

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences de l'Ingénieur

Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

En Chimie Industrielle

Spécialité : Génie des Procédés

**CONCEPTION D'UN PROCEDE BIOLOGIQUE POUR LE
CONTROLE DE LA QUALITE DE L'EAU CONTENANT
 Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} EN UTILISANT L'AZOTE PRODUIT
PAR LA PLANTE AQUATIQUE « *LEMNA GIBBA* »**

Par

Linda BELHADJI EPOUSE MEKIDAD

Devant le jury composé de :

H.KHALAF	Professeur, U. de Blida	Président
A.BADIS	Maître de conférences, U. de Blida	Examineur
M.BRADA	Maître de conférences, C.U.DE KHEMIS MILIANA	Examineur
A.ROUIBI	Chargé de cours, U. de Blida	Invité
S.SEMSARI	Maître de conférences, U. de Blida	Rapporteur

Blida, Juin 2008

RESUME

Les métaux lourds sont considérés toxiques dans les écosystèmes aquatiques. Il est donc question de mettre au point des méthodes de contrôle de la toxicité de certains cations métalliques tels que Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} , moyennant l'étude de fixation de ces métaux, sur une plante aquatique. La lentille d'eau *Lemna gibba* est sélectionnée pour la réalisation de cette étude en vue de réaliser des essais écotoxicologiques pour le suivi de l'inhibition de la croissance de la *Lemna gibba* et pour quantifier l'influence de Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} sur les échanges d'azote (N-NH_4 , NTK, NO_3^- et NO_2^-) entre la plante et son milieu de culture et sur la biosynthèse des protéines au niveau de la plante.

ABSTRACT

Heavy metals are considered toxic in the aquatic ecosystems. It is thus a question of developing methods of control of the toxicity of certain metal cations such as Cd^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} with the help of the study of the fixation of these metals on an aquatic plant. The duckweed *Lemna gibba* is selected for the realization of this study in order to carry out ecotoxicological tests for following-up the inhibition of the growth of *Lemna gibba* and to quantify the influence of Cd^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} on the exchanges of nitrogen (N-NH_4 , NTK, NO_3^- and NO_2^-) between the plant and its culture medium and on the biosynthesis of proteins on the level of the plant.

ملخص

تعتبر المعادن الثقيلة جد سامة بالنسبة الى المسطحات المائية. و لهذا السبب يستوجب وضع طرق لمراقبة سامية الايونات الشارديّة لهذه المعادن مثل Zn^{2+} ، Cu^{2+} و Cd^{2+} و كذا دراسة تثبيّت هذه المعادن على المسطحات المائية. و لهذا الغرض تم لاهتمام بنبات (*Lemna gibba*) لإنجاز هذه الدراسة حيث أجريت عدة تجارب لدراسة مدى تأثير نمو (*Lemna gibba*) و كذا إجراء دراسة كمية لتأثير Zn^{2+} ، Cu^{2+} و Cd^{2+} على الازوت ($N-NH_4$, NTK , NO_3^- , NO_2) بين المسطحات المائية و المحيط البكتيري و على البروتينات.

REMERCIEMENTS

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Madame S.SEMSARI Maître de Conférences au niveau du Département de Chimie Industrielle de la faculté des sciences de l'ingénieur de l'Université Saad Dahlab de Blida. Quelle trouve ici l'expression de ma vive gratitude, pour m'avoir proposé un thème très intéressant pour mon mémoire, ainsi que pour les orientations et le soutien constant qu'elle n'a cessé de m'apporter dans le cadre de ce travail, tout en me faisant bénéficier de son expérience enrichissante.

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.

Je souhaite particulièrement remercier Monsieur H.KHALAF, Professeur 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, Monsieur, M.BRADA Maître de conférences à l'université d'El KHEMIS au département de génie des procédés pour avoir accepté de faire partie du jury de ma soutenance, Monsieur A. ROUIBI, Chargé de cours au Département de Biologie de la faculté des sciences Agronomiques et Vétérinaire de l'Université Saad Dahlab de Blida, Monsieur A.BADIS, Maître de conférences au Département de Chimie Industrielle de la faculté des sciences de l'ingénieur de l'Université Saad Dahlab de Blida pour avoir accepté de faire partie du jury de ma soutenance.

En fin, que tous ceux ou celles qui m'ont apporté leur soutien et leur amitié tout au long de ce travail, trouve ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1.1	Méthodologies d'évaluation des effets écotoxicologiques	22
Figure 2.2	Représentation schématique du rôle des agents complexant dans l'assimilation des métaux (M) par les organismes aquatiques	30
Figure 3.3	La famille des lentilles d'eau	40
Figure 3.4	Arbre phylogénétique évolutif des lemnacées	41
Figure 3.5	Le cycle de l'azote	46
Figure 4.6	Site d'El-Kala Annaba	53
Figure 4.7	Site de Beni Tamou Blida	53
Figure 4.8	Site du jardin d'El Hamma (Alger)	53
Figure 5.11	Variation du taux d'inhibition de la croissance de la <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps ; $I \pm$ Ecart-types, n =3 : Cas du cadmium	66
Figure 5.12	Variation du taux d'inhibition de la croissance de la <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps ; $I \pm$ Ecart-types, n =3 : Cas du cuivre	66
Figure 5.13	Variation du taux d'inhibition de la croissance de la <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps ; $I \pm$ Ecart-types, n =3 : Cas du zinc	67
Figure 5.14	Variation du % azote total contenues dans les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps, % NTK \pm Ecart-types, n = 3 : Cas du cadmium	68
Figure 5.15	Variation du % azote total contenues dans les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps, % NTK \pm Ecart-types, n = 3 : Cas du cuivre	69
Figure 5.16	Variation du % azote total contenues dans les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps, % NTK \pm Ecart-types, n = 3 : Cas du zinc	69
Figure 5.17	Variation des concentrations de NO_2^- dans les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps ; $[\text{NO}_2^-] \pm$ Ecart-types, n = 3 : Cas du cadmium	71
Figure 5.18	Variation des concentrations de NO_2^- dans les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps ; $[\text{NO}_2^-] \pm$ Ecart-types, n = 3 : Cas du cuivre	71

Figure 5.19	Variation des concentrations de NO_2^- dans les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps ; [NO_2^-] \pm Ecart-types, n = 3 : Cas du zinc	72
Figure 5.20	Variation des concentrations de NH_4^+ dans les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i> en fonction de la concentration de Cd^{2+} , [NH_4^+] \pm Ecart-types, n = 3, Durée de l'essai égale à 10 jours	73
Figure 5.21	Variation des concentrations de NH_4^+ dans les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i> en fonction de la concentration de Cu^{2+} , [NH_4^+] \pm Ecart-types, n = 3, Durée de l'essai égale à 10 jours	74
Figure 5.22.	Variation des concentrations de NH_4^+ dans les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i> en fonction de la concentration de Zn^{2+} , [NH_4^+] \pm Ecart-types, n = 3, Durée de l'essai égale à 10 jours	74
Figure 5.23	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps; [NO_3^-] \pm Ecart-types, n = 3, [Cd^{2+}] = 10^{-3} ppm	76
Figure 5.24	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps; [NO_3^-] \pm Ecart-types, n = 3, [Cd^{2+}] = 10^{-2} ppm	76
Figure 5.25.	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps; [NO_3^-] \pm Ecart-types, n = 3, [Cd^{2+}] = 10^{-1} ppm	77
Figure 5.26	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps; [NO_3^-] \pm Ecart-types, n = 3, [Cu^{2+}] = 10^{-2} ppm	77
Figure 5.27	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps; [NO_3^-] \pm Ecart-types, n = 3, [Cu^{2+}] = 10^{-1} ppm	78
Figure 5.28	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps; [NO_3^-] \pm Ecart-types, n = 3, [Cu^{2+}] = 1 ppm	78
Figure 5.29	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps; [NO_3^-] \pm Ecart-types, n = 3, [Zn^{2+}] = 50 ppm	79

Figure 5.30	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps; $[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart-types}$, $n = 3$, $[\text{Zn}^{2+}] = 70 \text{ ppm}$	79
Figure 5.31	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction du temps; $[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart-types}$, $n = 3$, $[\text{Zn}^{2+}] = 90 \text{ ppm}$	80
Figure 5.32	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de Culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction de la concentration de Cd^{2+} , $[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart-types}$ $n = 3$, durée égale à 10 jours	81
Figure 5.33	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de Culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction de la concentration de Cu^{2+} , $[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart-types}$ $n = 3$, durée égale à 10 jours	81
Figure 5.34	Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de Culture de <i>Lemna gibba</i> en fonction de la concentration de Zn^{2+} , $[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart-types}$ $n = 3$, durée égale à 10 jours	82
Figure 5.35	Variation des quantités de nitrates absorbé dans la <i>Lemna gibba</i> en fonction de différentes concentrations de cadmium, $\text{NO}_3^-(\text{mg.g}^{-1}\text{MS}) \pm \text{Ecart-types}$, $n = 3$	83
Figure 5.36	Variation des quantités de nitrates absorbé dans la <i>Lemna gibba</i> en fonction de différentes concentrations de cuivre, $\text{NO}_3^-(\text{mg.g}^{-1}\text{MS}) \pm \text{Ecart-types}$, $n = 3$	84
Figure 5.37	Variation des quantités de nitrates absorbé dans la <i>Lemna gibba</i> en fonction de différentes concentrations de cuivre, $\text{NO}_3^-(\text{mg.g}^{-1}\text{MS}) \pm \text{Ecart-types}$, $n = 3$	84
Figure 5.38	Variation de la teneur en protéines dans la <i>Lemna gibba</i> en fonction des différentes concentrations de cadmium	85
Figure 5.39	Variation de la teneur en protéines dans la <i>Lemna gibba</i> en fonction des différentes concentrations de cuivre	86

Figure 5.40	Variation de la teneur en protéines dans la <i>Lemna gibba</i> en fonction des différentes concentrations du zinc	86
Tableau 2.1	Liste (non exhaustive) des éléments essentiels et non essentiels et exemple de propriétés des éléments connus pour Essentialités	33
Tableau 4.2	Concentrations des métaux choisis pour les bioessais	56
Tableau 4.3	Préparation de la gamme étalon pour le dosage des protéines totales	62
Tableau 5.4	Modèles mathématiques exprimant la quantité de nitrates absorbée en fonction des concentrations de Cd, Cu	83
Tableau 5.5	Valeurs des rapports de la teneur en protéines dans les plantes sur la quantité des nitrates absorbés exposés à différentes concentrations en métaux lourds	87
Tableau 5.6	Modèles mathématiques exprimant la quantité de protéines en fonction des concentrations de Cd, Cu et Zn	88

TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTES DES ILLUSTRATIONS, GRAPHYQUES ET TABLEAUX

INTRODUCTION	12
1. NOTIONS DE TOXICOLOGIE ET D'ECOTOXICOLOGIE	
1.1 La toxicologie	14
1.2 Caractérisation de l'impact des polluants sur les écosystèmes aquatiques	18
2. LES METAUX LOURDS ET LEURS IMPACTS SUR L'ENVIRONNEMENT	
2.1 Généralités	26
2.2 Origine de métaux dans l'hydrosphère	27
2.3 Les sources anthropogènes	28
2.4 Répartition et devenir des métaux lourds dans le milieu aquatique	28
2.5 Biodisponibilité des métaux dans les écosystèmes aquatiques	29
2.6 Evolution des organismes en présence des métaux	32
2.7 Effets des métaux lourds sur les milieux aquatiques	34
2.8 Spéciation des métaux en milieu aquatique	34
2.9 Les effets écologiques de certains métaux lourds	35
3. GENERALITE SUR LES LENTILLES D'EAUX	
3.1 Généralités	38
3.2 Taxonomie des lemnacées	39
3.3 Différents types de lemnacées	40
3.4 Ecologie des lentilles d'eau	41
3.5 Facteurs écologiques	42
3.6 Rôle physico-chimique	43
3.7 Indicateurs biologiques	43

3.8	Utilisation des lentilles d'eaux comme bioindicateurs	44
3.9	L'azote dans les écosystèmes	45
4.	MATERIELS ET METHODES	
4.1	Matériels et méthodes	53
4.2	Tests de toxicité ou bioessais	56
4.3	Analyse des résultats	63
5.	RESULTATS ET DISCUSSION	
5.1	Les essais écotoxicologiques	65
5.2	Effet de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sur l'azote total contenu dans les milieux de Culture de la <i>Lemna gibba</i>	68
5.3	Effet de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sur les nitrites contenu les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i>	70
5.3	Effet de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sur les quantités d'ammoniaque et de nitrates contenu dans les milieux de culture de la <i>Lemna gibba</i>	73
5.5	Effet de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sur la quantité des protéines au niveau de la biomasse végétale	85
	CONCLUSION	89
		90
	APPENDICES	
	REFERENCES	

INTRODUCTION

L'environnement, atmosphérique, terrestre et aquatique est soumis à la pression croissante des activités industrielles et humaines dont les effets se sont faits rapidement sentir.

Une substance d'origine anthropique rejetée dans le milieu est un contaminant, si elle exerce des effets défavorables sur le plan biologique, il s'agit alors d'un polluant [1] ou d'un xénobiotique [2]. Ce dernier terme désigne toute substance qui n'existe pas à l'état naturel et qui se caractérise par une forte toxicité à de faibles concentrations, [3]. Les contaminants rejetés dans l'environnement finissent par se retrouver plus ou moins rapidement dans les milieux aquatiques, en particulier estuariens et côtiers, où ils peuvent avoir des effets à court et à long terme [4].

La surveillance du milieu et des écosystèmes est exercée depuis plusieurs années afin d'éviter les conséquences parfois graves de la pollution. Le suivi de l'impact des métaux lourds entre autres agents nocifs a mis en relief l'importance d'une discipline scientifique connu sous le nom d'écotoxicologie.

Pour l'évaluation de la qualité de l'eau, les méthodes écotoxicologiques, utilisent comme substrat biologique ou réactif biologique des espèces végétales et/ou animales appartenant à divers maillons des chaînes trophiques. Ces tests présentent l'avantage d'être plus économiques que les analyses physico-chimiques, surtout lorsqu'il s'agit d'assurer la surveillance de la qualité de l'eau d'un écosystème dans le temps.

Depuis les années 1970, les lemnaées sont largement utilisées en raison de leur grand potentiel d'absorber les contaminants minéraux résiduels émanant des activités anthropiques [5] et d'autres travaux ont mis en évidence que certains végétaux aquatiques accumulent les éléments traces métalliques à proximité des sites miniers[6].

L'utilisation des plantes aquatiques pour éliminer les nutriments des eaux polluées et lutter contre l'eutrophisation des cours d'eau et des lacs a aussi été un des moteurs

de la recherche dans les pays précurseurs. Ces stations se sont montrées très performantes dans l'élimination de la pollution carbonée avec des rendements pouvant atteindre 95 % sur les principaux paramètres MES, DBO₅, DCO, azote et phosphore [7-11].

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de recherche dont l'objectif principal est l'utilisation des plantes aquatiques pour la bio surveillance de la qualité des eaux.

La démarche de ce travail consiste en :

- La réalisation des tests de toxicités chroniques sur la *Lemna gibba* en présence du Cd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ et le suivi de la croissance.
- L'étude analytique des différentes formes d'azote, NO₃⁻, NO₂⁻, azote ammoniacal et l'azote KJELDAHL contenus dans le milieu de culture.

A cet effet, nous nous sommes proposé de réaliser les travaux qui constituent notre étude autours des chapitres suivants :

- Une synthèse bibliographique.
- Matériels et méthodes.
- L'évaluation des effets des métaux étudiés sur :
- Le taux d'azote, nitrates, nitrites, l'azote ammoniacal et l'azote KJELDAHL contenus dans les milieux de culture de la *Lemna gibba* contaminés par le cadmium, le cuivre et le zinc.
- Le dosage des protéines.

CHAPITRE 1

NOTIONS DE TOXICOLOGIE ET D'ECOTOXICOLOGIE

1.1 La Toxicologie

1.1.1 Définition de la toxicologie

- 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 des perturbations des fonctions de l'organisme conduisant à des effets nocifs dont le plus grave, de toute évidence est la mort [12].
- D'après RAMADE 1979 cette science a pour objet d'étudier les modes d'actions des toxiques sur les poisons tant sur le plan analytique qu'au point de vue physiologique et biochimique [12].
- VIALA 2005 définit la toxicologie comme étant la science qui s'intéresse aux toxiques, à leurs propriétés, à leur devenir dans l'organisme à leur mode d'action, à leur recherche dans différents milieux et aux moyens (préventifs et curatifs) permettant de combattre leur nocivité [13].

1.1.2 Définition de la toxicologie industrielle

La toxicologie industrielle est une branche greffée sur le tronc de la toxicologie médico-légale, ne doit pas surprendre ; les sources d'intoxication, le mode de pénétration, les buts à atteindre, de même que les moyens à mettre en œuvre, sont bien différents dans les deux domaines [14].

La toxicologie industrielle évolue en permanence. Les acquis scientifiques s'élargissent et se diversifient par l'amélioration des connaissances en matière de cinétique et de mécanismes d'action des toxiques seuls ou en association et de

détection précoce des expositions et des effets par l'utilisation de biomarqueurs de plus en plus sensibles et spécifiques.

L'évaluation des risques liés à l'exposition toxique est un objectif majeur de la toxicologie industrielle. Elle doit intégrer cinq groupes de facteurs :

- L'état (liquide, gaz, vapeur, aérosol) dans les conditions habituelles d'utilisation ;
 - La pureté (présence d'additifs ou de contaminants) ;
 - La solubilité (dans l'eau) ;
 - Le niveau, la durée et la fréquence de l'exposition ;
 - Les voies d'introduction dans l'organisme : pulmonaire (gaz et vapeurs apolaires), percutanée (Liquides liposolubles) ;
- ❖ [14]. La dose absorbée et les relation dose effet : est la dose réellement incorporée par l'organisme à un niveau d'exposition donné : quand il existe une relation démontrée entre le niveau d'exposition, la dose absorbée et les manifestations cliniques et/ou biologiques, on définit une relation dose effet (ou dose-réponse) ;
- ❖ La susceptibilité interindividuelle et intra individuelle des salariés : ce concept tente d'intégrer les principaux facteurs intervenant dans la variabilité des délais d'apparition des effets (immédiats retardés, très différés), de leur intensité et parfois même de leurs caractéristiques symptomatiques ; ces facteurs sont liés à l'âge, au sexe, à l'état de santé, à l'hygiène de vie, aux polymorphismes génétiques et aux multi expositions toxiques

1.1.3 Les diverses manifestations de la toxicité

La toxicité peut se manifester de deux manières [15] :

- ✓ Indirectement: par accumulation tout au long d'une chaîne alimentaire (bioaccumulation). L'apparition des effets toxiques se fait au niveau des éléments terminaux de la chaîne trophique.
- ✓ Directement: au niveau d'une espèce, on distingue en général trois formes d'intoxication :

a) La toxicité aiguë

La toxicité aiguë peut donc se définir comme celle qui provoque la mort ou de très graves troubles physiologiques après un court délai suivant l'absorption en une fois ou en plusieurs répétitions [12], [16], [17].

b) La toxicité sublétales (subaiguë)

Celle-ci diffère de la précédente par le fait qu'une proportion significative de la population peut survivre à l'intoxication bien que tous les individus aient présenté des signes cliniques découlant de l'absorption du toxique [12],[17].

Elle résulte d'expositions fréquentes ou répétées sur une période de plusieurs jours ou semaines [12].

c) La toxicité chronique (à long terme).

Dans ce cas les effets toxiques sont produits par l'exposition chronique à de très faibles concentrations, parfois même à des doses infimes de substances polluantes dont la répétition d'effets cumulatifs provoque des troubles beaucoup plus insidieux [17], [18].

Par conséquent la concentration du toxique dans l'organisme augmente progressivement pour atteindre une concentration susceptible d'engendrer des manifestations toxiques [12], [16], [18].

1.1.4 Interactions entre agents toxiques

Lorsque plusieurs toxiques sont présents dans un milieu, leurs actions peuvent simplement s'ajouter, se renforcer ou se combattre.

Si la toxicité du mélange est supérieure à la somme de toxicité de chaque composant il y a synergie, si au contraire la toxicité globale est inférieure il y'a antagonisme [12], [16], [19].

1.1.5 Les agents toxiques et l'environnement

Plusieurs facteurs capables de transformer le métabolisme des polluants responsables des effets toxiques. L'action toxique d'un composé dans un milieu dépend de nombreux facteurs parmi lesquels : [20]

1. Le composé lui même [20]

- Son état, qu'il soit solide, liquide ou gazeux.
- Sa solubilité.
- Sa dissociation.

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 trace [21].

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 [21].

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 [21-25].

Plus la température de l'eau est élevée plus les besoins en oxygène sont grands, c'est pourquoi qu'un changement de température dans une rivière ou un lac peut altérer tout l'équilibre des espèces [26].

L'oxygène dissous est un facteur écologique essentiel [27], sa diminution favorise l'intoxication et accélère les mouvements respiratoires de la plante, favorisant ainsi la pénétration des toxiques présents dans l'eau [21].

A de très fortes concentrations le gaz carbonique dissout est toxique, il peut modifier le pH d'un milieu. Il agit également sur le rythme respiratoire des organismes vivants dans l'eau [21], [28].

Le potentiel redox représente un des paramètres essentiels des milieux aquatiques, au même titre que la température, le pH et l'oxygène dissous, sa mesure permet de caractériser le milieu, de suivre les évolutions de certaines substances et l'activité microbienne [15].

1.1.6 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 éléments traces métalliques 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 un bon bioindicateur, c'est pourquoi le principal facteur contrôlant les proportions des éléments trace métallique dans les fractions intra et extracellulaire reste l'espèce utilisée [29].

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 [30].

1.2 Caractérisation de l'impact des polluants sur les écosystèmes aquatiques

L'évaluation de la qualité des milieux aquatiques repose sur des approches tant chimiques que biologiques.

1.2.1 Approche physico-chimique de l'impact des polluants sur les écosystèmes aquatiques

Ces approches sont relativement faciles à obtenir. Les résultats de l'analyse chimique ont traditionnellement servi à l'élaboration de critères de qualité d'eau. Cependant, la mesure des compartiments de l'environnement aquatique permet d'évaluer les conséquences de l'exposition des organismes aux polluants, celle-ci ne permet pas d'en prédire les effets. De plus, cette mesure est toujours très incomplète par rapport au nombre de polluants présent dans l'environnement.

1.2.2 Approche biologique de l'impact des polluants sur les écosystèmes aquatiques

La biocénose du milieu récepteur peut être étudiée à travers différents niveaux d'organisation biologique: individu, population et communauté. L'étude à travers ces différents niveaux est préconisée par RAMADE 1992 [31] et KOSMALA 1998 [32] pour une approche écotoxicologique complète dans l'étude des effets des toxiques et par Karr 1993 [33] et KOSMALA 1998 [32] pour mieux appréhender le fonctionnement d'un écosystème.

Dans certains cas on peut constater:

- Une modification des peuplements de végétaux
- Des changements dans la faune des invertébrés benthiques allant parfois jusqu'à la disparition des organismes dans les conditions extrêmes. Le plus souvent on observe une diminution de la diversité spécifique et une prolifération de quelques espèces tolérantes [34-35]. Ces changements peuvent être détectés à différents niveaux taxinomiques de la faune benthique.

Des changements auraient même été décelés au niveau de groupes fonctionnels trophiques qui rendent compte de modification dans les modes de nutrition [36], [37].

1.3 L'écotoxicologie

Selon RAMADE 1979 [12], l'écotoxicologie est l'étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents polluants naturels ou artificiels produits par l'activité humaine ainsi que de leurs mécanismes d'action et de leurs effets sur l'ensemble des êtres vivants qui peuplent la biosphère.

Elle permet d'évaluer l'importance des atteintes subies par les divers écosystèmes à la suite de leur contamination et aussi de prévoir, dans une certaine mesure, les conséquences futures **résultats** de la libération d'un polluant déterminé.

La toxicologie aquatique est la partie de l'écotoxicologie qui traite des écosystèmes aquatique, elle a fait l'objet d'un intérêt croissant durant les dernières décennies en raison des problèmes de pollution de l'eau qui existent aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement [39].

Selon VIALA et GRIMALDI 2005, l'écotoxicologie est une branche de la toxicologie qui a pour objet l'étude des effets de toute nature des toxiques sur toutes les espèces vivantes et leurs organisations, leurs rapports avec la matière inanimée, leurs rapports entre elles et avec l'homme [13].

Selon BAUDO [38], la détermination de la concentration d'un toxique dans un écosystème donné n'est souvent pas suffisante pour protéger l'environnement. De plus l'extension dans l'espace et dans le temps de programmes de surveillance quantitative des toxiques peut se révéler extrêmement coûteuse. De ce fait les méthodes analytiques écotoxicologiques les plus simple, rapides et fiables sont nécessaires afin de fournir des informations supplémentaires sur les risques potentiels dus à un toxique donné.

Les tests de toxicité ou bioessais représentent l'aspect analytique des études écotoxicologique permettent d'établir les relations entre les quantités de toxiques absorbées et les différents effets biologiques sur les organismes des milieux naturels. En effet, 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 également des troubles de la reproduction (stérilité, effets tératogènes,.....etc.) [12-16]

1.3.1 Notion de bio monitoring

- Certaines recherches ont 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 de traces des substances environnementales dans notre corps [39].
- Le bio monitoring a pour objectif d'évaluer l'impact de la pollution à l'instant t ou en fonction du temps à l'un des niveaux de l'édifice biologique.
- Dans ce contexte, la difficulté est de prendre en compte et de recréer l'existence d'un écosystème appelé "mécosome" ou "microcosme" [40], [41].

1.3.2 Monitoring chimique

L'objectif du monitoring chimique est d'estimer les quantités de polluants accumulées ou accumulatrices dans la chaîne trophique. Les organismes tests représentatifs dans ce cadre sont inspirés de ceux énoncés par PHILIPS [39].

Dans le cadre d'un suivi de l'impact des éléments traces et leurs répartitions dans l'écosystème, les macrophytes aquatiques, les algues et toutes espèces animales sont beaucoup utilisés [42].

Ainsi, le bio monitoring intervient dans l'étude des échantillons de ces macrophytes ou / et algues exposées à ces éléments traces afin de détecter la présence d'un biomarqueur d'exposition.

A l'échelle des organismes s'est développée toute une série de méthodes regroupant les tests de toxicité, bio tests (bio essais) basés sur la détermination de la toxicité létale et chronique.

Dans ce contexte ont été élaborées des méthodologies moyennant certains matériels biochimiques pouvant faire l'objet de révélateur d'une toxicité. Ces derniers sont nommés biomarqueurs.

1.3.3 Les biomarqueurs

Un biomarqueur est un changement observable et / ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant [43].

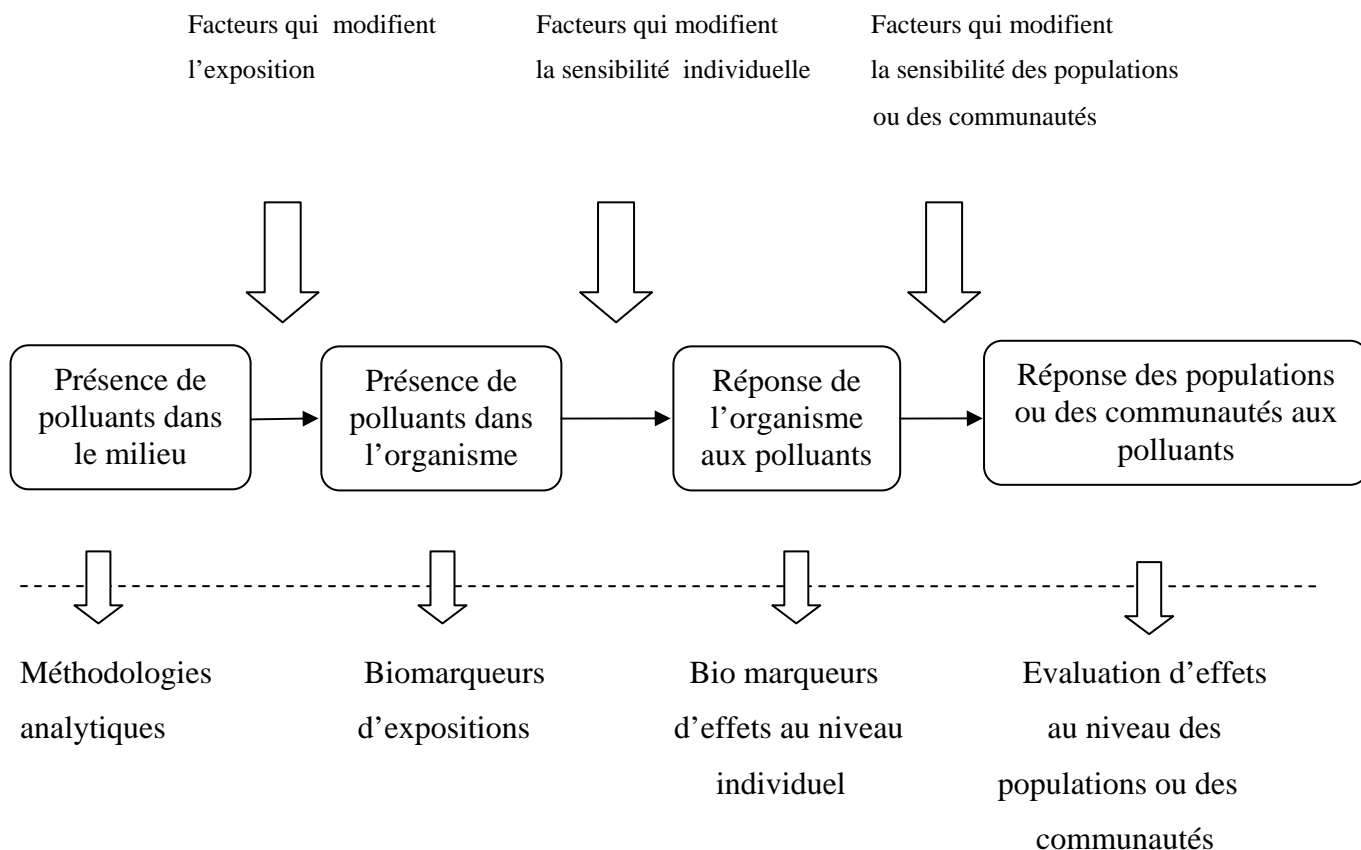


Figure 1.1 : Méthodologies d'évaluation des effets écotoxicologiques [44]

En écotoxicologie sont distingués, en général 03 types de biomarqueurs Les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique.

- ❖ Les biomarqueurs d'effets de l'exposition
- ❖ Les biomarqueurs de sensibilité aux effets provoqués par l'exposition.
- ❖ Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Ils sont le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et / ou dans des liquides corporels. La formation d'adduits à l'ADN est couramment utilisée chez l'homme TIMBRELL et al, 1994 [43].

Il a été suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle similaire chez les invertébrés aquatiques exposés aux polluants organiques LIVINGSTONE, 1993 [43].

Les biomarqueurs d'effets permettent de montrer que le xénobiotique est dans l'organisme et qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, il a exercé un effet, toxique ou non, sur une cible critique.

La spécificité des biomarqueurs dépend aussi de leur distribution tissulaire dans l'organisme et de la nature et des propriétés des composés toxiques en question. Les indices généraux de stress, dits "non-spécifiques" changement de poids de l'organisme par exemple, décrivent les effets provoqués par un grand nombre de facteurs de stress, aussi bien des polluants que des facteurs physico-chimiques et biologiques naturels. Ils apportent donc des informations sur l'impact global de changements environnementaux [43].

Les biomarqueurs de sensibilité représentent la résistance qui est définie comme une diminution de sensibilité, d'origine génétique, en réponse à la sélection par des molécules toxiques a été largement étudiée chez les invertébrés, plus précisément chez les insectes (ROUSH et TABASHNIK,1990,RAYMOND,1996) [43].

Parmi les biomarqueurs les plus connus, on cite le cytochrome P4501 A (ou les isoformés apparentées) est classiquement reconnu comme spécifique de la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, même si certains autres composés comme des pesticides sont également connus pour provoquer son induction (Narbonne et Michel 1997, Monod 1997[43]).

- L'acétylcholinestérase répond assez spécifiquement à la présence d'organophosphores et de carbamates, bien qu'elle réagisse aussi à certains métaux (Bocquené et al, 1997[43]).
- Les métallothioneines : sont des protéines de faibles poids moléculaire caractérisées par leur grande affinité pour des métaux lourds particuliers tels que le zinc, le cuivre, le calcium, le mercure et l'argent [43-45].
- Catalases et protéases.

1.3.4 Les bio essais

Un bio essai ou bio test consiste à observer le comportement d'un individu (ou d'un groupe homogène d'individus) mis en contact, dans des conditions expérimentales bien définies, avec le milieu du test.

L'élevage et le maintien des espèces à étudier est donc une opération délicate puisqu'ils doivent refléter avec fidélité les tests envisagés.

La détermination du potentiel toxique d'une substance, qu'il s'agisse d'effets aigus ou à long terme, consiste à évaluer divers paramètres qui caractérisent son action non pas au niveau de l'individu isolé mais à celui d'une population [12].

En effet la principale conséquence d'une intoxication qui est la mort des organismes contaminés, ne peut s'évaluer que par un taux de mortalité qui n'est pas un caractère de la population [12].

D'une façon générale trois précautions essentielles doivent être prises dans tout essais de toxicité.

- 1) Rassembler un échantillon aussi homogène que possible de l'espèce testée par sélection d'individus du même sexe, du même âge et de même poids.
- 2) Utiliser une technique d'administration du toxique qui assure une normalisation des conditions expérimentales pendant toute la durée du test.
- 3) Recueillir avec discernement les données numériques des expériences et les analyser avec une méthode statistique appropriée [12].

La toxicité aiguë est normalement déterminée à partir d'une CL_{50} concentration létale pour un essai de 96 heures pour les organismes testés, d'une CE_{50} concentration efficace pour un essai de 48 heures sur des organismes aquatiques telle que les daphnies d'une CE_{50} à 72 ou 96 heures généralement vis-à-vis des algues et macrophytes [46].

Le principe de l'essai avec les algues est de cultiver les cellules algales dans un milieu défini contenant une série de concentrations de la substance à expérimenter.

Les solutions d'essai sont incubées pendant une période minimale de 72 heures, pendant laquelle la concentration cellulaire de chacune d'entre elles est mesurée au moins toutes les 24 heures.

L'inhibition est mesurée comme étant la diminution de la croissance ou du taux de croissance par rapport aux cultures témoins réalisées dans des conditions identiques.

Les lentilles d'eau *Lemna gibba* et *Lemna minor* sont utilisées pour les essais de toxicité aquatique. L'essai sur *Lemna* est un essai à court terme et, bien qu'il vise des effets à la fois aigus et subchroniques, seuls la CE_{50} sont utilisés.

Les essais durent entre 10 à 14 jours et sont réalisés dans un milieu enrichi en nutriment, 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 [47].

Dans le chapitre suivant nous présenterons l'impact des métaux lourds (Cd^{2+} , Cu^{2+} Zn^{2+}) considérés toxiques sur l'environnement et les écosystèmes aquatiques en particulier.

CHAPITRE 2

LES METAUX LOURDS ET LEURS IMPACTS SUR L'ENVIRONNEMENT

2.1 Généralités

Les éléments traces métalliques (ETM) sont les éléments dont la concentration dans la croûte terrestre est inférieure à 1 g/Kg. Cette définition est aujourd'hui utilisée à la place du terme "métaux lourds", métaux qui possèdent des masses volumiques supérieures ou égales à 4.5 g.cm³ [48] et leur sont associées souvent les métalloïdes comme l'arsenic ou le sélénium.

Les métaux existent dans la nature sous différentes formes: ions, complexes inorganique et organique, en solution ou adsorbés sur des colloïdes [49].

Dans l'organisme les métaux lourds se trouvent normalement dans les protéines, dont certaines servent comme enzymes, qui sont des biocatalyseurs du métabolisme [49].

En 1980, NIEBOER et RICHARDSON ont envisagé une classification chimique de l'ensemble des métaux. Cette classification repose sur les propriétés des ions métalliques par rapport à la définition des acides selon LEWIS et ce, afin de séparer les ions en trois classes [50]:

- Classe A
- Classe B
- Classe intermédiaire.

2.1.1 Ions métalliques de classe A :

Les ions métalliques de la classe A sont des acides forts. Ils ont une préférence pour les liaisons avec les ligands dont l'oxygène est pris comme atome donneur d'e⁻.

On peut citer à ce titre, les phosphates, les groupes fonctionnels carbonyles et carboxyliques.

Cette classe comprend également les ions qui sont considérés comme d'importants éléments nutritifs (ions majeurs), tels que Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} [50].

2.1.2 Ions métalliques de la classe B:

Ces métaux s'imbriquent facilement avec les groupes fonctionnels suivant:

- Sulphydyle (- SH) ; Disulphide (-S-S) ;Thioether (- SR) ;Amine (- NH_2) parmi eux (les ions métalliques) on peut citer: Cu^{2+} , Ag^{2+} , Hg^{2+} et Pb^{2+} (IV) [50].

2.1.3 Ions métalliques de classe intermédiaire :

Les ions métalliques relevant de cette classe présentent un comportement intermédiaire. A titre d'exemple, les ions de zinc se lient au sulfure dans la métallothioneïne. Il s'agit des ions qui sont incorporés dans les dépôts granulaires de phosphate de calcium.

Ils existent aussi dans les tissus des invertébrés et jouent un rôle dans le processus de détoxification. La liaison des métaux se présente de telle sorte qu'ils ne lient pas vraiment ou qu'ils ne sont pas désirés.

Les cations métalliques suivants appartiennent à cette classe.

Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} .

2.2 Origine des métaux dans l'hydrosphère

Les métaux proviennent principalement de l'érosion des roches, des sols et des sédiments où ils sont présents à l'état naturel mais majoritairement des activités humaines [51].

Les métaux lourds qui entrent dans l'environnement aquatique proviennent de sources naturelle et de sources anthropogènes. Parmi les importantes sources naturelles, sont cités l'activité volcanique, l'altération des continents et les incendies de forêts.

Les principales sources de mercure atmosphérique, par exemple, proviennent du dégazage des terres et des océans GESAMP, 1988 [52].

2.3 Les sources anthropogènes

Les activités anthropogéniques peuvent résulter des industries, les transports, l'agriculture, les décharges de déchets ménagers, les effluents d'extractions minières et les activités pétrochimiques [51].

Les déversements peuvent être directs ou indirect dans le milieu aquatique des polluants des industries telles que des fonderies qui dégagent des émissions gazeuses qui contaminent le milieu aquatique, par les eaux de pluie sous forme indirecte.

La contamination directe passe par le biais des déversements dans le milieu aquatique des effluents des usines telles que les cimenteries ainsi les industries de traitement de surface (cadmiage, zingage, galvanisation, chromage) qui peuvent rejeter des effluents liquides [51].

2.4 Classification et devenir des métaux lourds dans le milieu aquatique

Les métaux rencontrés dans l'environnement peuvent être classés selon leur caractère essentiel ou non. Un métal est considéré comme essentiel si des symptômes pathologiques apparaissent lorsque sa teneur diminue ou qu'il est absent et disparaissent lorsqu'il est rajouté. Il faut aussi que les symptômes soient associés à une défection biochimique [53].

Cependant, un élément essentiel peut également être toxique lorsqu'il est présent à de trop fortes concentrations. Suivant ces critères, 17 métaux sont considérés comme essentiels, dont quatre (Na, K, Ca et Mg) sont présents en grande quantité (supérieurs à 1 mmole.Kg^{-1} de poids frais) alors que les treize autres (As, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Sn, V et Zn) sont présents à l'état de trace (0.001 à mmole.Kg^{-1} de poids frais) ou d'ultra trace ($<1 \text{ } \mu\text{mol.Kg}^{-1}$ de poids frais) [53].

Les métaux non essentiels n'ont à l'inverse des précédents, aucun rôle biologique actuellement connu. C'est le cas du Hg, Ag, Cd et Pb [53].

Ils sont considérés comme néfastes dès qu'ils sont présents dans le milieu et entraînent des effets biologiques délétères à de très faibles concentrations.

La toxicité des métaux dépend de nombreux facteurs WOOD [53], a classé différents métaux et métalloïdes en fonction de leur toxicité (action chez l'organisme vivant) et leur disponibilité dans l'environnement.

Dans la phase soluble, les métaux peuvent être présents sous formes d'ions hydratés, de complexes organiques et inorganiques, ainsi qu'associés à la phase colloïdale [54].

Les métaux se répartissent entre différents compartiments de l'environnement aquatique. L'eau, les solides en suspension et les sédiments peuvent exister sous forme de complexes, de particules en solutions [51].

Le devenir des éléments traces métalliques dépend de leurs natures et de leurs propriétés, ainsi que des paramètres physico-chimiques du milieu qui conditionnent leur répartition sous ses différentes formes [52].

Les principaux processus qui gouvernent la distribution et la répartition des métaux lourds sont la dilution, l'advection, la dispersion, la sédimentation et l'adsorption/désorption [52].

L'adsorption pourrait être la première étape du processus d'élimination définitive des métaux de l'eau. En outre, la spéciation selon les diverses formes solubles est régie 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 [51].

2.5 Biodisponibilité des métaux dans les écosystèmes aquatiques

On définit la biodisponibilité comme le degré avec lequel un contaminant, dans une source potentielle, par un organisme figure 2.2 [55-56].

Elle met en jeu trois étapes principales [57] :

- l'advection ou la diffusion depuis la solution vers la surface de la membrane ;
- l'adsorption ou la complexation sur les sites de transport ;
- le transport à travers la membrane pour une assimilation dans l'organisme ;

La connaissance de la biodisponibilité d'un élément toxique dans un milieu donné est donc primordiale pour estimer l'exposition des organismes à ce toxique et son effet (toxicité, bioaccumulation, bioconcentration). Dans le cas des métaux, il est connu depuis longtemps que les concentrations totales du milieu ne permettent pas d'évaluer l'exposition réelle ni les effets possibles sur les organismes. La biodisponibilité étant avant tout définie pour un organisme donné.

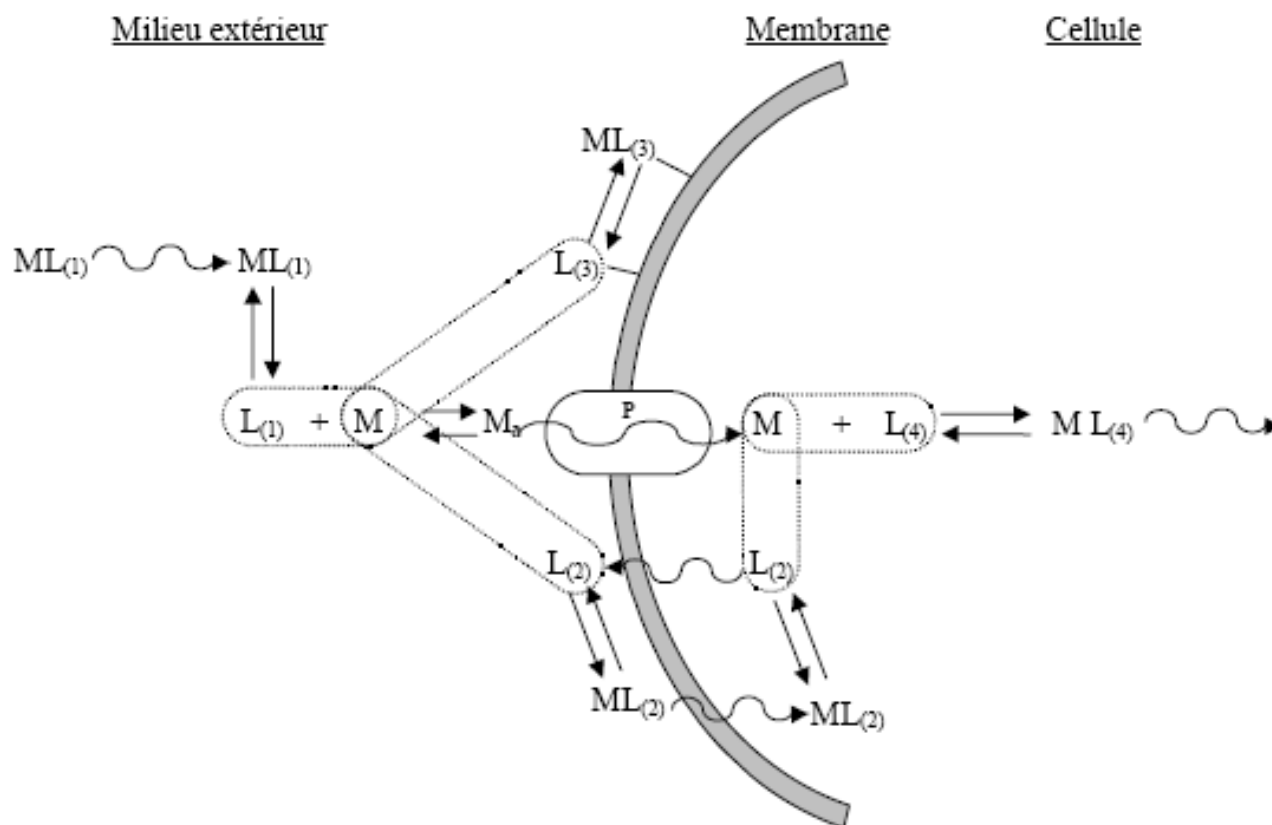


Figure 2.2: Représentation schématique du rôle des agents complexant dans l'assimilation des métaux (M) par les organismes aquatiques [58].

L_1 = ligand du milieu externe ; L_2 = ligand « transporteur » ; L_3 = site complexant de la membrane ; L_4 = agent complexant interne ; P = canal transporteur protéinique membranaire ;

M_a = ion métallique ; M = adsorbé sur un site permettant son transport éventuel à travers le canal protéinique = transport par diffusion (pompes membranaire).

La biodisponibilité des polluants dépend de l'état physico-chimique sous lequel ils sont présents dans les différents compartiments de l'environnement. Dans le milieu naturel, les organismes sont soumis à différentes sources de métaux, qui sont le milieu aqueux et l'alimentation qui comprend une source végétale ou animale selon le régime alimentaire, mais également des débris organiques présents dans les matières ainsi que dans le sédiment pour les dépositives.

Les complexes métalliques liposolubles et les formes ioniques ou faiblement complexées sont considérés comme les plus bio disponibles [54].

Les processus de transfert sont toutefois complètement différents les premiers pénétrant dans la cellule principalement par diffusion passive, les autres donnant lieu à des phénomènes de transport actif [53]. L'entrée des métaux peut également se faire par des phénomènes d'endocytose ou pinocytose [53].

Un changement des formes physico-chimique affectant l'équilibre de la concentration en ions libres, même en absence de changement de la concentration totale, pourra affecter le taux de prise de ces derniers par les organismes. Ainsi, une diminution de la salinité entraîne une diminution des chloro-complexes pour des métaux tels que le cadmium et le Zinc et donc correspond à une augmentation de la disponibilité des ions libres.

L'accumulation des métaux par la nourriture dans une chaîne trophique peut représenter une voie importante d'apport de métaux. En effet, les métaux en solution sont considérés comme les plus absorbés, mais les concentrations élevées enregistrées au niveau de la nourriture, du sédiment et des particules en suspension font de l'alimentation une source importante de métaux pour les organismes aquatiques [59].

Cependant, différents facteurs tels que les formes physico-chimiques, les forces de liaisons des métaux aux aliments, la qualité de ces aliments et la position des espèces dans les chaînes alimentaires interviennent sur la disponibilité des métaux à partir de la nourriture [59].

2.6 Evolution des organismes en présence des métaux

Les organismes vivants ont évolué en présence des éléments métalliques. Certains métaux sont mêmes essentiels aux processus biologiques. Les éléments métalliques ont la propriété de se fixer sur des protéines et ainsi de modifier la structure moléculaire et le mode d'action de ces dernières. Ces modifications de structure peuvent être essentiels au bon fonctionnement de certaines protéines (enzymes, pigments respiratoires) ou au contraire induire un effet toxique en les inactivant.

Les organismes sont capables, dans une certaine mesure, d'utiliser et de réguler les concentrations en métaux qui leurs sont essentiels. Des effets toxiques apparaissent lorsque cette régulation ne peut plus avoir lieu.

En effet, le caractère essentiel d'un métal dépend aussi des organismes : vu un métal donné pouvant être essentiel à un organisme tout en ne l'étant pour d'autres. Dans le tableau 2. 1, on propose une liste des métaux présentant un intérêt pour les organismes vivants.

Comme tout composé chimique, l'effet de l'apport d'un métal dépend de la dose. Mais lorsque le métal est essentiel, aussi bien sa carence que son excès sont dommageables [60].

Tableau 2.1 : Liste (non exhaustive) des éléments essentiels et non essentiels et exemple de propriétés des éléments connu pour leur essentialités [60].

	Métal	Propriétés connues	
Métaux essentiels	Chrome (Cr)	Impliqué dans le métabolisme du glucose (insuline)	
	Cobalt (Co)	Présent dans la vitamine B12 intervenant dans la formation de l'hémoglobine	
	Cuivre (Cu)	Présent dans les cytochromes et l'hémocyanine, des molécules impliquées dans la respiration cellulaire	
	Fer (Fe)	Présent dans l'hémoglobine pour le transport de l'oxygène	
	Iode (I)	Présent dans la thyroxine et lié aux composants assurant le bon fonctionnement du système thyroïdien	
	Manganèse (Mn)	Rôle dans le métabolisme des sucres (pyruvate carboxylase) impliqué dans la synthèse des acides gras et des glycoprotéines	
	Molybdène (Mo)	Impliqué dans les transferts d'électrons, la fixation de l'azote est aussi couplée à une réaction au molybdène	
	Nickel (Ni)	Composant de l'uréase et fait donc partie du cycle du CO ₂	
	Sélénium (Se)		Active la glutathion peroxydase pour l'élimination des radicaux libres
			Régulation des messages intracellulaires
	Vanadium (V)		Cofacteur d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique
			Agent thérapeutique possible pour les diabètes
Nécessaire au fonctionnement des déshydrogénases, aldol ases, isomérases			
Zinc (Zn)	ransphosphorylases, ARN et ADN polymérase, anhydrase carbonique, Cu-Zn super oxyde dismutase (et autres)		
Métaux non essentiels	Antimoine (Sb) ; Plomb (Pb) ; Thallium (Tl) ; Argent (Ag) ; Arsenic (As) ; Cadmium (Cd) ; Etain (Sn) ; Mercure (Hg)		

2.7 Effets des métaux lourds sur les milieux aquatiques

Les métaux lourds tels que Hg, Cd et autres sont dangereux pour les écosystèmes aquatiques qu'ils contaminent notamment à travers les eaux de ruissellement et des affluents, pollués. Ils se retrouvent également dans les différents compartiments de ces écosystèmes comme les sédiments, l'eau et les organismes vivants, parmi les métaux les plus dangereux, citons le mercure, le cadmium et le plomb [61].

D'une manière générale, les métaux lourds peuvent avoir trois types d'effets:

- 1- A partir de certaines concentrations, ils peuvent provoquer la mortalité.
- 2- Ils peuvent provoquer des effets sublétaux notamment sur la reproduction des espèces.
- 3- Ils peuvent également s'accumuler, se concentrer et provoquer la contamination de toute la chaîne trophique.

Les métaux lourds affectent l'abondance et la diversité du phytoplancton [62]. Les cellules algales peuvent accumuler les métaux lourds par des mécanismes d'adsorption (sur la surface de la cellule) et d'absorption [63].

Les ions métalliques inhibent la croissance des micro-algues [64]. Cette inhibition peut être due, par exemple, à l'altération du processus de photosynthèse ou à la perturbation de l'activité enzymatique. Certains métaux ayant la capacité de se combiner avec des enzymes, peuvent provoquer l'inactivation de ces derniers et occasionner d'importants désordres métaboliques pouvant endommager sévèrement la cellule [19].

Les métaux lourds inhibent également l'activité et la croissance de la flore bactérienne. Ils affectent les capacités d'autoépuration des milieux aquatiques [65].

2.8 Spéciation des métaux en milieu aquatique

Les eaux naturelles contiennent un mélange des cations (Ca^{++} , Mg^{++} , Na^+ , K^+), des ligands inorganiques (OH^- , Cl^- , SO_4^- , HCO_3^- , PO_4^-) et organiques (urée, acides aminés, composés humiques et fulviques) en solution. Les éléments dissous sont en contact avec les particules du sol, des sédiments ou matières en

suspension, qui agissent comme des surfaces d'échange complexes (mélanges de minéraux, argiles et matières organiques) avec une grande surface d'échange.

Le comportement d'un métal dans un écosystème aquatique dépend donc des conditions physico-chimiques du milieu ainsi que de ses caractéristiques physico-chimiques [66].

Un métal peut être sous différentes formes [58], [67-69] :

- ion libre hydraté ; complexé par des ligands inorganiques; pairs d'ions inorganiques;
- complexé par des ligands organiques; complexé à des molécules organiques de haut poids moléculaires (lipides, substances humiques, polysaccharides) ;
- adsorbé sur des colloïdes inorganiques (FeOH , $\text{Fe}(\text{OH})_3$, oxydes de manganèse, Ag_2S , argiles.....) et organiques ; précipité ;
- adsorbé sur des particules organiques, ou sur les détruits d'organismes vivants.

2.9 Les effets sur écologiques de certains métaux lourds

A travers la chaîne alimentaire, le cadmium s'accumule dans les plantes et les animaux ainsi que dans le corps humain.

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.

L'effet toxique du cadmium sur les plantes aquatiques est remarquable par le ralentissement de leur croissance, jusqu'à disparition totale de la flore aquatique.

Le cuivre représente 0.01 % de la croûte terrestre et il est présent naturellement dans l'eau de mer à des concentrations variant entre 0.001 et 0.02 ppm [70], 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 [71].

Pour les bactéries, le cuivre est connu pour agir à la surface des cellules, par exemple, l'inhibition de la respiration chez les coliformes a été attribuée à l'inhibition des enzymes respiratoires de la membrane cellulaire [72]

Des dommages de la paroi cellulaire et la lyse cellulaire en fonction de la concentration et du temps d'exposition ont été observés au microscope électronique [73].

Pour les algues et les plantes supérieures, le cuivre est nécessaire à leur croissance ; cependant, à des concentrations excessives, le cuivre agit sur la réaction primaire de la photosynthèse, principalement associée au photosystème, et affecte l'assimilation du carbone inorganique (CO_2) par la plante [74]. Il inhibe la photosynthèse, mais aussi la division cellulaire. Pour les poissons au moins deux voies de pénétration du cuivre sont évoquées: les voies respiratoires et le système digestif. Les conditions à la surface des cellules bronchiques (contact direct avec l'eau environnante) ou épithéliales (milieu gastrique) sont fondamentalement différents et les changements de spéciation du cuivre à l'intérieur de l'appareil digestif (désorption des particules due au changement de pH en particulier) doivent être prises en compte [75]

Le zinc représente 0.02 % de la croûte terrestre. Sa présence est donc nécessaire pour la galvanisation, la métallisation du fer et de l'acier. Il intervient aussi pour la fabrication des feuilles de zinc pour les toitures et les gouttières, les batteries sèches, les piles électriques. Il entre également dans la composition de nombreux alliages, en particulier les laitons en association avec le cuivre ou les bronzes d'aluminium.

Dans l'industrie pharmaceutique, il est introduit pour la fabrication des insulines au zinc.

Le bromure ZnBr_2 , sert en photographie et dans la fabrication des fenêtres pour réaction nucléaire.

Le zinc est un oligoélément nécessaire à la vie des organismes vivants à des concentrations relativement faibles. Une carence en zinc est à l'origine de retards de croissance des individus et populations.

Les concentrations les plus élevées sont observées dans les poissons et surtout les coquillages même à des concentrations de 0.05 ppm, 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 [76].

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. Les travaux de REIMER et TOTH ont montré que la plante *Cabomba caroliniana* pouvait absorber 750 à 1000 ppm en zinc et que *Lemna minor* avait la capacité d'absorber 500 ppm maximum et 370 ppm [77].

CHAPITRE 3

GENERALITES SUR LES LENTILLES D'EAU

3.1 Généralités

Les lemnacées habitent les eaux douces, et surtout stagnantes, sur toute la terre. Elles préfèrent les régions à climat tempéré ou tropical. Elles constituent fréquemment, à la surface des eaux, une couche continue qui se réalise par multiplication végétative, car la floraison est souvent rare chez ces plantes [78].

Les lemnacées ont suscité l'attention des chercheurs en raison de leur grand potentiel d'enlever les contaminants minéraux des eaux résiduares émanant des travaux d'eaux d'égout, industries animales intensives ou de la production végétale irriguée intensive. Le besoin des lemnacées d'être parvenu, protégé contre le vent d'être maintenu à une densité optimale et à équilibrer des concentrations nutritives dans l'eau pour obtenir des taux de croissance optimaux [5].

Les espèces de lenticules sont de petites usines aquatiques flottantes trouvées dans le monde entier 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 des monocotylédones phanérogame de la famille botanique des lemnacées, et sont de plus hautes usines ou macrophytes, bien qu'elles soient souvent confondues avec des algues [5]. Cet organisme est très régulièrement utilisé pour les études écotoxicologiques et les bio-essais normalisés [79].

Les lenticules se développent aux températures de l'eau entre 6 et 33°C. Elles ont des dispositifs structuraux simplifiés. Une famille de lenticule est plate et ovoïde. Beaucoup d'espèces ont des racines adventices qui fonctionnent pendant qu'un organe de stabilité et qui tendent à rallonger pendant que des aliments minéraux dans l'eau sont épuisés [81]. 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, des racines, cependant, semblent être fibreuses [5].

Elles font partie intégrante de la chaîne alimentaire, fournissant nourriture aux oiseaux aquatiques et de marais tels que les foulques, les canards noir etc.....

Ces plantes fournissent aussi de la nourriture, un abri, de l'ombrage et un substrat aux poissons et aux invertébrés aquatiques [80]; [81] ; [82]; [83]

Dans les conditions favorables à la croissance, elles peuvent se multiplier rapidement et former un tapis dense, constitué de divers genres et espèces [84] , dominé par une seule espèce [85] ; [86].

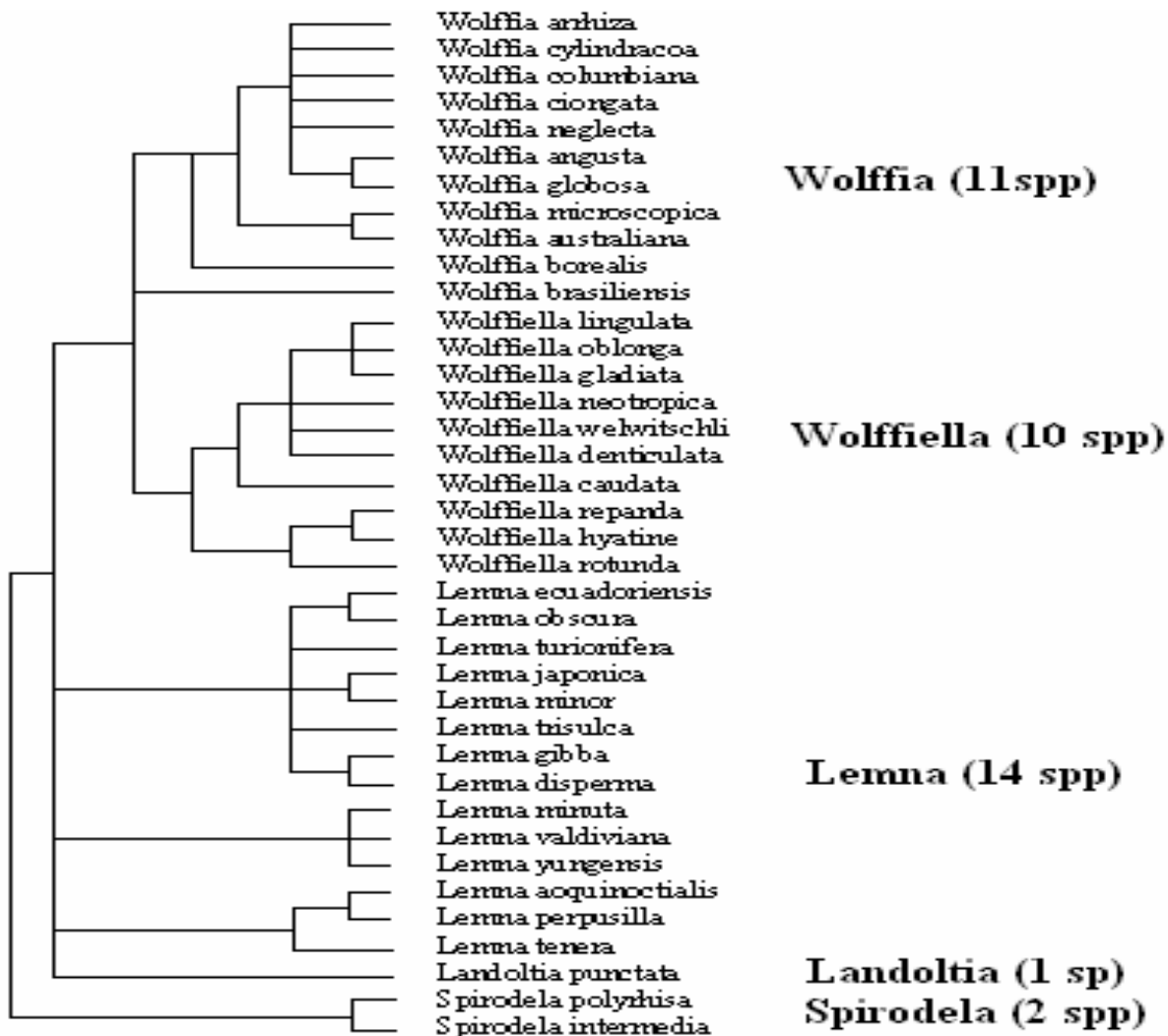
3.2 Taxonomie des lemnacées

Les lemnacées sont de l'ordre des spadiciflores (Arales), ce qui les relie aux aracées, par la laitue d'eau Pistia [87].

La taxonomie de *Lemna* (appelée aussi lentille d'eau, ou lenticule) est compliquée par l'existence d'une large gamme de phénotypes [88].

3.3 Différents types de lemnacées

Il existe cinq genres et 38 espèces qui sont présentées par le dendogramme ci-dessous :



Dendogramme 3.1 : La famille des lentilles d'eau. [89]

a- les genres avec une ou plusieurs racines :

- 01 racine *Lemna*
- 7-12 racines, des frondes de 10mm de longueur *Spirodela*
- 2-3 racines (jusqu'à cinq), des frondes de 3 à 6mm de *Landoltia*

b-les genres sans racines :

- des frondes aplaties, 3 à 10mm de longueur *Wolffiella*
- des frondes ovales, 0,6 à 1,2 mm de longueur *Wolffia*

On peut présenter les cinq genres sur un arbre évolutif où chaque genre est présenté par une branche, où Spirodila est considéré le plus primitif et le Wolffia le plus avancé car ils ont des caractères communs par contre Spirodila, Landoltia et Lemna plus étroitement sont liés.

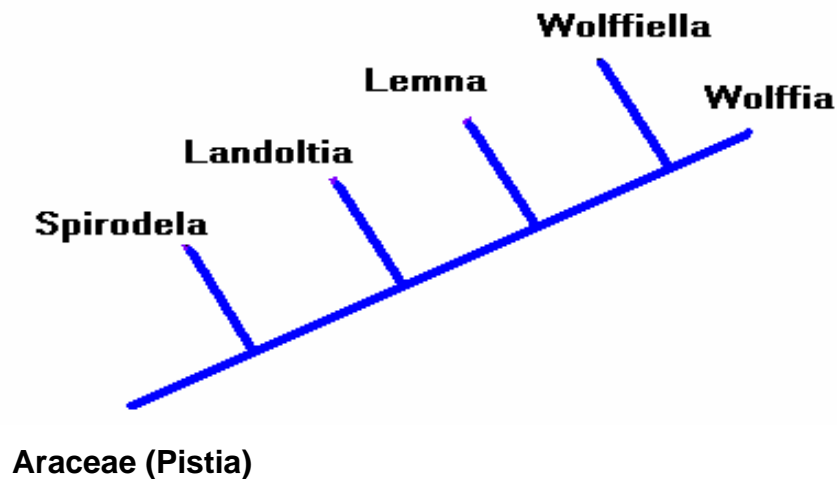


Figure 3.4 : Arbre phylogénétique évolutif des lemnacées

3.4 Ecologie des lentilles d'eau

En 1957, LANDOLT a signalé l'existence d'au moins deux souches distinctes de *Lemna minor* aux Etats-Unis, qui différaient selon la taille et la capacité de fleurir en culture [11]. *Lemna minor* est une petite plante coloniale possédant une seule fronde plate, arrondi, chaque plante mesure de 2 à 4 mm de longueur et comprend une fronde solitaire ou, dans le cas d'une colonie, plusieurs frondes (3 à 5) [87].

La fronde a une structure complexe représentant à la fois la feuille et la tige [90], son extrémité distale étant foliaire et son extrémité proximale étant axiale [90]. La face dorsale de la fronde possède une petite papille centrale qui n'est cependant pas proéminente [87] ; [91]. La face inférieure de la fronde est convexe (rarement concave) [92].

La *Lemna gibba* est une lentille d'eau bossue, lame épaisse, très convexe en dessous, à 3-5 nervures atteignant l'extrémité [92].

Lemna gibba diffère de *Lemna minor* par ses frondes largement elliptiques à ronds, leur face inférieure généralement bosselée (gibbeuse) [91-92]. C'est une plante se propageant principalement par voie végétative ou par bourgeonnement des petites feuilles appelées frondes, ovales et arrondies (2 à 5mm de longueur). Son habitat est constitué des étangs d'eau douce, et marais. Elle est de type vivace [93].

Les lentilles d'eau sont présentes presque partout dans le monde [92]. Elles sont largement distribuées dans toute l'Amérique du nord, en Europe, en Asie, en Australie, en Afrique et en Algérie, notamment les régions d'Annaba, lac Tanga à El-Kala. Récemment, la plante a été trouvée également dans la région de Béni-Tamou (Blida).

3.5 Facteurs écologiques

Les organismes cultivés devraient être soumis à un éclairage fluorescent en spectre continu, sans interruption ou à un «éclairage équivalent [94]. Toute augmentation de l'éclairage provoque un accroissement des réserves carbonées [95].

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 [95]. L'apport de ces ions est lié au pH du milieu. Ces pH peuvent aller de 5 à 9 mais se développe mieux à des pH étant entre 6,5 à 7,5.

Des taux de croissance de colonies de lenticule réduits à des extrémités du pH et de la température.

Un pH alcalin décale l'équilibre d'ammonium ammoniacal vers l'état non ionisé et des résultats dans la libération de l'ammoniac libre qui est toxique à la lenticule aux concentrations élevées [5]. Une baisse du pH stimule l'adsorption des anions (PO_4^{-3} , NO_3^-) et inhibe au contraire l'absorption des cations (K^+ , Ca^{++}), on peut penser que les ions H^+ ou OH^- peuvent saturer les sites de fixation des ions, gênant ainsi respectivement la pénétration des cations ou des anions [95].

Les *Lemna* devraient être cultivées à $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Il faut établir et contrôler périodiquement le rapport entre les lectures et la température dans les récipients pour faire en sorte que les plantes soient cultivées dans l'intervalle souhaité [88].

3.6 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 photosynthétique [96].

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 transforment 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 [97].

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 kilomètres 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 [97].

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 [97].

3.7 Indicateurs biologiques

Les indicateurs biologiques renseignent sur l'état des écosystèmes à partir de la compilation de données biologiques qui peuvent être très diverses. Selon Blandin

1986 un indicateur biologique 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.

Il s'agit bien de mesurer des modifications liées aux activités humaines qui détournent les écosystèmes de leur évolution naturelle.

Dans sa revue publiée en 1986 dans le bulletin d'écologie Blandin a relevé 690 références sur une période de 22 mois sur le sujet dans la bibliographie internationale, dont 77 concernent les écosystèmes aquatiques. Le nombre important de bioindicateurs est le reflet de l'immense variabilité biologique des écosystèmes.

3.8 Utilisation des lentilles d'eau comme bioindicateurs

Il est indéniable que les micropolluants contaminent la biosphère. C'est un fait de plus en plus admis dans les pays industrialisés.

A cette contamination viennent s'ajouter la pollution des milieux par des composés organiques répandus dans les écosystèmes par le biais de diverses sources (agriculture intensive, industrie électrique,.....), ainsi que par la présence d'éléments radioactifs émis par les centrales et les accidents nucléaires.

Désormais, de plus en plus de micropolluants minéraux (comme le cadmium, le mercure, le zinc.....) de composés organiques (HAP, PCP) et de radionucléides provoquent une contamination chronique d'un nombre croissant d'écosystèmes aquatiques continentaux [99].

Divers compartiments biologiques et physiques qui sont susceptibles d'accumuler les ETM (éléments traces métalliques) ont été étudiés, on peut citer :

- les sédiments qui, par leur capacité de stockage des polluants présentent un danger pour les écosystèmes [100].
- les plantes phanérogames [101].
- les plantes cryptogames comme par exemple le lichen aquatique.

La problématique revient alors 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. D'autre part, 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.

Cependant et d'après plusieurs années d'utilisation de ces différentes méthodologies, il apparaît clairement 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, il s'est avéré que c'est l'association judicieuse de ces différentes approches qui permet d'évaluer de façon précise l'état des milieux et des organismes [102].

Dans les années 1970, des études ont émis en évidence que certains végétaux aquatiques, accumulent les éléments traces métalliques à proximité des sites miniers [103-106]. Cette propriété de bioaccumulation qui a suggéré l'utilisation des plantes aquatiques pour la surveillance des métaux dans un état de traces dans l'eau [107]. La mise en évidence de la bioaccumulation des composés organiques est plus récente et ne date que de 1981 [108]. La *Lemna gibba* peut être considérée comme un bioindicateur préliminaire pour le transfert de l'arsenic vers les plantes [6].

3.9 L'azote dans les écosystèmes

Sur la terre, la majeure partie de l'azote est présent dans l'atmosphère (78% en Volume, soit $385 \cdot 10^{11}$ tonnes). L'azote entre également dans la composition des sols (10^{10} à 10^{11} tonnes) et des océans ($5 \cdot 10^{11}$ tonnes) [109] ; il est impliqué dans des associations chimiques minérales ou organiques. Dans la composition des êtres vivants, il se trouve associé dans des molécules organiques : il constitue, par exemple, 4 à 6% du poids sec d'un animal. Les composants fondamentaux des êtres vivants : protéines, enzymes etc. sont des macromolécules qui résultent de la polymérisation d'acides aminés selon un ordre parfaitement établi du code génétique de chaque individu [110].

Les différentes combinaisons chimiques organiques ou minérales sont impliquées dans des réactions essentiellement biochimiques, très différentes les unes des autres, mais qui n'en sont pas moins très étroitement liées entre elles et participent au "cycle de l'azote" représenté schématiquement sur la figure 3.5 qui permet d'assurer sa circulation dans la biosphère.

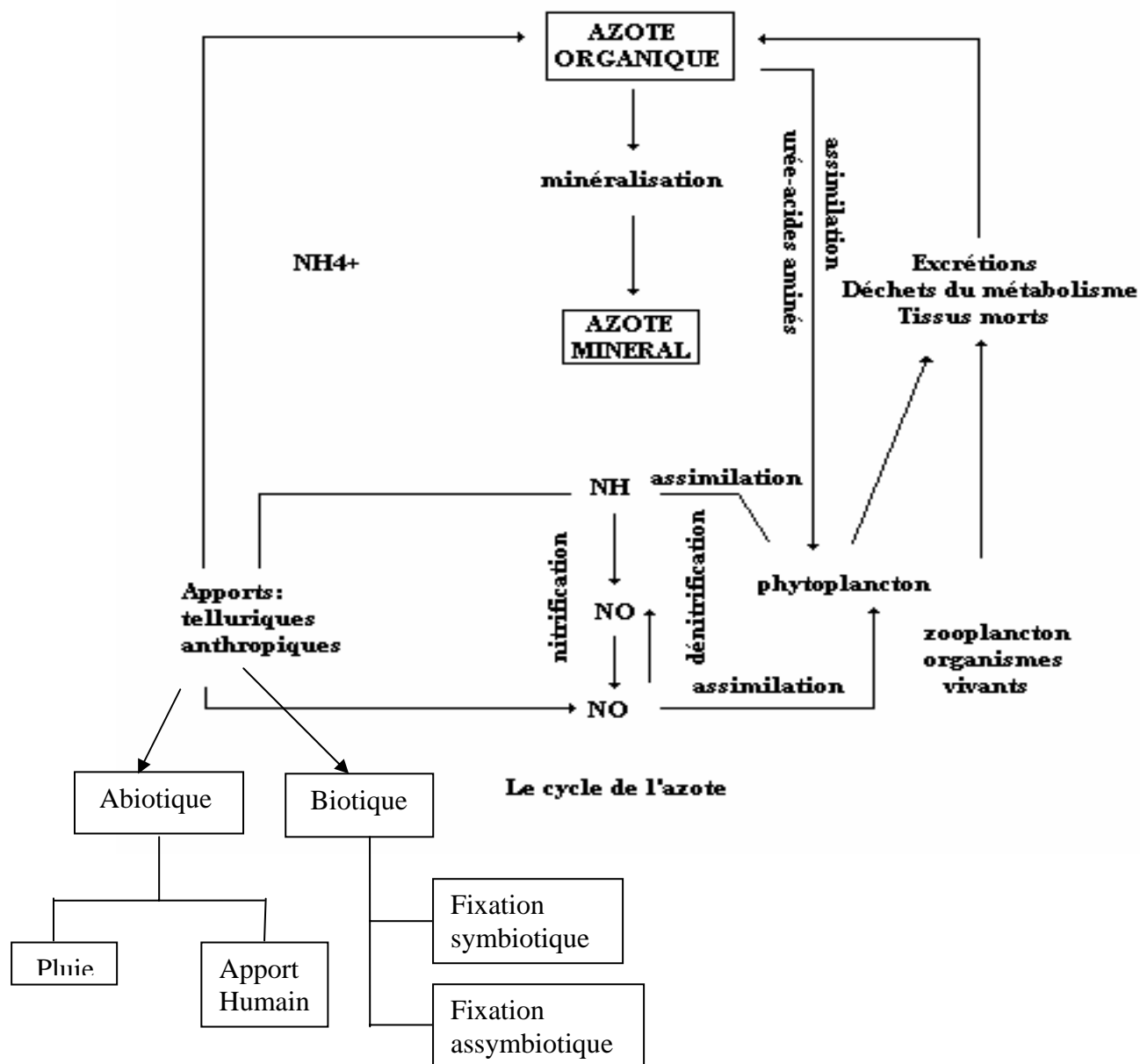
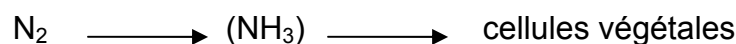


Figure 3.5: Le cycle de l'azote [111]

Les principales étapes du cycle de l'azote sont :

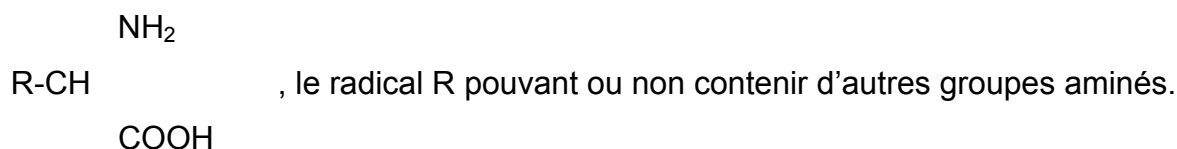
3.9.1 La fixation

Elle correspond à l'aptitude que possèdent certains organismes à fixer l'azote atmosphérique. L'azote est alors réduit à l'état d'ammoniac avant d'être assimilé [110].

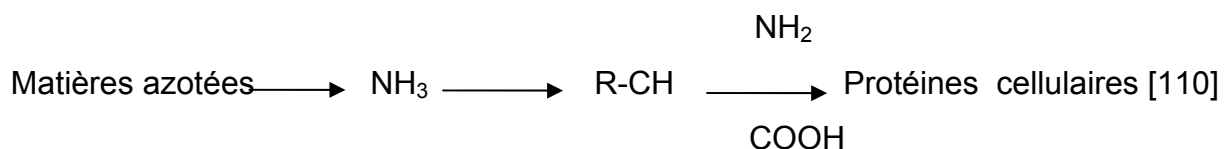


3.9.2 L'assimilation

C'est la transformation de matière azotée minérale ou organique inerte en matière vivante. La forme assimilable de l'azote est l'azote ammoniacal, qui est transformé, par exemple, en acides aminés (molécules de base de la matière vivante) de formule :



Les étapes de ce processus sont résumées ci-après :



3.9.3 L'ammonification

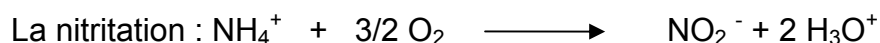
Cette étape, du cycle de l'azote, conduit à partir de matières organiques azotées à la libération d'ammoniac. Elle peut être également appelée minéralisation dans la mesure où l'azote impliqué dans des molécules organiques est transformé en azote minéral.



Ces réactions sont différentes de celles de l'assimilation.

3.9.4 La nitrification

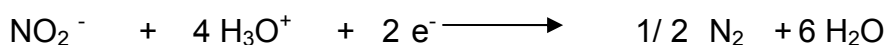
Elle est relative à l'oxydation de l'ammoniac en nitrate par l'intermédiaire de bactéries nitrifiantes autotrophes. Elle se produit en deux étapes essentielles [113], les nitrites, généralement observables, étant un intermédiaire d'oxydation.



L'accepteur d'électron est ici l'oxygène et le donneur d'électron l'ammoniac.

3.9.5 La dénitrification

C'est la réduction de l'azote nitrique à l'état d'azote gazeux par l'intermédiaire de bactéries dénitrifiantes, la plupart hétérotrophes. Elle se produit également en deux grandes étapes, le composé intermédiaire stable étant également ici l'azote nitreux :



Le donneur de l'électron est la matière carbonée. Si le processus est hétérotrophe, l'accepteur d'électron est l'azote nitrique.

A part la formation toxique (décarboxylation des acides aminés) d'amines et inversement la libération d'ammoniac, toutes ces étapes sont des réactions mises en œuvre par l'intermédiaire de bactéries, plantes ou champignons, et ne peuvent s'effectuer spontanément dans les conditions normales rencontrées dans la nature, car leur énergie (ou les potentiels) sont trop importants. Aussi, l'intervention de catalyseurs, les enzymes qui réduisent l'énergie d'activation est nécessaire pour que puissent s'effectuer ces réactions naturellement [113].

3.10 Facteurs internes

L'azote se trouve sous la forme d'ammonium et de nitrate dans de faibles proportions dans les eaux usées. Les différentes réactions qui conduisent à l'élimination de l'azote dans un milieu aquatique sont l'ammonification (transformation de l'azote organique en ammonium), la nitrification (oxydation de l'ammonium en nitrate), la volatilisation (transformation de l'ammonium en ammoniac) et la dénitrification (réduction des nitrates en azote gazeux, N_2).

Chacune de ces réactions est dépendante de l'état d'oxydation du milieu et de la disponibilité en oxygène dissous. En présence des plantes aquatiques, les principales réactions d'élimination de l'azote sont la nitrification / dénitrification et l'assimilation par les végétaux [114-116].

Plusieurs études ont montré que l'ammonium est la forme d'azote préférentiellement utilisée par les plantes aquatiques [117-120]. L'assimilation des nitrates semble être contrôlée par un processus enzymatique, alors que c'est un phénomène de diffusion qui contrôle le prélèvement de l'ammonium [117-118]. C'est ce qui expliquerait selon ces auteurs que le taux d'assimilation de l'ammonium ne varie pas dans la journée, tandis que le prélèvement des nitrates par les plantes se déroule seulement le jour lors de la photosynthèse. Une autre étude montre par ailleurs qu'une forte concentration d'ammonium peut inhiber la formation des nitrates réductases et empêcher ainsi l'assimilation des nitrates par la plante [121].

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 [108].

ALAERTS *et al*, 1996[122], ont démontré que la lenticule a enlevé 74% d'azote total (KJELDAHL) TKN et 77% de phosphore total (TP) dans une lagune d'eaux d'égout au BANGLADESH avec un temps hydraulique de conservation de 21 jours pendant une saison sèche locale. Un effluent final avec des valeurs basses de 2,7 mg.l⁻¹ TKN et de 0,4 mg.l⁻¹ TP a été produit.

ORON et al, montrent en 1988[123], que la lenticule a un taux élevé de prise nutritive. L'excès en ammonium accélère l'eutrophisation dans les étangs ouverts et résultent dans la formation de nitrate si elle est déchargée dans les eaux souterraines (ORON et al, 1988).

CULLY et al en 1981[124], ont indiqué qu'un mélange d'espèces de lenticules pourrait enlever 1,378 kg d'azote (la plupart du temps comme ammonium), 347 kg de phosphore et 441 kg de potassium d'un hectare de surface d'eau en un an.

ORON et al ,1988[123], ont prouvé que le rendement sec de la lenticule développé dans un système de traitement des eaux résiduaires était aussi élevé que 15 gm².j⁻¹ avec une teneur en protéines approximativement de 30%. La teneur élevée en protéine de la lenticule indique une capacité élevée d'assimilation d'azote.

YAMAMOTO et al ,2001[125], ont donné des protocoles simples pour transférer le gène étranger dans *lemna gibba* et *lemna minor*.

BJÖRN INGEMARSSON, en 1987[126], a montré que des cultures de *lemna gibba* G₃ étaient maintenues à une vitesse de croissance de N-limitée constante par addition journalière de nitrate. Les nitrates ajoutés aux cultures ont été consommés au bout de 8 à 10 heures.

En présence de protéase comme inhibiteur leupeptin durant l'extraction, cependant, l'activité de NR (NADH-nitrate), a été en général plus élevée et sans aucun cycle apparent. Il apparaît par conséquent que des changements en un faible temps de l'assimilation des nitrates par la *lemna* N-Limitée est relatif au flux de nitrate aux sites réduits et non pas au changement de l'activité réduite en nitrate.

BJÖRN INGEMARSSON, en 1987, il a utilisé ¹³ NO₃⁻ pour étudier les flux unidirectionnels de NO₃⁻ dans la *lemna gibba* N-suffisante et N-limitée qui croît exponentiellement. Il peut être conclu que la régulation du flux de plasma *lemna* NO₃⁻ dans la *lemna* présentant une consommation nette en NO₃⁻ est d'une importance vitale aussi pour la vitesse de réduction de NO₃⁻. Ce mode est cependant, moins claire lorsque les plantes comptent uniquement sur l'utilisation des

réerves de NO_3^- internes ,c'est-à-dire au point de compensation , où un échange considérable entre les réservoirs internes et externes en NO_3^- se produit[127] .

Un manque en azote stimule généralement la consommation nette en NO_3^- [128-129]

BJÖRN INGEMARSSON et *al*,1987(III)[130], étudient les effets de l'application de l'ammonium sur l'utilisation des nitrates dans les cultures N-Limitée de *lemna gibba*G₃.

Ils montrent que l'addition instantanée de l'ammonium inhibe la consommation nette en nitrate par au moins 60%, suivie par une faible récupération. Les expériences où du nitrate auquel ^{13}N est considéré comme traceur a été utilisé comme un flux de traceur,a révélé que l'ammonium inhibe spécifiquement le flux, mais n'accroît pas le flux en nitrate.

La réduction en nitrate, extraite et expérimenté in vitro en présence d'un inhibiteur thiol proténase leupeptis n'a pas été affecté par un traitement en un faible temps des plantes par les nitrates, ammonium. La réduction de l'activité en nitrate récupéré en absence de leupeptin a été considérablement faible, cependant, elle a été augmentée par toutes les sources en azote avec l'ammonium comme élément le plus important. Il est admis que l'effet de l'ammonium sur l'utilisation des nitrates dans la *lemma* est dû à l'inhibition du flux en nitrate, et que l'effet devrait être attribué à l'ammonium lui-même , et non au nouveau dérivé en azote nouvellement formé. Le flux en nitrate qui diminue cause une diminution de la réduction en nitrate est d'autant plus stabilisée par la présence de l'ammonium.

3.11 Le phosphore dans les écosystèmes

Tous comme l'azote, le phosphore est un constituant essentiel pour le développement des plantes, sa disponibilité ayant une influence directe sur leur croissance. La présence des plantes crée un environnement physico-chimique favorable à l'absorption et à la complexation du phosphore inorganique, qui est ainsi assimilé sous forme d'ortho phosphate au niveau des racines et des parties immergées. Cette assimilation est influencée par la disponibilité de l'azote. Elle s'accroît avec les concentrations d'azote et peut donc être freinée par une carence en azote [119], [131],

L'assimilation du phosphore augmente avec la productivité et la densité de la plante [131-133].

3.12 Potassium, calcium, sodium et magnésium dans les écosystèmes

Il y a une seule période d'assimilation intense à la formation de l'appareil foliaire. Il ne produit aucun stockage dans les organes de réserves [134]. Le potassium est soluble dans la cellule, il est émis quand la perméabilité de la membrane plasmique est altérée : de cette manière il se comporte comme un indicateur des changements de perméabilité membranaire [135]. L'absorption des métaux traces dans les mousses mène à des pertes importantes en K (probablement dues aux propriétés de la membrane) et en Mg intracellulaire (probablement liées au remplacement des cations sur les sites de liaisons extracellulaires [136].

Le magnésium est distribué de manière identique dans les compartiments intra/extracellulaire, qui dépendent des besoins de la cellule et des niveaux ambiants de magnésium [137].

BROWN et WELLES démontrent que le magnésium intracellulaire est libéré en réponse aux changements de la perméabilité membranaire [138]. Par ailleurs, SAMECKA-CYMERMAN et al, 2000, MARKET et WTOROVA 1992 [138], [139] émettent l'hypothèse d'une accumulation de métaux directement associée à une exclusion du magnésium et du calcium.

De façon générale, l'accumulation d'un élément résulte souvent en la diminution d'un ou d'autres éléments du fait de la capacité limitée de la plante à absorber les sels minéraux [140].

Ainsi, les déplacements cationiques liés à l'entrée intracellulaire de xénobiotique chez les bryophytes sont utilisés afin de déterminer l'état physiologique des espèces [141-142].

CHAPITRE 4 MATERIELS ET METHODES

4.1 Matériel et méthodes

4.1.1 L'échantillonnage de la plante

L'échantillonnage est réalisé sur trois sites différents :

- Le site de Benazouz est situé à l'est de l'Algérie, plus précisément dans la région d'El-Kala
- Le site de Béni-Tamou situé dans la région de Blida et le site du jardin d'El Hamma (Alger). La plante prélevée pendant la période du printemps est maintenue au laboratoire dans des conditions d'éclairage et de température de 25°C strictement artificielles.



Figure 4. 6: Site d' El-Kala Annaba



Figure 4.7: Site de Beni Tamou Blida

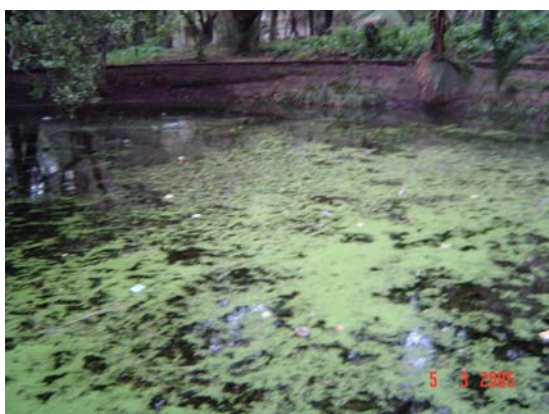


Figure 4.8: Site du jardin d'El Hamma (Alger)

4.1.2 Préparation du milieu de culture

Les réactifs que nous citerons pour la préparation des milieux de cultures sont tous de pureté analytique qui sont cités ci-dessous.

L'eau distillée utilisée pour préparer ces milieux est une eau de très bonne qualité de (conductivité < à 13 μs 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 du milieu de culture contenant le FeSO_4 qui est préparé au moment de la culture de la plante.

4.1.2.1 Préparation des solutions mères pour la constitution du milieu de culture au laboratoire [143] :

La solution de culture est composée de :

- Solution 1 : 11,8 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- Solution 2 : 10,11 g de KNO_3 dans 1000 ml d'eau distillée.
- Solution 3 : 12,33 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- Solution 4 : 6,8 g de K_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée.
- Solution 5 : 3,077 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.

Ces solutions, sauf (S₅), peuvent être conservées à 4°C à l'obscurité ; (S₅) est préparée avant chaque usage.

4.1.2.2 Préparation des solutions d'oligo-éléments [143] :

Une sixième solution (S6) est obtenue en mélangeant:

- ❖ 2,86 g de H_3BO_3 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 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- ❖ 0,079 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.

Une septième solution (S7) est obtenue en mélangeant :

- ❖ 0,128 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mg}_7\text{O}_{24}$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- ❖ 0,229 g de NH_4VO_3 dans 1000 ml d'eau distillée.
- ❖ 0,049 g de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- ❖ 0,0478 g de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.
- ❖ 0,017 g de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1000 ml d'eau distillée.

La préparation se fait en mélangeant 100 ml de S₁, 5 ml de S₂, 4 ml de S₃ avec 1 ml des solutions S₄, S₅, S₆, et S₇. Le volume obtenu est complété à 1 litre avec l'eau distillée.

Le pH de la solution ainsi préparée est ajusté à 5,5 (à l'aide des solutions d'acide chlorhydrique HCl à 1N ou de la soude NaOH à 1 N).

Ce milieu est préparé juste avant son emploi. La composition du milieu ainsi préparé est celle du milieu de Haogland standard (H) [143].

4.1.3 Méthodologie de culture de *lemna gibba*

4.1.3.1 Stérilisation du matériel de culture

Verrerie

Toute la verrerie en pyrex (Cristallisoirs, Erlen, Bêchers, Fioles,...) utilisée pour les expérimentations est plongée dans l'eau acidulée (pH = 2,03) pendant 24 h. Après 24 heures de trempage elle est rincée avec de 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, elle est recouverte avec du papier aluminium puis placée dans la hotte sous radiation. Les accessoires tels que les pipettes, les spatules subissent une stérilisation par autoclave à 120°C pendant 20 minutes (stérilisation par voie humide). Les milieux de culture ainsi que l'eau distillée ayant servi à la culture des plantes sont stérilisés et donc introduites dans des flacons hermétiquement fermés puis stérilisés à 120°C pendant 20 minutes (stérilisation par voie humide).

4.1.3.2 Stérilisation de 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 (10 secondes) dans l'éthanol dilué (3 à 4 gouttes d'éthanol dans 200 ml d'eau distillée stérile).
- Trempage rapide dans de l'eau de javel diluée (0.5 ml dans 200 ml) pendant 1 minute.
- Rinçage avec de l'eau distillée stérile.

- Incubation dans les milieux de culture préalablement stérilisée.
- Ce cycle de désinfection permet d'éviter d'éventuelle apparition des micro-organismes, en particulier des algues pouvant vivre en symbiose avec la plante.

La culture est réalisée dans une chambre thermo statée à 25°C avec une photopériode de 16 heures d'éclairage et 8 heures d'obscurité.

Le milieu de culture dilué 10 fois est considéré comme milieu optimal [144]. Ces conditions ont donné des colonies présentant un aspect physiologique remarquable (forte pigmentation, taille des frondes assez grandes, des racines longues).

4.2 Tests de toxicité ou bio essais

4.2.1 Objectif

La contamination par différentes concentrations en métaux lourds (Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+}) du milieu de culture contenant la *Lemna gibba* a pour objectif d'étudier, dans des conditions contrôlées, l'effet de ces métaux sur la croissance et le comportement de cette plante aquatique vis-à-vis de ces métaux toxiques.

La gamme de concentration testée est regroupée dans le tableau 4.2

Tableau 4.2: Concentrations des métaux choisis pour les bios essais [145]

$[\text{Cd}^{2+}]$ en ppm	$[\text{Cu}^{2+}]$ en ppm	$[\text{Zn}^{2+}]$ en ppm
10^{-3}	10^{-2}	50
10^{-2}	10^{-1}	70
10^{-1}	1	90

L'évaluation de l'impact de ces métaux sur la *Lemna gibba* est établie à l'aide de l'analyse des paramètres suivants :

- Dosage de l'azote (nitrates, nitrites, azote ammoniacal, azote KJELDAHL) dans le milieu de culture.
- L'extraction des protéines dans la plante.

4.2.2 Evaluation du taux d'inhibition

Des échantillons de la plante *Lemna gibba* par la présence des métaux est estimé par l'expression suivante [146] :

$$\%I = (\Delta N_t - \Delta N) \times 100 / \Delta N_t$$

Où:

ΔN_t : l'accroissement moyen du nombre de fronde observé dans le récipient témoin.

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

4.2.3 Dosage des nitrates

Les nitrates sont dosés par la méthode spectrophotométrie (U.V-VIS), U.V.MINI 1240 SHIMADZU à 520 nm.

Les nitrates sont réduits en nitrites par une solution d'hydrazine en milieu alcalin et en présence de sulfate de cuivre comme catalyseur. Les nitrites obtenus sont alors dosés par colorimétrie : diazotation avec l'acide sulfanilique et l' α -Naphtylamine. Après apparition de la coloration dans l'obscurité on mesure la densité à 520 nm [147]. Le passage en colorimètre ne doit intervenir que juste avant la mesure optique afin que la solution soit exposée au minimum de temps à la lumière à laquelle, elle est très sensible.

La courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide de solutions étalons de concentrations comprises entre 5 et 100 ppm de nitrates. L'évolution des absorbances mesurées en fonction de la concentration est représentée par la figure 1 (Appendice B)

4.2.4 Dosage de l'azote ammoniacal (NH_4^+)

L'ammonium (N- NH_4) est dosé par la méthode spectrophotométrie à la longueur d'onde 620nm [147].

L'ammonium en milieu alcalin et en présence d'hypochlorite de sodium donne avec le phénol une coloration bleue (réaction de Berthelot). Le nitroprussiate de sodium est utilisé comme catalyseur, les précipitations à ce pH par addition sont réduites par addition de tartrate et de citrate de sodium. La quantité d'hypochlorite est ajustée

soigneusement. L'établissement de la courbe d'étalonnage est réalisé à l'aide de solutions étalons dont les concentrations sont comprises entre 0,05 et 20 ppm de NH_4^+ . La courbe d'étalonnage est donnée à la figure 2 (Appendice B).

4.2.5 Dosage des nitrites

Les nitrites sont dosés par la méthode spectrophotométrie à la longueur d'onde 520 nm [156].

La diazotation de l'4-amino-2-naphtylamine par les nitrites en milieu acide et sa copulation avec le dichlorure de N-(1-naphtyl) éthane-1,2-diamine donne un complexe coloré pourpre, susceptible d'un dosage spectrophotométrie.

La courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide de solutions étalons dont les concentrations sont comprises entre 0,02 et 0,20 ppm de NO_2^- . L'évolution des absorbances mesurées en fonction de la concentration est représentée par figure 2 (Appendice B).

4.2.6 Dosage de l'azote KJELDAHL

KJELDAHL propose la méthode de dosage de l'azote, par minéralisation sulfurique. La méthode de KJELDAHL est devenue très généralisée, elle sert de méthode de référence et pour beaucoup de produit, reste la méthode officielle est conventionnelle [148], [149], [150], [151], [152]. La substance à analyser est chauffée dans l'acide sulfurique concentré en présence de différents catalyseurs jusqu'à complète décoloration de la liqueur. L'azote est transformé qualitativement en sulfate d'ammonium NH_4^+ . Une distillation est effectuée après passage en milieu alcalin de l'ammoniac NH_3 .

Le distillat est recueilli dans une solution acide dont l'excès est déterminé par titrimétrie.

4.2.7 La minéralisation de l'azote organique

Durant cette opération, l'ensemble de l'azote organique est transformé en azote minéral sous forme ammoniacal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Cette transformation est réalisée

par l'action oxydante de l'acide sulfurique concentré bouillant à une température de 300°C sur la matière organique.

- La prise d'essai doit être représentative du produit examiné.
- Un catalyseur adéquat doit être choisi.

Certains formes d'azote organique étant plus difficile à minéraliser. Les mélanges de catalyseurs les plus souvent utilisés sont composés de sels de sulfate de potassium K_2SO_4 , de sulfate de cuivre $CUSO_4 \cdot 5H_2O$ des métaux comme le sélénium qui permet d'activer la minéralisation.

Nos expériences, ont été réalisées à l'aide du mélange de catalyseurs suivants :

- Sulfate de potassium: 100g.
- Sulfate de cuivre : 10g.
- Sélénium : 1g.

Ce mélange de catalyseur a été choisi car il représente l'avantage d'être exempt de mercure, qui est nocif et dangereux. Le temps de minéralisation est variable. Certains auteurs préconisent de suspendre la minéralisation dès que la solution est incolore. D'autres estiment qu'un temps supplémentaire d'environ une heure semble donner des résultats meilleurs.

La minéralisation est effectuée durant 02 heures avec un minéralisateur BUCHI type 430 voir Figure 4.9 (Appendice E).

La distillation est réalisée à l'aide d'un appareil type BUHI 315 assurant une distillation par entraînement à la vapeur. Le digestat ou minéralisât est dilué par addition de 200 ml d'eau auquel sont ajoutés 50 ml de soude concentrée à 33%. Un échauffement du liquide se produit et l'entraînement de l'ammoniac commence aussitôt, l'ammoniac est aussi recueilli dans un bêcher contenant :

- 25 ml d'acide borique à 2%.
- Un indicateur coloré permettant de visualiser la présence éventuelle d'ammoniac contenant : 1/4 de rouge de méthyle à 0.2% dans l'alcool à 95%.
1/4 de vert de bromocrésol 0.1% dans l'alcool à 95%.

Il est recommandé de placer le b cher contenant l'acide borique sous le tube collectant le distillat avant toute addition de réactifs dans l'échantillon minéralisé. De plus, le tube doit plonger dans l'acide borique. La durée de la distillation dépend du type de l'appareil, elle dure généralement de 5   10 minutes pour la distillation d'un volume de 100 ml voir figure 4.10 (Appendice F).

Le dosage de l'ammoniac est réalisé en présence d'acide sulfurique 0,1N. L'ammoniac est titré rapidement. Il faut titrer rapidement l'ammoniac dans la solution d'acide borique en présence de l'indicateur, le milieu vert en milieu alcalin vire au rose en milieu acide. Le dosage permet de tenir compte de l'azote éventuellement porté par les eaux de rinçage, par les réactifs et les produits volatils entraînés en cours de la distillation. Par la conception de l'appareil à entraînement à la vapeur BUCHI, les risques de passage de microgouttelettes de soude dans le distillat sont quasiment nuls.

L'expression donnant la teneur en azote est la suivante :

$$\% \text{ Azote (g.g}^{-1}\text{)} = (0.0014 \times V \times 100 \times 200) / (M \times 50)$$

Avec:

V : volume d'acide sulfurique à 0.1 N utilisé pour doser en ml.

M : masse de l'échantillon en g.

50 : correspondant au volume de la prise d'essai du minéralisât.

200 : est le volume d'eau distillée ajouté au minéralisât.

4.2.8 Le pH

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

4.2.9 Extraction et dosage des protéines :

La méthode utilisée est celle de BRADFORD [153].

La teneur en protéines cytoplasmiques et pariétales de la plante utilisée est déterminée par spectrophotométrie visible à une longueur d'onde 595nm après extraction.

Le réactif de BRADFORD est préparé par mélange de :

- ✓ 0,1 mg de bleu de coomacie G250.
- ✓ 25ml de l'éthanol à 96%.
- ✓ 50 ml d'acide phosphorique à 85%.

La préparation doit être à froid (moins de 4°C) et à l'obscurité.

Une masse de la matière végétale obtenue après 10 jours d'exposition au métal est pesée. Cette biomasse est broyée à l'aide d'un mortier sur une plaque froide puis 5 ml de solution tampon phosphate à pH=7 est ajouté dans le but d'assurer une bonne dissolution de la matière végétale suivi d'une centrifugation à 4500 tr.mn⁻¹ pendant 15 minutes.

Le dosage des protéines est en diluant le surnageant .Une prise de 0,05 ml de l'extrait est placé dans un tube à essai à lesquels est ajouté 5 ml du réactif de BRADFORD et l'analyse est effectuée au spectrophotomètre type à 595 nm. La courbe d'étalonnage est donnée à la figure 4 (Appendice B).

Le tableau 4.3 représente les étapes de préparations de solutions étalons à base d'ovalbumine et les résultats des densités optique obtenues au spectrophotomètre.

Tableau 4.3: Préparation de la gamme étalon pour le dosage des protéines totales.

N°de tube	1	2	3	4	5	6
Volume de l'ovalbumine (ml)	0	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08
Eau distillée (ml)	0,1	0,09	0,08	0,06	0,04	0,02
Réactif de Bradford (ml)	5	5	5	5	5	5
Concentration de l'ovalbumine (ppm)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
DO	0,00	0,0446	0,0887	0,200	0,307	0,40

La teneur en protéines est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Teneur en protéines (mg.g}^{-1}\text{ MF)} = \frac{\text{Quantité de la protéine (mg)} * 200}{\text{Poids d'échantillon (g)}}$$

200 : représente le coefficient de dilution.

4.3 Analyse des résultats

Un traitement statistique des résultats obtenus est réalisé en utilisant le logiciel STATISTICA 5.1 où les moyennes arithmétiques et les écart-types sont déterminés. Le test de student est également appliqué à l'aide de ce logiciel.

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

4.3.1 L'estimation

Elle consiste à estimer la valeur d'un paramètre inconnu à partir des valeurs d'un échantillon, cette estimation peut se faire soit en attribuant au paramètre inconnu la valeur la plus raisonnable possible compte tenu des observations, cela peut se faire par le calcul de la moyenne, soit en le situant dans un intervalle ayant de grandes probabilités de recouvrir la valeur inconnue (intervalle de confiance) [154].

4.3.1.1 Moyenne

Un groupe de mesures est souvent caractérisé par sa moyenne arithmétique (ou espérance mathématique), elle est notée \bar{x} et calculée par la formule suivante :

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Où : n est l'effectif de l'échantillon (N^{bre} de valeurs composant l'échantillon).

Après avoir défini la moyenne arithmétique, il importe de préciser de quelle manière les valeurs s'en écartent, pour cela on peut calculer certains paramètres appelés paramètres de dispersion qui sont notamment la variance et l'écart-type.

4.3.1.2 La variance

La variance est la moyenne arithmétique des carrés des écarts par rapport à la moyenne, elle est notée « S^2 » et obtenue par la formule suivante [154].

$$S^2 = \frac{1}{n} \sum_1^n (x_i - \bar{x})^2$$

4.3.1.3 L'écart type

L'écart type ou déviation standard est la racine carrée de la variance on peut distinguer l'écart type observé et l'écart type estimé [154].

4.3.1.4 Intervalle de confiance

L'estimation par intervalle de confiance est choisie de telle façon que l'intervalle ait $(1-\alpha)$ probabilités de recouvrir la vraie valeur.

CHAPITRE 5 RESULTATS ET DISCUSSIONS

5.1 Les essais écotoxicologiques

5.1.1 Etude de l'impact de la contamination des milieux de culture par Cd²⁺, Cu²⁺ Zn²⁺ sur la croissance de la *Lemna gibba*

Les résultats relatifs à l'inhibition de la croissance de la *Lemna gibba* en présence de Cd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ sont illustrés par les figures 11,12 et 13.

Ces résultats montrent d'une part, une inhibition croissante ; déterminée par un taux d'inhibition (I); lorsque les concentrations de Cd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ augmentent respectivement de : 10⁻³ à 10⁻¹ ppm pour Cd et de 10⁻¹ à 1ppm pour Cu et de 50 à 90 ppm pour Zn.

En effet, les taux d'inhibition enregistrés au 10^{ème} jour de test et donc de l'exposition de la plante aux différents métaux sont de : 45,40 % ± 12,41 à 10⁻³ ppm de Cd²⁺ et 90,90% ± 0,83 à 10⁻¹ ppm de Cd²⁺.

Une même constatation est déduite dans les cas de Cu et Zn où les taux d'inhibition atteignent 100 % pour 1ppm de Cu²⁺ et 72,20 % ± 11,68 au 10^{ème} jour pour 90 ppm de Zn²⁺

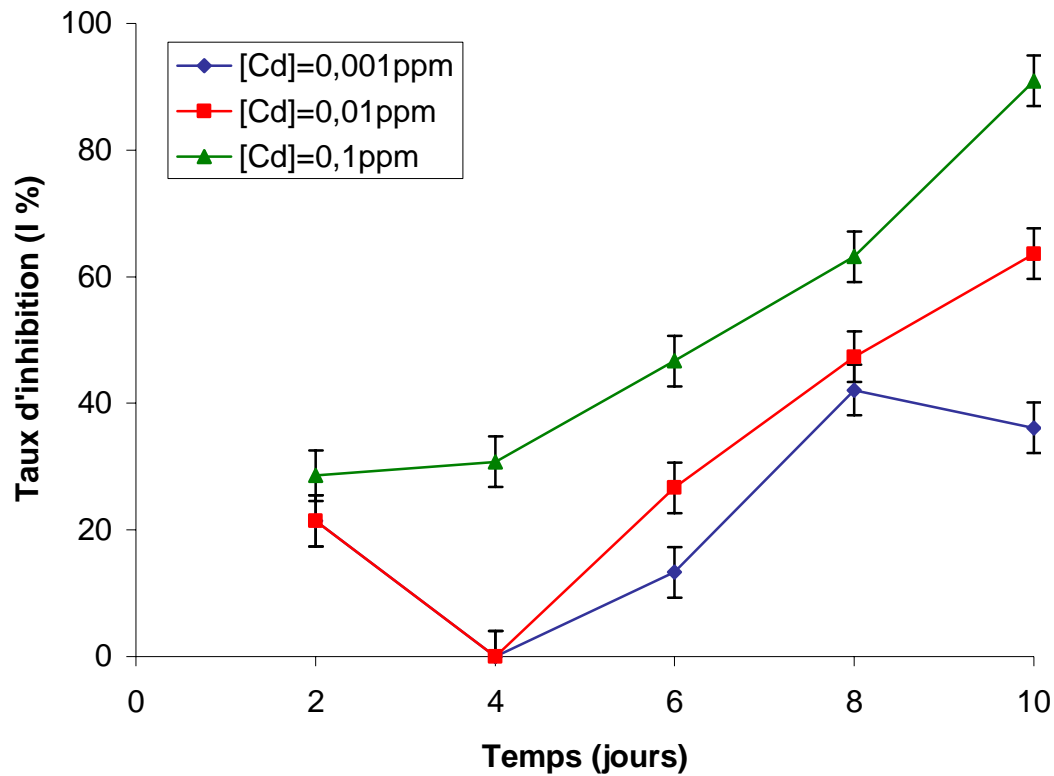


Figure 5.11: Variation du taux d'inhibition de la croissance de la *Lemna gibba* en fonction du temps ; I ± Ecart-types, n = 3 : cas du cadmium

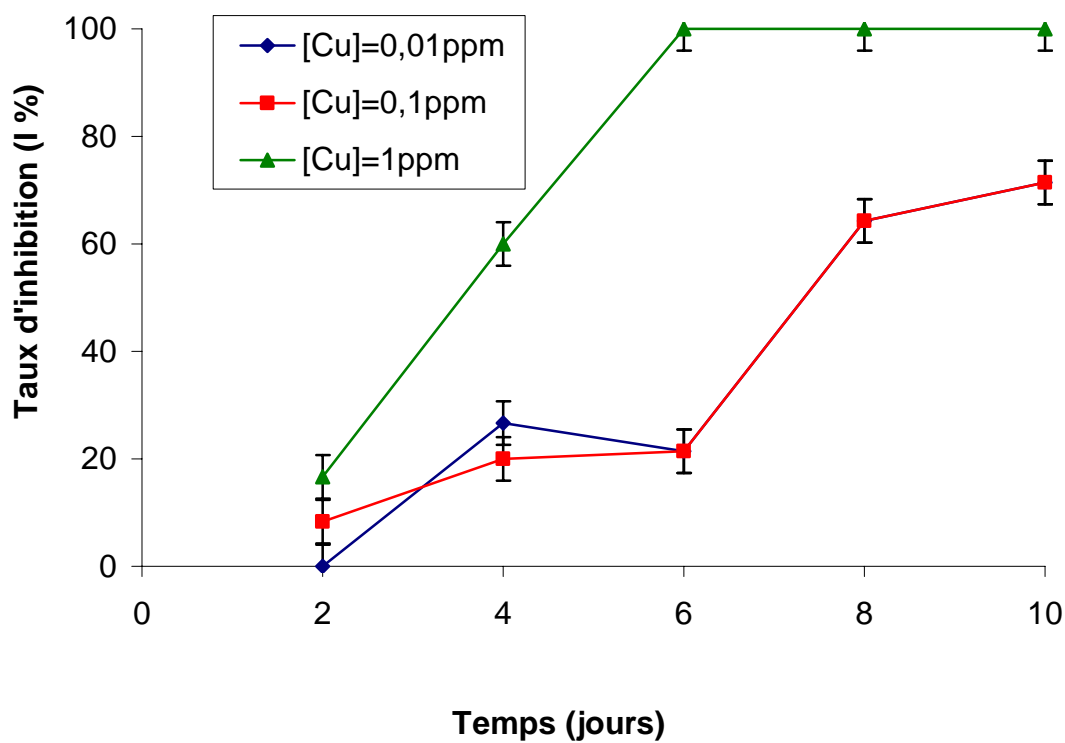


Figure 5.12 : Variation du taux d'inhibition de la croissance de la *Lemna gibba* en fonction du temps ; I ± Ecart-types, n = 3: cas du cuivre

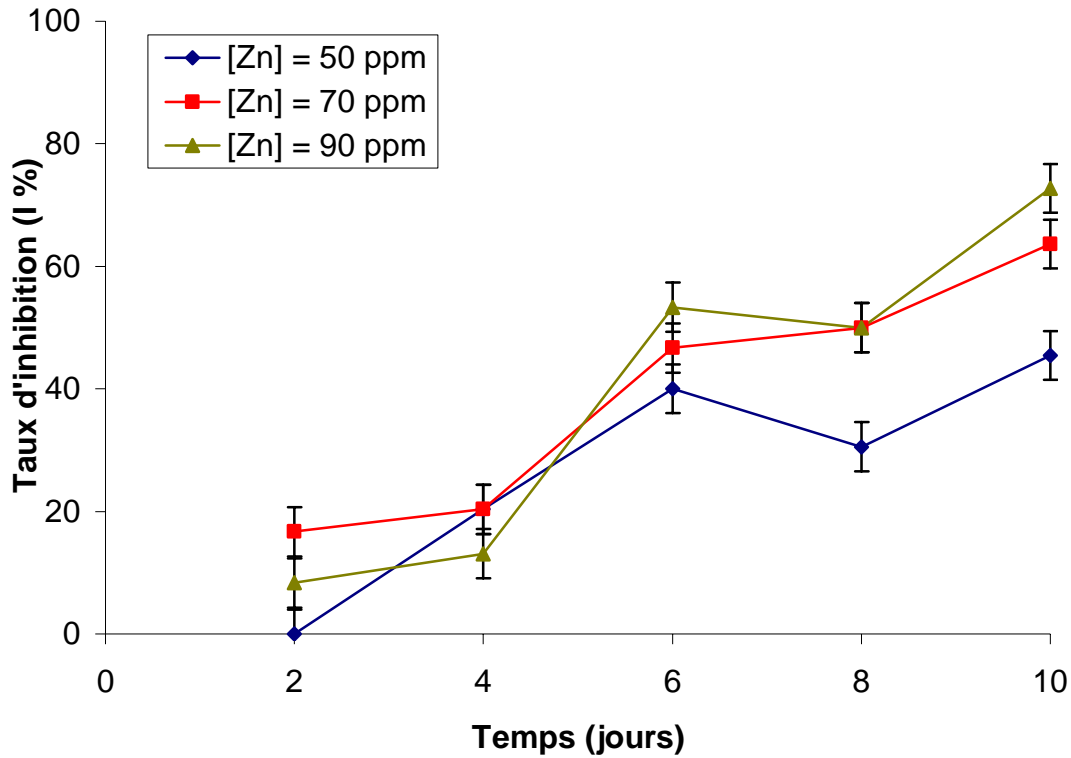


Figure 5.13 : Variation du taux d'inhibition de la croissance de la *Lemna gibba* en fonction du temps ; \pm Ecart-types, $n = 3$: cas du zinc

D'autre part, ces résultats permettent le classement de ces métaux par ordre de toxicité décroissante : $\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$.

Le zinc s'avère le moins inhibiteur de la croissance de la plante malgré les fortes concentrations testées. Cependant, des taux d'inhibition supérieurs à 50 % sont observables à des concentrations dépassant les 70 ppm et après les 6^{ième} jours de culture. Ces observations seraient attribuées au rôle nutritif du zinc vis-à-vis de la plante.

Il est admis que certains métaux sont à l'origine de la destruction de la membrane cytoplasmique, ces détériorations cellulaires sont fonction des caractéristiques des parois cellulaires de la plante, des propriétés physico-chimiques du milieu ainsi que du type de la toxicité métallique testé [155-156].

5.2 Effet de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sur l'azote total contenu dans les milieux de culture de la *Lemna gibba*

De diverses espèces de *Lemna* ont été employées pour le traitement des eaux usagées municipales et industrielles dans beaucoup de pays. ALAERTS et *al.*, 1996 ont démontré que la *Lemna gibba* pouvaient retenir 74% de (NTK). De même, les travaux de CHENG et *al.*, 2002 ont montré une rétention du taux de (NTK) par la *Lemna gibba* dans des effluents des eaux chargées en matières organiques atteignant des taux de 90 % à 99,2 % de rétention.

L'analyse des quantités d'azote total dans les milieux de cultures est réalisée sur les milieux contaminés par Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} échantillonnées tous les deux jours jusqu'à 10 jours d'expérience. Un témoin a été considéré pour chaque série de tests de toxicité. Les évolutions des concentrations en azote totale en présence des différentes concentrations métalliques de Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} et en fonction du temps sont représentées par les figures 14, 15 et 16.

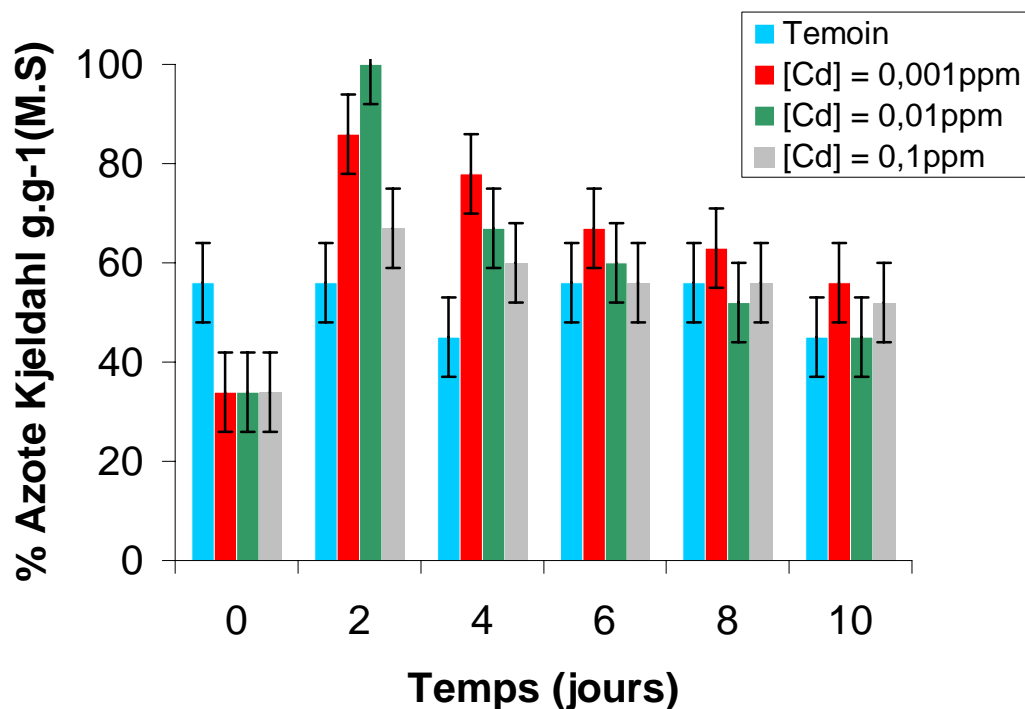


Figure 5.14 : Variation du % d'azote KJELDAHL contenues dans les milieux de culture de la *Lemna gibba* en fonction du temps ; % NTK \pm Ecart-types, n =3 : cas du cadmium.

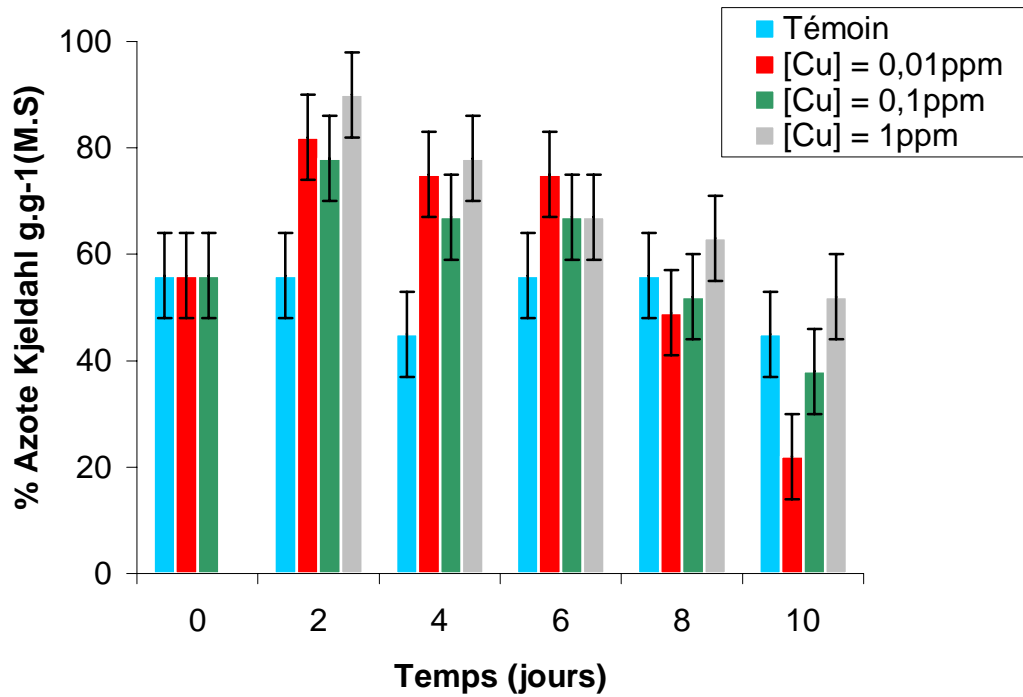


Figure 5.15 : Variation du % d'azote KJELDAHL contenues dans les milieux de culture de la *Lemna gibba* en fonction du temps ; % NTK \pm Ecart-types, n =3 : cas du cuivre.

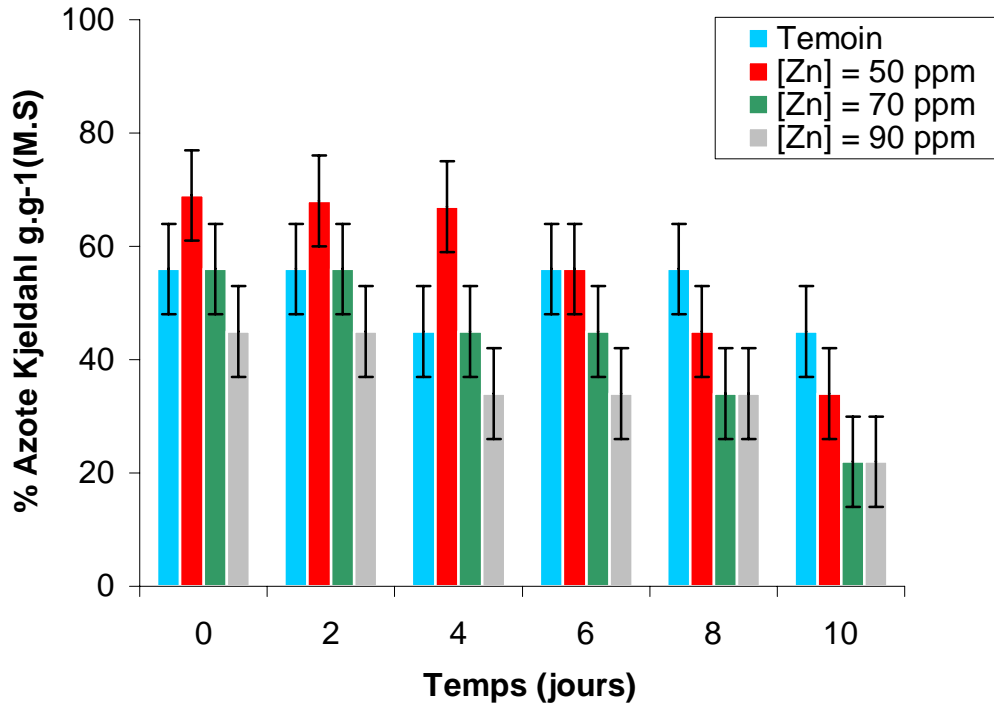


Figure 5.16 : Variation du % d'azote KJELDAHL contenues dans les milieux de culture de la *Lemna gibba* en fonction du temps ; % NTK \pm Ecart-types, n =3: cas du zinc.

Ces résultats montrent que l'azote total résiduel dans le témoin est plus faible que dans les solutions contaminées par Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} . Cette observation pourrait confirmer l'absorption de l'azote par la plante au cours du temps et donc son inhibition en présence de la toxicité métallique. Néanmoins, le résultat des cinétiques relatifs au témoin ne semble pas montrer l'absorption au cours du temps de l'azote total composé de nitrates, nitrites et d'azote ammoniacal. En effet, le N-Total apparaît plutôt constant pour les essais de 2, 4, 6, 8 et 10 jours où ces concentrations (N-Total) sont respectivement de : 56% ; 45% ; 56% ; 56% ; 45%.

Une telle conclusion ne permet donc pas de proposer l'utilisation de l'azote total pris sous ses différentes formes toutes associées pour prédire une inhibition du mécanisme de l'azote total entre la plante et son milieu de culture car l'absorption d'une des formes d'azote peut être remplacée par une autre forme qui réapparaît en solution et qui peut alors compenser la disparition d'une autre espèce d'azote.

Pour cela, nous nous sommes orientées vers l'analyse de chaque type d'azote dans les solutions contenant Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} .

5.3 Effet de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sur les nitrites contenu dans les milieux de culture de la *Lemna gibba*

Les résultats relatifs à la formation de nitrites dans les milieux de culture contaminés par Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} sont illustrés par les figures 17, 18 et 19.

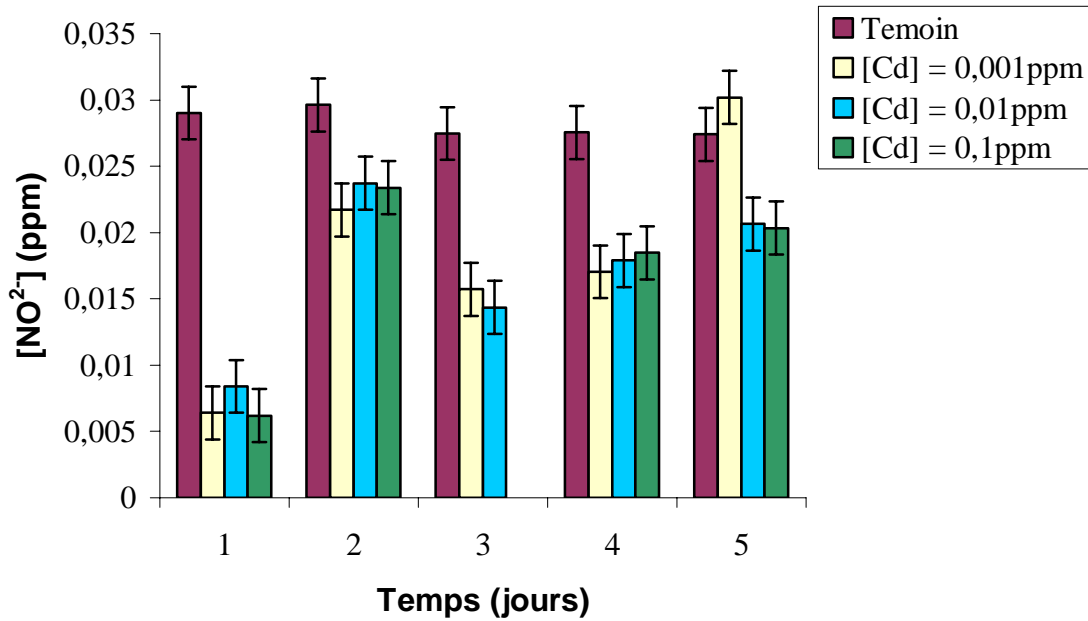


Figure 5.17 : Variation des concentrations de NO_2^- dans les milieux de culture de la *Lemna gibba* en fonction du temps ; $[\text{NO}_2^-] \pm$ Ecart-types, $n = 3$: cas du cadmium

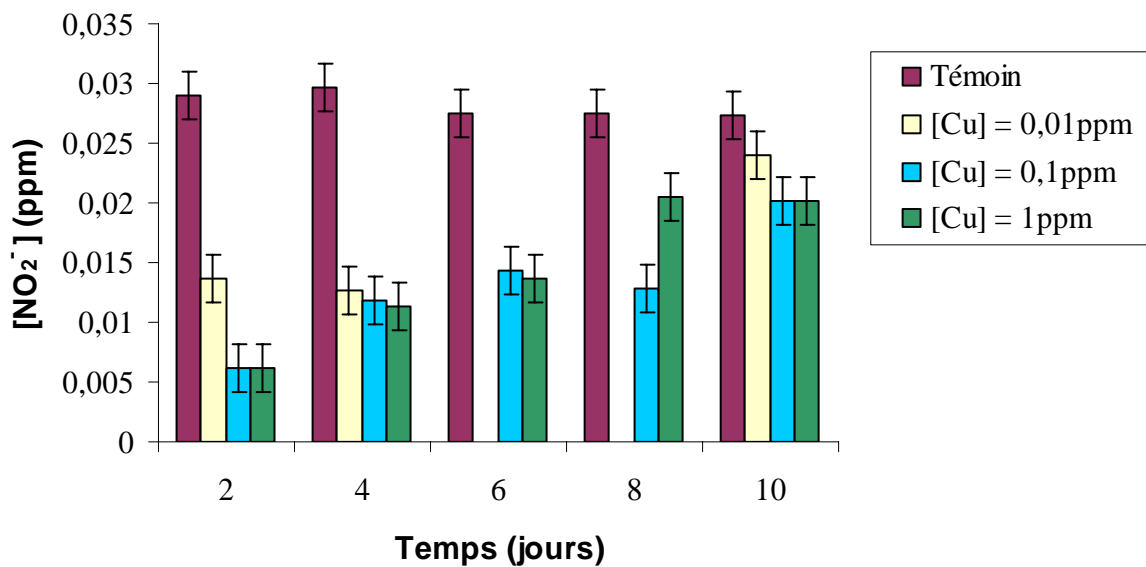


Figure 5.18 : Variation des concentrations de NO_2^- dans les milieux de culture de la *Lemna gibba* en fonction du temps ; $[\text{NO}_2^-] \pm$ Ecart-types, $n = 3$: cas du cuivre

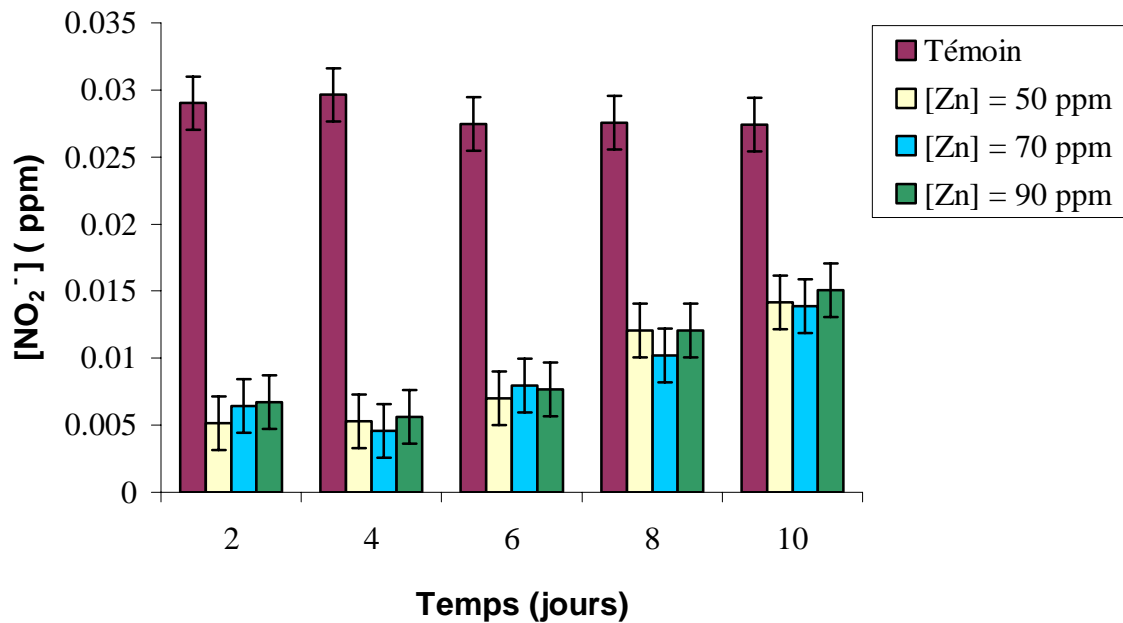
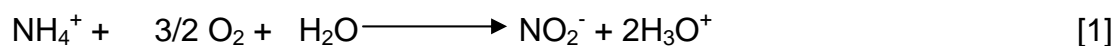


Figure 5.19: Variation des concentrations de NO_2^- dans les milieux de culture de la *Lemna gibba* en fonction du temps ; $[\text{NO}_2^-] \pm$ Ecart-types, $n = 3$: cas du zinc

Ces résultats montrent d'abord que les quantités de N- NO_2 dans les solutions témoins semblent constantes pour les essais de 2, 4, 6, 8 et 10 jours. Dans les solutions contenant respectivement 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} ppm de cadmium, 10^{-1} , 10^{-2} et 1ppm de cuivre et 50, 70 et 90 ppm de zinc les quantités de nitrites apparaissent nettement plus faibles que celle des milieux témoins. Cette constatation pourrait expliquer l'inhibition du mécanisme de transformation de l'azote en N- NO_2 et donc de la réaction de nitritation qui peut être représentée par la réaction [1].



Ces observations permettent la mise en évidence de l'inhibition d'un mécanisme réactionnel faisant intervenir l'azote nitrite mais il reste à confirmer l'inhibition du cycle d'échange des substances azotées entre la plante et son milieu de vie par l'analyse de l'azote nitrate et de l'azote ammoniacal. Ces quantifications sont présentées dans les paragraphes suivants.

5.4 Effet de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sur les quantités d'ammoniaque et de nitrates
contenues dans les milieux de culture de la *Lemna gibba*

*Effet de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sur l'azote ammoniacale contenu dans les milieux de culture de *Lemna gibba**

Nous avons, également quantifier l'azote ammoniacal parallèlement à la détermination des autres espèces d'azote ($N-NO_2$ et NTK). Les résultats ainsi obtenus sont représentés par les figures 20, 21 et 22.

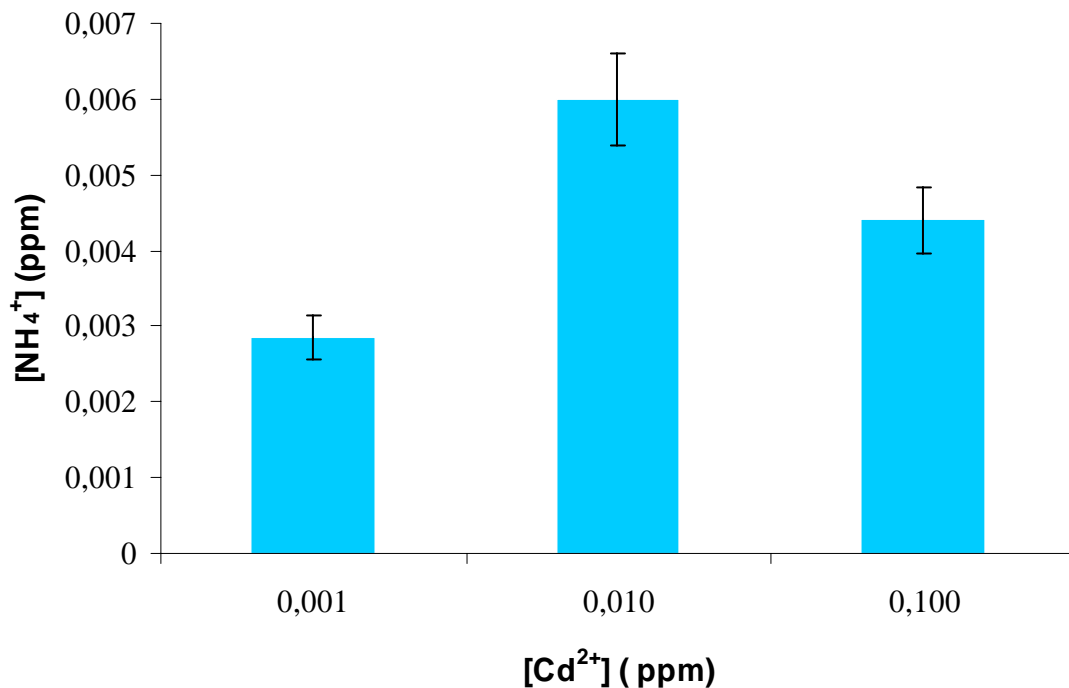


Figure 5.20: Variation des concentrations de NH_4^+ dans les milieux de culture de *Lemna gibba* en fonction de la concentration de Cd^{2+} ;
[NH_4^+] \pm Ecart –types, n = 3, durée de l'essai égale à 10 jours

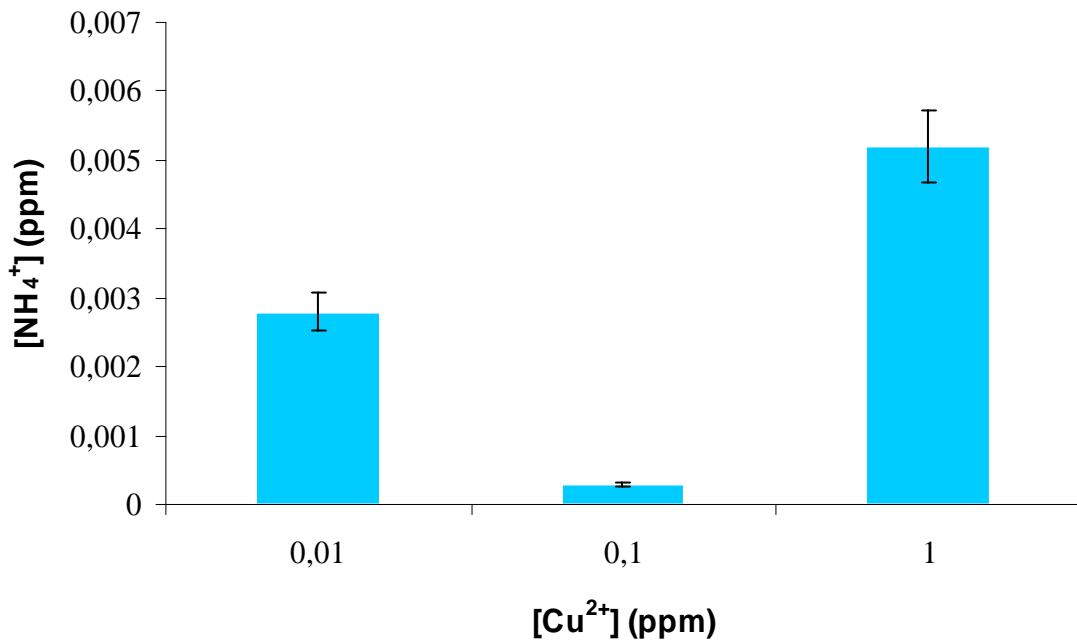


Figure 5.21: Variation des concentrations de NH_4^+ dans les milieux de culture *Lemna gibba* en fonction de la concentration de Cu^{2+} ;
 $[\text{NH}_4^+] \pm$ Ecart – types, $n = 3$ durée de essai égale à 10 jours

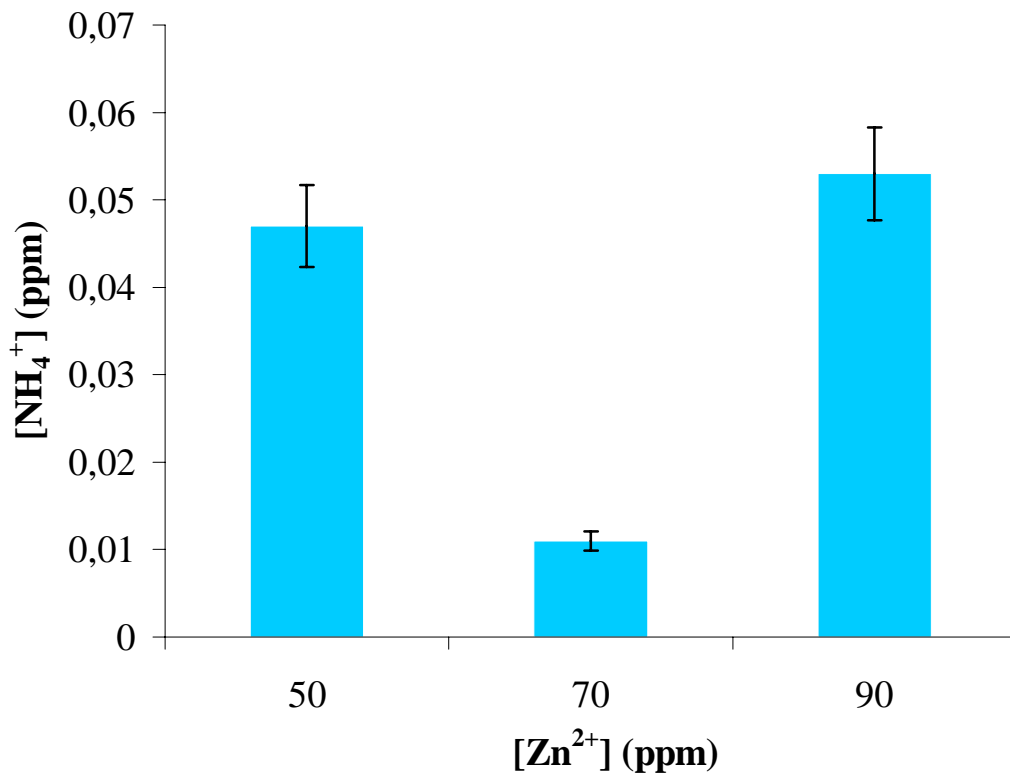


Figure 5.22: Variation des concentrations de NH_4^+ dans les milieux de culture de *Lemna gibba* en fonction de la concentration de Zn^{2+} ;
 $[\text{NH}_4^+] \pm$ Ecart – types, $n = 3$ durée de l'essai égale à 10 jours

Nous rappelons que la stérilisation de la plante et des milieux avant chaque essai témoin a montré une absence totale de N-NH_4^+ dans les milieux témoins, cette observation a été également évoquée préalablement par Ndang Ekouma [146]. Les résultats détaillés de l'analyse de N-NH_4^+ en fonction du temps pour les différentes concentrations de Cd, Cu et Zn sont données en appendice C.

Les figures 20, 21 et 22 qui présentent les variations de N-NH_4^+ contenus dans les milieux de culture en présence des différentes concentrations de Cd, Cu et Zn montrent après 10 jours d'expériences une augmentation des concentrations de N-NH_4^+ de 0 ppm (témoin) à $0,0044 \pm 0,00$ pour 10^{-1} ppm de Cd^{2+} ; $0,0052 \pm 0,0013$ ppm pour 1 ppm de Cu^{2+} et $0,053 \pm 0,0033$ ppm pour 90 (ppm) de Zn.

Nous pensons que cette apparition de N-NH_4^+ dans les solutions expérimentales est liée à une perturbation des métabolismes au niveau de la biomasse végétale qui conduit à un passage en solution de N-NH_4^+ qui est produit de manière excessive par la toxicité métallique.

Cette constatation démontre l'influence de ces métaux sur les réactions d'échange entre la plante et son milieu de culture mais ne nous permet pas d'affirmer que l'azote ammoniacal peut être un moyen de contrôle de la qualité de l'eau car l'excrétion éventuelle de NH_4^+ par les micro-organismes peut interférer avec le passage de NH_4^+ en solution à partir de la biomasse végétale.

*Effet de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sur les quantités de nitrates contenu dans les milieux de culture de *Lemna gibba**

Les évolutions des concentrations de NO_3^- pour des essais de 2, 4, 6, 8 et 10 jours et en fonction de différentes concentrations de cadmium sont représentées par les figures 23, 24 et 25.

Les tableaux représentant les variations des différentes espèces d'azote en fonction du temps sont donnés en appendice C.

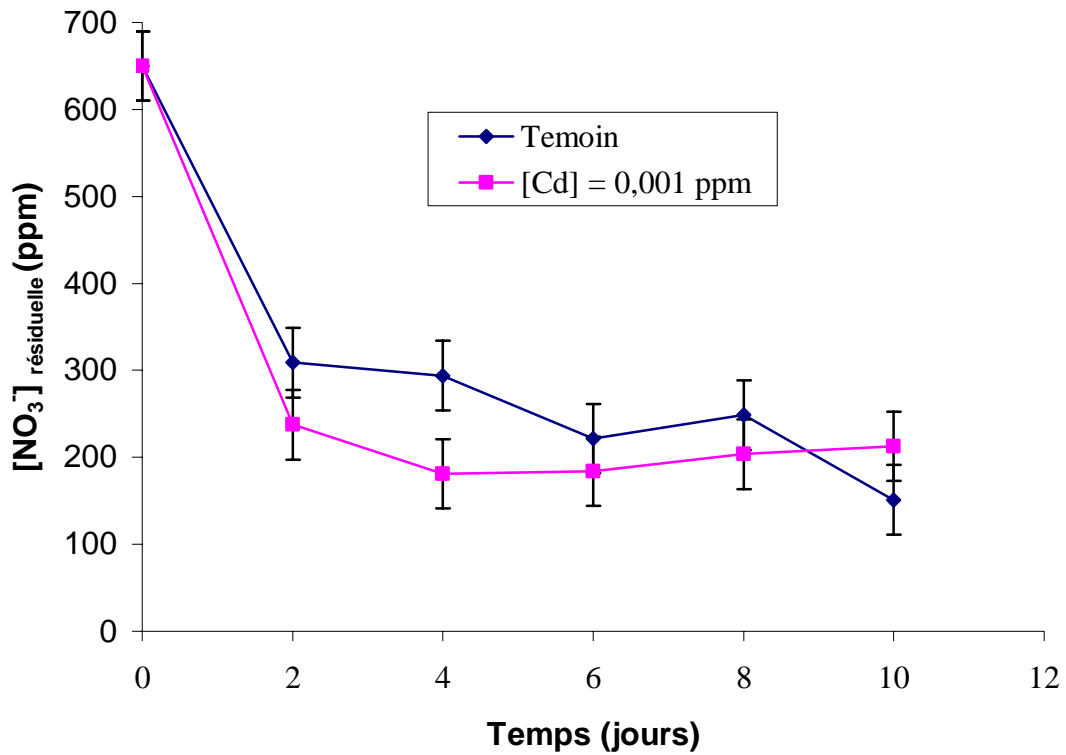


Figure 5.23 : Variation des concentrations résiduelles de NO₃⁻ dans les milieux de cultures de *Lemna gibba* en fonction du temps ;
[NO₃⁻] ± Ecart – types, n = 3

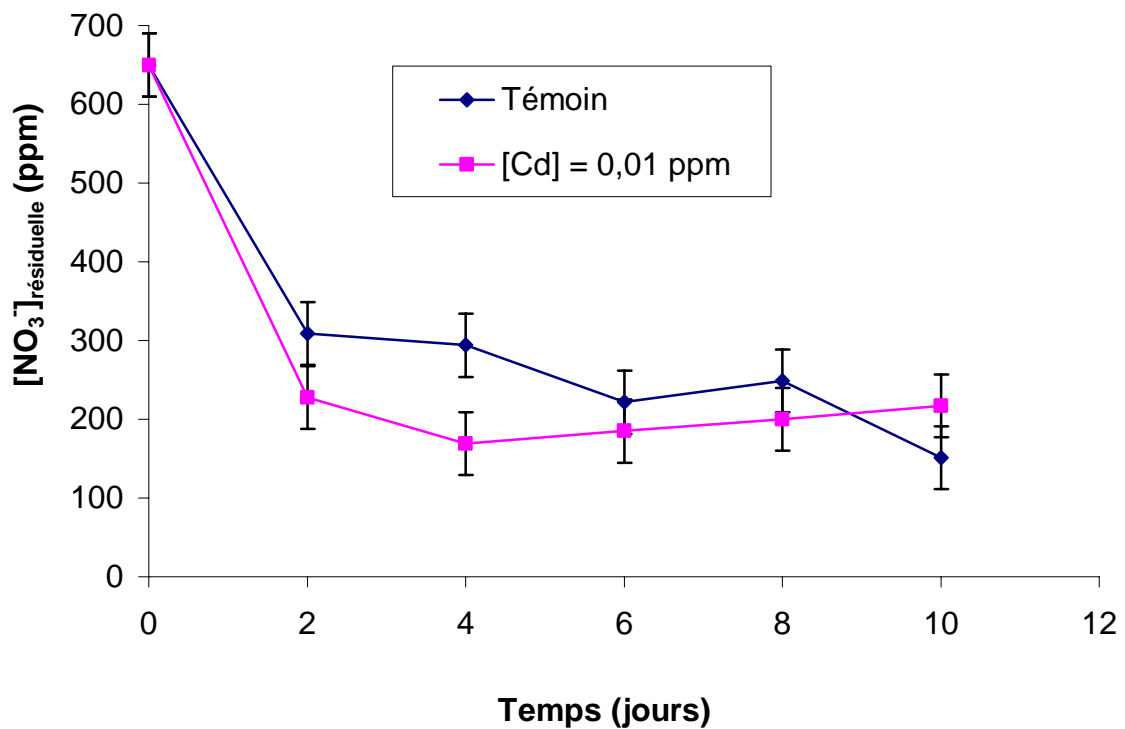


Figure 5.24 : Variation des concentrations résiduelles de NO₃⁻ dans les milieux de cultures de *Lemna gibba* en fonction du temps ;
[NO₃⁻] ± Ecart – types, n = 3

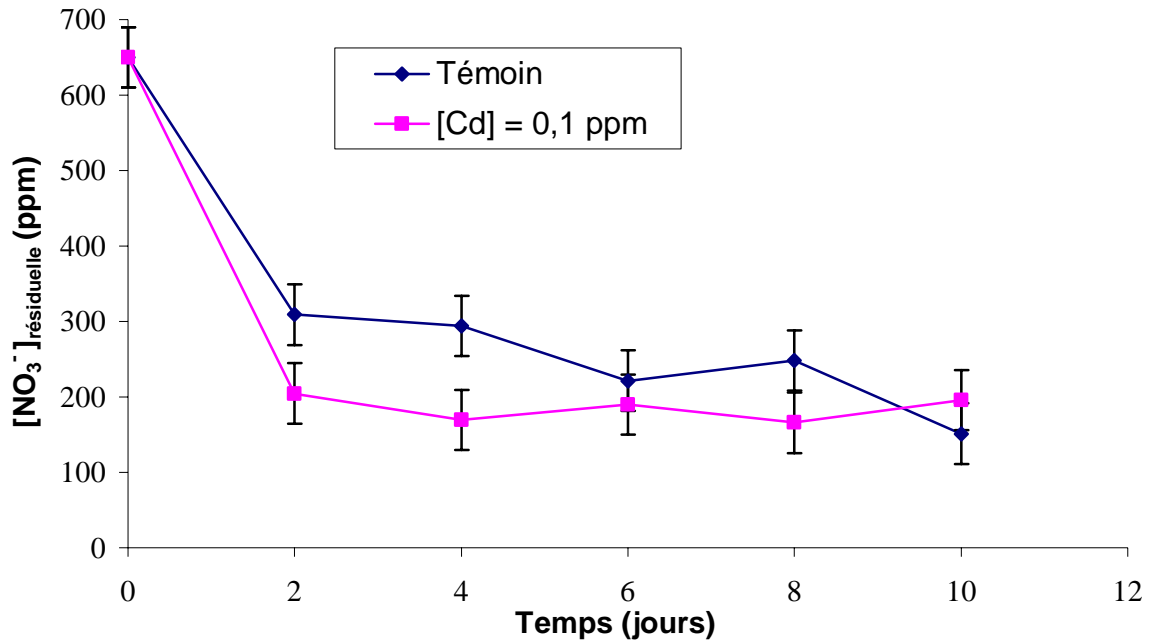


Figure 5.25: Variation des concentrations résiduelles de NO_3^- dans les milieux de cultures de *Lemna gibba* en fonction du temps ;
 $[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart - types, } n = 3$

Ces variations montrent l'absorption des nitrates par la plante dans tous les cas de concentrations de cadmium. Nous notons que NO_3^- chute respectivement pour le témoin et pour le test avec 10^{-1} ppm de cadmium de 650 ± 20 à $151,2 \pm 9,48$ ppm. Cette absorption des nitrates est également notée dans les cas de contaminations des milieux culture par Cu et Zn (figures 26-31).

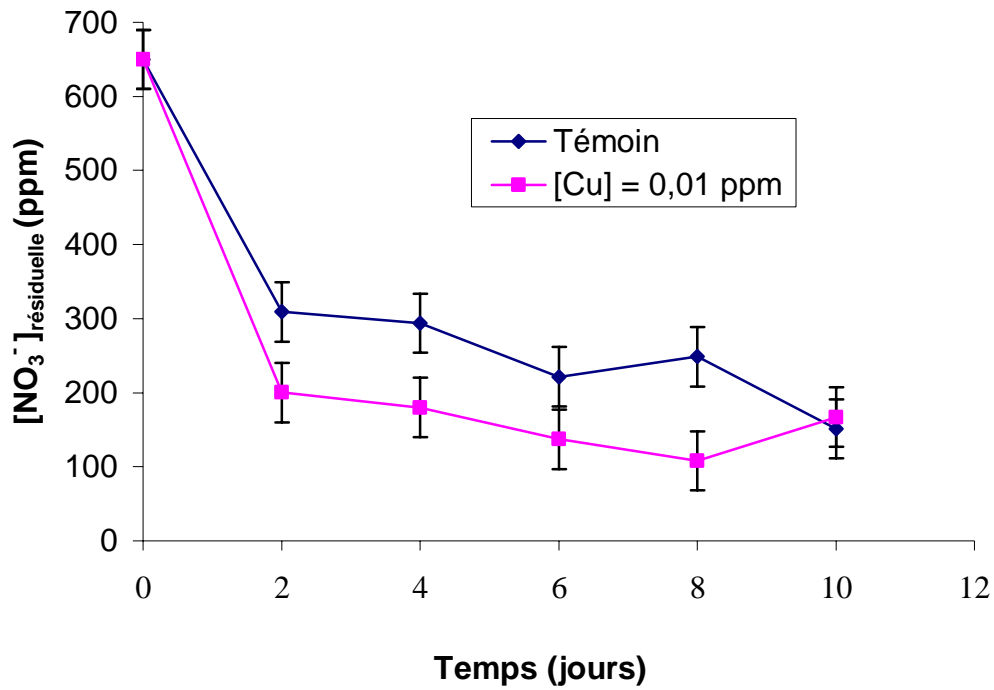


Figure 5.26: Variation des concentrations résiduelles de NO_3^- dans les milieux de cultures de *Lemna gibba* en fonction du temps ;

$[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart - types, } n = 3$

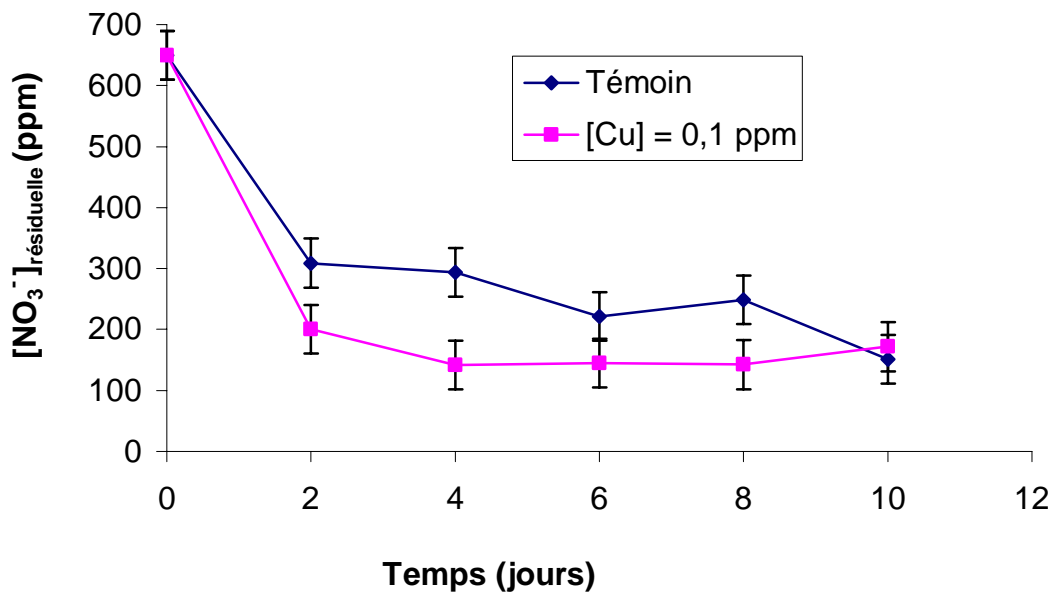


Figure 5.27: Variation des concentrations résiduelles de NO_3^- dans les milieux de cultures de *Lemna gibba* en fonction du temps ;

$[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart - types, } n = 3$

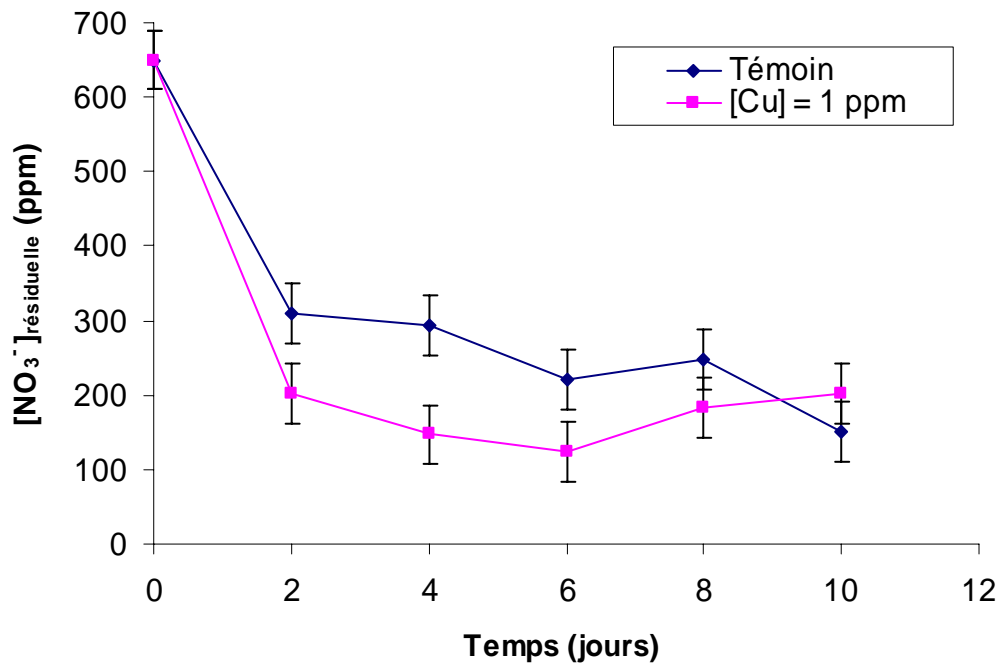


Figure 5.28: Variation des concentrations résiduelles de NO_3^- dans les milieux de cultures de *Lemna gibba* en fonction du temps ;
 $[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart -types, } n = 3$

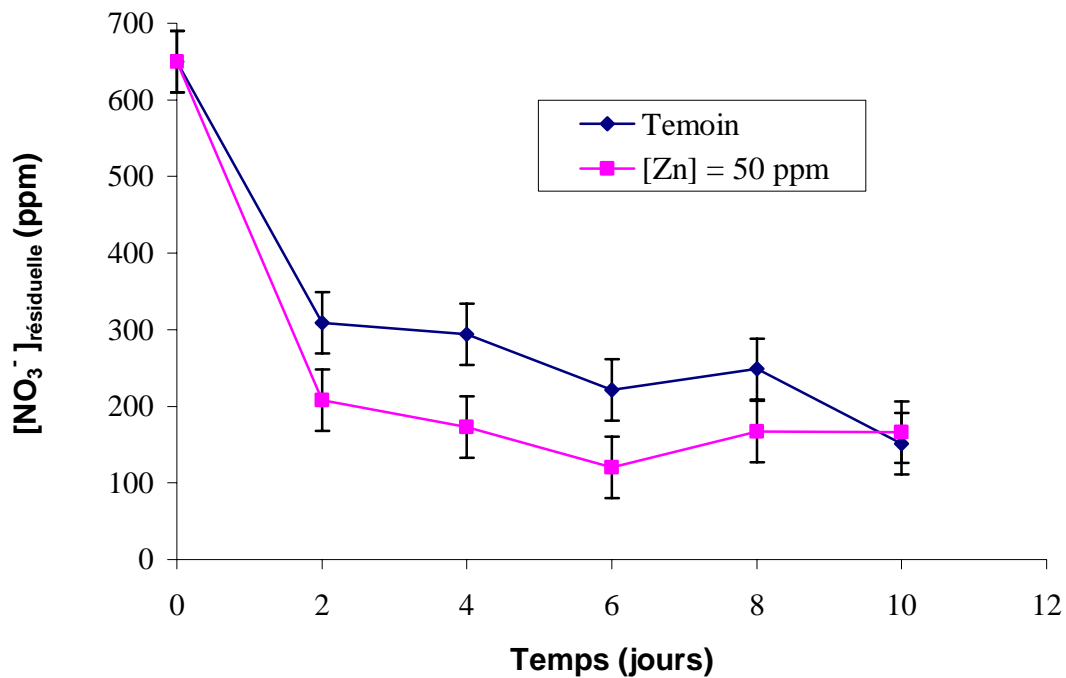


Figure 5.29: Variation des concentrations résiduelles de NO_3^- dans les milieux de cultures de *Lemna gibba* en fonction du temps ;
 $[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart -types, } n = 3$

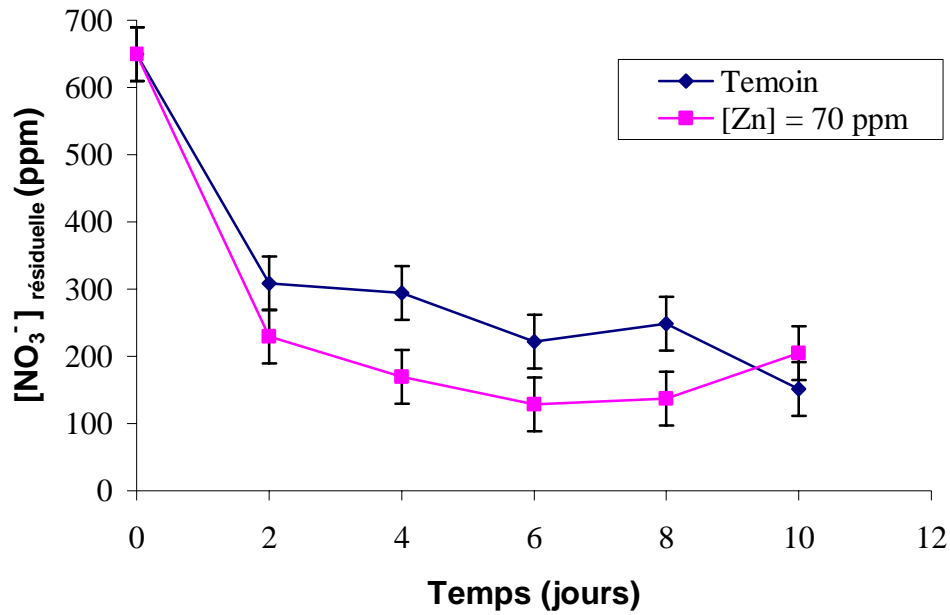


Figure 5.30: Variation des concentrations résiduelles de NO₃⁻ dans les milieux de cultures de *Lemna gibba* en fonction du temps ;
 [NO₃⁻] ± Ecart – types, n = 3

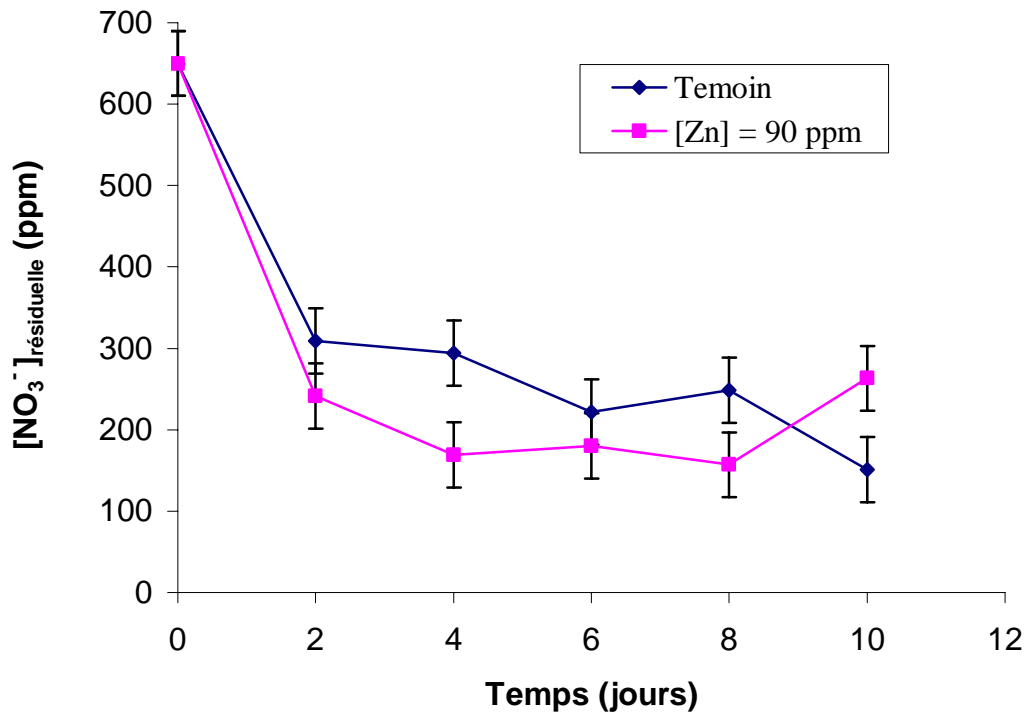


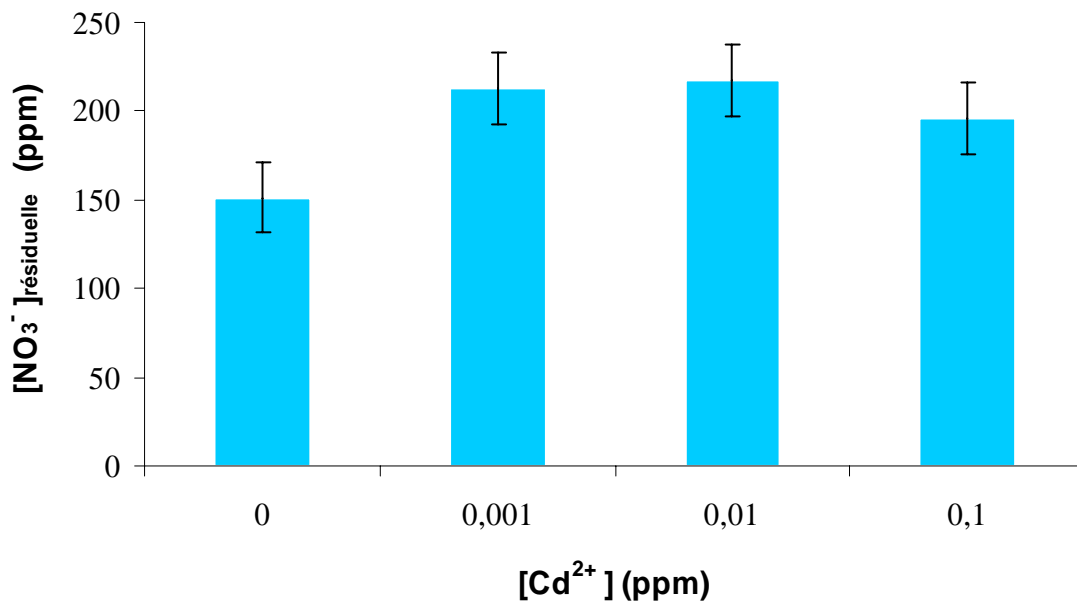
Figure 5.31: Variation des concentrations résiduelles de NO₃⁻ dans les milieux de cultures de *Lemna gibba* en fonction du temps ;
 [NO₃⁻] ± Ecart – types, n = 3

Cependant cette observation ne traduit pas de manière directe l'effet inhibiteur du cadmium sur l'assimilation de NO_3^- par la plante.

Par ailleurs, l'évolution des quantités résiduelles de nitrates en fonction des différentes concentrations de cadmium pour un essai de 10 jours (figure 32) démontre que le mécanisme d'absorption des nitrates par la *Lemna gibba* est significativement ($P < 0,05$) ralenti par 10^{-3} ; 10^{-2} et 10^{-1} ppm de Cd^{2+} .

En effet, la teneur résiduelle en NO_3^- dans les milieux contaminés passe de $151,2 \pm 19,48$ (Témoin) à $212,80 \pm 6,9$ ($\text{Cd}^{2+} = 10^{-3}$ ppm) et à $217,11 \pm 21$ ($\text{Cd}^{2+} = 10^{-2}$ ppm).

Les figures 33 et 34 montrant les variations des quantités de NO_3^- dans les milieux expérimentaux contenant Cu et Zn pour des expériences de même durées égale 10 jours conduisent à la même constatation.



e

Figure 5.33 : Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de *Lemna gibba* en fonction de la concentration de Cu^{2+} ;
 $[\text{NO}_3^-] \pm \text{Ecart} - \text{types}$, $n = 3$ Durée de l'essai égale à 10 jours.

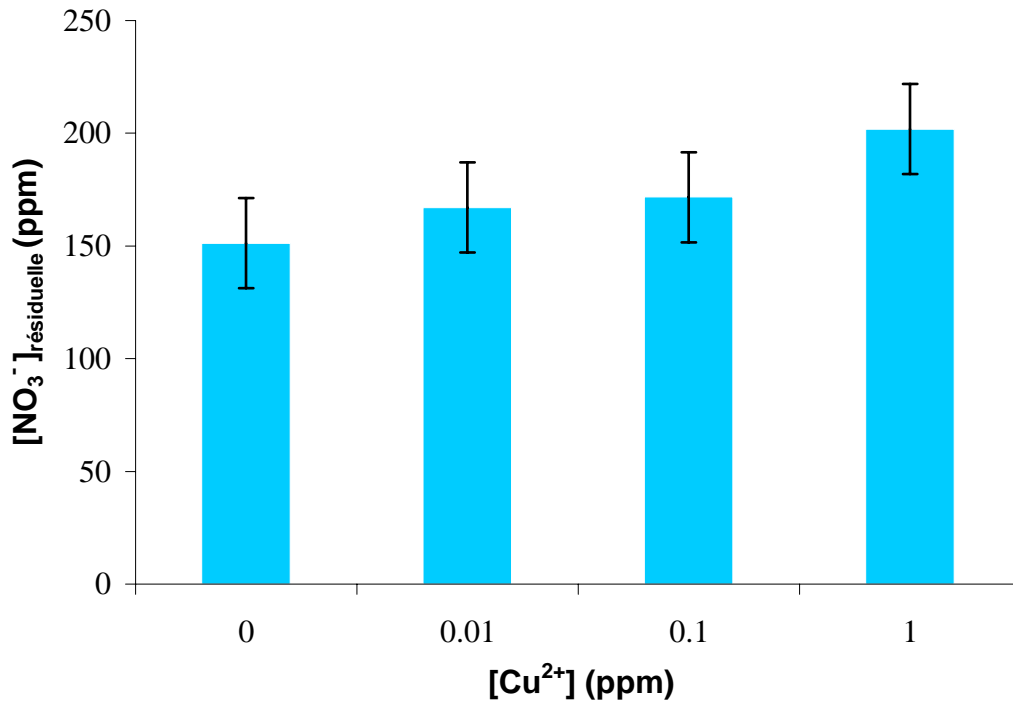


Figure 5.33 : Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de *Lemna gibba* en fonction de la concentration de Cu^{2+} ; $[\text{NO}_3^-] \pm$ Ecart – types, $n = 3$ Durée de l'essai égale à 10 jours.

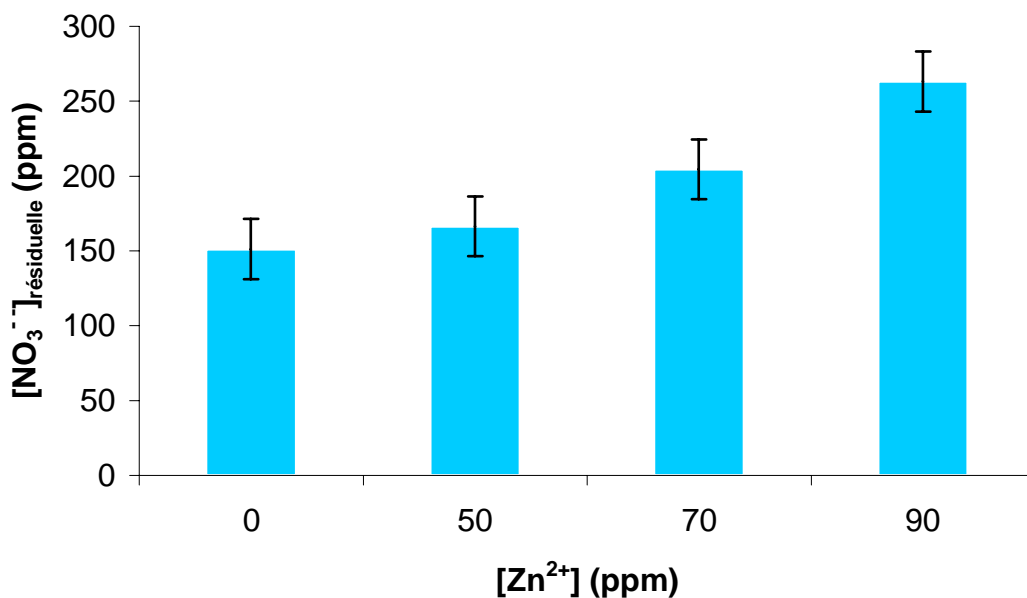


Figure 5.34: Variation des concentrations résiduelle de NO_3^- dans les milieux de culture de *Lemna gibba* en fonction de la concentration de Zn^{2+} ; $[\text{NO}_3^-] \pm$ Ecart – types, $n = 3$ Durée de l'essai égale à 10 jours.

La contamination des milieux de culture de la *Lemna gibba* par 10^{-2} , 10^{-1} et 1(ppm) de Cu^{2+} et pour 50, 70 et 90 ppm de Zinc entraînent à une augmentation significative ($P < 0,05$) des quantités résiduelles de NO_3^- , dans les milieux expérimentaux.

La reproductibilité de l'effet inhibiteur des cations métalliques sur la réaction d'assimilation de NO_3^- par la plante permet de considérer, l'évolution des concentrations de N- NO_3^- résiduelles comme moyen de détermination de la présence toxicité métallique lors des essais réalisés dans une période de 10 jours.

Comme cette étude est une contribution aux recherches qui s'intéressent à la mise au point de bioessais à l'aide de réactifs biologiques et afin d'exprimer ces observations à l'aide de modèles mathématiques pouvant être exploités pour suivre une toxicité métallique dans l'eau nous nous sommes proposés d'établir les modèles suivants qui représentent la quantité de NO_3^- absorbée par la plante en fonction de Cd et Cu.

Dans le cas du zinc, nous n'avons pas obtenu un modèle type polynomiale. Ces modèles peuvent constituer un moyen pour l'estimation des quantités de nitrates absorbées connaissant la concentration du métal dans l'eau et d'en déduire le taux d'inhibition de ce mécanisme.

Tableau 5.4 : Modèles mathématiques exprimant la quantité de nitrates absorbée en fonction des concentrations de Cd, Cu.

	Modèles mathématiques
Cadmium	$y = 353,79 x^2 - 46,601 x + 1,9223$ ($R^2 = 0,98$)
Cuivre	$y = 5,6661x^2 - 6,2872 x + 1,7414$ ($R^2 = 0,69$)

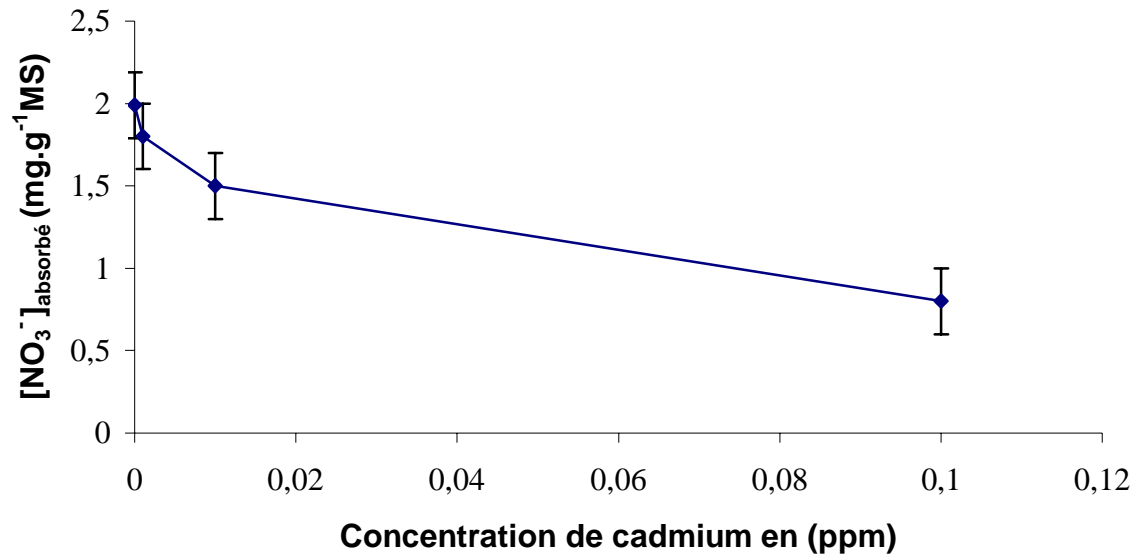


Figure 5.35: Variation des quantités de nitrates absorbé dans la *Lemna gibba* en fonction des différentes concentrations de cadmium, $\text{NO}_3^- \text{ (mg.g}^{-1} \text{ MS)} \pm \text{Ecart-types, } n=3$

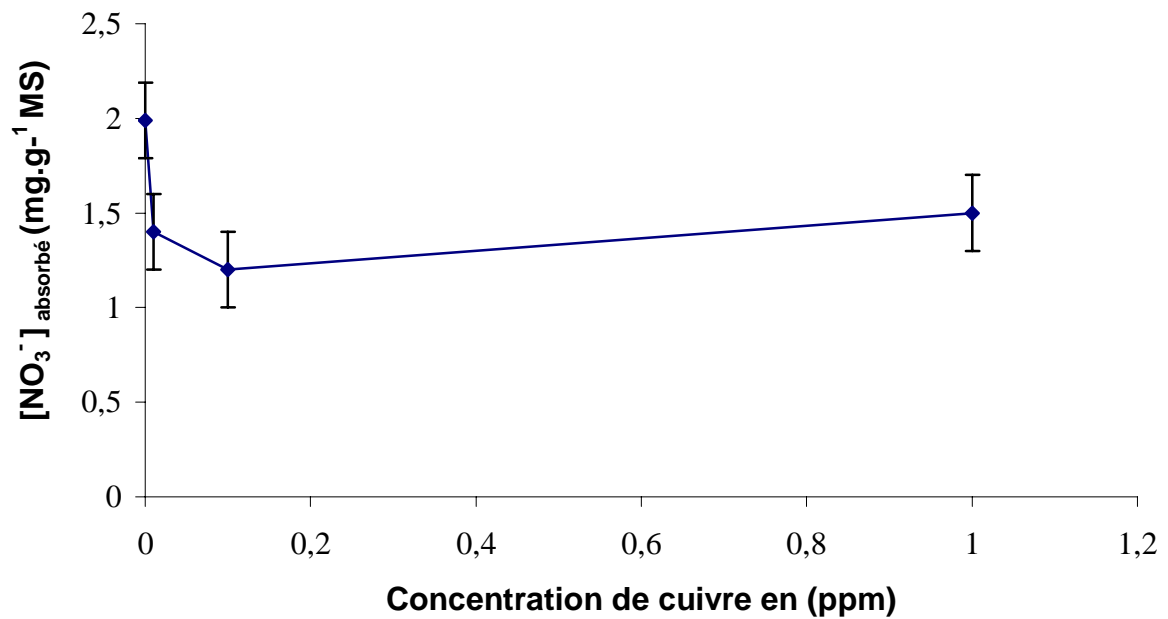


Figure 5.36: Variation des quantités de nitrates absorbé dans la *Lemna gibba* en fonction des différentes concentrations de cuivre, $\text{NO}_3^- \text{ (mg.g}^{-1} \text{ MS)} \pm \text{Ecart-types, } n=3$

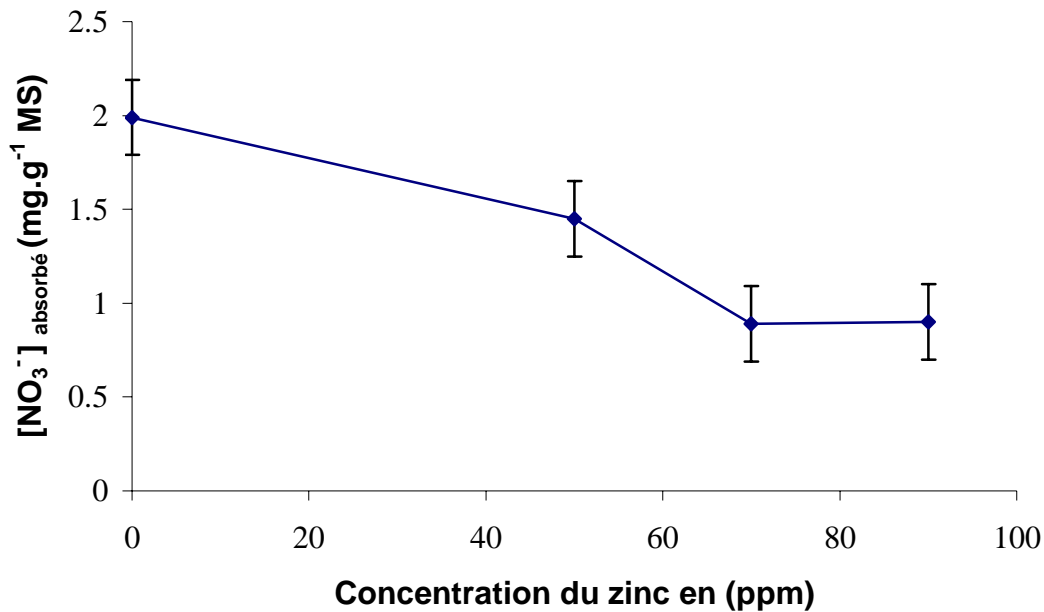


Figure 5.37: Variation des quantités de nitrates absorbé dans la *Lemna gibba* en fonction des différentes concentrations de zinc, NO₃⁻ (mg.g⁻¹ MS) ± Ecart-types, n=3

5.5 Effet de Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ sur la quantité des protéines au niveau de la biomasse Végétale

Les résultats relatifs aux variations des quantités de protéines au niveau de la *Lemna gibba* en présence de Cd²⁺, Cu²⁺ et Zn²⁺ sont illustrés par les figures 38, 39 et 40.

Ces représentations montrent une baisse de la teneur en protéines au niveau du végétal. En effet, ces quantités de protéines chutent respectivement de 62,44 (témoin) à 59,4 ppm quand Cd²⁺ passe de 0 à 10⁻¹ ppm et de 61,49 (témoin) à 50,2 ppm pour Cu²⁺ passant de 0 à 1 ppm et de 60,4 (témoin) à 48,8 ppm lorsque la concentration de Zn²⁺ est de 90 ppm.

Cette baisse de la teneur en protéines est la conséquence du stress causé par la toxicité métallique.

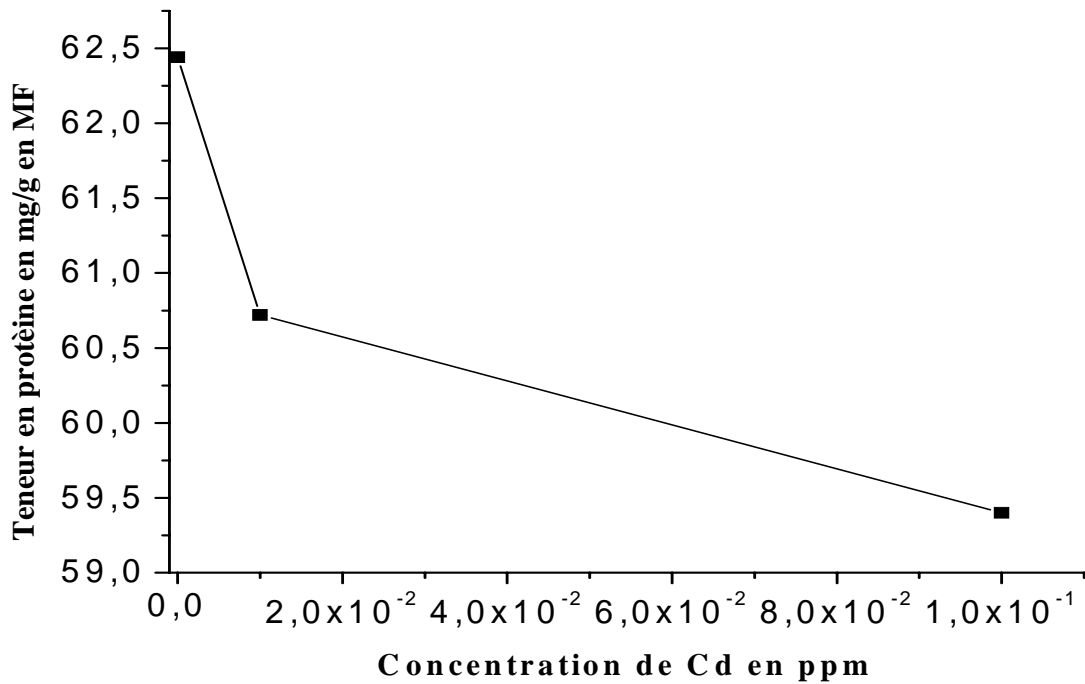


Figure 5.38: Variation de la teneur en protéines dans la *Lemna gibba* en fonction des différentes concentrations de cadmium. Durée de l'essai égale à 10 jours.

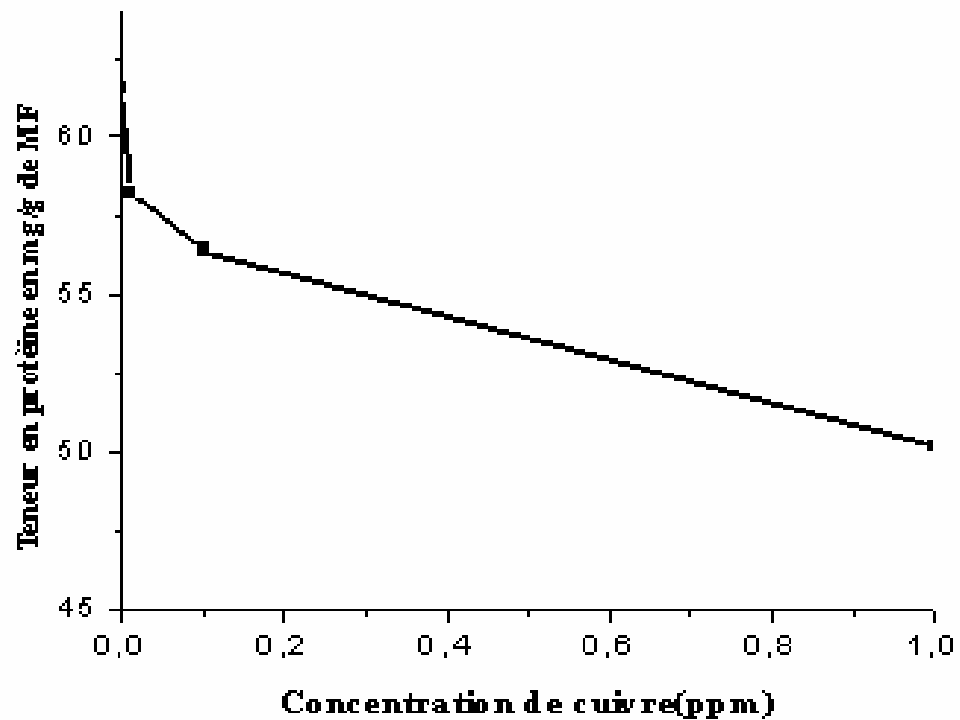


Figure 5.39: Variation de la teneur en protéines dans la *Lemna gibba* en fonction des différentes concentrations de cuivre. Durée de l'essai égale à 10 jours.

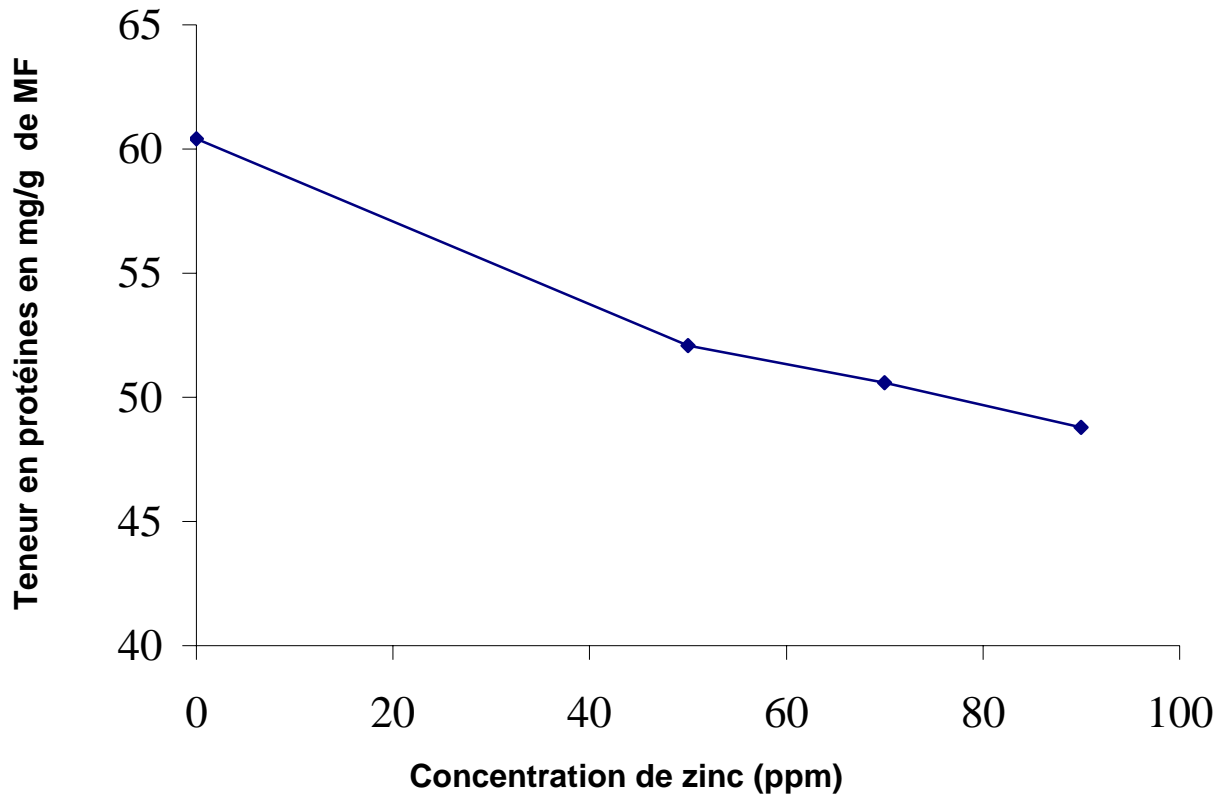


Figure 5.40: Variation de la teneur en protéines dans la *Lemna gibba* en fonction des différentes concentrations de zinc. Durée de l'essai égale à 10 jours.

Nous nous sommes également proposé de déterminer les rapports $[\text{Protéines}] / [\text{NO}_3^-]_{\text{absorbée}}$ afin d'en déduire les perturbations sur le mécanisme de la biosynthèse des protéines suite à l'assimilation des nitrates.

Les résultats obtenus sont mentionnés dans le tableau 5.5.

Tableau 5.5 : Valeurs des rapports de la teneur en protéines dans les plantes sur la quantité des nitrates absorbés exposés à différentes Concentrations en métaux lourds

[Cd ²⁺] (ppm)	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹
Protéines totales/ [NO ₃ ⁻] absorbé (l.g ⁻¹)	0,1479	0,1402	0,1307
[Cu ²⁺] (ppm)	10 ⁻²	10 ⁻¹	1
Protéines totales / [NO ₃ ⁻] absorbé (l.g ⁻¹)	0,1205	0,1179	0,1120
[Zn ²⁺] (ppm)	50	70	90
Protéines totales / [NO ₃ ⁻] absorbé (l.g ⁻¹)	0,1077	0,1135	0,1261

Nous remarquons que pour des essais de durée égale à 10 jours, les rapports Protéines totales / [NO₃⁻] absorbés sont constants pour les différents concentrations de Cd, Cu, Zn et que ces rapports varient entre 0,11 et 0,13 (l.g⁻¹).

Les déterminations qui représentent les proportions de NO₃⁻ transformées en protéines ne donnent pas une indication sur l'influence de la toxicité métallique car l'effet inhibiteur de Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ sur l'absorption de NO₃⁻ est certainement proportionnel à celui de la production des protéines.

Ces évaluations ont été considérées car l'azote assimilé par une plante contribue majoritairement à la synthèse des protéines qui est un mécanisme très important. Par ailleurs les modèles mathématiques obtenus pour exprimer la quantité de protéines formée en fonction des concentrations de Cd, Cu et Zn sont donnés dans le tableau 5.6.

Tableau 5.6 : Modèles mathématiques exprimant la quantité de protéines en fonction des concentrations de Cd, Cu et Zn.

	Modèles mathématiques	
Cadmium	$y = -25,156x^2 + 3,0016 x + 1E-15$	$(R^2 = 0,9)$
Cuivre	$y = -0,5272x^2 + 0,6891 x + 0,0218$	$(R^2 = 0,93)$
Zinc	$y = -1E-05x^2 + 0,0032 x + 0,0006$	$(R^2 = 0,99)$

La comparaison des modèles obtenus est présentée dans les tableaux 5.4 et 5.6 montrent que les coefficients relatifs au cadmium sont nettement très supérieurs à ceux obtenus dans le cas du cuivre.

Comme les coefficients a et b sont soit élevés (cas du Cd) ou moins élevés (cas du Cu) nous ne pouvons donc pas conclure sur le pouvoir toxique le plus élevé d'un des métaux.

Ces modèles constituent un moyen d'estimation d'un effet inhibiteur soit de l'absorption des nitrates soit de la biosynthèse des protéines.

CONCLUSION

L'objectif de ce travail est l'étude de l'influence de Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} sur les échanges unidirectionnels d'azote entre la plante *Lemna gibba* et son milieu de culture.

Les résultats trouvés nous ont conduit à ce qui suit :

- Les différentes associations, en particulier les contaminations algales inhibent la croissance de la *Lemna gibba*. En effet, une stérilisation de la plante avant toute culture s'avère indispensable.
- Les essais sur l'inhibition de la croissance réalisés permettent le classement des métaux par ordre de toxicité décroissante : Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} .
- L'azote total (NTK) est absorbé au cours du temps, l'utilisation de NTK pris sous ses différentes formes toutes associées ne nous permet pas de prédire une inhibition du mécanisme à l'azote total entre la plante et son milieu de culture.
- L'apparition de l'azote N-NO_2 pourrait s'expliquer par la réaction de nitritation.
- L'apparition de l'azote ammoniacal (NH_4^+) après 10 jours d'expériences est liée soit un développement de micro-organismes, ou à une perturbation des métabolismes au niveau de la biomasse végétale. Il ne nous permet pas d'affirmer que NH_4^+ peut être un moyen de contrôle de la qualité de l'eau.
- L'absorption des nitrates (NO_3^-) est relevée dans tous les cas et même en présence de Cd, Cu et Zn.
- La reproductibilité de l'effet inhibiteur des cations métalliques sur la réaction

d'assimilation de NO_3^- par la plante permet de considérer, l'évolution des concentrations de N- NO_3^- résiduelles comme moyen de contrôle de la toxicité métallique pour des essais réalisés dans une période de 10 jours.

- La biosynthèse des protéines est significativement affectée par la présence de Cd, Cu et Zn.
- Les déterminations qui représentent les proportions de NO_3^- transformées en protéines ne donnent pas une indication sur l'influence de la toxicité métallique car l'effet inhibiteur de Cd, Cu, Zn sur l'absorption de NO_3^- est certainement proportionnel à celui de la production des protéines. En effet, nous obtenons des rapports $[\text{Protéines}]/[\text{NO}_3^-]_{\text{absorbée}}$ constants.

PERSPECTIVES

- Vérifier par absorption atomique le taux de fixation des métaux en question par la plante après minéralisation de celle-ci.
- Voir s'il serait possible de sélectionner une souche bactérienne du milieu naturelle où se développe la plante et faire quelques essais dans le même contexte.
- Pour être mieux fixé, il serait indispensable de s'intéresser de très près aux dosage de l'azote dans la plante soumise aux essais de stress.
- Il faudrait penser à étudier l'effet de quelques ions métalliques autres que le cuivre et le zinc (Plomb, l'Arsenic et le Chrome)

APPENDICE A

L'origine et la qualité des produits chimiques utilisés dans les manipulations expérimentales sont données dans le tableau 1 :

Tableau 1 : Caractéristiques (origine et qualité) des différents produits chimiques utilisés

Solutions	(g.L ⁻¹)	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) : $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	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_3	2,86	Panreac	98
Sulfate de manganèse : $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,55	QUIMICA SA	99,8
Sulfate de zinc : $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22	Panreac	>98
Sulfate de cuivre: $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,079	QUIMICA SA Merck Nen Tech LTD	98
Solution (S₇)			
$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$	0,128	Panreac	99
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,229	QUIMICA SA	99
$\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,049	Fluka	98,9
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0478	CHEMIKA	99
	0,017	Gmbh Bolab Normapur PROLABO Rudi pont	99

APPENDICE B

COURBES D'ETALONNAGE

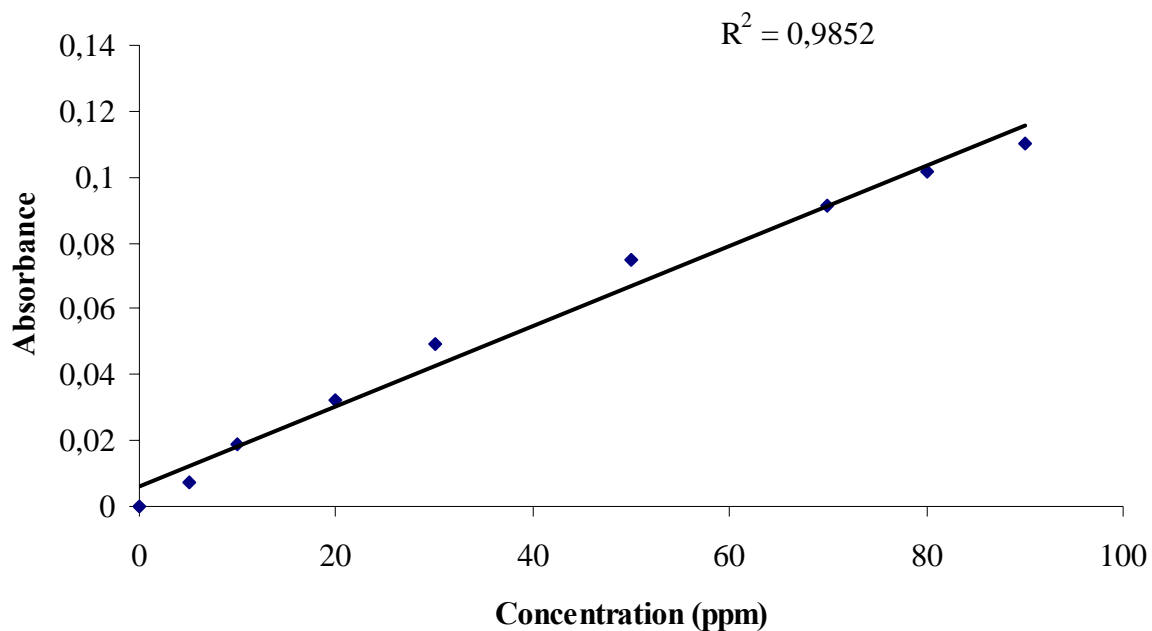


Figure B.1 : Courbe d'étalonnage des nitrates

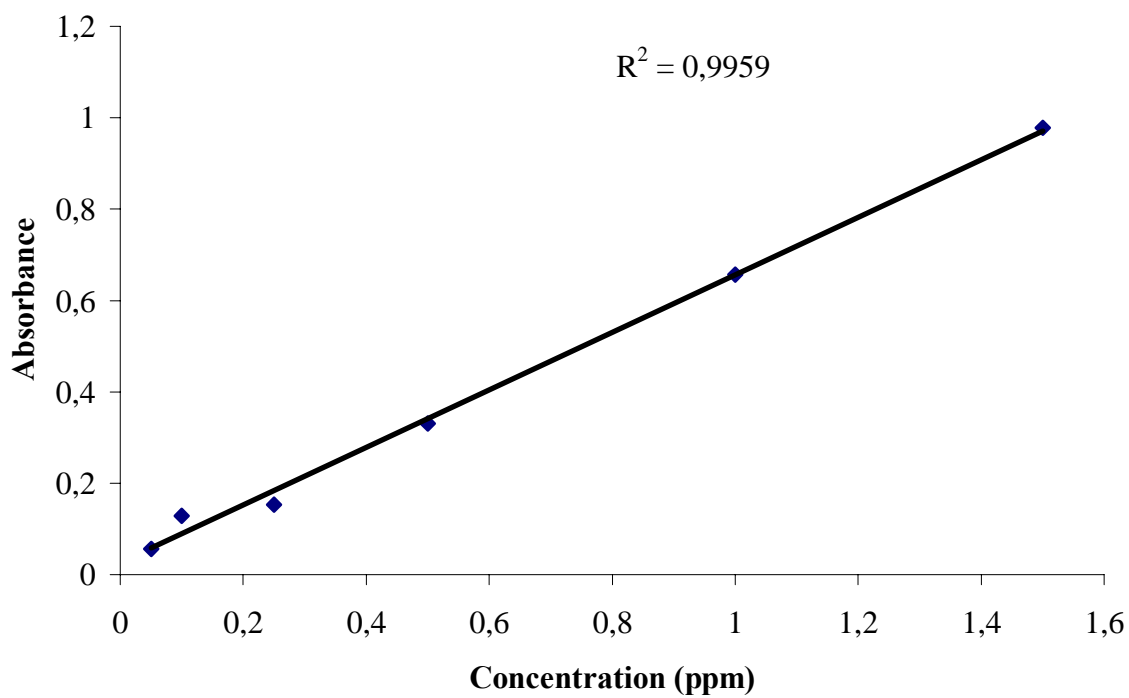


Figure B.2 : Courbe d'étalonnage de l'azote ammoniacal

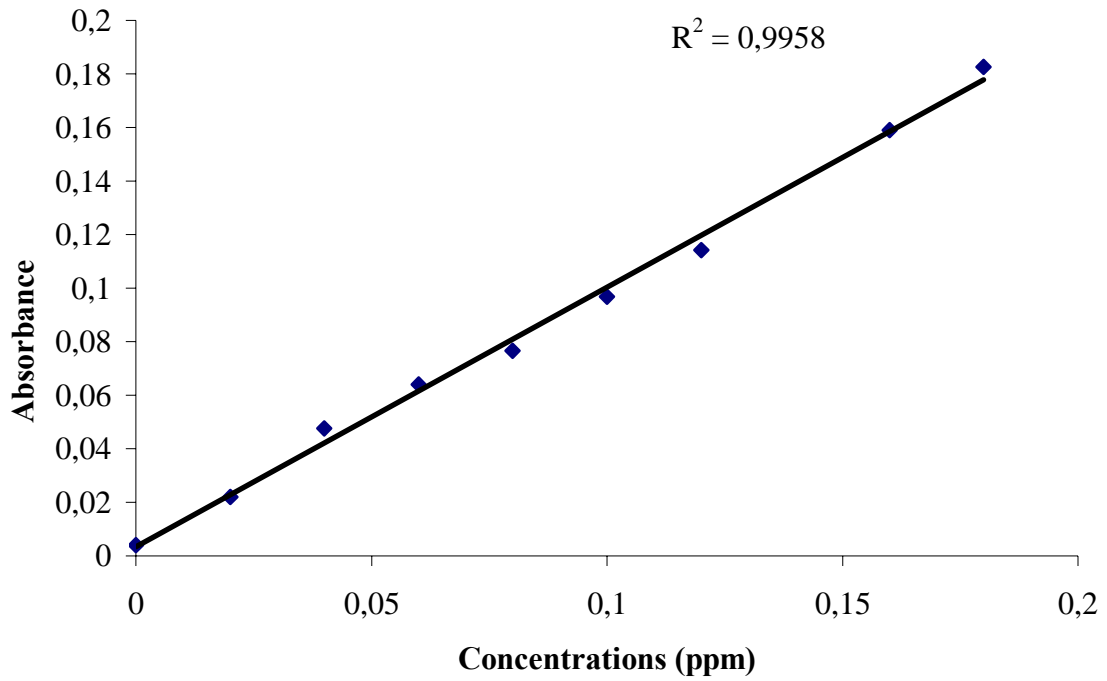


Figure B.3 : Courbe d'étalonnage des nitrites

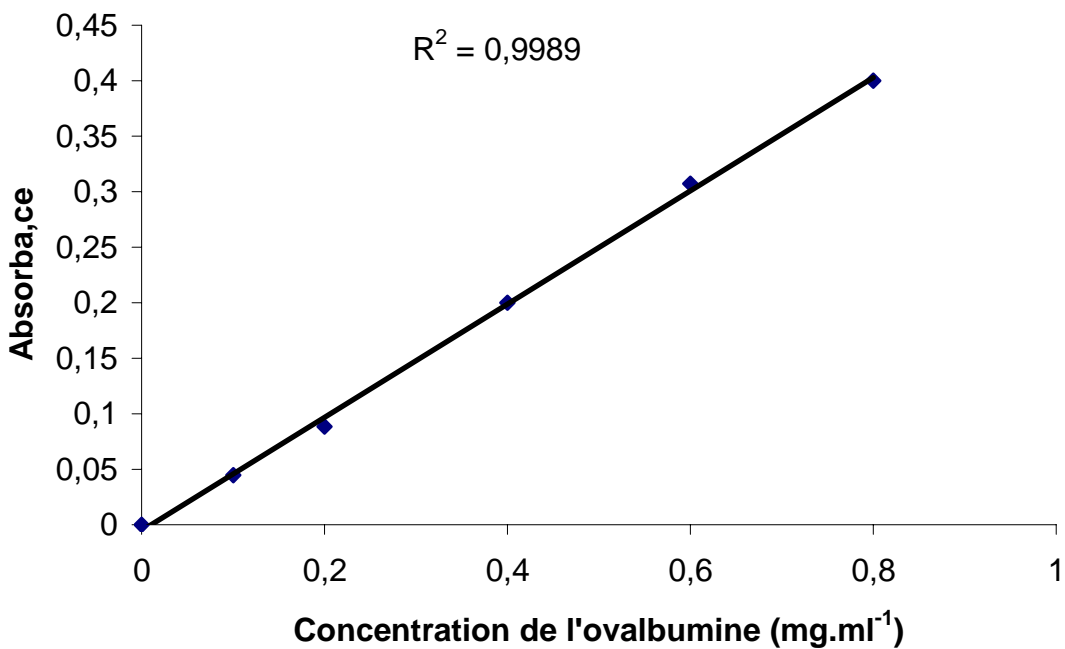


Figure B. 4 : Courbe d'étalonnage des protéines totales

APPENDICE C

Tableau 1 : Quantités des différentes formes d'azote contenues dans le milieu de culture, les écarts-types : Cas du cadmium

[Cd ²⁺]	Témoïn	10 ⁻³ ppm	10 ⁻² ppm	10 ⁻¹ ppm
m ± E.T(2j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	309 ± 0,66	237,52 ± 11,31	227,5 ± 10,61	204,63 ± 3,41
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,0290± 0,0014	0,0064± 0,001	0,0084± 0,0015	0,006± 0,0002
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,0087± 0,00	0,022±0,00	0,042±0,00	0,037± 0,00
N-total g.g⁻¹ (M.S)	56±0,00	86 ± 0,0023	100 ± 0,0011	67 ± 0,00063
m ± E.T(4j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	294±15,65	181 ± 15,82	169,30±6,16	169,58 ± 1,83
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,0296±0,0013	0,0217±0,0049	0,0237±0,0049	0,0233±0,0076
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,0460±0,0065	0,039±0,0026	0,058±0,0215	0,0509±0,079
N-total g.g⁻¹ (M.S)	45 ± 0,00	78 ± 0,00069	67 ± 0,0011	60 ± 0,00
m ± E.T(6j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	221,6 ± 6,08	184 ± 33,82	185 ±12,70	190 ± 8,5
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,0274±0,0057	0,0157±0,0060	0,0143±0,0050	0,0419±0,0013
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,0730±0,0055	0,036±0,0002	0,0013±0,02	0,045±0,00
N-total g.g⁻¹ (M.S)	56 ± 0,00	67 ± 0,0011	60 ± 0,0016	56 ± 0,0011
m ± E.T(8j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	248,55±39,29	203,75±3,71	200,11 ±15,66	165,69 ±19,46
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,0275±0,017	0,0170±0,0018	0,0178±0,0036	0,0184±0,0060
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,0565±0,0328	0,0042±0,00	0,0042±0,00	0,0316±0,00
N-total g.g⁻¹ (M.S)	56 ± 0,00	63 ± 0,0012	52 ± 0,00063	56 ± 0,00
m ± E.T(10j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	151,2 ±19,48	212,8 ± 6,91	217,11 ±1,21	195,66 ± 8,87
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,0274±0,00074	0,0301±0,0073	0,0206±0,0076	0,0203± 0,002
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,0044±0,00	0,0042±0,00	0,0060±0,0018	0,0044±0,00
N-total g.g⁻¹ (M.S)	45 ± 0,00	56 ± 0,00	45 ± 0,00	52 ± 0,0022

m ± E.T : quantités des différentes forme d'azote contenues dans le milieu de culture, les écarts-types.

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

M.S : matière sèche

Tableau 2 : Quantités des différentes formes d'azote contenues dans le milieu de culture, les écarts-types : Cas du cuivre

[Cu ²⁺]	Témoin	10 ⁻² ppm	10 ⁻¹ ppm	1 ppm
m ± E.T(2j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	309 ± 0,66	200,23± 0,00	200,27± 3,15	201,14 ± 6,67
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,029± 0,00	0,013± ,0047	0,006± 0,00	0,0062± ,004
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,008± 0,00	0,002± 0,00	0,017± 0,009	0,038± 0,00
N-total g.g⁻¹ (M.S)	56 ± 0,00	82 ± 0,0006	78 ± 0,00	90 ± 0,00
m ± E.T(4j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	294 ± 15,65	180 ± 0,00	141,41± 2,17	146,94±15,29
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,029± 0,00	0,012± 0,0026	0,011± 0,00	0,011± 0,005
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,046± 0,006	0,0006± 0,00	0,057± 0,008	0,054± 0,006
N-total g.g⁻¹ (M.S)	45 ± 0,00	75 ± 0,0017	67 ± 0,0019	78 ± 0,00
m ± E.T(6j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	221,6 ± 6,08	137 ± 0,00	144,44± 6,39	124 ± 15,89
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,0274± 0,00	0,069± 0,0036	0,0143± 0,00	0,0136± ,032
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,073± 0,005	0,0237±0 ,015	0,010± 0,00	0,0262±0,018
N-total g.g⁻¹ (M.S)	56 ± 0,00	75 ± 0,0017	67± 0,0019	67 ± 0,00
m ± E.T(8j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	248,55± 39,29	108 ± 0,00	142,27± 4,14	182,19 ± 1,83
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,0275±0 ,003	0,0612± ,0015	0,0128± 0,00	0,0205±0,029
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,056± 0,032	0,0074±0,0039	0,0054± 0,00	0,029± 0,008
N-total g.g⁻¹ (M.S)	56 ± 0,00	49 ± 0,0006	52 ± 0,0006	63 ± 0,0012
m ± E.T(10j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	151,2 ± 19,48	167 ± 0,00	171,69± 7,12	201,83 ± 1,25
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,027± 0,0009	0,0138± ,0026	0,0201± 0,00	0,0202±0,011
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,0044± 0,00	0,0028± 0,00	0,0003± 0,00	0,0052± 0,013
N-total g.g⁻¹ (M.S)	45 ± 0,00	22 ± 0,00	38 ± 0,0006	52 ± 0,0006

m ± E.T : quantités des différentes forme d'azote contenues dans le milieu de culture, les écarts-types.

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

M.S : matière sèche

Tableau 3 : Quantités des différentes formes d'azote contenues dans le milieu de culture, les écarts-types : Cas du zinc

[Zn ²⁺]	Témoin	50 (ppm)	70 (ppm)	90 (ppm)
m ± E.T(2j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	309 ± 0,66	208,11± 1,26	229,94± 4,99	241,33 ± 3,76
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,029± 0,0014	0,0051±0,0009	0,0064 ± ,0015	0,006 ± ,0018
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,008± 0,00	0,025± 0,013	0,0427 ± 0,008	0,054± ,0006
N-total g.g⁻¹ (M.S)	56 ± 0,00	68 ± 0,00	56 ± 0,00	45 ± 0,00
m ± E.T(4j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	294 ± 15,65	173 ± 3,73	170 ± 1,04	169 ± 7,48
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,029± 0,0013	0,0053± 0,003	0,0045 ± ,0012	0,005 ± ,0005
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,046± 0,065	0,0262±0,0016	0,0258 ± 0,0035	0,029 ± 0,006
N-total g.g⁻¹ (M.S)	45 ± 0,00	67 ± 0,00	45 ± 0,00	34 ± 0,00
m ± E.T(6j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	221,6 ± 6,08	120 ± 8,97	129 ± 3,22	180 ± 3,84
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,027± 0,0057	0,007± 0,0004	0,0079 ± ,0026	0,007± 0,001
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,073± 0,0055	0,03± 0,0027	0,0276 ± 0,00	0,012± 0,004
N-total g.g⁻¹ (M.S)	56 ± 0,00	56 ± 0,00	45 ± 0,00	34 ± 0,00
m ± E.T(8j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	248,55 ± 39,29	167 ± 27,18	137 ± 22,33	157 ± 17,92
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,027± 0,017	0,012± 0,0023	0,0102 ±0,0008	0,012 ± 0,002
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,056± 0,0328	0,048± 0,00	0,092± 0,0062	0,049± 0,0013
N-total g.g⁻¹ (M.S)	56 ± 0,00	56 ± 0,00	34 ± 0,00	34 ± 0,00
m ± E.T(10j)				
[NO ₃ ⁻] mg.l ⁻¹	151,2 ± 19,48	166,27± 3,31	204,5 ± 1,62	263,14 ± 9,64
[NO ₂ ⁻] mg.l ⁻¹	0,0274± 0,0007	0,014± 0,0052	0,013± 0,0013	0,015± 0,0006
[NH ₄ ⁺] mg.l ⁻¹	0,0044± 0,00	0,047± 0,018	0,011± 0,0038	0,053± 0,0033
N-total g.g⁻¹ (M.S)	45 ± 0,00	34 ± 0,00	22 ± 0,00	22 ± 0,00

m ± E.T : quantités des différentes forme d'azote contenues dans le milieu de culture, les écarts-types.

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

M.S : matière sèche

APPENDICE D

Tableau 1 : Quantités des nitrates résiduelles, les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05) : Cas du cadmium

[Cd²⁺]	Témoin	10⁻³ (ppm)	10⁻² (ppm)	10⁻¹ (ppm)
m ± E.T (0j)	650 ± 20	650 ± 20	650 ± 20	650 ± 20
pH à 0 jours	6,5	6,66	6,8	6,8
% d'inhibition	0	0	0	0
m ± E.T (2j)	309 ± 0,66	237,52 ± 11,31	227,5 ± 10,61	204,63 ± 3,41
pH à 2 jours	5,6	6,9	6,9	6,9
% d'inhibition	0	21,4	21,4	28,5
m ± E.T (4j)	294 ± 15,6	181 ± 15,82	169,3 ± 6,16	169,58 ± 1,83
pH à 4 jours	6,86	7	7,04	7,01
% d'inhibition	0	0	0	30,7
m ± E.T (6j)	221,61 ± 6,08	184 ± 33,82	185 ± 12,70	190 ± 8,5
pH à 6 jours	6,76	7,01	7,3	7,4
% d'inhibition	0	13,3	26,6	46,6
m ± E.T (8j)	248,5 ± 39,29	203,75 ± 3,71	200,11 ± 15,66	165,69 ± 19,46
pH à 8 jours	6,27	7,27	7,5	7,29
% d'inhibition	0	42,1	47,3	57,8
m ± E.T (10j)	151,2 ± 19,48	212,8 ± 6,91	217,11 ± 1,21	195,66 ± 8,87
pH à 10 jours	6,28	7,03	7,28	7,01
% d'inhibition	0	45,4	63,6	90,9

m ± E.T : quantités de nitrates résiduelles en (ppm) et les écarts types correspondant

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

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

Tableau 2 : Quantités des nitrites, contenus dans les milieux de culture, les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05) :
Cas du cadmium

[Cd²⁺]	Témoin	10⁻³ (ppm)	10⁻² (ppm)	10⁻¹ (ppm)
m ± E.T (0j) pH à 0(jour) % d'inhibition	0,00 ± 0,00 6,5 0	0,00 ± 0,00 6,66 0	0,00 ± 0,00 6,8 0	0,00 ± 0,00 6,8 0
m ± E.T (2j) pH à 2 (jours) % d'inhibition	0,0290 ± 0,0014 5,6 0	0,0064 ± 0,0014 6,9 21,4	0,0084 ± 0,0015 6,9 21,4	0,0061 ± 0,0002 6,9 28,5
m ± E.T (4j) pH à 4 (jours) % d'inhibition	0,0296 ± 0,0013 6,86 0	0,0217 ± 0,0049 7 0	0,0237 ± 0,0049 7,04 0	0,0233 ± 0,0076 7,01 30,7
m ± E.T (6j) pH à 6 (jours) % d'inhibition	0,0274 ± 0,0057 6,76 0	0,0157 ± 0,0060 7,01 13,3	0,0143 ± 0,0050 7,3 26,6	0,0419 ± 0,0013 7,4 46,6
m ± E.T (8j) pH à 8 (jours) % d'inhibition	0,0275 ± 0,0017 6,27 0	0,0170 ± 0,0018 7,27 42,1	0,0178 ± 0,0036 7,5 47,3	0,0184 ± 0,0060 7,29 57,8
m ± E.T (10j) pH à 10 (jours) % d'inhibition	0,0274 ± 0,0007 6,28 0	0,0301 ± 0,0073 7,03 45,4	0,0206 ± 0,0076 7,28 63,6	0,0203 ± 0,0022 7,01 90,9

m ± E.T : quantités de nitrites contenus dans les milieux de culture en (ppm) et les écart types correspondant.

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

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

Tableau 3 : Quantités d'azote total (% NTK) contenues dans les milieux de culture, les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05): cas du cadmium.

[Cd ²⁺]	Témoin	10 ⁻³ g.g ⁻¹ (M.S)	10 ⁻² g.g ⁻¹ (M.S)	10 ⁻¹ g.g ⁻¹ (M.S)
m ± E.T (0j)	56 ± 0,00	34 ± 0,00	34 ± 0,00	34 ± 0,00
pH à 0 (jour)	6,5	6,66	6,8	6,8
% d'inhibition	0	0	0	0
m ± E.T (2j)	56 ± 0,00	86 ± 0,0023	100 ± 0,001	67 ± 0,0006
pH à 2 (jours)	5,6	6,9	6,9	6,9
% d'inhibition	0	21,4	21,4	28,5
m ± E.T (4j)	45 ± 0,00	78 ± 0,0007	67 ± 0,001	60 ± 0,00
pH à 4 (jours)	6,86	7	7,04	7,01
% d'inhibition	0	0	0	30,7
m ± E.T (6j)	56 ± 0,00	67 ± 0,001	60 ± 0,0016	56 ± 0,001
pH à 6 (jours)	6,76	7,01	7,3	7,4
% d'inhibition	0	13,3	26,6	46,6
m ± E.T (8j)	56 ± 0,00	63 ± 0,0012	52 ± 0,00063	56 ± 0,00
pH à 8 (jours)	6,27	7,27	7,5	7,29
% d'inhibition	0	42,1	47,3	57,8
m ± E.T (10j)	45 ± 0,00	56 ± 0,00	45 ± 0,00	52 ± 0,002
pH à 10(jours)	6,28	7,03	7,28	7,01
% d'inhibition	0	45,4	63,6	90,9

m ± E.T : quantités d'azote total (% NTK) contenues dans les milieux de culture et les écart types correspondant

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

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

Tableau 4: Quantités d'ammonium contenus dans le milieu de culture: les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à 0,05 :
Cas du cadmium

[Cd ²⁺]	Témoin	10 ⁻³ (ppm)	10 ⁻² (ppm)	10 ⁻¹ (ppm)
m ± E.T (0j) pH à 0 (jour) % d'inhibition	0,00 ± 0,00 6,5 0	0,00 ± 0,00 6,66 0	0,00 ± 0,00 6,8 0	0,00 ± 0,00 6,8 0
m ± E.T (2j) pH à 2 (jours) % d'inhibition	0,0087 ± 0,00 5,6 0	0,022 ± 0,00 6,9 21,4	0,042 ± 0,00 6,9 21,4	0,037 ± 0,00 6,9 28,5
m ± E.T (4j) pH à 4 (jours) % d'inhibition	0,046 ± 0,006 6,86 0	0,039 ± 0,0026 7 0	0,058 ± 0,021 7,04 0	0,0509 ± 0,079 7,01 30,7
m ± E.T (6j) pH à 6 (jours) % d'inhibition	0,073 ± 0,005 6,76 0	0,036 ± 0,0002 7,01 13,3	0,0013 ± 0,02 7,3 26,6	0,045 ± 0,00 7,4 46,6
m ± E.T (8j) pH à 8 (jours) % d'inhibition	0,056 ± 0,032 6,27	0,0042 ± 0,00 7,27 42,1	0,0042 ± 0,00 7,5 47,3	0,0316 ± 0,00 7,29 57,8
m ± E.T (10j) pH à 10(jours) % d'inhibition	0,0044 ± 0,00 6,28 0	0,0042 ± 0,00 7,03 45,4	0,006 ± 0,0018 7,28 63,6	0,0044 ± 0,00 7,01 90,9

m ± E.T : quantités d'ammonium contenus dans les milieux de culture en (ppm) et les écart types correspondant

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

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

Tableau 5: Quantités des nitrates résiduelles, les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05) : Cas du cuivre

[Cu ²⁺]	Témoin	10 ⁻² (ppm)	10 ⁻¹ (ppm)	1 (ppm)
m ± E.T (0j)	650 ± 20	650 ± 20	650 ± 20	650 ± 20
pH à 0 jours	6,5	6,1	6,5	6,6
% d'inhibition	0	0	0	0
m ± E.T (2j)	309 ± 0,66	200,23 ± 0,00	200,27 ± 33,15	201,14 ± 6,67
pH à 2 jours	5,6	5,6	7,04	6,9
% d'inhibition	0	0	8,3	16,6
m ± E.T (4j)	294 ± 15,6	180 ± 0,00	141,41 ± 2,17	146,94 ± 15,29
pH à 4 jours	6,86	7,02	7,1	7
% d'inhibition		26,6	20	60
m ± E.T (6j)	221,61 ± 6,08	137 ± 0,00	144,44 ± 6,39	124 ± 15,89
pH à 6 jours	6,76	7	6,6	7,01
% d'inhibition	0	28,5	21,4	100
m ± E.T (8j)	248,5 ± 39,29	108 ± 0,00	142,27 ± 4,14	182,19 ± 1,83
pH à 8 jours	6,27	7,01	6,6	7,27
% d'inhibition	0	57,1	64,2	100
m ± E.T (10j)	151,2 ± 19,48	167 ± 0,00	171,69 ± 7,12	201,83 ± 1,25
pH à 10 jours	6,28	6,6	7,2	7,23
% d'inhibition	0	71,4	71,4	100

m ± E.T : quantités de nitrates résiduelles en (ppm) et les écarts types correspondant

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

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

Tableau 6 : Quantités des nitrites contenus dans les milieux de culture: les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05) : cas du cuivre

[Cu ²⁺]	Témoin	10 ⁻² (ppm)	10 ⁻¹ (ppm)	1 (ppm)
m ± E.T (0j) pH à 0 (jour) % d'inhibition	0,00 ± 0,00 6,5 0	0,00 ± 0,00 6,1 0	0,00 ± 0,00 6,5 0	0,00 ± 0,00 6,6 0
m ± E.T (2j) pH à 2 (jours) % d'inhibition	0,0290 ± 0,00 5,6 0	0,0137 ± 0,0047 5,6 0	0,0062 ± 0,00 7,04 8,3	0,0062 ± 0,0048 6,9 16,6
m ± E.T (4j) pH à 4 (jours) % d'inhibition	0,0296 ± 0,00 6,86 0	0,0126 ± 0,0026 7,02 26,6	0,0119 ± 0,00 7,1 20	0,0113 ± 0,0057 7 60
m ± E.T (6j) pH à 6 (jours) % d'inhibition	0,0274 ± 0,00 6,76 0	0,0693 ± 0,0036 7 28,5	0,0143 ± 0,00 6,6 21,4	0,0136 ± 0,032 7,01 100
m ± E.T (8j) pH à 8 (jours) % d'inhibition	0,0275 ± 0,0031 6,27 0	0,0612 ± 0,0015 7,01 57,1	0,0128 ± 0,00 6,6 64,2	0,0205 ± 0,029 7,27 100
m ± E.T (10j) pH à 10 (jours) % d'inhibition	0,0274 ± 0,0009 6,28 0	0,0138 ± 0,0026 6,6 71,4	0,0201 ± 0,00 7,2 71,4	0,0202 ± 0,011 7,23 100

m ± E.T : quantités de nitrites contenus dans les milieux de culture en (ppm) et les écart types correspondant.

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

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

Tableau 7 : Quantités d'azote total (% NTK) contenues dans les milieux de culture: les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05):
cas du cuivre

[Cu ²⁺]	Témoin	10 ⁻² g.g ⁻¹ (M.S)	10 ⁻¹ g.g ⁻¹ (M.S)	1 g.g ⁻¹ (M.S)
m ± E.T (0j)	56 ± 0,00	56 ± 0,00	56 ± 0,00	22 ± 0,00
pH à 0 (jour)	6,5	6,1	6,5	6,6
% d'inhibition	0	0	0	0
m ± E.T (2j)	56 ± 0,00	82 ± 0,0006	78 ± 0,00	90 ± 0,00
pH à 2 (jours)	5,6	5,6	7,04	6,9
% d'inhibition	0	0	8,3	16,6
m ± E.T (4j)	45 ± 0,00	75 ± 0,0017	67 ± 0,0019	78 ± 0,00
pH à 4 (jours)	6,86	7,02	7,1	7
% d'inhibition	0	26,6	20	60
m ± E.T (6j)	56±0,00	75 ± 0,0017	67 ± 0,0019	67 ± 0,00
pH à 6 (jours)	6,76	7,	6,6	7,01
% d'inhibition	0	28,5	21,4	100
m ± E.T (8j)	56 ± 0,00	49 ± 0,00063	52 ± 0,00063	63 ± 0,0012
pH à 8 (jours)	6,27	7,01	6,6	7,27
% d'inhibition	0	57,1	64,2	100
m ± E.T (10j)	45 ± 0,00	22 ± 0,00	38 ± 0,00063	52 ± 0,00063
pH à 10(jours)	6,28	6,6	7,2	7,23
% d'inhibition	0	71,4	71,4	100

m ± E.T : quantités d'azote total (% NTK) contenues dans les milieux de culture et les écart types correspondant.

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

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

Tableau 8 : Quantités d'ammonium contenus dans les milieux de culture: les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05) : cas du cuivre

[Cu ²⁺]	Témoin	10 ⁻² (ppm)	10 ⁻¹ (ppm)	1 (ppm)
m ± E.T (0j) pH à 0 (jour) % d'inhibition	0,00 ± 0,00 6,5 0	0,00 ± 0,00 6,1 0	0,00 ± 0,00 6,5 0	0,00 ± 0,00 6,6 0
m ± E.T (2j) pH à 2 (jours) % d'inhibition	0,008 ± 0,00 5,6 0	0,002 ± 0,00 5,6 0	0,017 ± 0,009 7,04 8,3	0,038 ± 0,00 6,9 16,6
m ± E.T (4j) pH à 4 (jours) % d'inhibition	0,046 ± 0,006 6,86 0	0,0006 ± 0,00 7,02 26,6	0,057 ± 0,008 7,1 20	0,054 ± 0,006 7 60
m ± E.T (6j) pH à 6 (jours) % d'inhibition	0,073 ± 0,005 6,76 0	0,0237 ± 0,015 7 28,5	0,010 ± 0,00 6,6 21,4	0,0262 ± 0,018 7,01 100
m ± E.T (8j) pH à 8 (jours) % d'inhibition	0,056 ± 0,032 6,27 0	0,0074 ± 0,0039 7,01 57,1	0,0054 ± 0,00 6,6 64,2	0,029 ± 0,008 7,27 100
m ± E.T (10j) pH à 10(jours) % d'inhibition	0,0044 ± 0,00 6,28 0	0,0028 ± 0,00 6,6 71,4	0,00031 ± 0,00 7,2 71,4	0,0052 ± 0,013 7,23 100

m ± E.T : quantités d'ammonium contenus dans les milieux de culture en (ppm) et les écart types correspondant

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

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

Tableau 9 : Quantités des nitrates résiduelles, les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05) : Cas du zinc

Zn²⁺	Témoin	50 (ppm)	70 (ppm)	90 (ppm)
m ± E.T (0j)	650 ± 20	650 ± 20	650 ± 20	650 ± 20
pH à 0 (jour)	6,5	6,73	6,95	6,74
% d'inhibition	0	0	0	0
m ± E.T (2j)	309 ± 0,66	208,11±1,26	229,94 ± 4,99	241,33±3,76
pH à 2 (jours)	5,6	7,06	7	6,76
% d'inhibition	0	0	16,6	8,3
m ± E.T (4j)	294 ± 15,6	173 ± 3,73	170 ± 1,04	169 ± 7,48
pH à 4 (jours)	6,86	6,8	6,82	6,86
% d'inhibition	0	21,4	21,4	14,2
m ± E.T (6j)	221,61 ± 6,08	120 ± 8,97	129 ± 3,22	180 ± 3,84
pH à 6 (jours)	6,76	6,68	7	6,72
% d'inhibition	0	40	46,4	53,3
m ± E.T (8j)	248,5 ± 39,29	167 ± 27,18	137 ± 22,33	157 ± 17,92
pH à 8 (jours)	6,27	6,63	6,85	6,89
% d'inhibition	0	33,3	50	50
m ± E.T (10j)	151,2 ± 19,48	166,27±3,31	204,5 ± 1,62	263,14 ± 9,64
pH à 10 jours)	6,28	6,86	7	6,97
% d'inhibition	0	45,4	63,6	72,2

m ± E.T : quantités de nitrates résiduelles en (ppm) et les écarts types correspondant.

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

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

Tableau 10 : Quantités des nitrites contenus dans les milieux de culture:
les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05) :
cas du zinc

[Zn ²⁺]	Témoin	50 (ppm)	70 (ppm)	90 (ppm)
m ± E.T (0j) pH à 0(jour) % d'inhibition	0,00 ± 0,00 6,5 0	0,00 ± 0,00 6,73 0	0,00 ± 0,00 6,95 0	0,00 ± 0,00 6,74 0
m ± E.T (2j) pH à 2(jours) % d'inhibition	0,029 ± 0,0014 5,6 0	0,0051 ± 0,0009 7,06 0	0,0064 ± 0,0015 7 16,6	0,0067 ± 0,0018 6,76 8,3
m ± E.T (4j) pH à 4 (jours) % d'inhibition	0,0296 ± 0,0013 6,86 0	0,0053 ± 0,003 6,8 21,4	0,0045 ± 0,0012 6,82 21,4	0,0056 ± 0,0005 6,86 14,2
m ± E.T (6j) pH à 6(jours) % d'inhibition	0,027 ± 0,0057 6,76 0	0,007 ± 0,0004 6,68 40	0,0079 ± 0,0026 7 46,4	0,0076 ± 0,0012 6,72 53,3
m ± E.T (8j) pH à 8(jours) % d'inhibition	0,0275 ± 0,017 6,27 0	0,012 ± 0,0023 6,63 33,3	0,0102 ± 0,0008 6,85 50	0,012 ± 0,0022 6,89 50
m ± E.T (10j) pH à 10(jours) % d'inhibition	0,0274 ± 0,0007 6,28 0	0,014 ± 0,0052 6,83 45,4	0,0138 ± 0,0013 7 63,6	0,015 ± 0,00063 6,97 72,2

m ± E.T : quantités de nitrites contenus dans les milieux de culture en (ppm) et les écart types correspondant

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

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

Tableau 11 : Quantités d'ammonium contenus dans les milieux de culture:
les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05) :
cas du zinc

[Zn ²⁺]	Témoin	50 (ppm)	70 (ppm)	90 (ppm)
m ± E.T (0j) pH à 0(jour) % d'inhibition	0,00 ± 0,00 6,5 0	0,00 ± 0,00 6,73 0	0,00 ± 0,00 6,95 0	0,00 ± 0,00 6,74 0
m ± E.T (2j) pH à 2(jours) % d'inhibition	0,008 ± 0,00 5,6 0	0,025 ± 0,013 7,06 0	0,0427 ± 0,008 7 16,6	0,054 ± 0,0006 6,76 8,3
m ± E.T (4j) pH à 4 (jours) % d'inhibition	0,046 ± 0,065 6,86	0,026 ± 0,0016 6,8 21,4	0,0258 ± 0,003 6,82 21,4	0,029 ± 0,006 6,86 14,2
m ± E.T (6j) pH à 6(jours) % d'inhibition	0,073 ± 0,005 6,76 0	0,030 ± 0,0027 6,68 40	0,0276 ± 0,00 7 46,4	0,012 ± 0,0043 6,72 53,3
m ± E.T (8j) pH à 8(jours) % d'inhibition	0,056 ± 0,032 6,27 0	0,048 ± 0,00 6,63 33,3	0,092 ± 0,006 6,85 50	0,049 ± 0,0013 6,89 50
m ± E.T (10j) pH à 10(jours) % d'inhibition	0,0044 ± 0,00 6,28 0	0,047 ± 0,018 6,83 45,4	0,011 ± 0,0038 7 63,6	0,053 ± 0,003 6,97 72,2

m ± E.T : quantités d'ammonium contenus dans les milieux de culture en (ppm)
et les écart types correspondant.

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

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

Tableau 12 : Quantités d'azote total (% NTK) contenues dans les milieux de culture:
les écarts-types, taux d'inhibition et le test significatif à (0,05):
cas du zinc

[Zn ²⁺]	Témoin	50 g.g ⁻¹ (M.S)	70 g.g ⁻¹ (M.S)	90 g.g ⁻¹ (M.S)
m ± E.T (0j) pH à 0(jour) % d'inhibition	56 ± 0,00 6,5 0	100 ± 0,00 6,73 0	56 ± 0,00 6,95 0	45 ± 0,00 6,74 0
m ± E.T (2j) pH à 2 (jours) % d'inhibition	56 ± 0,00 5,6 0	68 ± 0,00 7,06 0	56 ± 0,00 7 16,6	45 ± 0,00 6,76 8,3
m ± E.T (4j) pH à 4 (jours) % d'inhibition	45 ± 0,00 6,8 0	67 ± 0,00 6,8 21,4	45 ± 0,00 6,82 21,4	34 ± 0,00 6,86 14,2
m ± E.T (6j) pH à 6 (jours) % d'inhibition	56 ± 0,00 6,7 0	56 ± 0,00 6,68 40	45 ± 0,00 7 46,4	34 ± 0,00 6,72 53,3
m ± E.T (8j) pH à 8 (jours) % d'inhibition	56 ± 0,00 6,2 0	45 ± 0,00 6,63 33,3	34 ± 0,00 6,85 50	34 ± 0,00 6,89 50
m ± E.T (10j) pH à 10 (jours) % d'inhibition	45 ± 0,00 6,28+ 0	34 ± 0,00 6,83 45,4	22 ± 0,00 7 63,6	22 ± 0,00 6,97 72,2

m ± E.T : quantités d'azote total (% NTK) contenues dans les milieux de culture et les écart types correspondant

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

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

APPENDICE E

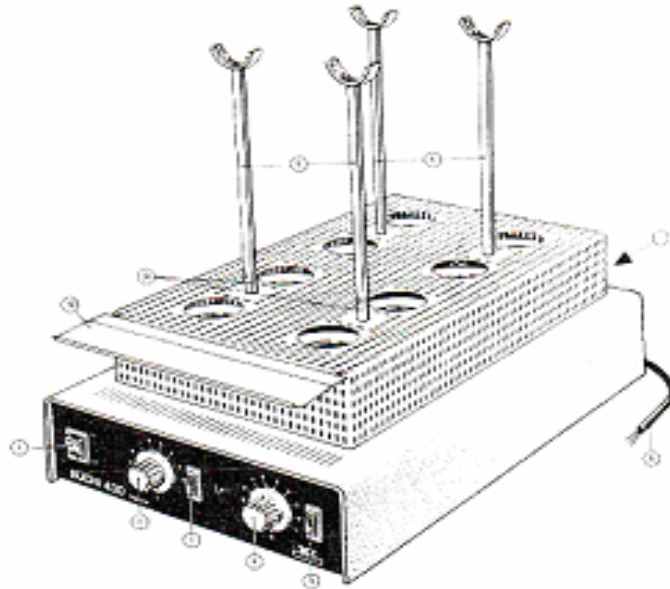


Figure 4.9 : Minéralisateur_KJELDAHL _de type BUCHI 430

1-Interrupteur principal.2-Régulateur de puissance pour postes gauche.3-Lampe témoin pour postes gauche.4- Régulateur de puissance pour postes droite.5-Lampe témoin pour postes gauche.6-Support pour dispositif d'évacuation.7-Fusible 10A.8-Câble de raccordement.30-Couvercle de protection

APPENDICE F

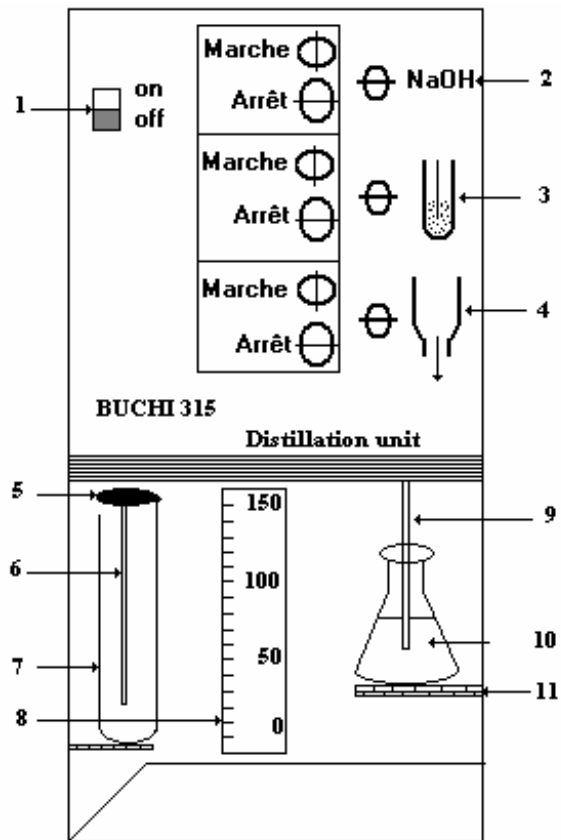


Figure 4.10 : Distillation BUCHI 315

1-Interrupteur principal. 2-Robinet d'addition soude caustique.3-Robinet distillation.3-Robinet vidange.4-Bouchon de raccord.5-Tuyau en téflon.6-Matras de distillation.7-Echelle graduée.7-Ecoulement de la solution.8-Ballon de réception.9-Support

REFERENCES

1. Moriarty, 1990. « The study of pollutants in ecosystems ». Academic Press, London, Ecotoxicology, 1990, p.289
2. Butler, PA., Lowe, JI., « Flowin sea water toxicity tests using oyster » (*Crassostrea virginica*). In Bioassay Procedures for the Ocean Disposal Permit Program, EPA-600/9-78-10, 1978, pp.25-27
3. Ramade, F., « Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau » Edisceince Paris, FRA, 1998, p.785
4. Burton, GA., « Sediment toxicity assessment » Lewis Publishers, London, 1992a, p.211
5. Leng, JH Stambolie et Bell « Lenticule- une ressource potentielle de fourrage à haute valeur protéique pour les animaux domestique et les poissons_ ». Revue n°1 octobre, Vol. 7, 1, 2, 3p, 1995, p.13
6. Martin, Mkandawire, E. Gert Dudel., « Accumulation of arsenic in *Lemna gibba*. duckweed in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany ». Science of the Total Environment, 2005, pp.81-89
7. Dinges, R., « Upgrading stabilization pond effluent by water hyacinth culture ». Journal Water Pollution Control Federation, 1978, 50(5): pp.833-845
8. Wolverton, B. C. and McDonald, R. C., « The Water Hyacinth-From Prolifie Pest to Potentiel Provider ». *Ambio*, 1979b, 8(1): pp.2-9
9. Debusk, T. A. and Reddy, K. R. « Bod Removal in Floating Aquatic Macrophyte -Baser Wastewater Treatment Systems ». *Water Sci. Technol* 1987, 19(12):pp.273-279.
10. Reddy, K. R. and Debusk, T. A. « Nutrient storage capabilities of aquatic and wetlands plants » Aquatic plants for water treatment and resource recovery. Reddy, K.R. and Smith, W.D. Orlando, Mangnolia Publishing Inc: 1987, pp.337-357
11. Kumar, P. and Garde, R. J. « Upgrading wastewater treatment by water Hyacinth in developing countries ». *Water Science and Technology*, 1990, 22(7-8):pp.153-160
12. Ramade, F., « Ecotoxicologie », Masson, Paris, 1979, p.224
13. Viala, A., « Toxicologie », Edition Technique et Documentetion, Lavoisier, Londre- New York ; 2005, p.3

14. Weil, E., « Element de toxicologie industrielle »; Masson, Paris, 1975, p.1
15. Gaujous, D., « La pollution des milieux aquatiques », Edition Technique et documentation, Lavoisier 1995, pp.203-219.
16. Angelier, E., « Ecologie des eaux courantes », Technique et Documentation, Paris, 2001, p.195
17. Chavéron, H., « Introduction à la Toxicologie Nutritionnelle », Edition Technique et Documentation, 1999, p.213
18. Picot, A. et Grenouillet, P., « La sécurité en laboratoire de Chimie et de biochimie », Technique et Documentation, Lavoisier, Paris, 1992, p.424
19. Wang, J., Zhang, M., Xu, J. and Wang, Y., « Reciprocal effect of Cu, Cd, Zn on a kid of marine alga », Water Research, V.29, n°1, 1995, pp.209-214.
20. M.C.Carre, A. Vulliermet, « Tannerie et environnement » Edition Centre du cuire, Lyon, 1983, p.53
21. Companella, L; E. Cardarelli, M. Cordatore et L. Patrolecco « Environmental protection by fungal activity» 9th forum of appl. Biotechnologiy. Gent.1995, pp.2545-2553.
22. Saiz, E.and Alcaraz, M., «Enhanced excretion rates induced by small-scale turbulence in Acartia(Copepoda-Calanoida)» Journal of Plankton Research, V.14, n°5, 1992, pp.681-689.
23. Zauke, G.P., « Cadmium in Gammaridae (Amphipoda: Crustacea) of the rivers Werra and Weser » Water Research, V.16, n°6, 1982, pp.785-792.
24. 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 streams», Water Research, V.18, n°7,1984, pp.833-842.
25. Goss, L.B. and Bunting, D.L., «_Thermal tolerance of Zooplankton »,Water Research, V. 10, n°5, 1976, pp.387-398.
26. Chapron, C., « Principes de Zoologie » Dunod, Paris, 1999, p.203
27. Matthews, R.A., Buikema, A.L., Cairns, J. and Rodgers,J.H., « Receiving system functional methods, relationships and indices»,Water Research,V.16, n°2,1982, pp.129-139.
28. Rondia, D., «Introduction à la Toxicologie de l'Environnement», Edition Université de Liège Faculté des Sciences Appliquées, Liège, 1977, p.272

29. 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. Environmental pollution, (serieb) 2: 1981, pp.285-307.
30. Simmeauer. A., « L'eau, la recherche, l'environnement » 3^{ième} journée scientifiques et techniques sur l'environnement : Limoge. France, 1979.
31. Ramade, F., « Précis d'écotoxicologie », Masson, Paris, 1992, p.300
32. Kosmala, A., « Evaluation écotoxicologique de l'impact des effluents de stations d'épuration sur les cours d'eaux: Intérêt d'une approche intégrée. » Thèse de Doctorat, 1998, p.189
33. Karr, J.R., « Defining and assessing ecological integrity: beyond water quality » Environmental Toxicology and chemistry, 12(9):1993, pp.1521-1531.
34. Kondratieff, P.F. et Simmon, G.M., Jr. « Nutrient retention and macro invertebrate community structure in a small stream receiving sewage effluent », hydrobiology, 94: 1982, pp.83-98.
35. Pontash, K.W., Niederlehner, B.R. et Caerns J. « Comparisons of single-species-microcosm and field responses to a complex effluent ». Environmental Toxicology and chemistry, 8:1989, pp.521-532.
36. Birge, W.J., Beak J.A. and Sxort T.M., « A comparative ecological and toxicological investigation of a secondary waste water treatment plants effluent and its receiving stream environmental toxicology and chemistry », 8:1989, pp. 437-450.
37. Wright, I.A., Chessman, B.C., Fairweather, P.G. et Benson, L.J. « Measuring the impact of sewage effluent on the macroinvertebrate community of an upland stream: the effect of different levels of taxonomie resolution and quantification », Australian Journal of Ecology, 20:1995, pp.142-149.
38. Baudo, R., « Memorie del Istituo Italiano di Idrobiologia-Ecotoxicological testing with Daphnia- », Peters and Bernardi Editors, Verbania Pallanza, 1987, pp. 461-482.
39. Philips, D.J.H., « The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments-a review ». Environmental Pollution 13:1977, pp.281-317.
40. Perrodin, Y., « Proposition méthodologique pour l'évaluation de l'écotoxicité des effluents aqueux. ». Thèse de Doctorat, Institut National des sciences Appliquées de Lyon:1988, p.176
41. Meador, J.P., Taub F.B. & Sibley T.H. « Copper dynamics and the mechanism of ecosystem level recovery in standrdized aquatic microcosm ». Ecol.Appl., 3, 1: 1993, pp.139-155.

42. 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: 1982, pp.299-316.
43. Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., «Biomarqueurs en écotoxicologie» Ed. Masson, Paris, 1997, p.6
44. Mahyaoui, M. et Saghi, M., « Etude de la pollution de l'eau de mer par les métaux lourds », Revue Internationale d'Océanographie médicale, V.88, n°1, 1987, pp.115-124.
45. Suedel, B.C., Deaver, E. and Rodgers, J.H., « Experimental factors that may affect toxicity of aqueous and sediment-bound copper to freshwater organisms », Archives of Environmental Contamination and Toxicology, V. 30, n°1, 1996, pp.40-46
46. Publication de la Direction de l'environnement de l'OCDE n° 27 Août 2002, «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 (le document complet est disponible sur OLIS).
47. Phillips, D.J.H. et P.S.Rainbow., « Biomonitoring of trace aquatic contaminants, Alden Press Ltd, Oxford », 1994.
48. Miquel G. « Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé ». Rapport parlementaire, N° 2979 / N° 261, Paris, Assemblée Nationale / Sénat, Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques, 2001.
49. Bliefert, C. Perraud, R., «Chimie de L'environnement, Air, Eau, Sols, Déchets», Environnemental. Edition De Boeck, 2001, pp.370-371
50. Nieboer, E.E. and Richardson, D.H.S., « The replacement of the nondescript term Heavy metals by a biologically and chemically significant classification of Metal ions », Environmental pollution, V.1, n°1, 1980, pp.3-26.
51. 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
52. Lawerys, «Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles» Ed. Masson, Paris, 2^{ème} édition, 1992, p.679
53. Geffard A.; « Réponses du biota à la contamination polymétallique d'un milieu estuarien, la Gironde, FR » : Exposition, imprégnation, induction d'une protéine de détoxification, la métallothionéine, impact au niveau individuel et populationnel. Thèse de Doctorat, 2001a, p.252

54. Morisson G. M.P.; « Trace element speciation and its relationship to bioavailability and toxicity in natural waters ». In: Batley GE (Ed). Trace element speciation: analytical methods and problems. *CRC Press. Boca Raton* 1989, pp.25-41.
55. O'Donnel J., Kaplan B. and Allen H. « Bioavailability of trace metals in natural waters ». 7th Symposium: Aquatic Toxicology and Hazard assessment, Philadelphia, ASTM. 1985.
56. Newman M. and Jagoe C. Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. In: « Bioavailability- Physical, Chemical, and biological interactions » Hamelin J.L.L.; P.F. Bergman, H.L. Benson, W.H. Ed. USA, Lewis Pub. Inc. 1994, pp.39-61.
57. Campbell P. Interactions between trace metals and aquatic organisms: A critique of the free- ion activity model. In: « Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems » Tessier A. and Turner D.R. Eds. Chichester, John Wiley and Sons. 1995, pp.45-102
58. Buffle J.; « Complexation reactions in aquatic systems: An analytical approach » New York, Ellis Horwood, John Wiley and Sons. 1988, p.692
59. Fischer J.C.; Ouddane B., Douez C. et Wartel M., « Sur la spéciation des métaux lourds dans les eaux naturelles » . *Oceanis* 16(4), 1990, pp.305-311
60. Le Goff F. et Bonnomet V., « Devenir et comportement des métaux dans l'eau ». Biodisponibilité et modèles BLM. Rapport technique. Ineris. 2004, p.85
61. Ramade, F., « Éléments d'Ecotoxicologie : Ecologie Appliquée ». Mc Graw- Hill, Paris, 1982, p.452
62. Pascoe, D., Wenzel, A., Janssen, C., Girling, A.E., Juttner, I., Fliedner, A., Blockwell, S.J., Maund, S.J., Taylor, E.J., Diedrich, M., Persoone, G., Verhelst, P., Stephenson, R.R., Crossland, N.O., Mitchell, G.C., Pearson, N., Tattersfield, L., Lay, J.P., Peither, A., Neumeier, B. and Velletti, A.R., « The development of toxicity tests for fresh water pollutants and their validation in stream and pond mesocosms », *Water Research*, V.34, n°8, 2000, pp.2323-2329.
63. Van der berg, G.A., Meijers, G.G.A., Van der heijdt, L.M. and Zwolsman, J.J.G., « Dredging- related mobilisation of trace metals : a case study in Netherlands » *Water Research*, V.35, n°8, 2001, pp.1979 -1986.
64. Ivorra, N., Kraak, M.H.S. and Admiraal, W., « Use of lake water in testing copper toxicity to Desmid species », *Water Research*, V.29, n°9, 1995, pp.2113-2117
65. Ajmal, M. and Ullah khan, A., « Effect of water hardness on the toxicity of cadmium to micro-organisms », *Water Research*, V.18, n°12, 1984, pp.1487-1491

66. Town, R. et Filella, M., « A comprehensive systematic compilation of complexation parameters reported for trace metals in natural waters », *Aquatic Sciences*, 62(3):2000, pp.252-295.
67. Turner, D., Relationship between biological availability and chemical measurements. In: «Metal ions in biological systems», Sigel H. Ed. New York, Marcel Dekker, 1984, pp.137
68. Tessier, A. et Turner D., «Metal speciation and bioavailability in aquatic systems» Chichester, John Wiley and Sons, 1995, pp.696.
69. Stumm, W. et Morgan J., « Aquatic Chemistry- Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters »; Third Ed. New York, John Wiley and Sons, 1996, p.1022.
70. Pesson, P., « La pollution des eaux continentales-Incidences sur les biocénoses aquatiques »; Gauthier Villars. Paris 2^{ème} Ed. 1980, p.462
71. Blake, G. J Dubois., « L'épuration des eaux par les plantes aquatiques », *Revue Scientifique*, 1974, p.47
72. Domek, M., Lechevallier, M., Cameron, S., «Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water » ; *Applied and Environmental Microbiology*, 48(2):1984, pp.289-293.
73. Zevenhuizen, L., Dolfing, J., Eshuis, E., «Inhibitory effect of copper bacteria related to the free ion concentration». *Microbiological Ecology*, 1979, 5: pp.139-146.
74. Shioi, Y., Tamai, H., et Sasa, T., « Effect of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts ». *Plant and Cell Physiology*, 1978, 19: pp.203-209.
75. Gilbin, R., «Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires » : Spéciation, biodisponibilité et toxicité .Exemple du cuivre dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles (Roujan, Hérault, France). Thèse de Doctorat, 2001, p.216
76. Babich, Schiffen, Baur et Stotzky, « Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *fungi* ». *bull, environment contamination toxical*, 1982.
77. Hillman. W.S. et Cully, D.D., « Les utilisations de la lenticule », *Scientifique Américain* 66 (July/ August), 1978, pp.442-451.
78. Batelière. G., « Grande Encyclopédie Alpha des sciences et des Techniques ». Les végétaux II. Editions Kister, Genève-Erasme, Bruxelles-Anvers, 1974, p.305
79. Afnor, norme XPIT 90-33 Normalisation française, Paris 1996, pp.437-446.

80. Jenner, H. A., J.P.M.Janssen-Mommen, « Phytomonitoring of pulverized fuel ASH Leachates by the duckweed *Lemna minor*» *Hydrobiologia*, 188\189: 1989,pp.361-366
81. Taraldsen, J.E., T.J.Norberg-King, «New Method For Determining Effluent Toxicity Using duckweed (*Lemna minor*) », *Environ. Toxicol. Cheme.*, 9:1990, pp.761-767.
82. APHA, AWWA et WEF (American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation), «Toxicity » Partie 8000, 2, dans: *Standard Methods for the Examination of ater and Wastewater*, 18^{eme} ed., 1992, pp.8-39.
83. NewMaster, S.G., A.G Harris, et L.J. Kershaw, *Wetland Plants of Ontario*, Lones Pines Printing and Queen's Printer for Ontario, Edmonton, AB ,1997.
84. Riemer, D.N., «Introduction to Freshwater vegetation », Krieger Publishing Company, Malabar, FL 1993
85. Wang, W., « Toxicity of Nickel to common Duckweed (*Lemna minor*) », *Environ. Toxicol. Chem.*, 6: 1987, pp.961-967.
86. ASTM (American Society for Testing and Materials), « Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with *Lemna gibba* G3». 1991, pp.1-10
87. Hillman, W.S., «The Lemnaceae, or Duckweed, A Review of the descriptive and Experimental Literature», *Bot. Rev.*, 27:1961, pp.221-287.
88. OCDE (Organisation de Coopération et de Développement économiques), « OECD *Lemna* Growth Inhibition Test», Ebauche 1998.
89. Crawford, D.H., Landolt, D.J., Gabel, J.D., and Kimball, R.T., «Phylogeny and systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family» *Systematic Botany* 27(2): 2002, pp.221-240.
90. Arber, A., *Water Plants: «A Study of Aquatic Angiosperms»*, Wheldon and Wesley Ltd. And Hafner Publishing Co., New York, NY, 1963.
91. Britton, N.L., A. Brown, «An Illustrated Flora of the Northern United States and Canada», Vol.I, Dover Publications, New York, NY, 1970.
92. Godfrey, R.K., J.W Wooten, «Aquatic and Wetland Plants of Southeastern United States», University of Georgia Press, Athens, GA, 1979.
93. Wayne Armstrong, «Treatment of Lemnaceae» *Lemna* corporation 1408 Northland Drive Suite 310 St, Paul, Minnesota 55120, USA, 2001.
94. SRC, « Conseil de recherches de la Saskatchewan », Annual Report : Development of Aquatic Plant Bioassays for Rapid Screening and Interpretive Risk Assessment of Metal Mining Wastewaters, prepare pour Environnement

Canada, Ressources naturelles Canada, le Programme d'innovation environnemental, par le SRC, Université technique du Danemark, publication SRC E-2100-2-C-95 de l'Université de la Saskatchewan, 1995.

95. Nasson, A., Goldstein, P., «Biologie animales et végétales », Ecologie, 1970, Paris, p.149
96. Montegut, J., « Les plantes aquatiques et les plantes de tourbières » tome I. Ed. Pascal Robbe et Nicole Beyt, Paris, 1987a, p.20
97. Montegut, J., « Les plantes aquatiques entretien-desherbage » tome IV. Ed. Réalisation Pascal Robbe et Nicole Beyt, Paris, 1987 b, p.40
98. Blandin P., Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. Bull. Ecol., 7(4), 1986, pp.215-307.
99. 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», 2003, p.149
100. Andre, B., et Lascombe, C., «Comparaison de deux traceurs de la pollution métallique des cours d'eau : les bryophytes et les sédiments», Agence de Bassin Rhone Mediterannee Corse, Pierre Benite, 1985.
101. Kovacs, M., et Podani, J., « Bioindication: a short review on the use of plants as indicators of heavy metals». Acta Biologica Hungarica, 1986,37(1): pp.19-29.
102. Lagadic, R., Caquet, T., Amiard, J-C., Ramade, F.,« Utilisation de Biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement » Ed. Tec et Doc, Paris, 1998, p.306
103. Burton, M.A.S.,et Peterson,P.J.,«Metal accumulation by aquatic bryophytes from polluted mine streams». Environmental Pollution, 19(1); 1979, pp.39-46.
104. Dietz, F., « Estimation de la pollution par métaux lourds dans la somme par l'analyse des bryophytes aquatiques». Bulletin Français de pisciculture, 48 ; 1976, pp.138-142
105. 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, 5:1975, pp.431-444.
106. Whitton, B.A., et Say, P.J., «Heavy metals». In: B.A. Whitton (Editor), River Ecology. Blackwell Sci. Publ., Oxford, 1975, pp.286-311.
107. Empain, A., 1988. « A posterior detection of heavy metal pollution of aquatic habitats». In: J.M. Glime (Editor), Methods in Bryology. Hattori Bot. Lab., Mainz, pp. 1988, pp.213-220.

108. Frisque, G., « Accumulation par des bryophytes aquatiques de la Meuse de deux micropolluants: les polychlorobiphenyles et le gamma-HcH », Université de Liege, 1981.
109. Encyclopédie Universalis, 1ere Edition Française vol.2, 979 ,1968.
110. Guy, M., et Leblanc, C., « Le problème de l'azote dans les eaux », 1979, p.12
111. Barnabé.G.,Fontaine.M.,«Technique et documentation-Lavoisier, vol.1, 2^{ème} Edition, 1989, p.27
112. Winogradsky, H., Annales de l'institut Pasteur, 1949, 76,35,
113. Whurmann, K., et Gujer, W., Cours international, IRCHA, Paris, 1976.
114. Brix, H., « Functions of Macrophytes in Constructed Wetlands. » Water Science and Technology. 29(4): 1994, pp.71-78.
115. Brix, H., « Do macrophytes play a role in constructed treatment wetlands » Water Science and Technology. 35(5): 1997, pp.11-17.
116. Reddy, K. R., and D'angelo, E. M., « Biogeochemical indicators to evaluate pollutant removal efficiency in constructed wetlands», Water Science and Technology. 35(5): 1997, pp.1-10.
117. Musil, C. F., and Breen, C. M., «The application of growth kinetics to the control of Eicchornia crassipes (Marts) Sloms. through nutrient removal by mechanical harvesting». Hydrobiol. 53(2): 1977, pp.165-171.
118. Nelson, S. G., Smith, B. D. and Best, B. R. «Kinetics of nitrate and ammonium uptake by the tropical freshwater macrophyte Pistia stratiotes L». Aquaculture 24: 1981, pp.11-19.
119. Ower, J., Cressewell, C. F and Bate, G. C. «The effects of varying culture nitrogen and phosphorus levels on nutrient uptake and storage by the waterhyacinth Eichornia crassipes (mart) sloms». Hydrobiol, 1981, pp.85-22.
120. Aoi, T. And Hayashi, T."Nutrient removal by water lettuce (Pisitia stratiotes)." Water Science and Technology 34(7-8):1996, pp.407-412.
121. Reddy, K. R.and Debusk, T. A. "Nutrient storage capabilities of aquatic and wetlands plants." Aquatic plants for water treatment and resource recovery. Reddy, K. R. and Smith, W. D. Orlando. Mangnolia Publishung Inc.: 1987, pp.337-357.
122. Alaerts, G. J., Rahman, M. D. And Kelderman, P. « Performance analysis of a full-scale duckweed-covered sewage lagoon». Water.Res. 30(4):1996, pp.843-852.

123. Oron, G., A. de-Vegt, and D. Porath. « Nitrogen removal and conversion by duckweed grown on wastewater». *Water Res.* 22(2):1988, pp.179-184.
124. Culley, D. D., Jr., E. Rejmankova, J Kvet, and J. B. Frye. « Production chemical quality, and use of duckweed (Lemnaceae) in aquaculture, waste management, and animal feeds". *J. World Maric. Soc.* 12(2):1981, pp.27-49.
125. Yamamoto, Y. T., N. Rajbhandari, X. Lin, B. A. Bergmann, Y.Nishimura, and A. - M. Stomp. « Genetic transformation of duckweed *Lemna gibba* and *Lemna minor*». *In vitro Cellular and developmental Biology- Plant.* 37(3): 2001, pp.349-353.
126. Bjorn Ingemarsson. « Nitrogen Utilisation in Lemna¹. I-Relations Between Net nitrate Flux, nitrate reduction, and in vitro activity and stability of nitrate reductase». *Plant Physiol.* 85, 1987, 1987, pp.856-859.
127. Bjorn Ingemarsson, Peter Oscarson Magnus AF UGGLAS, and Carl-Magnus Larsson. 1087. «_Nitrogen Utilization in Lemna¹.II-Studies of nitrate uptake using NO₃⁻». *Plant Physiol*, 85, 1987, pp.860-864.
128. Lee, RB, KA., Rudge., «_Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants» *Ann. Bot.* 1986, 57:pp.471-486.
129. Ullrich, WR, HD Schmitt., Earntz « Regulation of nitrate uptake in green algae and duckweeds», Effect of starvation and induction. In H Boethe, Atrebst, eds, *Biology of inorganic Nitrogen and Sulfur.* Sringer-Verlag, Heidelberg, 1981, pp.244-251.
130. Bjorn Ingemarsson, Peter Oscarson Magnus AF UGGLAS, and Carl-Magnus Larsson. 1087. «Nitrogen Utilization in Lemna¹ III-Short-Term. Effects of ammonium on nitrate uptake and nitrate reduction». *Plant Physiol.* 85, 1987, pp.865-867.
131. Reddy, K. R. and Tucker, J. C.«Productivity and Nutrient-Uptake of Water Hyacinth, Eichhornia-Crassipes.1.Effect of Nitrogen-Source » *Econ.Bot.*37 (2): 1983, pp.237-247.
132. Tucker, C. S. and Debusk, T. A.« Seasonal Variation in the Nitrate content of Water Hyacinth (Eichhornia-Crassipes [Mart] Solms),Aquatic Botany 15(4): 1983, pp.419-422.
133. Reddy, K. R. and D'angelo, E. M. «Biomass yield and nutrient removal by water hyacinth (Eichhornia crassipes) as influenced by harvesting frequency», *Biomass* 21(1): 1990, pp.27-42.
134. Brown et Wells," The extracellular and intracellular uptake of inorganic chemicals by bryophytes". In: H. D. Z. a. R. Mues (Editor), *Bryophytes: their chemistry and chemical taxonomy* clarendon press, Oxford, 1990b,pp.299-315

135. Brown, D. H., " Mineral nutrition". In: A. J. E. Smith (Editor), *Bryophyte Ecology*. Academic Press, London, 1982. pp.383-443.
136. Brown et Wells, " The extracellular and intracellular uptake of inorganic chemicals by bryophytes". In: H. D. Z. a. R. Mues (Editor), *Bryophytes: their chemistry and chemical taxonomy* clarendon press, Oxford, 1990a, pp.299-318.
137. Market, B et Wtorova, W., " Inorganic Chemical Investigations in the Forest Biosphere Reserve near Kalinin". Part3. Comparaison of the multielement budget with a forest ecosystem in Germany. Aspects of rejection indication and accumulation of chemicals elements. *Vegetation*, 98: 1992, pp.43-58.
138. Samecka-Cymerman, A., Kempers, A. J. Et Kolon, K., " Concentrations of heavy metals in aquatic bryophytes used f. biomonitoring in rhyolite and trachybasalt areas": a case study with platyhypnidium rusciforme from the studety mountains. *Annales Botanici Fennici*, 37: 2000, pp.95-104.
139. Market, B et Wtorova, W., " Inorganic Chemical Investigations in the Forest Biosphere Reserve near Kalinin". Part3. Comparaison of the multielement budget with a forest ecosystem in Germany. Aspects of rejection indication and accumulation of chemicals elements. *Vegetation*, 98: 1992, pp.43-58.
140. Brooks, R.R., "Geobotany and Biogeochemistry in Mineral Exploitation Harper and Row", New-York, 1972, p.290.
141. Buck, G. W. Et Brown, D. H., "The effect of desiccation or cation location in lichens". *Annals of Botany*, 44: 1979, pp.265-277.
142. Jacobson, L., Hannapel, R., Moore, D. et Schaedle, M., "Influence of calcium on selectivity of ion absorption process". *Plant physiology*: 1960, pp.58-61.
143. Hoagland D. et Arnon DI., « The water cultured method for growing plants without soil » *Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.* 1938, pp.347-39p.
144. Ndang Ekouma, D., « Etude de la cinétique et modélisation de la biosorption de quelques métaux lourds : Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} par la plante *Lemna gibba* », 2006, p.154.
145. Semsari, S., « Contribution à l'étude de l'inhibition de certains niveaux trophiques par la présence de cations métalliques dans l'eau » Thèse de doctorat d'état, Université de Houari Boumediene, 2002, pp.137-139.
146. ASTM, norme publiée par l'American Society for Testing and Matetials, pour la réalisation d'essais toxicologiques en conditions statiques *Lemna gibba* G3. 1991
147. Rodier, J., « L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer » 8^{ème} Ed. Dunod, 1996.

148. Kjeldahl, J. Z. Anal.Chem. 22, 366, (1883).
149. Morris, P. A century of Kjeldahl (1883-1983), J.Assoc. Publ. Analysts 1983, 21, pp53-58.
150. Association Française de normalisation, Norme NF,V03-050, Paris, 1970
151. Association Française de normalisation, Norme NF, V04-211, Paris, 1971.
152. Association Française de normalisation, Norme NF, V04-407, Paris, 1972.
153. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding Anal. Biochem.1976, 72, pp.248-254.
154. Dagnelie, P., « Théorie et Méthodes Statistiques : applications agronomiques», Les Presses Agronomiques de Gembloux ,Gembloux, 1986, p.463.
155. Rufus L Chaney, Minnie Malik, Yin M L, Sally L Brown, Eric P Brewer, J Scott , JM Baker, « Phytoremediation of soil metals».Current opinion in Biotechnology, 1997 8: pp.279-284.
156. 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:pp.165-181.
157. Cheng, J., Landesman, L., Bergmann, B.A., Classen, J.J., Howard, J.W., Yamamoto, Y.T., « Nutrient Removal from Swine Lagoon Liquid by *Lemna minor* 8627»American Society of Agricultural Engineers ISSN 0001-2351, 2002,Vol.45(4):pp.1003-1010