1. Présentation de la région d'étude

1.1. Situation géographique

Le bassin versant d'Oued Mellegue fait partie du bassin versant de "la Medjerda", il couvre une superficie de 4307 km. Cette surface est drainée par "Oued Mellegue" 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. La région d'étude est située dans les territoires des wilayas de Tébessa.elle est limitée :

- A l'Est par la frontière algéro- tunisienne.
- A l'Ouest par les wilayas d'Oum El Bouaghi et Khenchela.
- Au Nord par la wilaya de Souk Ahras.
- Au Sud par la wilaya d'El Oued. **(Ladlani, 2007)**

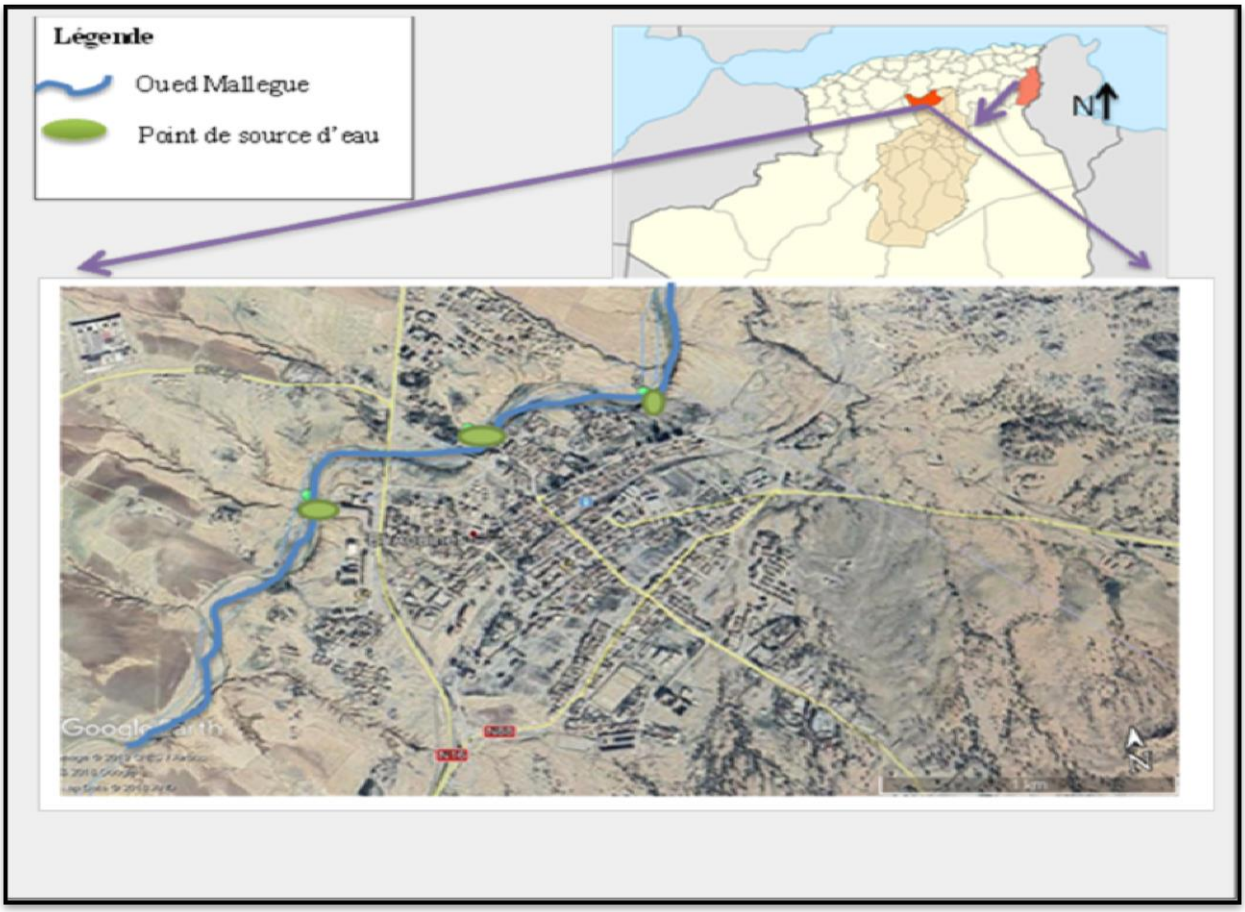


Figure 3 : Situation géographique d'oued Mellegue. (Google earth)

2. Matériel végétale : la plante *Lemna minor*

2.1. Description

Lemna minor est une angiosperme (plantes à fleurs) de 1,5 à 6 mm de diamètre, monocotylédones appartenant à la famille des ***Lemnacées***. Corps végétatif d'une forme de métalloïde correspondant, qui est dans laquelle il existe différance dans la tige et les feuilles. **(Del Pilar, 2004)**

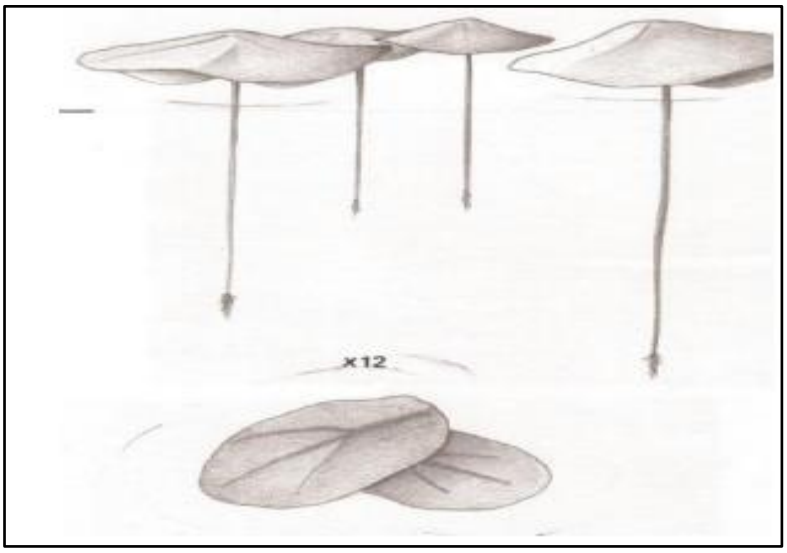


Figure 4 : Morphologie de la plante *Lemna minor* (Del Pilar; 2004).



Figure 5 : Lentille d'eau (*Lemna minor*). (Del Pilar, 2004)

2.2 .Classification

Règne plante : Plantes

Sous-règne : Tracheobionta

Division magnoliophyta : angiospermes, phanérogames

Classe liliopsida : Monocotylédones

Sous-classe : Alismatidae

Ordre : Alismatales

Famille : Araceae

Genre : Lemna

Espèce : Minor



Figure 6 : Aspect générale de *Lemna minor*. (Cauzzi, 2007)

2.3 .Traitement de l'eau

Lemna minor est utilisée pour le traitement des eaux usées (industrielles ou domestiques), en phytoépuration. Les caractéristiques que doivent avoir les plantes aquatiques utilisées pourtraiter les eaux usées sont les suivantes :

- une productivité élevée,
- une haute efficacité d'absorber des nutriments et de polluants,
- la prévalence élevée dans des conditions naturelles défavorables et facile à récolter.

Lemna minor répond à toutes ces caractéristiques et de ce fait a été utilisé dans les systèmes de décontamination de l'eau dans les conditions expérimentales de laboratoire. **(Del Pilar, 2004)**

3 .Echantillonnage

L'échantillonnage est une étape primordiale, car il conditionne la pertinence de l'analyse.il doit être de qualité mais également représentatif de ce que l'on veut analyser. **(Hebert et Legre, 2000)**

3. 1. Méthode d'échantillonnage

Le prélèvement des échantillons d'eau peut s'effectuer de plusieurs façons, selon la taille du cours d'eau et l'accessibilité au site. Dans les ruisseaux et rivières de faible profondeur, l'idéal est de se placer au centre du cours d'eau et de remplir les bouteilles à la main**. (Hebert et Legre, Octobre 2000)**

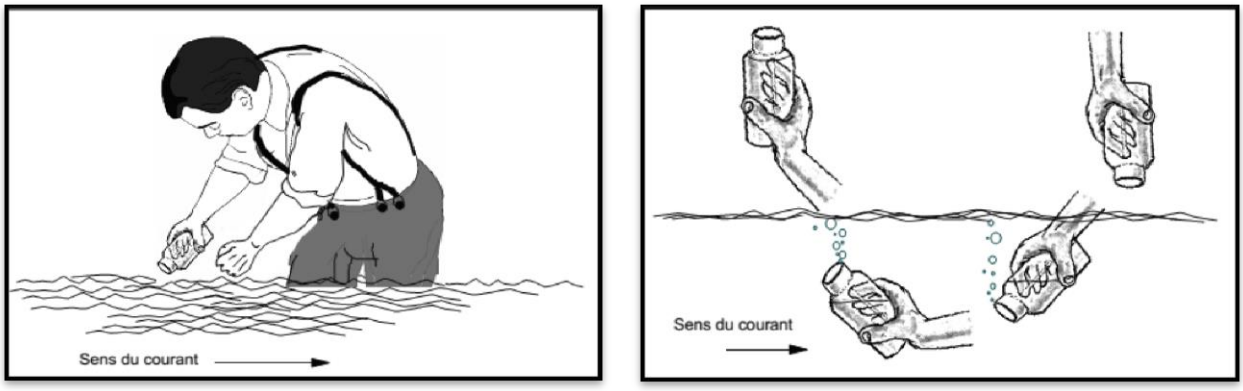


Figure 7: Méthode d'échantillonnage d'eau face au courant. (Hebert et Legre, Octobre 2000)

3.2 .Choix des stations de prélèvement

Le choix des stations de prélèvement a été effectué en fonction de la localisation et de l'accessibilité de ces derniers. En amont S1 (Partie Supérieur d'oued Mellegue), au milieu S2 (centre de la ville de la commune de l'Aouinet) et en aval S3 (Partie inférieur d'oued Mellegue). **(Figure 8)**

La zone sur laquelle porte cette étude correspond aux trois sites de la région de Tébessa :

- Site 1 : représente l'amont d'oued Mellegue situé à la route nationale n°88 qui relie la commune de l'Aouinet et Meskiana.
- Site 2 : situé à 07 km en amont d'oued qui se trouve au centre de la ville de la commune de l'Aouinet.
- Site 3 : se situe à 35 km de l'Aouinet dans la commune d'Ouenza derrière la mine.

Les 3 stations ont été choisi à cause des effluents urbains et les rejets de la station d'épuration des eaux usées de l'Aouinet qui peuvent changer les caractéristiques physicochimiques et bactériologiques de l'eau.



(a)



(b)



(c)

Figure 8: Les stations de prélèvement d'Oued Mellegue, (a) station 1, (b) station 2, (c) station 3

4. Conditions de l'expérimentation

L'expérience a été réalisé en laboratoire de toxicologie, dans des conditions in vitro. Les lentilles d'eau *Lemna minor* utilisées dans cette étude ont été récoltées de la région d'El taref et ils ont été placés dans les eaux usées pour la réalisation de quatre lots suivants :

Les lots ont été placé comme suite :

Témoin T: *Lemna minor* + Eau distillée.

Station 1 S1 : *Lemna minor* + Eau usée de l'amont d'Oued Mellegue.

Station 2 S2 : *Lemna minor* + Eau usée du centre d'Oued Mellegue.

Station 3 S3 : *Lemna minor* + Eau usée de l'Aval d'Oued Mellegue.

Les plantes ont été séjourné pendant 15 jours avant la réalisation des dosages biochimiques : protéines, clorophylle a, chlorophylle b, chlorophylle a+b et sucre soluble.

Nous avons effectué trois répétitions pour les protéines, les sucres solubles et cinq répétitions pour la chlorophylle a, b et a+b. Qui ont été mesuré selon trois dates :

- La première date: après 15 jours de traitement.
- La deuxième date: après 20 jours de traitement.
- La troisième date: après 25 jours de traitement.

5. Solution de Knop

Nous avons utilisé la solution de Knop pour cultiver la plante *Lemna minor* dans des condition in vitro.

Cette dernière a été inventé par le chimiste allemand Wilhelm Knop (1817-1891). Il contient les 4 éléments dont les symboles chimiques mis à la suite forment le nom de celui-ci:

K (potassium), N (azote), O (oxygène), P (phosphore).

Le liquide de Knop est un engrais mis au point pour obtenir une croissance optimale des plantes en laboratoire. Il est composé de divers sels minéraux dissous dans l'eau : nitrate de calcium, nitrate de potassium, sulfate de magnésium, phosphate mono potassique, sulfate ferrique. **(Bruchhauser, 2010)**

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

Tableau 03: Composition chimique de solution de knop, utilisé pour la culture de *Lemna minor*.

Composition chimique	**Concentration g/L**
nitrate de calcium (CaNO3)	1
nitrate de potassium (KNO3)	0.25
sulfate de magnésium (MgSO4)	0.25
phosphate mono potassique ou dihydrogénophosphate (KH2 PO4)	0.25
sulfate ferrique (FeSO4)	0.001

- ✓ Les substances utilisées doivent être de qualité réactif. Le liquide est agité jusqu'à dissolution complète du contenu, Il existe différentes sortes de liquides de Knop. Ces différentes solutions ne possèdent pas de source de carbone. Elles permettent d'expérimenter les exigences des plantes en faveur de tel ou tel élément non carbonaté.

6. Méthode de dosage

6.1. Extraction et Dosage de la Chlorophylle

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

On pèse 100 mg des feuilles/racines de *lemna minor* sont broyés dans un mortier avec 2.5 ml d'acétone à 80% (CH_3COCH_3) et une pincée de carbonate de calcium ($CaCO_3$).

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

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

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

Chl a = 12,7 (DO663)-2,69(DO645)

Chl b = 22,9 (DO645)-4,86(DO663)

Chl a+ b = 8,02 (DO663) + 20,20 (DO645)

6.2. Dosage des protéines totales:

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

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

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

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

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

$$Y = b + a X$$

Y : densité optique

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

(a et b voire les annexes).

6.3 .Dosage des sucres solubles

Le dosage des sucres est réalisé selon la méthode de **(Schields et Burnet, 1960)** qui utilise l'anthrone en milieu sulfurique comme réactif (150 mg d'anthrone, 75 ml d'acide sulfurique et 25 ml d'eau distillée) et une solution mère de glucose à 50 µg/ml.

Nous prélevons 100 mg de matière végétale fraiche. On ajoute ensuite 3 ml d'éthanol à 80%, on laisse le tout à une température ambiante pendant 48h environ. On chauffe au bain marie à 70°C, pendant 30 min, et on prélève 2 ml d'extrait pour le dosage.

Le dosage des sucres totaux racinaires est effectué dans une fraction aliquote (100 µl). Les absorbances sont mesurées grâce à un spectrophotomètre (Jenway-6300) et la lecture est réalisée à une longueur d'onde de 585 nm.