



République Algérienne Démocratique 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 : Biologie Appliquée**

**MEMOIRE DE MASTER**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la vie**

**Filière : Sciences biologiques**

**Option : Analyses Toxicologiques et Biochimiques**

Thème :

Evaluation des variations de la proline « Indicateur de stress »  
chez une plantes aquatique « *Lemna minor* »

Présenté Par :

*M<sup>lle</sup>. TAIB Dallel*

*M<sup>me</sup>. MAAMRI Souade*

*Devant le jury :*

<b>M<sup>lle</sup> BEN AMMARA A.</b>	M.A.A	Université Larbi Tébessi-Tébessa-	Présidente
<b>M<sup>me</sup> BOUADILA S.</b>	M.A.A	Université Larbi Tébessi-Tébessa-	Rapporteur
<b>M<sup>lle</sup> HAMOUM Z.</b>	M.A.A	Université Larbi Tébessi-Tébessa-	Examinatrice

**Date de soutenance :**

**Note : 16/20**      Mention : .....





## *Remerciement*

*Nous exprimer nos remerciements et notre profonde  
gratitude :*

*Avant tout à dieux « الله » le tout puissant qui nous a donné le courage  
et la force pour ; mener ce travail jusqu'au bout.*

*Nous tenons, en premier lieu, à remercier chaleureusement  
l'enseignante : M<sup>me</sup> BOUADILA Soulef*

*Maitre de assistant à l'université de Tébessa, pour nous avoir proposé ce  
sujet de recherche, pour sa compréhension, son aide et ces conseils,  
présence, pour sa patience, le suivi et l'orientation et le plus important  
pour sa confiance, ...*

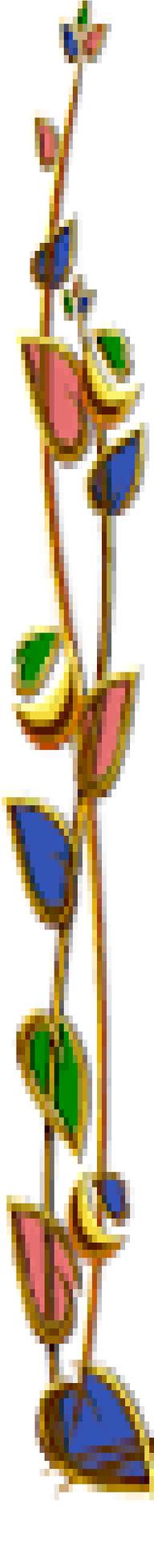
*Nos remercions vont également aux membres du jury*

*Un très grand merci à M<sup>lle</sup> BEN AMMARA amel, maitre-assistant à  
l'université de Tébessa, pour de présider le jury,  
Et à remercier chaleureusement pour son aide et ces conseils et sa  
compréhension,...*

*Nous tenons, merci à M<sup>lle</sup> HAMOUM zakia, maitre- assistant à  
l'université de Tébessa d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et de faire  
partie du Jury de cette soutenance*

*Nous remercions tous les enseignants du département de biologie qui ont  
contribué à notre formation pendant les 05 années d'études passées.*

*Ainsi tous les travailleurs au niveau de la bibliothèque enfin nous  
tenons à remercier très sincèrement tous ceux qui nous ont donnés leur  
soutien et courage, de proche ou de loin.*



*Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à...*

*a mon père et ma mère qui donné  
toujours le courage, les conseils,...,  
pour continuer à l'avant,  
et qui ont été toujours présents  
à mes cotés.*

*Je dédie ce travail*

*A mes très sœurs, et frères*

*Je dédie aussi tous mes amies*

*Dallel*



**DEDICACES**

*Je dédie ce mémoire à...*

*A mon père et ma mère et mon marie*

*qui mon donné toujours le courage,*

*les conseils, pour continuer à l'avant,*

*et qui ont été toujours présents à mes côtés,*

*Je dédie aussi ce travail*

*A mes chères sœurs et mes frères*

*et tous mes amies.*

*Souaad*

*ملخص*

التلوث الصناعي، العمراني والزراعي هو تدمير للبيئة عن طريق الهواء، الماء والترربة، حيث المادة لا توجد طبيعيا فيها. هذا التلوث يؤدي الى تدمير الوسط مما ينتج عنه هجرة وانقراض بعض الكائنات الغير قادرة على التأقلم لهذه التغيرات. هذا التلوث يمكن ان يؤثر على صحة الانسان عن طريق التناول المباشر للنباتات والحيوانات.

النباتات المائية هي نباتات بحيرية ذات دراسات واسعة لأنها أحسن مؤشر يدل على التلوث. لها دور في تصفية الماء، هذا الدور يعتمد على مقاومة هذه النباتات للمكونات النشطة مما يؤدي الى اثار جانبية على عملية أيضا، قدرة نبتة عدس الماء للتصفية، يسمح لها بتصفية المياه الملوثة بفضل قدرة امتصاصها للمواد السامة بواسطة نظامها الجذري.

هذه الدراسة تهدف الى تقدير تأثير المادة السامة على النباتات المائية عدس الماء المصفية للمياه العكرة، انصب اهتمامنا على تقدير نسبة تسمم المياه الملوثة على القياسات البيومترية البيوكيميائية، على هذا المنوال، فان هذه الفصيطة من النباتات، وضعت للنمو في المخبر في ظروف مخبرية، والمحافظة في الماء الملوث، بجرعات متفاوتة، في اوقات مختلفة من المعالجة.

مجموعة النتائج المتحصل عليها، فيما يخص القياسات البيومترية: زيادة في عدد الاوراق، الجذور وطول الجذور. كما سجلنا ارتفاع كبير في القياسات البيوكيماوية: زيادة في نسبة البروتينات ونسبة البرولين وتذبذب في نسبة الكلوروفيل(ا)، (ب)، (ا+ب).

**الكلمات المفتاحية:** تصفية المياه، عدس الماء، الاجهاد التأكسدي، مؤشرات التأكسد، المياه الملوثة

**ABSTRACT**

Industrial, urban and agricultural pollution is a degradation of the environment by the introduction into the air, water or soil of substances, which are not naturally present in the middle. It causes disruption of the ecosystem, the consequences of which until the migration or extinction of some species unable to adapt to change. This pollution can have consequences for the health of man direct ingestion of plants and animals.

Macrophytes are lake plants whose study is important because they have a good indicator of the degree of pollution, distinguished by their role of filtration and the specific purifying effect of these aquatic plants depends on their Resistance to active ingredients causing possible side effects, on their metabolism.

Lemna minor's purification capacities allow it to filter wastewater, Thanks to the high absorbency of their root system. The latter has a large Ability to absorb xenobiotics and a high rate of accumulation.

The study aims to assess the impact of xenobiotic on aquatic plants. Lemna minor water lens, wastewater purifiers. We have therefore Toxicity of this wastewater on morphological, biochemical, etc. aspects. Effect, these species are cultured in the laboratory under in vitro conditions which Retention in wastewater, at different doses, and at different treatment times:

The set of results obtained indicates, with regard to the parameters Morphological changes: increase in the numbers of leaves, and Roots however we noticed a sharp increase in biochemical parameters: The increase in total protein levels, and the proline content, we also Noticed a disturbance in chlorophyll a, b, and a + b.

**Keywords:** Water purification, water lens, oxidizing stress, stress indicator, water waste.

**RESUME**

La pollution industrielle, urbaine, et agricole est une dégradation de l'environnement par l'introduction dans l'air, l'eau ou le sol de matières n'étant pas présentes naturellement dans le milieu. Elle entraîne une perturbation de l'écosystème dont les conséquences peuvent aller jusqu'à la migration ou l'extinction de certaines espèces incapables de s'adapter au changement. Cette pollution peut avoir des conséquences sur la santé de l'homme soit par l'ingestion directe des végétaux et animaux.

Les macrophytes sont des plantes lacustres dont l'étude est importante car elles ont une bonne valeur indicatrice du degré de pollution, 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. Ce dernier possède une grande faculté d'absorber les xenobiotiques.

L'étude menée, vise à évaluer l'impact du xénobiotique sur des plantes aquatiques la lentille d'eau *Lemna minor*, épuratrices des eaux usées. Nous nous sommes donc intéressés à évaluer la toxicité de ces eaux usées sur les aspects morphologique, biochimiques,...A cet effet, ces espèces sont mises en culture en laboratoire, dans des conditions in vitro, dans des eaux usées, à différentes doses, et à différents temps de traitement :

L'ensemble des résultats obtenus indiquent, concernant les paramètres morphologiques : une augmentation dans les nombres des feuilles, des racines, et la longueur des racines cependant nous avons noté une forte augmentation dans les paramètres biochimiques : l'augmentation dans les taux des protéines totales, et la teneur en proline, nous avons aussi remarqué une perturbation dans les teneurs en chlorophylles *a*, *b*, et *a+b*.

**Les mots clés :** Epuration des eaux, lentille d'eau, stress oxydant, indicateur de stress, les eaux usées.

## Table des matières

ملخص
Abstract
Résumé
Remerciements
Dédicace
Listes des matières
Liste des tableaux
Liste des figures
Liste des abréviations
Introduction

### Chapitre 01 : Bioépuration par des plantes aquatiques

1. Définition d'une plantes aquatiques	04
2. Différentes types des plantes aquatiques	04
3. Phytoépuration	04
4. différents systèmes de phytoépuration	05
4.1. Lagunage à microphytes	05
4.2. Lagunage à macrophytes	05
5. Avantages du lagunage	06
6. Inconvénients du lagunage	06
7. Mécanismes d'adaptation des plantes au stress	07
7.1. Capacité photosynthétique	07
7.2. Teneur en chlorophylle.	07
7.3. Accumulation de la proline en condition de stress	07
8. Epuration de l'eau	08
8-1- Traitement primaire	08
8-2- Traitement secondaire	08
8-3- Traitement biologique.	08
9. Différentes méthodes de traitement des eaux usées	08
9.1. Filtres plantés à écoulement vertical	08
9.2. Filtres plantés à écoulement horizontal	09

## *Table des matières*

9.3. Systèmes hybrides	<b>09</b>
------------------------	-----------

### *Chapitre 02 : stress oxydatif chez les plantes aquatiques*

1. Définition du stress oxydant	<b>11</b>
2. Origine du stress oxydant	<b>11</b>
3. Causes du stress oxydant	<b>12</b>
4. Espèces Réactives de l'Oxygène	<b>12</b>
4.1. Radicaux libres ERO	<b>12</b>
4.1.1. ERO primaire	<b>12</b>
4.1.2. ERO secondaire	<b>13</b>
4.2. Production des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule végétales aquatiques	<b>14</b>
4.2.1. Chloroplastes et l'appareil photosynthétiques	<b>15</b>
4.2.2. Peroxysomes	<b>16</b>
4.2.3. Mitochondries et la chaine respiratoire.	<b>16</b>
5. Mécanisme de défense contre les stress oxydatif " Antioxydant "	<b>17</b>
5. 1. Principaux systèmes non enzymatiques	<b>17</b>
5. 1.1. Proline.	<b>17</b>
5.1.2. Glutathion.	<b>17</b>
5.2. Système de défense par des enzymes antioxydants	<b>18</b>
5.2.1. Super-oxyde dismutase (SOD)	<b>18</b>
5.2.2. Catalase (CAT).	<b>19</b>
6. Principaux stress environnementaux auxquels les sont confrontées.	<b>19</b>
6.1. Stress biotique	<b>19</b>
6.2. Stress abiotique.	<b>19</b>
7. Conséquences du stress oxydatif	<b>19</b>
7-1- Altération de la structure des protéines	<b>19</b>
7-2- Altération de la structure des lipides	<b>20</b>
7-3- Altération de la structure des acides nucléiques.	<b>20</b>

### *.Chapitre 03 : Méthode et matériels*

I. Matériel biologique	<b>22</b>
------------------------	-----------

## Table des matières

1. <i>Lemna minor</i>	22
1. 1. Systématique de la plante	23
1.2. Description de l'espèce	23
1.3. Distribution et Biotope de l'espèce	23
1.4. Culture de <i>lemna minor</i>	23
1.5. Impact de <i>lemna minor</i>	24
1.6. Capacités dépolluantes particulières	24
1.7. Croissance	24
2. Prélèvement de l'eau	24
II. Condition de l'expérimentation	25
1. Solution de knop (liquide de knop)	26
2. Methode de dosage	27
2.1. Paramètres biochimiques	27
2.1.1. Dosage des protéines totales	27
2.1.1.1. Principe	27
2.1.2. Extraction et dosage de la chlorophylle	28
2.1.3. Dosage de la proline	28
2.2. Paramètres morphométriques	29
2.2.1. Nombres moyennes des racines	29
2.2.2. Nombres moyennes des feuilles	29
2.2.3. Longueur moyennes des racines	30
2.3. Dosage des paramètres physicochimiques des eaux usées	30

## Chapitre 04 : Résultats et discussions

I. Analyse statistique	32
1. Résultats	32
2. Paramètres biochimiques	33
2.1. Protéines totales	33
2.2. Proline	35
2.3. Chlorophylles a, b et a+b	37
2.3.1. Chlorophylle a	37
2.3.2. Chlorophylle b	39

## *Table des matières*

---

2.3.3. Chlorophylles a+b	<b>41</b>
3. Paramètres morpho-métriques	<b>43</b>
3.1. Nombre des racines	<b>43</b>
3.2. Nombre des feuilles	<b>45</b>
3.3. Longueur des racines	<b>47</b>
<b>Discussion</b>	<b>50</b>
<b>Conclusion</b>	<b>58</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>60</b>
<b>Annexes</b>	<b>75</b>

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableaux</b>	<b>Titres</b>	<b>Pages</b>
<b>Tableau 01</b>	Présentation de quelques espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) radicalaire ou non.	<b>14</b>
<b>Tableau 02</b>	Répartition de la plante aquatique <i>Lemna minor</i> dans des 03 aquariums.	<b>25</b>
<b>Tableau 03</b>	Compositions chimiques de solution de knop utilisé pour la culture de <i>Lemna minor</i>	<b>.27</b>
<b>Tableau 04</b>	Méthodes des paramètres physicochimiques	<b>30</b>
<b>Tableau 05</b>	Moyennes des taux de protéines totales en ( $\mu\text{g} / \text{mg}$ de MF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : l'eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ eau d'oued mellague et $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>34</b>
<b>Tableau 06</b>	Moyennes des taux des prolines totales en ( $\mu\text{g} / \text{mg}$ de MF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ eau d'oued mellague et $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>36</b>
<b>Tableau 07</b>	Taux des chlorophylles <b>a</b> en ( $\text{mg} / \text{g}$ de MF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ l'eau d'oued mellague $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>38</b>
<b>Tableau 08</b>	Taux des chlorophylles <b>b</b> en ( $\text{mg} / \text{g}$ de MF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ eau d'oued mellague et $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>40</b>
<b>Tableau 9</b>	Taux des chlorophylles <b>a+b</b> en ( $\text{mg} / \text{g}$ de MF) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : l'eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ eau d'oued mellague et $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>42</b>
<b>Tableau 10</b>	Nombre des racines de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : l'eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ eau d'oued mellague et $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>44</b>

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 11</b>	Moyennes de nombre des feuilles de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées, ( <b>E1</b> : l'eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : ½ eau d'oued mellague et ½ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>46</b>
<b>Tableau 12</b>	Moyennes de la longueur des racines de <i>lemna minor</i> placées dans des eaux usées ( <b>E1</b> : l'eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : 1(L) l'eau d'oued mellague et 1L l'eau distillée en fonction du temps (J).	<b>48</b>
<b>Tableau 13</b>	Résultats des analyses physico-chimiques des eaux usées avant et après le traitement dans l'algérienne des eaux.	<b>49</b>
<b>Tableau 14</b>	Résultats des analyses physico-chimiques avant et après le traitement dans le FERPHOS.	<b>49</b>

## *Liste des figures*

<b>Figure</b>	<b>Titres</b>	<b>pages</b>
<b>Figure 01</b>	Quatre catégories de la plantes aquatiques.	<b>04</b>
<b>Figure 02</b>	Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants.	<b>11</b>
<b>Figure 03</b>	Schématisation de la transformation énergétique ou chimique (réductions successives) de la molécule de dioxygène dans un système biologique	<b>13</b>
<b>Figure 04</b>	Principaux sites de production des ROS dans la cellule végétale	<b>15</b>
<b>Figure 05</b>	Représentation de la chaîne respiratoire d'une mitochondrie	<b>16</b>
<b>Figure 06</b>	Formules chimiques de la proline.	<b>17</b>
<b>Figure 07</b>	Principales enzymes antioxydantes.	<b>18</b>
<b>Figure 08</b>	Plante aquatique <i>Lemna minor</i>	<b>22</b>
<b>Figure 09</b>	Station d'échantillonnage d'Oued Mellague.	<b>25</b>
<b>Figure 10</b>	Répartition des plantes ( <i>Lemna minor</i> ) dans trois aquariums.	<b>26</b>
<b>Figure 11</b>	Effets des eaux usées sur la teneur en protéines totale en ( $\mu\text{g} / \text{mg}$ de matière fraîche) chez la lentille d'eau <i>Lemna minor</i> ( <b>T</b> : Témoin) et ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ eau d'oued mellague et $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>33</b>
<b>Figure 12</b>	Effets des eaux usées sur la teneur en proline totale ( $\mu\text{g} / \text{mg}$ ) chez la lentille d'eau <i>Lemna minor</i> ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ eau d'oued mellague et $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>35</b>
<b>Figure 13</b>	Variations des effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle <b>a</b> en ( $\text{mg} / \text{g}$ ) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ eau d'oued mellague et $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>37</b>
<b>Figure 14</b>	Variation des effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle <b>b</b> en ( $\text{mg} / \text{g}$ ) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ eau d'oued mellague et $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>39</b>
<b>Figure 15</b>	Les effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle <b>a + b</b> en ( $\text{mg} / \text{g}$ ) chez les feuilles de <i>lemna minor</i> ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : $\frac{1}{2}$ eau d'oued mellague et $\frac{1}{2}$ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>41</b>

## *Liste des figures*

---

<b>Figure 16</b>	Les effets des eaux usées sur le nombre des racines (NR) de <i>lemna minor</i> . ( <b>T</b> : Témoin), ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : ½ eau d'oued mellague et ½ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>43</b>
<b>Figure 17</b>	Les effets des eaux usées sur le nombre des feuilles (NF) de <i>lemna minor</i> . ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : ½ eau d'oued mellague et ½ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>45</b>
<b>Figure 18</b>	les effets des eaux usées sur la longueur moyenne des racines en (mm) de <i>lemna minor</i> ( <b>E1</b> : eau d'oued mellague) et <b>E2</b> : ½ eau d'oued mellague et ½ eau distillée en fonction du temps (J).	<b>47</b>
<b>Figure 19</b>	La courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines et prolines.	<b>75</b>

## Liste des abréviations

Abréviations	Significations
<b>ADN</b>	Acide desoxy-ribo-nucléique
<b>AOX</b>	Alternative oxydase
<b>APX/GR</b>	L'ascorbate peroxydase /glutathion reductase
<b>BSA</b>	Sérum d'albumine bovine
<b>C</b>	Celcius
<b>Ca<sup>+</sup></b>	Calcium
<b>CaNO<sub>3</sub></b>	Nitrate de calcium
<b>CAT</b>	Catalase
<b>cd</b>	Cadmium
<b>CE</b>	Conductivité
<b>CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub></b>	Acétone
<b>Chl</b>	Chlorophylle
<b>cm</b>	Centimètre
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>CO<sub>2</sub><sup>·</sup></b>	Radical dioxyde de carbone
<b>CO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Carbonate
<b>CTE</b>	Chaînes de transport d'électrons
<b>Cu</b>	Cuivre
<b>Cyt-C</b>	Cytochrome c
<b>e<sup>-</sup></b>	Électron
<b>ERA</b>	Espèces réactives de l'azote
<b>ERO</b>	Espèces réactives de l'oxygène
<b>EUB</b>	Eau usées brute
<b>EUE</b>	Eau usées épurées
<b>Fe<sup>++</sup></b>	Fer
<b>FERPHOS</b>	Établissement des mines de phosphate
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	Sulfate ferrique
<b>g</b>	Gramme
<b>GPX</b>	glutathion peroxydase, en anglais Guaiacol-peroxidase activity

## Liste des abréviations

<b>GR</b>	glutathion reductase
<b>GSH</b>	Glutathion
<b>h</b>	Heure
<b>H<sup>+</sup></b>	Protone
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène
<b>HCOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Peroxomonocarbonate
<b>HNO<sub>2</sub></b>	Acide nitrique
<b>J</b>	Jour
<b>K</b>	Potassium
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Phosphate monopotassique ou dihydro-géno-phosphate
<b>Km</b>	Kilomètre
<b>KNO<sub>3</sub></b>	Nitrate de potassium
<b>L</b>	Litre
<b>Ln</b>	Proline
<b>LR</b>	Langueur des racines
<b>m</b>	Mètre
<b>MDA</b>	dialdehyde malonique, en anglais malondialdehyde
<b>MES</b>	Matieres en suspension
<b>mg</b>	Milligramme
<b>Mg<sup>+</sup></b>	Magnésium
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	Sulfate de magnésium
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Millilètre
<b>mm</b>	Millimètre
<b>mmol</b>	Milli-mol
<b>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Trioxyde d'azote
<b>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	Tetraoxyde
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfate de magnésium
<b>NADH</b>	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
<b>NF</b>	Nombre des feuilles

## Liste des abréviations

<b>NO<sup>+</sup> et NO<sup>-</sup></b>	Cation et anion nitrosyle
<b>NO<sup>+</sup></b>	Cation nitronium
<b>NO<sub>2</sub>Cl</b>	Chlorure de nitrile
<b>NO<sub>x</sub></b>	Oxyde d'azote
<b>NR</b>	Nombre des racines
<b>NO<sup>·</sup></b>	Oxyde nitrique
<b>NO<sub>3</sub><sup>·</sup></b>	Radical nitrate
<b>NO<sub>2</sub><sup>·</sup></b>	Dioxyde nitrique
<b>O<sub>2</sub></b>	oxygène
<b>O<sub>2</sub><sup>-·</sup></b>	L'anion superoxyde
<b>O<sub>2</sub>NOO<sup>-·</sup></b>	Peroxynitrate
<b>OH<sup>·</sup></b>	Radicale hydroxyl
<b>ONOO<sup>-·</sup></b>	Peroxynitrite
<b>ONOOH</b>	Acideperoxynitreux,
<b>orn</b>	Ornisitol
<b>P</b>	Plante
<b>Ph</b>	Phosphore
<b>P5CR</b>	1-pyrroline-5-carboxylate
<b>PH</b>	Potentiel hydrogene
<b>Pr</b>	Protein
<b>PSII, PSI</b>	Photosysteme I ou Photosysteme II
<b>RO<sup>·</sup></b>	Alkoxy
<b>RO<sub>2</sub><sup>·</sup></b>	Peroxyle
<b>ROOH</b>	Peroxydes organiques
<b>SH</b>	Radicale thiol
<b>SO<sub>2</sub></b>	Dioxyde sulfurique
<b>SO<sub>4</sub></b>	Sulfate
<b>SOD</b>	Super-oxyde dismutase
<b>T</b>	Température
<b>UV</b>	Ultra-violet
<b>Zn</b>	Zinc

## *Liste des abréviations*

---

<b>µg</b>	Micro-gramme
<b>µl</b>	Micro-litre
<b>µs</b>	Micro-second
<b>%</b>	Pourcentage
<b>±</b>	Plus ou moins
<b>1/2</b>	Demie

# *Introduction*

## INTRODUCTION

L'activité humaine, qu'elle soit industrielle, urbaine ou agricole, produit des substances polluantes, qui seraient à l'origine de divers types de pollution.

Ces polluants émis dans l'atmosphère, évacués dans les eaux usées se retrouvent dans les milieux aquatiques, qui provoque le stress oxydant chez la faune et la flore qui les habitent.

Le stress oxydatif est à l'origine de plusieurs stress abiotiques (salinité, métaux lourds, stress hydrique...), d'où la mise en œuvre par la cellule végétale de plusieurs systèmes de détoxifications tels que les métabolites secondaires, qui jouent un rôle crucial dans la détoxification des ERO.

En générale, certaines plantes aquatiques sont communément utilisées en zones humides reconstituées pour le traitement des eaux usées. L'assimilation des composés azotés et phosphorés par ce type de plantes constitue l'un des critères de choix pour leur utilisation en épuration des eaux usées.

L'utilisation des plantes aquatiques enracinées pour le traitement des eaux usées urbaines domestiques, industrielles... comme les lentilles d'eau *Lemna minor*, est représentée dans tout le monde et particulièrement dans les pays à climat chaud où le rendement photosynthétique est important (comme l'Algérie).

D'autre part pour l'évaluation de la tolérance et des mécanismes mis par la plante pour résister via les différents polluants existants dans les eaux usées, nous avons étudié plusieurs bio-marqueurs biologiques comme la proline (indicateur de stress), c'est un bio-marqueur biologique, la capacité d'accumuler la proline est corrélée la tolérance des plantes au stress abiotique (**Barnett et Naylor, 1966 ; Singh et al., 1972 ; Stewart et Lee, 1974**). La proline peut agir comme un osmolyte, un capteur d'ERO et un chaperon moléculaire stabilisateur de la structure des protéines, protégeant ainsi les cellules contre des dommages causés par le stress (**Hare et Cress, 1997 ; Rhodes et al., Verbruggen et Hermens, 2008 ; Szabados et Savoures, 2010**).

Le niveau de la proline est déterminé par l'équilibre entre sa biosynthèse et son catabolisme (Szabados et Savourén 2010).

Dans cette concordance nous avons mis les objectifs suivants :

Le premier but 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 Mellegue en raison de leur forte pollution par des effluents industriels, des eaux ménagères et des eaux d'irrigation agricole.

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

Ainsi notre mémoire est subdivisé en quatre grands chapitres :

## **Chapitre 01 :**

Dans ce chapitre, nous avons décrit la définition, origines, causes et conséquence du stress oxydatif, les principales sources de radicaux libres, et leur mécanisme de défense contre les stress oxydatif.

## **Chapitre 02 :**

Donnera un aperçu sur la définition, classification de la bio-épuration (lagunage), Une classification générale des différents types de lagunage, traitement des eaux usées, ...etc.

## **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. Ainsi nous avons étudié plusieurs bio-marqueurs biologiques comme la proline (indicateur de stress).

## **Chapitre 04 :**

Les résultats obtenus et leur interprétation et la discussion de chaque résultat.  
Une conclusion sur l'ensemble des résultats et suggère quelques perspectives à ce travail.

*Chapitre 01 : Bioépuration  
par les plantes aquatiques*

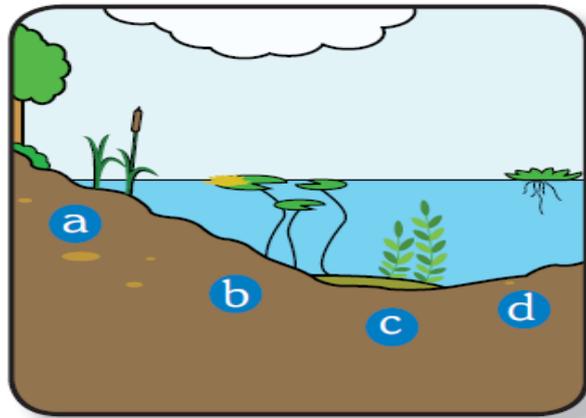
## 1. Définition d'une plante aquatique

Les plantes aquatiques, souvent appelées macrophytes, sont des plantes visibles à l'œil nu ayant la capacité de vivre dans l'eau ou aux abords des plans d'eau.

## 2. Différents types de plantes aquatiques

Il existe quatre catégories de plantes aquatiques ayant des caractéristiques physiques différentes :

- 1- Les plantes émergentes (a) sont enracinées aux sédiments et certaines de leurs parties, telles que les feuilles et les fleurs, poussent à l'extérieur de l'eau.
- 2- Les plantes à feuilles flottantes (b) ont des racines ancrées aux sédiments, mais leurs feuilles et leurs fleurs flottent à la surface de l'eau.
- 3- Les plantes submergées (c) sont enracinées aux sédiments et croissent entièrement sous la surface de l'eau.
- 4- Les plantes flottantes (d) ont des feuilles qui flottent à la surface de l'eau mais, contrairement aux autres plantes aquatiques, elles circulent librement dans l'eau, car leurs racines ne sont pas ancrées aux sédiments. [CRE, Laurentides 2009]



**Figure 01 : Les différents types de plantes aquatiques.**

## 3- Phytoépuration

Est un système très efficace pour éliminer la pollution microbologique des eaux usées. Plusieurs professionnels se tournent actuellement vers cette technique pour traiter les eaux grises (douches,...etc) et noires (toilettes).

Dans ces systèmes, ce sont les micro-organismes et les plantes qui dégradent la matière organique contenue dans les eaux (C. Boutin et al., 2009).

La phytoépuration veut dire l'action de l'épuration des eaux usées en présence de plantes. Elle peut être réalisée à travers différents systèmes, caractérisés par le fait que l'eau vient couler lentement et sous conditions contrôlées à l'intérieur de milieux végétaux, de

façon à en favoriser l'épuration naturel, qui s'effectue à cause du processus d'aération, sédimentation, absorption et métabolisation de la part des microorganismes et de la flore.

Les macrophytes et plus spécifiquement les roseaux ont la particularité de former un tissu racinaire et un réseau de galeries qui drainent apportent de l'oxygène et servent de support aux bactéries aérobies. Ces bactéries, ainsi que la macrofaune du sol, ont un rôle de dégradation et de minéralisation de la matière organique, qui devient assimilable par les plantes. (Medjdoub, 2014).

#### **4. Différents systèmes de phytoépuration**

##### **4.1. Lagunage à microphytes**

Dans les bassins de lagunage à microphytes (ou lagunage naturel), les plantes sont uniquement représentées par le phytoplancton, algues microscopiques de 1 /100 éme de mm en moyenne, mais jouant le même rôle que les macrophytes dans la fixation des nutriments. On distingue plus de 100000 espèces (ARDAM, 2007). L'épuration est donc essentiellement basée sur l'action symbiotique entre les populations d'algues et de bactéries.

Cependant, certains problèmes persistent notamment dans le cas d'une trop forte concentration de matières en suspension dans l'effluent. De meilleurs résultats, peuvent être obtenus par lagunage à macrophytes (Seidl M. et Mouchel J. M., 2003).

##### **4.2. Lagunage à macrophytes**

Il est caractérisé par la présence de plantes visibles à l'oeil nu. Il est constitué de plantes immergées ou émergées, enracinées ou non, telles que les roseaux, les lentilles d'eau ou les jacinthes d'eau.

Les bassins sont alors généralement de plus faible surface et moins profonds (0,6 à 0,8 m) où la charge polluante est plus faible (ARDAM, 2007).

L'utilisation des macrophytes peut améliorer significativement la qualité de l'effluent, mais leur biomasse ne produit guère de bénéfices supplémentaires. L'effet épuratoire est dû principalement à la faculté de ces plantes d'extraire les éléments nutritifs de la colonne d'eau et au support que leurs racines et feuilles offrent aux micro-organismes susceptibles de dégrader les matières organiques passe principalement par la création d'une zone de rhizomes servant comme support pour le biofilm pouvant dégrader.

Cet effet est cependant minimisé par la diminution de la ré-aération de la colonne d'eau. Par contre, l'ombrage de l'eau dû à la présence des macrophytes diminue fortement la quantité de rayonnements UV qui atteignent l'eau et l'efficacité épuratoire vis-à-vis des

## *Chapitre 01 : Bioépuration par les plantes aquatiques*

---

espèces pathogènes indicatrices (coliformes et streptocoques) (Seidl M. et Mouchel J. M., 2003).

De plus, l'utilisation des macrophytes entraîne une augmentation des coûts de fonctionnement du fait d'un entretien plus lourds (faucardage et arrachage) (ARDAM, 2007).

### **5. Avantages du lagunage**

Le principe de lagunage présente quatre avantages particuliers :

- En termes d'économie, d'écologie, d'aménagement du territoire et de pédagogie. D'un point de vue économique, l'entretien d'une station de lagunage est moins coûteuse et moins long qu'une station classique ; une station de lagunage ne présente aucun raccordement électrique et ne demande pas de personnel qualifié.
- Ecologiquement parlant, les bassins de lagunage développent tout un écosystème, où les végétaux aquatiques servent ainsi de support et de nourriture à une faune nombreuse (telle que les oiseaux, les amphibiens, les insectes), qui contribue à accroître la biodiversité du secteur.
- L'aménagement de leur territoire, ce type d'assainissement assure une intégration parfaite dans le contexte paysager (champs, étang, etc...).
- Enfin, un bassin de lagunage peut servir de support à des sujets de pédagogie très diversifiés, tels que l'eau, l'assainissement, la faune et la flore aquatique (**eau en couleur, 2006**).

### **6. Inconvénients du lagunage**

Ce procédé de traitement présente les principaux inconvénients suivants :

- ✓ Une emprise au sol importante
- ✓ Des contraintes de nature de sol et d'étanchéité
- ✓ Une variation saisonnière de la qualité de l'eau traitée
- ✓ Une élimination de l'azote et du phosphore incomplète
- ✓ Des difficultés d'extraction des boues (**eau en couleur, 2006**).
- ✓ L'impossibilité d'effectuer des réglages en exploitation (**eau en couleur, 2006**), impliquant donc que la conception des installations intègre au maximum les contraintes attendues (telles que les pointes hydrauliques et organiques, les températures minimales) (**FNDAE, 2005**).

## 7. Mécanismes d'adaptation des plantes au stress

### 7.1. Capacité photosynthétique

La cinétique de la fluorescence chlorophyllienne est utilisée pour étudier les effets des stress abiotiques sur le rendement de la photosynthèse et principalement sur l'activité des photosystèmes PSII (Krause et Weis, 1991). (Djekoun et Planchon, 1991) ont confirmé l'intérêt des mesures *in vivo* de la fluorescence chlorophyllienne pour l'étude de l'adaptation des plantes cultivées aux contraintes de l'environnement.

Les investigations basées sur des évaluations de la fluorescence chlorophyllienne ont prouvé que le PSII est tout à fait résistant au stress hydrique. Une grande partie du stress hydrique a été orientée pour diriger les effets de la déshydratation sur les réactions biochimiques de la photosynthèse (Heitholt *et al.*, 1991).

Pendant que les teneurs en eau des feuilles diminuent, une diminution d'efficacité photochimique de PSII et du transport d'électron se produit (Giardi *et al.*, 1996). Ceci peut être dû aux dommages des centres de réaction de PSII, mais peut également être provoqué par la diminution de la capacité de transport d'électron de PSII (Osmond, 1994).

La majeure partie de la variation de l'utilisation d'énergie pour la photochimie pendant un stress hydrique peut être expliquée en termes de variation de l'efficacité de la capture d'électron par les centres ouverts de PSII (Cornic et Fresneau, 2002). Yakhlef et Djekoun, (2000) suggèrent que la survie des plantes au manque d'eau est en partie due à l'entretien de la capacité photosynthétique des feuilles, permettant le rétablissement rapide des plantes suite à une période de stress hydrique.

### 7.2. Teneur en chlorophylle

Il est clairement exposé dans la littérature que la photosynthèse et les échanges gazeux des feuilles sont affectés par plusieurs stress dont, la salinité, le stress hydrique, le stress métallique, la compaction du sol, ...etc. (Thripathi et Tripathi, 1999).

### 7.3. Accumulation de la proline en condition de stress

L'accumulation de la proline constitue aussi un véritable mécanisme de tolérance au stress (Slama *et al.*, 2005). L'existence chez les céréales d'une variation intra spécifique pour l'accumulation de la proline sous l'effet du stress hydrique suggère la possibilité d'une sélection, sur la base de ce caractère, des génotypes qui auront une bonne capacité à survivre et un rendement en grains stable en conditions hydriques limitantes (Bergareche *et al.*, 1993). Pour cette raison, certains auteurs comme, (Bellinger *et al.*, 1991) proposent l'accumulation de la proline comme technique de sélection.

### **8. Epuration de l'eau**

#### **8.1. Traitement primaire**

Il permet d'éliminer de l'eau les matières en suspension (déchets grossiers, sables...) et les huiles (Louis, 2009).

#### **8.2. Traitement secondaire**

Le traitement secondaire élimine les matières en solution dans l'eau (matières organiques, substances minérales...) (Louis, 2009).

#### **8.3. Traitement biologique**

Les eaux arrivent dans un bassin où sont développées des cultures de micro-organismes.

Les impuretés sont alors digérées par ces êtres vivants microscopiques et transformées en boues. On reproduit ici l'autoépuration naturelle que l'on peut observer dans les rivières : sous l'action d'un brassage mécanique ou d'un apport d'air, les micro-organismes se reproduisent très rapidement ; ils se nourrissent de la pollution organique et du dioxygène de l'air pour produire du gaz carbonique et de l'eau.

A la suite de ce traitement la décantation secondaire permet de recueillir, sous forme de boues, les matières polluantes agglomérées par les micro-organismes.

Le traitement biologique est le procédé le plus utilisé pour restaurer la qualité de l'eau en la débarrassant de ses principales impuretés. Il est indispensable, mais insuffisant : en dessous de 5°C, l'activité bactérienne est stoppée. Les bactéries éliminent difficilement les phosphates, les éléments toxiques et les polluants non biodégradables (Louis, 2009).

### **9. Différentes méthodes de traitement des eaux usées**

#### **9.1. Filtres plantés à écoulement vertical**

Les principaux mécanismes d'épuration s'appuient sur la combinaison de plusieurs processus en conditions aérobies, qui se déroulent successivement sur deux étages de traitement.

Les filtres à écoulement vertical sont alimentés en surface, l'effluent percole verticalement à travers le substrat. La rétention physique des matières en suspension s'effectue en surface des filtres.

Ce type de dispositif permet un stockage et une minéralisation des boues sur le premier filtre de traitement par stabilisation des boues. La dégradation biologique des matières dissoutes est réalisée par la biomasse bactérienne aérobie fixée sur le support non saturé.

Pour des questions de capacité d'oxygénation, les filtres du premier étage contribuent essentiellement à la dégradation de la fraction carbonée alors que ceux du deuxième étage terminent la dégradation de cette fraction et peuvent permettre une nitrification qui sera en fonction des conditions d'oxygénation, de la température et du pH (**Poulet et al., 2004**).

### **9.2. Filtres plantés à écoulement horizontal**

Les filtres horizontaux ne sont pas alimentés par la surface, comme les filtres verticaux. Les eaux usées décantées entrent, via un gabion d'alimentation, directement dans le massif filtrant. Il est donc nécessaire de débarrasser l'effluent, au préalable, des matières en suspension, soit par l'intermédiaire d'un décanteur placé en amont, soit par un premier étage de filtration verticale. Les matières dissoutes sont dégradées dans le massif de filtration par la biomasse bactérienne fixée sur le support.

Le niveau d'eau dans un filtre horizontal est normalement constant. L'aération est limitée par l'absence d'un mouvement de la ligne de saturation et se fait de manière très faible par une diffusion gazeuse. L'apport d'oxygène est faible par rapport à la demande totale. La pénurie en oxygène, limite la dégradation de la pollution carbonée et azotée, oxydation du carbone organique et de l'ammonium, et par conséquent limite la croissance bactérienne hétérotrophe et autotrophe (**Poulet et al., 2004**).

### **9.3. Systèmes hybrides**

Son intérêt réside dans la combinaison des deux sortes de filtres : bonne nitrification dans les filtres verticaux bien oxygénés (dégradation de la matière organique) suivie d'une dénitrification dans les filtres horizontaux par des bactéries dénitrifiantes (conditions d'anoxie nécessaires). Les rendements de la dénitrification ne sont pas très élevés car les bactéries ont besoin de matière organique pour se développer et dénitrifier correctement (**Grison, 1999**).

*Chapitre 02: Stress  
oxydatif chez les plantes  
aquatiques*

## Chapitre 02. Stress oxydatif chez les plantes aquatique

### 1. Définition du stress oxydatif

Le stress oxydatif (ou stress oxydant) est un type d'agression des constituants de la cellule dû aux espèces réactives oxygénées et aux espèces réactives azotées oxydantes qui vont s'attaquer aux membranes cellulaires, aux protéines et à l'ADN.

Un stress oxydant peut-être induit lors de la surproduction d'espèces réactives et/ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse. Il correspond à un déséquilibre entre molécules pro-oxydant (espèces réactives oxygénées) et molécules de défenses anti-oxydantes (vitamines, enzymes) au niveau cellulaire (Peltier et al., 2004).

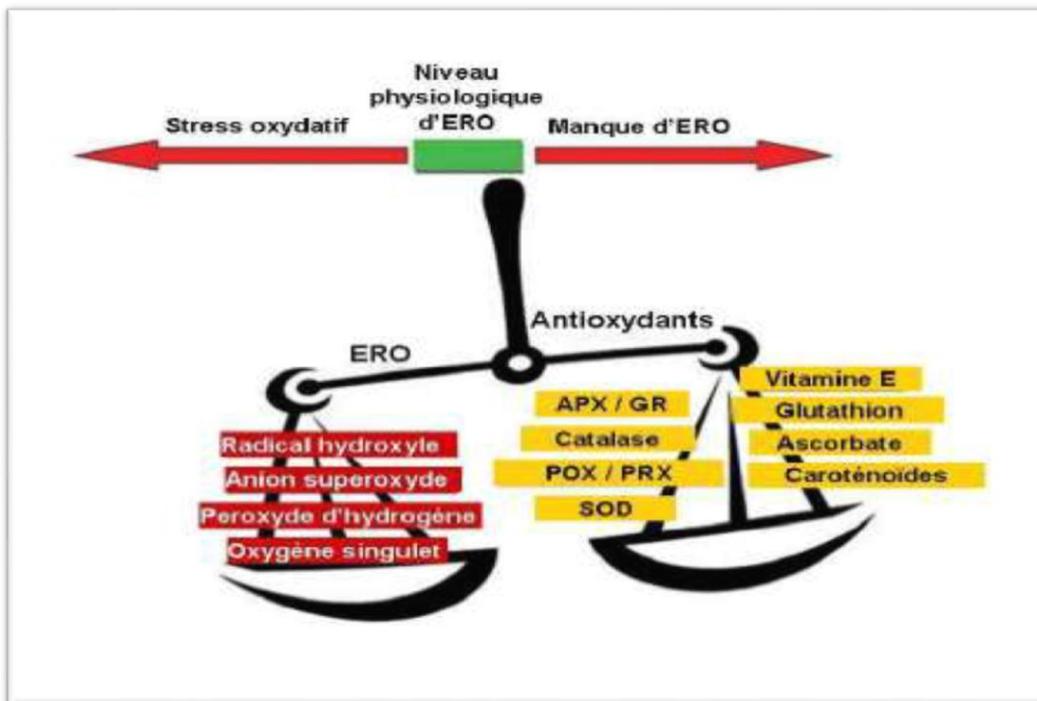


Figure 02. Schématisation de la balance entre les ERO et les antioxydants. (Pourrut, 2008).

### 2. Origine du stress oxydant

Les causes essentielles de stress oxydant sont :

- ✚ D'origine nutritionnelle dans les cas de carences en vitamines et oligo-éléments,
- ✚ D'origine accidentelle (inflammation, exposition à des xénobiotiques pro-oxydants, etc).
- ✚ D'origine génétique.

## Chapitre 02. Stress oxydatif chez les plantes aquatique

---

- ✚ Le plus souvent, l'association de ces différents facteurs aboutira à la formation des ERO qui mineront aux mécanismes pathogènes (**Bartosz. 2003., Favier. 2003**).
- ✚ des fongicides induisent des effets toxiques non négligeables sur diverses plantes aquatiques, telles que *Lemna minor*,
- Les fongicides de la famille des triazoles ont une action de compétition avec les gibbérellines, phytohormones impliquées notamment dans les processus d'élongation des tiges (**Child et al., 2003**).

### 3. Causes du stress oxydant

Un certain nombre de paramètres de l'environnement peuvent être à l'origine du stress oxydant chez les végétaux et plus particulièrement chez les micro-algues :

- Les polluants : l'ozone (O<sub>3</sub>), les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) et le dioxyde sulfurique (SO<sub>2</sub>) participent activement à la formation des radicaux libres (**Arora et al., 2002**).
- Un grand nombre d'herbicides (comme le chlorure de paraquat, l'éther de diphényle, ...) peuvent générer des ERO (**Arora et al., 2002., Salguero et al., 2003**).
- Accumulation de métaux phytotoxiques introduits par les pratiques industrielles ou agricoles. Les effets du Cu, du Zn et du Cd sont largement étudiés chez les microalgues (**Stauber et Florence, 1990**).
- Les facteurs environnementaux peuvent être une source du stress oxydant comme la température (**Abrahamsson et al., 2003**), la salinité (**Jahnke et White, 2003**), les ultraviolets (**Estevez et al., 2001**) et le manque des nutriments dans le milieu (**Salguero et al., 2003**).

### 4. Espèces Réactives de l'Oxygène

#### 4.1. Radicaux libres (ERO)

Les ERO sont souvent associées aux radicaux libres contenant un ou plusieurs électrons non appariés (**Halliwell, 2006**). Un électron non apparié est un électron qui occupe seul, un orbital atomique ou moléculaire. L'exemple le plus simple de radical libre est l'hydrogène. Ainsi, si les radicaux libres ne sont pas forcément associés à des espèces dérivant de l'oxygène, la notion de réactivité n'est pas forcément relative aux radicaux. (**Pourrut, 2008**).

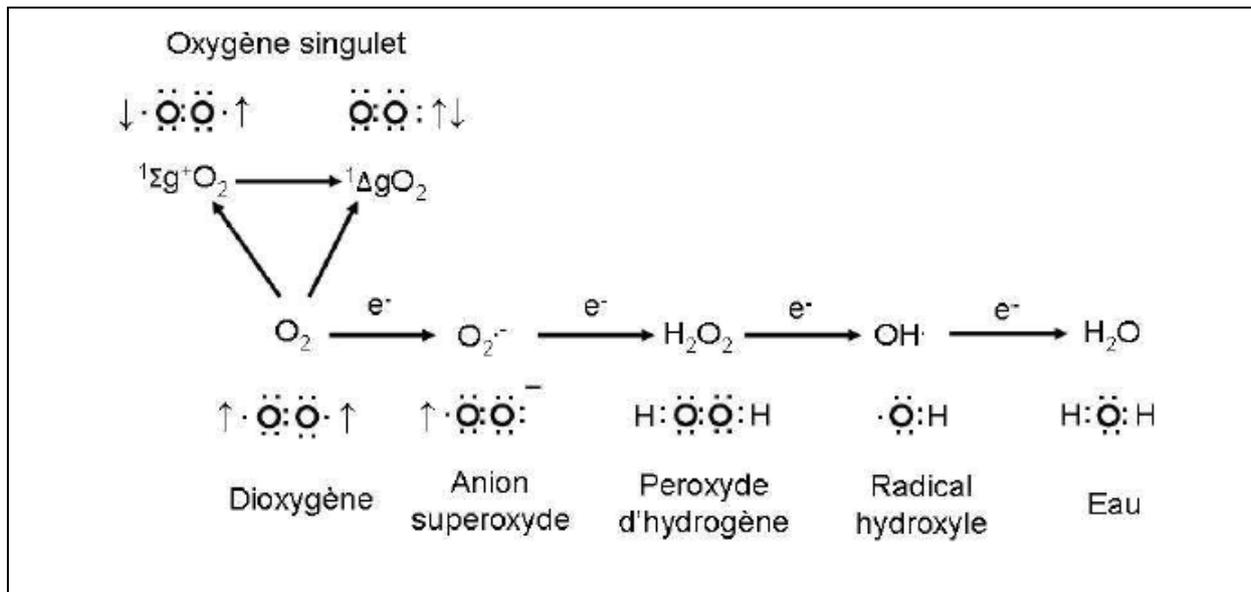
#### 4.1.1. ERO primaires

Différents types d'ERO, plus réactifs que l'O<sub>2</sub>, peuvent être formés dans les organismes vivants. Certaines, directement dérivées de la molécule de dioxygène, sont appelées ERO primaires. Dans un premier temps, un apport énergétique réorganise les

## Chapitre 02. Stress oxydatif chez les plantes aquatique

électrons de la molécule de dioxygène pour former une des deux formes du dioxygène singlet (Foote *et al.*, 1985).

Cependant, l'état singlet  $1\Sigma_g^+O_2$  est très instable et se transforme rapidement en  $1_gO_2$  (Figure 03). Cette dernière forme singlet qui peut se retrouver dans les tissus biologiques, est plus communément écrite sous la forme  $1O_2$ .



**Figure 03 :** Schématisation de la transformation énergétique ou chimique (réductions successives) de la molécule de dioxygène dans un système biologique (Foyer and Noctor, 2005b).

### 4.1.2. ERO secondaires

✓ Les ERO secondaires correspondent aux ERO formées par réactions entre les ERO primaires et les composés biochimiques de la cellule. Le **Tableau 1** présente quelques ERO secondaires. Contrairement aux ERO primaires, produites de façon régulière et en quantité importante par les cellules végétales.

✓ Les ERO secondaires sont seulement formées dans des conditions particulières. Mis à part certains peroxydes organiques, très peu d'études se sont intéressées à ces ERO, et leur importance biologique est discutable.

✓ Les Espèces Réactives de l'Azote (ERA) sont également présentées dans ce **Tableau 1**. Ces espèces particulières, possédant à la fois des capacités oxydantes et nitrifiantes, devraient plutôt être dénommées Espèces Réactives de l'Oxygène et de l'Azote.

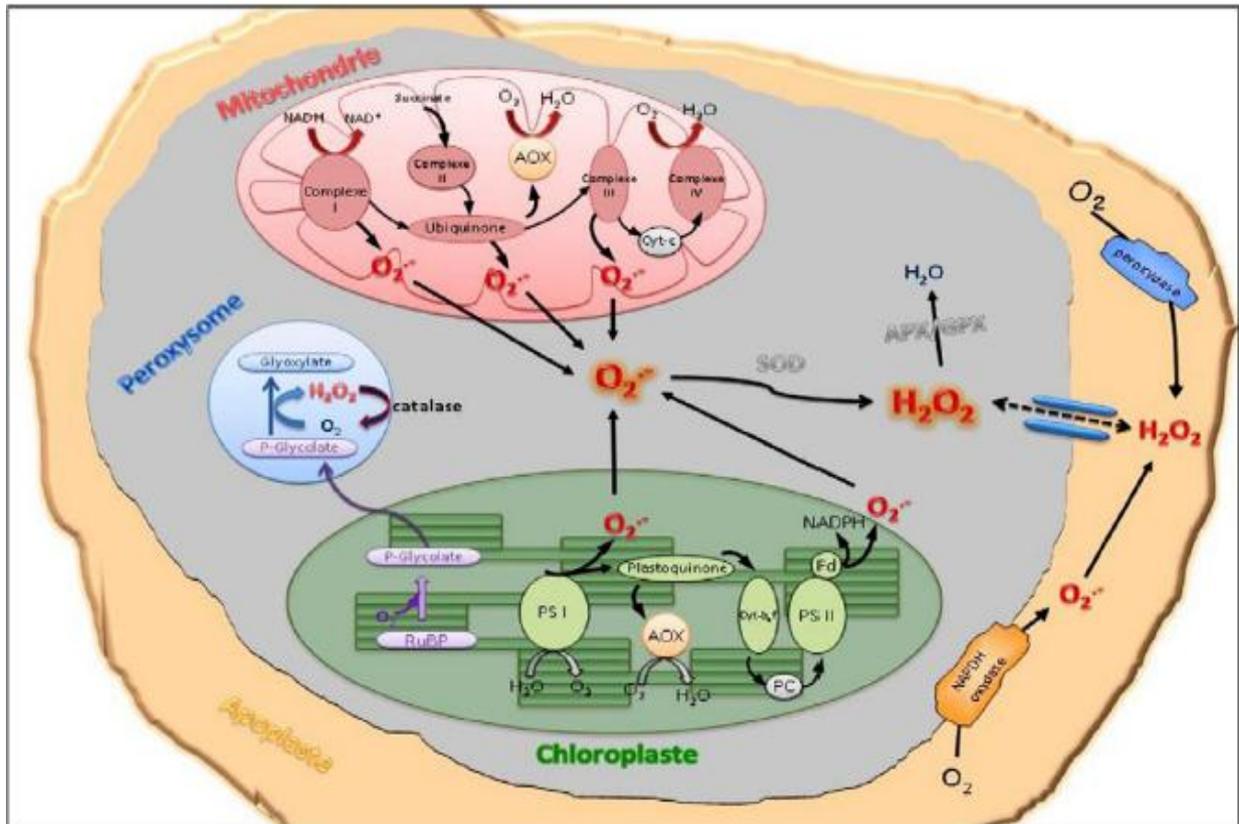
## *Chapitre 02. Stress oxydatif chez les plantes aquatique*

**Tableau 01 : Présentation de quelques espèces réactives de l'oxygène (ERO) et de l'azote (ERA) radicalaire ou non. (Adapté d'après Halliwell, 2006).**

Espèces radicalaires	Espèces non radicalaires
<b>ERO :</b> Carbonate, $\text{CO}_3^-$ , Peroxyle, $\text{RO}_2^\cdot$ Alkoxy, $\text{RO}^\cdot$ Radical dioxyde de carbone, $\text{CO}_2^\cdot$	<b>ERO :</b> Acide hypobromeux, $\text{hobr}$ Acide hypochloreux, $\text{hocl}$ Peroxydes organiques, $\text{ROOH}$ Peroxynitrite, $\text{ONOO}^-$ Peroxynitrate, $\text{O}_2\text{NOO}^-$ Acideperoxynitreux, $\text{ONOOH}$ Peroxomonocarbonate, $\text{HCOOCO}_2^-$
ERA :	ERA :
Oxyde nitrique $\text{NO}^\cdot$ Dioxyde nitrique $\text{NO}_2^\cdot$ Radical nitrate, $\text{NO}_3^\cdot$	Acide nitrique, $\text{HNO}_2$ Cation et anion nitrosyle, $\text{NO}^+$ et $\text{NO}^-$ , tétraoxyde et trioxyde d'azote, $\text{N}_2\text{O}_4$ et $\text{N}_2\text{O}_3$ Peroxynitrite $\text{ONOO}^-$ Peroxynitrate $\text{O}_2\text{NOO}^-$ Acideperoxynitreux, $\text{ONOOH}$ , Cation nitronium, $\text{NO}^+$ Chlorure de nitrile, $\text{NO}_2\text{Cl}$ .

### **4.2. Production des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule végétale**

Chez les plantes, il existe de nombreuses sources cellulaires d'ERO, localisées à divers endroits de la cellule. Les trois sources principales sont les chaînes de transport d'électrons (CTE) des chloroplastes et mitochondries, certaines enzymes comme les peroxydases et oxydases et enfin, les molécules photosensibilisatrices comme la chlorophylle (**Dat et al., 2000. Blokhina et al., 2003**).



**Figure 04 : Principaux sites de production des ROS dans la cellule végétale (Parent et al., 2008).**

### 4.2.1. Chloroplastes et l'appareil photosynthétique

Les cellules chlorophylliennes, du fait de leur production d'O<sub>2</sub> au cours du processus photosynthétique, sont particulièrement exposées à la génération d'ERO.

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

Le processus photosynthétique est à l'origine de la formation directe d' $1O_2$  et d' $O_2^{\bullet -}$  et indirecte d' $H_2O_2$  (par dismutation de l' $O_2^{\bullet -}$ ) et d' $\cdot OH$ . Il y a encore peu de temps, le photosystème I (PSI) était considéré comme la source principale des ERO chloroplastiques. Dans des conditions physiologiques normales, le flux d'électrons du PSI est dirigé vers le NADP qui est réduit en NADPH par la ferrédoxine NADP réductase (FNR).

Lors d'un stress (par exemple, une luminosité trop importante), la chaîne d'électron peut se saturer. Une partie du flux d'électrons peut être alors dérivée par la ferrédoxine vers l'oxygène (Figure 04). Cette réaction est connue sous le nom de réaction de Mehler. En plus de la ferrédoxine, d'autres accepteurs.

## Chapitre 02. Stress oxydatif chez les plantes aquatique

### 4.2.2. Peroxysomes

En raison de leurs caractéristiques, des peroxysomes longtemps été considéré comme des organites spécialisés dans la détoxification du peroxydes d'hydrogène. Les peroxysomes sont en une taille réduite et une très grande quantité de catalases (Zhang et al, 2007).

Comme les mitochondries et les chloroplastes, les peroxysomes représentent une source importante des productions des ERO intra cellulaire ; ils produisent l' $O_2^{\cdot-}$  suit a des métabolismes normaux (Hu. 2007).

### 4.2.3. Mitochondries et chaine 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'alternative oxydase(AOX),

La mitochondrie pourrait devenir un facteur important dans la régulation du stress oxydatif chez les plantes (Parent et al, 2008).

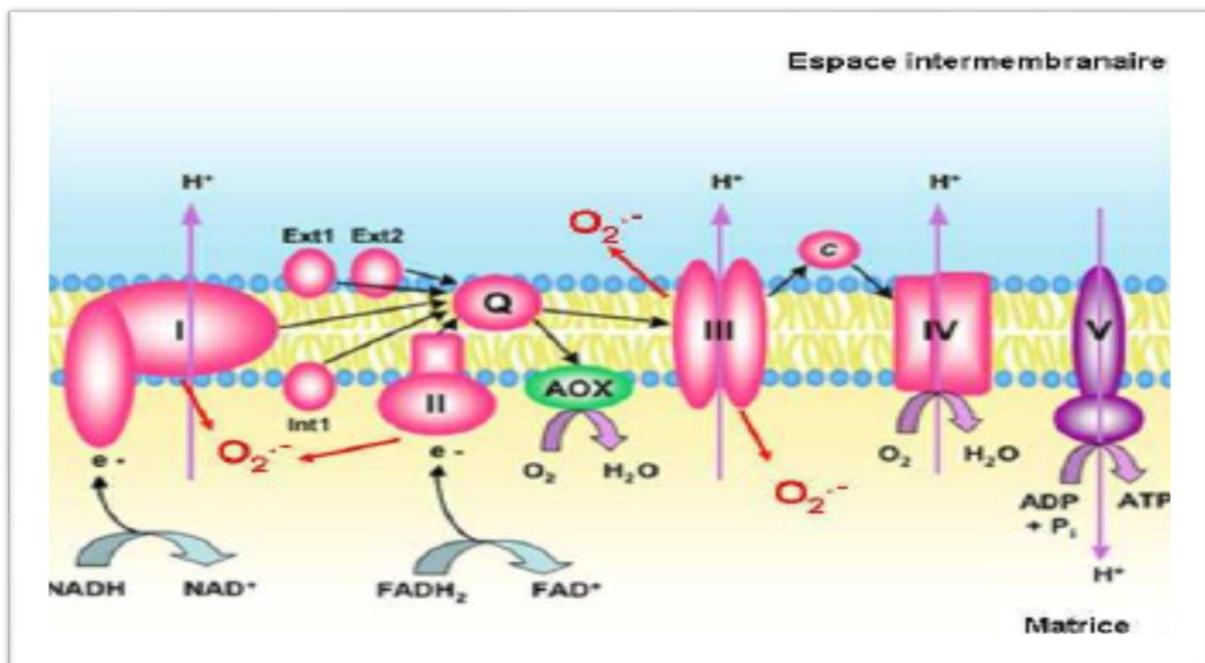


Figure 05 : Représentation de la chaîne respiratoire d'une mitochondrie (Parent et al., 2008).

### 5. Mécanisme de défense contre les stress oxydatif " Antioxydant "

#### 5.1. Principaux systèmes non enzymatiques

##### 5.1.1. Proline

La capacité d'accumuler la proline est corrélée avec la tolérance des plantes au stress abiotique (Barnett et Naylor, 1966 ; Singh et al., 1972 Stewart et lee, 1974). La proline peut agir comme un osmolyte, un capteur d'ERO et un chaperon moléculaire stabilisateur de la structure des protéines, protégeant ainsi les cellules contre les dommages causés par le stress (Hare et Cress, 1997., Rhodes et al., 1986., Verbruggen et Hermans, 2008., Szabados et Savoure, 2010). Le niveau de la proline est déterminé par l'équilibre entre sa biosynthèse et son catabolisme (Szabados et Savouré, 2010).

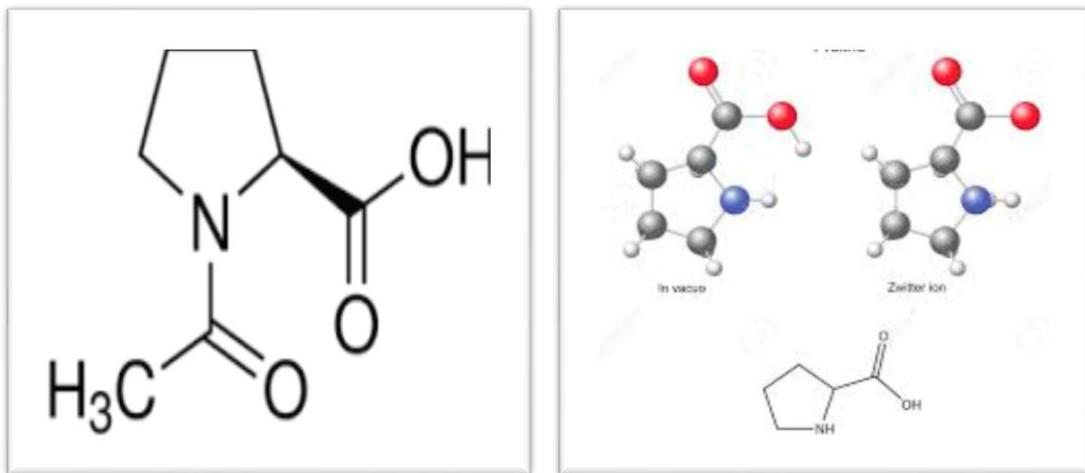


Figure 06 : Formules chimiques de la proline.

##### 5.1. 2. Glutathion

Le glutathion (GSH sous sa forme réduite) est un tri-peptide formé par la condensation d'acide glutamique, de cystéine et de glycine : -glutamyl-cystéinyglycine. Sa synthèse fait intervenir la glutamylcystéine synthétase et la glutathione synthétase. Il est particulièrement important car c'est le substrat de plusieurs enzymes antioxydantes (Helliwell and gutteridge, 1999). Il peut également régénérer la vitamine E (Reddy et al., 1982) et réagir avec les radicaux HO $\cdot$  Et O $_2^{\cdot -}$  Directement et ainsi casser la chaine d'oxydation (Hermes- Lima, 2005).

Il se présente alors sous la forme d'un radical GS. Et se lie à une autre molécule de glutathion radicalaire pour former le glutathion oxydé sous forme disulfide GSSG. Le ratio GSH/GSSG est souvent utilisé comme marqueur du niveau d'oxydation d'une cellule. La

## Chapitre 02. Stress oxydatif chez les plantes aquatique

maintenance d'un niveau élevé de glutathion est donc essentielle pour prévenir d'éventuels dégâts oxydatifs (May *et al.*, 1998; Noctor *et al.*, 1998).

### 5.2. Principaux systèmes enzymatiques

#### 5.2.1. Superoxyde dismutase

Le superoxyde dismutase ou SOD (McCord and Fridovich, 1969) est une métallo protéine. Elle existe sous plusieurs formes qui diffèrent par le métal contenu dans leur site actif et leur localisation cellulaire.

La SOD accélère la dismutation du radical  $O_2^{\cdot-}$  en  $H_2O_2$  permettant ainsi à l'organisme un contrôle du taux d' $O_2^{\cdot-}$  Intracellulaire. Il existe deux SOD cuivre/zinc (Cu/Zn SOD), les deux sont des dimères, l'une est une enzyme cytosolique et l'autre est une enzyme extracellulaire. Ces deux formes sont retrouvées aussi bien chez les eucaryotes que chez les bactéries.

L'ion cuivre est essentiel dans la réaction de dismutation tandis que l'ion zinc est nécessaire au maintien de la structure protéique (Hermes-Lima, 2005). Les SOD sont en général les premières défenses enzymatiques contre les ROS (Figure 2).

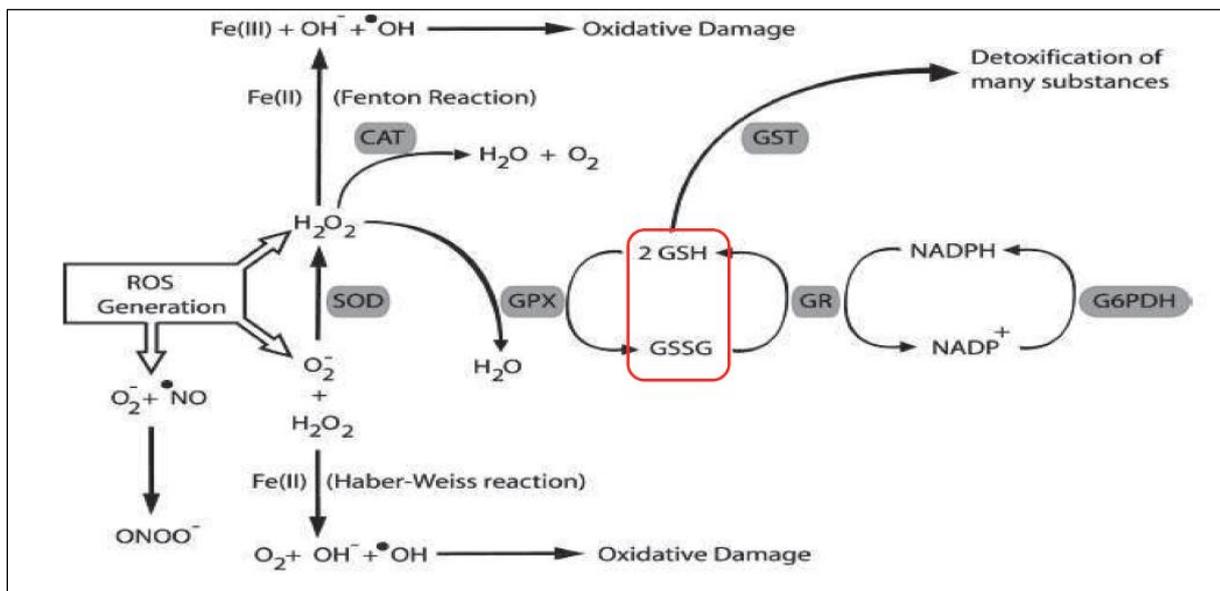


Figure 07 : Les principales enzymes antioxydantes (Hermes-Lima, 2005).

## *Chapitre 02. Stress oxydatif chez les plantes aquatique*

---

### **5.2.2. Catalases**

Les catalases sont des enzymes majoritairement paroxysmales catalysant la dismutation du peroxyde d'hydrogène (**Arora et al., 2002**). Elles sont formées de quatre chaînes polypeptidiques d'environ 500 acides aminés, comportant chacune un groupe géminique comprenant un atome de fer. Pour catalyser la réaction, l'atome de fer réalise une coupure hétérolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène, créant de ce fait

Le rôle principal de la CAT est de détoxiquer le peroxyde d'hydrogène produit à proximité par la CTE chloroplastique, et surtout par les processus peroxysomiaux de  $\beta$ -oxydation et de photo-respiration (**Smirnoff, 1998**)

### **6. Principaux stress environnementaux auxquels végétaux les sont confrontées**

De nombreuses situations de stress biotique ou abiotique peuvent être à l'origine de l'introduction ou de la production des ERO dans la cellule végétale :

#### **6.1. Stress biotique**

De nombreux agents pathogènes pénètrent dans la plante, par voie mécanique en forçant la résistance physique des barrières histologique, soit par l'excrétion d'enzymes dégradant la cuticule. Le végétale attaqué peut alors répondre par des réactions qui limitent la pénétration du parasite, par exemple lignification des parois, ou en sécrétant diverses substances chimiques ; soit toxiques pour le parasite (polyphénol,...etc). (**Laval-Martin et Mazliak, 1995**).

#### **6.2. Stress abiotique**

Plusieurs stress abiotiques peuvent à l'origine du stress oxydatif, parmi ces stress, le stress aux UV, le stress thermique, le stress par déficit hydrique, le stress aux métaux lourds,...etc (**Laval-Martin et Mazliak, 1995**).

### **7. Conséquences du stress oxydatif**

#### **7.1. Altérations de la structure des protéines**

Les protéines sont particulièrement sensibles à l'action des ERO. Plusieurs mécanismes directs ou indirects de modifications sont connus (**Stadtman and Levine, 2000., Favier, 2003**).

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 and 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

## *Chapitre 02. Stress oxydatif chez les plantes aquatique*

---

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. Ainsi, l'histidine, l'arginine, la lysine ou encore la proline sont des cibles privilégiées de ce processus d'altération oxydative (**Stadtman and Levine, 2000 ; Wong et al., 2008**).

Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques, et sont beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (**Stadtman and Levine, 2000**).

### **7.2. Altération de la structure des lipides**

Les lipides, et principalement les acides gras polyinsaturés (AGPI) membranaires, sont la cible privilégiée des ERO.

La peroxydation lipidique induite par les ERO à une importance physiologique considérable, car une fois initiée, elle perd un certain temps après la fin de la flambée oxydative (**Cillard and Cillard, 2006**).

Ce phénomène est la conséquence de la capacité des AGPI oxydés à s'auto-oxyder.

La peroxydation lipidique des AGPI se subdivise en trois phases :

- ✓ initiation
- ✓ propagation
- ✓ terminaison (**Spiteller, 1998**).

La peroxydation lipidique, si elle est importante, perturbe la fluidité membranaire, rend la membrane plus perméable, modifiant ainsi les homéostasies chimiques et redox cellulaires. (**Chehab et al., 2007**).

### **7.3. Altérations de la structure des acides nucléiques**

Les altérations oxydatives causées par les ERO sont considérées comme la source majeure de dommages spontanés sur l'ADN.

Les attaques au niveau des bases sont très variées. Par exemple, le radical hydroxyle attaque la double liaison des thymines en C5 ou C6, et moins fréquemment il arrache l'hydrogène du groupement méthyle. Le radical 6-hydroxythymine formé interagit avec  $O_2^{\cdot -}$  pour donner la thymine glycol, base modifiée capable de bloquer la réplication (**Croteau and Bohr, 1997**).

Des dommages indirects sur l'ADN résultent également du stress oxydatif. C'est le cas de certains aldéhydes comme le MDA ou le 4HNE qui forment des adduits prémutagéniques de type MDA-dG ou éthénodérivés (**Niedernhofer et al., 2003**).

# *Chapitre 03 : Matériels et méthodes*

### I. Matériel biologique

Afin de la réalisation de notre travail au niveau du laboratoire nous avons utilisé le matériel biologique suivant :

Une plante aquatique *Lemna minor* (la lentille d'eau).

L'eau d'oued mellague.

#### 1. *Lemna minor*

Est une angiosperme aquatique, de l'ordre des Arales et de la famille des Lemnacées. Les lentilles d'eau sont des plantes aquatiques flottantes de petite taille qui se présentent sous forme de colonies de frondes très vertes de 2 à 6 mm de diamètre. Les colonies sont formées de 2, 3 ou 4 frondes réunies par des pédicelles, chaque fronde porte une fine racine pouvant atteindre 3 cm.

Ce végétal colonise très facilement la surface des eaux douces et calmes au niveau des étangs, des chenaux, des mares ... Il est très commun sous les latitudes tempérées. Il se multiplie très rapidement et de manière végétative, les frondes mères donnant naissance à des frondes filles qui arrivées à maturité se détachent des frondes mères pour donner de nouvelles colonies. Cet organisme est souvent utilisé pour les études éco-toxicologiques et dans des tests normalisés (AFNOR, 1996., ISO, 2001).



**Figure 08 :** Plante aquatique *Lemna minor* (Dosnon-Olette, 2009).

### 1.1. Systématiques de la plante

**Regne plantae** : Plantes

**Sous-regne** : Tracheobionta

**Division magnoliophyta** : angiospermes, phanerogames

**Classe liliopsida** : Monocotyledones

**Sous-classe** : Alismatidae

**Ordre** : Alismatales

**Famille** : Araceae

**Genre** : *Lemna*

**Espèce** : *Minor*

### 1.2. Description de l'espèce

La lentille d'eau forme de grands tapis à la surface des eaux stagnantes. Ses frondes sont très fines et parfois teintées de rouge. Elle est utile pour couvrir la surface des points d'eau en été qu'elle protège ainsi de l'ensoleillement et donc du réchauffement (**Aymenryc., Guillaume L, 2011**).

### 1.3. Distribution et Biotope de l'espèce

*Lemna minor* est répandue sur toutes les eaux douces du globe, dormantes et eutrophes (chargées en substances nutritives). Elle se développe principalement à la surface des eaux calmes, lentes (un brassage de surface est une façon de lutter contre la prolifération des lentilles).

Elle affectionne la lumière, la chaleur et les eaux chargées en nutriments. Elle est présente jusqu'à 1800 m d'altitude (**Geoff Burnie et al., 2003**).

### 1.4. Culture de *Lemna minor*

Elles apprécient la lumière et peuvent devenir envahissantes en formant un épais tapis vert sur toute la surface d'un plan d'eau. Ce sont de bons sujets pour aquarium, qui tolèrent l'eau, froide ou chaude. Multiplier en disséminant de petites colonies dans des eaux dormantes riches en nitrates et calcaires. Cette espèce forme souvent de grandes colonies à la surface de l'eau stagnante. Rarement cultivée, elle est pourtant fort utile pour couvrir la surface d'une mare exposée au soleil et limiter ainsi l'échauffement de l'eau. Fines comme du papier, ses frondes brillantes sont parfois teintées de rouge (**Geoff Burnie et al., 2003**).

### 1.5. Impact de *lemna minor*

Les tapis denses de lentilles d'eau minuscule (comme sur la photo ci-contre, en haut) peuvent provoquer des conditions d'anoxie en empêchant les échanges gazeux avec le milieu aquatique et la pénétration de la lumière. Ces impacts restent limités en France, car les colonisations concernent généralement des plans d'eau de faible dimension ou des réseaux de fossés lors des périodes de stagnation des eaux (**Guillaume F, 2012**).

### 1.6. Capacités dépolluantes particulières

Il a été mis en évidence que la lentille d'eau est capable de dégrader le phénol présent dans le milieu. D'autre part, elle s'avère une excellente plante accumulatrice du mercure. En 1991, une étude a estimé que la lentille d'eau est capable d'absorber (par m<sup>2</sup>/an) 700g de phosphore, 5450g d'azote, 940g de chlorure, et jusqu'à 2300g d'aluminium ! Une étude menée sur l'atrazine a donné des résultats peu concluants (**Aymenryc., Guillaume L, 2011**).

### 1.7. Croissance

La multiplication végétative importante des Lemnacées leur confère une productivité élevée, avec un taux de croissance souvent exponentiel. Cette capacité de production a été exploitée depuis un certain nombre d'années par des mises en culture expérimentales.

Le temps de doublement de la population de *Lemna minor* et *L. trisulca* varie entre 3 et 15 j en conditions très favorables (**Blake & Dubois, 1982**). En présence de niveaux de température, de lumière et de nutriments corrects, le thalle de *Lemna minor* vit de 5 à 6 semaines, et chaque thalle donne un nombre limité de thalles filles, qui varie selon les différents clones de l'espèce (**Sculthorpe, 1967**).

## 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 km<sup>2</sup>.

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



**Figure 09.** Station d'échantillonnage d'Oued Mellague.

### II. Condition de l'expérimentation

L'expérience a été réalisée en laboratoire de toxicologie dans des conditions in vitro. Nous avons utilisé dans cette étude une plante aquatique : les lentilles d'eau (*Lemna minor*) qui ont été récolté de la région d'el taref, et ils ont été placé dans un autre milieu préparé pour la mise en évidence de trois lots afin de réaliser les dosages biochimiques.

Ces milieux ont été répartir selon le tableau suivant :

**Tableau 02 : Répartition des milieux expérimentaux.**

<b>T</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>
Eau distillée+ solution de knop (1L /3)	2L d'eau d'oued Mellegue+ solution de Knop (1L/3)	1L d'eau d'oued Mellegue+ 1L d'eau distillée + solution de Knop (1L/3)

Nous avons effectué cinq répétitions par paramètres étudiés. Qui ont été mesuré selon trois dates :

- ✓ La première date : Après 21 j de traitement.
- ✓ La deuxième date : Après 26 j de traitement.
- ✓ La troisième date : Après 31 de traitement.



**Figure 10. Répartition des plantes (*Lemna minor*) dans les trois aquariums.**

Concernant les paramètres de croissance, nous avons fait 3 lots de boîtes de pétris stériles, chaque lot contient 10 boîtes de pétris, pour chaque lot nous avons placé 5 lentilles d’eaux des aquariums précédents pour pouvoir suivre leur développement.

### **1. La solution de knop (liquide de knop)**

A été inventée par le chimiste allemand wilhelm Knop (1817-1891). Il contient les 04 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 utilisé en biologie dans le cadre d'expériences sur la croissance de végétaux en laboratoire et, plus particulièrement, la culture des plantes à chlorophylle. Le liquide de knop est un engrais mis au point pour obtenir une croissance optimale des plantes de *lemna minor* en laboratoire.

Il est composé de divers sels minéraux dissous dans l’eau : nitrate de calcium ( $\text{CaNO}_3$ ), nitrate de potassium ( $\text{KNO}_3$ ), sulfate de magnésium ( $\text{MgSO}_4$ ), phosphate mono potassique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sulfate ferrique ( $\text{FeSO}_4$ ). (**Bruchhauser, 2010**).

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

## Chapitre 03. Matériels et Méthodes

---

**Tableau 03 : Compositions chimiques de solution de Knop, utilisé pour la culture de *Lemna minor*.**

Composition chimique	Concentration g /L
Nitrate de calcium (CaNO <sub>3</sub> )	1
Nitrate de potassium (KNO <sub>3</sub> )	0.25
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> )	0.25
Phosphate monopotassique ou dihydro-géno-phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.25
Sulfate ferrique (FeSO <sub>4</sub> )	0.05

### 2. Méthode de dosage

#### 2.1. Paramètres biochimiques

##### 2.1.1. 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.

La méthode de Bradford est une méthode d'analyse spectroscopique utilisée pour mesurer la concentration des protéines en solution.

##### 2.1.1.1. Principe

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement d'absorbance (la mesure se fait à 595 nm), se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après liaison (complexification) avec les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et les résidus hydrophobes des acides aminés présents dans la ou les protéines (**Bradford, 1976**)

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

## Chapitre 03. Matériels et Méthodes

---

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

$$Y = b + a X$$

**Y** : densité optique (DO)

**X** : quantité de protéines en ( $\mu\text{g}/\text{mg MF}$ ).

(a + b voir les annexes)

### 2.1.2. Extraction et dosage de la chlorophylle

L'extraction des chlorophylles a été effectuée selon la méthode de Holden (1975), qui consiste en une macération du végétal dans de l'acétone.

Le traitement des échantillons se fait comme suit :

- 01- On pèse 100 mg des feuilles et racines (pédicelle) du végétal sont broyées dans un mortier avec 2,5 ml d'acétone à 80% ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )
- 02- pincée environ 100 mg de bicarbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ).
- 03- Après le broyage total, la solution est ensuite filtrée et mise dans des boîtes noires pour éviter l'oxydation des chlorophylles par la lumière.
- 04- La lecture se fait aux deux longueurs d'onde 645nm et 663nm, après étalonnage de l'appareil avec la solution témoin (blanc) d'acétone à 80%.

✚ L'équation qui nous permet de calculer les valeurs des chlorophylles (**Arnon, 1949**) est :

$$\text{Chl.a} = 12,70 \cdot \text{DO}(663) - 2,69 \cdot \text{DO}(645)$$

$$\text{Chl.b} = 22,90 \cdot \text{DO}(645) - 4,60 \cdot \text{DO}(663)$$

$$\text{Chl. (a+b)} = 8,02 \cdot \text{DO}(663) + 20,20 \cdot \text{DO}(645)$$

### 2.1.3. Dosage de la proline

#### La proline

La capacité d'accumuler la proline est corrélée avec la tolérance des plantes au stress abiotique (**Barnett et Naylor, 1966 ; Singh et al., 1972 ; Stewart et Lee, 1974**).

La proline peut agir comme un osmolyte, un capteur d'ERO et un chaperon moléculaire stabilisateur de la structure des protéines, protégeant ainsi les cellules contre les dommages causés par le stress (**Hare et Cress, 1997 ; Rhodes et al., 1986 ; Verbruggen et Hermans, 2008 ; Szabados et Savoure, 2010**).

## Chapitre 03. Matériels et Méthodes

---

Le niveau de la proline est déterminé par l'équilibre entre sa biosynthèse et son catabolisme (Szabados et Savouré, 2010).

La technique de dosage de la proline utilisée est celle de Troll et Lindesley (1955) modifiée par Dreider et Goring (1974) Elle est réalisée comme suit nous prélevons 100 mg de matière végétale fraîche on introduit cet échantillon dans de tubes à essais dans quels sont ajoutés 2 ml méthanol à 40 %, sont maintenir dans un bain marie à 80 ° C pendant 01 h (les tubes sont recouvert de papiers aluminium afin d'éviter la volatilisation de l'alcool, Après refroidissement on prélève 01 ml de la solution, à laquelle on ajoute 01 ml d'acide acétique (CH<sub>3</sub> COOH) et 01 ml de mélange contenant (120 ml eau distillée (ED) + 300 ml d'acide acétique + 80 ml acide ortho-phosphorique et 25 mg de ninhydrine.

Les solutions sont portées à Ebullition pendant 30 min, elles vivent au rouge après refroidissement, on ajoute 05 ml de toluène et on procède à une agitation. Deux phases se séparent :

- Une phase inférieure sans proline
- Une phase supérieure qui contient la proline.

Cette phase est ensuite récupérée et déshydratée par l'adjonction de Na<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>.

On procède enfin à la détermination des densités optiques échantillons à la longueur d'onde 528 nm, après étalonnage de l'appareil par la mélange (Acide acétique + eau distillée + Acide ortho-phosphorique + ninhydrine) (Manel Derradji, 2015).

### 2.2. Paramètres morpho métriques :

#### 2.2.1. Nombre moyen des racines :

Le nombre moyen de racines a été déterminé, pour chaque lentille existante dans les boites de pétris, pour chaque lot et condition de traitement, et cela par le dénombrement du nombre de racines. Ces dernières ont été suivi selon les trois dates fixées pour les différents dosages précédents (21 j, 26 j, 31 j).

#### 2.2.2. Nombre moyen des feuilles :

Le nombre moyen de feuilles a été établi, pour chaque lentille existante dans les boites de pétris, pour chaque lot et condition de traitement, et cela par le dénombrement du nombre de feuilles. Ces dernières ont été suivi selon les trois dates fixées pour les différents dosages précédents (21 j, 26 j, 31 j).

## Chapitre 03. Matériels et Méthodes

### 2.2.3. Longueurs moyennes des racines :

La longueur moyenne des racines a été déterminé, pour chaque lentille existante dans les boîtes de pétris, pour chaque lot et condition de traitement, et cela par la mesure de la longueur de chaque racine en utilisant une réglé. Ces dernières ont été suivi selon trois dates fixées pour les différents dosages précédents (21 j, 26 j, 31 j).

### 2.3. Dosage des paramètres physicochimiques des eaux usées :

Nous avons effectué les dosages des paramètres physicochimiques des eaux usées avant et après épuration dans deux laboratoires :

- Le laboratoire de l'Algérienne des eaux.
- Le laboratoire de FERPHOS ; selon les méthodes suivantes

**Tableau 04. Méthodes des paramètres physicochimiques des eaux usées.**

Les paramètres	Les méthodes
MES	-Photométric méthod. Les méthodes d'analyses HACH, 2001.
PH	-méthode par électrode combinée ph, 2001.
SO <sub>4</sub>	-Sulfa Ver 24 Méthode, 2001.
Fer	-1.10 Phenanthroline Méthode, 2001.
CU	-Méthode avec testeur Pocket Pal, 2001.
TAC	-M.V.cette est homologée par AFNOR, 1977.
Ca+	-Méthode métamérique à l'EDTA, ISO 6058, 1984.
Magnésium	-Méthode tétramérique à l'EDTA, ISO 6058, 1984.
Dosage le Fer	-Méthode Spectro métrique à la phénanthroline-1, 10.

# *Chapitre 04 : Résultats et Discussion.*

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

### I. Analyse statistique

- ✚ Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une analyse statistique grâce au logiciel Minitab 13.
- ✚ Les données sont représentées par la moyenne plus ou moins l'écart type ( $m \pm SD$ ).
- ✚ Les résultats ont été comparés par le test T de Student «  $\alpha = 0,05$  ».

### 1. Résultats

Dans cette partie nous représentons les principaux résultats obtenus concernant les expériences réalisés au laboratoire :

Les paramètres de croissances mesurés sont :

- ✓ Nombre des racines
- ✓ Nombre des feuilles
- ✓ Longueur des racines

Les paramètres biochimiques :

- ✓ Les protéines
- ✓ La chlorophylle a, b et a+b
- ✓ La proline

### 2. Parametre biochimiques

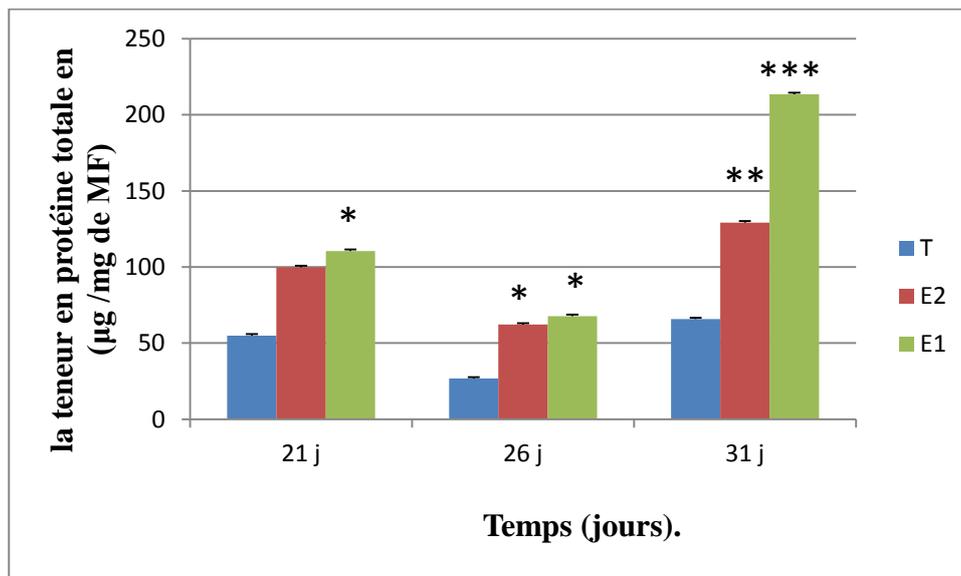
#### 2.1. Protéines totales :

La figure 11, illustre les effets des eaux usées sur la teneur en protéine totale chez la lentille d'eau *Lemna minor*.

On observe après 21 et 26 jours de traitement, une augmentation significative entre (T et E1), (T et E2). Et différence non significative entre (E1 et E2).

Après 31 jours de traitement, on observe une augmentation très hautement significative entre (T et E1) dont le ( $P \leq 0,001$ ), et entre (T et E2) et (E1 et E2) différence hautement significatif ( $P \leq 0,01$ ).

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 31 jours de traitement. En effet le taux de protéine est de l'ordre de 213,369  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de MF chez E1, 129,1019  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de MF chez E2 et de 65,7376  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de MF chez les témoins.



**Figure 11 :** Effets des eaux usées sur la teneur en protéine totale en ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de MF) chez la lentille d'eau *Lemna minor* (T : Témoin) et (E1 : eau d'oued mellague) et (E2 :  $\frac{1}{2}$  eau d'oued mellague et  $\frac{1}{2}$  ED) en fonction du temps (J).

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

**Tableau 05 :** Moyennes des taux de protéines totales en ( $\mu\text{g}$  /mg de MF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (**T** : Témoin), (**E1** : eau d'oued mellague) et (**E2** :  $\frac{1}{2}$  eau d'oued mellague et  $\frac{1}{2}$  **ED**) en fonction du temps (J).

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr (E1)	Ecartype Tr (E1)	Moyenne Tr (E2)	Ecartype T r (E2)
<b>21</b>	54,9302533	0,42437868	110,4566	5,3174	99,7866	2,23
<b>26</b>	26,7671	1,5679	67,7036	4,1027	62,1883	3,0701
<b>31</b>	65,7376	7,7316	213,369	5,3957	129,1019	3,2527

### 2.2. Proline

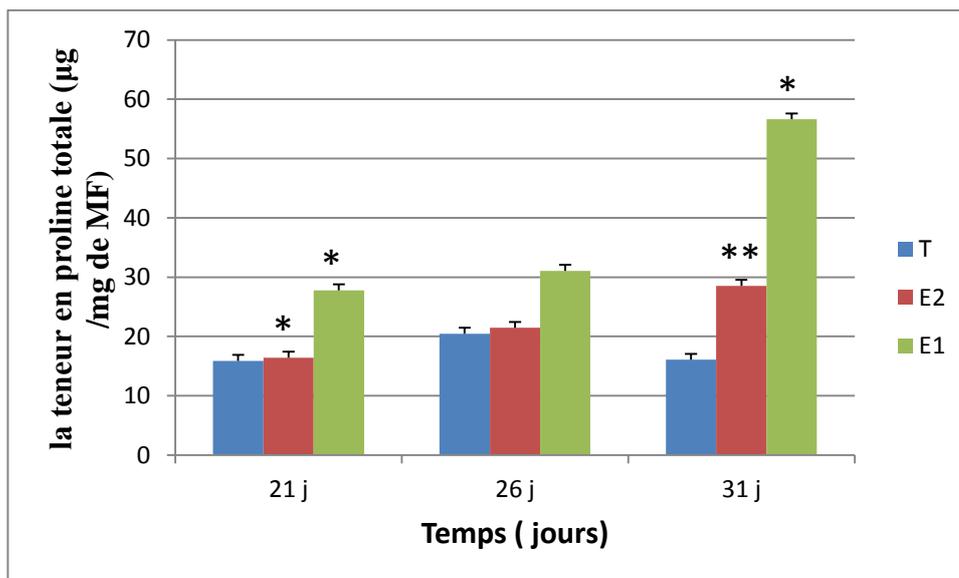
La **figure (12)** montre les effets des eaux usées sur la teneur en proline totale en ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) chez la lentille d'eau *Lemna minor*.

On observe après 21 jours de traitement, une augmentation significative ( $P \leq 0.05$ ) entre (T et E1), (T et E2), et différence non significative entre le (E1 et E2).

Après 26 jours de traitement, on observe une augmentation non significative entre (T et les traités), et différence non significative entre E1 et E2.

Après 31 jours de traitement, on observe une augmentation significative entre (T et E1), et différence hautement significative entre T et E2, et non significatif entre E1 et E2.

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 31 jours de traitement. En effet le taux de proline est de l'ordre de 56,5986 mg/g de MF chez E1 ; 28,5389mg/g de MF chez E2 et de 16,0852mg/g de MF chez les témoins.



**Figure 12.** Effets des eaux usées sur la teneur en proline totale ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) chez la lentille d'eau *Lemna minor* (**T** : Témoin), (**E1** : eau d'oued mellague) et (**E2** :  $\frac{1}{2}$  eau d'oued mellague et **ED**) en fonction du temps (J).

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

**Tableau 06 :** Moyennes des taux des protéines totales en ( $\mu\text{g}$  /mg de MF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (**T** : Témoin), (**E1** :  $\frac{1}{2}$  eau d'oued mellague) et (**E2** :  $\frac{1}{2}$  eau d'oued mellague et  $\frac{1}{2}$  ED) en fonction du temps (J).

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr (E1)	Ecartype T r (E1)	Moyenne Tr (E2)	Ecartype T r (E2)
<b>21</b>	15,8921	0,5254	27,7765	0,7694	16,4356	4,5287
<b>26</b>	20,4524	1,3394	31,0579	4,359	21,4678	5,8695
<b>31</b>	16,0852	1,6167	56,5986	3,9603	28,5389	9,1474

### 2.3. La chlorophylle a, b et a+b :

#### 2.3.1. La chlorophylle a :

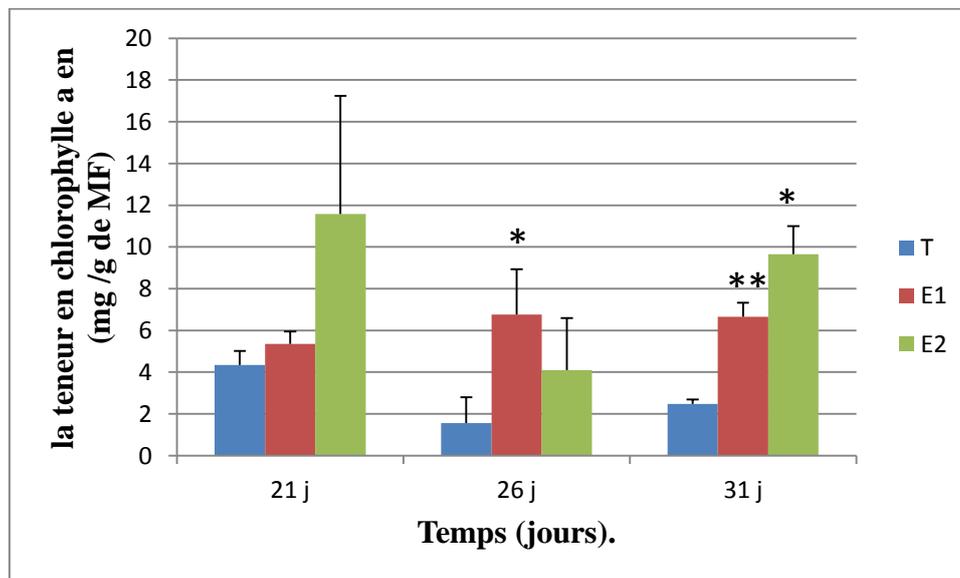
La **figure (13)** montre les variations des effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle a en (mg /g) chez les feuilles de *lemna minor*,

On observe après 21 jours de traitement, une différence non significative entre (T et E1), (T et E2) et (E1 et E2).

On observe après 26 jours de traitement, une différence significative entre (T et E1) et non significatifs entre (T et E2) (E1 et E2).

On remarque après 31 jours de traitement, une différence hautement significative entre (T et E1) et significative entre (T et E2) et non significative entre (E1 et E2).

L'augmentation est bien illustrée surtout après 21 jours de traitement (E2 plus augmenté par rapport au témoin. En effet le taux de chlorophylle a est de l'ordre de (5,3516 mg/g de MF chez E1, 11,5806 mg/g de MF chez E2 et de 4,33962267 mg/g de MF chez les témoins.



**Figure 13** : Variations des effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle a en (mg /g) chez les feuilles de *lemna minor* (T : Témoin), (E1 : eau d'oued mellague) et (E2 : 1/2 eau d'oued mellague et 1/2 ED) en fonction du temps (J).

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

**Tableau 07** : Taux de chlorophylle a en (mg /g de MF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (**T** : Témoin), (**E1** : eau d'oued mellague) et (**E2** : eau d'oued mellague ½ **ED**) en fonction du temps (J).

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr (E1)	Ecartype T r (E1)	Moyenne Tr (E2)	Ecartype T r (E2)
<b>21</b>	4,33962267	0,673	5,3516	0,60122	11,5806	5,6554
<b>26</b>	1,56727267	1,2333	6,7539	2,1719	4,0978	2,4955
<b>31</b>	2,47587067	0,2142	6,6588	0,6607	9,6452	1,3584

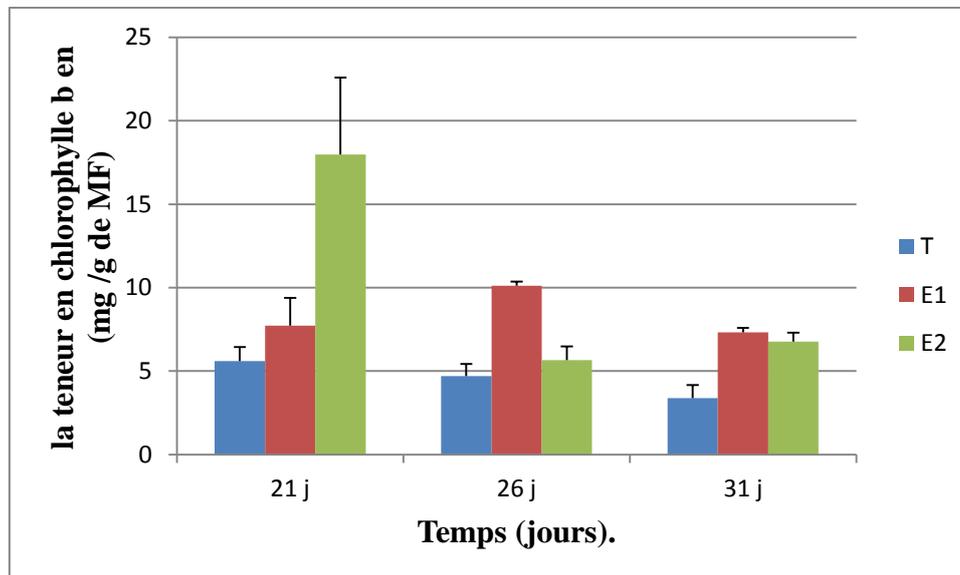
### 2.3.2. La chlorophylle b

La **figure (14)** montre les variations des effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle b en (mg /g) chez les feuilles de *lemna minor*,

On observe après 21 jours de traitement, une différence non significative entre (T et E1), (E1 et E2), et différence significative entre (T et E2).

Et on remarque après 26 jours de traitement, une différence hautement significative entre (T et E1), et significatif entre (T et E2) et non significatif entre (E1 et E2).

L'augmentation est bien illustrée surtout après 21 jours de traitement (E2 plus augmenté par rapport le (T et E1) mais après 26, 31 on remarque (E1 > E2 > Tm). En effet le taux de chlorophylle b est de l'ordre de 7,7236 mg/g de MF chez E1, 17,9711mg/g de MF chez E2 et de 5,6098 mg/g de MF chez les témoins.



**Figure 14 :** Variation des effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle b en (mg /g de MF) chez les feuilles de *lemna minor* (T : Témoin), (E1 : eau d'oued mellague) et (E2 : ½ eau d'oued mellague et ½ ED) en fonction du temps (J).

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

**Tableau 08 :** Taux des chlorophylles **b** en (mg /g de MF) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (**T** : Témoin), (**E1** : eau d'oued mellague) et (**E2** : ½ eau d'oued mellague et ½ **ED**) en fonction du temps (J).

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr (E1)	Ecartype T r (E1)	Moyenne Tr (E2)	Ecartype T r (E2)
<b>21 J</b>	5,6098	0,83590387	7,7236	1,65954119	17,9711	4,6194
<b>26 J</b>	4,6996	0,73260896	10,1075	0,2641	5,6509	0,8364
<b>31 J</b>	3,3904	0,78210236	7,3227	0,2769	6,7781	0,5304

### 2.3.3. La chlorophylle a+b

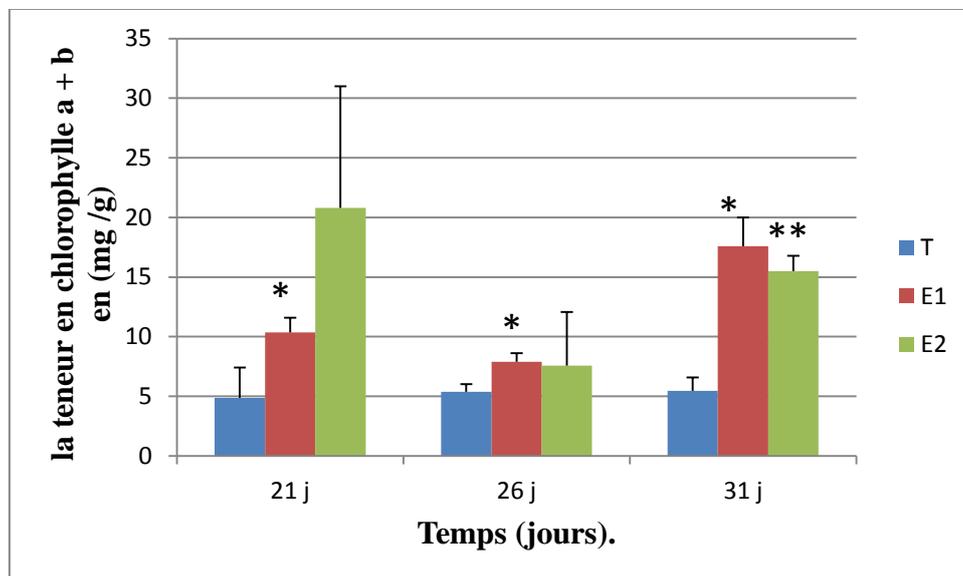
La **figure (15)** montre les effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle a + b en (mg /g) chez les feuilles de *lemna minor*.

On observe après 21 jours de traitement, qu'il a une augmentation significative ( $P \leq 0.05$ ) entre (T et E1), et différence non significative entre (T et E2) et (E1 et E2) dont  $E2 > E1$ .

On observe après 26 jours de traitement, qu'il a une différence significative ( $P \leq 0.05$ ) entre (T et E1), et différence non significative entre (T et E2) et (E1 et E2).

Et après 31 jour de traitement, il a une augmentation significative ( $P \leq 0.01^{**}$ ) entre (T et E1), et différence hautement significative entre (T et E2) et non significatifs entre (E1 et E2) dont  $E1 > E2$ .

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 21 jours de traitement. En effet le taux de chl a+b est de l'ordre de (13,1687mg/g de MF chez E1 ; 12,5796847mg/g de MF chez E2 et de 3,7939 mg/g de MF chez les témoins.



**Figure 15** : Effets des eaux usées sur la teneur en chlorophylle **a + b** en (mg /g) chez les feuilles de *lemna minor* (**T** : Témoin), (**E1** : eau d'oued mellague) et (**E2** : ½ eau d'oued mellague et ½ **ED**) en fonction du temps (J).

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

**Tableau 09** : Taux des chlorophylles **a+b** en (mg /g de **MF**) chez les feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées (**T** : Témoin), (**E1** : eau d'oued mellague) et (**E2** : ½ eau d'oued mellague et ½ **ED**) en fonction du temps (J).

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr (E1)	Ecartype T r (E1)	Moyenne Tr (E2)	Ecartype T r (E2)
<b>21</b>	4,8763	2,5298	10,3487	1,2491	20,8002	10,1962
<b>26</b>	5,3719	0,6407	7,8951	0,7275	7,5831	4,4921
<b>31</b>	5,4606	1,1204	17,5796	2,4175	15,502	1,2703

### 3. Paramètres morpho-métriques

#### 3.1. Nombre des racines

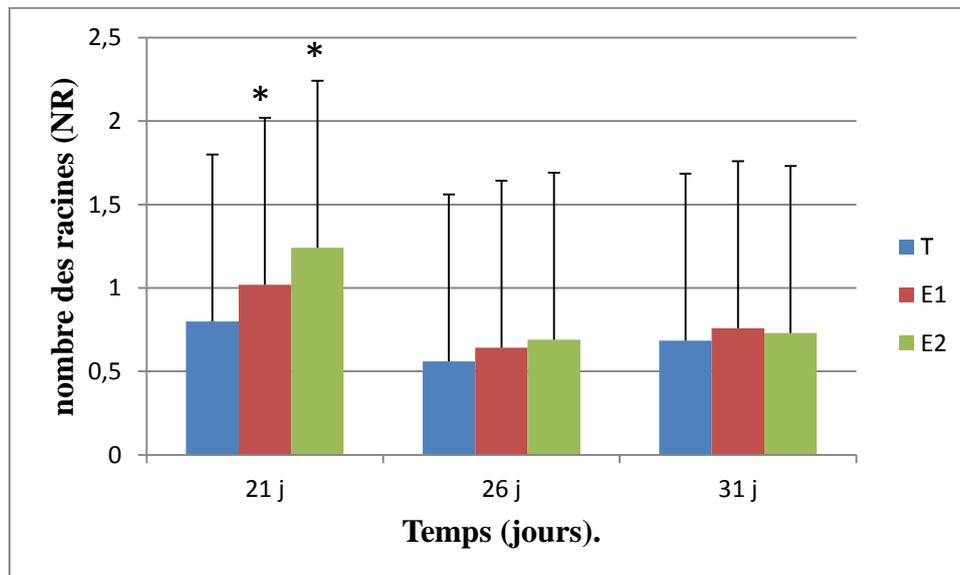
La figure (16), montre les effets des eaux usées sur le nombre des racines (NR) de *lemna minor*.

On remarque une augmentation significative entre T et E1 ( $P \leq 0.05$ ), et T et E2 ( $P \leq 0.05$ ) de (NR) après 21 jours de traitement, mais il existe des différences non significatives entre E1 et E2.

Après 21 jours de traitement, on remarque une augmentation de NR significative entre T1 et E1, T1 et E2 et non significative entre E1 et E2 ( $E2 > E1 > T$ ).

Après 26,31 jours de traitement, il y a une augmentation de NR est non significative entre les témoins et les traités ( $E1 > E2 > T$ ).

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 21 jours de traitement. Les moyennes de nombre des racines sont de l'ordre de 2,485 chez les traités E1 et 0,96200023 chez E2, et de 2,455 chez les témoins.



**Figure 16 :** Les effets des eaux usées sur le nombre des racines (NR) de *lemna minor*. (T : Témoin), (E1 : eau d'oued mellague) et (E2 : 1/2 eau d'oued mellague et 1/2 ED) en fonction du temps (J).

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

**Tableau 10 :** Le nombre des racines de *lemna minor* placées dans des eaux usées (**T** : Témoin), (**E1** : eau d'oued mellague) et (**E2** : ½ eau d'oued mellague et ½ **ED**) en fonction du temps (J).

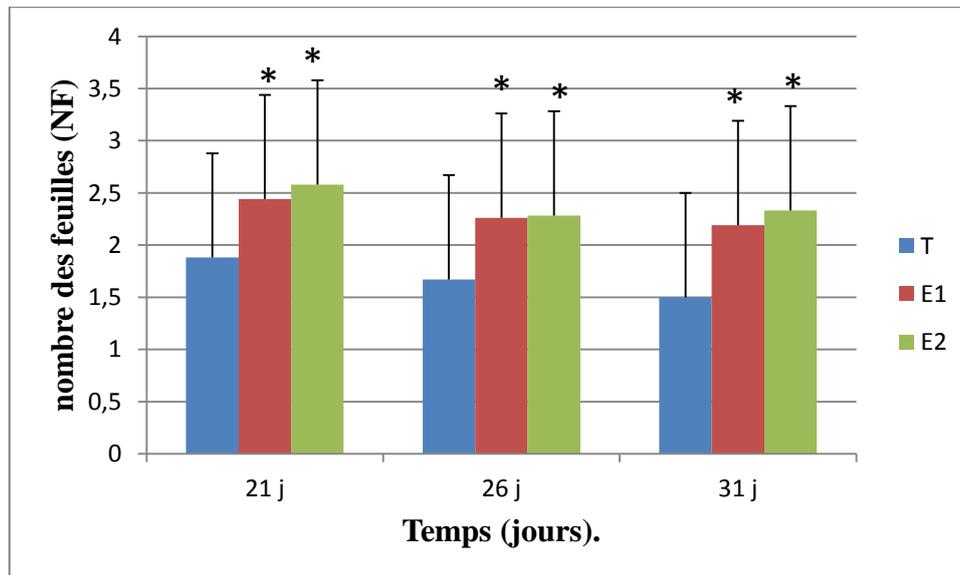
	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr (E1)	Ecartype T r (E1)	Moyenne Tr (E2)	Ecartype T r (E2)
<b>21</b>	2,455	0,67332096	2,485	1,85987604	3,11	0,96200023
<b>26</b>	1,112	0,53383414	1,147	0,91801477	1,894	2,93527663
<b>31</b>	1,054	0,51016773	1,295	1,19569831	1,49	0,86692304

### 3.2. Le nombre des feuilles

La figure (17), Indique les effets des eaux usées sur le nombre des feuilles (NF) de *lemna minor*. On remarque une augmentation significative entre T et E1 ( $P \leq 0.05$ ), et T et E2 ( $P \leq 0.05$ ) de (NR) après 21 jours de traitement, mais il existe des différences non significatives entre E1 et E2.

Après 21, 26, et 31 jours de traitement, il y a une augmentation de NF significative entre les témoins et les traités ( $P \leq 0,05$ ) et est non significative entre les traités ( $P \geq 0,05$ ) dont  $E2 > E1$ .

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 21 jours de traitement. Les moyennes de nombre des feuilles sont de l'ordre de 2,44 chez Traités E1 et 2,58 chez E2, et de 1,88 chez les témoins.



**Figure 17 :** Effets des eaux usées sur le nombre des feuilles (NF) de *lemna minor*. (E1 : eau d'oued mellague) et (E2 : 1/2 eau d'oued mellague et 1/2 ED) en fonction du temps (J).

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

**Tableau11** : Moyennes de nombre des feuilles de *lemna minor* placées dans des eaux usées, (E1 : eau d'oued mellague) et (E2 : ½ eau d'oued mellague et ½ ED) en fonction du temps (J).

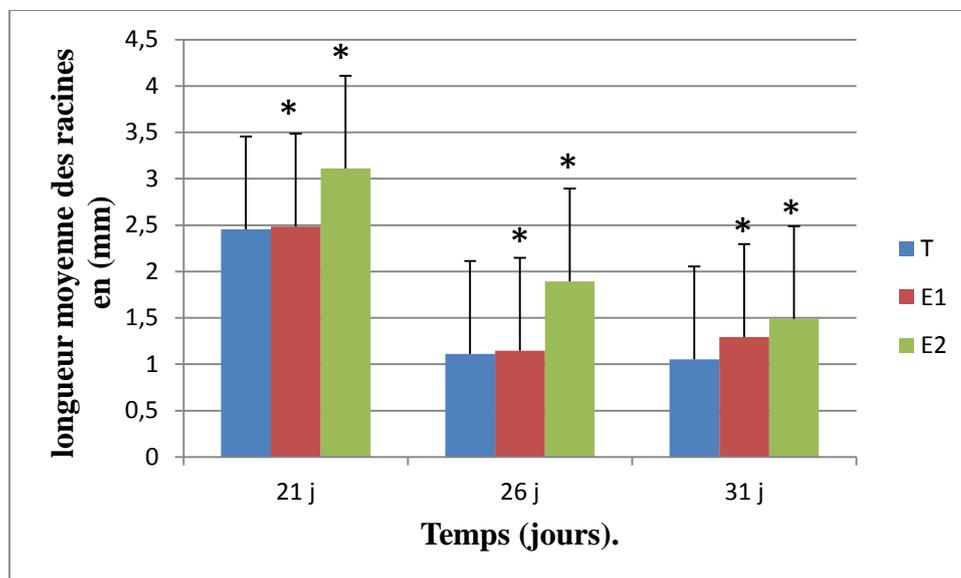
	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr (E1)	Ecartype T r (E1)	Moyenne Tr (E2)	Ecartype T r (E2)
<b>21</b>	1,88	0,48258563	2,44	0,35023801	2,58	0,81349725
<b>26</b>	1,67	0,18287822	2,261	0,47913	2,282	0,6156081
<b>31</b>	1,5	0,2538591	2,19	0,48177911	2,331	0,52307743

### 3.3. Longueur des racines :

La figure (18), Indique les effets des eaux usées sur la longueur moyenne des racines en (mm) de *lemna minor*.

On remarque une augmentation significative entre les témoins et les traités de (LR) ( $P \leq 0,05$ ) après 21, 26, 31 jours de traitement, mais il existe des différences non significative entre E1 et E2.

Cette augmentation est bien illustrée surtout après 21 jours de traitement. Les moyennes de nombre des feuilles sont de l'ordre de 2,485mm chez les traités E1 et 3,11mm chez E2, et de 2,44mm chez les témoins.



**Figure 18** : les effets des eaux usées sur la longueur moyenne des racines en (mm) de *Lemna minor* (E1 : eau d'oued mellague) et (E2 : 1/2 eau d'oued mellague et 1/2 ED) en fonction du temps (J).

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

**Tableau12 :** Moyennes de la longueur des racines de *lemna minor* placées dans des eaux usées (E1 : eau d'oued mellague) et E2 : ½ eau d'oued mellague et ½ eau distillée en fonction du temps (J).

	Moyenne Tm	Ecartype Tm	Moyenne Tr (E1)	Ecartype T r (E1)	Moyenne Tr (E2)	Ecartype T r (E2)
<b>21</b>	2,455	0,67332096	2,485	1,85987604	3,11	0,96200023
<b>26</b>	1,112	0,53383414	1,147	0,91801477	1,894	2,93527663
<b>31</b>	1,054	0,51016773	1,295	1,19569831	1,49	0,86692304

## *Chapitre 04. Résultats et Discussion*

**Tableau 13 :** Résultats des analyses physico-chimiques des eaux usées avant et après le traitement dans l'algérienne des eaux

	<b>Témoin</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>Avant traitement</b>
<b>Salinité</b>	1.2 %	1,8 %	1.6%	2,5%
<b>Taux de salinité</b>	1159 mg/l	2328 mg/l	1743 mg/l	2986 mg /l
<b>Turbidité</b>	0.901 NTU	0.270 NTU	0.769 NTU	0.923 NTU
<b>TAC</b>	32 mg/l	53 mg/l	42 mg/l	69 mg /l
<b>TH</b>	4.8 mmol/l = 480 mg/l	8 mmol/l = 800 mg/l	6.60 mmol/l = 660 mg/l	9.20 mmol/l
<b>Ca<sup>+</sup></b>	3.8 mmol = 152.304 mg/l	4.8 mmol = 192.38 mg/l	4.2 mmol = 168.33 mg/l	5.4 mmol/l
<b>Mg<sup>+</sup></b>	1 mmol/l = 24.312 mg/l.	3.2 mmol/l = 77.79 mg/l.	2.4 mmol/l = 57.376 mg/l.	6.3 mmol/l
<b>Cl<sup>-</sup></b>	51.98 mg/l.	557.95 mg/l	243.97 mg/l.	876.43 mg/l

**Tableau 14 :** Les résultats des analyses physico-chimiques avant et après le traitement dans le FERPHOS.

	<b>Témoin</b>	<b>E1</b>	<b>E2</b>	<b>Avant Traitement</b>
<b>Température</b>	18 C°	21.3 C°	8.10 C°	18.6 C°
<b>Ph</b>	7.20	8.25	7.64	7.34
<b>SO<sub>4</sub></b>	75 mg/l	≥ 250 mg/l	≥ 250 mg/l	≥ 250 mg/l
<b>MES</b>	2 mg/l	11 mg/l	9 mg/l	253 mg/l
<b>Fe<sup>++</sup></b>	0.000 mg/l	0.04 mg/l	0.001 mg/l	0.22 mg/l
<b>CE</b>	500 µs/cm	800 µs/cm	1000 µs/cm	14000 µs/cm

### Discussion

Dans cette partie de notre travail, nous avons étudié la réponse biologique de notre modèle végétale *Lemna minor* vis-à-vis des eaux usées d'oued Mellague sis à la commune de l'Aouinet Wilaya de Tébessa pour connaître s'il y a un stress oxydant ou non, par des marqueurs biologiques comme la proline.

Les résultats obtenus dans cette étude confirment les observations déjà rapportées par plusieurs études (Kleche, 2013 ; Semadi, 2010 ; Souiki, 2008), sur la réponse des plantes épuratrices *Lemna minor* face au stress oxydant causé par la présence des différents xénobiotiques dans les eaux usées. Les lentilles d'eaux vont mobiliser différents systèmes de défense qui leur permettent d'éliminer les radicaux libres. Certains sont de natures enzymatiques, les autres de natures chimiques.

Nous avons déterminé les effets des eaux usées sur : la biochimie des plantes aquatiques *Lemna minor* à savoir :

- ✓ La teneur en protéines totales,
- ✓ La teneur en proline
- ✓ La physiologie des deux macrophytes à savoir la chlorophylle *a*, *b*, et *a+b* durant trois durées de traitement 21, 26, 31 jours.

Nous avons aussi réalisé des dosages de paramètres physicochimiques des eaux usées d'oued Mellague de la région de Tébessa avant et après le traitement, qui ont montré que les eaux de surfaces d'oued Mellague s'avèrent entièrement chargées en Polluants chimiques et une forte salinité et constituent une véritable menace pour L'environnement, en particulier pour la vie et la santé des animaux et des végétaux.

#### Dosage des protéines :

L'ensemble des résultats de dosage des protéines obtenu dans cette partie de notre travail montre que le traitement des feuilles de *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 utilisées dans le développement de processus de reproduction (**Rodrigues et al., 2011** Thèse sara). De ce fait, la stimulation du taux des protéines enregistrée au niveau des deux plantes, traduit l'existence des protéines, synthétisées lors du stress généré par les xénobiotiques et/ou métaux lourds, existant éventuellement dans les milieux hydriques expérimentaux, tel que rapporté dans les travaux de **Dixon et al., (2003)**.

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

D'autres travaux (**Wollgieh et Newmann, 1995**) rapportent l'induction des protéines spécifiques au choc thermique sous l'effet d'un stress métallique qui montre leur rôle dans la réponse adaptative.

Pour confirmer le stress que *Lemna minor* a connu durant son séjour dans notre pilote expérimental, nous nous sommes intéressés aux variations du taux de protéines dans les deux systèmes racinaire et foliaire. En effet, les eaux usées stimulent la synthèse des protéines notamment au niveau des racines ceci pourrait s'expliquer selon **Pfugnacher et al. (1997)** par le fait que les racines présentent le siège de résistance de la plante aux différents stress, parce qu'elles sont rattachées au sédiment dont elles sont exposées à des concentrations élevées de xénobiotiques grâce à leur système enzymatique actif.

Cette augmentation des protéines s'expliquerait aussi par le fait que la présence de xénobiotique à l'intérieur des tissus, stimule 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 à 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.

**Gardés-albert et al ., (2003)** ont expliqué l'augmentation des protéines par le fait que la plante cherche à protéger son intégrité morpho-physiologique, en réponse au dommage et effet défavorable de la molécule en élaborant des protéines dont le rôle est de neutraliser la molécule herbicide (xénobiotique).

La stimulation de la synthèse protéique qui s'expliquerait par le fait que la présence de l'herbicide Calliofop 36EC, à l'intérieur des tissus stimule la synthèse de nombreuses Enzymes, entre autres celles intervenant dans la détoxification (**Shraddah et al., 2004**).

### **Dosage de la chlorophylle :**

Nous avons procédé au dosage des teneurs moyennes en chl *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

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

Environnementale (**Dewez et al., 2007**).

Sous un stress hydrique, une diminution de la teneur en chlorophylle est remarquée chez le blé dur (**Bousba et al., 2009**).

Le rapport chlorophylle (a/b) est un bon indicateur du seuil de tolérance au stress hydrique (**Guettouche, 1990**). **Tahri et al., (1998)** mettent en évidence une augmentation de la teneur en proline foliaire sous l'effet du stress suivie par un abaissement dans les teneurs en pigments chlorophylliens totaux (Chlorophylles *a* et *b*).

Les résultats de [**Tahri et al., (1998)**] révèlent une certaine proportionnalité, mais inverse, entre les teneurs en proline accumulées et les teneurs en pigments chlorophylliens perdues. Ainsi la variété qui accumule plus de proline est aussi celle qui connaît la plus forte diminution de ses teneurs en pigments chlorophylliens et vice versa (**Tahri et al., 1998**).

Les résultats obtenus montrent une diminution du taux de chlorophylle (*a*, *b* et *a+b*) chez les plantes exposées au Calliofop 36EC cette réduction chlorophyllienne est dose – dépendante, on a noté chez *Elodea Canadensis* une inhibition des chlorophylles (*a*, *b* et *a+b*) ces résultats concordent avec plusieurs travaux sur *Elodea canadensis* exposée aux pesticides et aux métaux lourds, la teneur en chlorophylle est un paramètre qui est sensible à la toxicité des métaux lourds (**Gupta et Chandra, 1996**).

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 . **El \_zbieta Kielak , Cezary Sempruch , Halina Mioduszevska , Jozef Klocek ,**

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. **Moldes et al., (2008)** ont suggéré que la diminution de la teneur en chlorophylle, dans les tissus de soja traités au glyphosate (herbicide) peut être causés par la perte de caroténoïdes et / ou par l'inhibition de leur biosynthèse et la photo-destruction, l'herbicide peut inhiber la synthèse de la chlorophylle en réduisant la formation de la daminolevulinic acide (ALA) en tant que précurseur de porphyrine.

Plus le nombre de molécules de chlorophylle *a*, *b* et caroténoïdes est important, plus l'énergie lumineuse absorbée est importante et la chaîne photosynthétique peut fonctionner au maximum de ses capacités. (**Kloskowski et al., 1992 ; Dec et al., 1997**)

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

En parallèle chez *Elodea canadensis* nous avons constaté une augmentation de la teneur en chlorophylles (*a*, *b* et *a+b*) après 21 jours de traitement par le Calliofop 36 EC

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 et al., (2004)**, qui rapporte un effet stimulateur du cadmium sur la teneur en chlorophylle.

### Dosage des prolines :

La proline est un biomarqueur biologique, comme la capacité d'accumuler la proline est corrélée la tolérance des plantes au stress abiotique (**Barnett et Naylor, 1966 ; Singh et al., 1972 ; Stewart et Lee, 1974**). La proline peut agir comme un osmolyte, un capteur d'ERO et un chaperon moléculaire stabilisateur de la structure des protéines, protégeant ainsi les cellules contre des dommages causés par le stress (**Hare et Cress, 1997 ; Rhodes et al., Verbruggen et Hermens, 2008 ; Szabados et Savoures, 2010**).

La proline peut jouer un rôle osmoprotecteur (**Peleg et al., 1984 ; Delaunay et Verma, 1993 ; Taylor, 1996**), stabilisateur des protéines (**Kuznetsov et sheveyakova, 1997, Shah et Dubey, 1998**), inhibiteur des métaux (**Farago et Mullen, 1979**) et inhibiteur de la peroxydation (**Mehta et gaur, 1999**). Cette augmentation du taux de proline peut être expliquée selon **Ober et sharp, (1994)**, par un effet de stress chez la plante. La synthèse de la proline peut impliquer également un allègement de l'acidification du cytoplasme qui permet de maintenir le rapport NADP/NADPH à une valeur compatible à celle du métabolisme (**Hare et Cress, 1997**). Selon **Monneveux et Nermann, (1989)**, l'accumulation de proline est associée à la résistance de la plante au stress, ce qui pourrait donc être l'un des facteurs qui expliquent le mieux la stratégie d'adaptation des plantes.

Dans ce travail nous nous sommes également intéressés à la teneur en proline chez les *Phragmites australis* retenues dans les eaux usées ; nous avons ainsi mis en évidence une forte augmentation de ce paramètre connu comme étant un biomarqueur de stress. (**Panda, 2003; Ben Khaled et al., 2003 ; Abdul, 2004 ; Leprince et al., 2004**).

D'autre part, nos résultats révèlent une forte corrélation entre la teneur en protéines totales et en proline qui montrent que l'accumulation de la proline peut être influée par des facteurs internes comme la synthèse protéique. Ces résultats sont confortés par ceux de (Tahri

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

et *al.*, 1998) et (Bedouh, 2014) qui affirment que toute augmentation de la teneur en protéines favorise une accumulation de la proline.

Selon un autre point de vue, l'accumulation de proline n'est pas une réaction D'adaptation au stress, mais plutôt le signe d'une perturbation métabolique (**Hanson et al., 1977; Hernandez et al., 2000**).

L'origine de la proline accumulée sous stress n'est pas totalement éclaircie. Elle est soit synthétisée de nouveau à partir de l'acide glutamique (Glu) ou via l'ornitine (Orn), qui sont utilisés comme précurseurs (**Samaras et al., 1995**).

Les hydrates de carbone peuvent être des facteurs essentiels dans l'accumulation de la proline, car la synthèse des protéines est liée automatiquement au métabolisme des glucides et à la respiration (dans le cycle de Krebs) par l'intermédiaire l' $\alpha$  cétyoglutarate qui forme le statut carbonique pour la synthèse de la proline (**Chaib, 1998**).

L'addition de l'ornithine dans le milieu de culture augmente la source de la proline par l'intermédiaire de l'enzyme ornithine amino-transferase (**Chaib, 1998**). **Savouré et al., (1995)** montrent chez *Arabidopsis* que l'augmentation de transcrits de la P5CR (\_1-pyrroline-5- carboxylate synthétase) est corrélée à une augmentation de proline.

De plus, cet auteur a montré que cette augmentation était directement reliée à l'application du stress. En effet, lors de la phase de récupération juste après l'application du stress, le contenu en proline diminue en même temps que la quantité de transcrits correspondant à la P5CR (\_1- pyrroline-5- carboxylate synthétase).

L'induction de ce gène est directement reliée à la régulation du taux de proline dans les cellules en fonction du stress.

L'accumulation de la proline induite par les stress, peut être le résultat de trois processus complémentaires : stimulation de sa synthèse ; inhibition de son oxydation et/ou altération de la biosynthèse des protéines. (**Tahri et al., 1998**).

### 3.4. Les paramètres morphologiques :

L'ensemble des résultats et les paramètres morphologiques obtenus dans cette partie de notre travail montre que le traitement des feuilles de *Lemna minor*, mettent en évidence, une augmentation hautement significative.

Dans ce chapitre, nous pouvons conclure que nos plantes aquatiques, *Lemna minor* sont sensibles à la présence des eaux usées, cette sensibilité s'est manifestée par une perturbation des paramètres morphologiques, mesurés durant notre travail. Ceci se traduit par

## Chapitre 04. Résultats et Discussion

---

une diminution de la longueur moyenne des feuilles (LMF), et de la longueur moyenne des racines (pédicelle) (LMR) chez *L. minor*.

La multiplication végétative importante des Lemnacées leur confère une productivité élevée, avec un taux de croissance souvent exponentiel. Cette capacité de production a été exploitée depuis un certain nombre d'années par des mises en culture expérimentale.

Le temps de doublement de la population de *Lemna minor* et *L. trisulca* varie entre 3 et 15 jours en conditions très favorables (**Blake & Dubois, 1982**).

En présence de niveaux de température, de lumière et de nutriments corrects, le thalle de *Lemna minor* vit de 5 à 6 semaines, et chaque thalle donne un nombre limité de thalles filles, qui varie selon les différents clones de l'espèce (**Sculthorpe, 1967**). En conditions expérimentales (**Rejmankova, 1975**), le taux de croissance de *Lemna gibba* est supérieur à celui de *L. minor*, et cela pour des températures allant de 17 à 29 °C.

Il est également augmenté lorsqu'en plus d'un fort éclaircissement, on enrichit le milieu en CO<sub>2</sub> (**Björndahl & Nilsen, 1985**).

La combinaison des deux facteurs, intensité lumineuse et température, influence le taux de multiplication de *L. minor*. A chaque niveau d'éclaircissement, le taux de croissance augmente si la température se situe entre 20 et 25 °C (**Sculthorpe, 1967**).

### 3.5. Les paramètres physico-chimiques :

Après les analyses physico-chimiques des eaux d'oued Mellague à l'Aouinet de Tébéssa, nous avons enregistré les résultats marquants, dont on remarque une réduction des taux suivants :

✚ la température, Fe<sup>++</sup>, Turbidité, MES, Taux de salinité, Conductivité, salinité, PH, TH SO<sub>4</sub>...etc, car les lentilles d'eau *lemna minor* accumulent et absorbent les sels, métaux lourds ce qui explique cette réduction.

#### Le PH :

La biomasse a besoin d'un pH proche de la neutralité pour réaliser son activité épuratrice. Dans le filtre sans lentille d'eau, le pH est légèrement plus élevé que celui du filtre planté, Plusieurs facteurs peuvent également expliquer cette baisse de pH parmi eux l'accumulation de CO<sub>2</sub> due au métabolisme des plantes ou à la dégradation de la matière organique par les bactéries hétérotrophes (**Attionu, 1976 ; Jedicke et al., 1989, Mancera, 2010**),

PH moyen des eaux usées brutes (EUB) à l'entrée du système d'épuration est de 7,5 ± 0,42. Alors que le PH moyen des eaux usées épurées (EUE) à la sortie des filtres plantés de

## *Chapitre 04. Résultats et Discussion*

---

diminue lentille d'eau dont il varie entre  $7,1 \pm 0,67$  et  $6,9 \pm 0,33$  respectivement pour un temps de séjour de 21 jours et de 26 jours. Ainsi nous constatons une légère diminution du PH pour le système non planté (**Manel, 2015**).

Nos résultats sont en accord avec les résultats obtenus antérieurement par (**Kleche, 2013**) et ils sont inférieures à ceux obtenus par (Benameur, 2010) et (**Tiglyène et al., 2005**).

### **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**).

Dans notre étude nous constatons que la température de l'eau est basse au niveau des cuves d'épuration car les eaux sont en contact avec le sol mais ces résultats n'influence pas la sélection des micro-organismes responsables de l'épuration des résultats similaires ont été enregistrés par **Semadi (2010)**.

### **5.3. La conductivité :**

La conductivité électrique des eaux usées épurées par les filtres plantés de lentille d'eau est inférieure à celle des eaux usées

Les lentilles d'eaux ont tendance à accumuler les sels dissous ce qui explique la diminution de la conductivité de l'eau au niveau des cuves plantées de cette dernière.

# *Conclusion*

### CONCLUSION

La ville de Tébessa rejette chaque jour des quantités importantes d'eaux usées, sans subir le moindre traitement. Ces eaux, rejetées dans la nature à l'état brute, sont un foyer de développement et de propagation de certains insectes nuisibles (les moustiques notamment) des maladies (typhoïde, cholera,...)

La phyto-épuration constitue une nouvelle technologie permettant d'épurer les eaux usées par l'utilisation de plantes aquatiques comme des lentilles d'eau (*Lemna minor*).

La lentille d'eau *Lemna minor*, se distingue par son rôle de filtration et d'épuration hydrique, sa capacité d'épuration lui permet de filtrer les eaux usées, par son système racinaire important, qui possède une grande faculté d'absorber les xénobiotiques.

L'objectif de cette étude démontre les effets de stress oxydant induit par les eaux usées sur la plante épuratrice *Lemna minor* en étudiant les paramètres biochimiques, les paramètres de croissances et les biomarqueurs biologiques comme la proline (indicateur de stress)

La rétention des *Lemna minor* dans les eaux usées stimule la synthèse des protéines et l'accumulation des prolines.

L'augmentation significative de la proline et des protéines indiquent une grande capacité anti-oxydative et résistante de *Lemna minor*. Cette activité peut représenter une réponse de cette plante au stress oxydatif provoqué probablement par l'accumulation des xénobiotiques au niveau cellulaire.

Les résultats remarquables pour les différents paramètres physico-chimiques avec une diminution des taux de la conductivité, la température, salinité...etc., par rapport à l'état antérieur des eaux d'oued Mellague, montre l'efficacité d'épuration des lentilles d'eaux *lemna minor*.

Nous avons remarqué après l'utilisation des paramètres de dosage et paramètres de croissance ce qui suit : Une augmentation hautement significative des protéines totaux, proline et de la teneur en chlorophylle (a, b et a+b) de la plante aquatique.

Augmentation du nombre des feuilles et des racines, ainsi que la longueur des racines.

En perspective plusieurs points importants comme suivants :

- Identifier les paramètres physico chimiques des eaux purifiées par les plantes aquatiques comme *Lemna minor*
- Développer les dosages des biomarqueurs (proline, protéines, chlorophylles) pour évaluer le stress oxydatif induit par les eaux usées sur la plante épuratrice.
- Les effets des eaux usées sur la plantes aquatiques néfaste.

*Références  
bibliographiques*

### A

**Abdul W., 2004.** Analysis of toxic and osmotic effects of sodium chloride on leaf growth and economic yield of sugarcane. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 133-141.

**Abrahamsson, K., Choo, K.-S., Pedersén, M., Johansson, G., Snoeijs, P. (2003).** *Ann. Bot.* 89: 887- 894.

**ARDAM, 2007.** L'épuration des eaux usées : le langage naturel-Cas de la station de Mèze Loupian/ Ecosite du Pays de Thau. Pagesperso-organe. Fr/ardam/ images/pdf/DL langage % 20(ad). Pdf.

**Arnon D.I., 1949.** Cooper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxylase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24: 1-25.

**Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002).** Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Cur. Sci.* 82, 1227-1238.

**Attionu RH, 1976.** Some effects of water lettuce (*Pistia stratiotes, L.*) On its habitat. *Hydrobiologia* 50(3), 245-254.

**Aymenryc., guillaume L, 2011.** Plante aquatique, eau pure. Edition Sang de la Terre, paris. 55.

### B

**Barnett N M., Naylor A W. 1966.** Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant Physiol.* 41 : 1222-1230.

**Barnett NM, Naylor AW. 1966** amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. *Plant physiol.* 41: 1222-1230.

**Bellinger Y., Bensaoud A., Larher F., 1991.** Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance. Colloque Physiology Breeding of winter Cereals for Stressed Mediterranean Environments, Montpellier (France). Ed. Les colloques .55. Inra. Paris.

**Ben Khaled L., Morte Gómez A., Ouarraquel M., Oihabi A., 2003.** Réponses physiologiques et biochimiques du trèfle (*Trifolium alexandrinum L.*) à la double association Mycorhizes-*Rhizobium* sous une contrainte saline. INRA, EDP Sciences. *Agronomie.* 23: 571–580.

**Bergareche C., Llusia J., Febrero A., Bort J., Araus J.L., 1993.** Effect of water stress on proline and nitrate content of barley relationships with osmotic potential, carbon isotope ratio and grain yield. Colloque Diversité génétique et amélioration variétale. Montpellier (France). *Les colloques*.64. (éd). Inra. Paris.

**BJORND AHL G., NILSEN S., 1985.** Growth potential of *Lemna gibba* : effect of CO<sub>2</sub> enrichment at high photon flux rate. *Aquat. Bot.*, 22 : 79-82.

**Bjorndahl g., nilsen s., 1985.** Growth potential of *lemna gibba*: effect of co<sub>2</sub> enrichment at high photon flux rate. *Aquat. Bot.*, 22 : 79-82.

**BJORND AHL G., NILSEN S., 1985.** Growth potential of *Lemna gibba*: effect of CO<sub>2</sub> enrichment at high photon flux rate. *Aquat. Bot.*, 22: 79-82.

**Blake g., dubois j.p., 1982.** L'épuration des eaux par les plantes aquatiques. Afée, Paris. 103 p.

**BLAKE G., DUBOIS J.P., 1982.** L'épuration des eaux par les plantes aquatiques. AFEE, Paris. 103 p.

**BLAKE G., DUBOIS J.P., 1982.** L'épuration des eaux par les plantes aquatiques. AFEE, Paris. 103 p.

**Blokhina O, E Virolainen and KV Fagerstedt (2003).** "Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review." *Annals of Botany* 91(2): 179-194. Carotenoids as protective response against oxidative damage in *Dunaliella bardawil*. *Biomol. Eng. Mar. Biotech.: Basics App.* 20, 249-253.

**Bousba R., Ykhlef N., Djekoun A., 2009.** Water use efficiency and flag leaf photosynthesis in response to water deficit of durum wheat (*Triticum durum Desf*). *World Journal of Agricultural Sciences* 5. 5: 609 -616.

**Bradford, m. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

**Bruchhauser, 2010.** Cellule, ADN et unité 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

© CRE Laurentides 2009 | Les plantes aquatiques p.1

**C. Boutin, S. Prost-Boucle et M. Boucher, 2009.** Étude des filtres plantés de roseaux dimensionnés pour des campings.

**Chaib .G, 1998.** Teneur en proline chez les différents organes de blé dur (*Triticum durum Desf*). Essai d'explication des conditions d'accumulation sous manque d'eau. Thèse de Doctorat. Univ. Constantine.

**Chehab EW, JV Perea, B Gopalan, S Theg and K Dehesh (2007).** "Oxylipin Pathway in Rice and *Arabidopsis*." *Journal of Integrative Plant Biology* 49: 43-51.

**Child RD, Summers JE, Babij J, Farrent JW, Bruce DM. 2003.** Increased resistance to pod shatter is associated with changes in the vascular structure in pods of a resynthesized *Brassica napus* line. *Journal of Experimental Botany* 54, 1919-1930.).

**Cillard J and P Cillard (2006).** "Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti oxydations." *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. 13(1): 24-29.

**Cornic G., Fresneau C., 2002.** Photosynthetic carbon reduction and carbon oxidation cycles are the main electron sinks for photosystem II activity during a mild drought. 139-155.

**Croteau DL and VA Bohr (1997).** "Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells." *Journal of Biological Chemistry* 272(41): 25409-25412.

Croteau DL and VA Bohr (1997). "Repair of Oxidative Damage to Nuclear and Mitochondrial DNA in Mammalian Cells." *Journal of Biological Chemistry* 272(41): 25409-25412.

### D

**Dat J, S Vandenabeele, E Vranová, M Van Montagu, D Inzé and F Van Breusegem (2000).** "Dual action of the active oxygen species during plant stress responses." *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 57(5): 779-795.

**Dec, A., 1997.** Analysis of soil bound residues of C13 – labelled fungicide cyprodinil by NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 3. pp. 1128 – 1135.

**Dec, A., 1997.** Analysis of soil bound residues of C13 – labelled fungicide cyprodinil by NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 3. pp. 1128 – 1135.

**Delaunay, A. J., and Verma, D .P .S, 1993.** Proline Biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*4:215-223.

**Delaunay, A. J., and Verma, D .P .S, 1993.** Proline Biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*4:215-223.

**Dethioux M., 1989a.** Espèces aquatiques des eaux courantes. Ministère de la région wallonne, namur. 72 p.

**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, Enviromental Toxicology Research Center. TOXEN, 2101, Montreal, Quebec, Canada.

**Dixon D.P., Mc Ewen A.G., Laphorn A.J. et Edwards R., 2003.** Forced evolution of herbicide detoxifying glutathione transferase. *The journal of biological chemistry*, 278, (26) : 23930-23935.

**Dixon D.P., Mc Ewen A.G., Laphorn A.J. ET Edwards R., 2003.** Forced evolution of herbicide detoxifying glutathione transferase. *The journal of biological chemistry*, 278, (26): 23930-23935.

### E

**(5)- Eau en couleur, 2006.** Introduction au lagunage naturel.

**El Hachemi O., El Halouani H., Meziane M., Torrens A., Salgot M., Sbaa M, 2012.** Etude des performances épuratrices dans une station de traitement des eaux usées par lagunage en climat désertique (Oasis de Figuig-Maroc) : Aspect bactérien et organique. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn* 6 (1), 84-97.

**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. *Pestic. Biochem. Physiol.* (2011), doi: 10.1016/ j.pestbp. 2011.01.002.

**Estevez, M.S., Malanga, G., Puntarulo, S. (2001).** UV-B effects on Antarctic *Chlorella sp* cells. *J. Photochem. Photobiol B : Bio.* 62, 19-25.

### F

**Farago, M.E., and Mullen, W.A, 1979.** Plants which accumulate metals. Part IV. A possible copper-proline complex from the roots of *Armeria maritima*. *Inorg. Chim.Acta* 32, L93–L94.

**Favier A (2003).** "Le stress oxydant." *L'Actualité chimique* Nov-déc: 108-115.

**FNDAE, 2005.** Dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration : origines et solutions.

**Foot C, J Valentine, A Greenberg and J Liebman (1985).** *Active Oxygen in Chemistry*. New York, Chapman and Hall.

**Foyer CH and G Noctor (2003).** "Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria." *Physiologia Plantarum* 119: 355-364

**Foyer CH and G Noctor (2005b).** "Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses." *Plant Cell* 17(7): 1866- 1875.

### G

**Geoff Burnie et al., 2003.** *Botanic encyclopédie de botanique et d'horticulture*. Edition Place des victoires, Paris. Page. 515.

**Giardi M.T., Cona A.B., Geiken T., Kucera J., Masojídek A.K., Matto O., 1996.**

**Grasmuck n., 1994.** La végétation aquatique des cours d'eau de lorraine : typologie floristique et écologique. Contribution à l'étude de l'autoécologie des espèces de la flore aquatique lorraine. Thèse de doctorat : sci. Vie : université de metz. 219 p.

**Grisson C, 1999.** Epuration des eaux usées par des filtres plantés de macrophytes : une étude bibliographique. Agence de l'eau Rhône Méditerranéenne Corse.

**Guettoche R., 1990.** Contribution à l'identification des caractères morpho physiologiques d'adaptation à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum durum Desf*). Thèse diplôme d'Agronomie approfondie

**Guillaune F, 2012.** Guide des plantes invasives. Edition Belin, France. P112-113.

**Gupta P, Chandra P., 1996.** Response of cadmium to *Ceratophyllum demersum* L., a rootless submerged plant. *Waste Manag* 16:335– 337.Doi: 10.1016/S0956- 053X(96)00053-0.

### H

**Halliwell B., 2006.** "Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is à Fundamental Theme of Aerobic Life." *Plant Physiology* 141(2): 312-322.

**Halliwell, B., Gutteridge, J., 1999.** *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed. Oxford University Press. Halocarbons by brackish-water algae. *Phytochem.* 64, 725-734.

**Hanson A.D., Nelson C.E., Everson E.H., 1977.** Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars. *Crop Sci.*, 17: 720-726.

**Hare P D., Cress W A. 1997.** Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation.* 21:79-102.

**Heitholt J.J., Johnson D.M., Ferris L., 1991.** Stomatal limitation to carbon dioxide assimilation in nitrogen-and drought-stressed wheat. *Crop Sci.* 31: 135 -139 p.

**Hernandez S., Deleu C., Larher F., 2000.** Accumulation de proline dans les tissus foliaire de tomates en réponse à la salinité. *Life Science*, 323: 551-557.

**Hermes-Lima, M., 2005.** Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals, In K. B. Storey (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Hoboken, NJ: Wiley-Liss, 319-368.

**Hurlimann-lüönd a.m., 1990.** The development of some *lemnaceae* under different nutrient conditions. *Folia geobot. Phytotaxon.*, 25: 309-314.

### J

**Jahnke, L. S., White, A. L. (2003).** Long-term hyposaline and hypersaline stresses produce distinct antioxidant responses in the marine alga *Dunaliella tertiolecta*. *J. Plant Physiol.* 160, 1193-1202.

**Jean L, 2009.** Station d'épuration de Pont-Labbé, l'épuration de l'eau, France, ONEMA, 10, p 02.

**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.

### K

**Kleche M, 2013.** Utilisation des systèmes biologiques dans l'épuration des eaux usées cas de la région d'Annaba. Thèse de Doctorat, Université d'Annaba, 95p.

**Kloskowski, H., 1992.** Plant availability of bound anilazine residues in a degraded loess soil. J. Environ. Scien. Health. 6. pp. 487 – 505.

**Kuznetsov VV, and Shevyakova NI., 1997.** Stress responses of tobacco cells to high temperature and salinity. Proline accumulation and phosphorylation of polypeptides. *Physiologia Plantarum* 100: 320–326

**Laval-Martin D., et Mazliak P., 1995.** Physiologie végétale 1 nutrition et métabolisme. Harmann Editeurs des sciences et des arts.

### L

**Leprince A.S., Lefebvre D., Ghars M.A., Parre E., Thiery L., Bordenave M.,**

**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* **1 42(3):** 251-255.

**Lynch MP, C Faustman, LK Silbart, D Rood and HC Furr (2001).** "Detection of Lipid Derived Aldehydes and Aldehyde:Protein Adducts In Vitro and in Beef." *Journal of Food Science* 66(8): 1093-1099.

**Richard L. and Savouré A., 2004.** Signalling pathways involved in proline metabolism regulation under hyperosmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Bull, biot.*134: 69-74.

### M

**Mancer H, 2010.** Analyse du pouvoir épurateur de quelques plantes macrophytes dans les régions arides. Mémoire de magister, Université de Biskra, p 99.

**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.41-42-76-77-140p.

- May M, T Vernoux, C Leaver, M Van Montagu and D Inze (1998).** "Review article. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development." *Journal of Experimental Botany* 49(321): 649-667.
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969.** Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem* 244, 6049-6055.
- McIlraith a.l., robinson g.g.c., shay j.m., 1989.** A field study of competition and interaction between *lemna minor* and *lemna trisulca*. *Can. J. Bot.*, 67: 2904-2911.
- Medjdoub, 2014.** Etude, Conception et dimensionnement d'une STEP par filtres plantés de roseaux des eaux usées des zones éparses de la commune de Terny. Mémoire de master, Université de Tlemcen, p 108.
- Mehta, S.K., and Gaur, J.P., 1999.** Heavy-metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.* 143, 253– 259.
- 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
- Meriaux j.l., 1978.** Etude analytique et comparative de la végétation aquatique d'étangs et marais du nord de la France (vallée de la Sensée et bassin houiller du nord- pas-de-calais). *Doc. Phytosociol.*, iii : 1-244.
- Moldes, D ., Diaz, M ., Tzanov, T ., and Vidal, T ., 2008.** Comparative study of the efficiency of synthetic and natural mediators in laccase-assisted bleaching of eucalyptus kraft pulp, « *Bioresource Technol.* 99(17), 7959-7965.
- Monneveux P.H, Nemmar M., 1989.** Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum*) et chez le blé (*Triticum durum* Desf) : étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie* 6 : (583-590).
- 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* (2009) 83:249–254.

### N

**Nber, E. S., and R. E. Sharp., 1994.** Proline accumulation in maize (*Zea mays* L.) primary roots at low water potentials: requirement for increased levels of abscisic acid. *Plant Physiology* 105: 981–87.

**Niedernhofer LJ, JS Daniels, CA Rouzer, RE Greene and LJ Marnett (2003).** "Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells." *Journal of Biological Chemistry* 278(33): 31426-31433.

**Noctor G, A Arisi, L Jouanin, K Kunert, H Rennenberg and C Foyer (1998).** "Review article. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants." *Journal of Experimental Botany* 49(321): 623-647.

### O

**Osmond C.B., 1994.** What is photo inhibition, some insights from comparisons of shade and sun plants. BIOS. Scientific Publishers. Oxford : 1-24.

### P

**Panda S. K., 2003.** Heavy-metal phytotoxicity induces oxidative stress in a moss,

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

**Peleg, S., Naor, J., Hartley, R., and Avnir, D., 1984.** "Multiple resolution texture analysis and classification," *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell.* 6(4), 518-52

**Peltier, J.-B., Ytterberg, A.J., Sun, Q., van Wijk, K.J., 2004.** New functions of the thylakoid membrane protéome of *Arabidopsis thaliana* revealed by a simple, fast, and versatile fractionation strategy. *J. Biol. Chem.* 279, 49367-49383. 20 (2): 93-98.

**Pip E., 1989.** Water temperature and freshwater macrophyte distribution. *Aquat. Bot.*, 34 : 367-373.

**Pfugmacher S., Geissler K., Steinberg C, 1997.** Activity of phase I and phase II detoxification enzymes in different comus parts of *Phragmites australis*. *Ecotoxicologie and Environnement Safety* 42, 62-66.

**Portielje r., roijackers r.m.m., 1995.** Primary succession of aquatic macrophytes in experimental ditches in relation to nutrient input. *Aquat. Bot.*, 50 : 127-140.

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

**Pourrut. B., 2008.** Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE. Institut National Polytechnique de Toulouse. Spécialité : Ecotoxicologie . p 297.

*Taxithellium* sp. *Science*. 84(5), 10: 631-633.

### R

**Reddy, C.C., Scholz, R.W., Thomas, C.E., Massaro, E.J., 1982.** Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Sci* 31, 571-5

**REJMANKOVA E., 1975.** Comparison of *Lemna gibba* and *Lemna minor* from the production ecological viewpoint. *Aquat. Bot.*, 1: 423-427.

**Rejmankova e., 1975.** Comparison of *lemna gibba* and *lemna minor* from the production ecological viewpoint. *Aquat. Bot.*, 1 : 423-427.

**Rhodes D, Handa S, Berssan R A. 1986.** Metabolic changes associated with adaptation of plant-cells to water-stress. *Plant physiology*. 82 :890-903.

**Robert D. et Roland J.C., 1998.** Organisation cellulaire : Biologie végétale. Ed Doin, Vol.1, pp 125-345.

**Robert et Roland, 1998 ; Lidia et al., 2004). Kloskowski, H., 1992.** Plant availability of bound anilazine residues in a degraded loess soil. *J. Environ. Scien. Health*. 6. pp. 487 – 505.

**Roelofs j.g.m., 1983.** Impact of acidification and eutrophication on macrophyte communities in soft waters in the netherlands. 1. Field observations. *Aquat. Bot.*, 17 :

**Salguero, A., de la Morena, B., Vigarà, J., Vega, J. M., Vilchez, C., León, R. (2003).**

**Scoppola a., 1982.** considérations nouvelles sur les végétations des *lemnetea minoris* (r.tx.1955) em. A. Schwabe et r.tx.1981 et contribution à l'étude de cette classe en Italie centrale. *Doc. Phytosociol.*, n.s., vi : 1-130.

### S

**Samaras Y., Bresson R.A., Csonka L.N., Garcia-Rios M.G., Paino D'Urzo M. & Rhodes D., 1995.** Proline accumulation during drought and salinity. Environment and plant metabolism, flexibility and acclimation. Oxford BIOS.161: 79- 88.

**Savouré A., Jaoua S., Hua XueJun., Ardiles W., Van Montagu M., Verbruggen N., 1995.** Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the DELTA 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* .372: 13 -19.

**Saygideger S, 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 ., 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.

**SCULTHORPE C. D., 1967.** The biology of aquatic vascular plants. E. Arnold, London. p610.

**Sculthorpe c. D., 1967.** The biology of aquatic vascular plants. E. Arnold, london. p 610.

**SCULTHORPE C. D., 1967.** The biology of aquatic vascular plants. E. Arnold, London. p610.

**Seidl M. et Mouchel J. M., 2003.** Valorisation des eaux usées par langage dans les pays en voie de developement. Centre d'enseignement et de recherche Eau Ville Environnement, centre conjoint de l'ENGREF, de l'ENPC et de L'UPVM shade and sun plants. BIOS. Scientific Publishers. Oxford: 1-24.

**Semadi F, 2010.** Faisabilité du traitement des eaux d'un oued chargé en éléments traces métalliques (ETM) par filtres plantés de macrophytes (*Phragmites australis*) : cas de la région d'Annaba. Thèse de Doctorat, Université d'Annaba, 174p.

**Shah, K., and Dubey, R.S., 1998.** Effect of cadmium on proline accumulation and ribonuclease activity in rice seedlings: Role of proline as a possible enzyme protectant. *Biol. Plant.* 40, 121–130.

- Shraddha S., Sarita S., Rohit S. , Kavita P. , Kavita B., 2004.** Translocation of metals and its effects in the tomato plants grow on various amendments of tannery waste: evidence for involvement of antioxydants. *Chemosphere* (57): 91-99.
- Singh T N, Aspinal D, Paleg LG. 1972.** Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: potential metabolic measure of drought resistance. *Nature. New biology.* 236: 188-190.
- Slama A., Ben Salem M., Ben Naceur M., Zid E.D., 2005.** Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. Institut national de la recherche agronomique de Tunisie (Inrat). Univ. Elmanar. Tunisie.
- Smirnoff N., 1998.** Plant resistance to environmental stress. *Current opinion in Biotechnology* 9(2), 214-219
- Smolders a.j.p., roelofs j.g.m., den hartog c., 1995.** Internal eutrophication of aquatic ecosystems: mechanisms and possible remedies. *Acta bot. Gallica*, 142: 707-717.
- 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 and RL Levine (2000).** "Protein Oxidation." *Annals of NY Academy of Science* 899(1): 191-208.
- Stauber, J. L., Florence, T. M. (1990).** Mechanism of toxicity of zinc to the marine diatom *Nitzschia closterium*. *Marine Biol.* 105, 519-524.
- Stewart G R., Lee J A.1974.** Role of proline accumulation in halophyte. *Planta.* 120: 279-289.
- 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.
- Szabados L, savoure A. 2010.** Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant Science.* 15: 89-97.

### T

**Tahri E. H., Belabed A. et Sabki K., 1998.** Effet d'un stress osmotique sur l'accumulation de la proline et chlorophylle et des ARNm codant pour la glutamine. Synthétase chez trois variétés de blé dur (*Triticum durum*). Bull. Inst. Sci., Rabat, (21) : 81-87.

**Taylor, C.B., 1996.** Proline and water deficit: Ups, downs, ins and outs. Plant Cell 8, 1221-1224.

**Thripathi A.K., Tripathi S., 1999.** Change in some physiological and biochemical Université de Tlemcen, 108p.

**Tiglyene S., Mandi L., Jaouad AE, 2005.** Enlèvement du chrome par infiltration verticale sur lits de phragmites australis. Rev. Sci.Eau 18(2), 177-198.

### V

**Verbruggen N, Hermans C. 2008.** Proline accumulation in plants : à review. Amino acids. 35 :753-759.

### W

**Wedge r.m., burris j.e., 1982.** Effects of light and temperature on duckweed photosynthesis. *Aquat. Bot.*, 12: 133-140.

**Wollgieh, R., Newmann, D., 1995.** Stress response of tomato cell cultures to toxicmetals and heat shock: differences and similarities. *J. Plant Physiol.* 146: 736-742.

**Wong CM, AK Cheema, L Zhang and YJ Suzuki (2008).** "Protein Carbonylation as a Novel Mechanism in Redox Signaling." *Circulation Research* 102(3) : 310-318.

### Υ

**Υkhlef N., Djekoun A., 2000.** Adaptation photosynthétique et résistance à la sécheresse chez le blé dur (*Triticum turgidum L. var. durum*) : Analyse de la variabilité génotypique. Option Méditerranéennes. Série A. 40: 327 -330.

### Z

**Zhang, C.G., Leung, K.K., Wong, Y, S., Tam, N.F.Y., 2007.** Germination, growth and physiological responses of mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza*) to lubricating oil pollution. *Environ. Exp. Bot* 60, 127-136.

#### *Les sites d'internet*

[www.eauencouleurs.org/IMG/pdf/introduction\\_au\\_lagunage\\_naturel.pdf](http://www.eauencouleurs.org/IMG/pdf/introduction_au_lagunage_naturel.pdf)

# *Les annexes*

**Annexe 1**

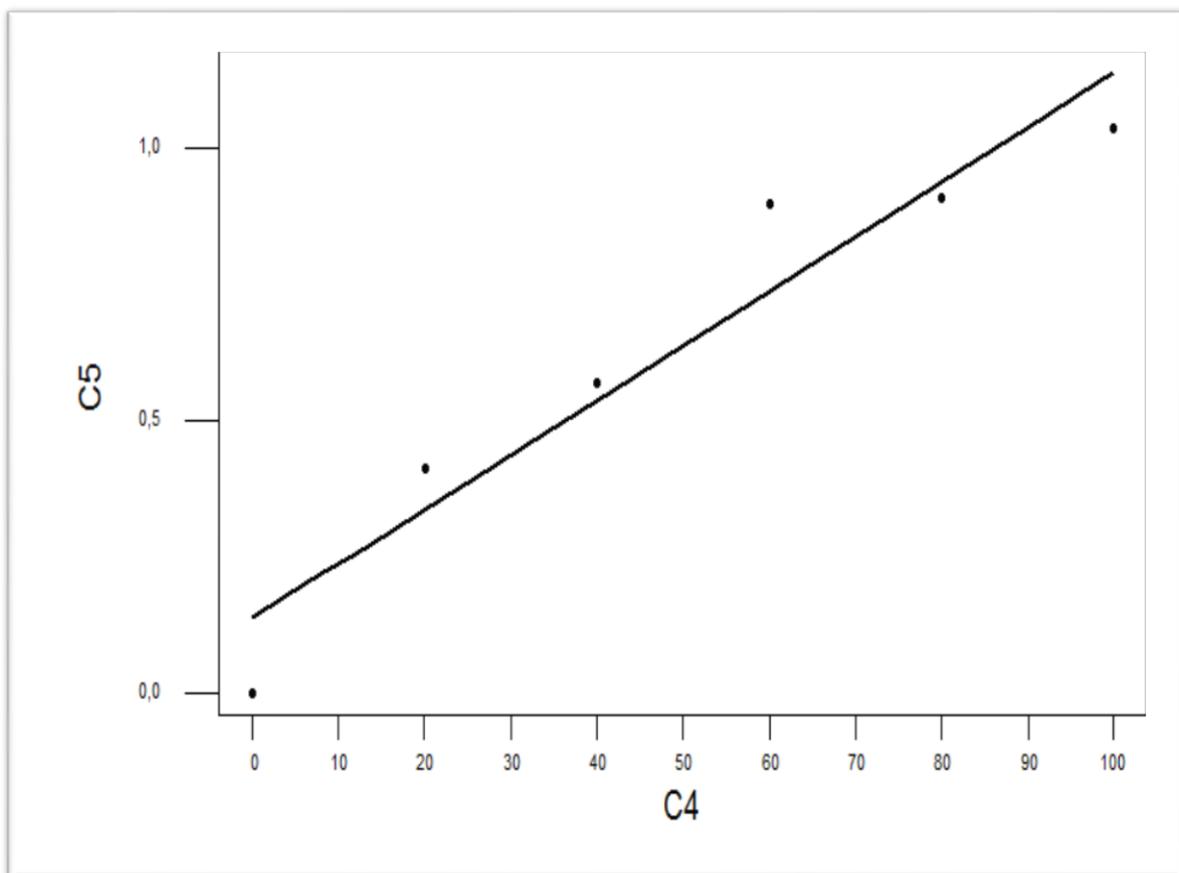
Les courbes d'étalonnages

**1. Dosage de protéine et proline**

✓ L'équation de la régression est :

$$C2 = 0,135852 + 0.0100093 C4$$

$$S = 0,123702 \quad R\text{-carre} = 92,0\% \quad R\text{-carre (ajust)} = 90,0\%$$

**Graphique de la régression****Figure 19 : La courbe d'étalonnage pour le dosage des protéines et prolines.**