



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-
Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie



Département : Sciences de la Nature et de la Vie

MEMOIRE DE MASTER

Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Toxicologie appliquée

Option: Toxicologie : Xénobiotiques et risques toxicologiques

Thème:

**L'étude de stress oxydatif chez une plante
aquatique *lemna minor***

Présenté par:

***M^{lle}* Aimene Besma**

***M^{lle}* Slimani Radia**

Devant le jury:

<i>M^{me}</i> BELLEL W.	M.A.B	Université Larbi Tébessi-Tébessa-	Présidente
<i>M^{me}</i> BOUADILA S.	M.A.A	Université Larbi Tébessi-Tébessa-	Rapporteur
<i>M^{lle}</i> BEN AMMAR A.	M.A.A	Université Larbi Tébessi-Tébessa-	Examinatrice

Date de soutenance: 29/05/2016

Note :..... Mention :.....

Résumé

ملخص

التلوث العمراني، الصناعي والزراعي هي أسباب تلوث المياه، من خلال رمي الكثير من الملوثات العضوية وغير العضوية. هذا التلوث يمكن أن يؤثر على صحة الإنسان إما عن طريق تناول المباشر للنباتات والحيوانات الملوثة أو من خلال استهلاك المياه.

العديد من النباتات المائية المعروفة بدورها في تنقية المياه، هذا الدور في تصفية المياه يعتمد على مقاومة هذه النباتات للمكونات النشطة مما يؤدي إلى آثار جانبية على عملية ايضها، قدرة التصفية لنبتة عدس الماء (*Lemna minor*) تسمح لها بتنقية المياه الملوثة. بفضل قوة امتصاصها الكبيرة نظرا لأهمية نظامها الجذري، هذا الأخير يمتلك قدرة امتصاص كبيرة للمواد السامة.

وقد أجريت هذه الدراسة لإثبات فعالية عدس الماء *Lemna minor* في تنقية ومعالجة المياه الملوثة، ومن جهة أخرى، لاختبار تأثير سمية الملوثات الموجودة في هذه المياه (مياه واد ملاق) على الوظائف الحيوية (الإجهاد التأكسدي)، وعلى نمو النبتة.

عندما قمنا بالتحليل البيوكيميائية والفيزيولوجية، تبين لنا قدرة هاته النبتة على معالجة المياه مع الزيادة في بعض الأنزيمات مثل (GPX)، يرافقه زيادة نمو النبتة، ويستدل على ذلك من خلال الزيادة في متوسط طول الجذور، وقطر الأوراق، كذلك عدد الأوراق والجذور. وينطبق الشيء نفسه على غيرها من العوامل مثل معدل الكلوروفيل (أ، ب) و (أ+ب) والبروتين.

الكلمات المفتاحية: التلوث المائي، تنقية المياه، الإجهاد التأكسدي، النشاط الإنزيمي، عدس الماء *Lemna minor*

Abstract

Pollution Urban, industrial and agricultural pollution are the causes of water pollution, by the release of many organic and inorganic pollutants. This pollution can affect the health of humans either by direct ingestion of contaminated vegetables and animals or through consumption of water.

Many macrophytes are distinguished by their role as water filtration and purification, the specific épuratif effect to these aquatic plants, depends on their resistance to the active ingredients causing any side effects on their metabolism. The treatment of *Lemna minor* capacity, enabling it to filter wastewater, due to the large absorption capacity of the root system.

This study was conducted to prove the effectiveness of *Lemna minor* in the purification and treatment of waste water by floating macrophytes, and secondly, to test the toxicity of existing polluting effects in waste water of Oued Mellague on vital functions (oxidative stress), and on the growth of the plant.

When the biochemical and physiological analysis, they highlight the purifying effects of this plant, with an increase of certain enzymes such as peroxidase guaiacol, accompanied by a stimulation of growth, evidenced by the increase in average lengths of root, diameter of the leaves, numbers of leaves and roots. It is the same for other factors as taken into account that the rate of chlorophyll (a, b and a + b) and protein.

Keywords: Pollution Hydrique, phytopurification, oxidative stress, enzyme activity, Lemna minor.

Résumé

Les pollutions urbaine, industrielle et agricole sont les causes de la pollution aquatique, par le rejet de nombreux polluants organiques et inorganiques. Cette pollution peut avoir des conséquences sur la santé de l'homme soit par l'ingestion directe des végétaux et animaux contaminés soit par consommation de l'eau.

De nombreux macrophytes sont distingués par leur rôle de filtration et d'épuration hydrique. L'effet épuratif spécifique à ces plantes aquatiques, dépend de leur résistance vis-à-vis des ingrédients actifs provoquant d'éventuels effets secondaires, sur leur métabolisme. Les capacités d'épuration de *Lemna minor*, lui permettent de filtrer les eaux usées, grâce au grand pouvoir absorbant de leur système racinaire.

Cette étude a été menée afin de prouver l'efficacité de *lemna minor* dans l'épuration et le traitement des eaux usées par macrophytes flottants, et d'autre part, de tester l'effet de toxicité des polluants existants dans les eaux usées d'Oued Mellague sur les fonctions vitales (stress oxydatif), et sur la croissance de cette plante.

Quand aux analyses biochimiques et physiologiques, elles mettent en évidence le pouvoir épurateur de cette plante, avec une augmentation de certaines enzymes telle que la gaïacol peroxidase, accompagnée d'une stimulation de la croissance, prouvé par l'augmentation des longueurs moyennes des racines (LMR), diamètre des feuilles (DM), nombres des feuilles et des racines. Il en est de même pour les autres facteurs pris en compte à savoir les taux de chlorophylle (a, b et a+b) et de protéine.

Mots Clés : Pollution Hydrique, phytoépuration, stress oxydatif, activité enzymatique, *Lemna minor*.

DÉDICACES

*Je dédie ce travail
A celui qui m'a donné sa vie et guidé mes pas,
Pour ce qui m'a soutenu et m'encouragé
Pour voire mon rêve devant mes yeux, pour toi *PAPA*,
Vous offre les fruits de mes efforts.
A ma lumière de ma vie, à toi mon adorable * MAMAN*,
c'est grâce à toi j'ai réalisé moi-même ;
que dieu te protège maman pour partager
et vivre avec moi toute les heureux moments.
A ma grand-mère (*Hajou*) source de joie perpétuelle !
Tu m'as toujours donné le meilleur de toi-même.
A mes chers frères (*Abdou, Chawki, Okba*)
Et sœurs (*Bouchra, Soumaya*) pour leurs encouragements.
Mon fidèle amie : *Ghania. H et Fatiha. M, Naima*
A mon binôme : *Besma.A* et sa famille.
A tous mes amis et collègues.
À tous les membres de ma famille sans aucune exception.
A tous ceux qui ont une place dans mon cœur*

Radia. S

DÉDICACES

Afin d'être reconnaissant envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :

*À mon **très cher Baba Brahim** pour son soutien moral, et pour tous les sentiments d'affection et d'amour qui représentent pour moi le pilier de tous mes efforts.*

*À ma **très chère mère** et à mon **grand-mère** qui n'ont cessé de me combler par leur amour et leur tendresse.*

*A mes **chers frères (Abdou, Lazhari, Walid, Ramzi)***

*Et **sœurs (Kikyo, Rabia)** pour leurs encouragements.*

*A mes **fidèle amies: Bouchra, Fatíha M, Naïma.***

*Mon **fidèle amie et sœur, mon binôme: Radia. S** et sa famille.*

*À tous les membres de ma famille sans aucune exception.
Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur.*

** **Besma A** **



Remerciement

*Nous exprimons d'abord nos profonds remerciements à notre DIEU
qui nous a donné le courage et la volonté pour achever ce travail.*

*Nous tiendrons à exprimer notre grande considération et mes vives
reconnaisances à notre directeur de mémoire, M^{me} BOUADILA .Soulef,
maitre de assistant à l'université de Tébessa, pour nous avoir proposé ce sujet de recherche,
pour sa présence, pour sa patience, ses précieux conseils,
le suivi et l'orientation et le plus important pour sa confiance,
m'apportée une aide inestimable en m'accordant son attention ; je la remercie très sincèrement.*

*Un très grand merci à M^{lle} BEN AMMAR. Amel, maitre assistant à
l'université de Tébessa d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et
de faire partie du Jury de cette soutenance, pour son aide continue, ses précieux conseils.
Merci beaucoup mademoiselle...*

*Un très grand merci à M^{lle} BELLEL Warda., maitre assistant à l'université de Tébessa,
pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury, Merci beaucoup mademoiselle...*

*Nous tiendrons à remercions le chef de département et tous les enseignants de biologie.
Nos sentiments de reconnaissance et de remerciements vont
également à toute personne qui a participé de près ou de loin
directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.*

Table des matières

Table des matières

ملخص	
Résumé	
Abstract	
Dédicace	
Remerciements	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	
Chapitre 1: la phytoépuration	
1. Historique	3
2. La phytoépuration ou lagunage	4
3. Les types de lagunage	4
3.1. Le lagunage à microphytes	4
3.2. Le lagunage à macrophytes	4
4. Avantages et inconvénients lagunage	5
5. Les types de filtres plantés	6
5.1. Les filtres à écoulement vertical	6
5.2. Les filtres à écoulement horizontal	6
6. Les étapes et procédés de traitement des eaux usées	7
6.1. Les prétraitements	7
6.2. Les traitements	7
7. Exemple de processus d'élimination des polluants	8
7.1. Elimination de l'azote	8
7.2. Elimination du phosphore	9
7.3. Elimination de la pollution bactériologique	10
8. Critères de choix des plantes épuratrices	10
9. Le pouvoir épurateur de lemna minor	10
Chapitre 2: le stress oxydatif	
1. Définition du stress oxydatif	13
2. les espèces réactives de l'oxygène	13
2.1. Formation des espèces réactives de l'oxygène	14

Table des matières

2.2. Sources des espèces réactives de l'oxygène	14
2.2.1 .Chloroplastes et l'appareil photosynthétique	15
2.2.2 .Peroxisomes	15
2.2.2.1. β -oxydation	16
2.2.2.2. Photorespiration	16
2.2.3. Mitochondries et chaîne respiratoire	16
3. Cibles cellulaires des ERO	17
3.1. Peroxydation lipidique (lipoperoxydation)	17
3.2. Oxydation des protéines	18
3.3. Oxydation de l'ADN	18
4. Mécanismes de défense contre le stress oxydatif	18
4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques	19
4.1.1. Superoxyde dismutase	19
4.1.2. Catalase	19
4.1.3. La glutathion peroxydase (GPX)	19
4.1.4. L'ascorbate peroxydase (APX)	19
4.1.5. La glutathion réductase (GR)	19
4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques	20
4.2.1. Flavonoïdes	20
4.2.2. Les caroténoïdes	20
4.2.3. L'acide ascorbique	20
4.2.4. Le glutathion	20
Chapitre 3: Matériels et méthodes	
1. Matériel biologique	23
1.1. <i>Lemna minor</i>	23
1.2. Classification et taxonomie	24
1.3. Répartition et écologie de l'espèce	24
1.4. Facteurs importants pour la croissance des lentilles d'eau	24
1.4.1. Température	24
1.4.2. Ensoleillement	24
1.4.3. Présence d'inhibiteurs	25
1.5. Conditions de l'expérimentation	25

Table des matières

1.5.1. Solution de Knop	25
2. Prélèvement de l'eau	27
3. Méthode de dosage.	28
3.1. Paramètres biochimiques	28
3.1.1. Extraction et Dosage de la Chlorophylle	28
3.1.2. Dosage des protéines totales	28
3.2. Paramètres enzymatiques	29
3.2.1. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPX)	29
4. Les Paramètres morphologiques	30
5. les paramètres physico-chimiques des eaux.	31
Chapitre 4 : Résultat et Discussion	
1. Analyse statistique des résultats	33
2. Résultats	33
2.1. Les protéines totales	33
2.2. Les chlorophylles a, b et a+b	35
2.2.1. La chlorophylle a	35
2.2.2. La chlorophylle b	37
2.2.3. Les chlorophylles a+b	39
2.3. La glutathion peroxydase (GPX)	41
2.4. Les tests morphologiques	43
2.4.1. Le nombre des feuilles	43
2.4.2. Le nombre des racines	45
2.4.3. Le diamètre des feuilles	47
2.4.4. La longueur des racines	49
2.5. Les résultats des analyses physico-chimiques des eaux	51
2.5.1. Température et le PH	51
2.5.2. Conductivité, orthophosphate	51
2.5.3. Taux d'alcalinité (TAC)	51
3. Discussion	53
Conclusion	
Références bibliographiques	
Les annexes	

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 01	Origines et localisations des espèces réactives de l'oxygène	15
Tableau 02	Composition chimique de solution de knop, utilisé pour la culture de <i>Lemna minor</i> .	26
Tableau 03	Gamme d'étalonnage d'une solution de protéine	29
Tableau 04	les milieux de cultures	30
Tableau 05	les moyennes des taux de protéines totales en ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de PF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	34
Tableau 06	Analyse de la variance à un critère de classification du taux de protéines totales en ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de PF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).	34
Tableau 07	les taux des chlorophylles a en (mg/g de PF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	36
Tableau 08	Analyse de la variance à un critère de classification du taux de chlorophylle a en (mg/g de PF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).	36
Tableau 09	Taux des chlorophylles b en (mg/g de PF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	38
Tableau 10	Analyse de la variance à un critère de classification du taux de chlorophylle b en (mg/g de PF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).	38
Tableau 11	Taux des chlorophylles $a+b$ en (mg/g de PF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Té : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	40
Tableau 12	Analyse de la variance à un critère de classification du taux de chlorophylle $a+b$ en (mg/g de PF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i>	40

	placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).	
Tableau 13	L'activité de GPX en ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	42
Tableau 14	Analyse de la variance à un critère de classification de l'activité de GPX en ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).	42
Tableau 15	les moyennes de nombre des les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	44
Tableau 16	Analyse de la variance à un critère de classification de nombre des feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).	44
Tableau 17	le nombre des racines de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	46
Tableau 18	Analyse de la variance à un critère de classification de nombre des racines chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).	46
Tableau 19	Les moyennes de diamètre des feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	48
Tableau 20	Analyse de la variance à un critère de classification de diamètre des feuilles en (mm) de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).	48
Tableau 21	les moyennes de la longueur des racines en (mm) de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	50
Tableau 22	Analyse de la variance à un critère de classification de la longueur en (mm) chez les racines de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).	50
Tableau 23	les résultats des analyses physico-chimiques des eaux avant et après le traitement	52

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
Figure 01	Principes de l'épuration dans un bassin à macrophytes flottants	5
Figure 02	Les filtres à écoulement vertical	6
Figure 03	les filtres à écoulement horizontal	7
Figure 04	Le cycle de l'azote	9
Figure 05	Lemna minor	11
Figure 06	Schématisation de la balance entre les espèces réactives oxygénées (ERO) et les antioxydants	13
Figure 07	Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène dans la cellule végétale	17
Figure 08	Les différentes étapes de la peroxydation lipidique	18
Figure 09	Lentille d'eau (<i>Lemna minor</i>).	23
Figure 10	Station d'échantillonnage d'Oued Mellague	27
Figure 11	les effets des eaux usées sur la teneur en protéines totale ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez la lentille d'eau <i>Lemna minor</i> (Tr : Traitée) et (T : Témoin) en fonction du temps.	33
Figure 12	les effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle <i>a</i> en (mg/g) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps	35
Figure 13	Variation des effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle <i>b</i> en (mg/g) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	37
Figure 14	les effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle <i>a+b</i> en (mg/g) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	39
Figure 15	Variations de l'activité de GPX en ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	41
Figure 16	les effets des eaux usées sur le nombre des feuilles (NF) de <i>lemna</i>	43

	<i>minor.</i> (Tr: Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	
Figure 17	les effets des eaux usées sur le nombre des racines (NR) de <i>lemna minor.</i> (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	45
Figure 18	les effets des eaux usées sur le diamètre des feuilles en (mm) de <i>lemna minor</i> (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	47
Figure 19	les effets des eaux usées sur la longueur moyenne des racines en (mm) de <i>lemna minor</i> (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.	49

ABRÉVIATIONS

Abréviation

Tm	Témoin
Tr	Traité
ERO ou ROS	Espèces Réactives Oxygénées, en anglais pour Reactive Oxygen Species
ERA ou RNS	Espèces Réactives de l'Azote, en anglais pour Reactive Nitrogen Species
BBC	Bleu Brillant Coumassie
BSA	L'albumine de sérum de bœuf
TBS	Tris Buffer Saline
µl	Microlitre
Mg	Microgramme
N.T.U	Néphélométrie Turbidity Unit
UV	Ultra violée
ETM	Elément trace métallique
CTE	Les chaînes de transport d'électrons
PSI ou PSII	Photosystème I ou Photosystème II
Mn⁺²	Manganèse
CO₂	Dioxyde de carbone
RuBP	La carboxylation du ribulose 1,5-biphosphate
AOX	L'alternative oxydase
ADN	Acide désoxyribonucléique
4-HNE	Le 4-hydroxynonéal
MDA	Le dialdéhyde malonique, en anglais malondialdehyde
SOD	Superoxyde dismutase
GPX	La glutathion peroxydase, en anglais Guaiacol-peroxidase activity
GSH	Le glutathion
APX	L'ascorbate peroxydase, en anglais activity-ascorbate peroxidase
GR	La glutathion réductase
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide
FADH₂	Flavine Adénine Dinucléotide Réduite

Abréviation

FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
pH	Potentiel Hydrogène
DO	Densité Optique
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
L	Litre
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
GSSG	Glutathion disulfure
H₂O	L'eau
NF	Le nombre des feuilles
NR	Le nombre des racines
PF	Poids fraîche
LMR	La longueur moyenne des racines
DF	Le diamètre des feuilles
Mm	millimètre
Chl	Chlorophylle
Ddl	Degré de liberté
SCE	Somme des carrés des écarts
CM	Carré moyen
F_{obs}	Test de Fisher
P	Seuil de signification
±	Plus ou moins
Ms	Milli-semence
μmol	Micromole
Min	Minute
‰	Pour mille
μg	microgramme
cm	Centimètre
O₂^{•-}	Anion superoxyde
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
OH⁻	Radical hydroxyle

Abréviation

AV1	ANOVA à un critère de classification
NS	Non significatives

Introduction

INTRODUCTION

Les activités humaines conduisent à des rejets d'eaux usées polluées allant d'une biodégradabilité totale au non biodégradabilité absolue. Ces eaux peuvent contenir ou non des substances toxiques et des nutriments qui dépassants certains seuils, peuvent conduire à un déséquilibre du fonctionnement naturel des écosystèmes aquatiques. Pour faire face à cette situation les eaux usées doivent subir une épuration avant d'être rejetées dans le milieu récepteur.

L'épuration des eaux usées domestiques fait appel à des techniques physico-chimiques et biologiques. Parmi ces dernières, l'utilisation de végétaux aquatiques, fixés sur support ou en flottation libre, acquiert de plus en plus d'importance dans le monde et particulièrement dans les pays à climat chaud où le rendement photosynthétique est important. Cette «technologie» appelée l'épuration verte (phytoépuration) présente plusieurs avantages (coût limité, mise en œuvre facile, intégration excellente dans le paysage naturel, absence de nuisances olfactives, etc.).

La biomasse produite peut être valorisée par compostage, par biométhanisation ou par incorporation dans la nutrition animale. Les eaux épurées peuvent être recyclées dans certains domaines de l'agriculture ou pour alimenter les réserves d'eaux. **(Oueslati et al, 2000)**

Dans ce contexte nous avons mis les objectifs suivants:

Le but premier de cette étude est de déterminer si les milieux humides artificiels ou marais épurateurs peuvent constituer un système adéquat pour le traitement des eaux usées domestiques, industrielles et agricoles. Pour atteindre ce but, nous avons mis en place un système d'épuration au laboratoire (simulation in vitro). Ce système est composé de deux aquariums, dans lesquels des lentilles d'eau ont été plantées (*lemna minor*). Nous avons choisis de travailler sur les eaux d'Oued El Mellague en raison de leur forte pollution par des effluents industrielles, des eaux ménagères et des eaux d'irrigation agricole.

Le deuxième but est l'étude des mécanismes cellulaires (biochimiques physiologiques et enzymatiques) mis en jeu par *lemna minor*, pour épurer les eaux extrêmement polluées.

Ainsi notre mémoire est subdivisé en quatre grands chapitres :

La première partie est consacrée aux dernières actualités bibliographiques, et est répartie en deux chapitres:

INTRODUCTION

- ✓ **Chapitre 01** : donnera un aperçu sur la définition de la phytoépuration ou le lagunage. Une classification générale des différents types de lagunage.
- ✓ Le deuxième chapitre décrit le stress oxydant, définit les principales sources de radicaux libres et leurs implications pathologiques suivi par la détermination des principaux antioxydants notamment leurs mécanismes d'actions.
- ✓ **Chapitre 03** : Matériel et Méthodes : le matériel végétal utilisé dans notre expérimentation est une plante aquatique : *Lemna minor*, suivi de leur classification et distribution, ainsi que les méthodes de dosages utilisées, afin de déterminer les effets des eaux usées sur les paramètres étudiés.
- ✓ **Chapitre 04** : Les résultats obtenus et leur interprétation et la discussion de chaque résultat.
- ✓ Une conclusion et éventuellement quelques perspectives achèveront notre modeste étude.

Chapitre 1:

La phytoépuration

1-Historique:

Les potentialités épuratoires des systèmes hydrauliques à plantes macrophytes ont été mis au point en France par le CEMAGREF. Quelques unités ont été implantées en France au cours des années 70-80. Diverses améliorations visant à simplifier la filière et fiabiliser son fonctionnement ont été apportées dans le but de procéder à son développement. Il existe deux types de filtres, les filtres à écoulement horizontal et les filtres à écoulement vertical. **(Grison, 1999)**

Le premier système mis en exploitation date de 1974. Exporté vers des pays européens (notamment le Danemark et le Royaume Uni), le système a fait l'objet de nombreuses critiques de la part de scientifiques qui ont contesté le dimensionnement et l'aptitude des roseaux à augmenter la perméabilité des sols en place utilisés comme substrat. Des recherches étaient menées en Europe pour fiabiliser le fonctionnement des filtres plantés de macrophytes jugé potentiellement intéressant et susceptible de combler un vide dans les pays où le lagunage naturel et les lits infiltration-percolation sur sable étaient peu répandus. **(Harberl R. et al, 1995)**

Ce genre de procédé d'épuration de plus en plus utilisé à travers le monde, à titre d'exemple, plus de 2000 stations d'épuration à filtres plantés fonctionnent en France L'utilisation des végétaux aquatiques pour le traitement des eaux usées est relativement ancienne. **(Harberl R. et al, 1995).**

Application en Algérie:

La station D'Ouargla : Concernant l'épuration par les plantes ou la STEP écologique, Le ministère des ressources en eau a procédé, en 2007, à la mise en place d'un système expérimental d'épuration des eaux usées basé sur un procédé principalement naturel, dénommé « jardin d'épuration ». Une première en Algérie, ce système-pilote de traitement des eaux usées a été réalisé au niveau de la localité de Témacine (vieux ksar) dans la wilaya d'Ouargla. **(ONA Alger, 2011)**

2- La phytoépuration ou lagunage:

Définition : La phytoépuration est le nom donné à un système d'assainissement écologique qui utilise le pouvoir épurateur des plantes pour traiter les eaux usées. Ce système d'assainissement écologique rassemble un ensemble de techniques, chacune mettant à profit des processus naturels d'une combinaison végétaux/microorganismes, dans un système créé artificiellement pour le traitement des eaux usées.

Le lagunage est donc une technique d'épuration basée sur la transformation et l'assimilation naturelle des polluants domestiques par des chaînes alimentaires aquatiques. (Vincent C et Dufour S ,2007)

3- Les types de lagunage

3-1-Le lagunage à microphytes:

Elle consiste à créer un bassin de faible profondeur où l'eau va stagner pendant une période plus ou moins longue. Les microphytes, qui sont des algues planctoniques, se développent dans ce bassin. Elles consomment la pollution azotée et phosphatée dans les eaux usées. Le lagunage à microphytes est souvent le premier bassin d'une station de lagunage car ce traitement est insuffisant et nécessite un lagunage à macrophyte. Les rôles des microorganismes dans l'épuration des eaux usées sont :

- La photosynthèse produite par les algues augmente la teneur en oxygène de l'eau qui affecte à leur tour les éléments nutritifs et les réactions ;
- Elles se nourrissent des effluents et dégradent la matière organique qui devient dès lors assimilable par les plantes.

Il y a donc une étroite coopération entre les plantes et les micro-organismes. (Anonyme, 2005).

3-2-Le lagunage à macrophytes:

Ce type de traitement nécessite des plantes macrophytes originaires des zones humides naturelles. Cette filière d'épuration s'appuie sur le pouvoir épurateur des végétaux. Les eaux usées séjournent simplement dans des séries des bassins à ciel ouvert peuplés de ces végétaux. Les rôles des végétaux macroscopiques dans l'épuration des eaux usées sont importants dans le traitement des eaux usées :

- Elles sont le support des bactéries : les plantes épuratrices abritent une flore bactérienne importante ;
- Elles récupèrent les matières minérales dégradées par les bactéries ;

- Elles stabilisent les substrats, tout en améliorant leur perméabilité et limite la vitesse des flux des eaux, ce qui permet à la matière en suspension, le carbone, les éléments nutritifs et les oligo-éléments d'intégrer les tissus végétaux ;
- Elles produisent de l'humus au moment de leur décomposition ;
- Elles aèrent le substrat en apportant de l'oxygène entre leur tige et les racines.

Elles améliorent aussi considérablement la valeur esthétique du site. Toutes les espèces des zones humides ne sont pas appropriées pour le traitement de l'eau. **(Anonyme, 2005).**

Les lagunages à macrophytes diffèrent de celles à microphytes par une plus faible profondeur d'eau et doivent être collectées régulièrement (fort taux de croissance des lentilles ou des jacinthes d'eau par exemple). **(Rodrigo N, 2005).**

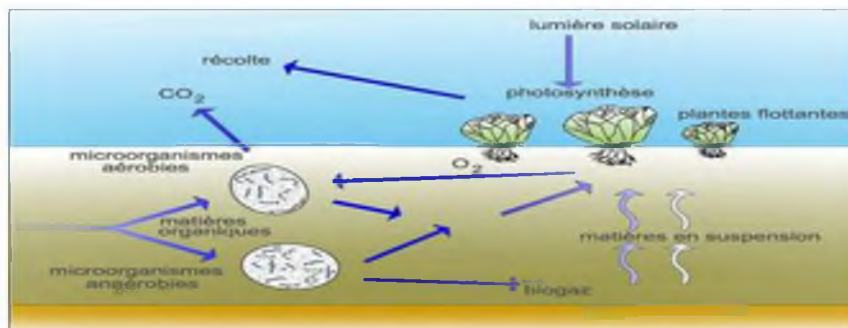


Figure 01 : Principes de l'épuration dans un bassin à macrophytes flottants.

(Rakotoarison H.A, 2008).

4-Avantages et inconvénients de lagunage. **(Hiroomi I et al, 2006).**

➤ **Avantages :**

Le lagunage naturel présente de nombreux avantages par rapport aux procédés classiques :

- Excellente élimination de la pollution microbologique ;
- Faibles coûts d'investissement et de fonctionnement ;
- Raccordement électrique inutile ;
- Très bonne intégration paysagère ;
- Valorisation aquacole et agricole de la biomasse planctonique produite et des effluents épurés ;
- Boues peu fermentes cibles ;
- Bonne élimination de l'azote (70 %) et du phosphore (60 %).

➤ **Inconvénients :**

A l'inverse, le lagunage naturel présente les inconvénients suivants :

- Variation saisonnière de la qualité de l'eau en sortie ;

- En cas de mauvais fonctionnement, risque d'odeurs, de moustiques, de rongeurs ;
- Emprise au sol importante ;
- Difficultés d'extraction des boues ;
- Pas de réglage possible en exploitation ;
- Sensibilité aux effluents septiques et concentrés.

5- Les types de filtres plantés

Il existe deux types de filtres : les horizontaux et les verticaux. Ils diffèrent par leur mode d'alimentation, par le sens de l'écoulement de l'eau et par les conditions aérobies de traitement. Nous rencontrons aussi les systèmes hybrides sont en fait l'association en série de filtres verticaux et de filtres horizontaux. **(Poulet J.B et al, 2004).**

5-1-Les filtres à écoulement vertical :

L'eau s'étend sur toute la surface du bassin, s'y infiltre et ressort par le fond. Plusieurs bassins sont placés en parallèle afin de créer une alternance de phase d'activité et de repos pendant laquelle la matière organique sera digérée. Ces filtres verticaux fonctionnent en aérobiose, ils retiennent les matières en suspension (MES), dégradent la matière organique et réduisent la quantité de bactéries pathogènes. **(Bensmina M.L et al, 2013).**

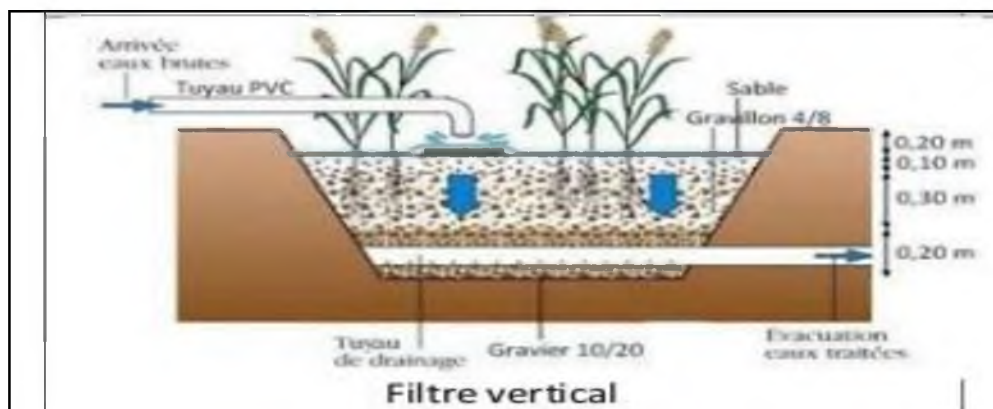


Figure 2: Les filtres à écoulement vertical. **(Benjamin L, 2015).**

5-2-Les filtres à écoulement horizontal :

L'eau remplit le volume du bassin, 5 à 10 cm en dessous de la surface des granulats. Les eaux ressortent, par un trop plein à l'extrémité opposée du filtre. On y trouve des bactéries anaérobies qui nitrifient et dénitrifient les composants azotés. Contrairement au filtres verticaux plantés uniquement de roseaux, les filtres horizontaux sont plantés d'une grande diversité d'espèces végétales qui pour certaines produisent des bactéries par les racines, éliminant une autre partie des bactéries pathogènes. Ce système est plus sensible au froid. **(Bensmina M.L et al, 2013).**

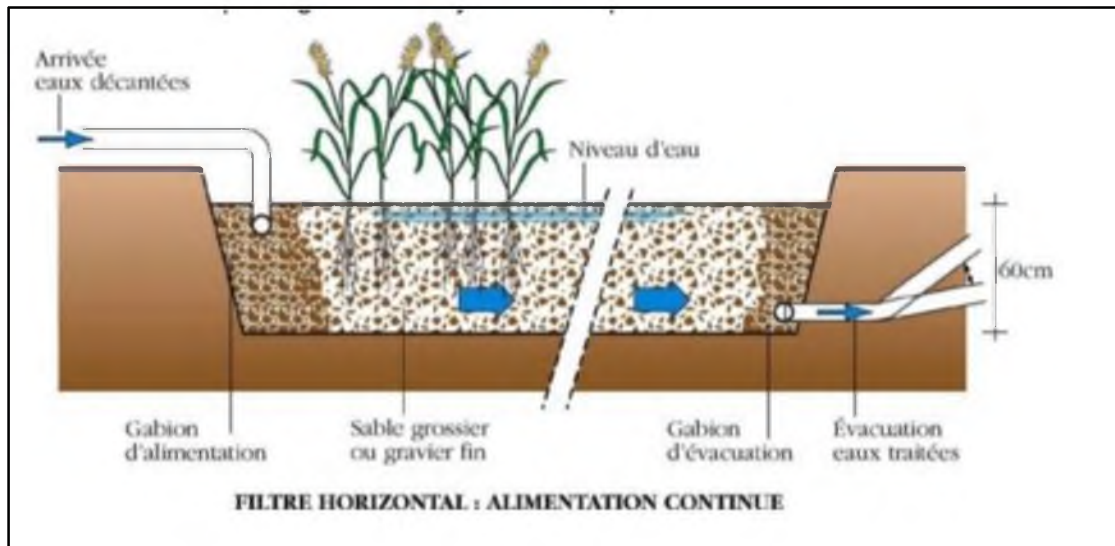


Figure 3: les filtres à écoulement horizontal. (Benjamin L, 2015).

6 - Les étapes et procédés de traitement des eaux usées

Le lagunage n'est qu'une phase de l'épuration des eaux usées. L'épuration des eaux se réalise en deux parties : les prétraitements et les traitements des eaux usées. (Degrémont, 1989).

6. 1 - Les prétraitements

Avant d'introduire les effluents dans les bassins de phytoépuration, des traitements préalables des eaux usées sont nécessaires. Il s'agit de :

- **dégrillage** : élimination de gros déchets des eaux usées au moyen d'une grille ;
- **tamissage** : filtration de matières en suspensions de petites tailles sur toile ;
- **dessablage** : évacuation des sables et graviers déposés au fond. (Degrémont, 1989).

6-2- Les traitements:

Le lagunage est composé de plusieurs bassins en série, en général trois, qui ont chacun un rôle bien précis.

Dans le premier bassin, l'épuration des eaux est uniquement due aux algues et aux bactéries. On transforme les charges polluantes par voie aérobie et anaérobie grâce à des micro-organismes. Dans la zone inférieure du plan d'eau, les bactéries anaérobiques stabilisent dans la couche limite les matières organiques en 2 phases :

- une partie de cette matière, sous l'influence des enzymes de certaines bactéries, est décomposée en nitrates et phosphates, puis rejoint la masse supérieure du plan d'eau.
- l'autre partie de la matière est transformée par un autre groupe de bactéries en méthane, dioxyde de carbone et en ammonium.

Dans la zone supérieure la matière organique est dégradée par les bactéries aérobiques. Cette transformation fournit du dioxyde de carbone, des nitrates et des phosphates, aliments de choix pour la flore aquatique.

Le premier bassin consiste donc à stocker les boues que les bactéries vont dégrader. L'eau y séjourne minimum 30 jours par temps sec et 20 jours par temps de pluie.

Dans le second bassin, l'épuration est principalement due à l'action biologique du phytoplancton, du zooplancton et des plantes à microphytes comme les algues vertes. Les algues vont assimiler le dioxyde de carbone, des nitrates et des phosphates et en retour produisent du dioxygène. La photosynthèse est d'autant plus intense que le climat est chaud et ensoleillé.

Le second bassin (appelé bassin à microphytes) permet la minéralisation des boues.

L'eau y séjourne minimum 20 jours par temps sec et 12 jours par temps de pluie.

Dans le troisième bassin, l'épuration est due principalement aux plantes aquatiques à macrophytes (plantes de grandes tailles comme les roseaux) qui vont assimiler la matière minérale formée, issue des bactéries mortes en décomposition.

Des éléments tels que les phénols, les hydrocarbures ou les détergents voient leur teneur considérablement abaissée après passage dans un étang de stabilisation. De plus, on note une accumulation importante des métaux lourds dans les sédiments du bassin de tête. Ainsi, les effluents épurés ne contiennent pratiquement plus de substances toxiques risquant de s'accumuler dans la chaîne trophique.

La dernière lagune sera donc plantée et permettra par la même occasion l'assimilation des nitrates, phosphates ainsi que l'assainissement de l'eau au niveau des germes pathogènes. L'eau y séjourne minimum 8 jours par temps sec et 5 jours par temps de pluie. (Vincent C et Dufour S ,2007).

7-Exemple de processus d'élimination des polluants:

7-1-Elimination de l'azote:

Dans les eaux usées, l'azote se trouve sous la forme organique d'ammonium NH_4 et de nitrate NO_3 . Les réactions d'élimination de l'azote dans un milieu aquatique sont :

- **la volatilisation** : c'est la transformation de l'ammonium en ammoniac,
- **l'ammonification** : c'est la transformation de l'azote organique en ammonium,

- **la nitrification** : c'est l'oxydation de l'ammonium en nitrate,
- **la dénitrification** : c'est la réduction des nitrates en azote gazeux, N_2 sous l'action des bactéries dénitrifiantes.

Dans le bassin à macrophytes, les principales réactions d'élimination de l'azote sont la nitrification/dénitrification et l'assimilation par les végétaux. (Edeline, 2001).

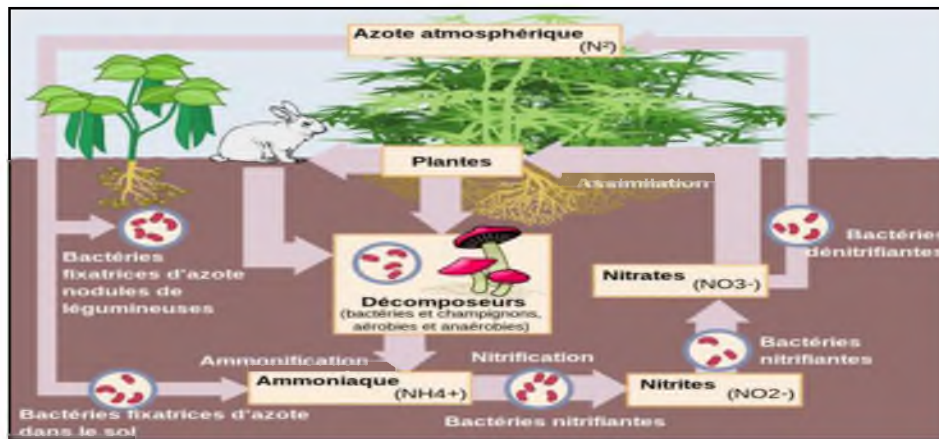
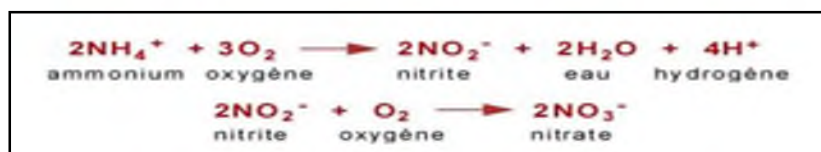
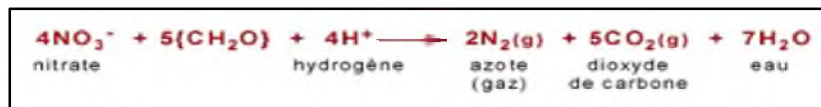


Figure 4 : Le cycle de l'azote. (Raven E.E, 2014).

- **La nitrification (Edeline, 2001):**



- **La dénitrification (Edeline, 2001) :**



7-2-Elimination du phosphore

L'élimination du phosphore, ou "déphosphatation", peut être réalisée par des voies biologiques. La réaction d'assimilation de phosphore est en fonction de la disponibilité de l'azote. Elle s'accroît avec les concentrations d'azote et peut être freinée par une carence de cet élément. Les racines et des parties immergées des plantes épuratrices assimilent le phosphore sous forme d'orthophosphate. Cette assimilation est influencée par la disponibilité de l'azote. En milieu acide, le phosphore inorganique réagit avec les ions ferriques et aluminiums pour former des composés insolubles qui précipitent. A pH basique, il précipite préférentiellement avec le calcium. Les valeurs de pH dans les bassins couverts de plantes flottantes sont généralement stables et comprises. Ce paramètre aura donc très peu d'influence sur la précipitation du phosphore. (Rajaonarivelo F.J, 2013).

7-3-Elimination de la pollution bactériologique:

Dans une station de lagunage, différents processus physico-chimiques ou biologiques ont lieu et diminuent les germes pathogènes :

- Rôle bactéricide des ultraviolets (U.V.) grâce aux rayonnements solaires (d'où une faible profondeur d'eau permettant aux rayons d'atteindre le fond)
- Phénomène de compétition avec les espèces autochtones ;
- Forte prédation par des espèces bactériophages (zooplancton) ;
- Production de substances inhibitrices ou bactéricides naturelles (antibiotiques par exemple) par certaines bactéries et micro-algues entraînant la mort ou une baisse de la reproduction des pathogènes ;
- Durée du cycle d'épuration longue durant laquelle les germes peuvent être éliminés par ces différents processus. **(Rajaonarivelo F.J, 2013).**

8-Critères de choix des plantes épuratrices :

Les plantes épuratrices doivent répondre aux conditions suivantes :

Pour les plantes aquatiques :

- la plante aquatique utilisée ne peut pas être utilisée par la population autour de la station d'épuration pour éviter tout risque de contamination. Cette plante n'est pas comestible.
- Elle est tolérante aux apports en polluants et aux conditions climatiques existantes

Pour toutes les espèces utilisées pour le traitement des eaux :

- Elles ont une croissance rapide pour assurer la continuité du traitement.
- Sa biomasse est valorisable pour éviter l'excès de déchets.
- Elle n'est pas toxique.
- Elles n'ont pas besoin beaucoup d'espace. **(Rajaonarivelo F.J, 2013).**

9-Le pouvoir épurateur de *lemna minor*:

Les lentilles d'eau (*Lemna minor*) l'espèce la plus courante, font partie des plantes aquatiques généralement utilisées pour le traitement des eaux résiduelles domestiques ou industrielles du fait de leur performance dans l'élimination de la pollution carbonée et leurs capacités d'assimilation de l'azote ou du phosphore. Cependant, leur croissance rapide dans les conditions optimales (i.e. température, intensité lumineuse, en soleillées, nutriments, pH, etc.) exige une gestion du tapis végétal formé sur le plan d'eau en vue d'assurer une bonne épuration des eaux usées. **(Tangou T.T et al, 2014).**



Figure 5:Lemna minor. (Hans W.K ,2007).

Différentes études ont montré chez *lemna minor* une accumulation élevée d'éléments traces. (Zayed et al, 1998).

Chapitre 2:

Stress oxydatif

1. Définition du stress oxydatif :

Dans les systèmes biologiques, le stress oxydant est la conséquence d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxygénées (ERO) et leurs destructions par des systèmes de défense antioxydants. **(Bonfont-Rousselot et al, 2003).**

Les espèces réactives oxygénées (ERO) peuvent engendrer des dommages importants dans la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles: protéines, lipides et acides nucléiques. **(Pincemil et al, 1999).**

Dans les conditions quotidiennes normales, les espèces réactives oxygénées (ERO) sont produites en faible quantité comme des médiateurs tissulaires ou des résidus des réactions énergétiques ou de défense, et cela sous le contrôle de systèmes de défense adaptatifs par rapport au niveau de radicaux présents. Dans ces conditions, on dit que la balance pro-oxydant/anti-oxydants est en équilibre. Cette dernière peut être rompue pour diverses raisons en faveur du système pro-oxydant, et est alors à l'origine d'un stress oxydant. **(Favier, 2003).** (Figure 6).

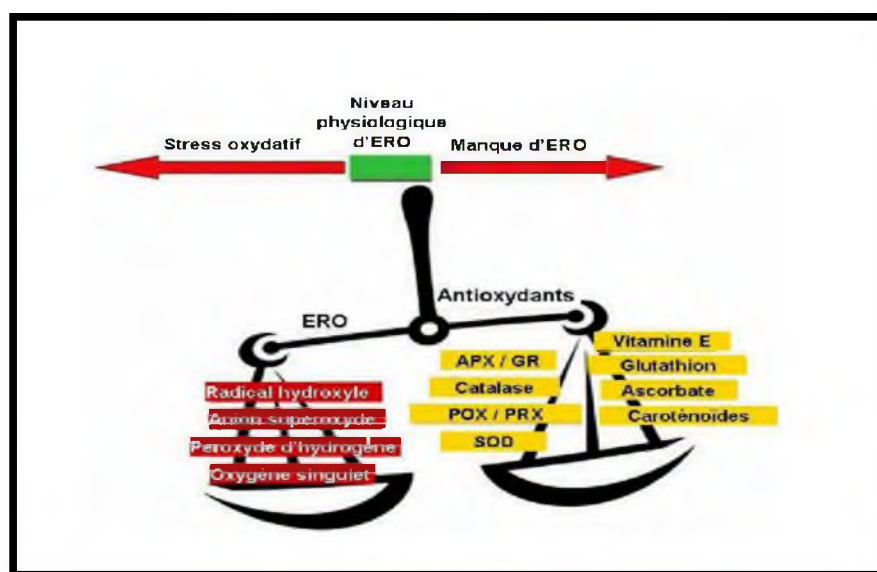


Figure 06 : Schématisation de la balance entre les espèces réactives oxygénées (ERO) et les antioxydants. **(Pourrut et al, 2008).**

2 .Les espèces réactives de l'oxygène:

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont utilisées pour la description des formes d'oxygène qui sont énergétiquement plus réactives que l'oxygène moléculaire. Elles regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs. **(Asada, 2000 ; Foyer et Noctor, 2003 ; Edreva, 2005).**

Certaines espèces réactives de l'azote (ERA ou RNS en anglais pour Reactive Nitrogen Species) sont parfois mentionnées comme appartenant à cette classification puisqu'elles possèdent un atome d'oxygène et qu'elles se comportent de manière similaire (espèces généralement radicalaires, pouvoir oxydant important, générées et régulées par l'organisme) aux ERO vis-à-vis du stress oxydant. **(Smirnoff, 2005).**

Même si les ROS sont formées au cours du métabolisme normal de la plante, l'augmentation de leur concentration intracellulaire est souvent synonyme de stress. En effet, de nombreux stress (par exemple, la sécheresse, la salinité, les chocs thermiques, l'attaque d'un pathogène, les UV, les polluants atmosphériques ou encore les ETM) sont capables d'induire une production accrue de ROS. **(Noctor et Foyer, 1998; Van Breusegem et al, 2001).**

2.1. Formation des espèces réactives de l'oxygène :

Le métabolisme cellulaire chez les végétaux produit à l'état physiologique plusieurs variétés d'ERO. Dans le cas d'un stress oxydatif, ces ERO peuvent être modulés qualitativement et quantitativement. Tous les ERO ne sont pas extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Parmi les radicaux formés chez les végétaux on distingue. **(Smirnoff et al, 2005) :**

- Anion superoxyde ($^{\circ}\text{O}_2^-$) ;
- Peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ;
- Radical hydroxyle (OH^{\cdot}).

2.2. Sources des espèces réactives de l'oxygène (ROS) :

Chez les plantes, il existe plusieurs sources cellulaires d'espèces réactives de l'oxygène localisées à divers endroits de la cellule **(Pourrut Bertrand, 2008)**, et qui sont produites de façon permanente durant le métabolisme normale et durant les périodes de stress. Ces sources incluent :

- ❖ Les chaînes de transport d'électrons (CTE) des chloroplastes;
- ❖ Les chaînes de transport d'électrons (CTE) des mitochondries;
- ❖ Certaines enzymes comme le glycolate oxydase, la xanthine oxydase et les enzymes de l'oxydation des acides gras dans le peroxysome;
- ❖ L'amine oxydase et l'oxalate oxydase dans l'apoplaste;
- ❖ Les molécules photosensibilatrices comme la chlorophylle.**(Pourrut Bertrand, 2008).**

Tableau 01: Origines et localisations des espèces réactives de l'oxygène. (Smirnov et al, 2005).

Origine	Localisation	ERO
Photosynthèse, PSI ou PSII	Chloroplaste	O ₂ [°]
Respiration (transport d'électrons)	Mitochondrie	O ₂ [°]
Glycolate oxydase	Peroxisome	H ₂ O ₂
Chlorophylles excitées	Chloroplaste	O ₂ [°]
NADPH oxydase	Membrane cellulaire	O ₂ [°]
b-oxydation des acides gras	Peroxisome	H ₂ O ₂
Oxalate oxydase	Apoplaste	H ₂ O ₂
Xanthine oxydase	Peroxisome	O ₂ [°]
Peroxydases, Mn ⁺² et NADH	Membrane cellulaire	H ₂ O ₂
Amine oxydase	Apoplaste	H ₂ O ₂ , O ₂ [°]

2.2.1. Chloroplastes et l'appareil photosynthétique :

Le chloroplaste est souvent considéré comme étant la principale source d'ERO chez les organismes photosynthétiques. (Foyer et Noctor, 2003; Edreva, 2005; Asada, 2006).

En effet, de nombreuses situations de stress abiotiques entraînent une inhibition de la photosynthèse et les électrons qui ne participent plus à la fixation du CO₂ vont entraîner la production et l'accumulation de ROS. Durant les conditions de photoinhibition, la carboxylation du ribulose 1,5-biphosphate (RuBP) est inhibée, favorisant son oxygénation et entraînant la production de phosphoglycolate. Celui-ci est transporté vers le peroxysome où il est converti en glyoxylate par la glycolate oxydase, produisant ainsi le peroxyde d'hydrogène. Les chloroplastes et les peroxysomes sont ainsi considérés comme «capteurs» des changements environnementaux (figure 7). Les ROS se comportent donc comme signaux «rédox», dérivés des chloroplastes, et sont susceptibles de réguler l'expression de gènes de la réponse et de l'adaptation au stress. (Parent et al, 2008).

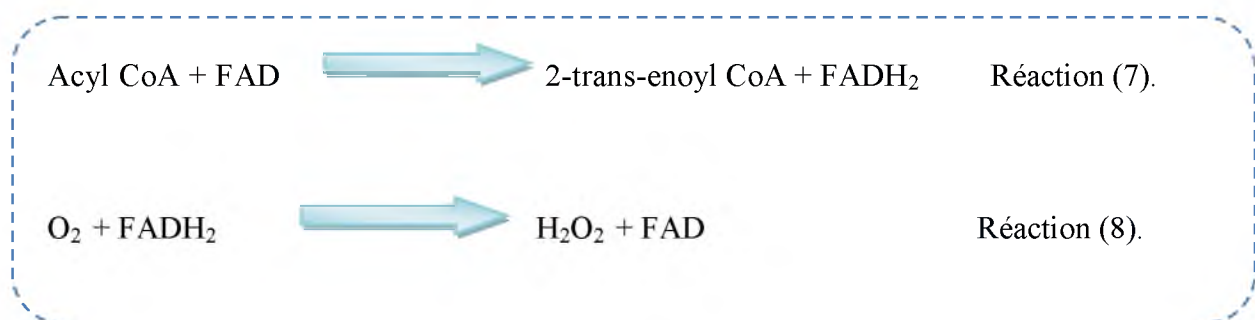
2.2.2. Peroxisomes :

Les peroxysomes sont des vésicules cytoplasmiques minuscules (0,5 µm de diamètre) entourées d'une membrane simple contenant des oxydases et des enzymes spécifiques du métabolisme du peroxyde d'hydrogène.

Ils sont le siège d'une forte activité métabolique très centrée sur le métabolisme oxydatif (Corpas et al., 2001; Nyathi et Baker, 2006), et ils possèdent de nombreux systèmes antioxydants et prooxydants.

2.2.2.1. β -oxydation:

La β -oxydation est un processus fondamental et commun chez les animaux, les levures et les plantes. Les composés dérivés de la β -oxydation sont impliqués dans un très grand nombre de processus cellulaires parmi lesquels l'oxydation de l'acyl CoA par la l'acyl CoA-oxydase qui entraîne la réduction du FAD en FADH₂ (Baker et al, 2006). La régénération du cofacteur s'effectue par la réduction d'une molécule d'O₂ entraînant la formation d'H₂O₂. (Foerster et al, 1981; Baker et al, 2006).



2.2.2.2. Photorespiration:

La photorespiration est un processus vital pour les plantes. Bien qu'il apparaisse comme un mécanisme coûteux en énergie et peu rentable, ce mécanisme physiologique remplit le rôle de «soupape de sécurité» du photosystème, en évitant la saturation de la CTE chloroplastique. (Pourrut Bertrand, 2008).

La photorespiration est un processus complexe illustrant bien les échanges de métabolites entre les différents composants cellulaires. Elle se déroule dans quatre compartiments cellulaires : chloroplastes, peroxyosomes, mitochondries (figure 3), auxquels s'adjoint le cytosol en tant qu'un milieu de transit. (Pourrut Bertrand, 2008).

2.2.3 Mitochondries et chaîne respiratoire:

Chez les animaux, les mitochondries constituent la source principale de ROS. Chez les plantes, la production de ROS par les mitochondries a été historiquement minimisée par rapport à celle des chloroplastes. Cependant, avec l'identification de l'alternativen oxydase (AOX), la mitochondrie pourrait devenir un facteur important dans la régulation du stress oxydatif chez les plantes. (Parent et al, 2008).

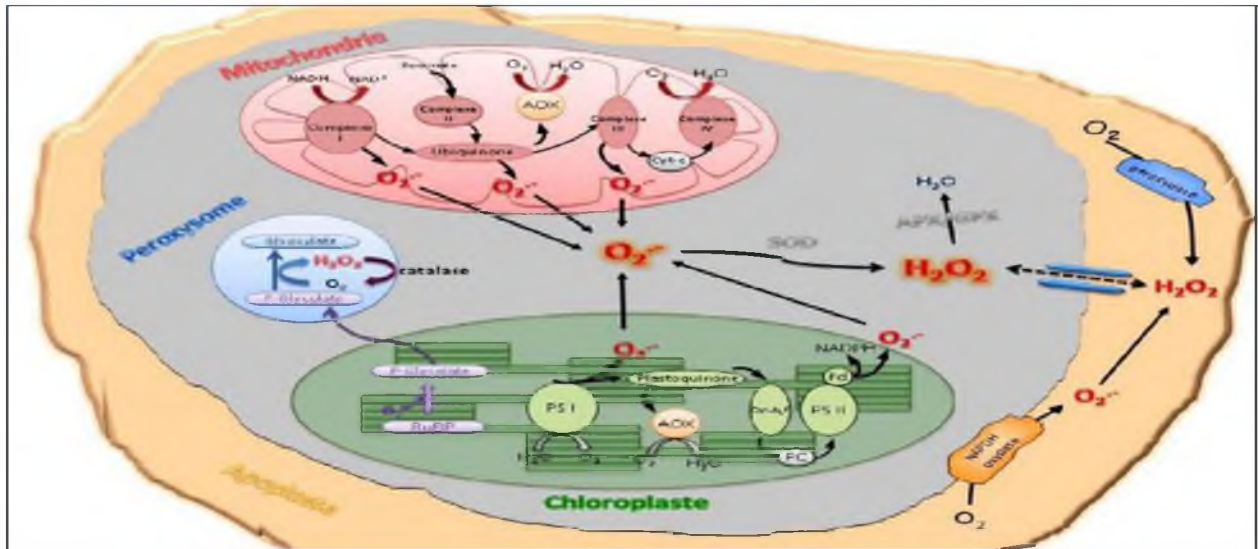


Figure 7: Sites de production intra-organites des formes réactives de l'oxygène dans la cellule végétale. (Bolwell et al, 2002). APX: ascorbate peroxydase; PSI: photosystème I; PSII : photosystème II ; AOX : alternative oxydase ; Fd : ferodoxyne (RuBP) ribulose 1,5-biphosphate.

3. Cibles cellulaires des ERO:

Du fait de leur grande réactivité, les ERO peuvent endommager les constituants biologiques essentiels tels que l'ADN, les lipides et les protéines et sont donc potentiellement toxiques. (Céline Haton, 2005).

3.1. Peroxydation lipidique (lipoperoxydation):

La Peroxydation lipidique est un effet majeur des radicaux libres. La plupart des membranes des cellules sont riches en acides gras polyinsaturés, et sont donc très sensibles au stress oxydant. La plupart des aldéhydes produits après lipopéroxydation sont très réactifs et peuvent être considérés comme des seconds messagers toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Les aldéhydes les plus étudiés sont le 4-hydroxynonéal (4-HNE) et le dialdéhyde malonique(MDA).

Certains produits de la peroxydation contribuent à l'adaptation des organismes aux conditions de l'environnement ou encore à la différenciation cellulaire. (Céline Haton, 2005).

Ce processus se déroule en trois phases (Spiteller, 1998) (figure 8):

- Phase d'initiation ;
- Phase de propagation ;
- Phase de terminaison.

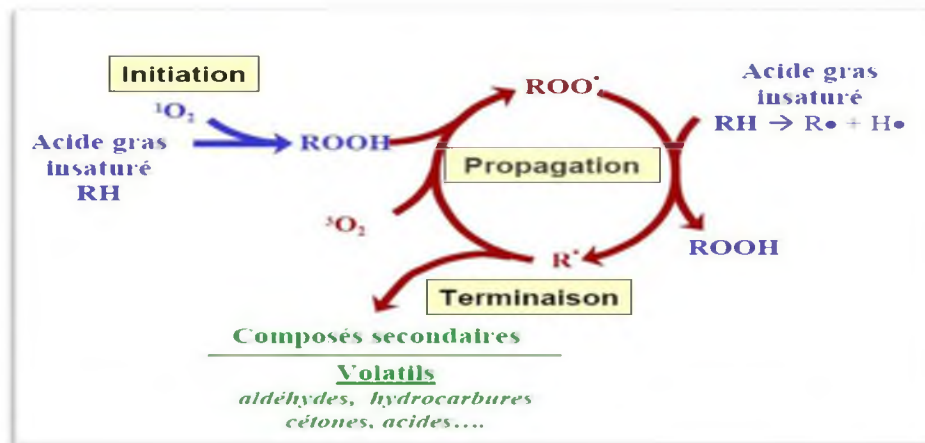


Figure 8: Les différentes étapes de la peroxydation lipidique. (Spiteller, 1998).

3.2. Oxydation des protéines :

Les ERO sont en effet capables de réagir avec différents acides aminés des chaînes de protéines, altérant également leur fonction. Les protéines les plus touchées sont celles comportant un groupement sulphydryle (-SH), comme c'est le cas pour de nombreuses enzymes et protéines de transport (Stadtman et Levine, 2000). Le peroxyde d'hydrogène, mais surtout le radical hydroxyle sont capables d'oxyder ces groupements, conduisant à l'inactivation de certaines enzymes. En particulier, la présence de radicaux hydroxyles est à l'origine de dégradations irréversibles des protéines, par la formation de groupements carbonyles sur la chaîne latérale de certains acides aminés.

3.3. Oxydation de l'ADN :

L'oxydation des différents constituants de l'ADN induit la formation de 4 grandes classes de lésions:

- Les modifications des bases nucléiques.
- Les sites abasiques.
- Les pontages et les cassures de chaînes (simple et double brins).

Les ERO sont à l'origine d'une grande variété de dommage des bases, comme la 8-oxo-7,8-dihydroxy-guanine (8-oxoG).

Par ailleurs, dans la chaîne des réactions, des méthylations au niveau des bases sont observées. La conséquence de ces altérations sera une erreur de lecture lors de la transcription. (Céline Haton, 2005).

4. Mécanismes de défense contre le stress oxydatif:

Le stress oxydant, conséquence naturelle du métabolisme de l'oxygène, est normalement contrôlé par des systèmes endogènes de défense antioxydante. Les antioxydants cellulaires peuvent être enzymatiques ou non-enzymatiques. Généralement, l'augmentation des activités des enzymes impliquées dans les réactions de défense semble être liée à l'espèce

ou à la variété végétale utilisée, aux conditions physiologiques de la plante utilisée, ou encore au type de stress oxydant appliqué. (Souguir Dalila, 2009).

4.1. Systèmes antioxydants enzymatiques:

4.1.1. Le superoxyde dismutase :

Le rôle déterminant du superoxyde dismutase (SOD) dans les systèmes de défense antioxydante de l'organisme est connu depuis 1968. On sait que l'ion superoxyde (O_2°) est le point de départ de la chaîne de production des radicaux libres. Or, dès ce stade précoce, le superoxyde dismutase inactive l'ion superoxyde en le transformant en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Celui-ci est ensuite rapidement catabolisé par la catalase et les peroxydases en dioxygène (O_2) et en molécules d'eau (H_2O). (Souguir Dalila, 2009).

4.1.2. Catalase :

La catalase possède comme cofacteur le fer et elle dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène. Cette protéine est un homotétramère de 56kDa. La catalase est essentiellement localisée dans les peroxysomes. (Céline Haton, 2005).

4.1.3. La glutathion peroxydase (GPX):

La glutathion peroxydase ou GPX est une enzyme tétramérique permettant également la décomposition du H_2O_2 . Elle agit plus lentement que la catalase mais elle a une meilleure affinité pour le H_2O_2 que cette dernière. La GPX est donc essentielle à la décomposition du H_2O_2 produit de manière continue et à des niveaux physiologiques dans la cellule. Les GPX sont des enzymes sélénium-dépendantes. (Jean-Philippe, 2012).



4.1.4. L'ascorbate peroxydase (APX):

L'ascorbate peroxydase (APX) est une enzyme impliquée dans l'élimination du peroxyde d'hydrogène lors d'un stress oxydant. C'est une enzyme clé du cycle ascorbate-glutathion



Chez les plantes supérieures, l'activité APX est localisée à la fois au niveau des chloroplastes (chAPX) et du cytosol (cytAPX). (Souguir Dalila, 2009).

4.1.5. La glutathion réductase (GR):

La glutathion réductase (GR) joue un rôle essentiel dans la protection des chloroplastes contre le dommage oxydant en maintenant un rapport GSH/GSSG élevé (Mishra et al, 2006).

Cette enzyme catalyse la réduction de GSSG en GSH (glutathion réduit) selon la réaction suivante:



4.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques :

Avant d'introduire les systèmes enzymatiques, il est important de noter qu'il existe également des systèmes non-enzymatiques de dégradation des EOR. Il s'agit le plus souvent du glutathion, de l'ascorbate, les Flavonoïdes, et des caroténoïdes. **(Filipe Gama, 2010).**

4.2.1. Flavonoïdes:

Les flavonoïdes, classe importante des polyphénols, sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques telles que: les activités antivirales, anti-inflammatoires et anticancéreuses. Ces activités sont attribuées, en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres.

Les flavonoïdes peuvent agir de différentes façons dans les processus de régulation du stress oxydant par :

- Capture directe des espèces réactives de l'oxygène,
- Chélation de métaux de transition comme le fer (empêchant ainsi la réaction de Fenton),
- Inhibition de l'activité de certaines enzymes responsables de la production des ERO.

(Benahmed Fatiha, 2010).

4.2.2. Les caroténoïdes:

Les caroténoïdes sont divisés en deux familles: les carotènes qui sont formés de 40 atomes de carbone et les xanthophylles qui, en plus, comportent un ou deux atomes d'oxygène. Au niveau du chloroplaste, les caroténoïdes, en plus de capter l'énergie lumineuse protègent les photosystèmes. **(Michel Vincent, 2006).**

4.2.3. L'acide ascorbique:

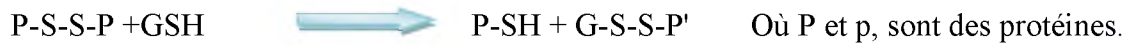
L'acide ascorbique, communément appelé vitamine C, joue plusieurs rôles au sein de la cellule. Il se retrouve tant au niveau du chloroplaste, du cytoplasme, de la mitochondrie **(Horemans et al, 2000)**. C'est un antioxydant puissant qui réagit rapidement avec le radical superoxyde, l'oxygène singulet, l'ozone et le peroxyde d'hydrogène. **(Michel Vincent, 2006).**

4.2.4. Le glutathion :

Le glutathion (GSH) est un tri-peptide formé dans l'ordre des acides aminés suivants: l'acide glutamique, la cystéine et la glycine. Son pouvoir réducteur réside dans le groupement thiol (SH) de la cystéine. Le glutathion est présent au niveau du cytosol et du chloroplaste où

il réagit avec l'oxygène singulet, l'anion superoxyde et le radical hydroxyl en plus d'être utilisé comme coenzyme afin d'exploiter son pouvoir réducteur.

Le glutathion agit de deux façons, soit par l'activité de la glutathion S-transférase qui catalyse l'échange intermoléculaire des groupements thiols entre une protéine dont les thiols sont oxydés et le glutathion selon le mécanisme suivant (**Michel Vincent, 2006**):



Chapitre 3:

Matériels et méthodes

1. Matériel biologique :

Le matériel expérimental utilisé dans notre travail c'est une plante aquatique la lentille d'eau :

1.1. *Lemna minor* :

Lemna minor est un macrophyte flottant qui appartient à la famille des *Lemnaceae*. Cette lentille d'eau est principalement présente dans les milieux aquatiques de type lentique des zones tempérées de l'hémisphère Nord et est très représentative des cours d'eau français (**Bodo et al, 2005**). Elle se présente sous la forme de colonies (libres ou reliées entre elles par un fin pétiole) composées au minimum, de 2 à 4 feuilles aplaties et lenticulaires de taille réduite (2 à 4 mm). Chacune possède une racine filiforme, transparente et d'un fin diamètre : La taille des racines (de 1mm à 5 cm) est fortement liée à la disponibilité en éléments trophiques (azote et phosphore) dans le milieu aquatique. (**MATE, 1997; Cauzzi, 2007**).

Bien qu'une reproduction sexuée soit possible, elle est très rare et ces végétaux se reproduisent la plupart du temps par multiplication végétative sous la forme de bourgeonnements successifs latéraux. Chaque fronde mère peut donner naissance à 10 à 20 frondes et a une durée de vie limitée de 3 à 7 semaines, d'où le caractère parfois envahissant du développement de ces végétaux. (**Cauzzi, 2007**).

L. minor a une forte affinité vis-à-vis des milieux aquatiques riches en azote et phosphore, un développement important de ces macrophytes pouvant être le signe de la mise en place d'un état eutrophe.



Figure 09 : Lentille d'eau (*Lemna minor*). (**Cauzzi, 2007**).

1.2. Classification et taxonomie :

Règne plantae : Plantes

Sous-règne : Tracheobionta

Division magnoliophyta : angiospermes, phanérogames

Classe liliopsida : Monocotylédones

Sous-classe : Alismatidae

Ordre : Alismatales

Famille : Araceae

Genre : *Lemna*

Espèce : *Minor*

1.3. Répartition et écologie de l'espèce:

Lemna minor est présente presque partout dans le monde. Elle est largement répandue dans toute l'Amérique du nord, sauf dans l'extrême nord et dans les Bahamas. On la trouve aussi en Europe, en Asie, en Afrique et en Australie. En Amérique du nord, on la trouve de terre-neuve à l'Alaska et au sud jusqu'en Californie, au Texas et en Floride. (**Godfrey et wooten, 1979**).

1.4. Facteurs importants pour la croissance des lentilles d'eau :

La croissance des lentilles d'eau est régie par l'ensemble des facteurs biotiques et abiotiques de l'environnement où elles évoluent. Toutefois, la température et l'ensoleillement semblent y jouer un rôle plus important que celui des concentrations des nutriments. En conditions optimales, leur biomasse peut doubler en deux jours ;

1.4.1. Température :

Les lentilles d'eau utilisées dans le traitement des eaux usées sont capables de se reproduire à des températures allant de 5 à 30°C. Elles subissent un stress entre 31 et +35°C, et une forte inhibition de la photosynthèse à 45°C.

Dans les régions où la température peut descendre en dessous de zéro pour une partie de l'année, elles coulent au fond du plan d'eau et demeurent inactives sous une forme appelée turion jusqu'à que les conditions redeviennent plus propices à leur croissance.

1.4.2. Ensoleillement :

La croissance des lentilles d'eau dépend de l'intensité et de la photopériode de l'ensoleillement auquel elles sont exposées. Les rendements de la photosynthèse et de la photorespiration atteignent leurs valeurs maximales au début de l'après-midi et leurs valeurs minimales le soir (36 à 60% de la valeur maximale). Dans l'hémisphère Nord, la croissance de

ces plantes est optimale durant la période allant de mi-juin au début de septembre, elle s'étale par contre sur toute l'année dans les régions ayant un climat tropical ou tempéré.

1.4.3. Présence d'inhibiteurs :

Les eaux usées agricoles et industrielles contiennent des quantités importantes de métaux liés aux polluants organiques, bien que la présence de métaux en traces soit indispensable dans le processus de croissance des plantes, des concentrations élevées peuvent occasionner des phénomènes d'inhibition et de toxicité et donc limiter l'efficacité du traitement. Les lentilles d'eau peuvent tolérer des concentrations de métaux plus ou moins importantes selon le type de métal.

L'utilisation des tests vis-à-vis des lentilles d'eau en écotoxicologie est très intéressante du fait de leur sensibilité à de nombreux polluants, de leur culture relativement facile et des possibilités qu'elles offrent de tester des effluents colorés, turbides ou encore chargés en MES. (Wang, 1991).

1.5. Conditions de l'expérimentation :

L'expérience est réalisée en laboratoire de toxicologie, dans des conditions in vitro. Les lentilles d'eau *Lemna minor* utilisées dans cette étude ont été récoltées de la région d'El teref et ils ont été placés dans milieu pour la réalisation de deux lots afin de réaliser les dosages biochimiques:

Milieu 01 (Témoin): dans lequel nous avons utilisé l'eau distillée.

Milieu 02 (Traité) : nous avons utilisé l'eau d'Oued Mellague (l'Aouinet) en raison de leur forte pollution.

En ayant effectué trois répétitions par paramètres étudiés. Qui ont été mesuré selon trois dates:

- La première date: Après 5 jours de traitement.
- La deuxième date: après 20 jours de traitement.
- La troisième date: après 25 jours de traitement.

1.5.1. Solution de Knop:

Il faut utiliser la solution de Knop pour cultiver la plante de *L. minor* :

La solution de Knop (ou liquide de Knop) a été inventée par le chimiste allemand *Wilhelm Knop* (1817-1891). Il contient les 4 éléments dont les symboles chimiques mis à la suite forment le nom de celui-ci : K (potassium), N (azote), O (oxygène), P (phosphore).

Le liquide de Knop est engrais mis au point pour obtenir une croissance optimale des plantes en laboratoire. Il est composé de divers sels minéraux dissous dans l'eau : nitrate de

calcium, nitrate de potassium; sulfate de magnésium, phosphate monopotassique, sulfate ferrique. (Bruchhauser, 2010).

Pour préparer 1 L de solution de knop, on ajoute les ingrédients suivants à 1L d'eau distillée:

Tableau 02 : Composition chimique de solution de knop, utilisé pour la culture de *Lemna minor*.

Composition chimique	Concentration g/L
nitrate de calcium (CaNO ₃)	1
nitrate de potassium (KNO ₃)	0,25
sulfate de magnésium (MgSO ₄)	0,25
phosphate monopotassique ou dihydrogénophosphate (KH ₂ PO ₄)	0,25
sulfate ferrique (FeSO ₄)	0,05

✓ Les substances utilisées doivent être de qualité réactif. Le liquide est agité jusqu'à dissolution complète du contenu.

Il existe différentes sortes de liquides de Knop. Ces différentes solutions ne possèdent pas de source de carbone. Elles permettent d'expérimenter les exigences des plantes en faveur de tel ou tel élément non carbonaté.

2. Prélèvement de l'eau :

Des échantillons d'eau ont été prélevés d'Oued Mellague qui coule sur une longueur environ de 153 km depuis sa source à djebel Tadinart au Sud-ouest jusqu'à la frontière algéro-tunisienne au Nord-est, il couvre une superficie de 4307 km².

Cet oued est situé dans la zone des hautes plaines. Les eaux distillées sont directement prélevées de distillateur.



Figure 10 : Station d'échantillonnage d'Oued Mellague.

3. Méthode de dosage :

3.1. Paramètres biochimiques

3.1.1. Extraction et Dosage de la Chlorophylle:

Nous avons utilisé la méthode établie par **Holden (1965)** pour l'extraction de la chlorophylle. Le traitement de tous les échantillons se fait comme suit :

On pèse 100mg des feuilles/racines de *lemna minor* sont broyées dans un mortier avec 2.5 ml d'acétone à 80% (CH₃COCH₃) et une pincée de carbonate de calcium (CaCO₃).

Après broyage total, la solution est filtrée et conservée à l'obscurité dans des boîtes noires pour éviter l'oxydation de la chlorophylle par la lumière. Le dosage se fait par un prélèvement de 2.5 ml de la solution dans la cuve à spectromètre, ce dernier est de type «**Spectrophotomètre Jenway 6300**».

Les échantillons sont ensuite analysés par spectrophotométrie à deux longueurs d'onde différentes (645 et 663 nm) en utilisant l'acétone 80% comme blanc.

Le contenu en chlorophylle (a et b et a+b) a été déterminé à l'aide des équations suivantes. (**Bassa et al. 2012**).

$$\text{Chl a} = 12,7 (\text{DO663}) - 2,69(\text{DO645})$$

$$\text{Chl b} = 22,9 (\text{DO645}) - 4,86(\text{DO663})$$

$$\text{Chl a+ b} = 8,02 (\text{DO663}) + (20,20 (\text{DO645}))$$

3.1.2. Dosage des protéines totales:

La méthode utilisée pour le dosage des protéines totales est celle de Bradford (**Bradford, 1976**) qui utilise la BSA (Sérum Albumine Bovine) comme standard. C'est une méthode colorimétrique basée sur l'absorption du colorant Bleu de Coomassie G250, en milieu acide, sur les groupements basiques et/ou aromatiques des protéines et une mesure au spectrophotomètre à 595 nm.).

Le calcul des concentrations se fait par l'équation déduite de la gamme d'étalonnage réalisé à partir d'une solution d'albumine de sérum de bœuf

Le dosage des protéines est effectué avec une fraction aliquote de 100µl.

Les densités optiques sont mesurées grâce à un spectrophotomètre (**Jenway-6300**).

La quantité des protéines a été déterminée à partir de la formule :

$$Y = b + a X$$

Y : densité optique

X : quantité de protéines en (µg/mg MF).

(a et b voir les annexes)

3.1.2.1. La gamme d'étalonnage :

La gamme est réalisée à partir d'une solution mère d'albumine de sérum de bœuf (BSA) à 1mg/ml d'eau distillée.

Tableau 03 : Gamme d'étalonnage d'une solution de protéine :

Tubes	01	02	03	04	05	06
Solution d'albumine BSA (µl)	00	20	40	60	80	100
Eau distillée (µl)	100	80	60	40	20	00
BBC (ml)	4	4	4	4	4	4

3.2. Paramètres enzymatiques

3.2.1. Dosage de l'activité enzymatique de la glutathion peroxydase (GPX) :

L'activité enzymatique de la GPX est mesurée par la méthode de **Flohe et Gunzler (1984)**. En utilisant l' H_2O_2 comme substrat.

L'extraction de l'enzyme : On pèse 500mg des feuilles/racines de *lemna minor* sont broyées à froid à l'aide d'un mortier par le tampon TBS (Tris 50mM, NaCl 150Mm, pH=7,4) pour obtenir un homogénat.

-Prélever 0,2 ml de l'homogénat puis ajouter 0,4ml de GSH (glutathion forme réduite à 0,1mM) et 0,2ml de tampon de l'extraction. Incubation au bain marie à 25°C pendant 05 min. Ajouter 0,2ml de H_2O_2 (1,3mM) pour initier la réaction, laisser agir 10min. Arrêter la réaction par addition de 1ml de TCA (1% Acide Tri Chloro-accétique). Mettre le mélange dans la glace pendant 30 min. Centrifuger durant 10 min à 3000t/min.

-Prélever 0,48ml de surnageant, ajouter 2,2ml de TBS et 0,32ml de DTNB (1mM), mélanger et après 5 min lire les densités optiques à 412nm. (**Flohe L. Gunzler W.A ,1984**).

-la détermination (calcul) de l'activité de la GPX se fait de la façon suivante :

Activité de GSH consommée/min/gr de protéine.

$X = (\text{DO}_e - \text{DO}_b) \times 0,04 / \text{DO}_b = \text{quantité de GSH réduite disparue (oxydée) dans 0,2 extrait dans 1ml.}$

L'activité de la GPX = la quantité de GSH réduit disparue x 5/ [protéines].

- **DO_e** : la densité optique d'échantillon.
- **DO_b** : la densité optique de blanc.

4. Les Paramètres morphologiques :

Cet essai est réalisé pour évaluer l'effet des eaux usées provenant d'Oued Mellague sur la croissance de populations de lentilles d'eau après séjours de ces derniers une durée de 15 jours et en fonction de deux critères : le taux de croissance, le nombre et les longueurs des frondes et des racines.

4.1. Protocole :

Les cultures utilisées dans les essais toxicologiques (c.-à-d. les cultures d'essai) devraient être entreprises 7 à 10 jours avant le démarrage de l'essai. Pour adaptation de la plante avec le nouveau milieu.

✓ Nous avons prélevé 08 plantes de *Lemna minor* des cultures âgées d'une semaine et les transférer dans les boîtes de Pétri (sont choisis en tenant compte de l'uniformité de taille et de couleur), pour chaque lots nous avons faits 5 boites de pétri.

✓ Les cultures sont soumises à deux milieux différents (voir le tableau ci-dessous).

Tableau 04:les milieux de cultures.

	Milieu de Culture		Nbr des plantes
	Composition	Volume total (ml)	
Culture 1 (témoin)	Eau distillé	15	08
	Liquide de Knop	15	
Culture 2 (traité)	Eau pollué	15	08
	Liquide de Knop	15	

✓ Les résultats sont exprimés en reportant le nombre et les longueurs des feuilles, et des racines en fonction du temps (après 15, 18, 21, 24 et 27 jours de traitements).

5. Les analyses physico-chimiques des eaux :

La répartition spatiale des paramètres physico-chimiques basés sur les résultats des analyses des eaux usées provenant d'Oued Mellague avant et après le traitement par *lemma minor*, permet de mettre en évidence l'évolution de chaque élément et d'estimer l'origine des minéralisations.

Ainsi l'analyse des paramètres chimiques montre que les eaux d'oued Mellague caractérisées par l'abondance des ions (Mg^{+2} , Cl^- , Ca^{2+} , PO_4^{3-}).

Chapitre 4:

Résultats et Discussion

1. Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique grâce au logiciel Minitab 16. Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart type ($m \pm SD$). Le test T de Student et une analyse de la variance ANOVA (AV1) à un critère de classification sont effectuées. Le seuil de signification est $\alpha \leq 0.05$. (Dagnelie, 1999).

2. Résultats :

Dans cette partie nous avons représenté les principaux résultats obtenus concernant les essais réalisés au laboratoire, sur les paramètres enzymatiques (**la GPX**), biochimiques(**les protéines, La chlorophylle**), et morphologiques (**nombre des racines et des feuilles, longueurs des racines et diamètres des feuilles**).

2.1. Les protéines totales :

La figure (11) illustre les effets des eaux usées sur la teneur en protéine totale chez la lentille d'eau *Lemna minor*, l'analyse de la variance ANOVA à un critère de classification (**Tableau 06**), montre une augmentation de la production des protéines totales hautement significative ($p \leq 0.01$) par rapport au témoin après 15, 20 jours de traitement. Après 25 jours de traitement. On note une diminution très hautement significative ($p \leq 0.000$) des traités par rapport au témoin.

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 20 jours de traitement. En effet le taux de protéines est de l'ordre de (92,31/ 102,83/62,22 $\mu\text{g}/\text{mg}$) chez les feuilles des plantes traités pendant 15, 20,25 jours en ordre, alors que chez les témoins ne dépasse pas 89,80 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Le test T de Student entre les témoins (Tm) et les traités donne des différences significative à très hautement significatives.

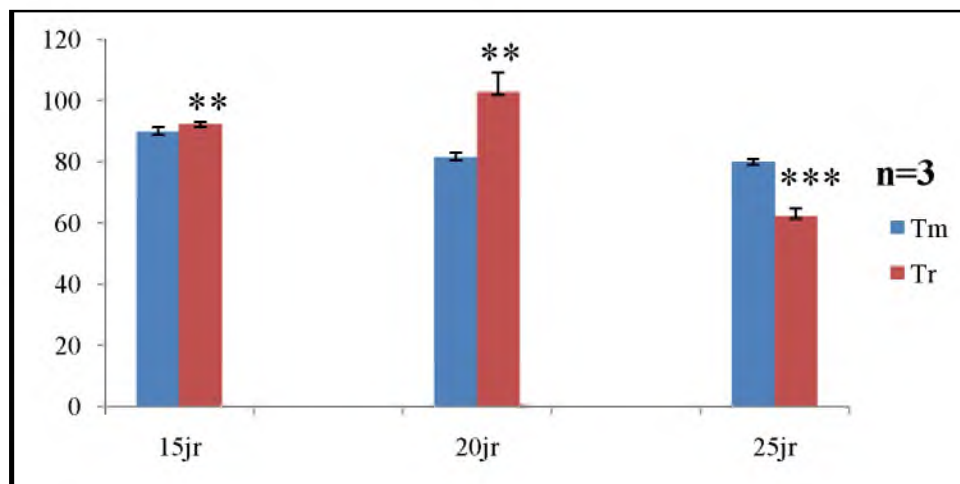


Figure 11: les effets des eaux usées sur la teneur en protéines totale ($\mu\text{g}/\text{mg}$) chez la lentille d'eau *Lemna minor* (Tr : Traitée) et (T : Témoin) en fonction du temps.

Tableau05: les moyennes des taux de protéines totales en ($\mu\text{g} / \text{mg}$ de PF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr	Ecartype Tr	Test. T
15jr	89,7996	$\pm 1,42100$	92,3111	$\pm 0,60268$	P=0,013**
20jr	81,3322	$\pm 1,54997$	102,835	$\pm 6,29306$	P=0,003**
25jr	80,0132	$\pm 0,86494$	62,218	$\pm 2,43497$	P=0,0002***

Tableau 06: Analyse de la variance à un critère de classification du taux de protéines totales en ($\mu\text{g} / \text{mg}$ de PF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).

Source	ddl	SCE	CM	F _{obs}	P
Date	2	2235,4	1117,7	13,62	0,000***
Erreur	21	1723,8	82,1	-	-
Total	23	3959,2	-	-	-

- **ddl** : degré de liberté ; **SCE** : somme des carrés des écarts ; **CM** : carré moyen ; **F_{obs}** : test de Fisher ; **P** : seuil de signification.

2.2. Les chlorophylles a, b et a+b :

2.2.1. La chlorophylle a:

La figure (12), illustre les effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle *a* chez «*Lemna minor* ». L'analyse de la variance ANOVA à un critère de classification (**tableau 08**), a montré qu'après 15 jours de traitement on remarque une augmentation non significative des traités par rapport au témoin; Après 20 jours de traitement. On note une augmentation hautement significative des traités par rapport au témoin; Après 25 jours de traitement. On note une diminution non significative des traités par rapport au témoin.

Le test T de Student entre les témoins (Tm) et les traités (Tr) donne des différences significatives à très significatives.

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 20 jours de traitement. En effet le taux de chlorophylle *a* est de l'ordre de 4,0989 mg/g de PF chez Tr, et de 3,7544 mg/g de PF chez les témoins.

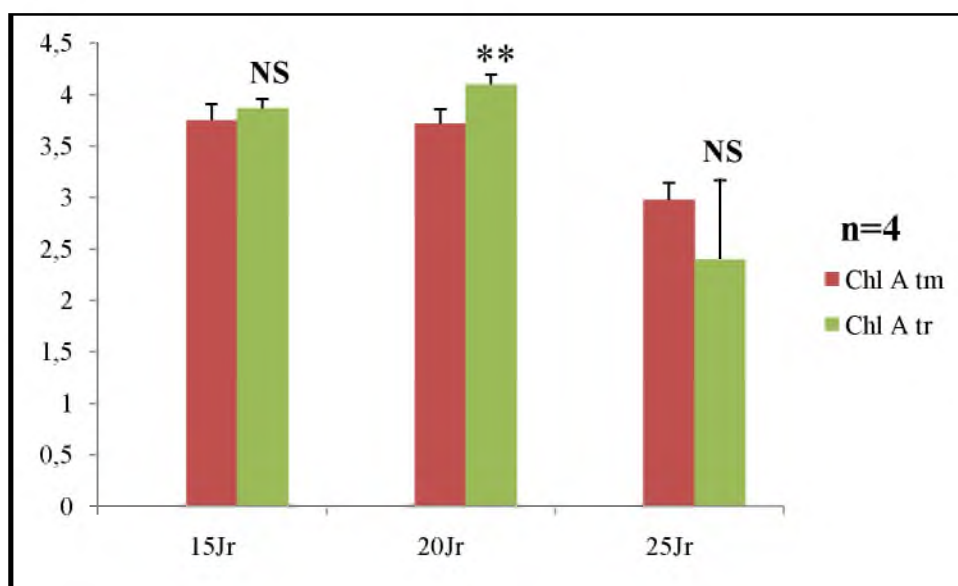


Figure 12: les effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle *a* en (mg /g) chez les feuilles de *lemna minor* (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

Tableau 07: les taux des chlorophylles a en (mg /g de PF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr	Ecartype Tr	Test. T
15 Jr	3,74865	±0,15358	3,865725	±0,09049	P=0,42NS
20 Jr	3,7544	±0,13804	4,0989	±0,09154	P=0,0058**
25 Jr	2,9756	±0,16050	2,399475	±0,76564	P=0,11NS

Tableau 08: Analyse de la variance à un critère de classification du taux de chlorophylle a en (mg /g de PF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).

Source	ddl	SCE	CM	Fobs	P
date	2	7,353	3,677	5,76	0,010**
Erreur	21	13,395	0,638	-	-
Total	23	20,748	-	-	-

- **ddl** : degré de liberté ; **SCE** : somme des carrés des écarts ; **CM** : carré moyen ; **Fobs** : test de Fisher; **P** : seuil de signification.

2.2.2. La chlorophylle b:

La figure (13), présente les effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle *b* chez «*Lemna minor* ». Après 15 et 20 jours de traitement on remarque une augmentation non significative des traités par rapport au témoin; Après 25 jours de traitement, On note une diminution hautement significative des traités par rapport au témoin. Ceci est confirmé après l'analyse de la variance ANOVA à un critère de classification (**Tableau 10**).

Le test T de Student entre les témoins (Tm) et les traités (Tr) donne des différences significatives à très hautement significatives.

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 20 jours de traitement. En effet le taux de chlorophylle *b* est de l'ordre de 7,4208 mg/g de PF chez Tr, et de 7,0912 mg/g de PF chez les témoins.

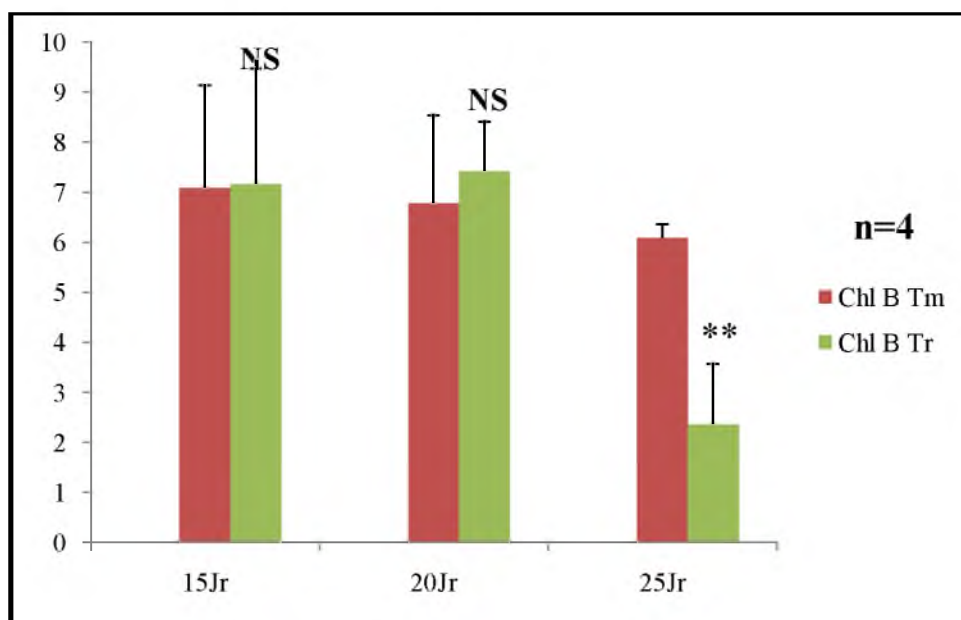


Figure 13: Variation des effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle *b* en (mg /g) chez les feuilles de *lemna minor* (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

Tableau 09: Taux des chlorophylles b en (mg /g de PF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr	Ecartype Tr	Test. T
15 Jr	7,087125	±2,04907534	7,1555	±2,31450572	P=0,383NS
20 Jr	7,09125	±1,74768042	7,4208	±0,98923143	P=0,217NS
25 Jr	6,0806	±0,27679765	2,3628	±1,20270628	P=0,0020**

Tableau 10: Analyse de la variance à un critère de classification du taux de chlorophylle b en (mg /g de PF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).

Source	ddl	SCE	CM	Fobs	P
date	2	61,27	30,64	6,35	0,007**
Erreur	21	101,38	4,83	-	-
Total	23	162,66	-	-	-

- **ddl** : degré de liberté ; **SCE** : somme des carrés des écarts ; **CM** : carré moyen ; **Fobs** : test de Fisher ; **P** : seuil de signification.

2.2.3. Les chlorophylles a+b :

La figure (14), illustre les effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle $a+b$ chez «*Lemna minor* ». Après 15 jours de traitement on remarque une augmentation non significative des traités par rapport au témoin; Après 20 jours de traitement. On note une augmentation hautement significative, après 25 jours on remarque une diminution hautement significative des traités par rapport au témoin. Ceci est confirmé après l'analyse de la variance ANOVA à un critère de classification (**Tableau 12**).

Le test T de Student entre les témoins (Tm) et les traités (Tr) donne des différences significatives et hautement significatives.

Cette augmentation est plus importante après 20 jours de traitement ou le taux de chlorophylle $a+b$ est de l'ordre de 11,514 mg/g de PF chez Tr, alors que chez les témoins ne dépasse pas 10,345mg/g.

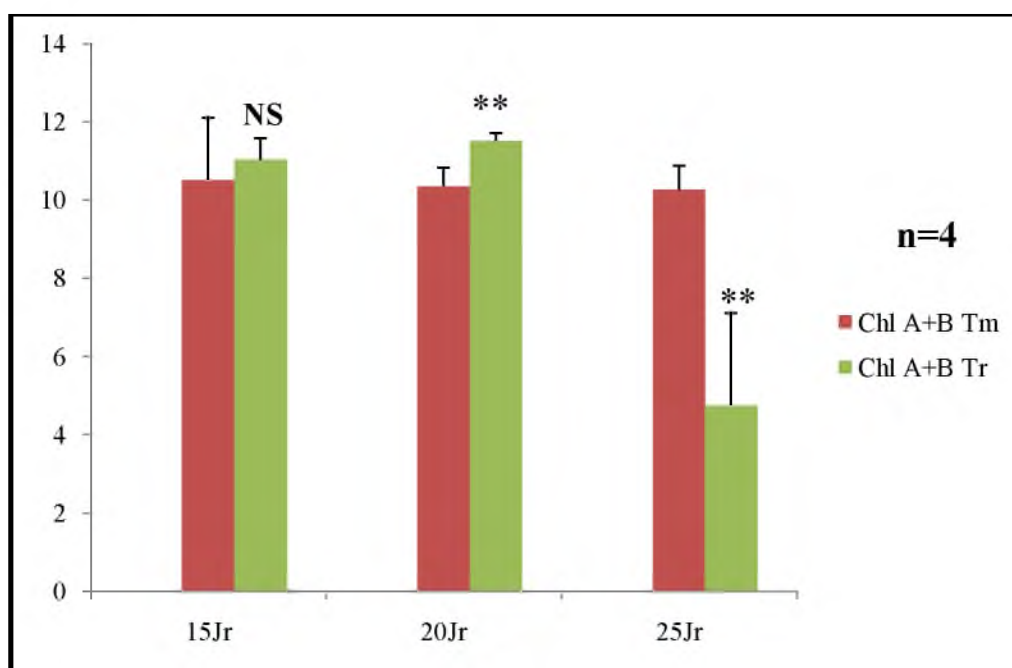


Figure 14: les effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle $a+b$ en (mg /g) chez les feuilles de *lemna minor* (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

Tableau 11: Taux des chlorophylles *a+b* en (mg /g de PF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Té : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr	Ecartype Tr	Test. T
15 Jr	10,50835	±1,58135923	11,0245	±0,55157644	P=0,343NS
20 Jr	10,345325	±0,465635	11,51415	±0,19458182	P=0,00996**
25 Jr	10,257125	±0,61355987	4,736575	±2,36424857	P=0,00490**

Tableau 12: Analyse de la variance à un critère de classification du taux de chlorophylle *a+b* en (mg /g de PF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).

Source	ddl	SCE	CM	F _{obs}	P
Date	2	60,00	30,00	6,72	0,006**
Erreur	21	93,80	4,47	-	-
Total	23	153,80	-	-	-

- **ddl** : degré de liberté ; **SCE** : somme des carrés des écarts ; **CM** : carré moyen ; **F_{obs}** : test de Fisher ; **P** : seuil de signification.

2.3. La glutathion peroxydase (GPX) :

La figure (15) montre les effets des eaux usées sur l'activité de La glutathion peroxydase (GPX), chez *lemna minor*. Elle indique une diminution hautement significative et non significative ($p \leq 0.05$) des traités par rapport au témoin après 15 et 20 jours de traitement, Cet enzyme montre un niveau d'activité inchangé par rapport au témoin, et une augmentation significative ($p \leq 0.05$) des traités par rapport au témoin après 25 jours de traitement, ces résultats sont confirmés par l'analyse de la variance à un critère de classification (**Tableau 14**).

Le test T de Student entre les témoins (Tm) et les traités (Tr) donne des différences significatives à hautement significatives.

Cette augmentation est plus importante durant la première quinzaine ou l'activité de GPX est de l'ordre de 1,92566 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$) de PF chez témoin, par contre chez les traitée est de 1,53856 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$) de PF. après 25 jours l'activité de GPX est de l'ordre de 1,685 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$) chez les Traitées, et de 1,550 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$) chez les témoins.

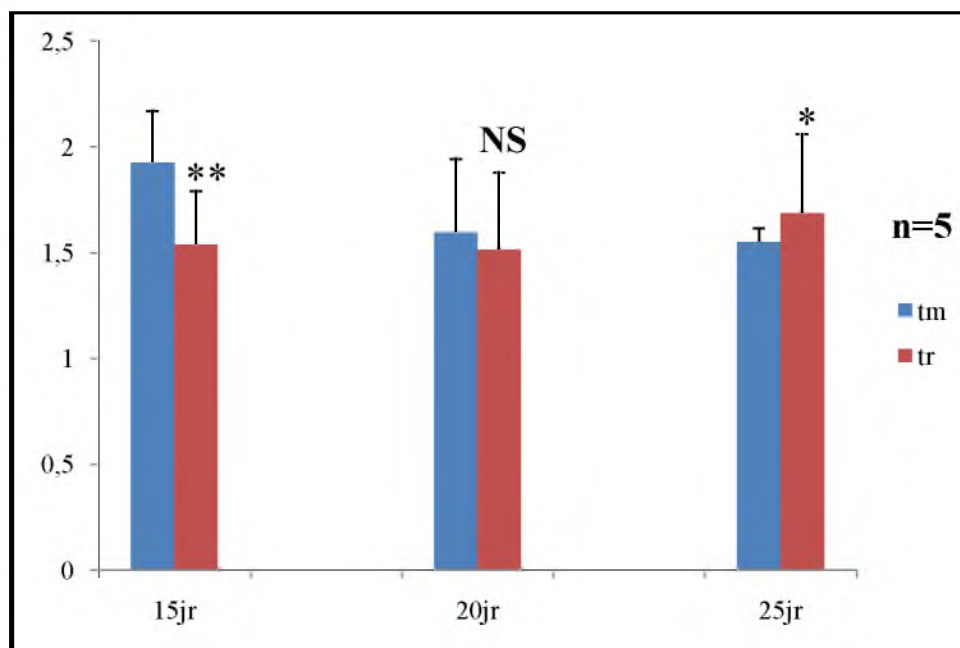


Figure 15: Variations de l'activité de GPX en ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (T : Témoin) en fonction du temps.

Tableau13: L'activité de GPX en ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr	Ecartype Tr	Test .T
15jr	1,92566	$\pm 0,24279$	1,53856	$\pm 0,25115$	P=0,0117**
20jr	1,5960	$\pm 0,346005$	1,514009	$\pm 0,364465$	P=0,4097NS
25jr	1,55094	$\pm 0,06343$	1,685687	$\pm 0,372437$	P=0,0178*

Tableau 14: Analyse de la variance à un critère de classification de l'activité de GPX en ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg Prot}$) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).

Source	ddl	SCE	CM	F _{obs}	P
Date	2	0,693	0,346	2,31	0,119NS
Erreur	27	4,055	0,150	-	-
Total	29	4,747	-	-	-

- **ddl** : degré de liberté ; **SCE** : somme des carrés des écarts ; **CM** : carré moyen ; **F_{obs}** : test de Fisher; **P** : seuil de signification.

2.4. Les tests morphologiques :

2.4.1. Le nombre des feuilles:

La figure (16), indique les effets des eaux usées sur le nombre des feuilles (NF) de *lemna minor*. Après 15, 21, 24 et 27 jours de traitement, l'augmentation du nombre des feuilles est hautement significative ($P \leq 0,01$), Par contre après 18 jours de traitement l'augmentation de NF est non significative ($P \geq 0,05$).

Ces résultats sont confirmés par l'analyse de la variance ANOVA à un critère de classification (**Tableau 16**).

Le test T de Student entre les témoins (Tm) et les traités (Tr) donne des différences significatives (hautement significatives et non significatives).

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 27 jours de traitement. Les moyennes de nombre des feuilles est de l'ordre de 3,25454 chez Traités, et de 2,79592 chez les témoins.

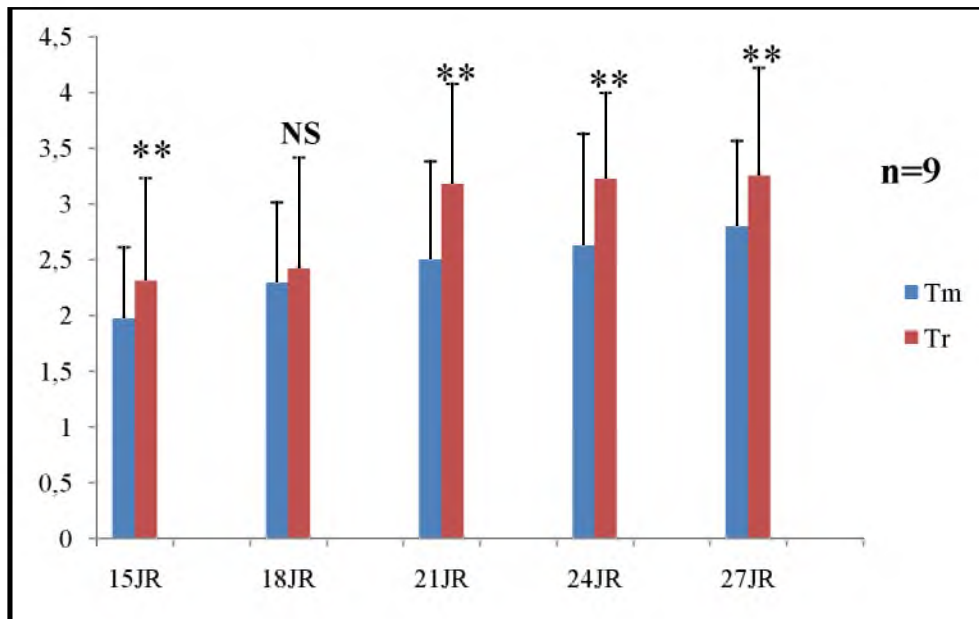


Figure 16: les effets des eaux usées sur le nombre des feuilles (NF) de *lemna minor*. (Tr: Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

Tableau15: les moyennes de nombre des feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr	Ecartype Tr	Test. T
15Jr	1,97101	±0,64102	2,30909	±0,9204	P=0,0104**
18Jr	2,29114	±0,71883	2,42	±0,99160	P=0,3296NS
21Jr	2,5	±0,88055	3,17857	±0,89660	P=0,0063**
24Jr	2,625	±1,00479	3,225	±0,76753	P=0,0022**
27Jr	2,79592	±0,76753	3,25454	±0,96644	P=0,00479**

Tableau 16: Analyse de la variance à un critère de classification de nombre des feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).

Source	ddl	SCE	CM	F _{obs}	P
Date	4	11,95	2,99	2,87	0,029*
Erreur	75	78,00	1,04	-	-
Total	79	89,95	-	-	-

- **ddl** : degré de liberté ; **SCE** : somme des carrés des écarts ; **CM** : carré moyen ; **F_{obs}** : test de Fisher ; **P** : seuil de signification.

2.4.2. Le nombre des racines:

La figure (17), montre les effets des eaux usées sur le nombre des racines (NR) de la lentille d'eau *Lemna minor*. L'analyse de la variance ANOVA à un critère de classification (**Tableau.18**), met en évidence une augmentation non significative ($P \geq 0,05$) de (NR) des traités par apport au témoin après 15 et 24 jours de traitement. Par contre après 18, 21 et 27 jours de traitement, cette augmentation de NR est significative.

Le test T de Student entre les témoins (Tm) et les traités (Tr) donne des différences significatives après 18, 21 et 27 jours et non significatives après 15 et 24 jours de traitement.

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 27 jours de traitement. Les moyennes de nombre des racines est de l'ordre de 1,75 chez Traités, et de 1,64 chez les témoins.

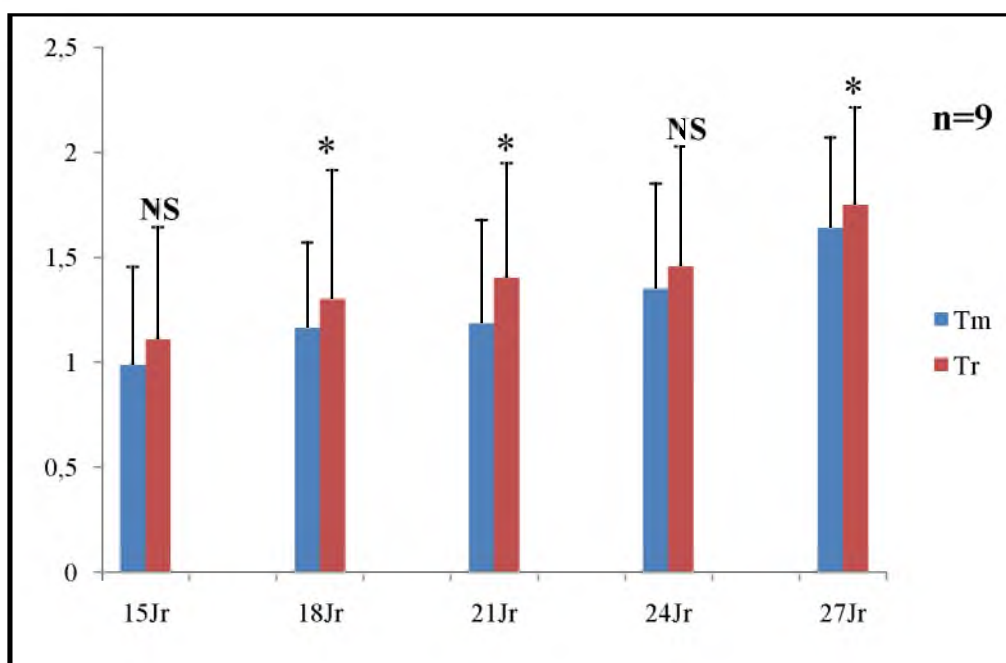


Figure 17: les effets des eaux usées sur le nombre des racines (NR) de *lemna minor*. (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

Tableau17: Le nombre des racines de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr	Ecartype Tr	Test. T
15Jr	0,98551	±0,46944	1,10909	±0,5331	P=0,1789NS
18Jr	1,16456	±0,40606	1,3	±0,6144	P=0,053*
21Jr	1,18571	±0,49028	1,4	±0,54944	P=0,0441*
24Jr	1,35	±0,49982	1,45455	±0,57149	P=0,3091NS
27Jr	1,64	±0,43116	1,75	±0,46409	P=0,035*

Tableau 18: Analyse de la variance à un critère de classification de nombre des racines chez *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).

Source	ddl	SCE	CM	F _{obs}	P
date	4	3,325	0,831	2,22	0,075NS
Erreur	75	28,063	0,374	-	-
Total	79	31,388	-	-	-

- **ddl** : degré de liberté ; **SCE** : somme des carrés des écarts ; **CM** : carré moyen ; **F_{obs}** : test de Fisher ; **P** : seuil de signification.

2.4.3. Le diamètre des feuilles :

La figure (18), indique les effets des eaux usées sur le diamètre des feuilles (DF) de *lemna minor*. Après 15 et 18 jours de traitement, l'augmentation de la longueur des feuilles est très hautement significative ($P \leq 0,000$), après 21 jours de traitement l'augmentation de DF est significative ($p \leq 0,05$) des traités comparativement au témoin, à 24 et 27 jours de traitement l'augmentation de DF est hautement significative et non significative par rapport au témoin, ces résultats sont confirmés par l'analyse de la variance ANOVA à un critère de classification (**Tableau 20**).

Le test T de Student entre les témoins (Tm) et les traités (Tr) donne des différences significatives à très hautement significatives.

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 27 jours de traitement. Les moyennes de diamètre des feuilles est de l'ordre de 3,4 mm chez Traités, et de 2,9818 mm chez les témoins.

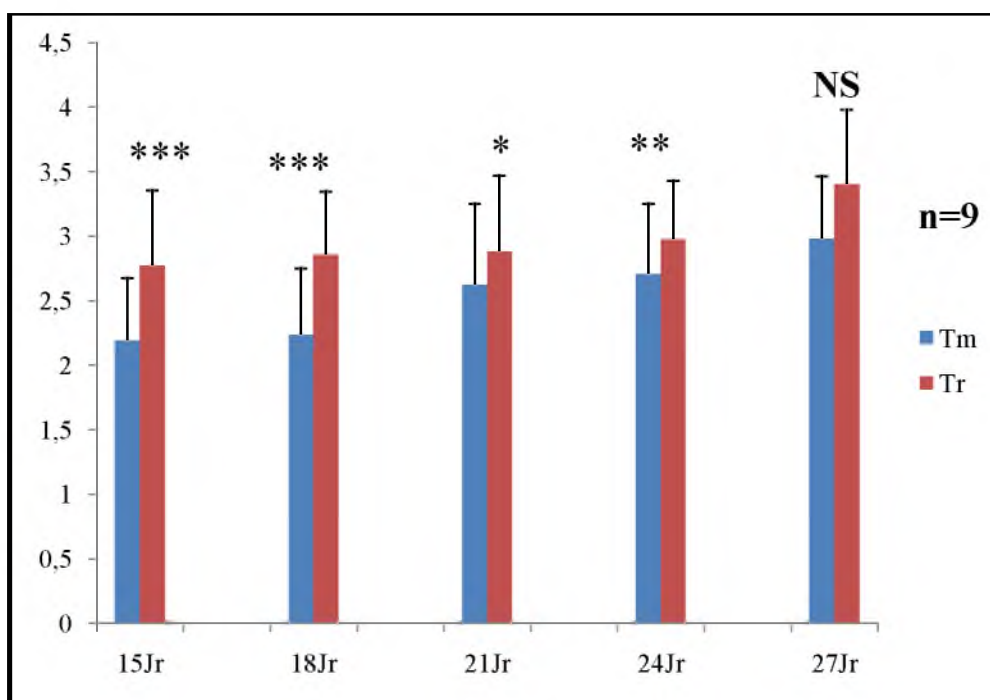


Figure 18: les effets des eaux usées sur le diamètre des feuilles en (mm) de *lemna minor* (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

Tableau19: Les moyennes de diamètre des feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr	Ecartype Tr	Test. T
15Jr	2,18987	±0,48240	2,77273	±0,57854	P=2,70E-08***
18Jr	2,23571	±0,51215	2,85455	±0,48756	P=3,82E-08***
21Jr	2,62	±0,62727	2,88	±0,58519	P=0,02347*
24Jr	2,70588	±0,543919	2,975	±0,45220	P=0,0099**
27Jr	2,98182	±0,48242	3,4	±0,57854	P=0,086NS

Tableau 20: Analyse de la variance à un critère de classification de diamètre des feuilles en (mm) de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).

Source	ddl	SCE	CM	F _{obs}	P
date	4	5,406	1,352	3,45	0,012**
Erreur	75	29,344	0,391	-	-
Total	79	34,750	-	-	-

- **ddl** : degré de liberté ; **SCE** : somme des carrés des écarts ; **CM** : carré moyen ; **F_{obs}** : test de Fisher ; **P** : seuil de signification.

2.4.4. La longueur des racines :

La figure (19), représente les effets des eaux usées sur la longueur moyenne des racines (LMR) de *lemna minor* après 15 jours de traitement après analyse de la variance ANOVA à un critère de classification (**Tableau 22**), montré une augmentation significative des traités par apport au témoin , après 18 et 21 jours de traitement l'augmentation enregistrée des traités par apport au témoin est non significative à très hautement significative ($p \leq 0.000$), après 24 et 27 jours de traitement, indique une augmentation significative à hautement significative ($p \leq 0.001$) des racines traitées.

Le test T de Student entre les témoins (Tm) et les traités (Tr) donne des différences significatives à très hautement significatives.

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 27 jours de traitement. la longueur moyenne des racines est de l'ordre de 9,85 mm chez Traités, et de 6,96 mm chez les témoins.

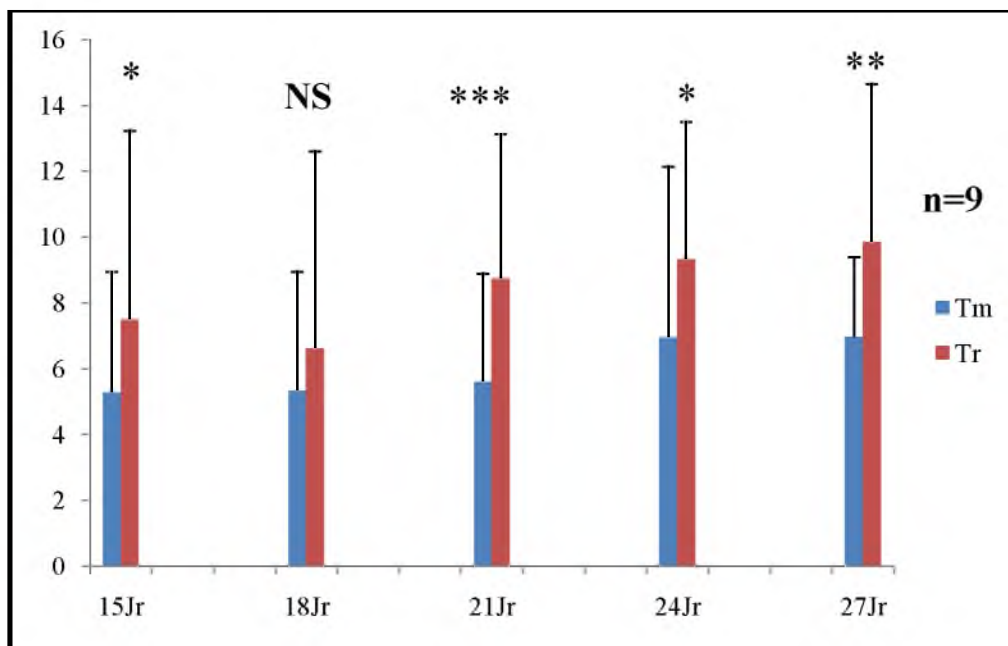


Figure 19: les effets des eaux usées sur la longueur moyenne des racines en (mm) de *lemna minor* (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

Tableau21: les moyennes de la longueur des racines de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin) en fonction du temps.

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr	Ecartype Tr	Test. T
15Jr	5,27941176	±3,65354618	7,48	±5,73340183	P=0,02884*
18Jr	5,32857143	±3,59436527	6,61818182	±5,97057882	P=0,1971NS
21Jr	5,60759494	±3,2558339	8,72727273	±4,37778291	P=9,54E-05***
24Jr	6,95	±5,1786049	9,30909091	±4,17165358	P=0,0185*
27Jr	6,96	±2,42402937	9,85	±4,79074963	P=0,0020**

Tableau 22: Analyse de la variance à un critère de classification de la longueur en (mm) chez les racines de *lemna minor* placées dans des eaux usées (Tr : Traitée) et (Tm : Témoin).

Source	ddl	SCE	CM	F _{obs}	P
Date	4	266,7	66,7	3,38	0,013**
Erreur	75	1478,1	19,7	-	-
Total	79	1744,8	-	-	-

- **ddl** : degré de liberté ; **SCE** : somme des carrés des écarts ; **CM** : carré moyen ; **F_{obs}** : test de Fisher; **P** : seuil de signification.

2.5. Les résultats des analyses physico-chimiques des eaux :

2.5.1. Température et le pH :

Les variations de température des eaux durant notre expérimentation sont illustrées dans le tableau 23. La température après la phytoépuration présente une diminution par rapport à celle des eaux usées brutes. La température après la phytoépuration est de 13,4 °C, ainsi pour les eaux usées brutes elle est de l'ordre de 17,8 °C. Concernant le pH, on remarque une variation du taux de pH au niveau de l'eau avant épuration qui été de l'ordre de (8.23), et il est de (7,35) après épuration.

2.5.2. Conductivité, orthophosphate:

D'après le tableau 23, on remarque une diminution de la conductivité de l'eau de l'oued, ainsi que les orthophosphates qui ont montré une diminution très importante après épuration, La concentration des orthophosphates après la phytoépuration est 1,64mg/l pour un temps de séjour de 25, par contre à celles des eaux usées brutes la concentration des orthophosphates dépasse 1.81 mg/l.

2.5.3. Taux d'alcalinité (TAC):

On remarque une diminution importante du taux d'alcalinité dans les eaux traités par *lemna minor* par rapport à celles des eaux usées brutes, où il passe de 300mg/l avant l'épuration, après le traitement c'est 126mg/l.

D'après le tableau 23, nous remarquons que les teneurs en calcium, magnésium et Chlorure après l'épuration qui sont de l'ordre de 185,97 mg/l, 167,26mg/l et de 332,97mg/l, sont inférieures à celles des eaux usées avant traitement qui sont de l'ordre de 314,22mg/l, 171,15mg/l, et de 854,92mg/l.

Tableau 23: les résultats des analyses physico-chimiques des eaux avant et après le traitement :

	Avant le traitement	Après le traitement
Température des eaux	17,8°C	13,4°C
Conductivité (cond)	8,84ms/cm	4,78ms/cm
Salinité (sal)	5,0‰	2,6‰
Taux de salinité (T Sal)	4,35g/l	2,50g/l
Turbidité	0,126NTU	0,053NTU
Taux d'alcalinité (TAC)	300mg/l	126mg/l
Dureté totale (TH)	1488mg/l	1152mg/l
Calcium (Ca²⁺)	314,22mg/l	185,97mg/l
Magnésium (Mg²⁺)	171,15mg/l	167,26mg/l
Chlorure (Cl)	854,92mg/l	332,97mg/l
Phosphate (PO₄³⁻)	1,81mg/l	1,74mg/l
Nitrite(NO₂)	0,003mg/l	0,003mg/l
Potentiel hydrogène (pH)	8.23	7.35

3. Discussion :

Dans cette partie de notre travail, nous avons étudié la réponse biologique de notre modèle végétal à savoir *Lemna minor* vis-à-vis des eaux usées d'oued Mellague.

Nous avons déterminé les effets des eaux usées sur : la biochimie de la plante aquatique *Lemna minor* à savoir : la teneur en protéines totales, la physiologie de macrophyte à savoir la chlorophylle *a*, *b*, et *a+b*, l'activité enzymatique ainsi le GPX, et le taux de croissance durant trois durées de traitement 15, 20, et 25 jours.

Nous avons aussi réalisé des dosages de paramètres physicochimiques des eaux usées d'oued Mellague de la région de Tébessa avant et après épuration, qui ont montré que les eaux de surfaces d'oued Mellague de la région de Tébessa s'avèrent entièrement chargées en polluants chimiques et une forte salinité et constituent une vraie menace pour l'environnement, en particulier pour la vie et la santé de la faune et la flore.

3.1. Dosage des Protéines :

Les résultats des dosages des protéines totales *Lemna minor* mettent en évidence, une augmentation très significative des taux de protéines, qui laisse suggérer une disponibilité des protéines dans les tissus foliaires pouvant essentiellement être utilisé dans le développement des processus de reproduction (**Tlidjen Sara, 2014**). De ce fait, la stimulation du taux des protéines enregistrée au niveau de la plante, traduit l'existence des protéines synthétisées lors du stress généré par les eaux usées et/ou métaux lourds existant éventuellement dans les milieux hydriques expérimentaux.

Cette augmentation des protéines s'expliquerait aussi par le fait que la présence des polluants qui stimulent la synthèse protéique de nombreuses enzymes entre autres celles intervenant dans la détoxification, ce qui est en parfait accord avec les résultats de **Stolt et al., (2003)** qui indiquent que l'exposition des plantes à différentes concentrations de cadmium a tendance de provoquer une augmentation de la synthèse des protéines particulièrement des phytochélatines dont le rôle est la détoxification.

Nos résultats concordent aussi avec ceux de **Meksem et al., (2007)** sur les deux variétés de blé dur (GTA dur et Vitron) après traitement au FL SC et Tilt 250 EC deux fongicides, ou ils ont mis en évidence une augmentation significative de la teneur en protéines solubles, comparativement au témoin et ceci avec un effet dose réponse.

De nombreuses études ont montré que la teneur en protéines chez les macrophytes est diminué par l'accumulation de Pb dans des milieux aquatiques (**Gupta et Chandra, 1996; Mohan et Hosetti, 1997**). La réduction de la teneur en protéines a été observée chez la plante *Lemna minor* étudiée après 25 jours de traitement à l'eau usée.

3.2. Dosage de la chlorophylle :

Les résultats obtenus montrent une augmentation du taux de chlorophylle (a , b et $a+b$) chez la plante exposées à l'eau pollué, Cette augmentation pourrait traduire une stimulation de la photosynthèse et peut être également expliquée, par les besoins en précurseurs pour la synthèse de certains polypeptides spécifiques (phytochélatines) via la photo respiration (**Robert et Roland, 1998 ; Lidia et al, 2004**). Aussi ces résultats obtenus concordent beaucoup plus avec ceux de **Harrieche, O. (2004)**, qui rapporte un effet stimulateur du cadmium sur la teneur en chlorophylle.

La teneur en chlorophylle est un paramètre qui est sensible à la toxicité des métaux lourds. (**Gupta et Chandra, 1996**).

Nous avons procédé au dosage des teneurs moyennes en chlorophylle a et b , et chlorophylle totale ($a+b$) paramètres susceptibles de nous indiquer un éventuel stress, car considérées comme bio-marqueur de la toxicité des végétaux puisque des corrélations entre les densités cellulaires et les paramètres de la fluorescence photosynthétiques ont prouvé que ces dernières pouvaient être considérées comme bio-marqueurs de la toxicité, dans le cadre de la pollution environnementale. (**Dewez et al, 2007**).

Les auteurs suivants **Muhittin Dogan et al, (2009)**, **Saygideger et Dogan (2004)**; **Saygideger et al, (2004)** ont noté une réduction dose réponse des teneurs en chlorophylle (a , b et $a+b$) respectivement chez *Elodea canadensis* et *Lemna minor*, exposées à différentes concentrations de plomb.

Une autre étude selon **El zbieta Kielak et al, (2011)** sur la phytotoxicité d'un herbicide Roundup Ultra 360 SL sur la lentille d'eau *Lemna minor*, a montré une diminution des taux de chlorophylle a , b et $a+b$, en augmentant la dose de l'herbicide. La réduction de la teneur en chlorophylle a été observée chez la plante *Lemna minor* étudiées après 25 jours de traitement à l'eau usée.

3.3. Dosage de La glutathion peroxydase (GPX) :

Nous avons observé que l'activité de GPX est inchangée par rapport au témoin après 15 et 20 jours, une stimulation significative de GPX après 25 jours de traitement.

Notre travail est en parfait d'accord avec les travaux de **Souguir Dalila, (2009)** qui ont montre une activité de la GPX est inchangée durant le traitement quelque soit la dose du métal.

Une forte activité de GPX pourrait être un signe de stress oxydatif sévère ou un mécanisme de réponse efficace au stress (**Zlatev et al, 2006**). Sa présence au niveau du

cytosol de la paroi cellulaire et dans les vacuoles permet de former de l'eau à partir de peroxyde d'hydrogène.

L'activité de la GPX varie considérablement selon les espèces végétales et les conditions de stress (**Gill et Tuteja, 2010 ; Passardi et al, 2005**), Les activités peroxydase élevés dans les plantes aquatiques ont été liés à la tolérance aux polluants. (**Lavid et al, 2001; Roy et al, 1992**).

Cette activité peut représenter une réponse de ces plantes au stress oxydatif provoqué probablement par l'accumulation des xénobiotiques au niveau cellulaire.

D'autres métaux sont capables de modifier son activité tels que le cuivre (**Jouili et El Ferjani, 2004; Bouazizi et al, 2007**) et le nickel (**Baccouche et al, 1998**).

3.4. Les paramètres morphologiques:

Les lentilles d'eau possèdent une très bonne croissance tout au long de l'étude. En effet, les conditions de ces eaux (provenant d'oued Mellague) ne représentent aucun signe défavorable quand au développement de ces végétaux. Notre travail est en parfait d'accord avec les travaux de **Chafaa et al, (2015)**, qui rapporte chez *lemna minor* aucune difficulté de culture surtout à la surface des eaux à fort taux de nitrates et riches en matières organiques. Cette plante tolère un niveau de ph inférieur à 4 et même supérieur à 8 et des températures allant de 16 à 32 °C (**Saint-maxent, 2002**). Les lentilles d'eau ne possèdent aucune exigence particulière à l'égard de la température ou de la lumière. (**Wolff et Landolt, 1994**).

Chez les lentilles d'eau, l'effet des substances toxiques peut être estimé par différents paramètres comme le nombre des frondes, la biomasse et la surface foliaire (**Tkalec et al, 1998**), en plus de leur large utilisation, présentent l'avantage d'être simples et compatibles avec un grand dispositif expérimental.

D'autre part, les lentilles d'eau constituent un bon modèle expérimental vu leur croissance rapide et la facilité de culture et de récolte. En effet, elles ont été très utilisées pour l'évaluation de la toxicité des polluants, comme les huiles industrielles, les métaux lourds, les hydrocarbures et les pesticides. (**Ater et al ; 2006**).

3.5. Les paramètres physico-chimiques :

Nous avons enregistré des résultats remarquables pour les différents paramètres physico-chimiques avec une diminution des taux de la conductivité, la température, salinité, PH, TH...etc., car les lentilles d'eau *lemna minor* accumulent les sels ce qui explique cette réduction.

3.5.1. Le PH :

Pour le processus d'épuration aérobie, la biomasse a besoin d'un pH proche de la neutralité pour réaliser son activité épuratrice (**Franck, 2002**), c'est le pH le plus favorable à l'activité bactérienne. Il apparaît assez nettement que la vitesse de la nitrification est influencée par le pH.

Nos résultats obtenus concordent beaucoup plus avec les travaux de (**Manel Derradji, 2015**), Dans le filtre sans roseaux, le pH est légèrement plus élevé que celui de filtre planté des roseaux.

Plusieurs facteurs peuvent également expliquer cette baisse de pH parmi eux l'accumulation de CO₂ due au métabolisme des plantes ou à la dégradation de la matière organique par les bactéries hétérotrophes (**Attionu, 1976 ; Jedicke et al, 1989, Mancer, 2010**).

3.5.2. La température :

La température agit également comme facteur physiologique sur le métabolisme et la croissance de la plupart des organismes vivant dans l'eau, notamment ceux microscopiques et est, de ce fait, directement liée à la vitesse de dégradation de la matière organique. (**El Hachemi, 2012**).

5.3.La conductivité :

Notre travail est en parfait d'accord avec ceux de (**Tanner et al, 1995**). Les *Phragmites australis* ont tendance à accumuler les sels dissous ce qui explique la diminution de la conductivité de l'eau au niveau des cuves plantées des roseaux. Concernant la cuve non plantée la diminution pourrait être expliquée par la filtration et la sédimentation des particules et des sels minéraux à travers le massif de sable et de gravier.

D'après, **Bensmina et al, (2009)** mis en évidence une réduction des ions ammonium et nitrates après le passage des eaux usées à travers le système d'épuration planté et non planté. Les mécanismes prédominants dans l'élimination de l'azote dans les lits plantés sont la conversion microbienne sous forme gazeuse et le stockage dans le sol, les détritiques et la biomasse végétale. La séquence nitrification-dénitrification est considérée comme le processus majeur d'élimination de l'azote à long terme.

Ainsi, **García et al, (2005)** ont montré, que les macrophytes absorbent principalement de l'azote inorganique sous forme de nitrates (NO₃⁻) et d'ammonium (NH₄⁺) ces nutriments sont utilisés par la plante pour la croissance de ses tissus, ce qui explique leur diminution dans les deux filtres plantés.

Selon **Mancer, (2010)**, le phosphore est un constituant essentiel pour le développement des plantes, qui est assimilé sous forme d'orthophosphate au niveau de leurs racines.

L'élimination des orthophosphates peut impliquer deux phénomènes différents : soit l'absorption par le substrat y compris la litière ou la consommation par les plantes, ce qui explique leur diminution après l'épuration.

Conclusion

CONCLUSION

Les scientifiques sont toujours à la recherche du meilleur moyen permettant l'épuration des eaux usées avec le minimum de dépense et le maximum d'efficacité. La phytoépuration s'avère un moyen d'épuration écologique est avantageux à plus d'un titre.

D'un autre côté, l'utilisation des milieux humides artificiels n'engendre que peu ou pas de production de boues. Enfin, ce genre d'unité de traitement augmente la superficie des milieux humides disponibles pour la faune et la flore, tout en rendant l'aspect d'une station de traitement beaucoup plus esthétique et socialement acceptable.

Dans notre travail nous avons utilisé une plante macrophyte : *lemna minor* pour l'épuration des eaux usées, les résultats obtenus ont montré l'efficacité de cette plante dans la phytoépuration.

Nous avons travaillé avec les eaux usées de la ville de Tébessa notamment la région d'El Aouinet (Oued Mellague).

Les différents paramètres mesurés pour ces eaux indiquent évidemment une pollution importante. Les résultats des principaux indicateurs physico-chimiques (T, pH, Turbidité, NO₂ ...), ont révélé des valeurs inférieures à la norme algérienne. En revanche nous avons remarqué des concentrations importantes de (Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺, TH....) qui sont supérieures à la norme algérienne.

Nous avons enregistré des résultats remarquables pour les différents paramètres physico-chimiques avec une diminution des taux de la conductivité, la température, salinité...etc. Car les lentilles d'eau *lemna minor* ont la possibilité d'accumulation des sels ce qui explique forcément cette réduction.

Les effets de ces eaux polluées se manifestent par une perturbation au niveau du système métabolique des lentilles d'eau *lemna minor* conduisant à des troubles au niveau des fonctions physiologiques. Différentes analyses telles que le dosage des protéines, chlorophylles, et certains enzymes ont été effectuées sur cette plante.

Sur le plan biochimique et enzymatique, Les résultats obtenus semblent converger vers la mise en évidence du caractère toxique oxydatif des polluants présents dans les eaux usées, à travers l'étude des métabolites et des activités antioxydantes d'enzymes telles que la GPX.

CONCLUSION

Nous avons noté les modifications métaboliques, enzymatiques et morphologiques suivantes :

- Une activité inchangée par rapport au témoin de la GPX à 15 et 20 jours de traitement. Par contre après 25 jours nous remarquons qu'il y a une stimulation significative de l'activité de la GPX.

- Ainsi une augmentation significative des protéines totaux et de la teneur en chlorophylle (a, b et a+b) de la plante.

- Augmentation du nombre des feuilles et des racines, ainsi que le diamètre et la longueur de ces derniers.

Tenant compte de la tolérance, de la capacité d'accumulation et de la productivité en biomasse, *L. minor* montre des potentialités réelles pour d'éventuelles applications dans les technologies de phytoépuration, et spécialement le traitement des eaux usées.

En perspective, il serait intéressant de doser les métaux lourds et surtout ceux déversés par les usines avoisinantes au niveau des eaux usées, ainsi qu'au niveau des différentes parties de la plante. Il serait aussi très intéressant d'investir d'autres aspects toxicologiques en mettant l'accent entre autres sur les processus de détoxification qui ont lieu au niveau cellulaire (Phase I et II) et ce, afin de mieux cerner le devenir des xénobiotiques et leur capacité cytotoxique.

Références bibliographiques

A

-
- Anonyme, 2005. Macrophytes et traitement des eaux.** Épuration des eaux usées domestiques par filtres plantés de macrophytes. Recommandation technique pour la conception et la réalisation. 45 p.
- Asada K, 2000.** The water– water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355(1402), Pp : 1419-1431.
- Asada K, 2006.** Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their functions. *Plant Physiology* 141(2), Pp : 391-396.
- Ater M, Aït Ali N et Kasmi H, 2006.** Tolérance et accumulation du cuivre et du chrome chez deux espèces de lentilles d'eau : *Lemna minor* L. et *Lemna gibba* L. *Journal of Water Science*, 19(1), Pp : 57-67.
- Attionu RH, 1976.** Some effects of water lettuce (*Pistia stratiotes*, L.) On its habitat. *Hydrobiologia* 50(3), Pp: 245-254.

B

-
- Baccouche, S., Chaoui, A., El Ferjani, E. (1998)** Nickel induced oxidative damage and antioxidant reponses in *Zea mays* shoots. *Plant Physiol. Biochem.* 36; Pp: 689-694.
- Baker A., Graham I.A., Holdsworth M., Smith S.M. et Theodoulou F.L. ,2006.** Chewing the fat: β -oxidation in signalling and development. *Trends in Plant Science* 11(3), Pp : 124-132.
- Bassa, C., Mila, I., Bouzayen, M., and Audran-Delalande, C. 2012.** Phenotypes associated with down-regulation of Sl-IAA27 support functional diversity among Aux/IAA family members in tomato. *Plant Cell Physiology* 53, Pp : 1583-1595.
- Benahmed Fatiha, 2010.** Stress oxydatif chez des plantules de *Vicia faba* L. soumises à différentes contraintes abiotiques (stress salin, stress hydrique et stress aux métaux lourds) ; Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie.
- Benjamin Lisan. 2015,** Récupération d'eau de pluie et phyto-épuration / bio-filtres.
- Bensmina-Mimeche L., Debabeche M., Mekaoussi S, 2009.** Epuration des eaux usées domestiques par les macrophytes dans un milieu semi aride; séminaire international d'hydraulique El oud.
- Bensmina Mimeche L., Debabeche M., Seghairi N., Benameur N, 2013.** Capacité de filtres plantés de macrophytes pour l'épuration des eaux usées dans le climat semi-aride. *Courrier du Savoir.* p 17.

- Bodo R., Hausler R., et Azzou A., 2005.** Approche multicritère pour la sélection de plantes aquatiques en vue d'une exploitation rationnelle. Revue des sciences de l'eau, Journal of Water Science, vol. 19, n° 3, Pp : 181-197.
- Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C. et Minibayeva F, 2002.** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. Journal of Experimental Botany 53(372), Pp : 1367-1376.
- Bonfont-Rousselot D., Therond P. et. Delattre J, 2003.** Radicaux libres et antioxydants. Ed :Flammarion Médecine-Sciences. Pp : 59-81
- Bouazizi, H., Jouili, H., El Ferjani, E., 2007.** Copper-induced oxidative stress in maize shoots (*Zea mays* L.): H₂O₂ accumulation and peroxidases modulation. Acta Biol. Hun. 58(2); Pp: 209- 218.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. Pp : 248-254.
- Bruchhauser, 2010. Cellule, ADN et unite du vivant : Cours à l'usage exclusif des élèves de sa classe de seconde 1 dans le cadre de la session de rattrapage.** Pp : 2.

C

-
- Cauzzi N, 2007.** Évaluation de l'éco-compatibilité de sédiments contaminés, traités et non traités par un procédé physico-chimique, dans le cadre d'un scénario de dépôt en gravière - Étude en microcosmes aquatiques. Thèse INSA de Lyon - Spécialité Sciences et Techniques du Déchet au LSE de l'ENTPE. Villeurbanne: INSA de Lyon, 341p.
- Céline Haton, 2005.** Effets des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale ; Thèse de doctorat de l'Université Paris VI Spécialité Physiologie et Physiopathologie .168p
- Corpas F.J., Barroso J.B. et del Río L.A, 2001.** Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. Trends in Plant Science 6(4), Pp : 145-150.

D

-
- Dagnelie, P., 1999.** Statistiques théoriques et appliquées. Tome2 : références statistiques à une et à deux dimensions. Bruxelles. Univ De boeck et Larcier, 659p.
- Degrémont, 1989.** Memento technique de l'eau. Tome1. 9^{ème} édition : Édition du cinquantenaire.
- Dewez D., Didur O., Vincent-Heroux J., Popovic R., 2007.** Validation of photosynthetic-fluorescence parameters as biomarkers or isoproturon toxic effect on alga *scenedesmus*

obliquus. Department of Chemistry, Environmental Toxicology Research Center. TOXEN, 2101, Montreal, Quebec, Canada.

-Dr. Hans W. Kothe ,2007. 1000 Plantes aromatiques et médicinales-propriétés et usages. 189p.

E

-Edreva A., 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 106(2-3), Pp :119-133.

- Edeline M.F., 2001 .Le pouvoir autoépurateur des rivières. Edition CEBEDOC sprl, liège. Pp: 103-104.

- El Hachemi O, 2012. Traitement des eaux usées par lagunage naturel en milieu désertique (Oasis de Figuig) : performances épuratoires et aspect phytoplanctonique. Thèse de doctorat, Université Oujda, 122p.

-El _zbieta Kielak, Cezary Sempruch , Halina Mioduszevska , Jozef Klocek , Bogumil Leszczyn´ ski., 2011. Phytotoxicity of Roundup Ultra 360 SL in aquatic ecosystems: Biochemical evaluation with duckweed (*Lemna minor* L.) as a model plant. Contents lists available at ScienceDirect . doi:10.1016/j.pestbp.

F

-Favier A., 2003. Le stress oxydant. *Actualité chimique* , Pp : 108-115.

-Filipe Gama, 2010. Les glutarédoxines : de la réduction des peroxyrédoxines de type II aux systèmes d'assemblage des centres fer-soufre ; Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy I en Biologie Végétale et Forestière.196p.

-Flohe, L., Gunzler, W.A., 1984.Analysis of glutathione peroxidase, *methods enzymol.*105, Pp: 114-121.

- Foerster E., Fährenkemper T., Rabe U., Graf P. et Sies H., 1981. Peroxisomal fatty acid oxidation as detected by H₂O₂ production in intact perfused rat liver. *Biochemistry Journal* 196(3), Pp : 705- 712.

-Foyer C.H. et Noctor G., 2003. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria." *Physiologia Plantarum* . 119, Pp :355-364.

- Franck R, 2002. Analyse des eaux : Aspects réglementaire et techniques. Edition CRDP Aquitaine décembre.

G

-
- **García P., Aguirre J., Barragán R., Mujeriego V., Matamoros JM., Bayona, 2005.** Effect of key design parameters on the efficiency of horizontal subsurface flow constructed wetlands. *Ecol. Eng* 25, Pp: 405–418.
- **Gill, S.S. et Tuteja N., 2010.** Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48, Pp: 909–930.
- **Godfrey, R. K. et J. W. Wooten., 1979.** Aquatic and wetland plants of the southeastern United States: monocotyledons. University of Georgia Press, Athens. 712 p.
- **Gupta P, Chandra P., 1996.** Response of cadmium to *Ceratophyllum demersum* L., a rootless submerged plant. *Waste Manag* 16. Doi : 10. 1016/S0956- 053X(96)00053-0. Pp : 335– 337
- **Grison, 1999,** épuration des eaux usées par filtres plantés des macrophytes, études bibliographie agence de l'eau Rhone Méditerranée et Corse.

H

-
- **Harberl R, Perfler R, Mayes H, 1995.** Constructed wetlands in Europe, Pergamon, vol 32.
- **Harrieche O., 2004.** Impact du cadmium et de l'interaction cadmium-calcium sur la germination et la croissance du blé dur (*Triticum durum* Desf., variété Vitron). Effets sur la respiration des racines. *Mémoire de Magistère. Université d'Annaba.* 79p.
- **Hiroomi Imamoto, Kenji Horiya, Mitsuo Yamasaki, Izumi Washitani, 2006,** An experimental system to study ecophysiological responses of submerged macrophytes to temperature and light. The Ecological society of Japan
- **Horemans, N., C.H. Foyer et H. Asard , 2000.** « Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane ». *Trends Plant Sci.*, vol. 5,263-267.

J

-
- **Jean-Philippe Béguet, 2012.** Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Ecole Doctorale des Sciences de la Mer en Université de Bretagne Occidentale. Spécialité : *Biologie Marine.* 187p.
- **Jedicke A., Furch B., Saint PU., Schlueter UB, 1989.** Increase in the oxygen concentration in Amazon waters resulting from the root exudation of two notorious water plants, *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae). *Amazoniana* 11(1), 53-70.
- **Jouili, H., El Ferjani. E., 2004.** Effect of copper excess on superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in sunflower seedlings (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiol. Plantarum* 26 (1); 29-35.

L

-
- Lavid N., Schwartz A., Yarden O., Tel-Or E., 2001.** The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy-metal accumulation by epidermal glands of waterlily (Nymphaeaceae). *Planta* 212, 323–331.
- Lidia, B., Vysotskaya, N., Tatyana, N., Leila, Timergalina, V., Aleksandr, Dedov, YU., and Stanislqy., 2004.** Effect of partial root excision on transpiration, root hydrolic conductance and leaf growth in wheat seedlings. *Plant Physiologie and Biochemistry I* **42(3)**: 251-255.

M

-
- **Manel Derradji, 2015.** Contribution à l'étude de la tolérance des plantes épuratrices dans l'épuration des eaux usées : stratégie et application ; Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat, Université Badji Mokhtar .140p
- **Mancer H, 2010.** Analyse du pouvoir épurateur de quelques plantes macrophytes dans les régions arides. Mémoire de magister, Université de Biskra, 99p.
- MATE, 1997.** Biologie et écologie des espèces végétales proliférant en France - Synthèse bibliographique n°68. Les études des Agences de l'Eau. Paris: 202p.
- Meksem, L, Rouabhi, R, Djebbar-Berrebah, H. and Djebbar, M. R., 2007.** The impact of propiconazole (Tilt 250 EC) on the growth and the breathing of hard wheat isolated roots (*Triticum durum*, *GTA* and *Vitron* varieties). *African Journal of Agricultural Research* Vol. 2 (8), pp. 370-373
- **Michel Vincent, 2006.** Etudes des effets toxiques des ions métalliques du cadmium sur la formation et l'activité des photosystèmes chez l'algue unicellulaire *chlamydomonas reinhardtii* ; Mémoire présenté comme exigence partielle de la maîtrise en chimie.134p
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R. D., Govindarajan, R., Kuriakose, S. V., Prasad, M. N.V. 2006.** Phytochelatine synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol. Bioch.* 44; 25-37.
- Mohan BS et Hosetti BB., 1997.** Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization pond. *Environ Pollut* 9:233–238
- Muhittin Dogan, Saadet Demirors Saygideger, Ugur Colak, 2009.** Effect of Lead Toxicity on Aquatic Macrophyte *Elodea canadensis* Michx. _ Springer Science+Business Media, LLC *Bull Environ Contam Toxicol.* 83:249–254

N

-
- Noctor G., Arisi A., Jouanin L., Kunert K., Rennenberg H. et Foyer C., 1998.** Review article. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress

tolerance explored in transformed plants." *Journal of Experimental Botany* 49(321), 623-647.

-**Nyathi Y. et Baker A., 2006.** Plant peroxisomes as a source of signalling molecules." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763(12), 1478-1495.

O

-**ONA Alger, 2011.** Rapport Intervenant : Amar Chouikh Directeur central de l'exploitation et de la maintenance a l'ONA, STEP de N'Goussa une station 100/ verte.

- **Oueslati M.A., M. Haddad, Y.Charbonnel, 2000.** Étude physico-chimique des eaux usées domestiques traitées par des végétaux aquatiques : Première expérience Tunisienne.

P

- **Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C., 2005.** Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep.* 24, 255–265.

-**Poulet JB., Terfous A., Dap S., Ghenaïm A, 2004.** Stations d'épuration à lits filtrants plantés de macrophytes. *Courrier du Savoir* 5,103-106.

-**Pincemail J., Meurisse M., Limet R. et Defraigne J.O., 1999.** Mesure et utilisation des antioxydants en médecine humaine *MEDISPHERE*, 1-4.

- **Pourrut Bertrand, 2008.** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba* ; Thèse en vue de l'obtention du Doctorat de l'université de Toulouse.297p.

-**Pourrut B., Perchet G., Silvestre J., Cecchi M., Guiresse M.et Pinelli E., 2008.** Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. *Journal of Plant Physiology* 165(6), 571-579.

- **Parent C., Capelli N. et Dat J., 2008.** Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C. R. Biologies* 331, 255– 261.

R

-**Rajaonarivelo Fanjatiana Justoberthe. 2013** La faisabilité de la phytoépuration des eaux usées dans la ville de Toliara. Mémoire de fin d'études pour l'obtention du diplôme d'Études Approfondies en Biodiversité et Environnement. Faculté des Sciences. Université de Toliara.68 p.

-**Raven / Evert/ Eichhorn, 2014.** *Biologie Végétale*.3^{ème} édition de Boeck supérieur S.A. p:693

-**Rakotoarison H.A. 2008.**Analyse de la qualité des eaux usées municipales dans la commune urbaine de Toliara: proposition de dimensionnement d'une station de lagunage. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention de Diplôme d'Études Approfondies. Département de Chimie Minérale et de Chimie Physique. Faculté des Sciences. Université d'Antananarivo. 112 p.

- Robert D. et Roland J.C., 1998.** Organisation cellulaire : Biologie végétale. Ed Doin, Vol. 1, pp 125-345.
- Rodier Jean, 1984.** L'analyse de l'eau : Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. Edition Dunod Paris.
- Roy S., Inhatola R., Hanninen O, 1992.** Peroxidase activity in lake macrophytes and its relation to pollution tolerance. *Environ Exp Bot* 32, 457–464.

S

-
- Saint-Maxent T., 2002.** Les espèces animales et végétales susceptibles de proliférer dans les milieux aquatiques et subaquatiques. *Fiches synthèse espèces végétales*. 143p.
- Saygideger S et Dogan M., 2004.** Lead and cadmium accumulation and toxicity in the presence of EDTA in *Lemna minor* L. and *Ceratophyllum demersum* L. *Bull Environ Contam Toxicol* 73:182–189. doi:10.1007/s00128-004-0411-3
- Saygideger S, Dogan M, Keser G., 2004.** Effect of lead and pH on lead uptake, chlorophyll and nitrogen content of *Typha latifolia* L. and *Ceratophyllum demersum* L. *Int J Agri Biol* 6:168–172.
- Smirnoff N., Foyer C., Dietz K., Mittler R., Feierabend J., Grace S., Desikan R, Jones M., Vreeburg R., Logan B. et Jaspers P, 2005.** Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants, Blackwell publishing.
- Spiteller G, 1998.** Linoleic acid peroxidation--the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein--and its relationship to chronic diseases. *Chemistry and Physics of Lipids* 95(2), 105-162.
- Stadtman ER et Levine RL, 2000.** "Protein Oxidation." *Annals of NY Academy of Science* 899(1):191-208.
- Stolt J. P., Sneller F. E. C., Bryngelsson T., Lundborg T. And Schat H., 2003.** Phytochelatin and Cadmium accumulation in wheat. *Environmental and experimental botany*, 49: 21-28.
- Souguir Dalila, 2009.** Modifications métaboliques, moléculaires et génotoxicité induites par le cadmium chez *Vicia faba*. Thèse de Doctorat en co-tutelle, spécialité de Sciences Biologiques. 239p.

T

-
- Tanner CH., Clayton JS., Upsdelle MP, 1995.** Effect of loading rate and planting on treatment of dairy farm wastewaters in constructed wetlands, removal of oxygen demand, suspended solids and faecal coliforms. *Water Resource* 29,17-26.
- Thierry Tangou Tabou, Dehenould Trésor Baya, Mouhamadou Nourou Dine Liady, Dieudonné Musibono Eyul'Anki, Jean-Luc Vasel, 2014** *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*

Apport du traitement d'images dans le suivi de l'influence des teneurs en nutriments sur la croissance des lentilles d'eau (*Lemna minor*).37-48.

- **Tlidjen Sara, 2014.** Impact de xénobiotiques, sur une végétation aquatique, épuratrice des eaux usées : biométrie, aspect biochimique, enzymatique, métabolisme énergétique et cytotoxicité. Thèse de 3^{ème} cycles, Université Badji Mokhtar – Annaba. 200p.

-**Tkalec M., Vidakovic Cifrek Z., Regula I., 1998.** The effect of oil industry «high density brines» on duckweed *Lemna minor* L. *Chemosphere*. 13, 2703-2715.

V

-**Van Breusegem F., Vranova E., Dat J.F. et Inze D, 2001.** The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161(3), 405-414.

-**Vincent Coliatti et Dufour Sébastien ,2007. Phytoépuration et récupération des eaux de pluies.** Coliatti Vicent Sébastien Dufour.CNT-AIT 63, 2 place Poly, 63100 Clermont Ferrand. cntait63@gmail.com

W

-**Wang, W., 1991.** Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water Air Soil Pollut.* 59: 381–400

-**Wolff P., Landolt E., 1994.** Spread of *Lemna turionifera* (Lemnaceae), the red duckweed, in Poland. *Fragmenta Floristica et Geobotanica*.39 (2), 439-451.

Z

-**Zayed A., Gowthaman S., Terry N., 1998.** Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. *J. Environ. Qual.*27, 715-721.

-**Zlatev ZS., Lidon FC. Ramalho JC. Yordanov IT, 2006.** Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biol Plant* 50, 389-394

Les annexes

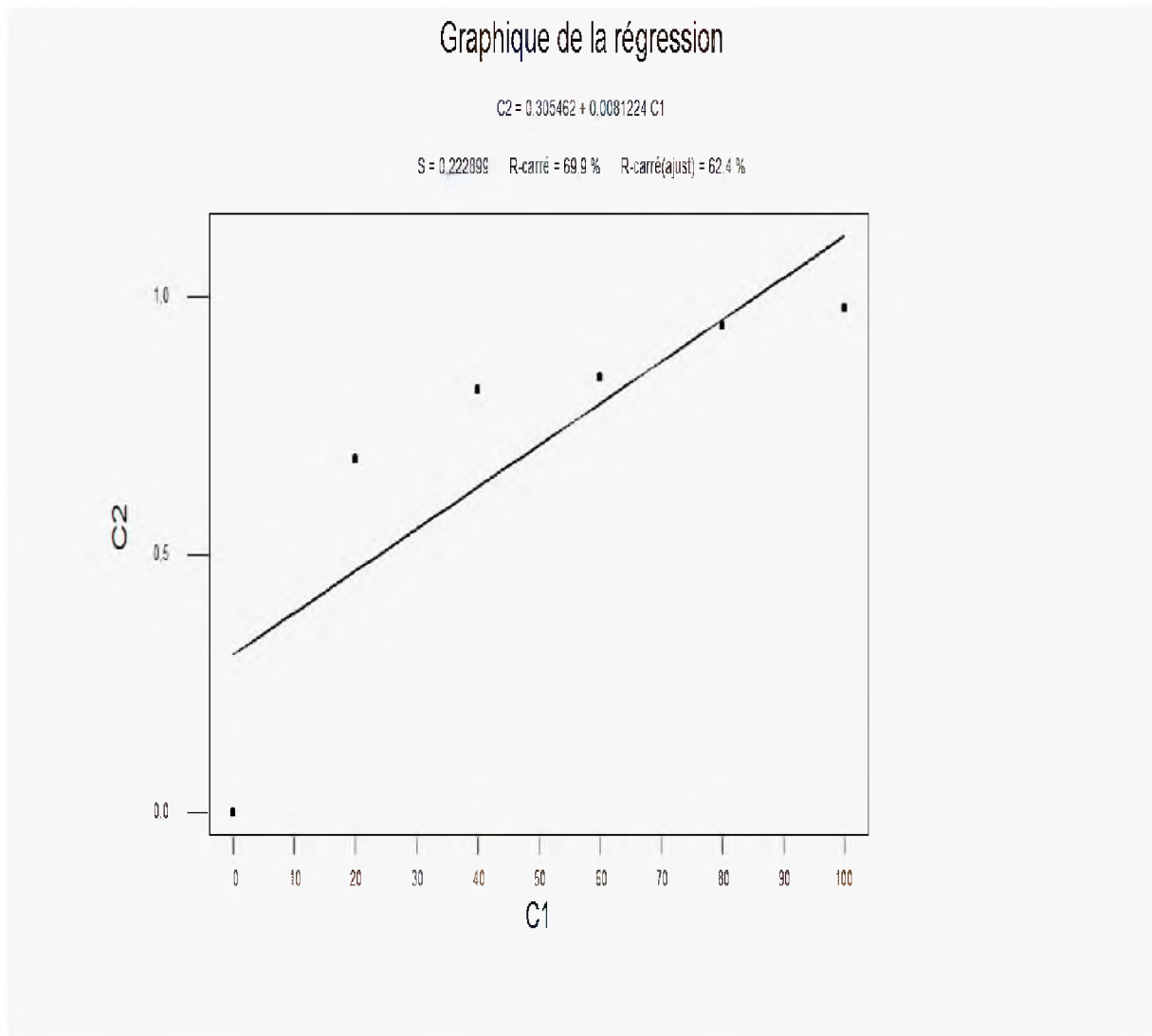
Annexe 1 : les courbes d'étalonnages :

1- Dosage de protéine :

L'équation de régression est :

$$C2 = 0,305462 + 0,0081224 C1$$

S = 0,222899 R-carré = 69,9 % R-carré (ajust) = 62,4 %



Figuer 01 : La courbe détalonnage pour le dosage des protières

2- Dosage de GPX :

L'équation de régression est

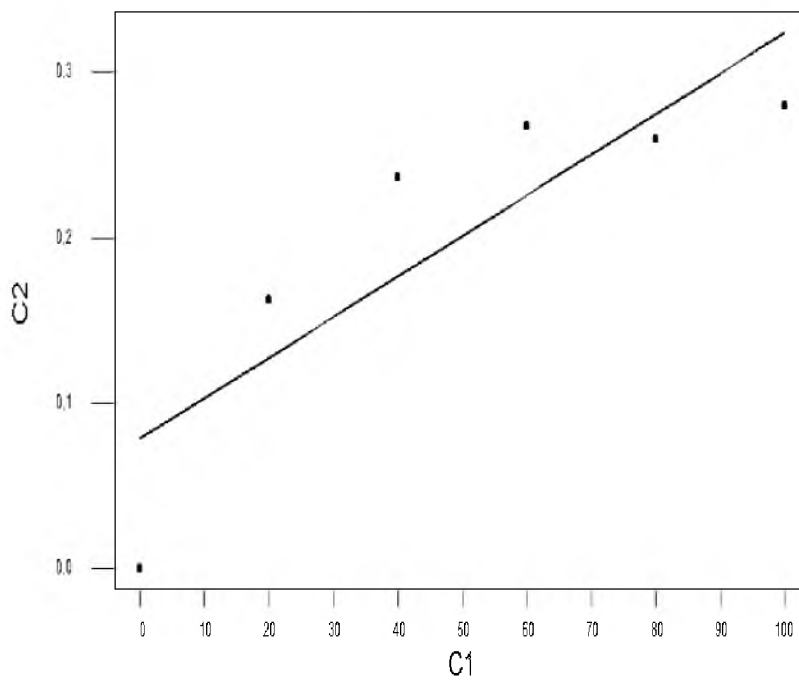
$$C2 = 0,0781619 + 0,0024584 C1$$

$$S = 0,0611355 \quad R\text{-carré} = 73,9 \% \quad R\text{-carré (ajust)} = 67,4 \%$$

Graphique de la régression

$$C2 = 0,0781619 + 0,0024584 C1$$

$$S = 0,0611355 \quad R\text{-carré} = 73,9 \% \quad R\text{-carré (ajust)} = 67,4 \%$$



Figuer 02 : la courbe détalonnage pour le dosage de GPX.

Annexe 02 : les protocoles des dosages pour les analyses des eaux :

1-dosage de la somme de calcium et de magnésium (méthode tetrimétrique à l'EDTA).

{Iso 6059 : Rodier J, 1984}:

❖ **Réactif :**

- ❖ Solution tampon : dissoudre 67,5g de chlorure d'ammonium(NH_4Cl) dans 750ml de solution ammoniacale [25%(m/m) ; et 0,910g/ml] ajouter ensuite 0,5g du sel di-sodique de magnésium de l'EDTA ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8\text{NO}_2\text{Mg}$) et diluer à 1000ml avec l'eau.
- ❖ EDTA : solution titrée (NO_2 EDTA) : 10mmol/l

❖ **Mode opératoire :**

A l'aide d'une pipette, introduire 50ml de l'échantillon préparé dans une fiole conique de 250ml. Ajouter 4ml de solution tampon et 3gouttes de l'indicateur au mordant noir. Solution doit se colorer en violet et son pH doit être de 10. Mélanger et doser immédiatement. Ajouter la solution d'EDTA tout en continuant d'agiter. Verser lentement, puis goutte à goutte dès que la couleur de la solution commence à virer du violet au bleu. Le virage est atteint lorsque la couleur ne doit plus changer avec l'ajout d'une goutte supplémentaire de la solution d'EDTA.

❖ **Expression des résultats :**

La teneur globale en calcium et magnésium, $[\text{Ca}] + [\text{Mg}]$ exprimée en mmol/l est donnée par l'équation :

$$[\text{Ca}] + [\text{Mg}] = C_1 \times V_3/V_0$$

Où ; C_1 : est la concentration en EDTA exprimée en mmol/l.

V_0 : est le volume en ml de la prise d'essai.

V_3 : est le volume en ml de la solution de l'EDTA utilisé pour le dosage.

2-dosage des ions nitrites (NO_2) (Méthode spectrométrique) :

La méthode est applicable à des concentrations des ions nitrites de 0,005 à 10mg/l de NO_2 (en N). À des concentrations plus élevées, on doit opérer une dilution (mesurée à 540nm).

❖ **Réactif :**

- ✓ **Solution de nettoyage** : solution d'acide chlorhydrique (à $d=1,12g=20\%$).
- ✓ **Solution du réactif** : 20 g de sulfamide ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) à dissoudre dans un mélange de 50ml d'acide phosphorique ($d=1,71g/ml=85\%$ de masse) et 250ml d'eau distillée. dans cette solution dissoudre 1g de N-(1-Naphtyl)-éthylène diamine-dichlorohydraté. ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_2$).

Compléter avec l'eau distillée dans une fiole jaugée à un volume de 500ml, cette solution est stable pendant un mois si elle est gardée à l'obscurité (bouteille en verre marron bien fermée) et 4°C au frigo.

- ✓ **Solution standard de 100mg/l** : dissoudre 0,492g ±0,0002 de nitrites de sodium (NO_2SO_2), sécher pendant 2 heures à 105°C dans 750ml d'eau distillée complète à 11 1ml=100g=0,1mg de $\text{NO}_2\text{-N}$. Cette solution est stable pendant un mois à l'obscurité et à 4°C.

❖ **Mode opératoire :**

Dans le cas d'échantillons troubles, il faut filtrer ceux-ci sur un filtre à membrane de 0,45µm. introduire 40ml de l'échantillon (filtre) dans une fiole jaugée de 50ml. Ajouter 1ml de la solution du réactif. Bien mélanger, compléter à 50ml, vérifier que le pH soit < 1,9 (à un pH ajouter de l'acide phosphorique).

3- détermination des phosphates (PO_4^{3-}). {Iso : 6878} :

❖ **Réactif :**

1. réactif-mélange :

A-13g d'heptamolybdate d'ammonium+100ml d'eau distillée.

B-0,35g de tartrate d'antimoine+ 100ml d'eau distillée.

C-150ml d'acide sulfurique concentré+300ml d'eau distillée.

-mélanger (A+C) +B=500ml (stable pendant 2 mois).

2. Acide ascorbique :

10g d'acide ascorbique +100ml d'eau distillée.

❖ **Mode opératoire :**

Prendre 40ml d'eau à analyser, 1ml d'acide ascorbique, ajouter 2ml du réactif-mélange, incubation pendant 10min, l'apparition de la coloration bleu indique la présence des PO_4^{3-} .

❖ **Expression des résultats :** le résultat est donné directement en mg/l

4-dosage des Chlorures (méthode de mohr). {Iso 9297} :

❖ **Réactif**

-nitrate d'argent : dissoudre 4.791g de nitrate d'argent (AgNO_3) dans l'eau. Séchés au préalable à 105°C et compléter à 1000ml dans une fiole jaugée.

-chromate de potassium : dissoudre 10g de chromate de potassium K_2CrO_4 dans l'eau et diluer à 100ml.

❖ **Mode opératoire :**

A l'aide d'une pipette, introduire 100ml de l'échantillon préparé dans une fiole conique de 250ml. Ajouter 1ml d'indicateur de chromate de potassium et titrer la solution par addition

goutte à goutte de solution de nitrate d'argent jusqu'à ce que la solution preuve une couleur rougeâtre. Un essai à blanc est traité de la même façon.

❖ Expression des résultats

La concentration en chlorure, [Cl], exprimée en mg/l est donnée par la formule suivante :

$$[\text{Cl}] = (\text{V}_s - \text{V}_b) \times \text{C} \times \text{F} / \text{V}_a$$

[Cl] : est la concentration de chlorure

V_a : est le volume en ml de l'échantillon

V_b : est le volume en ml de la solution de nitrate d'argent (blanc)

V_s : est le volume en ml de la solution de nitrate d'argent (l'échantillon)

C : est la concentration en moles d'AgNO₃ par litre, de la solution de nitrate d'argent :

$$\text{C} = 0,0282039 \text{ mol/l.}$$

F : est le facteur de conversion.

$$\text{F} = 35,453 \text{ mg/mol.}$$