevance to a freshwater system». *Aquatic Botany* (1985), 21: 181-193.
- [61]. **Lehtonen, J.**, Effects of acidification on the metal level in aquatic macrophytes in Espoo, S. Finland. *Annales Botanici Fennici* (1989), 26: 39-50.
- [62]. **Spearing, A.M.**, "Cation-exchange capacity and galacturonic acid content of several species of *Sphagnum* in Sandy Ridge Bog", Central New York State. *The Bryologist* (1972), 75(2): 154-158.
- [63]. **Oron G, Porath D** : exécution de Jansen MH du *gibba de lemna* d'espèce de lenticule d'eau de déchets municipaux pour la production effluente de rénovation et de protéine. *Biotechnologie et technologie biologique* (1987), 29 : 258-268.
- [64]. **Amiard-Triquet, C., C. Amiard-Triquet et C. Metayer.**, "Distribution de quelques métaux (Cd,Pb, Cu, Zn) chez les organismes vivants de l'estuaire de la Loire et des zones côtières adjacentes." *Bull. Soc. Sc. Nat. Ouest de la France* (1982), 4: 153-168.
- [65]. **Samecka-Cymerman, A., Kempers, A.J. et Kolon, K.**, «Concentrations of heavy metals in aquatic bryophytes used for biomonitoring in rhyolite and trachybasalt areas: a case study with *Platyhypnidium rusciforme* from the Sudety Mountains». *Annales Botanici Fennici* (2000), 37: 95-104.
- [66]. **Frahm, J.P.**, Weitere Toxizitätsversuche an Wassermoosen. *Gewässer und Abwässer* (1976), 60/61: 113-123.
- [67]. **Mouvet, C.**, « Utilisation des bryophytes aquatiques pour l'étude de la pollution des cours d'eaux par les métaux lourds et les radioéléments ». *Revue de Biologie et d' Ecologie méditerranéenne* (1979), 6(3-4): 193-204.
- [68]. **Pickering, D.C. et Puia, I.L.**, « Mécanism for the uptake of zinc by *Fontinalis antipyretica* ». *Physiologia plantarum* (1969), 22: 653-661.
- [69]. **Mouvet, C.**, « Mousses aquatiques et micropollution ». Agence de bassin Rhône Méditerranée Corse, Laboratoire d'Ecologie, Université de Metz (1984).
- [70]. **Say, P.J. et Whitton, B.A.**, «Accumulation of heavy metals by aquatic mosses» 1: *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Hydrobiologia* (1983b), 100: 245-260.
- [71]. **Wehr, J.D et Whitton, B.A.**, «Accumulation of heavy metals by aquatic mosses» 3: Seasonal changes. *Hydrobiologia* (1983a), 100: 285-291.
- [72]. **Smith, A.J.E.**, «The moss flora of Britain and Ireland». Cambridge University Press, Cambridge (1978), 706 pp.

- [73]. **Mouvet** « Métaux lourds et mousses aquatiques : Synthèse méthodologique » Université de Metz (1986), Agence de l'eau Rhin-Meuse, Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, Metz.
- [74]. **Claveri, B., Morhain, E. et Mouvet, C.**, «A methodology for the assessment of accidental copper pollution using the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*». *Chemosphere* (1994), 28(11): 2001-2010.
- [75]. **Mersch, J.**, « Modalités d'utilisation de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* en tant qu'indicateur biologique de la contamination des écosystèmes d'eau douce par les métaux lourds comparaison avec un autre type d'organismes sentinelles, les mousses aquatiques », Université de Metz (1993), 213 pp.
- [76]. **Vray, F., Baudin, J.P. et Svadlenkova, M.**, «Effects of some factors on uptake and release of ruthenium-106 by a freshwater moss, *Platyhypnidium riparioides* ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* (1992), 23(2): 190-197.
- [77]. **Say, P.J., Harding, J.P.C. et Whitton, B.A.**, «Aquatic mosses as monitor of heavy metal contamination in the river Etherow». Great Britain (1981). *Environmental pollution*, (serie b) 2: 285-307.
- [78]. **Kovács, M. et Podani, J.**, «Bioindication: a short review on the use of plants as indicators of heavy metals». *Acta Biologica Hungarica* (1986), 37(1): 19-29.
- [79]. **Chiffolleau, J. F., D. Auger, E. Chartier, P. Michel, I. Truquet, A. Ficht, J. L. Gonzalez et L. A. Romana** "Spatiotemporal changes in Cadmium contamination in the Seine estuary" (France,2001). *Estuaries* **24** (6B): 1029-1040.
- [80] **J. Tonneau et Hemes St-Laurent** « Printemps des sciences : d'un bout à l'autre » Revue scientifique de la FAO , rapport et étude ADEME édition (2003).
- [81]. **Smith, A.J.E.**, «The moss flora of Britain and Ireland». Cambridge University Press, Cambridge (1978), 706 pp.
- [82]. **Van der Wal, A., Norde, W., Zhender, J.B., Lyklema, J.**, «Determination of the total charge in the cell walls of Grampositive bacteria ». *Colloids Surf. B: Bio-interfaces* (1997) 9, 81–100.
- [83] **Yoshimura, E. et al.**, «Accumulation of metals and cellular distribution of aluminium in the liverwort *Scapania undulata* in acidic and neutral streams in Japan ». *Journal of Environmental Science & Health Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* (1998), 33(4): 671-680.
- [84]. **GESAMP IMO/FAO/Unesco/WMO/WHO/IAEA/UN/Unep**. Joint Group of Experts on Scientific Aspects of Marine Pollution. Report of the Thirty-third session, working group on the evaluation of the hazards of harmful substances carried by ships, EHS/(Feb 1997), International Maritime Organization, London.
- [85]. **Davies, P.H Goettl, J.P., Sinley, J.R.**, « Toxicity of silver to rainbow trout (*salmo gairdneri*), » *Water Research*, V.12, n°2, (1978), 113-117.

- [86]. **Cain, D. J. et S. N. Luoma** "Effect of seasonally changing tissue weight on trace metal concentration in the bivalve *Macoma bathica* in San Francisco bay." Mar/1986. Ecol. Prog. Ser **28**: 209-217.
- [87]. **Ramade, F.**, « Élément d'écologie » Ed. Mc Graw-Hill Paris (1982).
- [88]. **Borchardt, T.** "Relationship between carbon and cadmium uptake in *Mytilus edulis*." Mar Biol, (1985), 85: 233-244.
- [89]. **Gonzalez, J. L., J. F. Chiffolleau, P. Miramand et B. Thouvenin** « Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire », Programme scientifique Seine Aval, Editions Ifremer, Plouzané, France (1999): 31.
- [90]. **Campbell, P. G. C.** Interactions between trace metals and organisms: critique of the free-ion activity model. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. A. Tessier et D. R. Turner, J. Wiley & Sons, Chichester, UK (1995): 45-97.
- [91]. **Cossa, D. et P. Lassus** « Le cadmium en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie », Editions Ifremer, Plouzané, France (1989). 16: 111.
- [92]. **Babich, Schiffen Baur et Stotzky**: « Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *fungi* ». *bull, environment contamination toxical*, (1982).
- [93]. **Price, N. M. et F. M. M. Morel** "Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom." *Nature* **344**(6267): 658-660, (1990).
- [94]. **Lane, T. W. et F. M. M. Morel**. "A biological function for cadmium in marine diatoms." *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2000), **97**(9): 4627-4631.
- [95]. **ATSDR**. "Toxicological profiles for copper. Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, GA: US department of Health and Human Services, Public Health Services (1990).
- [96]. **Dameron, C. et P. D. Howe**. « Copper Environmental Health criteria» n°200. Geneva (1998), World Health Organization.
- [97]. **Casas, S.**, « Modélisation de la bioaccumulation des métaux de traces (Hg, Cd, Pb, Cu, et Zn) chez la Moule, *Mytilus Galloprovincialis*, en milieu Méditerranée » Thèse de doctorat, Université du Sud Toulon France (2005).
- [98]. **OMS-IPCS**. « Environmental Health» Criteria (1998), n°200: copper, World Health Organisation, International Program on chemical safety. <http://www.inchem.org/fullist.htm>.
- [99]. **Fabre et Tauhaut**, : « Précis de la toxicologie des fleuves ». Tome II Edition SEDES Paris (1965).
- [100]. **L. Levesque**. « Les micropolluants minéraux dans les eaux continentales ». Rapport n° 6, le chrome, le cuivre et le nickel. Publication de l'Agence Française pour l'étude des eaux (1990).

[101]. **Decamps, H et R.J. Naiman** : « l'écologie des fleuves », (1989), Vol. 30 N°208 311 p.

[102]. **Ribeyre, F. et A. Boudou**. «Trophic chains and experimental ecosystems: study of bioaccumulation and transfer processes. Aquatic Ecotoxicology: Fundamental Concepts and Methodologies». CRC Press (1989), Boca Raton, FL.1:3-46.

[102]. **Gjengedal, E. et Steinnes, E.**, «Uptake of metal ions in moss from artificial precipitation». Environmental Monitoring and Assessment (1990), 14: 77-87.

[103]. **Neff, J. M.** «Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of contaminants from oil well produced water», Elsevier Science Publishers, Amsterdam (2002).

[104]. **Burton, M.A.S.**, «Studies on zinc localization in aquatic bryophytes». The Bryologist (1979), 82(4): 594-598.

[105]. **Jones, K.C., Peterson, P.J. et Davies, B.E.**, «Silver and other metals in some aquatic bryophytes from streams in the lead mining district of Mid-Wales», Great Britain. Water Air Soil and Pollution (1985), 24: 329-338.

[106]. **Roeck, U., Trémolières, M., Exinger, A. et Carbiener, R.**, « Les mousses aquatiques, bioindicateurs du niveau de pollution chimique. Utilisation des mousses aquatiques dans une étude sur le transfert du mercure en tant que descripteur du fonctionnement hydrologique » (échanges cours d'eau - nappe) en plaine d'Alsace. Hydroécologie Appliquée (1991), 3(2): 241-256.

[107]. **Mouvet, C., Couturieux, N. et Morhain, E.**, « Mousses aquatiques et métaux lourds en Loire-Bretagne campagne » (1988), Agence de l'eau Loire Bretagne, B.R.G.M, Orléans/Metz.

[108]. **Volesky, B.**, « Biosorption of Heavy Metals ». CRC Press (1990), Boca Raton, FL

[109]. **Volesky, B., Holan, Z.R.**, « Biosorption of heavy metals ». Biotechnol. Prog (1995). 11, 235–250.

[110]. **Schiewer et Wong**, « Ionic strength effects in biosorption of metals by marine algae » Chemosphere (2000), 41, 271–282.

[111]. **Aksu, Z.**, « Determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of the batch biosorption of nickel (II) ions onto *Chlorella vulgaris* ». Process Biochem (2002), 38, 89–99.

[112]. **Markai, S., Andres, Y., Montavon, G., Grambow, B.**, «Study of the interaction between europium (III) and *Bacillus subtilis*: fixation sites, biosorption modelling and reversibility». J. Colloid Interface Sci (2003), 262, 351–361.

[113]. **Daughney, C.J., Fein, J.B., Nathan, Y.**, «A comparison of the thermodynamics of metal adsorption into two common bacteria». Chem. Geol (1998). 144, 161–176.

- [114]. **Van der Veer, H. W., S. A. L. M. Kooijman et J. van der Meer** "Intra- and interspecies comparison of energy flow in North Atlantic flatfish species by means of dynamic energy budgets." *Journal of Sea Research* (2001), **45**: 303-320.
- [115]. **Esposito, A., Paganelli, F., Veglio, F.**, « pH related equilibria models for biosorption in single metal systems ». *Chem. Eng. Sci* (2002). **57**, 307–313.
- [116]. **Brown, D.H. et Bates, J.W.**, «Bryophytes and nutrient cycling». *Botanical Journal of Linnean Society* (1990), **104**: 129-147.
- [117]. **Clymo, R.S.**, « Ion exchange in Sphagnum and its relation to bog ecology». *Annals of Botany* (1963), **27**: 309-324.
- [118]. **Errecalde, O., M. Seidl et P. G. C. Campbell**. "Influence of low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: an exception to the Free-Ion Model." *Wat. Res* (1998) **32**: 419-429.
- [119]. **Brown, D.H.**, «Mineral nutrition. In: A.J.E. Smith (Editor), *Bryophyte Ecology*». Academic Press, London (1982), pp. 383-443.
- [120]. **Mouvet, C., Morhain, E., Sutter, C. et Couturieux, N.**, «Aquatic mosses for the detection of follow-up of accidental discharges in surface waters». *Water, Air and Soil Pollution* (1993), **66**: 333-348.
- [121]. **Vazquez, M.D., Lopez, J. et Carballeira, A.**, «Uptake of heavy metal to the extracellular and intracellular compartment in tree species of aquatic bryophytes». *Ecotoxicology and Environment Safety*, (1999) **44**: 12-24.
- [122]. **Maes, M.**, « Les résidus industriels : Traitement, volatilisation, législation » Ed. Tec & doc Paris (1975).
- [123]. **Luoma, S. N.** "Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - a review." *Sci. Total. Environ* (1983). **28**: 1-22.
- [124]. **Simkiss, K. et M. G. Taylor** «Transport of Metals across Membrane in Metal speciation and bioavailability in aquatic systems». A. Tessier et D. R. Turner, Wiley. **3**: 2-39, (1995).
- [125]. **Simkiss, K., M. Taylor et A. Z. Mason** "Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs." *Mar. Biol. Letters* (1982), **3**: 197-201.
- [126]. **Vincent, C.D., Lawlor, A.J. et Tipping, E.**, "Accumulation of Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd and Pb by the bryophyte *Scapania undulata* in three upland waters of different pH". *Environmental Pollution* (2001), **114**(1): 93-100.
- [127]. **Brown, D.H. and Whitehead, A.**, The effect of mercury on the physiology of *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. *Journal of Bryology* (1986), **14**: 367-374.

- [128]. **Brown, D.H. and Wells, J.M.**, "The extracellular and intracellular uptake of inorganic chemicals by bryophyte" In: H.D.Z.a.R. Mues (Editor), *Bryophytes: their Chemistry and Chemical Taxonomy*. Clarendon press, Oxford (1990), pp. 299-318.
- [129]. **Steffens JC.**, «The heavy metal- binding peptides of plants». *Annu. Rev. Plant physiol. Plant mol. boil.* (1990), 41: 553-575.
- [130]. **Rausser WE** , "Copper –binding protein and copper tolerance in *Agrostis gigantean*" *Plant Sci.* (1984), 33: 239-247.
- [131]. **Bruns, I., Friese, K., Markert, B. and Krauss, G.J.**, «The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 2. Heavy metal accumulation and physiological reaction of *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. in active biomonitoring in the river Elbe». *The Science of the Total Environment* (1997), 204(2): 161-176.
- [132]. **Zenk, M.H., Meinhart 1996.** "Heavy metal detoxification in higher plants"- a review. *Gene*, 179: 21-30.
- [133]. **Rufus L Chaney, Minnie Malik , Yin M L , Sally L Brown , Eric P Brewer , J Scott Angle , and JM Baker** , "Phytoremediation of soil metals". *Current opinion in Biotechnology* (1997), 8:279-284.
- [134]. **Bruns, I., Sutter, K., Menge, S., Neumann, D. & Krauss, G.-J.**, «Cadmium lets increase in glutathione pool in bryophytes». *Journal of Plant Physiology* (2001), 158: 79-89.
- [135]. **Johnston, W. et Proctor, J.,.** «Metal concentration in plants and soils from two british serpentine sites». *Plant Soil.* (1977), 46: 275-278.
- [136]. **Maurel-Kermarrec, A., Pally, M., Foulquier, L. & Hébrard, J.P.**, « Cinétique de la fixation d'un mélange de césium 137, de chrome 51, de cobalt 6, de manganèse 54 et de sodium 22 par *Platyhypnidium riparoides* (Hedw.) Dix ». *Cryptogamie, Bryologie et Lichénologie* (1983), 4(4): 299-313.
- [137]. **George, S. G., E. Carpené et T. L. Coombs** «The effect of salinity on the uptake of cadmium by the common mussel, *Mytilus edulis* (L.). Physiology and behaviour of marine organisms». D. S. McLusky et A. J. Bary. Oxford, Pergamon Press (1978): 189-193.
- [138] **Kohler, K. et H. U. Riisgard** "Formation of metallothioneins in relation to accumulation of cadmium in the common mussel *Mytilus edulis*." *Mar.Biol* (1982), **66**: 53-58.
- [139]. **Poulsen, E., H. U. Riisgard et F. Mohlenberg.** "Accumulation of cadmium and bioenergetics in the mussel *Mytilus edulis*." *Mar. Biol* (1982), **68**: 25-29.
- [140]. **Chong, K. et W.-X. Wang.** "Comparative studies on the biokinetics of Cd, Cr and Zn in the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*." *Environ. Pollut* (2001), **115**(1): 107-121.

- [141]. **Sunda, W. G. et S. A. Huntsman.** "Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems." The Science of the Total Environment (1998), 219: 165-181.
- [142]. **Boudou, A., J. P. Desmazes et D. Georgescauld** "Fluorescence quenching study of mercury compounds and liposome interactions: effect of charged lipid and pH." Ecotox. Environment. Safety (1982), 6:379-387.
- [143]. **Boudou, A., D. Georgescauld et J. P. Desmazes.** "Ecotoxicological role of the membrane barriers in transport and bioaccumulation of mercury compounds". Aquatic Toxicology. J. O. Nriagu. New York, J. Wileyland Sons (1983): 118-136.
- [144]. **Wehr, J.D. Whitton, B.A.,** «Accumulation of heavy metals by aquatic mosses» 3: Seasonal changes. Hydrobiologia (1983), 100: 285-291.
- [145] **Glime, J.M.,** "Growth model for *Fontinalis duriaei* based on temperature and flow conditions". Journal of the Hattori Botanical Laboratory (1987), 62: 101-109.
- [146] **Kelly, M.G. et Whitton, B.A.,** Growth rate of the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides* in Northern England. Freshwater Biology (1987) , 18: 461-468.
- [147]. **Nunez-Olivera, E., Garcia-Alvaro, M.A., Beaucourt, N. et Martinez-Abaigar, J.,** « Changes in element concentrations in aquatic bryophytes over an annual cycle ». Archiv fur Hydrobiologie (2001), 152(2): 253-277.
- [148]. **Engleman, C.J. et McDiffett, W.F.,** "Accumulation of aluminium and iron by bryophytes in streams affected by acid-mine drainage". Environmental Pollution (1996), 94(1): 67-74.
- [149]. **Ciffroy, P., Vazelle, D. et Claveri, B.,** « Méthode de mesure de micropolluants biodisponibles basée sur l'utilisation de bryophytes en milieu contrôlé et sur un modèle numérique d'interprétation quantitative »: dossier technique (1994), HE-31/94/14, EDF, Chatou.
- [150]. **Siebert, A., Bruns, I., Krauss, G.J., Miersch, J. et Markert, B., 1996.** "The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw as a bioindicator for heavy metals 1-Fundamental investigations into heavy metal accumulation in *Fontinalis antipyretica* L. ex. Hedw". The Science of the Total Environment (1998), 177: 137-144.
- [151]. **Claveri, B. et Mersch, J.,** « Les bryophytes comme outil de surveillance de la qualité des eaux courantes par les micropolluants métalliques: Concept, méthodologie et interprétation des données », Université de Metz (1998), Agences de l'Eau, Metz.
- [152]. **Yoshimura, E. et al.,** «Accumulation of metals and cellular distribution of aluminium in the liverwort *Scapania undulata* in acidic and neutral streams in Japan». Journal of Environmental Science & Health Part A Toxic/Hazardous Substances et Environmental Engineering (1998), 33(4): 671-680.
- [153]. **Denayer, F.O.,** « Ecotoxicité des éléments traces métalliques chez les bryophytes ». Université de Metz (2000), 231 pp.

- [154]. **Heller, R** « Nutrition et métabolisme » Biologie végétale (1969), Tome II, Ed. Masson 331-334p
- [155]. **Haury, J. et al.**, « 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 (2000), UMR INRA-ENSA EQHC Rennes & CREUM-Phytoécologie Univ. Metz. Agence de l'eau Artois Picardie.
- [156]. **Stobart, A.K., Griffith, W.T., Bukhari, I.A. and Sherwood, R.P.**, "The effect of Cd₂₊ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley". *Physiologia plantarum* (1985), 63: 293-298.
- [157]. **Bogges, S.F; Aspinall, D. et Paleg, L.G** « Stress metabolism .IX. The significance of end-product inhibition of proline synthesis and of compartmentation in relation to stress-induced proline accumulation. *Aust. J.Plant Physiol* (1976)., 3, pp. 513-525.
- [158]. **Lignowski, E.M. et Splittstoesser, W.E.** "Arginine synthesis, proline synthesis and related process" . In JOHN & THOMPSON (Eds): *The Biochemistry of plants* (1971), 25, pp. 225-229.
- [159]. **Blum, A et Ebercon, A** , "Genotypic responses in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance". *Crop Science* (1976), 16,pp. 428-431.
- [159]. **Jones, M.M. ; Osmond, C.B. et Turner, N.C.** - Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. *Aust. J. Plant Physiol* (1980), 7, pp. 193-205.
- [160]. **Casas**, « Modélisation de la bioaccumulation des métaux de traces (Hg, Cd, Pb, Cu, et Zn) chez la Moule, *Mytilus Galloprovincialis*, en milieu Méditerranée » Thèse de doctorat, Université du Sud Toulon France (2005).
- [161]. **Lake, J. L., N. I. Rubinstein et S. Pavignano** "Prediction bioaccumulation: Development of a partitioning model for use as a screening tool in regulation ocean disposal of wastes. Fate and effects of sediment bound chemicals in aquatic systems". K. L. Dickson, A. W. Maki et W. A. Brungs. Elmsford, N.Y, Pergamon Press (1987): 151-166.
- [162]. **Walker.C.H.** "Kinetic models to predict bioaccumulation of pollutants." *Functional Ecology* (1990), 4: 295-301.
- [163]. **Landrum, P. F., H. Lee et M. J. Lydy.** "Toxicokinetics in aquatic systems: model comparisons and use in hazard assesment." *Environ. Toxicol. Chem* (1992),n°11: 1709-1725.
- [164]. **Reinfelder, J. R., N. S. Fisher, S. N. Luoma, F. H. Nichols et W.-X. Wang** "Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach." *The Science of the Total Environment* (1998), 219: 117-135.

- [165]. **Chu, KH. Hashim, MA. Phang, S.H, Samuel, V.B .**, "Biosorption of cadmium by algal biomass: adsorption and desorption characteristics. Water Sci. Technol (1997). 35 (7), 115-122.
- [166]. **Chitour, SE** « Chimie des surfaces, introduction à la catalyseur » 2^{ème} édition, OPU-Algerie (1981).
- [167]. **Zauke, G.P.**, «Cadmium in Gammaridae (*Amphipoda: Crustacea*) of the rivers Werra and Weser», Water Research, (1982), V.16,n°6, 785-792.
- [168]. **Wang, W.-X., N. S. Fisher et S. N. Luoma.**, "Assimilation of trace elements ingested by the mussel *Mytilus edulis*: Effects of algal food abundance." Mar. Ecol. Prog. Ser (1995). **129**: 165-176.
- [169]. **Wang, W.-X. et N. S. Fisher.** "Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates." The Science of the Total Environment 237/238 (1999): 459-472.
- [170]. **Wang.** "Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach." The Science of the Total Environment (1998), **219**: 117-135.
- [171]. **Depledge, M. H. et P. S. Rainbow** "Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates." Comp. Biochem. Physiol (1990), **97C**: 1-7.
- [172]. **Loizeau, V. et P. Cugier**, «A model of PCB bioaccumulation in the blue mussel (*Mytilus edulis*) from the bay of Seine (Eastern English Channel)». SETAC Europe 12th annual meeting (2002), 12-16 May 2002, Vienna, Austria.
- [173]. **OZIL. P.**, "Plans d'expériences (D.O.E.) Modélisation empirique Méthodologie de surface de réponses Méthodologie TAGUCHI", ENS d'électrochimie et d'électrometallurgie, INPG-1997.
- [174]. **Davies. O.L** « The design and analysis of industrial Experiments». Oliver and Boyd, Edinburgh (1971), 637 p.
- [175]. **Schimmerling .P., J-C. Sission, A. Zaidi** , " Pratique des plans d'expériences". Tec et doc., Lavoisier, Paris, (1998).
- [176]. **Fisher, H.** "Cadmium body burden-shell weight of mussels: a precise index for environmental monitoring". International Council for the Exploration of the Sea, C.M. 1984/E41, Marine Environmental Quality Committee (1984): 1-19.
- [177]. **Goupy. J .**, «Plans d'expériences pour surfaces de réponse» Edition Dunod., Paris (1999).
- [178]. **Vigier M.G.**, « pratique des plans d'expériences. Méthodologies Taguc » Les éditions d'organisation, Paris, 155 pages. 1988.

- [179]. **Belaiche, T. Rutledge D.M., Ducauze C.J.**, « Etalonnage et détermination simultanée en chromatographie : application des plans d'expérience », *Analisis* (1993), vol 21, n°5, 243-254p.
- [180]. **Muller, H.G.**, « Experiences with test systems using *Daphnia magna* » *Ecotoxicology and Environmental Safety* (1980), V.4, n°1, 21-25.
- [181]. **Boutemak.K.**, « Développement d'une méthodologie expérimentale pour la formulation d'un générique de type emulgel », Thèse de magistère, Univ Blida (2000).
- [182]: **Hoagland D. et Arnon DI.**, « The Water cultured method for growing plants without soil » *Calif.Agric. Exp.Stn.Circ* (1938). 347,39p.
- [183]: **Monneveux et Nemmar**, - Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.): Etude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie* (1986), 6 (6), pp. 583-590.
- [184]. **Alaerts, G.J., M.D.Rahaman Mahbubar, and P. Kelderman**. "Performance analysis of a full-scale duckweed-covered sewage lagoon". *Water Res* (1996). 30(4): 843-852.
- [185]. **Cheng, L. Landesman, B. A. Bergmann, J. J. Classen, J. W. Howard, Y. T. Yamamoto** «Nutriment removal from swine lagoon liquid by *Lemna minor* 8627 » art. *American Society of Agricultural Engineers* (2002), ISSN 0001-2351.
- [185]. **Kluttgen, B. and Ratte, H.T.**, "Effects of different food doses on cadmium toxicity to *Daphnia magna*", *Environmental Toxicology and Chemistry* (1994), V.13, n°10, 1619-1627.
- [186]. **Salt D. E., Smith, R. D., and I. Raskin**, "Phytoremediation". *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* (1998), 49:643-96.
- [187]. **Lopez, J. et Carballeira, A.**, "Interspecific differences in metal bioaccumulation and plant-water concentration ratios in five aquatic bryophytes". *Hydrobiologia* (1993) 263(2): 95- 107.
- [188]. **De Knecht JA, Koevoets PLN, Verkleij JAC et Ernst WHO**. " Evidence against a role for phytochelatins in naturally selected increased cadmium tolerance in *silene vulgaris*" (Moench) Garcke. *new phytol* (1993) .,122: 681-688.
- [189].**Stendahl, D.H., and Sprague, J.B.**, "effects of water hardness and pH on vanadium lethality to rainbow trout", *Water Research*, V.16, n°10, (1982), 1479-1488.
- [190]. **Roditi, H. A. et N. S. Fisher** "Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels." *Limnol. Oceano gr* (1999), 44: 1730-1749.
- [191]. **Thomann, R. V. et J. P. Connoly** "Model of PCB in the lake Michigan trout food chain." *Environ. Sci. Technol* (1984), 18(1): 65-71.

- [192]. **Wong, P.K. et Chang, L.**, “Effects of copper, chromium and nickel on growth, photosynthesis and chlorophyll a synthesis of *Chlorella pyrenoidosa*”. Env.Pollution (1991), 72: 1299-1307.
- [193]. **Bengston, C Klockare, B. Klockare, R. Larsson, S. et Sundquist. C.** “The after effect of water stress on chlorophyll formation during greening and the level of abscisic acid and praline in dark grown wheat seedlings” . Plant Physiol. (1978) 43. pp. 205-212.
- [194]. **Rainbow, P. S., Wolowicz. M., Fialkowski. W., Smith. B.D and Sokolowski,A.**, «Biomonitoring of trace metals in the gulf of Gdansk, using mussels (*Mytilus trossulus*) and barnacles (*Balanus improvisus* » Water Research (2000) , V.34, n°6, 1823-1829.
- [195]. **Taylor,G., Baird, D.J. and Soares,** « Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to daphnia magna Straus», Environmental Toxicology and Chemistry, V.17, n°3, (1998), 412-419.
- [196]. **Borgmann, U. and Ralph, K.E.**, “Complexation and Toxicity of copper and free metal bioassay technique”, Water Research (1983), V.17, n°11, 1697-1703.
- [197]. **Graney, R.L., Cherry, D.S., and Cairns, J.**, “The influence of substrate, pH, diet and temperature upon cadmium accumulation in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in laboratory artificial stream”, Water Research (1984), V.18 n° 7, 833-842.
- [198]. **Jacobson, L., Hannapel, R., Moore, D. and Schaedle, M.**, Influence of calcium on selectivity of ion absorption process. Plant Physiology (1960): p.58-61.
- [199]. **Ketchum, R Warren, R Kmima, L. Lopez,G and Nabors, M.N.**, “The mechanism and regulation of praline accumulate ion in suspension culture af halophytic grass *Distichlis spicata*”. J.Plant Physiol. (1991), 137, p. 368-374.
- [200]. **Morel. J.L., Bitton, C. Schwartz, M. Shiavon.** Rapport pour l’OCDE Ecotoxicology : Responses, biomarkers and risk assessment, 1997.
- [201]. **Rodier. J.;** « L’analyse de l’eau » 8^{ième} Edition Dunod, Paris, 1996.

