

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Agronomiques



THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat es Sciences

Spécialité : Sciences Agronomiques

Option : Agronomie Saharienne

THEME

**Bioindication et bioaccumulation : Deux modèles biologiques pour
la détection de la pollution atmosphérique par les hydrocarbures
dans la région de Ouargla**

KHELIL Rahma

Devant le jury :

Présidente :	BISSATI-BOUAFIA Samia	Professeure	(Univ. Ouargla)
Directrice de thèse :	OULD EL HADJ-KHELIL Aminata	Professeure	(Univ. Ouargla)
Co-directeur de thèse :	DADAMOUSA Belkhir	Professeur	(Univ. Ghardaia)
Examineurs :	OULD EL HADJ Mohamed Didi	Professeur	(Univ. Ouargla)
	ESNAULT Marie Andrée	MCA-HDR	(Univ. Rennes 1)
	CABELLO-HURTADO Francisco	MCA-HDR	(Univ. Rennes 1)

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Je remercie tout d'abord **ALLAH** le tout Puissant et Miséricordieux de m'avoir donné la santé, la patience et la volonté pour réaliser cette thèse.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi Arides et aux laboratoires pédagogiques de l'université Kasdi Merbah-Ouargla, à l'UMR Ecobio 6553 et l'UMR Geosciences 118 de l'université de Rennes1. Le financement étant assuré dans le cadre de la coopération Algéro-Française par un projet Tassili et une bourse BAF. Je remercie les responsables de m'avoir accueillie et permis de réaliser mes expérimentations.

Je remercie mes deux directrices de thèse Pr. **Aminata Ould El Hadj-Khelil**, Professeure à l'université Kasdi Merbah-Ouargla et **Marie-Andrée Esnault**, MCA-HDR à l'université de Rennes 1, à l'origine du projet sur lequel est basé cette thèse, pour m'avoir fait partager leur connaissances dans leurs domaines de compétences, pour leurs conseils, leur disponibilité et leur investissement dans ce travail de recherche et dans la rédaction de la thèse et des articles.

J'adresse, en particulier mes remerciements les plus sincères à **Marie-Andrée Esnault** qui a guidé, suivi le déroulement et l'exécution du travail de cette thèse et sa rédaction à Rennes en me prodiguant toute aide possible et en me consacrant son temps précieux. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude et ma reconnaissance.

Je remercie Monsieur **Dada Moussa Belkeir**, Professeur à l'Université de Ghardaia pour ses conseils et les moyens qu'il a mis à ma disposition. Je lui suis reconnaissante d'avoir initié cette thèse et d'avoir accepté de la codiriger.

A présent, je voudrais exprimer ma plus grande gratitude aux membres de jury qui ont eu l'amabilité de lire et de juger ce manuscrit de thèse. Merci tout particulièrement au Pr. **Samia Bissati-Bouafia**, Professeure à l'université Kasdi Merbah-Ouargla pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de soutenance. Qu'il me soit permis de lui exprimer ma profonde reconnaissance. J'adresse également mes vifs remerciements à Dr. **Mohamed Didi Ould El Hadj**, Professeur à l'université Kasdi Merbah-Ouargla et Dr. **Francisco Cabello-Hurtado**, MCA-HDR à l'université de Rennes1 pour leur disponibilité et leurs conseils précieux et pour avoir accepté d'examiner mon travail. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance et de mes sentiments respectueux.

J'exprime toute ma reconnaissance à toutes les personnes qui, à un moment ou un autre, se sont intéressées à mes recherches. Parmi celles-ci je cite notamment tout le personnel du Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-Arides (Ecosys) de l'université de Ouargla, du Laboratoire des Mécanismes à l'origine de la biodiversité (MOB) de l'université de Rennes 1 et du Laboratoire de Géochimie des Eaux et des Interfaces de l'université de Rennes 1 et plus particulièrement Dr. **Emilie Jardé**, Chargée de recherches au CNR -UMR Géosciences 118 de l'Université de Rennes 1, pour ses orientations, ses conseils et son aide concernant les analyses des hydrocarbures par GC-MS et les différentes

corrections. Un grand merci à tous mes collègues des trois laboratoires pour l'ambiance sympathique qu'ils ont su créer tout au long de ces années de thèse.

Enfin, rien n'aurait été possible sans la présence et le soutien de mon entourage proche qui a contribué à l'aboutissement de mon cursus universitaire. Je tiens à remercier mes parents, mes frères et sœurs pour leur soutien et leurs encouragements, mon mari de m'avoir soutenu pendant les moments difficiles, ma grande famille, mes amis de Rennes, d'Algérie et d'ailleurs.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de mes travaux de thèse à différentes étapes de sa réalisation et à sa finalisation tant attendue.

Dédicaces

*A ceux qui m'ont donné sans rien en retour,
A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles,
Et ceux à qui je dois tant.*

*A ma très chère mère, la source de tendresse et l'exemple du dévouement
A mon très cher père pour son support continu.*

A mes chers frères, mes belles sœurs et leurs enfants.

A mes très chères sœurs, mes beaux-frères et leurs enfants.

A mon mari pour son amour, son dévouement et son respect.

A ma belle famille

*A la mémoire de ma sœur Khadidja.
A la mémoire de mon oncle El Kharchi*

*A toute ma famille,
A tous mes ami(e)s.*

Je vous dois tous mes succès, tous mes bonheurs et toutes mes joies.

*Que Dieu le tout puissant vous procure continuellement santé, bonheur et
tranquillité.*

*Je suis très heureuse et fière de votre présence à mes côtés.
J'espère vous honorer par le titre du Docteur.*

Rahma.

Liste des figures

Figures	pages
Figure 1 : Illustration des différents types de source géologique du gaz naturel.	13
Figure 2 : Répartition de la consommation par secteur.	14
Figure 3 : Schéma classique d'un champ pétrolier et de son exploitation.	15
Figure 4 : Structure des 16 HAP retenus par Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis et déclarés polluants prioritaires.	20
Figure 5 : L'absorption des polluants dans les plantes.	29
Figure 6 : Les principales voies de prélèvement des molécules organiques par les plantes.	30
Figure 7 : Schéma global du devenir des HAP dans les sols.	31
Figure 8 : Représentation schématique des couches de la cuticule au-dessus des cellules de l'épiderme.	33
Figure 9 : Les observations des effets des polluants sur les feuilles à différents niveaux.	36
Figure 10 : Les enzymes antioxydants et leurs localisation dans la cellule.	40
Figure 11 : Les différentes étapes permettant la détoxification des xénobiotiques dans les plantes en fonction des compartiments cellulaires.	42
Figure 12 : Répartition des palmiers en Afrique et au Moyen-Orient.	49
Figure 13 : Répartition de la culture du palmier dattier dans le monde (en % de palmiers plantés).	50
Figure 14 : Le palmier dattier.	54
Figure 15 : Le palmier dattier.	55
Figure 16 : Les différentes zones du système racinaire du palmier.	56
Figure 17 : Une Palme.	57
Figure 18 : Situation géographique de Ouargla en Algérie.	61
Figure 19 : Variation des températures lors des périodes de récolte.	67
Figure 20 : Variation de l'humidité lors des périodes de récolte.	68
Figure 21 : Variation de la vitesse des vents lors des périodes de récolte.	68
Figure 22 : Analyse de l'orientation principale du vent de la zone d'échantillonnage.	69
Figure 23 : Position des 3 stations de récolte autour de Ouargla.	71
Figure 24 : Illustration de la station de Haoud Berkaoui (HBK).	72

Figure 25 : Environnement de la station de Ain Moussa (AM).	73
Figure 26 : Illustrations de de la station de Hassi Ben Abdellah (HBA).	74
Figure 27 : Hassi Messaoud et son environnement.	75
Figure 28 : Illustrations montrant l'installation des filtres dans les palmeraies.	76
Figure 29 : Le plan d'échantillonnage type d'une station.	78
Figure 30 : L'extracteur automatique ASE 200.	89
Figure 31 : Le rotavapor P-12 connecté à la pompe à vide V-700.	90
Figure 32 : Les étapes de fractionnement sur gel de silice et les fractions récupérées.	91
Figure 33 : Schéma de fonctionnement d'un spectromètre de masse.	93
Figure 34 : Morphologie et anatomie des folioles en coupe transversale.	110-111
Figure 35 : Teneurs en pigments (chlorophylles <i>a</i> et <i>b</i> , et caroténoïdes) et leurs rapports dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées.	114
Figure 36 : Capacité antioxydante des palmes, en TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity). Dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées.	115
Figure 37 : L'activité Superoxyde dismutase (SOD) dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées.	116
Figure 38 : Activité de la Guaiacol peroxydase (GPX) dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées.	117
Figure 39 : Activité de la Glutathion Réductase (GR) dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées.	118
Figure 40 : Activité de Glutathion peroxydase dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées.	119
Figure 41 : Activité Glutathion S-transférases (GST) dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées.	119
Figure 42 : ACP réalisées à partir des 9 variables quantifiées pour les 5 couronnes des 27 échantillons analysées.	121
Figure 43 : ACP réalisées à partir des 9 variables quantifiées pour chacune des 5 couronnes des 27 échantillons analysées.	123
Figure 44 : Concentrations relatives en phrénanthrène, fluoranthène et pyrène par rapport à Phe-d10 mesurées sur les filtres des trois stations d'échantillonnage.	131

Figure 45 : Teneur en phénanthrène, fluoranthène et pyrène (en ng/g) dans les sols des stations de Aïn Moussa (AM), Haoud Berkaoui (HBK) et Hassi Ben Abdallah (HBA).	132
Figure 46 : Teneurs en phénanthrène, fluoranthène et pyrène dans les sables des stations de Aïn Moussa, Haoud Berkaoui et Hassi Ben Abdallah en fonction de l'orientation.	133
Figure 47 : Teneurs moyennes du total des HAP dans les stations de Aïn Moussa (AM), Haoud Berkaoui (HBK) et Hassi Ben Abdallah (HBA).	134
Figure 48 : Teneurs en pigments et leurs rapports dans les 3 stations étudiées.	141
Figure 49 : Les activités antioxydantes des 3 stations étudiées.	142
Figure 50 : Quantification du malondialdéhyde (MDA) des 3 stations étudiées.	143
Figure 51 : Activité des Glutathion S-transférases (GST) des 3 stations étudiées.	144
Figure 52 : Teneur en HAP et leur somme des palmes des 3 stations étudiées.	145
Figure 53 : Les courbes de tendances entre les teneurs en pigments des palmes et leur teneur en HAP de la station HBK.	147
Figure 54 : Les courbes de tendances entre les teneurs en pigments des palmes, la GR et leur teneur en HAP de la station HBK.	149
Figure 55 : Analyse en composantes principales réalisées à partir de l'ensemble des données de la couronne 4 pour les 45 palmiers.	152
Figure 56 : Analyses en composantes principales au sein de chaque station prenant en compte les données des palmiers placés aux quatre points cardinaux de la station (sans ceux du centre de la palmeraie).	154
Figure 57 : Comparaison des teneurs moyennes en HAP dans les palmes des 3 stations d'échantillonnage entre les palmiers du nord et du sud à ceux de l'est et de l'ouest.	155
Figure 58 : Comparaison des teneurs moyennes en pigments dans les palmes des 3 stations d'échantillonnage entre les palmiers du nord et du sud à ceux de l'est et de l'ouest.	157
Figure 59 : Sites de production des formes réactives de l'oxygène (ROS) intra-organites dans la cellule végétale.	162
Figure 60 : Voies d'exposition aux HAP des plantes vasculaires <i>in situ</i> .	163
Figure 61: Structures de cire épicuticulaires de palmier dattier feuille.	168
Figure 62: La composition chimique des cires du palmier dattier en % du total des	170

cires.	
Figure 63: Les principaux composants des 6 extraits de cire du palmier dattier.	171
Figure 64 : Teneur des cires épicuticulaires en HAP.	173
Figure 65: Observation en microscopie électronique à balayage (MEB) des formes d'origine organique à la surface des feuilles du palmier dattier au grossissement x3,000 et x5,000.	174
Figure 66: Les photos d'essais de pulvérisation du pétrole à la surface des palmes x1,000 et 10,000.	175
Figure 67: Observations au MEB des cristaux de sels à la surface des palmes, x1,000.	176
Figure 68: Diagramme schématique montrant la localisation du phénanthrène dans les feuilles d'épinard (gauche) et de maïs (droite) après 12 jours d'exposition à une atmosphère contaminée par le phénanthrène.	181

Liste des tableaux

Tableaux	pages
Tableau 1 : Consommation de pétrole dans le monde en 2012.	10
Tableau 2 : Production et réserve de pétrole brut dans le monde en 2012.	11
Tableau 3 : Évolution de la production de dattes par pays (Quintaux) de l'année 1998 à 2003.	50
Tableau 4 : Evolution des superficies des palmeraies (ha) et de la production des dattes (Qx) en Algérie de 1990 à 2003.	51
Tableau 5 : Répartition du potentiel phoenicicole algérien (2001).	51
Tableau 6 : Historique du champ pétrolier de Hassi Messaoud.	63
Tableau 7 : Historique du champ pétrolier de Haoud Berkaoui.	64
Tableau 8 : Étude climatique de la période d'échantillonnage de novembre 2011 à novembre 2012.	66
Tableau 9 : Caractéristiques climatiques sur la période d'échantillonnage (2011/2012).	67
Tableau 10 : Contribution les plus fortes des variables sur les axes 1 et 2, des ACP réalisées pour chaque couronne.	124
Tableau 11 : Teneurs en HAP dans les rejets atmosphériques dans les Sahara Algérien, le Nord de l'Algérie et l'Europe.	135
Tableau 12 : Teneur en HAP et la somme des HAP des sols sahariens et d'autres sols sableux.	137
Tableau 13 : Sources anthropiques des HAP et les valeurs typiques du rapport Flu/Pyr.	138
Tableau 14 : Coefficients de corrélation entre les marqueurs biologiques mesurés dans les palmes et les teneurs en HAP pour la station HBK.	146
Tableau 15 : Coefficients de corrélation entre les marqueurs biologiques mesurés dans les palmes et leur teneur en HAP pour la station AM.	148
Tableau 16 : Coefficients de corrélation entre les marqueurs biologiques mesurés dans les palmes et leur teneur en HAP pour la station HBA.	150
Tableau 17 : Bilan des résultats significatifs obtenus par comparaison des marqueurs biologiques entre stations.	158
Tableau 18 : Comparaison des teneurs en 3 HAP majeures de différentes plantes	164

provenant de différents milieux.	
Tableau 19: Principaux composants parvenant des cires du palmier dattier en ng.cm ² .	171
Tableau 20 : Teneurs en HAP (ng.g ⁻¹ de palme sèche) dans les feuilles et dans les cires épicuticulaires des palmes du palmier dattier.	180

Sommaire

Introduction générale	5
Chapitre 1: Pollution atmosphérique par les hydrocarbures et effets biologiques sur les végétaux.	10
1. Les hydrocarbures.....	10
1.2. Origine des hydrocarbures.....	12
1.2.1. Les hydrocarbures d'origine naturelle	12
1.2.2. Les hydrocarbures d'origine anthropique	14
1.3. Classification des hydrocarbures	15
1.3.1. Les hydrocarbures aliphatiques.....	16
1.3.2. Les hydrocarbures aromatiques	17
1.3.3. Les composés polaires.....	18
1.3.4. Les asphaltènes	18
1.4. La pollution atmosphérique par les HAP.....	18
1.4.1. Les HAP toxiques	18
1.4.2. Les sources de la pollution par les HAP	21
1.4.3. Transformation des HAP dans l'atmosphère	21
2. La biosurveillance	22
2.1. La biosurveillance végétale	22
2.1.1. Définition et méthodes.....	22
2.1.2. Les outils de la biosurveillance	24
2.2. La bioindication végétale.....	26
2.2.1. Les modèles	26
2.2.2. L'utilisation des lichens.....	27
2.2.3. L'utilisation des arbres et arbustes	28
3. Les effets de la pollution par les hydrocarbures chez les végétaux	29
3.1. La pénétration des hydrocarbures dans la plante	29
3.1.1. Les cuticules et cires épicuticulaires des feuilles	32
3.1.2. La pénétration des polluants atmosphériques	33
3.2. Les effets physiologiques.....	35
3.2.1. Effets sur la croissance et les voies de signalisation hormonales	37
3.2.2. Effets sur la reproduction.....	38
3.2.3. Effets sur la nutrition	38
3.2.4. Effets sur les membranes	38
3.2.5. Effets sur la photosynthèse	39
3.2.6. Génération d'un stress oxydant.....	39

3.1.4	Élimination des hydrocarbures dans la plante.....	41
4.	Les modèles biologiques utilisés.....	43
4.1.	Les lichens	43
4.1.1.	Structure et fonctionnement des lichens	43
4.1.2.	Réponse des lichens à la pollution et utilisation en bio-indication.....	45
4.2.	Le palmier dattier.....	47
4.2.1.	Généralités	47
4.2.2.	Répartition géographique.....	48
4.2.3.	Cycle végétatif	52
4.2.4.	Morphologie du palmier dattier	53
4.2.5.	Ecologie du palmier dattier.....	58
4.2.6.	Le palmier dattier et la bioindication	59
Chapitre 2:	Matériel et méthodes.....	61
1.	Présentation de la zone d'étude	61
1.1.1.	Hassi Messaoud.....	62
1.1.2.	Haoud Berkaoui	63
1.2.	Présentation du cadre géologique	64
1.2.1.	Cadre géomorphologique	64
1.2.2.	Cadre géologique et hydrogéologique	65
1.3.	Présentation climatique.....	66
2.	Échantillonnage et récolte du matériel.....	69
2.1.	Les modèles végétaux.....	69
2.2.	Choix des stations	70
2.3.	Échantillonnage	76
2.4.	Conservation du matériel.....	79
3.	Méthodes analytiques	79
3.1.	Observation des surfaces foliaires	79
3.1.1.	Microscopie optique.....	79
3.1.2.	Microscopie électronique à balayage (MEB).....	79
3.2.	Mesures sur les marqueurs biologiques.....	80
3.2.1.	Extraction des protéines solubles	80
3.2.2.	Dosage des protéines.....	81
3.2.3.	Mesure de l'activité gaïacol peroxydase (GPX) EC 1.11.1.7	81
3.2.4.	Mesure de l'activité glutathion disulfide réductase (GR) EC 1.8.1.7	82
3.2.5.	Mesure de l'activité superoxyde dismutase (SOD) EC 1.15.1.1.....	82
3.2.6.	Mesure de l'activité glutathion peroxydase (GSH-PX) EC 1.11.1.9	84
3.2.7.	Mesure de l'activité glutathion-S-transférase (GST) EC 2.5.1.18.....	85

3.2.8. Détermination des produits de peroxydation lipidique (TBARs-MDA)....	85
3.2.9. Mesure de la capacité antioxydante totale	87
3.2.10. Dosage des pigments.....	87
3.3. Extraction des cires cuticulaires	88
3.4. Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)	88
3.5. Traitement des données	94
3.5.2. Analyses statistiques	94
Chapitre 3 : Résultats et discussions	96
1. Biosurveillance de la pollution atmosphérique à l'aide d'un lichen : <i>Xanthoria</i> <i>parietina</i>	96
2. Variabilité anatomique et métabolique des couronnes du palmier dattier	108
2.1. Anatomie des feuilles du palmier dattier	109
2.2. Variabilité des marqueurs métaboliques en fonction de l'âge des couronnes ...	113
2.2.1. Évolution de la teneur en pigments en fonction de l'âge des palmes	113
2.2.2. Evolution des activités antioxydantes en fonction de l'âge des palmes	116
2.2.3. Glutathion-S-transférase (GST).....	120
2.2.4. Bilan de l'analyse des marqueurs biologiques.....	121
2.2.5. Analyse globale de l'ensemble des paramètres	121
2. 3. Discussion.....	125
3. Évaluation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans l'air et le sol.....	131
3.1. Occurrence et quantification des HAP dans l'air.....	131
3.2. Occurrence et quantification des HAP dans les sols.....	132
3.3. Discussion.....	135
4. Comportement des marqueurs métaboliques en fonction de la teneur en HAP dans les palmes de la couronne 4.....	141
4. 1. Comparaison des 3 stations.....	141
4.1.2. Teneur des palmes en HAP.....	145
4.1.3. Recherche de corrélation entre les valeurs des marqueurs biologiques et les teneurs en HAP des palmes	146
4. 2. Effet de la position des palmiers dans la palmeraie.....	152
4.2.1. Analyse en composantes principales globale.....	152
4.2.2. Comparaison des palmiers au nord et sud versus est et ouest	154
4.3. Bilan de l'analyse des palmes de la couronne 4	159
4.4. Discussion.....	160
5. Dépôts des HAP sur les palmes	167
5.2. Composition chimique des cires épicuticulaires.....	171
5.3. Structures organiques observées sur les palmes	174

5.4. Recherche des HAP dans les cires épicuticulaires.....	176
Conclusion générale.....	183
Références Bibliographiques	188

Introduction générale

Introduction générale

L'atmosphère est un élément essentiel de notre écosystème. Il joue un rôle déterminant pour la vie sur Terre en intervenant notamment dans la régulation de la température de la surface, de la filtration des rayonnements ultraviolets ou dans la formation des précipitations. Sa qualité a donc un impact direct sur le fonctionnement des organismes vivants. Pourtant, la qualité de l'atmosphère s'est considérablement dégradée en raison de l'industrialisation et l'urbanisation qui se sont fortement accrues avec le développement de la société de consommation et la mondialisation.

La pollution de l'environnement, notamment la pollution atmosphérique, est donc devenue un problème majeur à prendre en compte. La problématique de la pollution atmosphérique et les débats sur le changement climatique global sont de plus en plus au cœur de l'actualité notamment lors d'épisodes climatiques exceptionnels (canicule, sécheresse, inondations, cyclones...) et une prise de conscience collective de la gravité de la situation se fait jour.

Depuis l'arrivée de l'ère industrielle au XIX^{ème} siècle, la composition de l'atmosphère a largement évolué reflétant les modifications des activités humaines, sources d'émissions de substances vers l'atmosphère. Cependant, la législation internationale relative à la qualité de l'air n'a été mise en place que tardivement. En effet, c'est seulement au cours des années 1980 que des directives concernant la qualité de l'air et sa surveillance ont été établies aux niveaux européen et mondial. La plupart des pays ont mis en place des normes qui s'appuient sur les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) afin de favoriser la réduction de la pollution (OCDE, 2012).

Parmi les nombreuses définitions de la pollution atmosphérique, celle-ci peut être définie, comme « *L'introduction par l'homme de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre la santé humaine en danger, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer les nuisances olfactives excessives* » (loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie n°96-1236 du 30 décembre 1996) (JORF, 1996).

Dans l'atmosphère, les polluants atmosphériques sont de différentes natures et de concentrations diverses. Les formes de pollution de l'air extérieur les plus toxiques au niveau de la santé humaine sont les formes particulières présentes dans l'air et l'ozone de la troposphère (OCDE, 2012). Seuls 2 % de la population urbaine vivait dans une atmosphère dont la qualité de l'air était sous le seuil de particule (PM₁₀ soit les particules de diamètre

inférieur à 10 µm inhalables) fixé par l’OMS. L’OCDE prévoit une stabilité des teneurs au sein des pays de l’OCDE et une augmentation dans les BRICS (*Brazil, Russia, India, China, South Africa*) et le reste du monde (OCDE, 2012). Certains de ces polluants sont étudiés et suivis systématiquement depuis les années 1960, comme le dioxyde de carbone (CO₂), le dioxyde de soufre (SO₂), les oxydes d’azote (NO_x), certains éléments traces métalliques comme le plomb (Pb) ou le mercure (Hg). D’autres polluants sont suivis depuis les années 1990, comme les gaz à effet de serre (CH₄, N₂O), les composés organiques volatils (COV) les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), l’ozone (O₃) et les organochlorés (dioxines et furannes).

La famille des HAP regroupe plus d’une centaine de molécules de poids moléculaire élevé, constituées uniquement d’atomes de carbone et d’hydrogène assemblés en cycles benzéniques fusionnés. Ils sont présents naturellement mais sont aussi liés aux activités humaines notamment à l’activité pétrolière. Ce sont des polluants prioritaires du fait de leur potentiel toxique, mutagène et cancérigène et de leur persistance dans l’environnement (EPA, 2008). Vingt et un d’entre eux, comptant entre deux et sept cycles aromatiques, doivent être suivis en priorité dans l’environnement du fait de leur toxicité selon les recommandations de l’OMS, l’EPA, et l’Union Européenne. Sept sont en liste principale : l’acénaphthène, l’acénaphthylène, l’anthracène, le benzo(g,h,i)perylène, le fluorène, le phénanthrène et le pyrène.

L’AIE (Agence Internationale de l’Energie) avait établi des prévisions de croissance de la demande pétrolière mondiale d’environ 1 % par an sur la période 2000-2030 pour atteindre un besoin de 120 millions de barils par jour (sur une hypothèse d’une croissance mondiale de 3 % en moyenne par an sur la période 2000 à 2030). Même dans le contexte actuel d’une réduction de la demande par rapport à ces prévisions du fait du développement d’autres énergies, l’augmentation de la production d’hydrocarbures entraînera une augmentation de la contamination atmosphérique par les HAP. En effet, leur émission dans l’atmosphère est majoritairement due à la combustion incomplète des produits pétroliers et du bois. La contribution des sources naturelles telles que les feux de forêt et les éruptions volcaniques n’a d’importance que localement (Edwards, 1983 ; Wild et Jones, 1995).

L’analyse directe des polluants émis dans l’atmosphère par les méthodes physico-chimiques est très onéreuse ; elle ne permet pas de connaître l’impact et les effets sur le milieu vivant. On a donc recherché d’autres moyens de biosurveillance des effets des polluants émis dans l’atmosphère sur les écosystèmes environnants. Le recours aux

organismes vivants présente l'intérêt d'observer la vie sous ses différentes formes et permet de servir, dans les conditions de perturbation, de signal d'alarme. Le développement de la bioindication ouvre ainsi la voie à une surveillance plus large et écologique intégrant les effets sur l'environnement grâce à des organismes sentinelles.

"La biosurveillance de la qualité de l'air consiste à l'utilisation des réponses à tous niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, physiologique...) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement pour en suivre l'évolution et avoir une estimation quantitative de l'exposition des végétaux à un ou plusieurs polluants" (Garrec et Van Haluwyn, 2002).

De nombreuses études ont examiné les sources de distribution et d'accumulation des HAP dans le sol, les sédiments et l'atmosphère. Au niveau de la biosurveillance, beaucoup de ces techniques recherchent une corrélation quantitative de la concentration des HAP dans l'air et les plantes (Kaupp *et al.*, 2000 ; Lehndorff et Schwark, 2004; Tao *et al.*, 2004, 2006 ; Zelano *et al.*, 2006 ; Lin *et al.*, 2007 ; Orecchio, 2007; Prajapati et Tripathi, 2008 ; Sharma et Tripathi, 2008; Zhu *et al.*, 2008 ; Lehndorff et Schwark, 2009a et b). Un certain nombre de ces études tentent de modéliser l'accumulation potentielle de ces polluants dans les tissus des végétaux (Trapp *et al.*, 1994; Tao *et al.*, 2006; Yang et Zhu, 2006; Lin *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2007; Gao et Collins, 2009; Collins et Finnegan, 2010).

De nombreux végétaux peuvent être utilisés pour la biosurveillance de la qualité de l'air, soit parce qu'ils présentent des réactions biologiques caractéristiques en réponse à certains polluants soit parce qu'ils accumulent dans leurs tissus certains des composés toxiques qui se trouvent dans l'air qui les entoure (Castell, 2009). L'utilisation d'espèces végétales, témoins de l'état de contamination de l'air est un outil très intéressant au niveau local. Si certaines espèces comme les lichens sont connus depuis longtemps pour être de bons indicateurs sous milieu tempéré, il n'en est pas de même sous tous les climats. Le Sahara présente un climat sous lequel le nombre d'espèces végétales disponibles pour ce type d'étude est réduit.

L'Algérie est un pays producteur de pétrole et de gaz et sa production en 2012 était de 1,8 % de la production mondiale (Insee, 2013). Outre la production liée à l'activité des villes, la Wilaya de Ouargla sur laquelle se trouvent les grands champs pétroliers est donc soumise à une pollution atmosphérique liée à l'exploitation des ressources pétrolières notamment leur extraction. Notre objectif était donc de rechercher un modèle biologique végétal pouvant être le témoin de cette pollution. Après avoir évalué la possibilité d'acclimater des lichens du nord de l'Algérie aux conditions climatiques sahariennes de la région de Ouargla, l'essentiel du

travail a été réalisé sur une espèce locale bien adaptée au climat de type désertique et largement présente : le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*). Ce modèle végétal présente l'intérêt d'être une espèce de grande taille, avec une grande surface foliaire, à longue durée de vie. Du fait de sa taille, cette espèce est donc susceptible de recevoir des particules atmosphériques et est ainsi soumise à un stress chronique ce qui peut permettre aux individus de développer des mécanismes d'adaptation. La pérennité des palmes du palmier dattier, sa grande répartition sur le territoire saharien, son adaptation aux conditions défavorables de sécheresse et de chaleur, et surtout sa présence à proximité des champs pétrolifères, font de lui une espèce clé dans notre région d'étude qui pourrait constituer un bon modèle pour la biosurveillance de la qualité de l'air. Il pourrait ainsi être utilisé comme une sentinelle de l'état de contamination environnementale.

Ce travail de recherche a donc porté sur l'évaluation de l'impact de la pollution atmosphérique liée aux HAP dans la région de Ouargla par le moyen d'espèces bioindicatrices, à savoir les lichens, qui réagissent à des doses infimes de polluants et permettent ainsi de caractériser de façon pratique et sûre l'état d'un écosystème, et le palmier dattier, une espèce bioaccumulatrice, pérenne, locale et résistante aux conditions climatiques de la zone par opposition aux lichens bioindicateurs qui sont moins adaptés au climat. Pour cela le travail a abordé les points suivants :

- L'évaluation de la possibilité d'utiliser un lichen en zone Saharienne pour estimer la qualité de l'air
- La quantification des HAP au niveau de l'air, du sol et dans les palmes du palmier dattier
- La recherche de liens entre les teneurs en HAP et leurs effets sur le palmier dattier au travers de certains marqueurs biologiques : teneur en pigments et métabolites cellulaires liés au stress oxydant généré par les HAP comme les activités enzymatiques et la capacité antioxydante.

Dans un premier chapitre, nous ferons un point bibliographique sur les différents aspects abordés dans cette thèse : origine, classification et pollution engendrée par les hydrocarbures ; des éléments de compréhension de ce qu'est la biosurveillance végétale, puis une synthèse des connaissances sur l'effet de la pollution par les HAP sur les végétaux. Enfin, nous présenterons les modèles biologiques utilisés.

Le deuxième chapitre présente le matériel et les méthodes utilisées, la zone d'étude, les méthodes d'échantillonnage, de prélèvement et de récolte, les techniques d'analyses des échantillons et le traitement des données.

Le troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats et leur discussion. Il se découpe en plusieurs parties. La première partie évalue la possibilité d'utiliser un lichen comme indicateur de la pollution dans la zone d'étude pour la réponse des lichens à la pollution. La deuxième expose la variabilité anatomique et métabolique des couronnes des palmes afin de choisir la couronne la plus judicieuse. Dans la troisième partie, nous avons quantifié les HAP dans l'air, le sol et les palmes. Ensuite, nous avons recherché des corrélations entre le comportement des marqueurs métaboliques et les teneurs en HAP. Enfin, un dernier point porte sur le dépôt des HAP sur les cires épicuticulaires des palmes.

Chapitre 1 :
Pollution atmosphérique par
les hydrocarbures et effets
biologiques sur les végétaux

Chapitre 1 : Pollution atmosphérique par les hydrocarbures et effets biologiques sur les végétaux.

1. Les hydrocarbures

1.1. La consommation mondiale en hydrocarbures

Les hydrocarbures représentent aujourd'hui plus de 60% de l'approvisionnement en énergie primaire des 6,5 milliards d'habitants de la planète. Ils se révèlent ni facilement ni massivement remplaçables. En effet, en raison du développement lent des énergies alternatives, les hydrocarbures resteront prédominants dans les prochaines décennies (Yves, 2009). La consommation de pétrole en 2012 était de 3131 millions de tonnes (Tableau 1). Elle est en croissance régulière, avec une augmentation mondiale moyenne de 1,2 % depuis 1973 (Insee, 2013). Dans les années à venir, l'augmentation de la population mondiale et l'accroissement du revenu moyen par habitant devraient entraîner une hausse de la demande mondiale d'énergie et se traduire par des besoins grandissants en hydrocarbures.

Tableau 1 : Consommation de pétrole dans le monde en 2012 (Insee, 2013).¹

	Millions de tonnes	%
Etats Unis	820	19,8
Chine	484	11,7
Japon	218	5,3
Inde	172	4,2
Russie	148	3,6
Allemagne	112	2,7
Canada	104	2,5
France	81	2
Italie	64	1,6
Royaume-Uni	69	1,7
Rest du monde	859	45
Total	3131	

Conséquence directe, le pétrole, première source d'énergie, a connu une progression ininterrompue de son extraction pendant plus d'un siècle. La production mondiale a

¹ http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg_id=98&ref_id=CMPTEF11336

atteint 3913 millions de tonnes en 2012 (Insee, 2013) dont 73 millions pour l'Algérie (Tableau 2). L'exploitation humaine des gisements de pétrole n'a cessé d'augmenter depuis le début du siècle dernier. Toutefois, l'extraction, le transport et l'utilisation de cette forme d'énergie sont des sources de pollution (accidentelle et chronique) pour l'environnement pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème (Soltani, 2004).

Tableau 2 : Production et réserve de pétrole brut dans le monde en 2012 (Comité professionnel du pétrole ; Oil and Gas Journal).

	Production en 2012		Réserves prouvées au 1er janvier 2013	
	millions de tonnes	(%)	millions de tonnes	(%)
Amérique du Nord	525,9	13,1	26 438	11,8
dont :				
Canada	119,3	3,0	23 616	10,6
États-Unis	406,6	10,1	2 822	1,3
Amérique Latine	505,5	12,5	45 865	20,5
dont :				
Mexique	137,4	3,4	1 400	0,6
Venezuela	139,7	3,5	40 596	18,2
Afrique	451,6	11,2	17 406	7,8
dont :				
Algérie	73,0	1,8	1 664	0,7
Libye	71,1	1,8	6 550	2,9
Nigeria	116,2	2,9	5 075	2,3
Europe	822,4	20,4	17 859	8,0
dont :				
Norvège	85,5	2,1	732	0,3
Royaume-Uni	44,5	1,1	426	0,2
CEI (1)	660,1	16,4	16 217	7,3
dont Russie	521,8	13,0	10 914	4,9
Proche-Orient	1 328,6	33,0	109 435	49,0
dont :				
Arabie saoudite	547,0	13,6	36 550	16,4
Irak	152,4	3,8	19 284	8,6
Iran	174,9	4,3	21 089	9,4
Koweït	152,5	3,8	14 188	6,3

	Production en 2012		Réserves prouvées au 1er janvier 2013	
	millions de tonnes	(%)	millions de tonnes	(%)
Extrême-Orient et Océanie	394,4	9,8	6 442	2,9
dont Chine	207,5	5,2	3 490	1,6
Total monde	4 028,4	100,0	223 445	100,0
dont OPEP (2)	1 778,2	44,1	164 353	73,6

(1) : communauté des États indépendants (11 des 15 anciennes républiques soviétiques).

(2) : Arabie saoudite, E.A.U., Irak, Iran, Koweït, Qatar, Algérie, Angola, Libye, Nigéria, Équateur, Vénézuéla.

1.2. Origine des hydrocarbures

Les hydrocarbures ont une origine naturelle et anthropique.

1.2.1. Les hydrocarbures d'origine naturelle

Les deux principales sources naturelles actuelles d'hydrocarbures sont, en premier, le pétrole brut et en second le charbon. Les gaz naturels que l'on peut rattacher au pétrole brut par leur origine géologique constituent eux aussi une ressource importante en hydrocarbures (Figure 1). Enfin, les êtres vivants, animaux et plantes, constituent eux aussi une ressource pour certains hydrocarbures particuliers. Les sables et les schistes bitumineux peu exploités constituent des réserves d'hydrocarbures dont l'exploitation peut être rentable dans certaines circonstances économiques (Lefebvere, 1978 ; Lescole, 2002 ; Rohmer et Vandecasteele, 2005 ; Pointard, 2008).

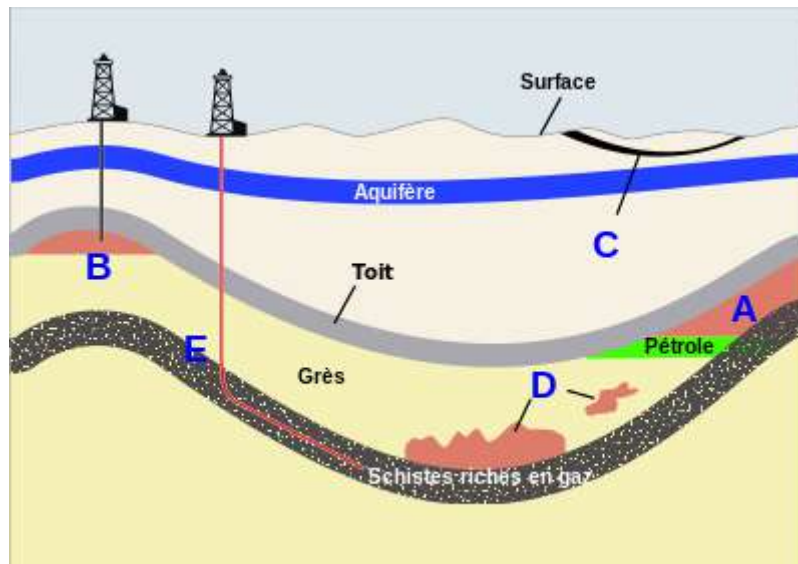


Figure 1 : Illustration des différents types de source géologique du gaz naturel (selon Wikipedia, 2014).

- A. Gaz naturel associé (à un réservoir de pétrole)
- B. Gaz naturel conventionnel non associé
- C. Gaz de couche (ou gaz de houille)
- D. Gaz de « réservoir ultracompact »
- E. Gaz de schiste

Les hydrocarbures sont majoritairement des restes fossilisés d'organismes vivants, provenant des forêts préhistoriques et des fonds océaniques datant de plus de 500 millions d'années. Les plantes et les animaux ont été enfouis sous plusieurs couches de sédiments décomposés sous l'action de la pression et de la température. Mêlés à divers sédiments, ils ont subi une lente transformation donnant la roche mère. Cette transformation a commencé par la transformation des constituants en boue putride dite "sapropel" en présence de bactéries. Ensuite, d'autres bactéries anaérobies sont intervenues dans la polymérisation des acides gras non saturés, en hydrocarbures et cétones. Tous ces produits, intimement mêlés, se sont dissouts dans les acides gras saturés pour donner le "propétrole". Celui-ci a ensuite été entraîné au fond du bassin de sédimentation pour donner finalement le "pétrole" par le processus d'une hydrogénation lente en absence d'oxygène (Dalemont, 1998). C'est au sein de cette roche que les substances organiques se sont transformées en hydrocarbures liquides et gazeux. Ces hydrocarbures se sont accumulés dans des roches poreuses pour former les gisements de pétrole et de gaz naturel (Roussel, 2001).

On trouve également des hydrocarbures d'origine naturelle dans les organismes terrestres et marins. Ils peuvent être synthétisés par les organismes vivants, provenir de leur

nourriture ou encore modifiés par ingestion (Louisot, 1983). Parmi ceux-ci, on peut citer : l'isoprène et les terpènes.

1.2.2. Les hydrocarbures d'origine anthropique

Les hydrocarbures de synthèse sont les produits de la distillation des pétroles bruts conduisant à faire apparaître des combinaisons inexistantes et intéressantes pour leurs propriétés et leur utilisation. C'est le cas de l'essence, du gasoil, du mazout et du kérosène (Pèrs, 1976 in Djendi, 2006). L'augmentation de leur utilisation pour la production industrielle et la circulation des véhicules s'accompagne du dégagement dans l'air de quantités croissantes de fumées, de gaz toxiques tels que les hydrocarbures et autres agents polluants (Ramade, 1982) ; (Figure 2).

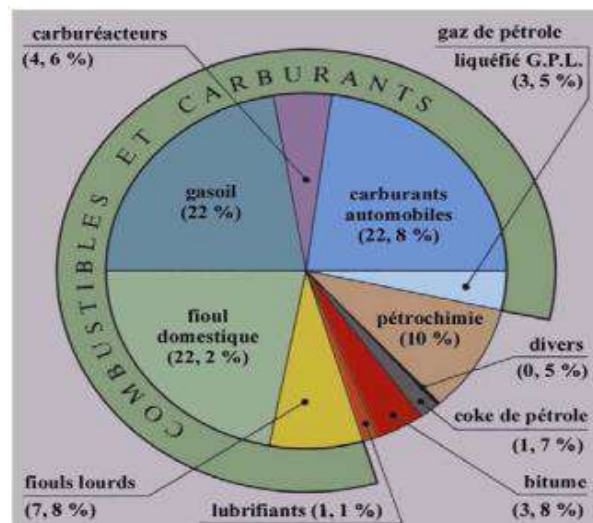


Figure 2 : Répartition de la consommation par secteur (Roussel, 2001).

Les principales sources anthropiques d'hydrocarbures dans l'air sont (Ramade, 1982) :

- Les gaz torchés produits par les différentes unités (traitement, stations de compression, raffineries),
- Les fuites de gaz dans les équipements pétroliers,
- Les risques de fuite d'hydrocarbures des pipelines,
- Le déversement accidentel des hydrocarbures,
- L'utilisation de solvants dans l'industrie chimique,
- Les combustions incomplètes des carburants dans les moteurs à explosion,
- Les chaufferies à fuel des foyers domestiques et industriels,

- L'évaporation au niveau des cuves ou réservoirs des véhicules automobiles.

Au niveau de la production industrielle, les rejets intempestifs des hydrocarbures accompagnent l'exploitation pétrolière (Figure 3). Dans la plupart des cas, ces rejets sont liés à une mauvaise administration ainsi qu'à des accidents techniques dus au manque d'entretien et au contrôle déficient des machines.

La circulation routière en croissance est une autre des sources majeures de pollution atmosphérique. Le moteur diesel, objet de nombreux débats, rejette les hydrocarbures polycycliques aromatiques associés aux fumées noires de leurs échappements (Ramade, 2007). En outre, au cours des combustions incomplètes s'effectue la synthèse d'hydrocarbures carcinogènes comme le benzo-3,4-pyrène (le plus connu d'entre eux), le benzanthracène, le fluoroanthrène, le cholanthrène. Ces derniers sont également contenus dans les goudrons et suies rejetés par divers foyers (Ramade, 1982).

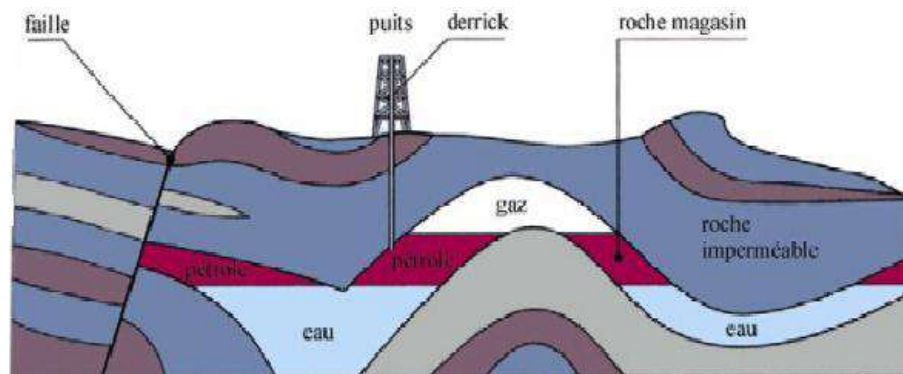


Figure 3 : Schéma classique d'un champ pétrolier et de son exploitation (Roussel, 2001).

Le pétrole imprègne une roche poreuse : la roche magasin. Celle-ci est surmontée par une roche imperméable. On dit que le pétrole est piégé dans un anticlinal. Il est toujours accompagné de gaz (au-dessus) et d'eau salée (en-dessous). Le pétrole est en général piégé sous très fortes pressions (des centaines de bars). Il peut alors jaillir tout seul par le trou du forage. Si la pression naturelle n'est pas suffisante, on utilise des dispositifs de pompes actionnés par de gros balanciers ou bien on injecte à la base du puits de l'eau sous pression (Roussel, 2001).

A grande profondeur, les hydrocarbures formés par pyrolyse peuvent subir des réactions de craquage. Ils sont alors transformés en alcanes de plus en plus légers, jusqu'au méthane CH_4 pour donner le gaz naturel : le plus simple des alcanes et principal constituant du gaz naturel est le méthane (70 à 95%) (Hagop, 2005).

1.3. Classification des hydrocarbures

Les pétroles bruts sont constitués de différentes familles de composés dont la composition chimique varie énormément selon leur origine géographique et géologique

(Tissot et Welte, 1984). Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un pétrole brut. Ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon l'origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %), (Soltani, 2004).

Les métaux sont également présents mais à l'état de traces. Les plus abondants sont le vanadium et le nickel, mais du fer, du sodium, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés (Loppinet *et al.*, 1976 ; Glinka, 1981 ; Al-linger *et al.*, 1985 ; Ouahes, 1983 ; Soltani, 2004).

1.3.1. Les hydrocarbures aliphatiques

Les hydrocarbures aliphatiques sont des hydrocarbures dont la chaîne ne se referme pas en cycle (Benard, 1985). Ils comprennent:

- *les alcanes* aussi appelés paraffines. Ce sont des hydrocarbures aliphatiques saturés. Ils sont constitués d'un enchaînement d'atomes de carbone portant chacun de 2 à 3 atomes d'hydrogène (sauf le méthane : CH₄) ; leur formule générale est : C_nH_{2n+2} (Wauquier, 1994).

Nom	Formule brute	Formule développée	Formule semi-développée
Méthane	CH ₄	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$	CH ₄
Ethane	C ₂ H ₆	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	CH ₃ -CH ₃
Propane	C ₃ H ₈	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	CH ₃ -CH ₂ -CH ₃
Butane	C ₄ H ₁₀	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{H} \\ \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \quad \text{H} \end{array}$	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃

- *les alcènes* aussi appelés oléfines. Ce sont des hydrocarbures aliphatiques insaturés. Il existe une ou plusieurs doubles liaisons carbone-carbone ; leur formule générale est : C_nH_{2n} (Lefebvre, 1978).

Nom	Formule brute	Formule développée	Formule semi-développée
Ethylène	C ₂ H ₄	$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{H} \\ & \diagdown & / \\ & \text{C} = \text{C} & \\ & / & \diagdown \\ \text{H} & & \text{H} \end{array}$	CH ₂ = CH ₂
Propène	C ₃ H ₆	$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{H} & & \text{H} \\ & \diagdown & / & & \\ & \text{C} = \text{C} & - & \text{C} & - \text{H} \\ & / & & & \\ \text{H} & & \text{H} & & \text{H} \end{array}$	CH ₂ = CH - CH ₃
Butène	C ₄ H ₈	$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{H} & & \text{H} & & \text{H} \\ & \diagdown & / & & & & \\ & \text{C} = \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - \text{H} \\ & / & & & & & \\ \text{H} & & \text{H} & & \text{H} & & \text{H} \end{array}$	CH ₂ = CH - CH ₂ - CH ₃
		$\begin{array}{c} \text{H} & & \text{H} & & \text{H} \\ & & & & \\ \text{H} - \text{C} & - & \text{C} & = & \text{C} & - & \text{C} - \text{H} \\ & & & & \\ \text{H} & & \text{H} & & \text{H} \end{array}$	CH ₃ - CH = CH - CH ₃

- *les alcynes*. Ces hydrocarbures aliphatiques insaturés sont caractérisés par la présence dans leur molécule d'une triple liaison ; leur formule générale est : C_nH_{2n-2} (Lefebvre, 1978).

Parmi les alcanes, on distingue les alcanes linéaires, ramifiés et les cycloalcanes.

Les alcanes linéaires (n-alcanes) dont la longueur de chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone, constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier).

Pour les alcanes ramifiés, les plus abondants sont les iso-alcanes possédant un groupement méthyle en position 2, les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple : pristane, phytane) qui sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut dans des proportions sensiblement égales à celles des n-alcanes.

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut.

Le pétrole brut d'origine fossile ne contient en général pas d'alcènes.

1.3.2. Les hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (HAP) dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques (Neff, 1979). En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes et ne représentent que 10 à 30% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier. Les composés alkylés sont,

la plupart du temps, plus abondants que les molécules parentales dont ils dérivent. Certains cycles aromatiques peuvent être associés et former des noyaux (cycle à 5 ou à 6 atomes de carbone).

1.3.3. Les composés polaires

Cette fraction correspond à des molécules hétérocycliques, telles que :

- des composés oxygénés : phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes,
- des composés soufrés : mercaptans, sulfures, disulfures,
- des composés azotés : pyridines, quinoléines.

Les dérivés soufrés sont, dans la plupart des cas, plus abondants que les composés oxygénés ou azotés.

1.3.4. Les asphaltènes

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. La structure de ces composés est mal connue du fait, d'une part de leur composition chimique complexe (à base de cycles aromatiques condensés, de naphthéo-aromatiques, de ramifications et d'hétéroatomes (O, N, S)).

1.4. La pollution atmosphérique par les HAP

1.4.1. Les HAP toxiques

La pollution atmosphérique par les hydrocarbures est due à la contamination par les hydrocarbures gazeux d'origine artificielle ou naturelle. Leur combustion incomplète tant dans les foyers domestiques qu'industriels introduit dans l'atmosphère d'importantes quantités d'hydrocarbures (notamment benzopyrène, benzotrène et des composés polycycliques (Bournelle et Guidicelli, 1993)).

Parmi les hydrocarbures, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), également appelés polynucléaires, en raison de leurs effets cancérigènes et mutagènes (Lehr et Jerina, 1977 ; White, 1986 ; Sims et Overcash, 1988), constituent la catégorie la plus étudiée (Neff, 1979 ; Mc Elroy *et al.*, 1989 ; Piccardo *et al.*, 2001). Ils constituent la famille la mieux documentée. En effet, ils sont émis par toutes les

combustions et constituent d'excellents indicateurs de pollution. Ils sont en voie de réglementation dans le monde au même titre que les polluants classiques (Albinet, 2006).

Les HAP forment une famille de molécules organiques composées de carbone et d'hydrogène et présentant une structure polyaromatique condensée constituée de la fusion de cycles aromatiques composés de 5 et 6 atomes de carbone. La plus petite de ces molécules est le naphthalène ($C_{10}H_8$) composé de deux cycles benzéniques. La nature chimique de ces molécules les rend hydrophobes, d'où une faible affinité pour les phases aqueuses et une affinité plus élevée pour les phases particulières telles que les sols, les matières en suspension et les sédiments. Ces molécules sont inscrites dans la liste des polluants prioritaires de l'Agence pour la Protection de l'Environnement Américaine (US-EPA), de l'Organisation Mondiale de la Santé et de l'Union Européenne du fait de leur caractère toxique. Ce sont des molécules biologiquement actives qui peuvent provoquer des dysfonctionnements cellulaires via leur interaction avec les bases azotées de l'ADN et de l'ARN.

A la surface de la planète, les HAP ont deux origines distinctes. La première voie de production de ces hydrocarbures aromatiques correspond à l'évolution de la matière organique naturelle à l'échelle du cycle géologique du carbone organique. En effet, lors de la diagenèse et de la catagenèse, processus résultant en la formation de pétrole ou de charbon, la composition de la matière organique naturelle évolue, d'abord en perdant ses fonctions oxygénées puis en s'aromatisant via la perte d'atome d'hydrogène. Ce processus naturel conduit à la formation de molécules aromatiques à partir de leur précurseur biologique. Ces composés aromatiques sont dans leur grande majorité alkylés, c'est-à-dire portent sur leur structure un ou plusieurs groupements alkyl (C_nH_{2n+1}). Ces HAP alkylés se retrouvent ainsi dans la composition des huiles pétrolières qui peuvent être introduite dans notre environnement soit de manière naturelle soit de manière anthropique via des pollutions accidentelles comme lors de l'accident sur la plateforme Deepwater Horizon dans le Golfe du Mexique en avril 2010.

Le deuxième mode de production des HAP est la combustion de matière organique, qu'elle soit fossile (pétrole, charbon...) ou récente (bois, tourbes...). En effet les réactions de combustion produisent, en plus du dioxyde de carbone et de l'eau, des imbrûlés. Lors de la décomposition par combustion, des espèces réactives sont produites. Ces molécules réagissent entre elles pour former des hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP. Ces molécules continuent à interagir, provoquant une augmentation de la surface du plan graphitique. Ce phénomène est à la base de la formation des suies (cheminées, pots d'échappement...).

Comme le développement de nos sociétés industrielles s'est basé sur la production d'énergie par la combustion de matière organique, les HAP sont ubiquistes dans les sédiments déposés après le début de la révolution industrielle caractérisant l'importance de l'impact de notre société industrialisée sur son environnement (Killops et Killops, 2005).

Les HAP sont devenus un sujet d'étude important, des propriétés toxiques et cancérigènes leurs ayant été découvertes. Par exemple, des corrélations entre les concentrations des HAP et le taux de propagules mutées déficientes en chlorophylle ont été mis en évidence pour un arbre, *Avicennia marina* (Duke et Watkinson, 2002).

Ce sont des molécules relativement stables, considérées comme une catégorie de polluants parmi les plus importants vu leur toxicité potentielle et leur persistance dans l'environnement (Yu, 2005 ; Galuszka, 2007). Compte tenu de cette stabilité dans l'environnement et de leur toxicité, 16 d'entre eux ont été déclarés comme polluants prioritaires par l'US-EPA (Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis, Figure 4) et par l'EEA (Agence de l'Environnement Européenne).

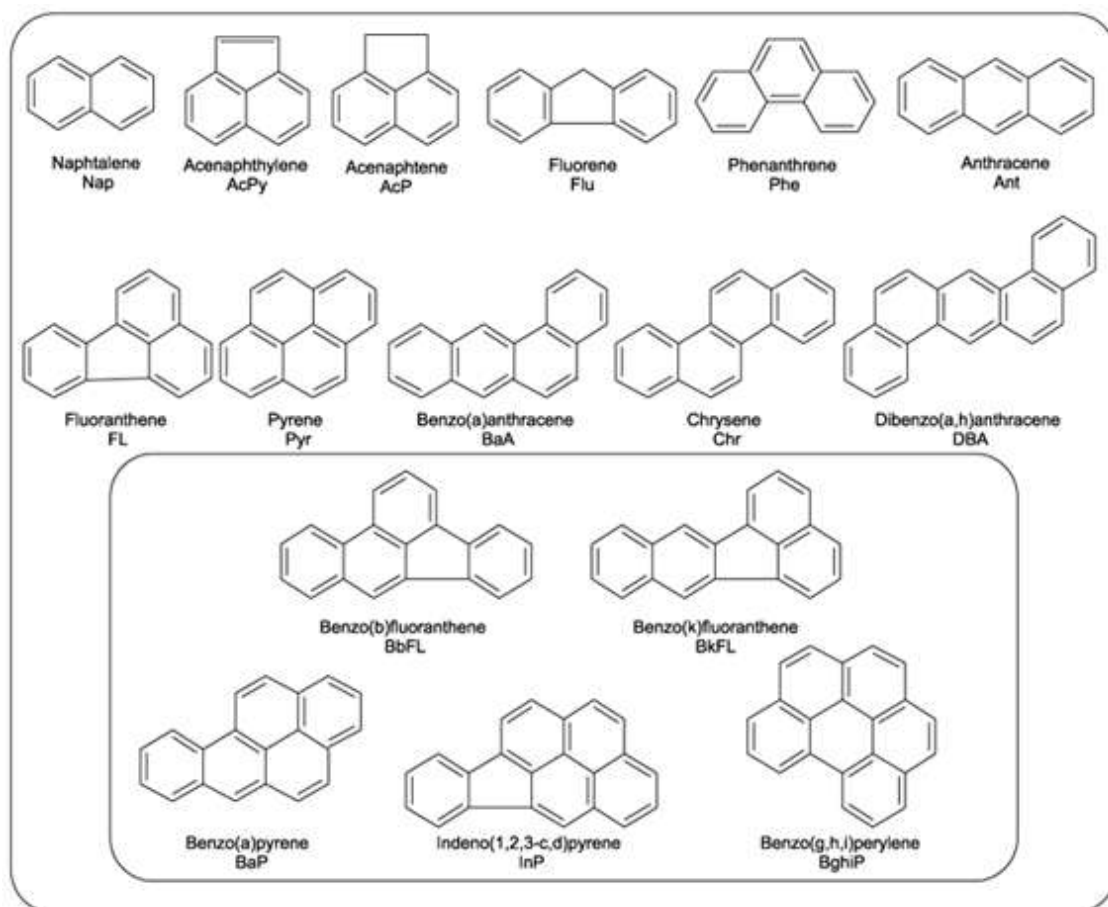


Figure 4 : Structure des 16 HAP retenus par Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis et déclarés polluants prioritaires (Coehlo *et al.*, 2008).

1.4.2. Les sources de la pollution par les HAP

Les sources des HAP leur confèrent une répartition ubiquiste. En effet, ils proviennent en majorité des activités humaines liées au trafic et aux exploitations pétrochimiques mais aussi de la combustion partielle de matières organiques. Les HAP présents dans l'atmosphère sont formés au cours des combustions incomplètes ou de la pyrosynthèse de matière organique. En dehors des zones d'exploitation ou de traitement, ils sont donc issus majoritairement des combustions des dérivés du pétrole, du charbon, du gaz naturel, du bois et plus généralement des combustions de biomasse et d'ordures ménagères (Besombes *et al.*, 2001). Les éruptions volcaniques peuvent aussi injecter dans l'atmosphère des quantités importantes de HAP (Hoyau *et al.*, 1996 ; Nikolaou *et al.*, 1984). Par ailleurs, les HAP sont considérés comme des précurseurs dans la formation des suies (Miguel *et al.*, 1998 ; Seinfeld et Pandis, 1998).

Une autre partie des HAP atmosphériques provient d'activités commerciales telles que la teinture, la production d'explosifs, la production de fibres et de l'industrie pharmaceutique et chimique (Hawley, 1987 ; Galuszka, 2007).

1.4.3. Transformation des HAP dans l'atmosphère

Bien que les HAP soient distribués dans tout l'environnement, le moyen de transport le plus important de ces composés est l'atmosphère. Étant semi-volatils, ils sont distribués à la fois dans la phase gazeuse et la phase particulaire de l'air. Ils se déposent sur les plantes, les sols et dans l'eau.

L'importance de la connaissance de la répartition des HAP dans l'atmosphère selon la taille des particules est essentielle d'un point de vue toxicologique afin de mieux localiser leurs zones d'actions. De nombreuses études ont été entreprises en milieu urbain afin de mieux comprendre cette distribution (Par exemple, Aveves et Grimalt, 1993 ; Allen *et al.*, 1996 ; Allen *et al.*, 1998 ; Katz et Chan, 1980 ; Kiss *et al.*, 1998 ; Schnelle-Kreis *et al.*, 2001 ; Van Vaeck et Van Cauwenberghe, 1978 ; Venkataraman *et al.*, 1994 ; Venkataraman et Friedlander, 1994). Il ressort de ces études que dans l'atmosphère, les HAP sont préférentiellement associés au mode fin de l'aérosol (70-80% en masse). Ils appartiennent donc à la fraction inhalable de l'aérosol. De plus, la distribution en fonction de la taille des particules est liée aux masses moléculaires des HAP et donc à leurs pression de vapeur saturante. Les HAP les plus légers sont associés majoritairement aux particules moyennes et grosses alors que les plus lourds sont

d'avantage observés sur les particules fines (Allen *et al.*, 1996 ; Allen *et al.*, 1997 ; Kiss *et al.*, 1998). L'explication de telles distributions semble liée à un processus de volatilisation et de réadsorption des HAP les plus volatils (Allen *et al.*, 1996 ; Offenberg et Baker, 1999).

Les HAP émis dans l'atmosphère sous forme gazeuse ou associés à des particules sont soumis dans l'atmosphère à divers processus tendant à les dégrader et donc à modifier leur structure et leurs propriétés physico-chimiques. Ainsi, les HAP sont dégradés lors de réactions chimiques avec les différents oxydants présents en phase gazeuse et principalement O₃, le radical °OH, NO, NO₂ et N₂O₅. Toutefois, si l'action de ces différents composés n'est pas négligeable, la principale cause de dégradation des HAP ou du moins la plus rapide réside dans les réactions de photolyse (Korfmacher *et al.*, 1979; Behymer et Hites, 1985 ; Albinet, 2006).

2. La biosurveillance

Le processus d'analyse chimique de l'air ambiant est une tâche difficile en raison de la manipulation des échantillons et du coût élevé des équipements d'échantillonnage et d'analyse (Anderson *et al.*, 2004 ; Chen *et al.*, 2003 ; Domeno *et al.*, 2006). Aussi des méthodes biologiques se sont développées. Elles sont relativement récentes par rapport aux mesures physico-chimiques. Les premiers organismes utilisés en biosurveillance, tels que les lichens et les mousses, sont en effet restés discrets pendant très longtemps, aux yeux des promeneurs (Glasomies, 2006). L'emploi de la biosurveillance utilisant les organismes vivants pour évaluer la contamination de l'environnement présente des avantages d'échantillonnage. Ils permettent une surveillance à long terme avec un grand nombre de sites d'échantillonnage, et aussi l'identification simultanée de plusieurs polluants métalliques et organiques au sein de la même matrice (Wolterbeek, 2002 ; Augusto *et al.*, 2010).

2.1. La biosurveillance végétale

2.1.1. Définition et méthodes

Il s'agit d'une méthode utilisant la réponse des organismes à la pollution d'un milieu. Elle permet, en outre, un suivi sur un certain laps de temps. C'est une technique peu

couteuse et qui ne nécessite pas des grands équipements (Sloof *et al.*, 1988 ; Steinnes, 1989 ; Sloof, 1994). Elle utilise des bio-indicateurs de la pollution et/ou bioaccumulateurs qui permettent un échantillonnage aisé et facilitent les étapes de traitement et d'analyse d'échantillons au laboratoire même pour des éléments traces (Wolterbeek, 2002 ; Guidotti *et al.*, 2003).

Garrec et Van Haluwyn (2002) définissent la biosurveillance comme « l'utilisation des réponses à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution ». Les informations pertinentes à la biosurveillance sont déduites à partir de changements dans l'organisme et la communauté ou à partir des concentrations de certaines substances dans les tissus. L'avantage et la réussite de la biosurveillance sont liés principalement à un choix judicieux de l'organisme avec une présence permanente et commune sur le secteur choisi et la facilité de l'échantillonnage sans équipement coûteux. Elle permet d'évaluer des faibles concentrations d'éléments dans les aérosols et les dépôts ce qui implique que le modèle concentre quantitativement l'élément d'intérêt (Wolterbeek, 2002). Différents bio-indicateurs ont été appliqués dans des programmes de contrôle de l'air tels que les lichens, mousses, fougères, graminées, écorce d'arbre et les aiguilles de pin. Toutefois, les mécanismes de l'absorption et la rétention des éléments traces ne sont pas parfaitement connus (Sloof, 1993).

Les méthodes de surveillance de la bioaccumulation peuvent être divisées en deux groupes : active et passive. La surveillance active comprend l'exposition d'espèces bien définies dans des sites d'étude tandis que la surveillance passive se réfère à l'analyse chimique et à l'observation des plantes indigènes.

L'approche active utilise des végétaux préalablement sélectionnés et cultivés sur le site d'étude. Elle permet d'étudier des zones qui pourraient être vierges de toute végétation (Garrec et Van Haluwyn, 2002). Elle implique une transplantation à partir de zones non polluées vers les sites d'études (Ceburnis et Valiulis, 1999 ; Szczepaniak et Biziuk, 2003). Le temps d'exposition est bien défini mais il peut y avoir un changement dans l'efficacité de l'absorption du polluant due au changement climatique (Ceburnis et Valiulis, 1999).

L'approche passive consiste à utiliser des végétaux déjà existants sur le site d'étude. Ainsi, il n'y a pas d'étapes de mise en place et adaptation du matériel. Si tous les

végétaux présents sur une zone à étudier sont a priori utilisables pour la biosurveillance passive, différents critères permettent cependant de sélectionner le végétal le plus intéressant

- Large répartition sur la zone d'étude,
- Répartition de la façon la plus homogène possible sur cette zone,
- Présence de feuilles ou organes pérennes, dans la mesure du possible,
- De grande taille si possible,
- Possibilité de plusieurs prélèvements foliaires ou autres,
- Facile à retrouver, à marquer,
- Une certaine pérennité vis-à-vis du vandalisme par exemple,
- Le moins possible influencé par les paramètres telluriques.

La biosurveillance passive a toutefois un inconvénient majeur : tous les processus et toutes les sources agissent en même temps sur le modèle (Ceburnis et Valiulis, 1999). Ainsi, la variabilité naturelle dans les conditions de macro- et micro-climat ambiant peut générer un comportement variable chez le biomoniteur (Gerdol *et al.*, 2002 ; Wolterbeek et Verburg, 2002 ; Wolterbeek, 2002).

2.1.2. Les outils de la biosurveillance

Dans cette partie, nous donnerons quelques définitions sur les outils de la biosurveillance : bioindicateur, biointégrateur, biomarqueur, bioaccumulateur qui, avec l'avancement des travaux de recherche, se diversifie et recouvre en réalité plusieurs concepts.

2.1.2.1. Bioindicateur

Selon Blandin (1986) "un indicateur biologique ou bioindicateur est un organisme ou un ensemble d'organismes qui par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques permet de façon pratique et sûre, de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un éco-complexe et de mettre en évidence aussi précocement que possible leurs modifications, naturelles ou provoquées". Garrec et Van Haluwyn (2002) les considèrent comme un simple relais ne faisant référence qu'à des effets observables au niveau de l'individu se traduisant par des altérations morphologiques, tissulaires ou physiologiques (croissance et reproduction).

Les bioindicateurs sont donc des organismes qui répondent à un certain niveau de la pollution par une modification de leur cycle de vie ou l'accumulation d'un polluant particulier. Pour l'évaluation de la pollution de l'air, les aiguilles de pin (Migaszewski *et al.*, 2002), les algues marines (Stengel *et al.*, 2004), les lichens et les mousses (Gerdol *et al.*, 2002 ; Migaszewski *et al.*, 2002) peuvent être considérés comme des organismes bioindicateurs les plus couramment appliqués (Domeno *et al.*, 2006).

2.1.2.2. Biointégrateur

Toute disparition d'une espèce, toute modification de son abondance relative, toute modification de la structure des peuplements végétaux d'un écosystème signifie une modification de l'environnement de cette espèce (Echaubard, 1995 ; Garrec et Van Haluwyn, 2002). L'introduction d'un polluant peut être ce facteur perturbateur. Le terme de bioindicateur est alors utilisé lorsque la perturbation se situe au niveau populationnel et/ou communautaire (disparition ou apparition d'espèces, variation densitaire).

2.1.2.3. Biomarqueur

Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau individuel telle qu'un changement moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, qui révèle l'exposition d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.*, 1997). Fabure (2009) distingue:

- Les biomarqueurs d'exposition : le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme.
- Les biomarqueurs d'effet d'exposition : le xénobiotique est entré dans l'organisme et a exercé un effet, toxique ou non, sur une cible critique.
- Les biomarqueurs de sensibilité aux effets, traduisant le phénomène de variation d'origine génétique de la réponse à la contamination par des polluants.

2.1.2.4. Bioaccumulateur

Selon Ramade (1993), "la bioaccumulation est un phénomène par lequel une substance présente dans un biotope s'accumule en surface et/ou pénètre dans un organisme même si elle n'a aucun rôle métabolique, voire même si elle est toxique à ce dernier". L'utilisation de bioaccumulateurs nécessite, après la récolte des échantillons, de

disposer de techniques analytiques pour réaliser le dosage des polluants (Elichegaray, 2008).

Le dosage des polluants peut s'effectuer :

- Soit par analyse des polluants eux-mêmes, après l'extraction de ceux-ci par un solvant des surfaces foliaires et l'utilisation de méthodes chromatographiques appropriées.
- Soit par l'analyse des éléments minéraux contenus dans les polluants organiques (Cl pour le chloroforme par exemple), après l'extraction de ceux-ci des surfaces foliaires par un solvant organique, ou dans les feuilles entières après réduction en poudre de celle-ci (Garrec et Van Haluwyn, 2002).

2.2. La bioindication végétale

2.2.1. Les modèles

Les plantes sont connues pour être des organismes qui conviennent particulièrement bien à la biosurveillance de la qualité de l'air car ils peuvent être très efficaces pour détecter des changements de l'environnement (Markert *et al.*, 1996). Les polluants pénètrent par les différents organes de la plante (Figure 5). Les végétaux sont assez faciles à échantillonner sur de grands espaces (Reimann *et al.*, 1999 ; Yenisoys-Karakas et Tuncel, 2004). Parmi eux, les lichens, les mousses et les aiguilles de pin sont les plus couramment utilisés (Holoubek *et al.*, 2000 ; Conti et Cecchetti, 2001 ; Onianwa, 2001 ; Migaszewski *et al.*, 2002. ; Landers *et al.*, 2008).

De toutes les espèces biologiques utilisées dans la biosurveillance, les lichens et les bryophytes sont les plus fréquents. Ils présentent l'avantage d'avoir une morphologie constante avec les saisons ; ainsi l'accumulation peut se produire tout au long de l'année. Ils ont une longue durée de vie ce qui permet leur utilisation sur le long terme comme accumulateurs de dépôts atmosphériques (Sloof, 1993). En effet, étant dépourvu de véritable système racinaire, leurs réactions aux changements de l'environnement sont directes. Les bryophytes sont très sensibles à certaines substances toxiques, comme les composés sulfureux ou azotés ce qui se traduit par des altérations dans la vitalité, l'abondance et la reproduction. Ils sont par contre très résistants à de nombreuses substances toxiques comme les métaux lourds et peuvent les accumuler ainsi qu'une large gamme de polluants organiques persistants. Il est possible d'établir une corrélation entre

l'entrée du toxique et sa concentration ce qui permet de déterminer la durée exacte des dépôts. Il a été démontré qu'ils étaient d'excellents indicateurs dans de nombreuses études (par exemple Zechmeister *et al.*, 2003 ; Krommer *et al.*, 2007).

Les lichens sont largement utilisés comme bioindicateurs grâce, notamment à leur capacité exceptionnelle à accumuler les métaux traces (Puckett, 1988 ; Nash, 1989 ; Garty, 1992, 1993, 2000a, b, 2001 ; Bargagli, 1998 ; Conti et Cecchetti, 2001 ; Wolterbeek, 2002 ; Wolterbeek *et al.*, 2003 ; Szczepaniak et Biziuk, 2003 ; Garty et Garty-Spitz, 2011). Ce sont des organismes symbiotiques formés par l'association d'un champignon et d'une algue/cyanobactéries. Sans racine, cuticule ni stomate, toute la surface du lichen est exposée aux polluants de l'air. La zone exposée est donc proportionnellement plus importante que celle d'autres bioindicateurs comme les aiguilles de pin, les légumes et les fruits. Cela pourrait expliquer les plus grandes concentrations détectées dans les lichens par rapport aux aiguilles de pin (Augusto *et al.*, 2010).

2.2.2. L'utilisation des lichens

Les lichens ont été utilisés comme bioindicateurs et/ou bioaccumulateurs de la pollution atmosphérique dans plusieurs études, au cours des 40 dernières années, depuis les premiers travaux de Hawksworth et Rose en 1970 qui reliaient la concentration en SO₂ avec la présence/absence de lichens (Calatayud *et al.*, 1984 ; Domeno *et al.*, 2006). Ils sont maintenant bien connus pour leur potentiel comme bioindicateurs de la pollution de l'environnement et ont été utilisés pour quantifier des contaminants tels que les éléments radioactifs (Hattson, 1975 ; Daillant *et al.*, 2004). Les lichens ont été utilisés pour surveiller la présence de métaux, soufre, azote, fluor, radionucléides et divers composés organiques tels que les dioxines et les furanes, les biphényles polychlorés ainsi que des pesticides organochlorés (Villeneuve *et al.*, 1988 ; Calamari *et al.*, 1991 ; Garty, 2000 ; Augusto *et al.*, 2004, 2007). La nutrition minérale des lichens dépend principalement de l'apport atmosphérique. Ceci, combiné avec leur capacité à accumuler des éléments minéraux plus qu'ils n'en ont besoin font que les lichens sont l'un des meilleurs bioindicateurs de la pollution de l'air (Carreras et Pignata, 2007). Bien que la majorité des lichens soient sensibles aux polluants dans l'environnement, certains sont capables de survivre sur des substrats riches en métaux lourds (Purvis et Salles, 1996 ; Dzubaj *et al.*, 2008). Ils sont très sensibles aux changements de la composition de l'air et permettent de suivre la pollution sur une grande période (Goujon, 2004). L'ensemble de leurs

caractéristiques (pérennité, absence de cuticule, de stomates et de racines, organismes poikilohydriques (humidité dépendant de celle de l'environnement) les rend exclusivement dépendants de l'atmosphère pour leur nutrition. Ils sont donc particulièrement bien adaptés pour l'étude des polluants atmosphériques aussi bien gazeux que particulaires (Rezpka et Cuny, 2008). En ce qui concerne les HAP, les études utilisant des lichens comme biomoniteurs de ces composés sont plus réduites (Herzig, 1989 ; Owczarek *et al.*, 2001 ; Migaszewski *et al.*, 2002 ; Guidotti *et al.*, 2003 ; Domeno *et al.*, 2006 ; Blasco *et al.*, 2006, 2007, 2008 ; Naeth et Wilkinson, 2008 ; Shukla et Upreti, 2009 ; Augusto *et al.*, 2010).

2.2.3. L'utilisation des arbres et arbustes

Les essais sur les plantes supérieures n'ont pas donné beaucoup de résultats convaincants. En effet, leur capacité d'adaptation est plus faible et elles sont moins ubiquistes que les mousses et les lichens (Loppi *et al.*, 1998 ; Szczepaniak et Biziuk, 2003). Leur utilisation dans ce contexte reste donc localisée. Toutefois, parmi les plantes supérieures, les arbustes et les arbres sont les végétaux les plus intéressants et souvent les plus utilisés (arbres urbains ou le long des routes). Dans la majorité des cas, ils sont utilisés comme bioaccumulateur (Figure 5) (Garrec et Van Haluwyn, 2002).

Certaines plantes sont décrites pour accumuler et tolérer les HAP. Cela concerne à la fois des espèces herbacées telles que le riz, l'avoine, le blé et le maïs aussi bien que des arbres tels que le peuplier et le pin de Virginie (Simonich et Hites, 1994). Certaines espèces auraient la capacité de métaboliser les hydrocarbures en se liant au glucose ou au glutathion (Mac Cutcheon et Schnoor, 2003). Dans d'autres cas, ils semblent s'accumuler provoquant des anomalies morphologiques (Alkio *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2009).

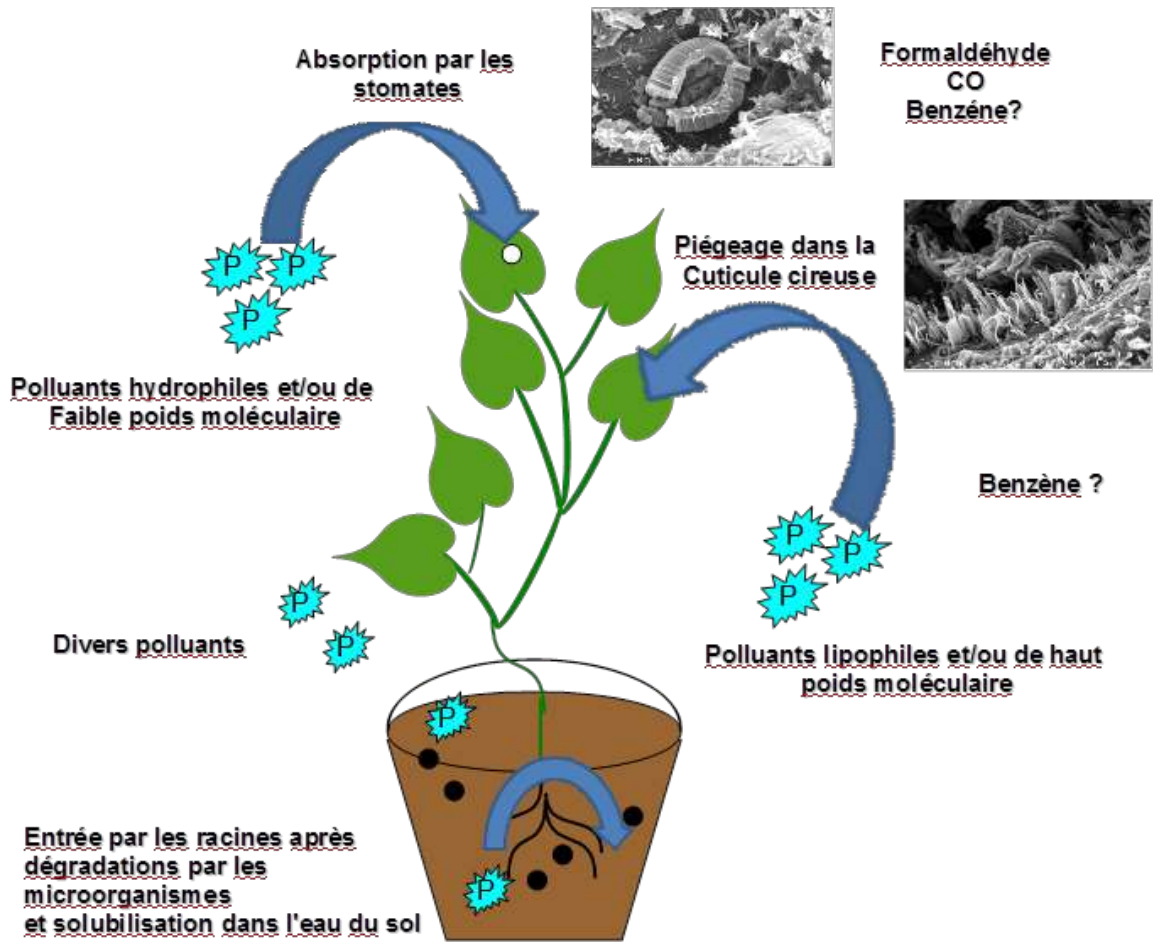


Figure 5 : L'absorption des polluants dans les plantes (inspiré de Castell, 2009).

3. Les effets de la pollution par les hydrocarbures chez les végétaux

Les végétaux répondent à la pollution par les hydrocarbures à différentes échelles : tissulaire, subcellulaire ou moléculaire jusqu'à l'organisme entier ainsi qu'à l'échelle collective populationnelle et communautaire (Festy, 2002 in Garrec et Van Haluwyn, 2002). Par ailleurs, certains d'entre eux ont la capacité d'accumuler les polluants de l'atmosphère au sein de leurs tissus.

3.1. La pénétration des hydrocarbures dans la plante

Les plantes peuvent capter les HAP par deux voies majeures, une voie racinaire et une voie foliaire (Figure 6). Dans la voie racinaire, les HAP pénètrent passivement dans les cellules par osmose (Meudec *et al.*, 2006). Ce mode de captation est plus influencé par la concentration en HAP que par leur nature (Watts *et al.*, 2005). Dans la seconde

voie, ce sont les formes volatiles qui s'accumulent sur les feuilles et ensuite pénètrent soit par les stomates soit passivement par les cuticules (Lemée, 1978 ; Garrec et Van Haluwyn, 2002). Dans la majorité des cas, les polluants sont accumulés au niveau des feuilles (Elichegaray, 2008). Suivant le mode de pénétration, les contaminations des organes sont différentes. Ainsi, dans le cas d'une pollution aérienne au phénanthrène chez *Trifolium pratense*, la molécule a été retrouvée principalement dans les feuilles (73%), et en moindre quantité dans la tige (25%) et dans les racines (2%) (Desalme *et al.*, 2011). Dans le cas d'une pollution du sol au fluoranthène chez *Pisum sativum*, le polluant a été retrouvé en majorité dans les racines (Kummerova *et al.*, 2006).

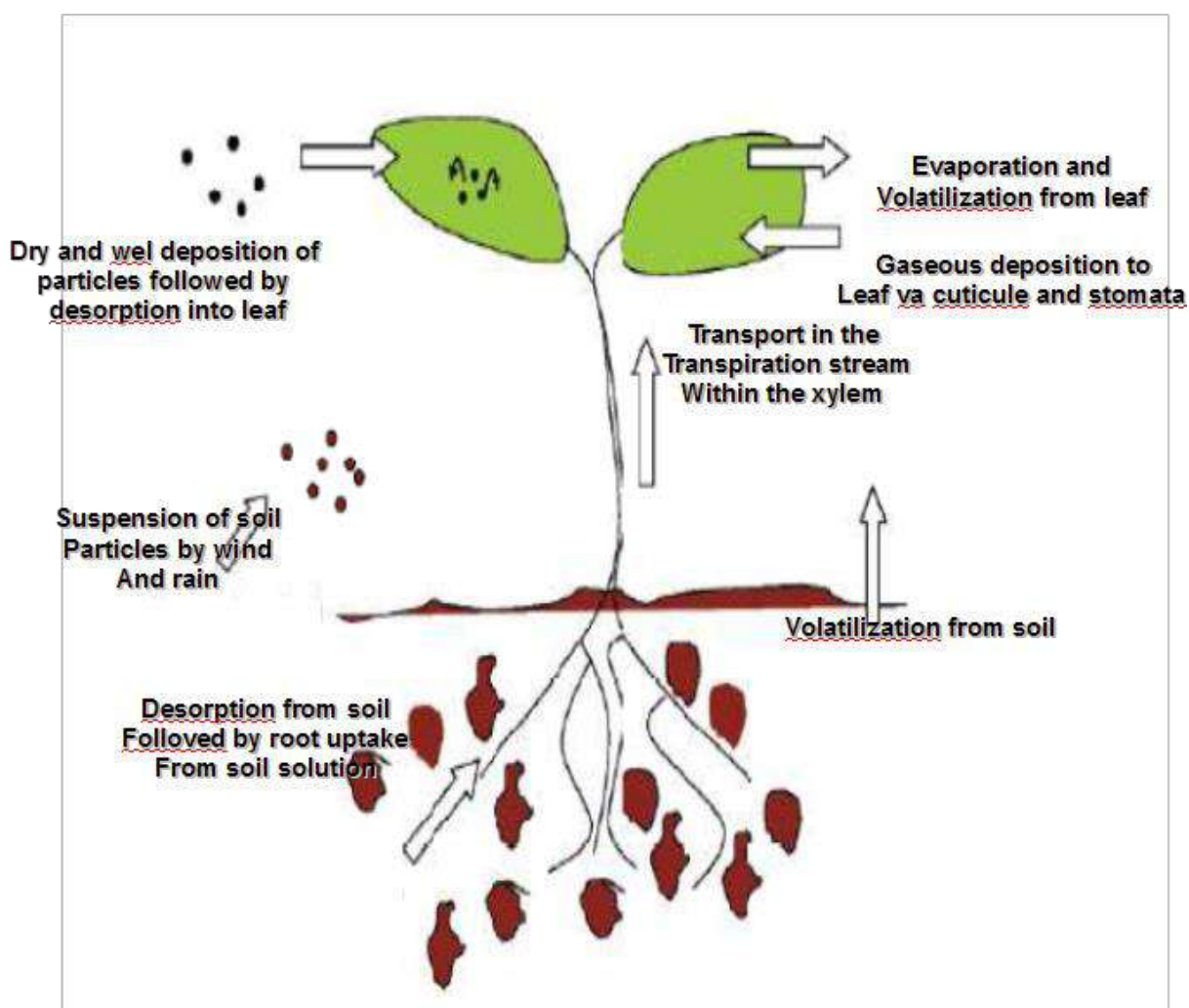


Figure 6 : Les principales voies de prélèvement des molécules organiques par les plantes (Collins *et al.*, 2005).

Dans le cas des pollutions atmosphériques, l'efficacité de captation des HAP varie selon l'environnement des feuilles, leur structure, le taux de transpiration ainsi que selon

la présence et la quantité de cires foliaires (De Nicola *et al.*, 2011 ; Elichegaray, 2008). Les dépôts en phase particulaire se font surtout par la cuticule des feuilles ; l'absorption par les stomates concerne les HAP dans la phase gazeuse (Kipopoulou *et al.*, 1999 ; Lehndorff et Schwark, 2004). Les caractéristiques foliaires (surface, cires cuticulaires, poils, nombre de stomates, lipides) jouent un rôle important dans l'absorption et l'accumulation des composés lipophiles tels que les HAP (Jouraeva *et al.*, 2002 ; Howsam *et al.*, 2000).

Outre la pénétration par les stomates et la cuticule dans la plante, d'autres voies sont possibles comme la pénétration par les bourgeons, les cicatrices foliaires, les lenticelles. Bien que les racines ne captent pas les polluants atmosphériques, elles peuvent être perturbées physiologiquement par leur présence induisant un dépôt sur/dans le sol (Figure 7). Les racines des plantes absorbent les polluants organiques du sol en relation presque directe avec leur charge lipophile relative (Cunningham et Ow, 1996).

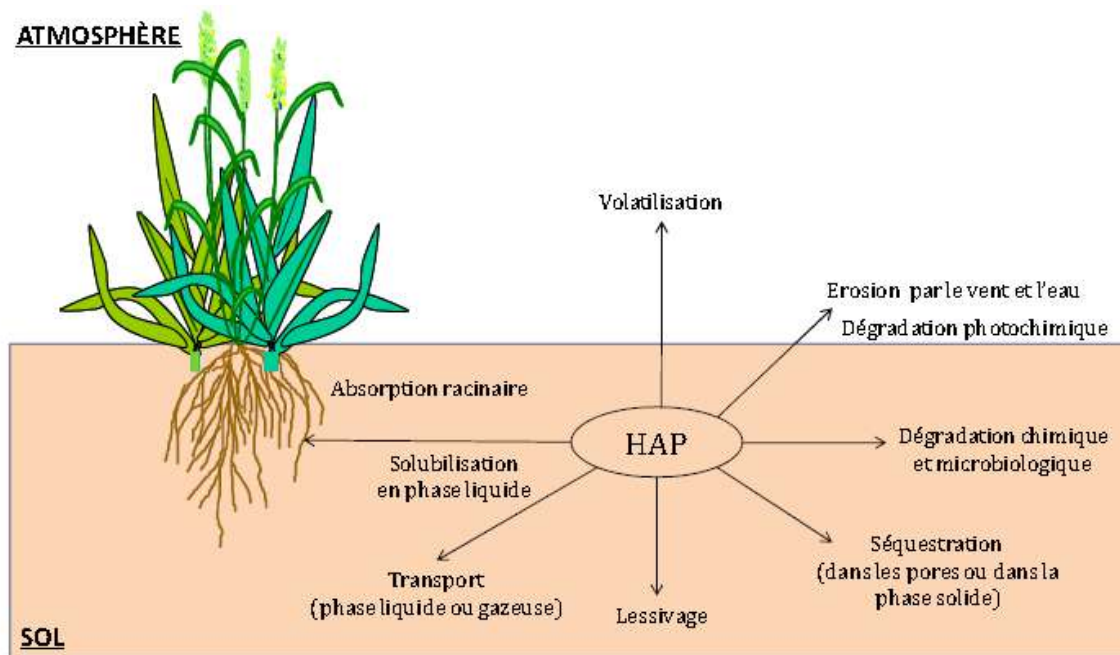


Figure 7 : Schéma global du devenir des HAP dans les sols (Alcayde *et al.*, 2000).

Dans le cas d'une pollution atmosphérique, les structures des surfaces foliaires sont donc essentielles. Les cuticules et cires sont des éléments importants impliqués dans la pénétration des polluants par cette voie.

3.1.1. Les cuticules et cires épicuticulaires des feuilles

La cuticule et les cires foliaires ont donc un rôle important dans la pénétration des HAP dans les feuilles. La cuticule des plantes est définie comme un film de polymères lipidiques et de cires solubles localisé à la surface extérieure des cellules de l'épiderme (Jeffree, 2006).

Les rôles reconnus de la cuticule sont essentiels pour la maintenance de l'intégrité physiologique de la plante. En effet, elle intervient dans le contrôle de la transpiration, le transport des substances lipophyles, comme barrière limitant la perte en eau et en ions et dans la protection en général contre les stress qu'ils soient biotiques ou abiotiques grâce à ses diverses propriétés (par exemple anti-adhérentes, auto-nettoyantes ; propriétés optiques contre les rayonnements ; réduction de la température de surface) (Koch *et al.*, 2009a; Bernard et Joubès, 2013). La cuticule peut couvrir toutes les parties aériennes des plantes. Elle peut être réduite à un film fin inférieur à 0,5 μm non visible en microscopie ou à une pellicule d'une centaine de μm d'épaisseur (Koch *et al.*, 2009a). Quantitativement, elle peut ne représenter que 1 μg par cm^2 sur des feuilles de milieux tempérés. Sur les palmes du palmier à cires (*Copernicia cerifera*), une espèce des milieux arides du Brésil de la même famille que le palmier dattier, les cires représentent plusieurs mg par cm^2 et peuvent être extraites mécaniquement (Jeffree, 2006).

On associe généralement un stress hydrique à la présence d'une cuticule conséquente (Kim *et al.*, 2007). Même si ce n'est pas toujours strictement le cas, la présence d'une couche de cires importante est une réponse des plantes relativement universelle de tolérance au stress hydrique au même titre que la présence de nombreux poils (Koch *et al.*, 2009a). Ainsi, l'évaporation de l'eau au travers de la cuticule est réduite. Elle ne se produit que grâce aux stomates en nombre souvent plus réduit et qui sont, de plus, protégés au fond d'une fosse par les cires épicuticulaires de manière à réduire les turbulences de l'air au-dessus du stomate et donc la transpiration. De plus, des structures particulières protègent les cellules de garde et l'ostiole du stomate.

La cuticule est composée de deux couches principales, une couche interne d'un matériel composite contenant un polyester, la cutine et des cires incorporées (intracuticulaires) (Figure 8). Vers l'extérieur, des cristaux de formes variables visibles en microscopie électronique à balayage constituent les cires épicuticulaires (ou supracuticulaires). Ces cires épicuticulaires peuvent donner une coloration bleutée (feuille décrite avec un aspect glauque dans les flores) aux organes des végétaux (feuilles et fruits notamment) et avoir une épaisseur de 0,5 à 100 μm (Koch *et al.*, 2009a). On utilise également le terme de pruine.

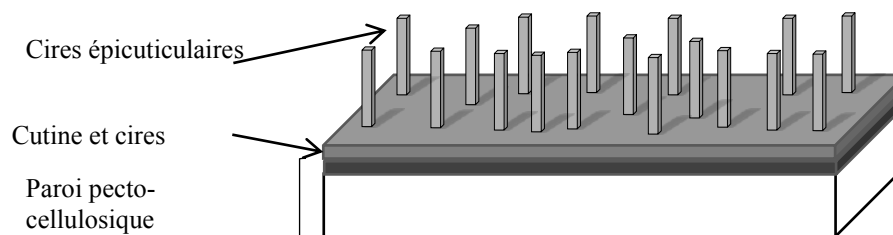


Figure 8 : Représentation schématique des couches de la cuticule au-dessus des cellules de l'épiderme.

La cutine est un polymère insoluble constitué d'acides gras hydroxy et hydroxyepoxy, contenant 16 ou 18 atomes de carbone, estérifiés sur du glycérol. Elle représente 40 à 80 % de la cuticule (Stark et Tian, 2006). Les hydroxylations ω ainsi que les substitutions hydroxy ou epoxy sont très courantes (Jeffree, 2006). Les cires sont constituées de composés organiques en mélange dont la composition varie en fonction des espèces, des organes, de leur développement et des contraintes environnementales. Elles sont constituées majoritairement de chaînes aliphatiques (alcanes, alcools, aldéhydes, acides...). Les alcanes sont majoritaires (59 % du total) (Kim *et al.*, 2007 ; Koch *et al.*, 2008 ; 2009b). Les chaînes ont un nombre de carbone majoritairement entre 20 et 40 ; certains monesters correspondant à des chaînes allant jusqu'à 60 carbones (Dominguez et Heredia, 1998 ; Koch *et al.*, 2009b). Parmi les dérivés, on trouve des alcools primaires et secondaires, des cétones, des acides gras, des aldéhydes et quelques composés aromatiques comme des triterpénoïdes (Koch *et al.*, 2009b). Des composés comme les polysaccharides ou des composés phénoliques peuvent également être présents dans la cuticule (Chantier et Samel, 1998). En réponse à la sécheresse, cette composition peut varier. Ainsi chez le sésame, le stress hydrique peut provoquer une augmentation de 24 % des alcanes et 13 % des aldéhydes (Koch *et al.*, 2009b). Pour les alcanes, les constituants qui augmentent le plus sont les C27, C29, C31, C33 et C35 alors que pour les aldéhydes, ce sont les C30, C32 et C34.

3.1.2. La pénétration des polluants atmosphériques

La cuticule est considérée comme une barrière pour un certain nombre de molécules. Leur pénétration dépend nettement de leur caractéristique d'hydrophilie ou lipophilie (Santier et Chamel, 1998). En ce qui concerne les composés lipophiles tels que ceux d'origine

pétrolière, leur voie de pénétration serait liée au mécanisme de dissolution-diffusion (Riederer et Friedmann, 2006). Dans ce système, la pénétration des molécules est réglée par les lois de la thermodynamique (Riederer et Friedman, 2006). Un équilibre de concentration s'établit entre le milieu extérieur (solide, gouttelettes d'eau, gaz) et intérieur (la cuticule). Dans la nature, cet équilibre est également fonction de la température ambiante. Pour ce type de molécule, le transfert entre un milieu aqueux et la cuticule donne une enthalpie négative et correspond donc à une réaction exothermique. Le coefficient de partition cuticule/eau diminue avec l'augmentation de la température et il varie en fonction des molécules. Le mécanisme de transport des composés lipophyles à travers la cuticule est plus complexe qu'un simple processus de diffusion expliqué par la loi de Fick (Riederer et Friedman, 2006). La taille de la molécule intervient.

Les HAP sont solubles dans l'eau quand ils comportent moins de 4 cycles aromatiques. Les HAP de plus haut poids moléculaire sont généralement insolubles dans l'eau et ont donc une forte affinité pour la surface des particules en suspension dans l'air. Par ailleurs, étant lipophyles, les HAP s'associent aisément à la matière organique comme les acides gras et les cires des plantes. Les cires épicuticulaires peuvent donc capter non seulement les particules mais aussi les contaminants présents dans l'air. Les HAP de grande taille (5/6 cycles notamment), déposées par les particules restent à la surface des feuilles alors que ceux de plus petite taille augmentent en proportion dans les cires épicuticulaires et à l'intérieur de la feuille ce qui montrerait leur capacité à pénétrer plus aisément vers l'intérieur (Khun *et al.*, 1998 ; Bakker *et al.*, 2001).

La pénétration des HAP dans les feuilles se ferait selon un processus en 2 temps ; une première accumulation serait rapide (de l'ordre de la journée à la semaine) et la seconde accumulation plus lente (à l'échelle du mois et de l'année) selon Simonich et Hites (1994). La première étape impliquerait le compartiment extérieur. Ensuite, une diffusion plus lente vers l'intérieur serait l'étape limitante pour la contamination de la feuille. Elle serait fonction de la température ambiante et des concentrations en HAP. Par ailleurs, les pluies éliminent vraisemblablement les HAP (Lodovici *et al.*, 1998). Seuls, ceux présents à l'intérieur du parenchyme restent. Une fois absorbés dans la matrice végétale, ces composés peuvent avoir des destins multiples. De ce fait, pour les arbres à feuilles caduques, l'absorption des HAP sur les feuilles serait régulière au cours d'une saison de croissance (Howsam *et al.*, 2001) alors que pour les arbres à feuilles persistantes, après accumulation pendant la période estivale, une forte baisse des HAP en période hivernale a été notée (De Nicola *et*

al., 2005 ; Alfani *et al.*, 2005). Smith (1981) a suggéré que les plus petites feuilles ont une plus grande capacité à accumuler et conserver les particules que les plus grandes.

Peng *et al.* (2011) notent l'augmentation d'un gène clé pour l'absorption des HAP à partir du sol : une protéine relative aux lipide-synthases, la monogalactosyldiacylglycerol synthase (MGDGS) qui catalyse la formation de monogalactosyldiacylglycerol (MGDG). Celui-ci participe pour une part importante à la constitution des membranes des chloroplastes. Une protéine de transfert des phospholipides, également capables de lier les acides gras, dans les membranes cellulaires est aussi très augmentée. Pour les auteurs, les lipides des membranes aideraient le naphthalène à pénétrer directement au contact des tissus ainsi que à partir de l'air ambiant.

3.2. Les effets physiologiques

L'une des raisons ayant conduit au classement des HAP dans la liste des polluants prioritaires de l'US-EPA et de l'EEA, est le caractère toxique de certains d'entre eux. Ce sont des molécules biologiquement actives qui, une fois accumulées dans les tissus organiques, peuvent subir des réactions de transformation sous l'action d'enzymes conduisant à la formation de dihydriols et/ou d'époxydes. Les métabolites ainsi formés peuvent avoir un effet toxique plus ou moins marqué en se liant à des molécules biologiques fondamentales telles que les protéines, l'ARN, l'ADN et en provoquant des dysfonctionnements cellulaires (Albinet, 2006).

Les effets des HAP sur les plantes dépendent de l'intensité et de la durée de l'exposition des plantes à ceux-ci (Kummerova *et al.*, 2006). Les plantes subissent l'effet des HAP comme un stress. En conséquence, divers mécanismes de réponses aux stress sont mobilisés à différents niveaux et peuvent atteindre tous les compartiments cellulaires (Figure 9). En réponse à ce stress, les plantes se défendraient en allouant plus d'énergie à leur maintien et notamment au maintien de leur métabolisme (Immel *et al.*, 2012).

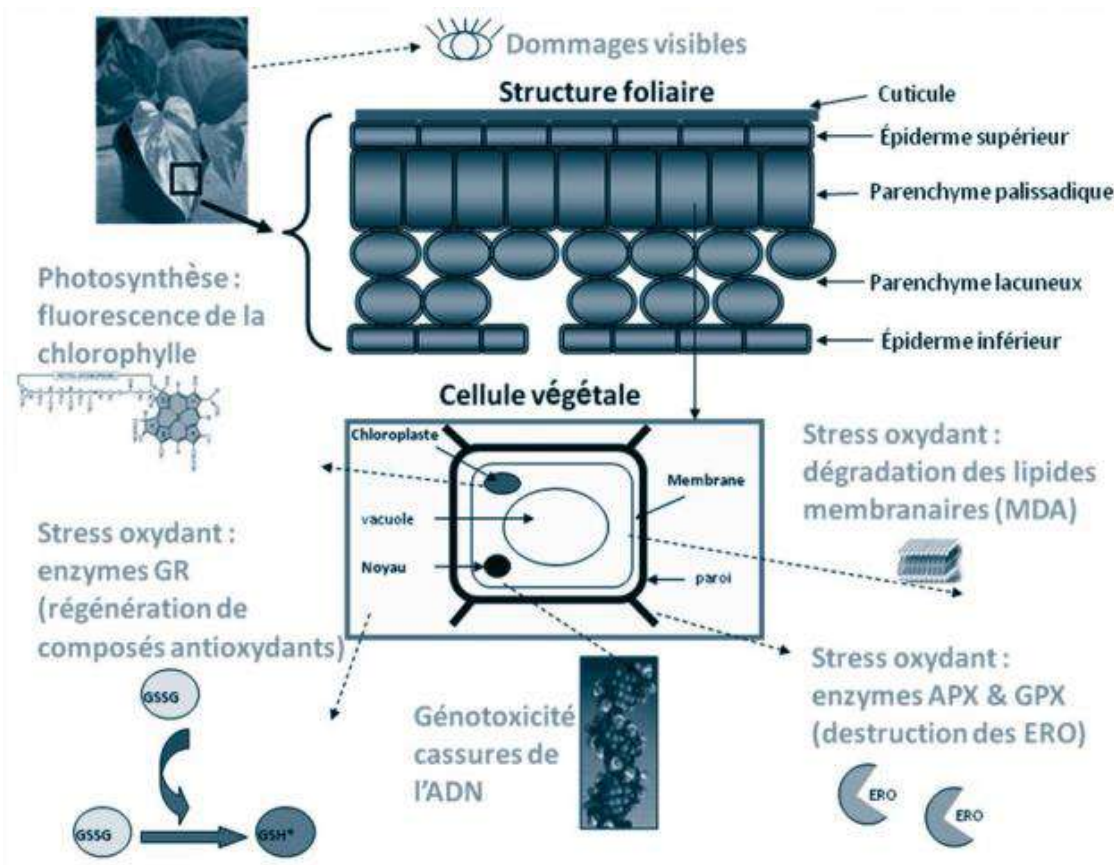


Figure 9 : Les observations des effets des polluants sur les feuilles à différents niveaux (Rzepka *et al.*, 2010).

Il existe très peu de travaux analysant la réponse globale du génome suite à un stress lié aux HAP. Trois travaux complets, l'un en protéomique, et deux en transcriptomique permettent de dégager les voies majeures impliquées dans la réponse aux HAP (Immel *et al.*, 2008 ; Weisman *et al.*, 2010 ; Dumas, 2013). L'étude de Immel *et al.* (2008) a été réalisée sur des plants de *Solidago canadensis* ayant poussé sur un sol pollué majoritairement par les métaux lourds, où les HAP représentent toutefois 37,6% des polluants potentiels. Celle de Weisman *et al.* (2010) ainsi que celle de Dumas étudient la réponse d'*Arabidopsis thaliana* croissant sur un milieu enrichi en phénanthrène. Les voies présentant le plus d'expressions différentielles de gènes sont celles de la photosynthèse, de la réponse aux stress, notamment au stress oxydant. Ainsi, dans l'étude du protéome, 21 protéines régulées sont relatives surtout au métabolisme des protéines, 11 à la réponse antioxydante, 13 métabolisme carboné, 6 à la transcription et la traduction et 5 au transport des ions. Certaines réponses seraient spécifiques de certaines HAP (Weisman *et al.*, 2010). Dumas (2013) a montré que la réponse métabolique

se faisait en deux temps, une première étape rapide dure de 30 min à 4h. Une seconde plus tardive s'établit entre 8h et 24h.

3.2.1. Effets sur la croissance et les voies de signalisation hormonales

Au niveau morphologique, les HAP entraînent des lésions sur les plantes qui peuvent être visibles. Ainsi chez des plants de tomates soumis au fluoranthène, les feuilles et rameaux présentent des nécroses ; les fruits sont plus petits et moins nombreux (Oguntimehin *et al.*, 2008). La biomasse est généralement affectée (Oguntimehin *et al.*, 2008 ; Desalne *et al.*, 2011). Ainsi, si les plants de tomates sont cultivés 21 jours sur un sédiment enrichi au phénanthrène (300 µM), ils subissent une perte de masse sèche de 32,2 % pour les tiges et de 63,9 % pour les racines (Ahmed *et al.*, 2011). Le naphthalène induit la même réduction de croissance et de biomasse chez *A. thaliana* (Peng *et al.*, 2011), ainsi que les HAP en mélange chez *Spartina alterniflora* (Watts *et al.*, 2006). Cette perte de biomasse peut être accompagnée d'une réduction de la longueur racinaire de l'ordre de 45 % chez *A. thaliana* exposé au phénanthrène (Liu *et al.*, 2009).

Les HAP induisant des effets sur la croissance, l'application d'hormones a été testée dans le cas de pollution aux HAP. Un traitement préalable à l'auxine avant l'application de faibles concentrations de fluoranthène entraîne une légère stimulation de la croissance et protège des plants de *Pisum sativum* de l'effet des HAP (Vanova *et al.*, 2009). La production d'acide abscissique est augmentée en présence de fluoranthène. De manière concordante, l'analyse du transcriptome de *A. thaliana* après application de phénanthrène montre une régulation positive des ARNm de l'acide abscissique ainsi que de l'acide jasmonique alors que ceux de l'acide gibbérellique et de l'auxine sont régulés négativement (Weisman *et al.*, 2010). Les HAP influenceraient également la voie hormonale d'une cytokinine, le N6-benzyladenine (Vanova *et al.*, 2009). Par ailleurs, une exposition de *Pisum sativum* au fluoranthène induit une production d'éthylène qui intervient dans la formation d'un tissu aérifère formé par des cellules lysées facilitant les échanges O₂/CO₂ (Vanova *et al.*, 2011). Cette phytohormone est connue pour jouer un rôle central dans les stress. L'induction du gène GSTF2 chez *A. thaliana* par les HAP a suggéré aux auteurs que la voie de signalisation de l'éthylène serait impliquée (Smith *et al.*, 2003 ; Alkio *et al.*, 2005 ; Weisman *et al.*, 2010).

3.2.2. Effets sur la reproduction

Les HAP affectent la reproduction ce qui se traduit par une réduction du nombre de fleurs et du taux de germination des graines. Ainsi, sur un substrat pollué aux HAP, seuls 59 % des plants de *Spartina alterniflora* produisent des fleurs pour 78 % en conditions témoins (Watts *et al.*, 2006). De plus, un retard à la germination est observable pour de nombreuses espèces. Une exposition de *A. thaliana* au phénanthrène 11 jours (1 mM) conduit à une réduction du taux de germination de 56 % (Liu *et al.*, 2009). Les effets varient suivant le type de molécule (Henner *et al.*, 1999). L'impact semble plus élevé lorsque les molécules sont sous forme volatile.

3.2.3. Effets sur la nutrition

Les HAP peuvent réduire les quantités d'éléments essentiels disponibles pour les plantes. Ainsi, la présence de HAP réduit la disponibilité du cuivre chez des plantes des prés salés (Almeida *et al.*, 2008). Une pollution aérienne au phénanthrène perturbe la captation de l'azote par les racines chez *Trifolium pratense*, alors que, dans la tige, le ratio carbone/azote reste stable (Desalme *et al.*, 2011). Le taux d'assimilation de carbone reste efficient, mais son allocation est modifiée. En effet, les feuilles retiennent 51 % du carbone en présence de HAP au dépend de la tige et des racines alors que dans le cas sain, seulement 39 % du carbone restent dans les feuilles. De plus, le cycle respiratoire semble aussi perturbé. Le carbone ré-émis est plus faible chez les plantes en présence de HAP (60-82 % versus 90-102 % chez les témoins) (Desalme *et al.*, 2011).

3.2.4. Effets sur les membranes

Les HAP ont des effets dommageables pour les cellules. En effet, leurs propriétés lipophiliques entraînent des dommages pour les parois et membranes cellulaires. Ainsi, chez des cellules racinaires de pieds de tomates (*Solanum lycopersicum*) traitées 21 jours au phénanthrène, les parois cellulaires deviennent plus fines et entrent en contact avec les membranes plasmiques en divers points (Ahammed *et al.*, 2011). De plus, les cellules présentent des irrégularités au niveau du noyau, des nucléoles réduits et des dépôts d'électrons denses dans les vacuoles et les espaces intercellulaires. Elles ont un nombre réduit d'organites (mitochondrie et réticulum endoplasmique). Une observation des chloroplastes et des mitochondries d'*Abidopsis thaliana* par microscopie électronique montre que leurs contours sont mal définis après traitement au phénanthrène (Liu *et al.*,

2009). En effet, la lamelle des chloroplastes est difficilement observable et les granats sont quasiment effacés. Les mitochondries deviennent translucides à l'observation et les replis membranaires sont presque indéfinis ce qui confirme les dommages membranaires.

3.2.5. Effets sur la photosynthèse

Les HAP ont des effets perturbateurs et inhibiteurs sur la photosynthèse. Dans les études de Immel *et al.* (2012) et de Weismann *et al.* (2010), les protéines/gènes relatifs à la photosynthèse, à la biosynthèse des chlorophylles et des caroténoïdes ainsi qu'au métabolisme carboné sont remarquablement sous-exprimés. Le catabolisme carboné est très affecté notamment au niveau de la rubisco et du photosystème II.

Les teneurs en pigments photosynthétiques sont réduites chez le pois, la tomate, le trèfle et *A. thaliana* soumis au fluoranthène, au phénanthrène ou au naphthalène (Kummerova *et al.*, 2006 ; Oguntimehin *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2009 ; Vanova *et al.*, 2009 ; Desalme *et al.*, 2011 ; Peng *et al.*, 2011). Le photosystème II est affecté. Chez le pois, il y a perte du potentiel électronique du photosystème II et de son efficacité (Kummerova *et al.*, 2006). Chez la tomate, il y a une diminution de la capacité maximale de fluorescence, des échanges gazeux, de l'assimilation du CO₂ et de la conductance des stomates (Oguntimehin *et al.*, 2008 ; Ahammed *et al.*, 2011).

3.2.6. Génération d'un stress oxydant

Les effets oxydants des HAP ont été mis en évidence tout d'abord sur des mammifères. Des traitements par instillation ou par inhalation ont mis en évidence des dommages liés au stress oxydant, notamment des dommages sur l'ADN allant jusqu'à la rupture de brins ou à une augmentation de molécules telles que le 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (un dérivé oxydé de la guanine) (Risom *et al.*, 2005). Pour réduire ou éviter les lésions induites par les formes réactives de l'oxygène, les organismes ont développé une batterie de défenses telles que les antioxydants primaires et secondaires. Les antioxydants primaires, comme l'acide ascorbique, la vitamine E et l'ubiquinone sont des protections non enzymatiques capables de subir des oxydoréductions en restant assez stables pour ne pas former de nouveaux radicaux. Une deuxième voie est composée d'enzymes (Figure 10). Ainsi, les superoxydes dismutases, les catalases, les glutathion réductases et les peroxydases peuvent éliminer ces formes réactives (Limon-Pacheco *et al.*, 2009). Chez les végétaux, les approches globales de génomique montrent que

les réponses antioxydantes sont aussi impliquées lors d'un stress par les HAP (Weisman *et al.*, 2010 ; Immel *et al.*, 2012 ; Dumas, 2013).

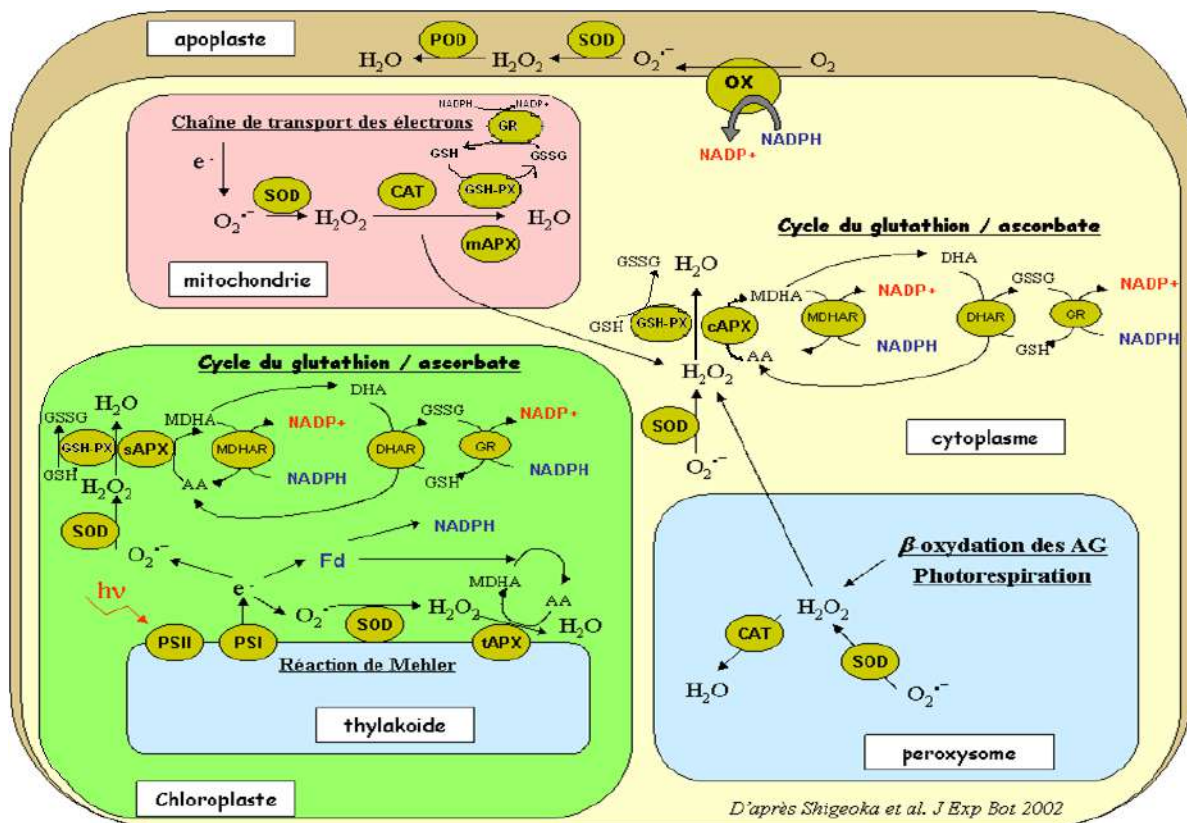


Figure 10 : Les enzymes antioxydantes et leurs localisation dans la cellule (modifiée par Shigeoka *et al.*, 2002).

La pollution aux HAP génère la production d'H₂O₂. Ainsi, un traitement au phénanthrène des feuilles entraîne une augmentation d'H₂O₂ chez *Solanum lycopersicum* (Ahammed *et al.*, 2011) ou *Arabidopsis thaliana* (Liu *et al.*, 2009 ; tableau 3). En réponse à cette production de ROS, le malondialdéhyde (MDA), témoin de la peroxydation lipidique augmente également (Ahammed *et al.*, 2011). Les mécanismes de défense se mettent en place. Chez la tomate, le traitement au phénanthrène déclenche une stimulation de l'activité superoxyde dismutase (SOD) dans les feuilles et une diminution dans les racines. Par contre, les activités gaiacol peroxydases (GPX), catalases (CAT), ascorbate peroxydase (APX), glutathion réductase (GR) et polyphénol oxydase (PPO) augmentent pour les feuilles comme pour les racines (Ahammed *et al.*, 2011). Chez *Arabidopsis thaliana*, la teneur en glutathion augmente fortement ; les activités enzymatiques sont induites ou réprimées de manière dose-dépendante (Liu *et al.*, 2009 ;

tableau 3). Ainsi, l'expression des gènes des catalases, ascorbate peroxydases et SOD est diminuée (Weisman *et al.*, 2010). Chez *Solidago canadensis*, les catalases sont sur-exprimées, les SOD et peroxydases sous-exprimées (Immel *et al.*, 2012). Certaines peroxydases peuvent toutefois être sur-exprimées (Tervahauta *et al.*, 2009).

3.1.4 Élimination des hydrocarbures dans la plante

Les xénobiotiques les plus toxiques pour les organismes portent des sites électrophiles (avidés d'électron), de faible densité électronique, capable d'accepter aisément une paire d'électrons pour former une liaison covalente. En effet, ils peuvent exercer leur toxicité en se liant à un site nucléophile, site riche en électrons (Coleman *et al.*, 1997). Le glutathion (GSH: γ -Glu-Cys-Gly) agit dans la cellule à la fois comme agent protecteur du stress oxydant et comme un nucléophile pour éviter la toxicité des xénobiotiques. Tous les organismes ont mis en place des systèmes d'élimination des xénobiotiques par métabolisation. Chez les plantes, si ces voies sont moins connues pour l'élimination des hydrocarbures, elles ont été bien démontré pour divers xénobiotiques selon le mécanisme du « green liver » (pour une revue voir Eapen *et al.*, 2007). Les travaux de Weisman *et al.* (2011), Peng *et al.* (2011), Ahammed *et al.* (2010) et Dumas (2013) soutiennent un mécanisme qui semble similaire à celui des autres xénobiotiques pour les HAP (Figure 11).

La métabolisation des xénobiotiques est connue pour se dérouler en 3 séquences nommées phase I, II et III (Figure 11).

Dans la première phase, une activation/transformation des xénobiotiques lipophiles est mise en place par l'action d'enzymes telles que les cytochromes P450 monooxygénases ou peroxydases. Les réactions induites sont variables suivant le type de métabolites (oxydation, hydrolyse, réduction). Peng *et al.* (2011) ont montré l'induction de 8 gènes de P450 monooxygénase avec une augmentation de 2 à 22 fois chez *A. thaliana* en présence de naphthalène dans le milieu de culture.

Dans la phase II, le xénobiotique métabolisé est lié à un sucre, un acide aminé ou un groupement sulfhydryl (-SH) du glutathion pour donner une forme hydrosoluble. Cette conjugaison réalisée dans le cytosol par des enzymes telles que les glutathion-S-transférases (GSTs), glucosyl transférases (GTs) et malonyl transférases donne un composé moins toxique. Les glutathion-S-transférases catalysent l'attaque nucléophile d'un atome de soufre du glutathion sur un groupement électrophile du xénobiotique. Le composé obtenu est plus soluble et plus facile à excréter ou compartimenter. L'implication de plusieurs GST lors d'un stress aux hydrocarbures est mise en relief dans les études de Weisman *et al.* (2010) et Dumas

(2013) confirmant ainsi ce processus chez *Arabidopsis* après application de phénanthrène. Ahammed *et al.*, (2011) ont montré l'augmentation du niveau de transcripts de GST après l'application de phénanthrène dans les feuilles de la tomate. Ceci s'accompagne d'une augmentation de la teneur en glutathion réduit et oxydé et d'une baisse du rapport GSH/GSSG montrant la consommation du glutathion réduit pour lutter contre le stress oxydant et l'élimination des hydrocarbures.

Dans la phase III, le xénobiotique est déplacé du cytosol vers les vacuoles ou l'apoplasme par un transporteur lié aux membranes qui utilise de l'ATP. Cette localisation évite les interactions des xénobiotiques avec les métabolites vulnérables du cytosol. Des transformations peuvent encore avoir lieu à l'intérieur de la vacuole.

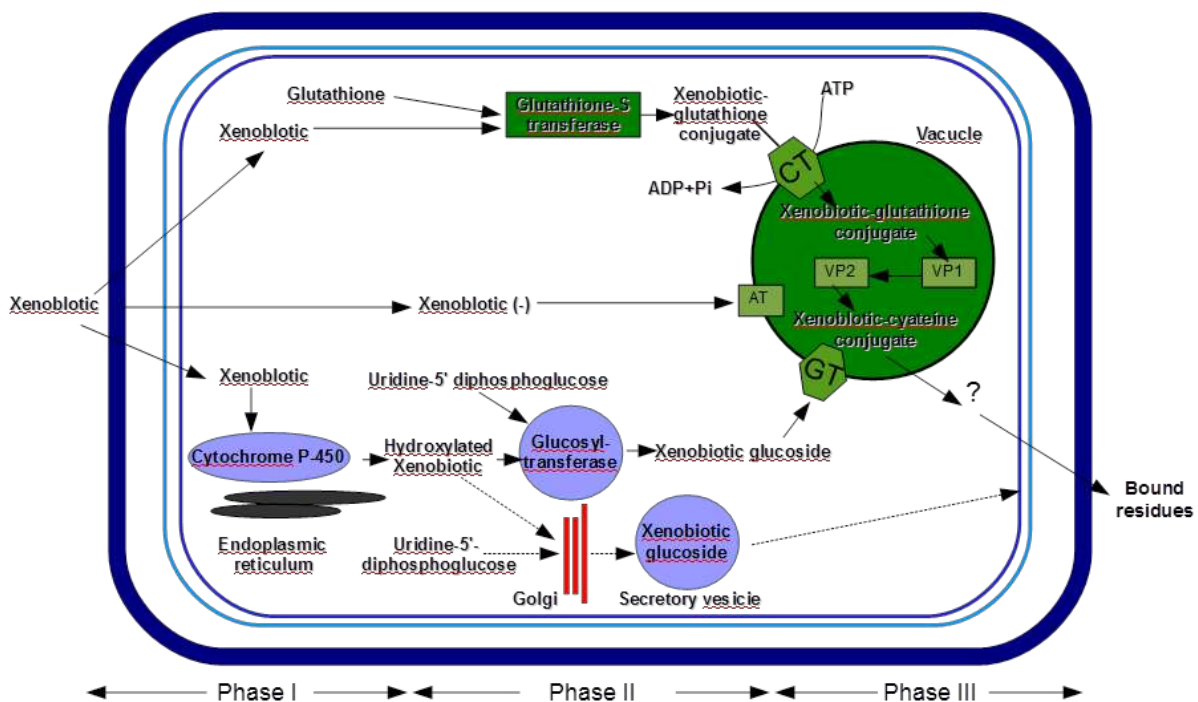


Figure 11 : Les différentes étapes permettant la détoxification des xénobiotiques dans les plantes en fonction des compartiments cellulaires. Les flèches en pointillées sont relatives à une voie impliquant la glucosylation des xénobiotiques. Les flèches en trait plein impliquent le glutathion (d'après Coleman *et al.*, 1997).

CT : glutathionconjugate transporter, *AT* : ATP-dependent xenobiotic anion (taurocholate) transporter, *GT* : ATP-dependant glucoside-conjugate, *VP* : vacuolar peptidase

4. Les modèles biologiques utilisés

Nous avons utilisé deux modèles biologiques pour répondre à l'objectif de cette thèse. Le premier était un lichen, largement utilisé dans les travaux cherchant à identifier des biomarqueurs de pollutions. Celui-ci s'étant révélé peu adapté au climat saharien, le travail a ensuite été repris et développé sur une espèce bien répandue au Sahara, le palmier-dattier.

4.1. Les lichens

4.1.1. Structure et fonctionnement des lichens

Les lichens sont définis comme une association symbiotique entre un champignon et une algue. Dépourvus de racines, feuilles ou fleurs ils prélèvent l'eau et les éléments nutritifs directement de l'atmosphère. Ils peuvent donc aussi absorber d'autres substances comme les polluants atmosphériques qui sont accumulés dans les tissus (Wolterbeek, 2002). La pollution atmosphérique peut induire une destruction des lichens en raison de l'éclatement de l'association symbiotique, à un degré variable en fonction de la sensibilité des espèces. Les lichens recouvrent environ 17 000 espèces représentant 8 % des écosystèmes terrestres et sont particulièrement importants dans les environnements extrêmes (Nash, 1996a ; Hale, 1983). Par conséquent, les lichens ont été largement utilisés en tant que bio-indicateurs sur une base de présence /absence d'espèces (Kinnunen *et al.*, 2003 ; Piervittori et Maffei , 2001 ; Domeno *et al.*, 2006).

Le lichen est un végétal complexe résultat du rapprochement de deux constituants: les hyphes, des filaments analogues à ceux d'un mycélium de champignons inférieurs et les gonidies, des cellules d'un végétal chlorophyllien (cyanophyte ou plus fréquemment chlorophyte). L'ensemble forme un thalle qui se présente en amas plus ou moins régulier de cellules. Ils sont composés des cellules algales et des hyphes, l'ensemble étant compacté de manière variable. Une coupe transversale dans le thalle montre 3 couches, de la face supérieure à la face inférieure :

- Un cortex composé de grandes cellules polyédriques, souvent bi- ou trinuéclées, unies par un ciment composé de mucilages et d'hémicelluloses. C'est une couche protectrice contre les agresseurs, la dessiccation et l'excès de lumière. Elle est constituée d'un réseau dense de filaments.
- Une couche gonidiale composée des cellules algales.

- Une médulle composée de filaments mycéliens ou hyphes, sub-horizontaux et lâches. Elle peut être épaissie et former des veines, saillantes sous le thalle, aux cellules longues et étroites, à parois épaisses. Les veines sont recouvertes, à leur base, d'un tomentum dense à cellules courtes, à membranes épaisses. La médulle est la zone d'attachement au substrat qui est plus ou moins complexe en fonction des lichens.

Au niveau cellulaire, les contacts sont étroits avec, dans certains cas, la mise en place de structures spéciales (appressorium et/ou suçoir) pour faciliter les échanges. L'algue fournit les métabolites carbonés issus de la photosynthèse (polyols pour les algues vertes, glucose pour les cyanobactéries), de l'ammonium issu de la fixation de l'azote atmosphérique lorsque le partenaire est une cyanobactérie, ainsi qu'éventuellement des vitamines. Le champignon a un rôle de protection et de fait, les lichens sont capables de résister à des dessiccations importantes. Ils deviennent physiologiquement inactifs quand leur teneur en eau est réduite à 20% de leur poids sec (Van Haluwyn et Lerond, 1993). Ils produisent une grande variété de substances toxiques servant de protection contre les stress biotiques (herbivores notamment) ou abiotiques (lumière), (Deruelle et Lallemand, 1983).

Grâce à leur remarquable résistance aux conditions extrêmes, les lichens colonisent des milieux particulièrement inhospitaliers, rochers, écorces, toundras arctiques. Certaines espèces peuvent résister à -10° à -30° C dans l'Arctique, d'autres s'adapter aux conditions désertiques ou supporter la submersion régulière des eaux salées des océans. Toutefois, si les lichens considérés dans leur ensemble représentent un groupe très plastique présent à peu près partout, chaque espèce a ses exigences propres. Le substrat intervient dans l'adaptation des différentes espèces par ses caractéristiques physiques (consistance, porosité, perméabilité) ou chimiques (réaction ionique, teneur en calcium et en nitrate) (Ozenda et Clauzade, 1970). Les facteurs physiques et mécaniques conditionnent la pénétration du thalle dans le substrat, et l'économie de l'eau. Les facteurs chimiques interviennent notamment au niveau de la richesse en substances minérales solubles, déterminante pour certaines espèces (Van Haluwyn et Lerond, 1993). L'atmosphère rassemble sur le plan écologique un ensemble de facteurs importants, les lichens y puisant une partie de l'eau, le gaz carbonique et les sels minéraux apportés par la pluie ou le vent.

A l'état sec (à 20 % de leur poids sec), ils peuvent résister à des températures de 100° C en zone exposée au soleil. A l'état hydraté, leur résistance est moindre (40 à 50° C) (Deruelle et Lallemand, 1983). La lumière agit sur le taux de photosynthèse ; les lichens ont 4 à 10 fois

moins de chlorophylle que les plantes supérieures à poids égal. Le vent agit de manière indirecte par une augmentation de la vitesse de dessiccation des thalles ainsi que de manière directe par dispersion des fragments de lichens. Les lichens sont extrêmement sensibles aux impuretés contenues dans l'atmosphère et en particulier aux fumées et aux poussières industrielles et domestiques ce qui permet de les utiliser comme bio-indicateurs (Ozenda et Clauzade, 1970).

4.1.2. Réponse des lichens à la pollution et utilisation en bio-indication

La réponse des lichens à la pollution peut se traduire de trois manières : sensibilité des espèces conduisant à la mort, résistance et tolérance ou remplacement par une autre communauté. Trois mécanismes ont été mis en avant dans l'absorption des métaux par les lichens, pollution qui a été la plus étudiée :

- L'absorption intracellulaire grâce à un processus d'échange,
- L'accumulation intracellulaire,
- Le piégeage des particules qui contiennent des métaux.

La teneur en métaux lourds dans les thalles des lichens a tendance à suivre un modèle d'alternance au cours du temps avec des phases d'accumulation et ensuite de libération. Les conditions locales peuvent influencer cette accumulation. La relation dose-effet n'est pas linéaire ce qui peut provoquer des problèmes d'interprétation dans l'évaluation des dommages causés aux organismes et aux écosystèmes (Conti et Cecchetti, 2001). Les lichens ont été utilisés en tant que bioindicateurs et/ou bioaccumulateurs de plusieurs façons :

- En relevant toutes les espèces présentes dans une zone donnée en fonction de critères de pollution,
- Par l'échantillonnage et la mesure des polluants accumulés dans le thalle,
- En transplantant des lichens d'une zone non contaminée dans une zone contaminée et en évaluant les changements morphologiques ou physiologiques dans le thalle du lichen et/ou la bioaccumulation des polluants (Conti et Cecchetti, 2001). La transplantation lichénique a l'avantage d'être applicable même dans une zone désertique où il n'existe pas un substrat approprié (Conti et Cecchetti, 2001 ; Szczepaniak et Biziuk, 2003).

Comme bio-indicateurs de la pollution de l'environnement, les lichens présentent plusieurs avantages :

- Ils ont une large distribution géographique. Ils ont une croissance lente et conservent une morphologie relativement uniforme sur une longue période de temps (Ahmadjian, 1993).
- Ils peuvent accumuler de nombreux composés à des concentrations élevées en raison de l'absence de cire et de stomates sur la surface des thalles du lichen ce qui permet la diffusion de contaminants dans les tissus.
- Ils perdent de l'eau par évaporation pendant les périodes sèches ce qui peut conduire à la concentration des polluants et donc à une augmentation de leur sensibilité.
- Ils peuvent avoir une activité photosynthétique (une cible principale de la pollution) à basse température et sont par conséquent, sensibles tout au long de l'année (Nash, 1996b ; Gries, 1996).

Pour ce travail, le lichen, *Xanthoria parietina*, a été choisi parce que c'est une espèce très commune de lichen, à large répartition géographique (Domeno *et al.*, 2006). Il est parmi les lichens les plus largement utilisés dans les programmes de biosurveillance (Nimis *et al.*, 2001). *X. parietina* présente une grande surface de contact pour les polluants atmosphériques et est capable d'accumuler de grandes quantités de métaux lourds (Scerbo *et al.*, 1999 ; Scerbo *et al.*, 2002 ; Cuny *et al.*, 2004).

Bien que la tolérance de *X. parietina* soit connue depuis longtemps (Hawksworth et Rose, 1970), les mécanismes mis en jeu dans cette tolérance sont mal compris. Sanita di Toppi *et al.* (2004, 2005) ont observé des réponses complexes à court terme aux concentrations environnementales pertinentes de métaux (Cr et Cd) chez cette espèce. Ils ont trouvé une immobilisation des métaux par la partie externe de la paroi cellulaire, des niveaux accrus d'acide ascorbique, une diminution des concentrations de glutathion réduit et une augmentation de l'activité de la gaïacol peroxydase. Les métaux lourds génèrent un stress oxydant quantifié par des niveaux accrus de malondialdéhyde (MDA) (Monnet *et al.*, 2006 ; Dzubaj *et al.*, 2008). La pollution au Cd a provoqué chez *X. parietina* une augmentation de la formation de MDA en raison de la peroxydation des lipides membranaires. Pawlik-Skowronska *et al.* (2002) ont constaté que les thalles du lichen synthétisent des peptides thiols de bas poids moléculaires (phytochélatines) en réponse à la présence de certains métaux lourds (Cd, Pb, Zn). Des altérations physiologiques ont été démontrées telle qu'une dégradation de la chlorophylle et la modification de l'assimilation des pigments des lichens (Garty *et al.*,

1985, 2002 ; Chettri *et al.*, 1998 ; Backor et Zetikova ², 2003). La mesure de l'activité du photosystème de l'algue est souvent utilisé pour évaluer l'état physiologique des lichens (Branquinho *et al.*, 1997 ; Garty *et al.*, 2000 ; Backor et Fahselt, 2004) ainsi que les changements dans la respiration et la photosynthèse en réponse à la pollution atmosphérique (Bartók *et al.*, 1992).

A la suite d'une première étape du travail, il s'est révélé nécessaire de choisir un nouveau modèle biologique. Le palmier dattier a été retenu.

4.2. Le palmier dattier

Le palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.) est «l'arbre» emblématique des oasis des zones semi-arides et arides constituant des agrosystèmes spécifiques avec une importante diversité agrobiologique. La présence du palmier est tributaire de la présence d'eau, qu'elle soit d'origine phréatique, liée à l'écoulement (oueds ou wadis) ou à un captage (Terral *et al.*, 2010). Les agrosystèmes des oasis sont basés sur l'association hiérarchisée (horizontalement et verticalement) dans un même espace irrigué, d'espèces fruitières arborescentes sous lesquelles de nombreuses espèces vivrières sont cultivées. Le palmier dattier est le pivot de la strate arborescente autant pour son rôle essentiel dans l'économie de subsistance des sociétés traditionnelles, actuelles et passées que pour l'agrosystème. En effet, la production de dattes reste actuellement une culture de subsistance extrêmement importante dans la plupart des régions désertiques (FAO, 2004).

4.2.1. Généralités

La grande majorité des espèces de la famille des palmiers est concentrée dans les régions intertropicales de la planète, majoritairement les forêts équatoriales et tropicales humides. Il existe quelques exceptions : certains palmiers vivent dans des zones sèches, d'autres dans des marécages (ou même dans les cours d'eau), certains sont en haute montagne (jusqu'à 4000 m dans les Andes), et quelques-uns survivent même dans des régions tempérées. Leur taille et leur forme peuvent donc être assez variables. Hormis les formes connues de type «arbre», il existe de petits palmiers, sans tronc, de la taille d'une espèce herbacée. Beaucoup de petits palmiers de sous-bois atteignent rarement 1 m de hauteur. A l'opposé, des palmiers géants peuvent atteindre 60 m de hauteur (Albano, 2004). Les palmiers forment une vaste famille végétale, de plus de 2800 espèces: celle des Arecaceae (ou Palmaceae) appartenant

aux monocotylédones. De nouvelles espèces sont identifiées chaque année (Albano, 2004). Le palmier-dattier a été dénommé *Phoenix dactylifera* par Linné en 1734. Phoenix dérive de Phoinix, nom du dattier chez les grecs de l'antiquité qui le considéraient comme l'arbre des phéniciens ; Dactylifera vient du latin dactylus dérivant du grec daktulos, signifiant doigt, en raison de la forme du fruit .Il est considéré comme une espèce fruitière peu exigeante mise à contribution pour mettre en valeur des régions défavorisées où la plupart des plantes cultivées végéteraient (Munier, 1973). Le genre Phoenix est constitué de 14 espèces distribuées des îles de l'Atlantique à travers l'Afrique, le Sud de l'Europe, le Moyen-Orient, et l'Asie du Sud jusqu'aux Philippines; (Gros-Balthazard *et al.*, 2011).

Les vestiges archéobotaniques les plus anciens, attestant de la consommation de dattes, sont des graines carbonisées et minéralisées d'assemblages néolithiques dans la péninsule d'Oman en Arabie orientale et datées du VI^e millénaire av. J.-C. (Beech et Shepherd 2001 ; Beech, 2003 in Terral *et al.*, 2010). De là, sa culture s'est développée autour du golfe persique puis s'est propagée vers les autres pays du Maghreb comme la Tunisie, l'Algérie, le Sud Marocain pour atteindre ensuite l'Adrar Mauritanien (Munier, 1973 ; Terral *et al.*, 2010).

4.2.2. Répartition géographique

La culture du palmier dattier est concentrée dans les régions arides au Sud de la Méditerranée et dans la frange méridionale du proche Orient depuis le Sud de l'Iran à l'Est jusqu'à la côte atlantique de l'Afrique du Nord à l'Ouest, entre les altitudes 35° Nord et 15° Sud (Figure 12). En Europe, seule l'Espagne produit des dattes principalement dans la célèbre palmeraie d'Elche, à l'Ouest d'Alicante (39° Nord).

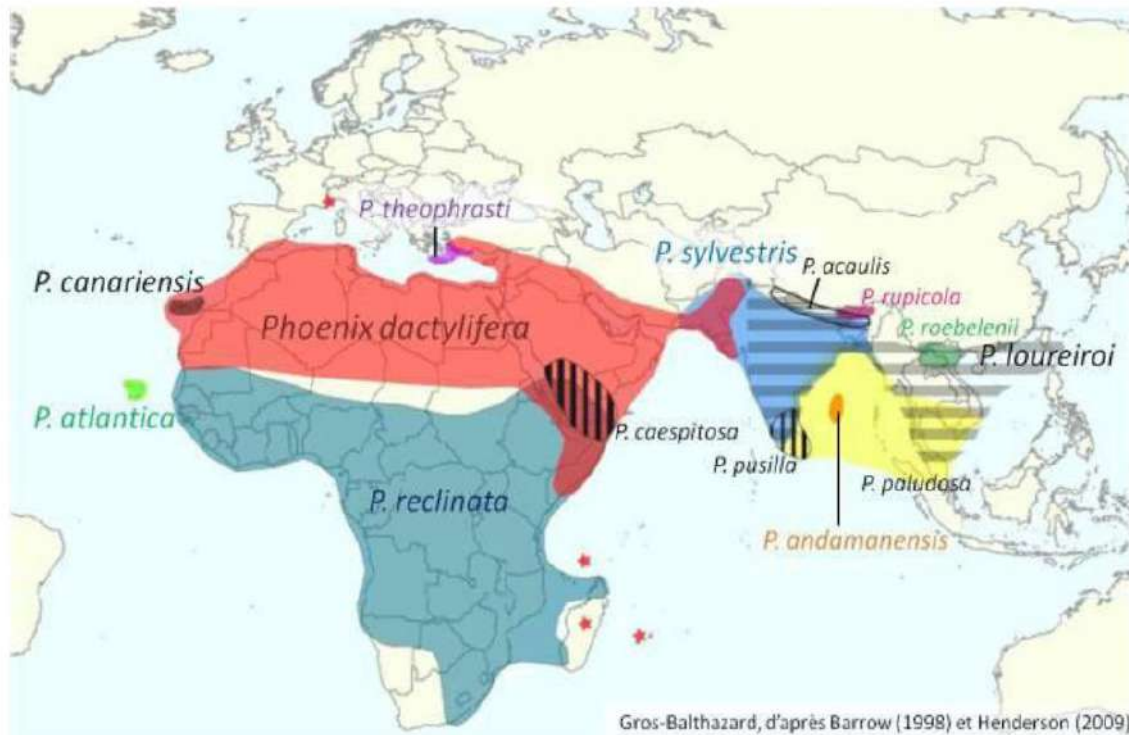


Figure 12 : Répartition des palmiers en Afrique et au Moyen-Orient (Gros-Balthazard *et al.*, 2011).

Le palmier dattier est également cultivé à plus faible échelle au Mexique, en Argentine et en Australie. Aux Etats-Unis, le palmier dattier fut introduit au XVIII^e siècle mais sa culture n'a débuté réellement que vers les années 1900 avec l'importation des variétés algériennes, en particulier la **Deglet-Nour**, et des variétés Iraquiennes en Californie (Hilgeman, 1972).

En termes de production, l'Algérie se place en 4^{ème} ou 6^{ème} position mondiale après l'Iraq, l'Iran, l'Arabie saoudite suivant que l'on s'intéresse aux nombres de palmiers ou à la production de dattes (Figure 13 et Tableaux 3 et 4). Il faut noter que ces données datent de 1996 et qu'il n'y a pas eu de mise à jour récente. De plus, certaines affectations de lieux semblent erronées et les chiffres réels pourraient donc être différents. Ainsi, les wilayas algériennes de Biskra et Bousaada sont imputées à la Tunisie sur le site de la FAO (<http://www.fao.org/docrep/006/y4360e/y4360e06.htm#bm06.2>).

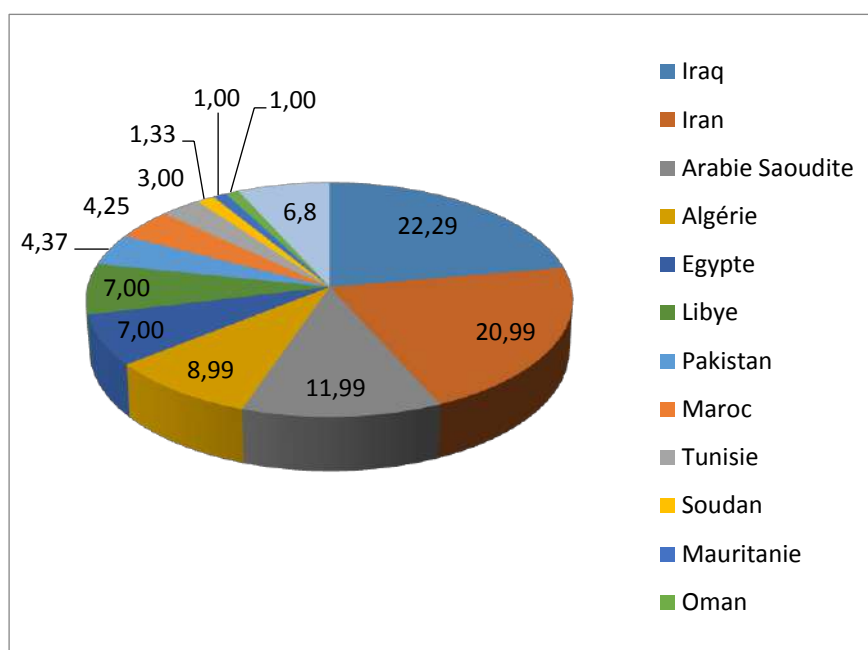


Figure 13 : Répartition de la culture du palmier dattier dans le monde (en % de palmiers plantés) pour les pays ayant une production de plus de 1 %. Graphique établi d'après les données de la (FAO, 2013).

Tableau 3 : Évolution de la production de dattes par pays (Quintaux) de l'année 1998 à 2003. (Source : FAO, 2003).

Année	1998	1999	2000	2001	2002	2003
Pays						
Irak	6.300,000	4.380,000	4.000,000	5.123,000	6.565,200	-
Iran	9.181,310	9.083,400	9.083,400	8.749,860	8.750,000	8.750,000
Egypte	8.398,050	9.059,530	9.059,530	11.132,700	11.150,000	11.150,000
A-saoudite	6.480,000	7.120,000	7.120,000	8.180,000	8.290,000	8.300,000
Pakistan	7.216,430	5.798,800	5.798,000	6.302,810	6.500,000	6.500,000
Algérie	3.873,130	4.275,830	4.275,830	4.373,320	4.370,000	4.370,000
Oman	2.360,000	2.820,000	2.280,000	2.659,000	3.123,200	2.386,110
Soudan	1.750,000	1.755,000	1.755,000	3.000,000	2.500,000	2.500,000
Libye	1.300,000	1.320,000	1.320,000	1.400,000	1.400,000	1.400,000
Tunisie	1.030,000	1.030,000	1.030,000	1.050,000	1.100,000	1.150,000

Tableau 4 : Evolution des superficies des palmeraies (ha) et de la production des dattes (Qx) en Algérie de 1990 à 2003 (Source : FAO, 2003).

Année	Superficie cultivée (ha)	Production (Qx)
1990	78,640	2.059,070
1991	81,890	2.090,920
1992	83,440	2.605,150
1993	84,410	2.616,120
1994	85,230	3.171,840
1995	87,020	2.851,550
1996	96,560	3.606,370
1997	96,520	3.029,930
1998	97,990	3.873,130
1999	100,120	4.275,830
2000	100,120	3.656,160
2001	120,036	4.373,320
2002	135,059	4.184,270
2003	135,000	4.200,000

En Algérie, la culture du palmier dattier est principalement localisée dans le nord du Sahara (tableau 5).

Tableau 5 : Répartition du potentiel phoenicicole algérien (2001).

Wilaya	Surface (ha)	Nombre de palmiers		%
		Total	en rapport	
Adrar	19,625	2.704,780	1.997,650	73,85
Biskra	24,894	2.533,360	1.998,580	78,89
Béchar	4,745	679,530	315,650	46,45
Tamanrasset	2,480	355,570	246,000	69,18
Ouargla	16,811	1.934,200	1.585,770	82,00
Illizi	550	75,220	50,420	67,03
Tindouf	138	14,770	2,760	18,68
El-Oued	27,395	2.774,000	2.140,000	77,15
Ghardaia	5,626	723,720	566,330	78,25
Autres Wilayas présahariennes	2,126	240,500	162,450	67,55
Totaux	101,820	12.035,650	9.065,610	75,32

Source : Ministère de l'Agriculture Algérien : Direction des Services Agricoles.

4.2.3. Cycle végétatif

Le genre *Phoenix* est unique pour sa morphologie mais aussi son développement. Cinq phases de développement dans la croissance des palmiers peuvent être distinguées. Sans être strictement définies, elles sont décrites sur des critères morphologiques alors qu'elles correspondent en réalité à des périodes physiologiques qui ne sont ni connues avec exactitude, ni bien comprises :

- **Stade 1, La graine.** Elle possède un albumen (endosperme) dur et corné dont l'embryon dorsal est toujours très petit par rapport à l'albumen (2 à 3 mm).
- **Stade 2, Phase germinative.** A ce stade, la germination puis la plantule vivent sur les réserves de l'albumen. La première feuille est de forme linéaire et lancéolée. Cette forme est une des caractéristiques du genre *Phoenix*.
- **Stade 3, Construction de la plante.** Cette phase post germinative est la plus importante dans l'ontogénie des palmiers car elle aboutit à la constitution de l'axe primaire. La plante devient autotrophe et son système vasculaire doit se construire. Durant cette phase appelée aussi "phase d'établissement" on observe une série de feuilles à limbe para penné puis penné et qui ont une insertion spiralée caractéristique du genre *Phoenix* (Figure 14D).
- **Stade 4, la phase adulte végétative.** Le dattier construit son tronc ou stipe et acquiert le « port de palmier » grâce à une croissance continue de l'axe végétatif. Cette phase dans laquelle il produit essentiellement des feuilles et accumule des réserves peut durer de 3 à 8 ans. Le tronc couvert par la base des feuilles anciennes mortes et/ou coupées, peut atteindre 20 à 30 m de haut et environs 1 m de diamètre (Figure 14C et E).
- **Stade 5, La phase adulte reproductive.** Entre la 5ème et la 8ème année (pouvant aller jusqu'à 10 ans) le dattier commence à produire des inflorescences (Figure 14). Le dattier étant dioïque, ce n'est qu'à ce stade que l'on peut reconnaître son sexe (les quatre stades précédents apparaissent identiques chez les pieds mâles et femelles). Ceci entraîne une allogamie obligatoire qui permet un brassage génétique mais aussi une hétérozygotie (Riedacker *et al.*, 1990).

4.2.4. Morphologie du palmier dattier

Le palmier est une monocotylédone arborescente. Il possède un bourgeon terminal, ou apex qui assure sa croissance en longueur. Ce bourgeon terminal est unique, et il est protégé au centre de la couronne de palmes la plus jeune (Figures 14 et 15A). Il est cependant flanqué de bourgeons axillaires qui parfois le remplacent en cas de dommage localisé (Peyron, 2000).



A



B



C



D



E



F

Figure 14 : Le palmier dattier. A- Palmier adulte ; B et E- Rejet à la base des palmiers (palmeraie de Ain Moussa) ; C- Inflorescence mâle sur le marché de Ouargla ; D- Jeune feuille pliée sur elle-même, montrant les plissements à l'origine des folioles ; E- Inflorescence femelle dans la palmeraie de l'Université de Ouargla.

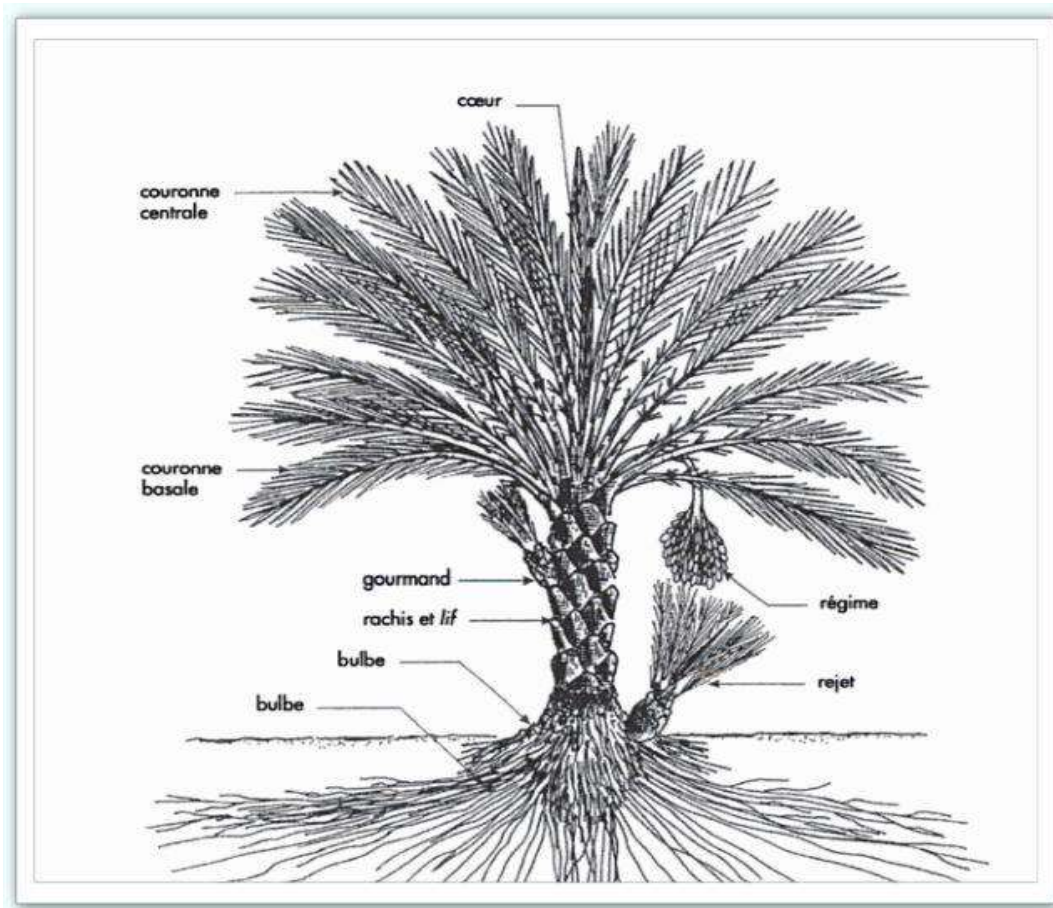


Figure 15 : Le palmier dattier (Peyron, 2000).

4.2.4.1. Le système racinaire

Le système racinaire du palmier dattier est de type fasciculé c'est-à-dire que les racines ne se ramifient pas et ont relativement peu de radicelles (Munier, 1973; Peyron, 2000). Le bulbe ou plateau racinal, est volumineux et émerge en partie au-dessus du niveau du sol. Le système racinaire présente quatre zones d'enracinement (Figure 16) :

- **Zone 1** : les racines «respiratoires» sont localisées au pied du palmier dattier dans la couche superficielle du sol (0,2 à 0,25 m de profondeur) ; elles servent, comme leur nom l'indique, aux échanges gazeux grâce à la présence de nombreux méats aérifères ou lenticelles dans leur partie corticale. De plus, de nombreuses racines adventives aériennes peuvent se développer à partir de la région basale du tronc.
- **Zone 2** : les racines «de nutrition» sont localisées dans cette zone très étendue surtout en culture unique ; elles représentent la plus forte proportion de racines du système. Ces racines sont longues, obliques ou horizontales et pourvues de

nombreuses radicelles. Elles peuvent se développer bien au-delà de la zone de la frondaison d'un palmier adulte, d'où l'importance des grandes cuvettes de plantation dans les palmeraies traditionnelles.

- **Zone 3** : les racines « d'absorption » sont plus au moins importantes selon le mode de culture et la profondeur de la nappe phréatique.
- **Zone 4** : les racines du faisceau pivotant peuvent être très réduites et se confondre avec la zone précédente suivant le niveau de la nappe phréatique. Toutefois, les racines de cette zone peuvent atteindre de grandes longueurs (17 m).

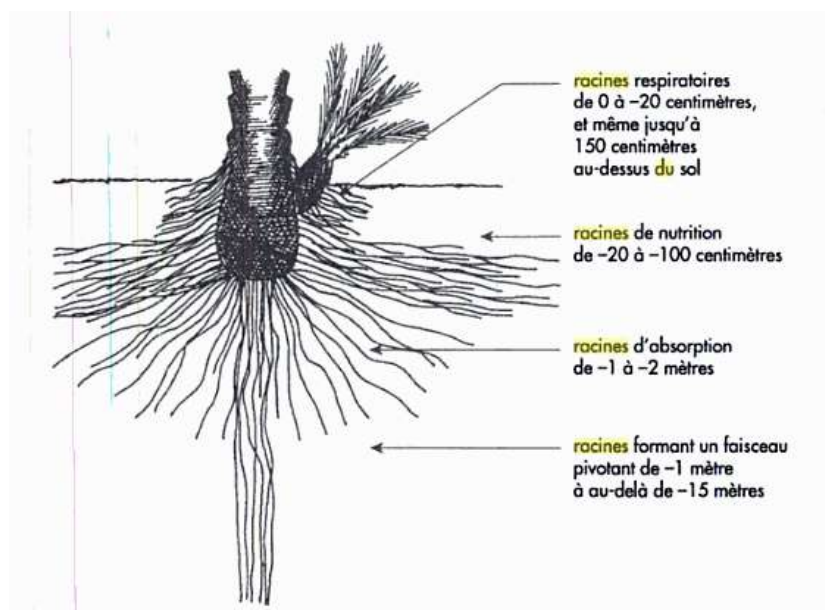


Figure 16 : Les différentes zones du système racinaire du palmier (Peyron, 2000).

4.2.4.2. Le tronc

Le tronc, appelé "stipe", est cylindrique sauf à la base, où l'on trouve les racines respiratoires (Figure 14A). L'élongation du tronc s'effectue au niveau de la couronne terminale par le bourgeon terminal ou phyllophore. Chez les jeunes sujets, le tronc est recouvert par la base des pétioles (kornaf) des anciennes palmes et, dans l'interstice de ceux-ci, par une bourre fibreuse : le fibrillum (*lif*).

A l'aisselle de chaque palme, se trouve un bourgeon adventif ou axillaire qui, en se développant, peut donner naissance :

- à une inflorescence dans la région coronaire (Figure 14F)
- à un rejet dans la région basale (Figure 14 B et E).
- à un gourmand dans la région moyenne et sous-coronaire.

Le stipe peut atteindre et dépasser 20 m de haut (Munier, 1973; Peyron, 2000; Albano, 2004).

4.2.4.3. La couronne ou frondaison

L'ensemble des palmes vertes forme les couronnes du palmier. On dénombre de 50 à 200 palmes chez un arbre adulte. Les palmes vivent de trois à sept ans, selon la variété et le mode de culture.

On distingue:

- la couronne basale, avec les palmes les plus âgées ;
- la couronne centrale, avec les palmes adultes ;
- les palmes du cœur, avec les palmes non ouvertes, dites "en pinceau", et les palmes n'ayant pas encore atteint leur taille définitive (Peyron, 2000).

Le palmier dattier forme de 10 à 20 palmes (jusqu'à 30) chaque année. Les jeunes palmes sont d'abord de grandes feuilles entières à nervation pennée, pliées sur elles-mêmes (Figure 14 D). En se développant, le limbe se déchire aux plissements et chaque élément se sépare pour former une feuille composée, pennée (Figure 17). Elles sont disposées sur le tronc en hélice. Elles demeurent en activité pendant plusieurs années, puis elles jaunissent, se dessèchent et meurent. Leur déclin est également lié à d'éventuels stress biotiques ou abiotiques (Munier, 1973). La palme, (*djerid*), possède un pétiole à la base (*kornaf*) qui gaine partiellement le tronc et est recouverte par le fibrillum, (*lif*) en partie.

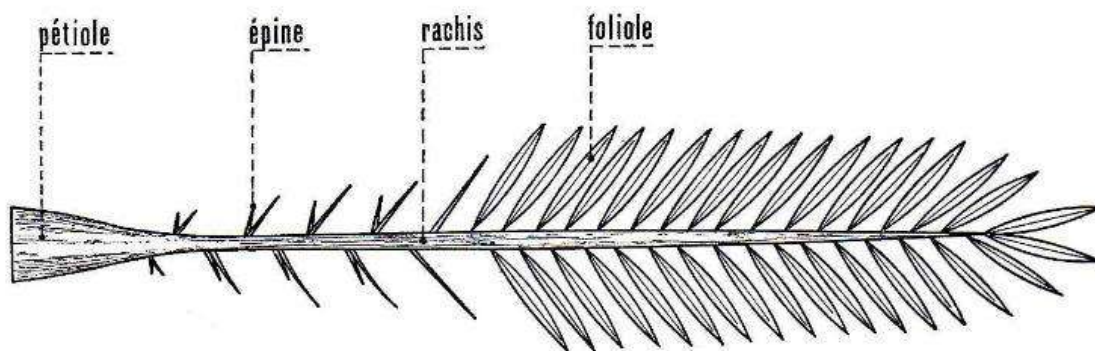


Figure 17: Une Palme (Peyron, 2000).

Le rachis porte les épines (*chouks*), et les folioles. Les épines sont en nombre et taille variables. Elles se transforment progressivement en folioles. Les caractéristiques morphologiques des folioles (finesse, rigidité et couleur) diffèrent selon le cultivar.

4.2.5. Ecologie du palmier dattier

La culture du palmier dattier (phoeniciculture) est pratiquée dans les régions chaudes arides et semi-arides du globe (Munier, 1973; Peyron, 2000). En effet, bien qu'originnaire de pays chauds et humides, il s'adapte à de nombreuses conditions.

C'est une espèce thermophile dont l'activité végétative se manifeste à partir de + 7 à + 10°C, selon les individus, les cultivars et les conditions climatiques locales. Le maximum d'activité correspond à des températures de 30 à 38 °C. Au-delà de 38 à 40 °C, l'activité végétative décroît rapidement.

Pour mûrir, la datte a besoin d'une chaleur estivale prolongée, mais sans excès, et d'une hygrométrie relativement faible. « L'indice brut" (somme des températures nécessaires pour atteindre le murissement) doit atteindre 3700 à 6000 °C, selon la variété (Toutain, 1979, 1989). Le palmier dattier est sensible à l'humidité de l'air pendant sa période de fructification. Pendant la floraison, une forte humidité favorise la pourriture des inflorescences et gêne la pollinisation en provoquant une germination du pollen. A l'époque de la maturation, elle empêche la transpiration des dattes nécessaire pour leur maturation. Si celle-ci ne peut s'effectuer, les dattes restent gorgées d'eau et ne mûrissent pas ; elles peuvent même éclater, et la pulpe, au contact de l'air humide, fermente et pourrit (Munier, 1973 ; Peyron, 2000).

Le palmier est une plante héliophile, c'est-à-dire qui aime le soleil. La disposition des folioles sur les palmes permet d'offrir un maximum de surface foliaire pour faciliter la photosynthèse et la maturation des dattes. En parallèle, cette organisation ralentit et arrête la croissance des organes végétatifs pour de fortes intensités de rayonnements. La croissance ne s'effectue alors normalement que la nuit, avec une activité ralentie le jour (Munier, 1973 ; Peyron, 2000). Une trop forte densité de plantation empêche la pénétration des rayons du soleil jusqu'au sol. La lumière est tamisée par le couvert des palmiers et les rejets tendent vers la lumière et s'effilent en poussant du cœur.

Le palmier résiste bien aux vents si l'alimentation hydrique est suffisante, mais divers accidents sont provoqués par leur action. Les vents les plus dangereux pour le palmier sont les vents chauds et desséchants, qui provoquent l'échaudage. Les dattes mûrissent trop

rapidement : les fruits peuvent être fripés et sont alors fortement dépréciés (Munier, 1973 ; Peyron, 2000).

4.2.6. Le palmier dattier et la bioindication

Le palmier a été étudié comme bioindicateur pour les cas de pollutions par les métaux lourds (Al- Shayeb *et al.*, 1995 ; Celik *et al.*, 2005 ; Al- Khlaifat et Al- Khashman, 2007). En effet, pour les pays des zones arides et semi-arides, il présente l'intérêt d'être présents sur une aire géographique importante comprenant notamment la Péninsule arabique et l'Afrique ainsi que d'autres pays comme l'Iran, le Pakistan ou les Etats-Unis. Comme pour les hydrocarbures, la pollution par les métaux et notamment le plomb provient de la fumée de l'industrie du pétrole, du trafic routier et des pollutions industrielles (EPA, 1996 ; Kovacs *et al.*, 1981). Cette pollution peut donc être atmosphérique ou concerner le sol.

Les premières recherches d'éléments sur le palmier dattier se sont concentrées autant sur les métaux que sur les nutriments dans les dattes. Yousif *et al.* (1982) ont recherché les éléments As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Y. Il a été montré que les feuilles et les fruits pouvaient accumuler de nombreux métaux ou métalloïdes tels que Ag, As, Ba, Be, Cr, Hg ou Ni (Pillay *et al.*, 2002 ; Pillay *et al.*, 2003 ; Williams et Pinay, 2011). Cette accumulation varie avec le stade de développement dans les fruits.

Les effets de la pollution atmosphérique ont été mis en évidence en Jordanie dans les sites industriels. Les échantillons présentent des concentrations élevées de Fe, Zn, Ni et Cr (Al-Khlaifat et Al-Khashman, 2007 ; Al- Khashman *et al.*, 2011) alors que les échantillons proches des zones de circulation routière possèdent de forte concentration en Cu, Ni et Pb. Bu-Olayan et Thomas (2002) ont montré le lien entre l'activité industrielle et la teneur en plomb dans les feuilles, les fruits ou l'écorce du palmier dattier au Koweït. La teneur la plus élevée atteint 5,06 µg/g dans les feuilles non lavées et 3,52 µg/g dans les feuilles lavées. De la même manière, Aldjain *et al.* (2011) ont déterminé les concentrations de plomb et de cadmium dans les résidus de lavage et dans les tissus des dattes dans 14 sites à Riyad, en Arabie Saoudite. Des teneurs importantes de plomb dans les eaux de lavage (jusqu'à 8,38 µg/g) et de cadmium (jusqu'à 1,19 µg/g) en lien avec l'augmentation des teneurs dans les sources anthropiques ont été révélées. La concentration moyenne de Pb et Cd dans tous les échantillons prélevés des différents sites restait toutefois dans les limites de sécurité recommandées par la FAO et l'OMS (Aldjain *et al.*, 2011). L'ensemble de ces travaux a

démonstré que les fruits et feuilles du palmier dattier pouvaient être utilisés comme indicateur de pollution.

La majeure partie des métaux semblent rester à la surface des feuilles ou des fruits. En effet, le lavage des feuilles élimine une partie des polluants (Bu-Olayan et Thomas, 2002 ; Khlaifat et Al-Khashman, 2007 ; Al- Khashman *et al.*, 2011 ; Aldjain et al, 2011). Ainsi, le Pb et le Zn ont été détectés en tant que contaminants superficiels des feuilles par Al-Shayeb *et al.*, dès 1995, dans les fibres (Al- Shayeb et Seaward, 2000a) et les dattes (Al- Shayeb , 2002a). La quantité qui pénètre dans les feuilles est variable suivant les métaux. Pour le plomb notamment, il y a un lien direct entre le dépôt sur les feuilles et la fraction qui pénètre ; 20 % du plomb seulement reste présent dans les feuilles après lavage (Bu-Olayan et Thomas, 2002). Par ailleurs, la distribution des métaux dans les palmes est liée à l'âge des feuilles (Al- Shayeb et Seaward, 2000b). La comparaison du comportement du palmier dattier avec le laurier rose, *Nerium oleander* L. montrent que si les dépôts (Pb, Cr, Cu , Li , Ni, Zn) sont légèrement plus importants sur le laurier, la fraction qui pénètre dans la feuille est similaire (Al- Shayeb , 2002b).

La pollution des sols est également une cause d'accumulation des métaux. Ainsi, l'irrigation par les eaux usées augmente les concentrations en Cu, Cd, Fe, Pb et Zn et dans les feuilles de palmiers dattiers (El Mardi et al., 1995 ; 1998 ; Aksoy et Ozturk , 1996). Par ailleurs, Williams et al. (2005) ont montré une corrélation entre les teneurs en Ba, La, dans les feuilles et Ti dans les fruits avec les teneurs dans le sol. Une forte concentration de Al (jusqu'à 34.9 mg g⁻¹) dans les fruits et (54,6 mg g⁻¹) dans les feuilles a été mise en évidence.

En ce qui concerne les mécanismes de résistance des palmiers dattiers, il s'agit d'une espèce sur laquelle il existe quasiment aucune donnée quant à sa physiologie et sa réponse au stress abiotique. La plupart des travaux portent sur les méthodes de culture *in vitro* et la résistance à sa principale maladie, la fusariose ainsi que sur la production de fruits et les mécanismes impliqués. Les seuls travaux en lien avec la physiologie portent sur sa résistance à la salinité.

Chapitre 2:

Matériel et méthodes

Chapitre 2: Matériel et méthodes

1. Présentation de la zone d'étude

La Wilaya de Ouargla se situe au sud-est Algérien à 800 km de la capitale, Alger (Figure 18). Elle est considérée comme le cœur économique de l'Algérie grâce aux gisements pétroliers et à ses ressources en eaux souterraines.

Elle occupe une superficie de 163 233 km². Elle est limitée :

- Au Nord : par la Wilaya de Djelfa, d'El-Oued ;
- Au l'Est : par la Wilaya de El-Oued et la Tunisie ;
- Au Sud : par Wilaya de Tamanrasset et d'Illizi ;
- A l'Ouest : par la Wilaya de Ghardaïa.

L'oasis de Ouargla est considérée comme l'une des plus grande oasis du Sahara algérien. Elle occupe le centre d'une cuvette endoréique appelée cuvette de Ouargla. C'est une cuvette de 1000 km² dans la basse vallée de l'oued Mya (134 m d'altitude) qui s'étend sur une soixantaine de kilomètres du sud au nord.

Les coordonnées géographiques de cette cuvette sont comprises entre :

- Pour la longitude, 5°15' et 5°25'
- Pour la latitude 31°55' et 32°00'



Figure 18 : Situation géographique de Ouargla en Algérie (données Google Earth 2014).

Deux champs pétroliers majeurs sont présents sur la Wilaya de Ouargla : Hassi Messaoud et Haoud Berkaoui.

1.1. Présentation des deux champs pétroliers (Hassi Messaoud et Haoud Berkaoui)

1.1.1. Hassi Messaoud

Le champ de Hassi Messaoud situé dans le Sud-Est Algérien représente la principale zone productrice d'hydrocarbures de Sonatrach (1ère compagnie d'hydrocarbures en Algérie et en Afrique) au Sahara Algérien. Il compte 934 puits producteur d'huiles et 129 puits injecteurs (gaz et eau). Il est situé à environ 80 km au Sud-Est de Ouargla.

Le champ est limité :

- Au nord-ouest par les gisements de et Haoud-Berkaoui et Guellala,
- Au sud-ouest par les gisements de d'EL- Gassi, Zotti et EL-Agreb,
- Au sud-est par les gisements de Rourd-el-Baguel et Mesdar,
- A l'est par le Bassin de Berkine.

Le premier puits a été découvert le 15 Juin 1956 (Tableau 6). La mise en production a eu lieu en 1958 avec 20 puits en exploitation. La superficie totale du champ est de 2500 km². Il est situé à 85 km au sud-est du chef-lieu de la wilaya de Ouargla et fait partie de la province triasique dont la superficie est plus de 280 000 km² et qui reste à l'heure actuelle la région pétrolifère la plus riche de l'Algérie. Le champ de Hassi Messaoud comptait au 15 Septembre 2004 :

- 760 puits producteurs d'huile,
- 90 puits secs et inexploitable,
- 94 puits injecteurs gaz,
- 38 puits injecteurs eau,
- 18 puits transformés en producteurs eau,
- 49 puits abandonnés (avec bouchons de ciment),
- 49 puits en attente d'abandon

Ces 1098 puits sont découpés en 25 zones de production. Chaque zone correspond à un groupement de puits.

Le gisement de Hassi Messaoud a été très exploité les premières années de sa découverte. Un long et vaste programme de développement plus important a été tracé vu l'importante capacité du gisement (Sonatrach, 2011).

Tableau 6 : Historique du champ pétrolier de Hassi Messaoud (Sonatrach, 2008).

<p>1956 Découverte par une campagne sismique gravimétrique du gisement de Hassi Messaoud. La SN REPAL réalise le premier forage pétrolier (MD1) sur le gisement de Hassi Messaoud le 15 janvier 1956.</p> <p>1957 Forage d'un deuxième puits OM1 le 16 Mai 1957, à 7 km du puits MD1 dans la partie Nord du champ, dans la continuité du premier gisement.</p> <p>1961 Mise en exploitation de la Raffinerie RHM1 d'une capacité de 720 m³/j dans l'UTB. Découverte, par la COPEFA – CEP des champs de Gassi Touil (GTL) & Gassi Touil Supérieur (GTS).</p> <p>1962 Découverte et mise en production du gisement de Rhourde El Baguel (REB).</p> <p>1964 Mise en service des deux premières stations de réinjection de gaz haute pression : UC1 au Nord & SC1 au Sud.</p> <p>1970 La production de pétrole atteint 23,2 millions de tonnes/an.</p> <p>1971 Nationalisation des hydrocarbures le 24 février. Création de la société ALREP (Algérie Recherche Exploitation Pétrolière, qui est une joint venture entre SONATRACH & CFPA) pour la gestion du champ HMD nord.</p> <p>1973 Mise en service de l'unité GPL sud & de la deuxième station de compression (SC2) dans le centre UTS. La station de compression est un prototype fonctionnant avec des compresseurs centrifuges entraînés par 2 turbines à gaz mono arbre.</p> <p>1975 Réalisation des premiers tests de potentiel sur des puits producteurs de gaz sur le champs de Gassi Touil (GTS).</p> <p>1976 Création de la région de Hassi Messaoud</p> <p>1978 Réalisation de stations de compression pour la récupération des gaz torchés. Reconversion de l'unité de stabilisation du brut N°2 en unité de fractionnement condensât (UFC) au CIS.</p> <p>1979 Mise en service au CIS de la raffinerie RHM2 d'une capacité de traitement de 1 million de tonnes/an, afin d'assurer l'approvisionnement du Sud Algérien en produits finis.</p> <p>1982 Introduction de nouvelles techniques sismiques (sismique 2D).</p> <p>1989 Par autorisation ministérielle, l'eau du Turonien est progressivement remplacée par celle de l'Albien pour l'injection d'eau. Début de l'injection d'eau dans la zone 12 (Nord).</p> <p>1993 Forage du premier puits d'huile horizontal MDZ453. À la fin de l'année 1993, le nombre total de puits forés atteint le chiffre de 850. Le CIN devient Centre Industriel Naili Abdelhalim (CINA).</p> <p>1995 Mise en service de l'unité de production d'azote liquide COSMODYNE au CINA.</p> <p>2000 Découverte du champs périphérique de Hassi Tarfa situé à 80km au sud de Hassi Messaoud.</p> <p>2001 Remplacement des bassins de déshuilage par la mise en service des unités de traitement des eaux huileuses (UTEH) au CIS ainsi qu'au CINA.</p> <p>2005 Découpage du champs de HMD en 2 champs : HMD central (HMDC) & HMD complexe (HMDX).</p> <p>2006 Campagne sismique 3D sur les périmètres de HMD Central & HMD Complexe.</p> <p>2008 L'apport de gaz venant de GTL par le GM1 est remis en exploitation avec le redémarrage de l'UTG de Gassi Touil.</p>
--

1.1.2. Haoud Berkaoui

Le champ de Haoud Berkaoui représente une des 9 principales zones productrices d'hydrocarbures du Sahara Algérien pour la Sonatrach. Sur la route nationale n° 49, dite route

des pétroliers, reliant Ghardaïa à Hassi Messaoud et à 30 Km au sud-ouest de Ouargla, un carrefour indique la présence d'un champ pétrolier : celui de Haoud Berkaoui. Il est important en regard de sa production (6% de la production journalière pétrolière du pays) (HBK 2004, 2011).

C'est ce champ pétrolier qui est le plus proche de Ouargla. Il a été découvert en 1963 et géré par Hassi Messaoud jusqu'en 1977, année de son autonomie (Tableau 7).

Tableau 7 : Historique du champ pétrolier de Haoud Berkaoui (Sonatrach, 2008).

1963	Découverte des champs de Sahane (SAH), Oulouga (OA) et Boukhazana (BKZ)
1965	Démarrage du champ HBK par CFPA
1967	Mise en service du centre de production de HBK
1969	Découverte du champ GLA (Forage GLA2)
1971	Nationalisation des hydrocarbures, HBK est relié au district de HMD
1976	Création de la Région de HBK
1983	Installation unité de dégazolinage à HBK
1990	Lancement du projet Récupération de Gaz Associé (RGA)
1995	Mise en service de la station d'injection d'eau électrique de HBK
2001	Réalisation de 3 stations de déshuilage à HBK, BKH et GLA
2007	Extension du projet de récupération du gaz associé, installation DCS des centres de production de HBK, BKH et GLA

1.2. Présentation du cadre géologique

1.2.1. Cadre géomorphologique

Selon Rouvilois-Brigol (1975), la région de Ouargla est marquée sur le plan géomorphologique d'Ouest en Est par cinq grands ensembles :

- Le **plateau de la Hamada** pliocène est situé à l'Ouest de Ouargla à 230 m au-dessus de la vallée en confluence avec l'Oued M'zab et l'Oued N'sa, et présente une légère pente orientée d'Ouest en Est. Ce plateau calcaire a été le théâtre d'une intense érosion laissant une série de buttes témoins ou Goures.
- Les **Glacis** s'étagent sur le versant Ouest de la cuvette de Ouargla. Bien caractéristiques, ils sont répartis du plus ancien au plus récent d'Ouest en Est sur quatre niveaux de 200 à 140 m. Les glacis de 180 m et de 160 m sont très visibles. Ils se caractérisent par l'affleurement du substrat gréseux du Mio-Pliocène.
- Le **chott**² et la **sebkha**³, au niveau le plus bas de la vallée de l'oued Mya correspondent à un très vaste glacis. Celui-ci constitue un chott dans lequel s'encaisse

² Chott : une étendue d'eau salée permanente, aux rivages changeants, située dans les régions semi-arides.

l'immense sebkha de Ouargla en forme de croissant qui entoure la ville. C'est sur le chott que sont implantées les principales oasis de Ouargla. Elles sont entourées à l'ouest par une déclivité naturelle importante et notable dans cette région. Ainsi l'altitude est presque de 150 m d'altitude au lieu dit les ruines de Sedrata et diminue rapidement à 135 m dans la sebkha de Ouargla créant ainsi une cuvette. L'effet s'accroît légèrement en aval de Ouargla où les sebkhas (Oum Raneb, Nakhlet En-Nous, El-Mergueb et Safioune 103 m) alternent avec les massifs dunaires (Touil, Arifdji, Bou-Khezana, ...etc.).

- Les **dunes de sable** sont des formations éoliennes récentes et se présentent en petits cordons. Elles occupent la zone sud de Ouargla et recouvrent des ruines à Sedrata. Elles occupent également l'Est et le Nord-Est de Ouargla et bordent les sebkhas le long de la vallée de l'Oued Mya.

1.2.2. Cadre géologique et hydrogéologique

Le territoire de Ouargla est situé dans l'immense bassin saharien, caractérisé par la prédominance de dépôts plioquaternaires. Néanmoins, des affleurements éocènes et créacés sont présents à l'Est.

Trois régions peuvent être distinguées (Hamdi Aissa, 2001) :

- Le grand erg oriental : un vaste dépôt de sable éoliens dans la zone Est et Sud,
- Au centre : des régions de vallées où prédominent les dépôts d'alluvions,
- Le plateau du M'zab à l'Ouest.

Comme dans la plupart des oasis du Sahara, les ressources hydriques les plus sollicitées sont d'origine souterraine. Les formations géologiques de la région de Ouargla contiennent deux grands ensembles de formations aquifères séparés par d'épaisses séries d'évaporites ou argileuses :

- La nappe du continental intercalaire qui couvre une superficie de 600 000 km² et renferme 50 000 milliards de m³. Elle contient : l'Albien, le Barrémien, le Néocomien et le Malm.
- La nappe du complexe terminal dont les eaux servent à l'irrigation des palmeraies du bas Sahara, de Touggourt à Tozeur et Biskra. Elles sont plus favorables à l'agriculture

³ Sebkra : un bassin occupant le fond d'une dépression à forte salinité et plus ou moins séparé d'un milieu marin.

que les eaux précédentes, pourtant généralement moins salées. Cette nappe est constituée de: nappe de Méo-pliocène, Turonien, nappe du Sénonien et la nappe phréatique (Dubost, 1991).

1.3. Présentation climatique

Le climat de Ouargla est particulièrement contrasté malgré la latitude relativement septentrionale. La région est située en zone saharienne avec un climat sec et désertique. Une aridité bien exprimée se traduit par des précipitations faibles ou nulles et irrégulières ainsi qu'une sécheresse permanente (Rouviolois-Brigol, 1975). Les données climatiques concernant la période échantillonnée ont été relevées à partir du site underground (<http://french.wunderground.com>, Tableau 8). Les échantillonnages ont été réalisés sur des périodes sans pluviométrie et faibles vents afin de rester dans des conditions homogènes (Tableau 10). De plus, il était nécessaire d'attendre la fin de la saison de production des dattes afin de ne pas abimer la récolte des propriétaires des palmeraies échantillonnées.

Tableau 8 : Étude climatique de la période d'échantillonnage de novembre 2011 à novembre 2012.

Mois/ Année	Tmax (°C)	Tmoy (°C)	Tmin (°C)	Point de rosée (°C)	Précipitation (mm)	Vent (Km/h)	Pression (hPa)
Novembre 2011	24	17	11	8	0	11	1017
Décembre 2011	19	12	6	6	0	8	1024
Janvier 2012	18	11	4	4	0	12	1023
Février 2012	17	10	4	2	0	14	1019
Mars 2012	24	17	10	6	0	11	1024
Avril 2012	30	22	15	8	0	16	1010
Mai 2012	35	27	20	9	0	17	1013
Juin 2012	43	35	27	13	0	14	1012
Juillet 2012	45	36	28	13	0	12	1012
Aout 2012	43	35	27	12	0	12	1013
Septembre 2012	38	30	22	10	0.9	12	1014
Octobre 2012	33	26	19	9	0	12	1013
Novembre 2012	26	19	12	9	0	10	1015

La température de l'air résulte de nombreux facteurs : rayonnement solaire incident et émis par le substrat, éventuels, apports liés à la mobilité de l'air, sa densité et la quantité d'énergie consommée pour l'évapotranspiration (Tabeaud, 2000). Lors des journées de récolte, la moyenne des températures a varié entre 13 et 20°C, avec un minima de 4°C et un maxima de 25°C (Tableau 9 et Figure 19).

Tableau 9 : Caractéristiques climatiques sur la période d'échantillonnage (2011/2012).

Jours	Tmoy (°C)	Tmax (°C)	Tmin (°C)	P. rosée (°C)	Hmoy (%)	Hmax (%)	Hmin (%)	Précipitation (mm)	Pression (hPa)	V vent (Km/h)	Vmax vent (Km/h)
19/11/2011	16	23	9	7	53	82	26	0	1017.56	6	15
20/11/2011	17	25	9	5	50	76	24	0	1014	10	29
21/11/2011	20	23	16	16	39	59	21	0	1008.24	26	48
22/11/2011	17	23	11	9	56	77	27	0	1013.19	12	30
23/11/2011	15	22	8	8	57	82	29	0	1019	4	22
24/11/2011	13	21	5	5	57	76	26	0	1021.71	6	22
15/11/2012	14	19	9	7	53	71	26	0	1015.77	4	20
16/11/2012	11	25	7	7	53	76	23	0	1017	0	0
17/11/2012	16	22	9	6	49	67	23	0	1015	3	23
18/11/2012	18	25	12	7	43	63	23	0	1011	3	19
19/11/2012	17	21	12	10	57	88	32	0	1013	2	11
20/11/2012	18	25	11	8	55	77	29	0	1018	5	14
21/11/2012	16	24	8	7	55	77	28	0	1020	2	14
22/11/2012	15	22	8	6	50	76	29	0	1021	5	19
23/11/2012	16	23	9	7	54	76	28	0	1021	16	32
24/11/2012	16	22	9	9	58	76	35	0	1021	21	34
25/11/2012	17	23	10	9	63	82	35	0	1020	18	29
26/11/2012	17	24	10	10	64	88	30	0	1017.68	15	20
27/11/2012	18	25	10	8	58	94	26	0	1010	5	34
28/11/2012	14	19	10	4	49	76		0	1009.83	18	33

Journées d'échantillonnage 2011

Journées d'échantillonnage 2012

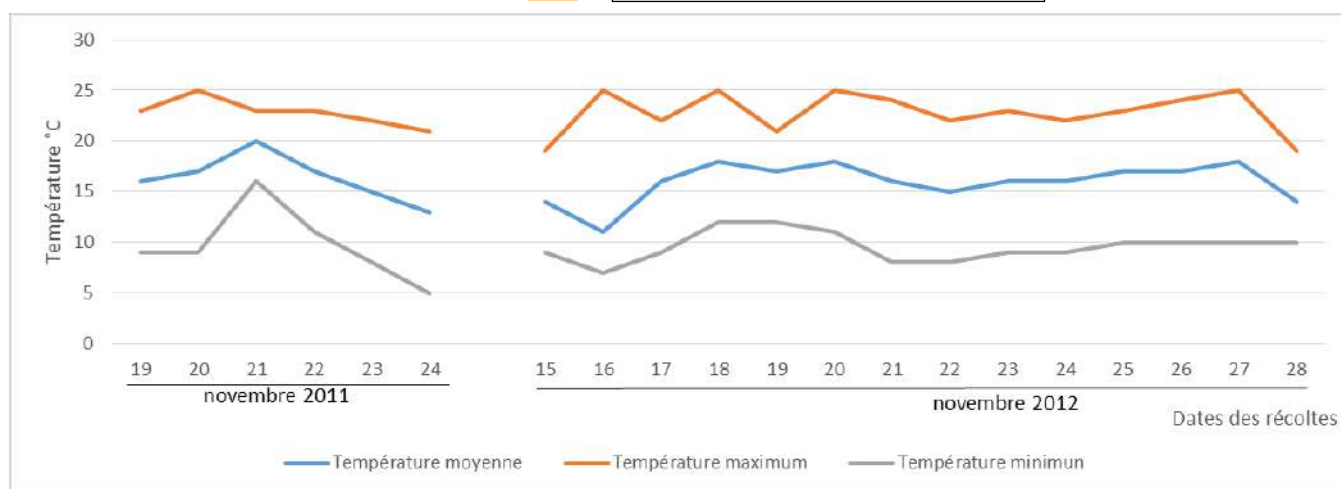


Figure 19 : Variation des températures lors des périodes de récolte.

Le total annuel des précipitations peut être extrêmement variable d'une année sur l'autre en zone saharienne. Il peut être nul pendant une ou plusieurs années. Sur la durée d'échantillonnage, il n'y a eu que 0,9 mm d'eau en septembre 2012 et aucune précipitation sur la période des récoltes (Tableau 9).

L'humidité relative est le rapport de la pression réelle de vapeur d'eau à la pression de vapeur saturante à la même température (Dajoz, 1982). L'humidité joue un rôle dans "le captage" des particules polluantes. En effet, les gouttelettes d'eau en suspension retiennent les polluants ce qui accroît leur stagnation (Guelle et Emmanuel ,1998). L'humidité de l'air oscille entre 39 et 64 % lors des échantillonnages avec un minima de 21 % et un maxima de 88 % (Figure 20).

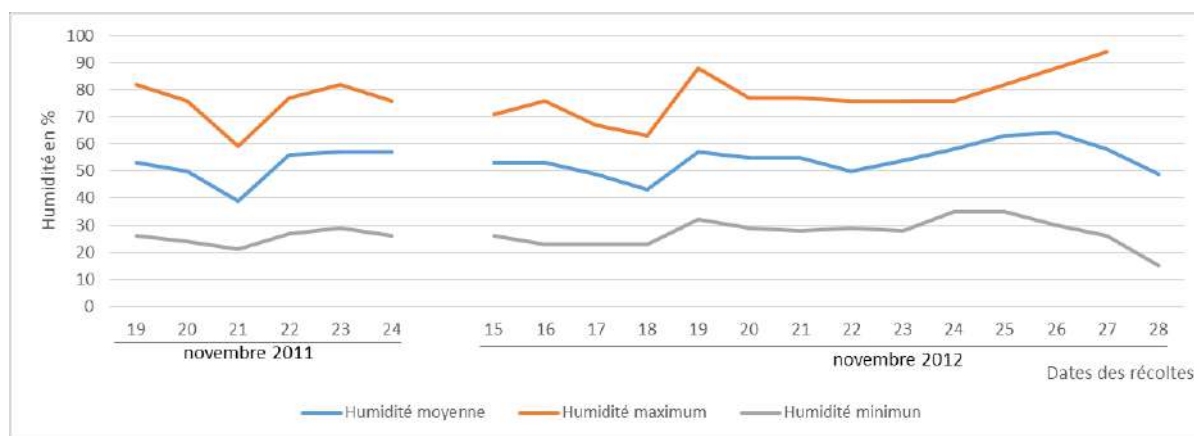


Figure 20 : Variation de l'humidité lors des périodes de récolte.

L'analyse de la vitesse et de l'orientation des vents permet de mieux comprendre la dynamique de la pollution atmosphérique (Dubief, 1963). Il intervient tant par sa direction pour orienter les panaches de fumée que par sa vitesse pour diluer et entraîner les émissions (Elichegaray, 2008). Les vents lors des récoltes ont soufflés à une vitesse de 4 et 26 km/h (Figure 21), sur l'ensemble de la période de travail comprise entre novembre 2011 et novembre 2012.

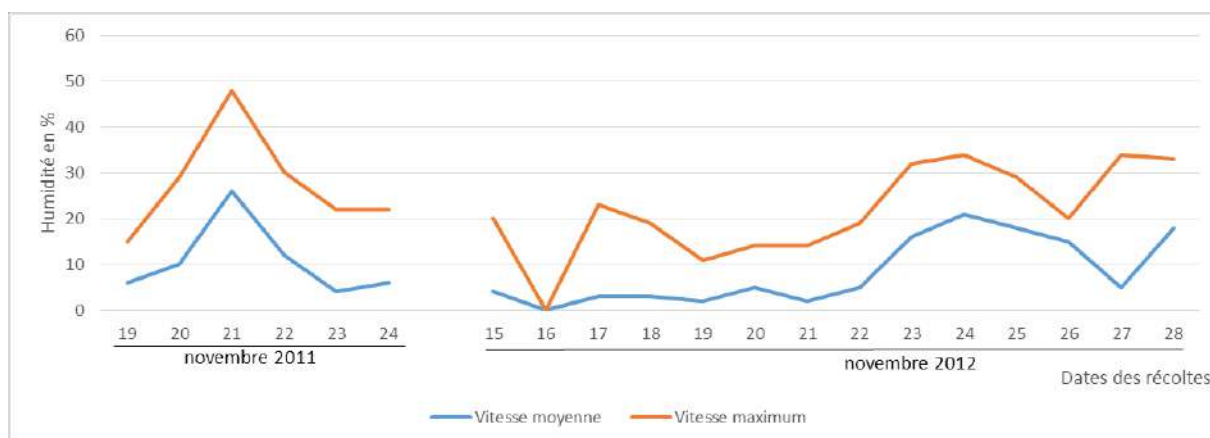


Figure 21 : Variation de la vitesse des vents lors des périodes de récolte.

L'orientation des vents est généralement considérée nord-est dans la région de Ouargla. Une analyse plus fine montre que l'orientation des vents est assez changeante en fonction des journées mais aussi au cours de la journée. Elle peut ainsi être plein nord ou plein sud dans la même journée. Toutefois, le nombre de jours avec une orientation des vents au nord-est est prédominante (Figure 22).

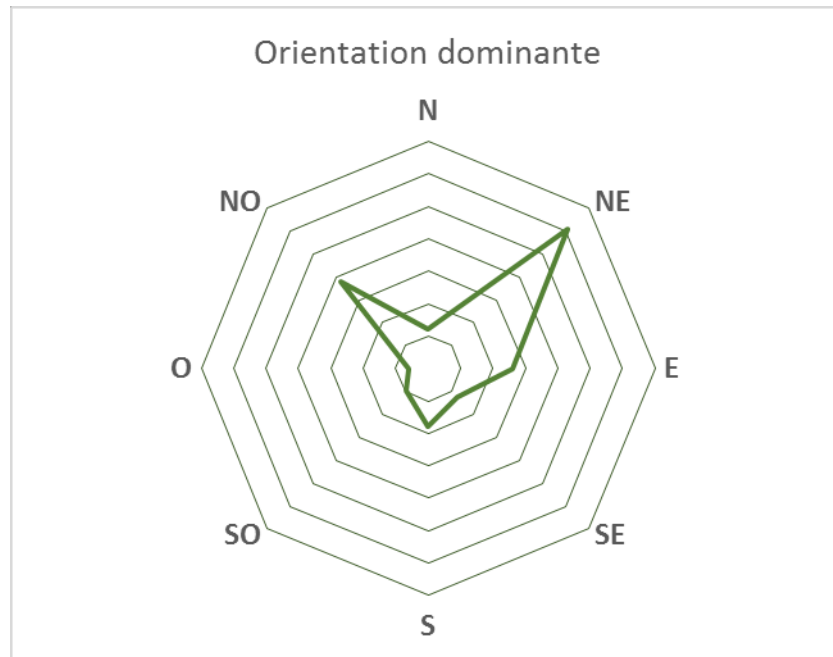


Figure 22 : Analyse de l'orientation principale du vent de la zone d'échantillonnage. Le nombre de jours avec une orientation dominante du vent a été comptabilisé de novembre 2011 à novembre 2012. Les journées non comptabilisées correspondent à une absence de vent ou une orientation tournante sur l'ensemble de la journée. L'unité de l'échelle est de 20 jours.

2. Échantillonnage et récolte du matériel

2.1. Les modèles végétaux

Notre étude a commencé par l'utilisation d'un lichen (*Xanthoria parietina*) comme modèle biologique pour la détection de la pollution existante à Ouargla. Toutefois, l'étude a montré que son utilisation était limitée en zone aride. Par la suite, nous avons donc recherché un autre modèle biologique avec une aire de répartition très large sous les climats nous concernant. Nous avons retenu une espèce caractéristique de la région, une espèce pérenne, le Palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*).

En biosurveillance passive, il y a des critères à prendre en considération dans le choix de l'espèce. Le palmier dattier correspond à ces critères. Il constitue la principale culture au Sahara Algérien. Son aire de culture se situe entre 15° et 35° de latitude nord. Pour la région nous concernant, Ouargla est l'une des principales régions productrice des dattes en Algérie (Munier, 1973). Ce modèle possède donc plusieurs critères pour le choisir en biosurveillance :

- Il est largement réparti sur la zone d'étude et de façon homogène donc il est facile à retrouver, à marquer.
- Il contient des feuilles pérennes sur lesquelles on peut effectuer plusieurs prélèvements foliaires, et il présente des organes permanents et pratiques à recueillir. Il est de grande taille et peut atteindre les 30 m ce qui fait qu'il n'est pas trop influencé par les paramètres telluriques. Van Haluwyn et Garrec (2002) ont défini ces critères comme les meilleures conditions d'utilisation d'un arbre pour la biosurveillance de la qualité de l'air.

2.2. Choix des stations

Pour mieux connaître les niveaux de pollution, il est important de mettre en place un réseau de prélèvements en choisissant des stations en nombre suffisant et correctement réparties autour de la source de pollution (Semadi, 1989). Aussi, les stations d'échantillonnages du palmier ont été choisies dans notre étude pour couvrir toute la zone d'échantillonnage autour de Ouargla (Figure 23). Pour cela, nous avons sélectionné deux stations considérées comme polluées par l'exploitation pétrolière (Ain Moussa et Haoud Berkaoui) et une troisième éloignée de ces sources de pollution (Hassi Ben Abdellah). En effet, Yassa *et al.* (2011) avaient montré que l'air de Hassi Ben Abdellah était peu pollué comparativement à leurs autres prélèvements plus proches du centre-ville. Une oasis, proche de Ouargla, Bamendil s'était également révélée peu polluée dans leur étude. Nos premiers essais préliminaires ont montré que le sable au pied des palmiers était assez contaminé à Bamendil alors qu'il ne l'était pas à Hassi Benadbadllah. Nous avons donc abandonné Bamendil pour privilégier Hassi Ben Abdellah comme station témoin.

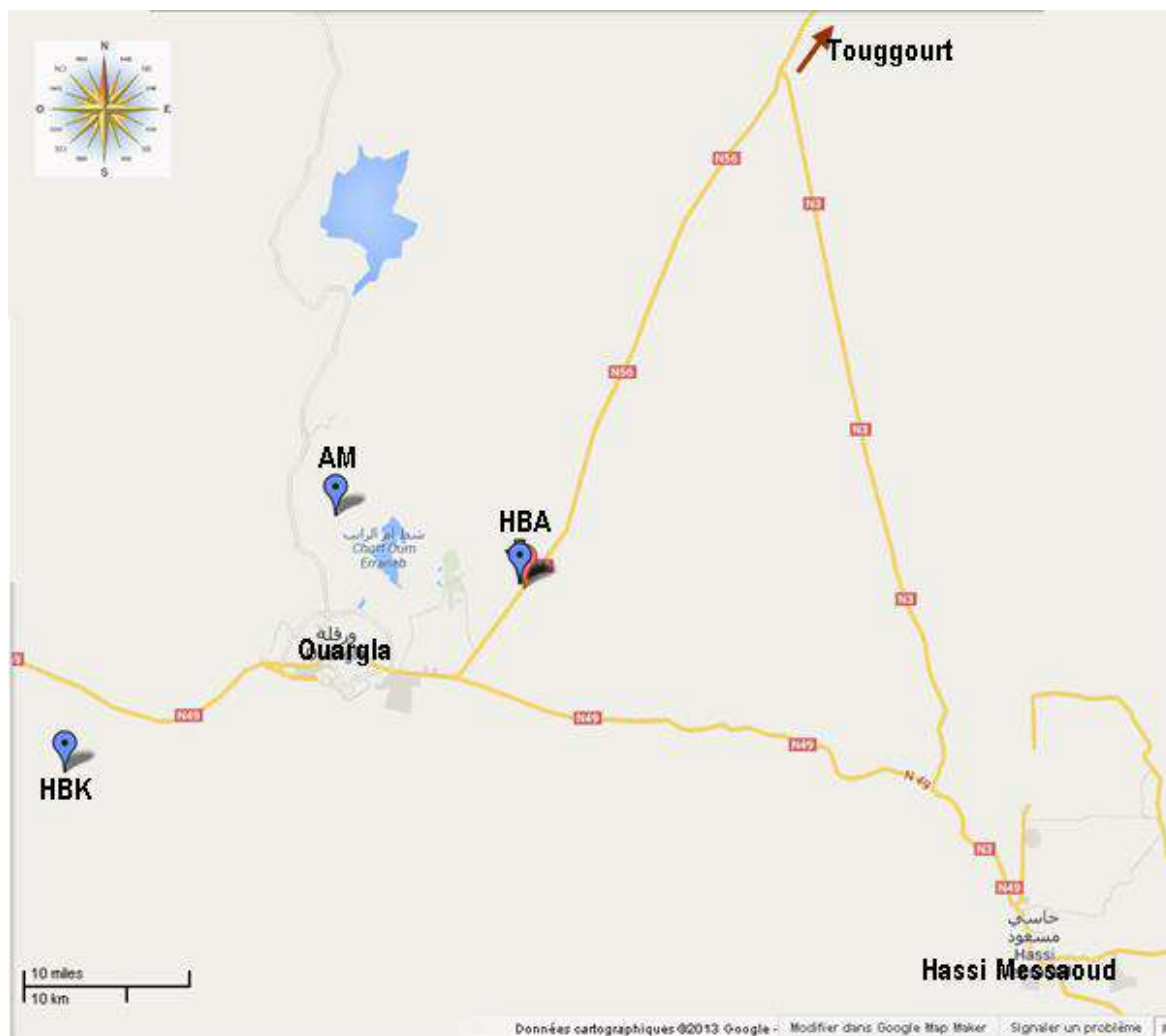


Figure 23 : Position des 3 stations de récolte autour de Ouargla : Ain Moussa (AM), Haoud Berkaoui (HBK) et Hassi Ben Abdellah (HBA). Les stations ont été positionnées d’après leurs coordonnées GPS sur un fond de carte Google maps.

La station de Haoud Berkaoui (HBK), est une palmeraie que l'on peut considérer comme mixte car elle contient espèces végétales (arbres fruitiers, brise vent et arbustes) en plus du palmier. Elle se situe au sein d'une région productrice de pétrole et plus précisément à l'entrée du champ de Haoud Berkaoui donc directement exposée à la source de pollution par le dégagement des torches à une distance de 700 m au Nord (Figure 24).

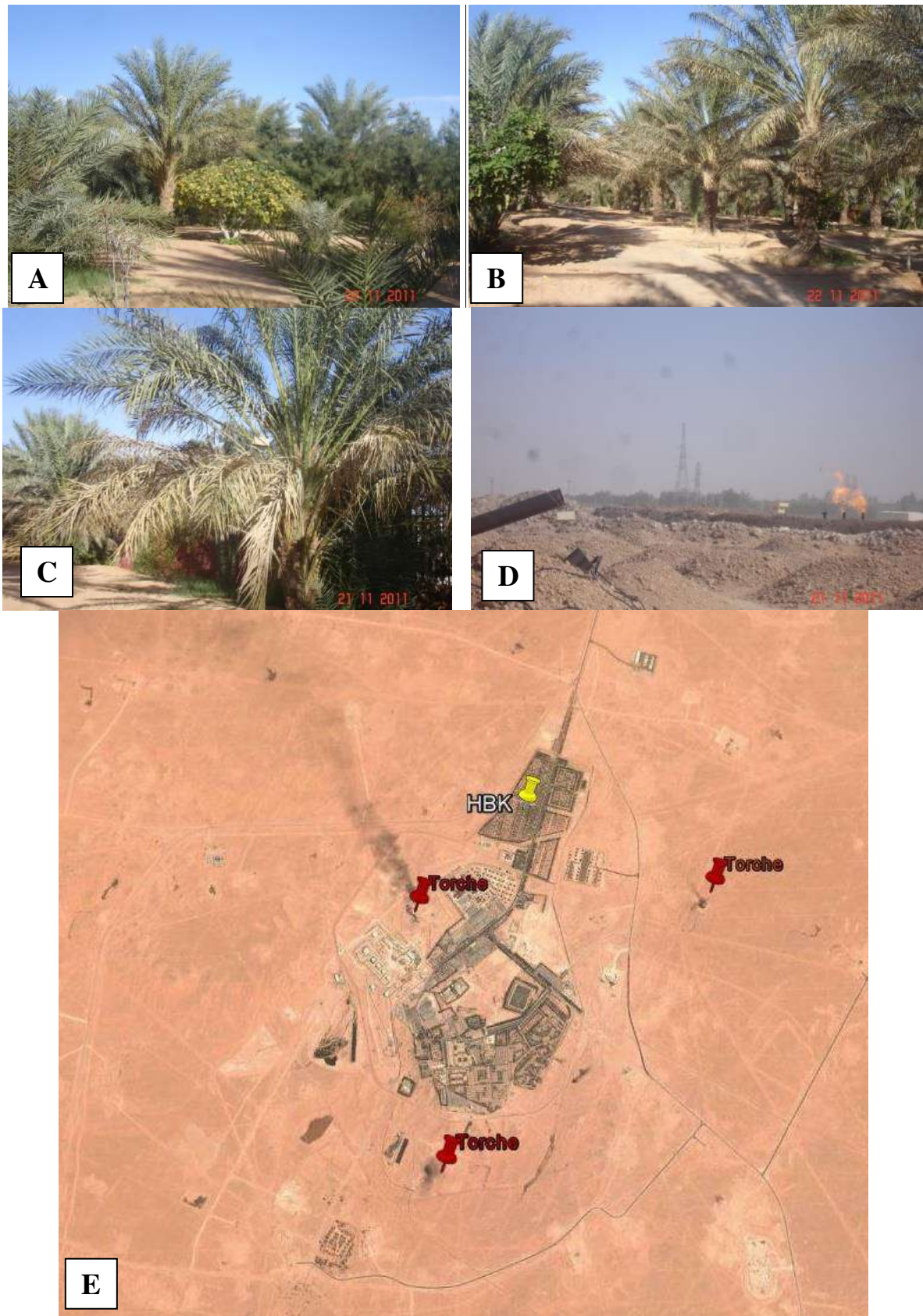


Figure 24 : Illustration de la station de Haoud Berkaoui (HBK). A à C : les palmiers et les autres espèces cultivées ; D : position de la palmeraie par rapport à quelques torches.

E : la base de vie de HBK avec la palmeraie (pointe jaune) et les torches les plus proches (pointes rouges : exemple de torches en activité) ; image google earth du 17/8/13.

La station d'Ain Moussa (plus précisément N'goussa), est une palmeraie traditionnelle privée. Elle n'est constituée que de palmier dattier surtout de la variété Deglet Nour. Elle est située à l'Ouest d'une station de pompage à 400 m (Figure 25).

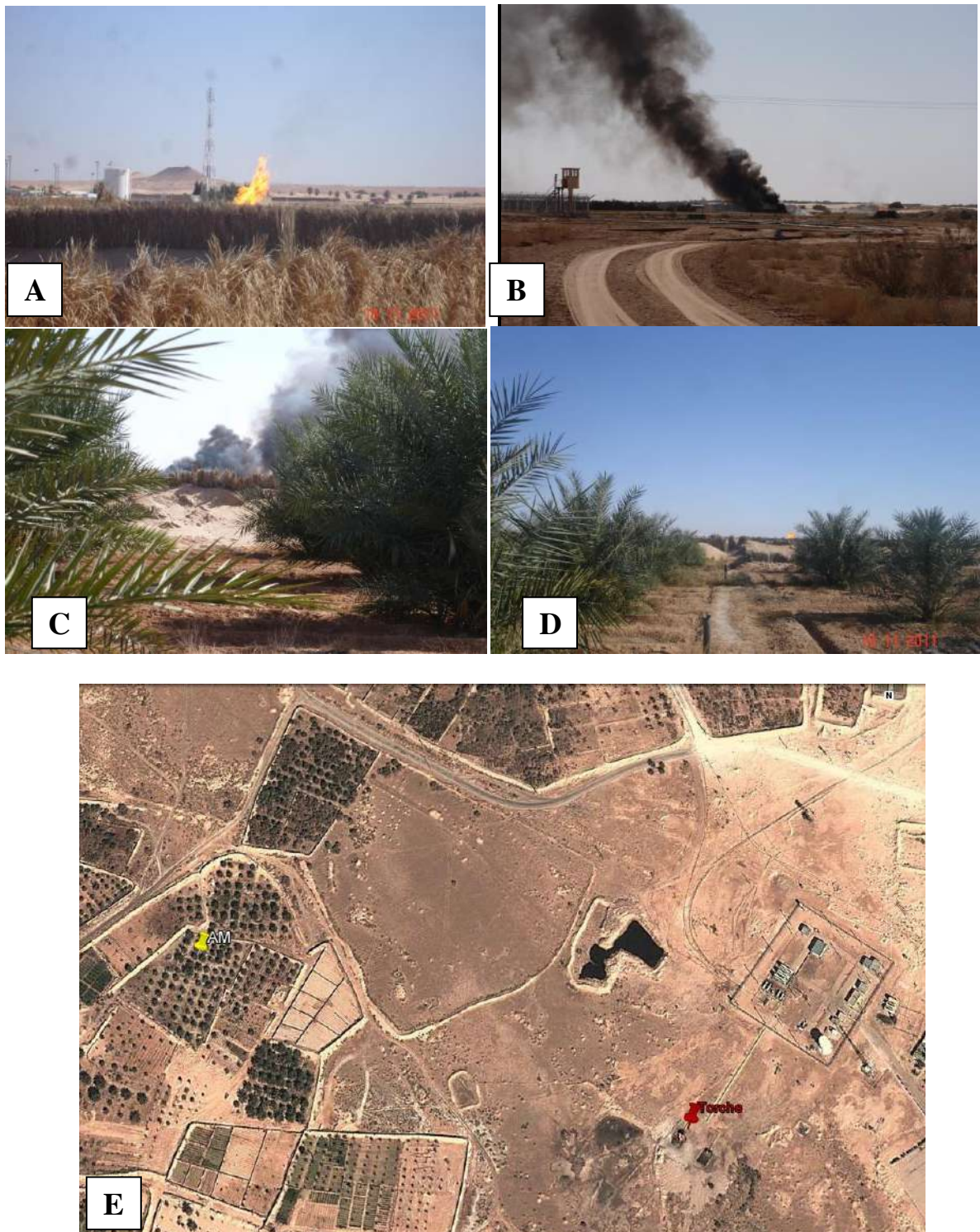


Figure 25 : Environnement de la station de Ain Moussa (AM). A, B : la torche voisine de la station ; C, D : les dégagements de la torche vue de la station.

E : Position de la palmeraie (pointe jaune) par rapport à la torche (pointe rouge) ; image google earth du 14/2/13.

La station de Hassi Ben Abdellah (HBA) est une palmeraie moderne, privée, avec des palmiers tous du même âge et uniquement de la variété Deglet Nour (Figure 26). Cette palmeraie a été choisie pour son éloignement de toute torche et sur la base des données de Yessaa *et al.* (2011).

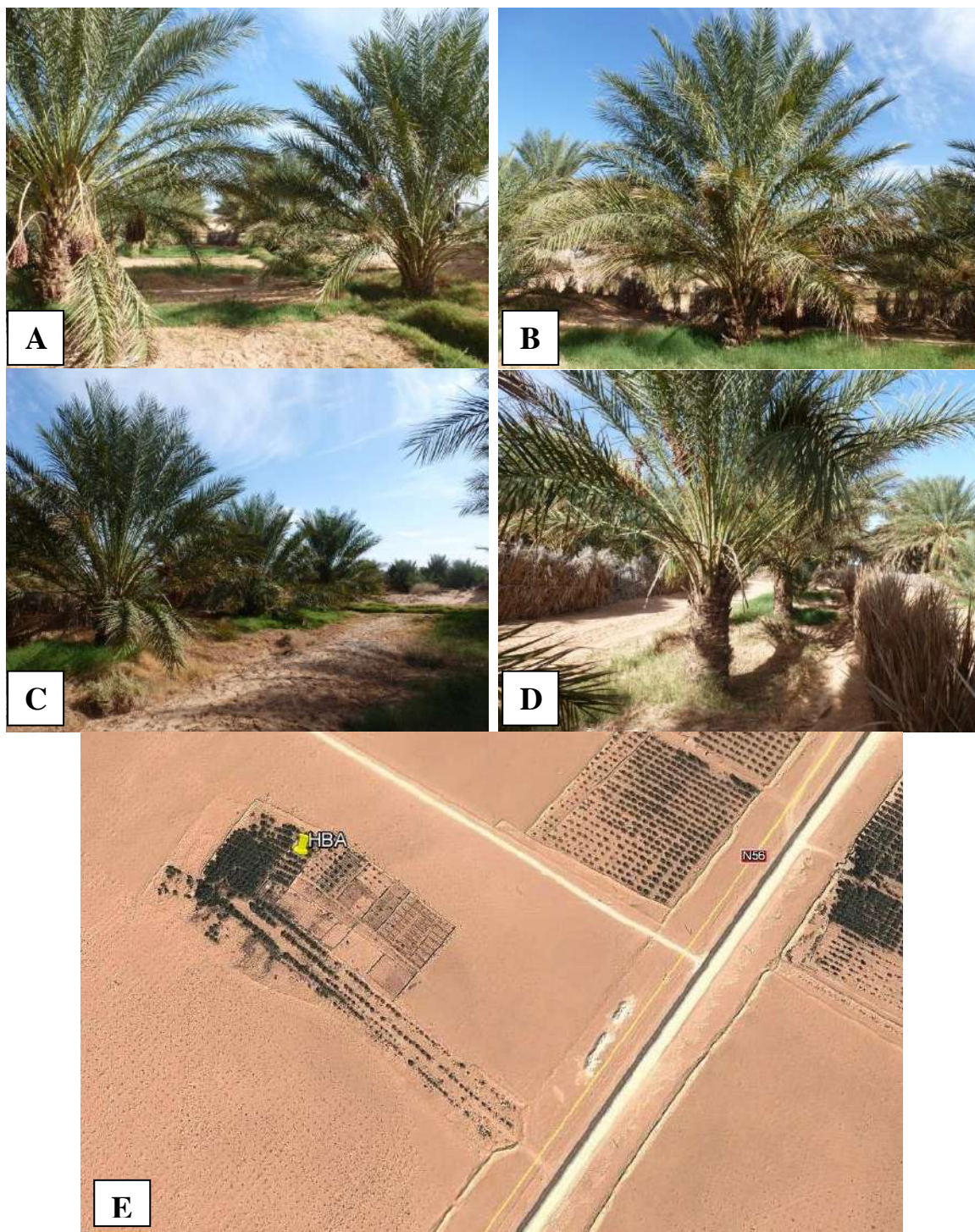


Figure 26 : Illustrations de de la station de Hassi Ben Abdellah (HBA). Différentes zones de la palmeraie (photos A à D). E- position de la palmeraie par rapport à la nationale N56 (image google earth 14/2/13).

Par ailleurs, pour l'étude des surfaces foliaires, des prélèvements ponctuels ont été réalisés à Hassi Messaoud, ville située dans le champ pétrolier du même nom et régulièrement sous l'influence des dégagements des nombreuses torches entourant la ville (Figure 27).

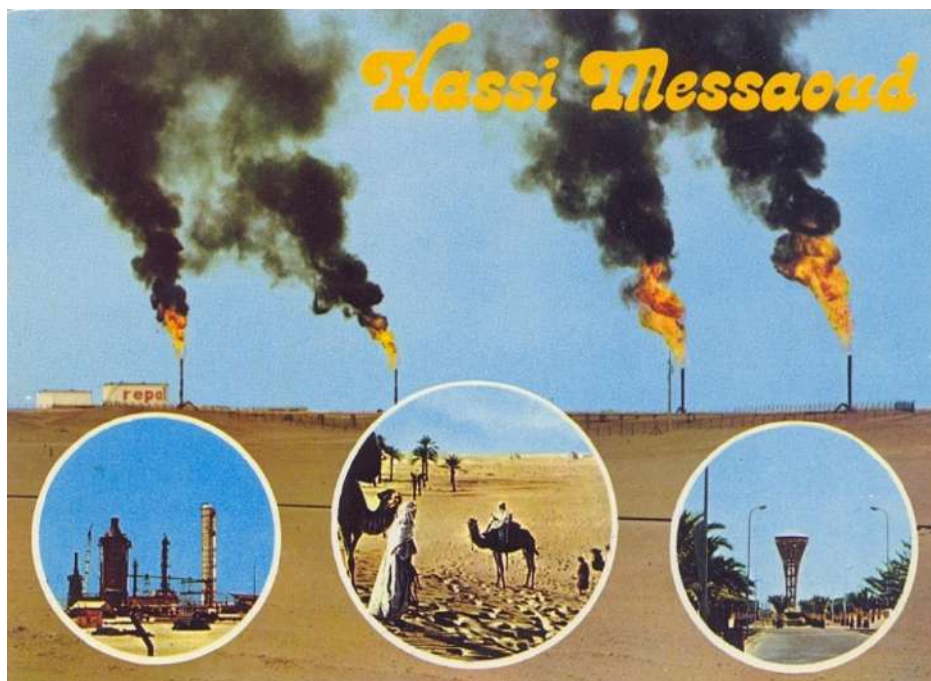


Figure 27 : Hassi Messaoud et son environnement

2.3. Échantillonnage

Une station échantillonnée correspond dans notre cas à une palmeraie découpée en 5 secteurs : les 4 points cardinaux (Nord, Est, Sud et Ouest) et le centre de la palmeraie. Dans chaque secteur, nous avons choisi 3 palmiers représentant des répétitions biologiques.

Trois types de prélèvements ont été réalisés : des filtres pour caractériser la composition en hydrocarbures atmosphériques, du sable et des portions de palme. Pour une première recherche des HAP présents dans l'atmosphère, nous avons suspendu des maisonnettes en bois sous lequel était placé un filet fin contenant une membrane en Quartz de 90 mm de diamètre (PALLFLEX 2500QAT-UM 90MM). 15 filtres ont été installés par station soit 3 à chacun des secteurs de la palmeraie (15 par station ; 45 au total). Ils sont restés en place pendant 10 jours (Figure 28).



Figure 28 : Illustrations montrant l'installation des filtres dans les palmeraies.

Des échantillons de sol ont été prélevés au pied de chaque palmier à une profondeur de 10 cm. Au pied de chaque palmier, 4 prélèvements différents ont été effectués. Le contenu des

4 prélèvements a ensuite été mélangé pour obtenir un mélange homogène de sable. Les prélèvements sont transportés en boîte hermétique puis congelés. Il y a 3 palmiers pour chaque secteur de la palmeraie, soit un total de 15 échantillons de sol par station donc 45 échantillons pour les 3 stations.

Les prélèvements foliaires sont effectués pour chaque secteur sur les 3 palmiers identifiés (Figure 29).



Figure 29 : Le plan d'échantillonnage type d'une station.
 (En rouge et les palmiers du nord, en bleu les palmiers du sud, en beige les palmiers de l'est ,
 en jaune les palmiers de l'ouest et en violet les palmiers du centre.)

Les prélèvements sont réalisés au niveau des 5 couronnes du palmier, notées de 1 à 5 (allant de la couronne la plus âgée à la plus jeune). Pour chaque couronne des folioles sont prélevés en 3 points de la palme et ce pour les 4 palmes situées aux 4 points cardinaux de la couronne. Toutes les folioles sont rassemblées dans le même sac en papier Kraft préalablement étiqueté. Les folioles sont aussitôt soigneusement découpées en petits morceaux et rangées dans des boîtes hermétiques classifiés puis placés au congélateur le jour même de la récolte.

2.4. Conservation du matériel

Les échantillons (filtres, sol ou palmes) sont conservés dans un congélateur à -20 °C avant d'être lyophilisées au laboratoire à Ouargla pour faciliter leur transport en France sans les endommager.

Concernant les filtres et le sol, les échantillons sont directement utilisés pour la détermination des teneurs en HAP au niveau du laboratoire de Géosciences. Pour le végétal, les échantillons sont broyés au broyeur à bille (Retsch MM400) réglé à une fréquence de 25 tours /seconde pendant une minute. Les poudres sont conservées dans des piluliers et gardées à 4°C.

3. Méthodes analytiques

3.1. Observation des surfaces foliaires

3.1.1. Microscopie optique

Des petits fragments de palmes sont conservés dans de l'alcool à 90° sitôt récolte pour faciliter la préparation des coupes, les feuilles du palmier dattier étant très dures. La préparation des coupes a été sous-traitée à l'entreprise Bégénat⁴ (sans coloration ou avec double coloration au carmin-vert d'iode puis montage permanent).

Les photos sont prises avec un appareil Nikon Eclipse TS100 couplé à un ordinateur par le logiciel Falcon Server HRM 1300 FWP et traitées avec le logiciel Pegase pro.

3.1.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

⁴ Bégénat. Impasse de la Mesnillière-14790 Verson

Les fragments de feuilles ont été congelés et lyophilisés. Les observations au MEB ont été réalisées à la plateforme de microscopie du CMEBA (Centre de Microscopie Électronique à Balayage et microAnalyse) de l'Université de Rennes 1.

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour Scanning Electron Microscopy) est une technique de microscopie électronique capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon en utilisant le principe des interactions électrons-matière. Le pouvoir de résolution (capacité à distinguer des détails fins) de l'œil humain avec un microscope optique est limité par la longueur d'onde de la lumière visible (photons) ainsi que par la qualité des lentilles grossissantes. Les plus puissants microscopes optiques peuvent distinguer des détails de 0,1 à 0,2 μm^3 . Si l'on veut observer des détails plus fins, il faut diminuer la longueur d'onde qui éclaire les cibles. Dans le cas des microscopes électroniques, on n'utilise pas des photons, mais des électrons, dont les longueurs d'ondes associées sont beaucoup plus faibles.

Un microscope électronique à balayage est essentiellement composé d'un canon à électrons et d'une colonne électronique, dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les trois directions et de détecteurs permettant de capter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon. En outre l'appareil doit nécessairement être équipé d'un système de pompe à vide (Goldstein *et al.*, 1992).

L'appareil sur lequel nos échantillons ont été analysés est un JEOL JSM 6301F. C'est un MEB à effet de champ (FEG = field emission gun) de la société JEOL. La métallisation des échantillons a été faite par pulvérisation cathodique (sputtering) avec un métalliseur JEOL JFC 1100.

3.2. Mesures sur les marqueurs biologiques

3.2.1. Extraction des protéines solubles

L'extraction des protéines solubles est réalisée à partir de 100 mg de matières lyophilisées et broyées, et de 1 mL de tampon d'extraction : tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM, PVPP 5%, 2-mercaptoéthanol 4 mM, ascorbate 5 mM, cocktail inhibiteur de protéases (Sigma P9599 à 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ ajoutés au moment de l'extraction). Les microtubes sont placés sur un agitateur rotatif pendant 1 h à 4°C puis centrifugés 20 min à 12000 g, à 4 °C. Les surnageants sont récupérés, aliquotés en raison de 200 μl par tube et conservés à -80°C. Ces extraits enzymatiques seront utilisés pour les mesures des activités

enzymatiques : gaïacol peroxydase (GPX), glutathion réductase (GR), superoxyde dismutase (SOD), glutathion-S-transférerase (GST) et glutathion peroxydase (GSH-PX).

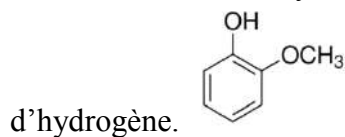
Tous les dosages décrits ensuite sont effectués en triplicata (3 extraits du même échantillon biologique) sur le spectrophotomètre VERSAmax (Molecular Devices) piloté par le logiciel Sofmax Pro

3.2.2. Dosage des protéines

La teneur en protéines des extraits enzymatiques est déterminée selon la méthode colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976) adapté au spectrophotomètre à plaques avec le réactif Sigma B6916. La procédure est basée sur la formation d'un complexe entre le bleu brillant G et les protéines en solution, grâce à l'arginine et dans une moindre mesure l'histidine, la lysine et les acides aminés aromatiques des protéines. Ce complexe entraîne un changement dans l'absorption du colorant à 595 nm. L'albumine sérique bovine est utilisée comme protéine standard.

3.2.3. Mesure de l'activité gaïacol peroxydase (GPX) EC 1.11.1.7

La GPX catalyse l'oxydation du gaïacol (4-méthoxyphénol) utilisé comme donneur



La réaction catalysée est (d'après base de données BRENDA, <http://www.brenda-enzymes.org/>) :

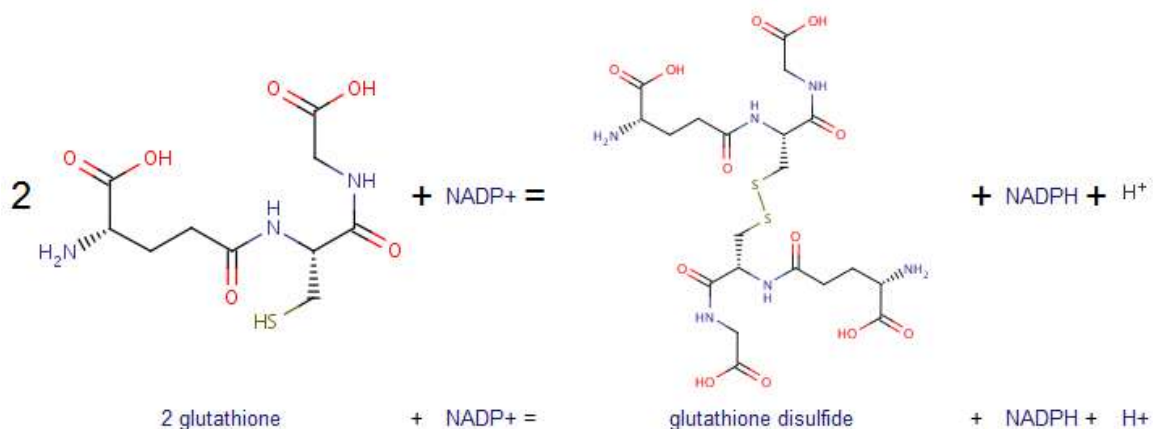


L'activité GPX est déterminée à partir de la vitesse d'apparition du produit formé selon le protocole décrit par Srivastava et Van Huystee (1977) adapté aux microplaques 96 puits. Pour cela, 10 µL d'extrait enzymatique sont déposés dans chaque puits auxquels sont ajoutés du tampon phosphate de potassium 100 mM pH 6,5, du gaïacol 15 mM, et H₂O₂ 0,05 % v/v (concentrations finales). Chacune des solutions est préparée à une concentration 10X afin d'obtenir la composition du milieu réactionnel final. La réaction est initiée par l'addition de H₂O₂ au mélange réactionnel. L'activité enzymatique est suivie par la mesure de la vitesse initiale de la réaction (conditions saturantes en substrat) à 470 nm. La quantité de produits formés (sous forme de tétragaiacol) par seconde est calculée à partir de la pente initiale en

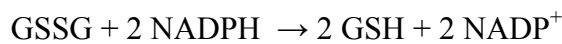
utilisant la valeur de coefficient d'extinction du tétragaiacol, $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Une unité d'activité GPX est définie comme la quantité d'enzyme produisant $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de tétragaiacol. Elle est exprimée par mg de protéine.

3.2.4. Mesure de l'activité glutathion disulfide réductase (GR) EC 1.8.1.7

La GR catalyse la réaction de réduction du glutathion (γ -glutamylcysteinylglycine) selon l'équation suivante (base de données BRENDA) :



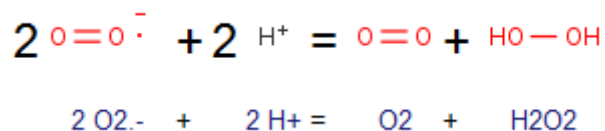
Pour la mesure *in vitro*, elle est étudiée dans le sens :



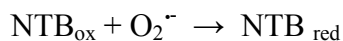
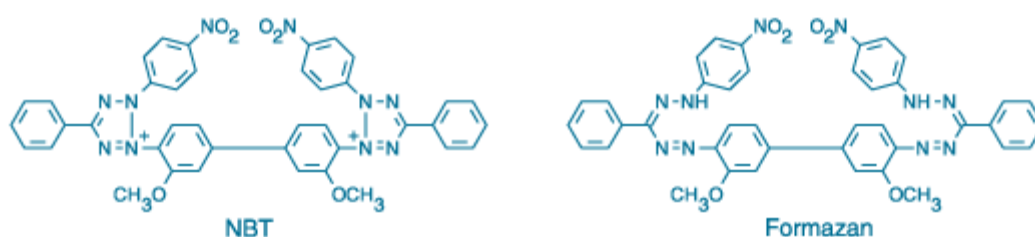
Son activité est déterminée à partir de la vitesse initiale de disparition du NADPH, selon le protocole décrit par Vanacker *et al.* (1998) adapté en plaques 96 puits. A $20 \mu\text{L}$ d'extrait enzymatique sont additionnés du tampon Hepes 50 mM pH 8 contenant de l'EDTA $0,5 \text{ mM}$, du GSSG $0,5 \text{ mM}$ et du NADPH $0,25 \text{ mM}$ (concentrations finales). Comme précédemment, les réactifs sont préparés à une concentration 10X. La réaction est initiée par l'ajout du NADPH. L'activité enzymatique est suivie par mesure de l'absorbance à 340 nm , pendant 20 min à 25°C . La quantité de glutathion réduit par seconde est calculée à partir de la pente de la vitesse initiale en utilisant la valeur de coefficient d'extinction du NADPH à 340 nm , $\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Une unité d'activité GR est définie comme la quantité d'enzyme réduisant $1 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ de glutathion. Cette activité est rapportée par mg de protéine.

3.2.5. Mesure de l'activité superoxyde dismutase (SOD) EC 1.15.1.1

Les superoxydes dismutases catalysent la réaction de dismutation de l'ion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène selon les équations suivantes (base de données BRENDA) :



Pour la mesure in vitro, la réduction du nitrobleu tétrazolium (NBT) par $\text{O}_2\cdot^-$ conduisant à la formation du formazan est suivie.



Les ions superoxydes sont produits par oxydation de la riboflavine sous lumière blanche. Il y a alors compétition entre les deux réactions utilisant l'anion superoxyde, l'action des SOD inhibant alors la réaction photochimique du NBT_{ox} . L'activité des SOD peut donc être déterminée en calculant le pourcentage d'inhibition de la réaction de réduction du NBT. Elle est suivie par la mesure de l'absorbance à 560 nm selon le protocole décrit par Giannopolitis et Ries (1977) adapté en plaques 96 puits.

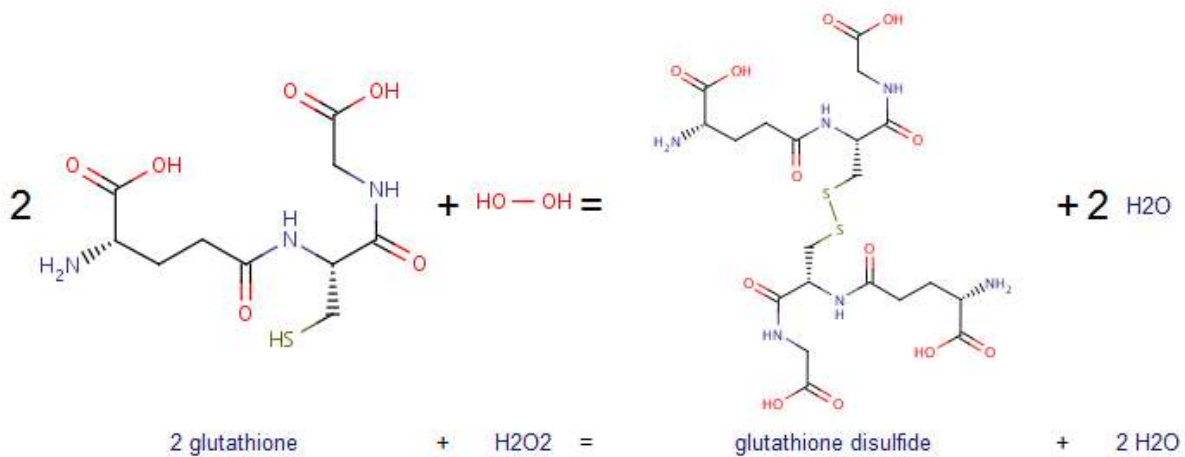
A 10 μL d'extrait enzymatique (dilué au 1/100^e pour nos extraits) sont ajoutés du tampon phosphate de potassium 50 mM pH 7,8 contenant de l'EDTA 0.1 mM, du NBT 75 μM , de la méthionine 13 mM et de la riboflavine 2 μM (concentrations finales). Les solutions sont préparées concentrées 10X. Afin de calculer le pourcentage d'inhibition, un puits est préparé avec l'ensemble des réactifs mais sans l'extrait enzymatique qui est remplacé par le tampon d'extraction. Il permet de déterminer l'absorbance maximale du NBT après réduction photochimique. La réaction est initiée par l'ajout de la riboflavine et le mélange est placé sous lumière blanche dans une enceinte de culture à 25°C. La formation du formazan se traduit par l'apparition d'une réaction violette. L'absorbance est mesurée à 560 nm avant la réaction photochimique et après 15 minutes de réaction sous lumière.

Une unité d'activité SOD correspond à une inhibition de la réduction du NBT de 50 %. L'activité SOD des extraits est donc calculée en appliquant la formule suivante :

$$\text{Inhibition} = [(A_{560 \text{ max}} - A_{560 \text{ échantillon}}) / A_{560 \text{ max}}] * 100.$$

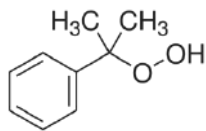
3.2.6. Mesure de l'activité glutathion peroxydase (GSH-PX) EC 1.11.1.9

Les glutathion peroxydases catalysent la réaction d'oxydation du glutathion réduit (GSH) en utilisant H_2O_2 comme oxydant selon (base de données BRENDA) :



Pour la mesure *in vitro*, H_2O_2 est généralement remplacé par le cumène hydroperoxyde. De plus, la mesure nécessite l'ajout de la glutathion réductase pour régénérer le glutathion oxydé en utilisant du NADPH. Par ailleurs, les glutathion transférases et glutathion réductases ont un site de liaison du GSH et certaines peuvent avoir une activité peroxydase. La méthode utilisée ici ne fait pas la différence.

Les réactions catalysées dans cette méthode sont :



cumène hydroperoxyde utilisé en remplacement de H_2O_2

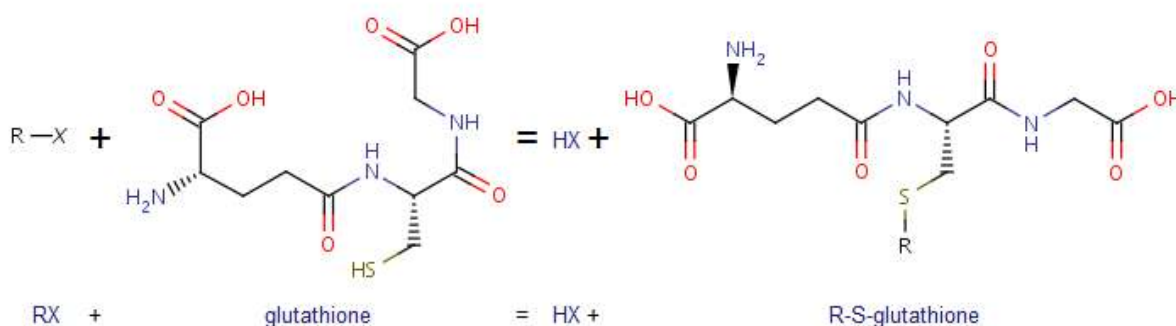
Dans chaque puits, à 10 μL d'extrait enzymatique sont ajoutés du glutathion réduit (GSH) 4 mM et du NADPH 0,2 mM (concentration finale). La glutathion réductase (GR) préparée de manière à avoir 0,05 unité/30 μL est ajoutée dans chaque puits. Les puits sont complétés avec du tampon phosphate 100 mM, pH 7. La réaction est initiée en ajoutant le

cumene hydroperoxyde à 0,5 mM (concentration finale) dans tous les puits et la vitesse initiale de réaction est suivie par mesure de l'absorbance à 340 nm pendant 10 min à 25° C.

L'activité enzymatique est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire à 340 nm du NADPH de 6,22 mmol.L⁻¹.cm⁻¹. 1 unité est définie comme la quantité d'enzyme réduisant 1 µmol de NADPH en 1 min (Holovska *et al.*, 1996).

3.2.7. Mesure de l'activité glutathion-S-transférase (GST) EC 2.5.1.18

Les glutathion synthétases conjuguent le glutathion réduit (GSH) avec un autre composé selon la réaction (base de données BRENDA) :



La molécule conjuguée au glutathion dans les protocoles est le plus souvent le CDNB ou 1-chloro-2,4-dinitrobenzène qui permet d'obtenir un complexe qui absorbe à une longueur d'onde précise (Habig *et al.*, 1974).

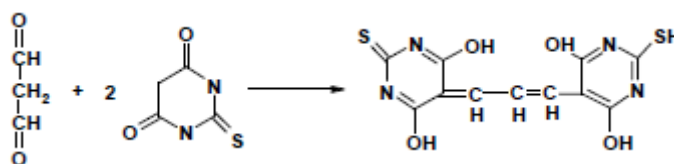
10 µL d'extrait enzymatique sont déposés dans chaque puits auxquels sont ajoutés du tampon phosphate de potassium 100 mM, pH 7,4 et du GSH 1 mM (concentration finale). La réaction est initiée par l'ajout du CDNB 1 mM (concentration finale) dans tous les puits. La vitesse initiale de réaction est suivie par mesure de l'absorbance à 340 nm pendant 20 min. L'activité enzymatique est calculée en utilisant le coefficient d'extinction molaire de 9,6 mM⁻¹.cm⁻¹ à 340 nm du CDNB. Une unité est définie comme la quantité d'enzyme produisant 1 µmol de produit en 1 min (Nepovim *et al.* 2004 ; Vidal et Narbonne, 2000).

3.2.8. Détermination des produits de peroxydation lipidique (TBARs-MDA)

Le malondialdéhyde (MDA) est le produit final issu de l'autooxydation et de l'oxydation enzymatique des acides gras polyinsaturés cellulaires généré en cas de stress notamment. Le produit final principal généré lors de la peroxydation lipidique étant le malondialdéhyde, il est utilisé comme référence et les résultats exprimés en équivalent de

MDA. Bien que controversées car surestimant probablement la teneur en MDA, les techniques basées sur la quantification du MDA pour évaluer la peroxydation lipidique sont relativement simples à mettre en œuvre et dans notre cas, permettent des comparaisons entre échantillons. Plusieurs améliorations ont été apportées au protocole initial afin de ne pas prendre en compte un certain nombre de molécules créant des interférences comme les sucres ou certains pigments (Hodges *et al.* 1999).

Le MDA peut réagir avec 2 molécules d'acide thiobarbiturique pour donner un complexe. D'autres molécules peuvent être réactives à l'acide thiobarbiturique appelées globalement TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) comme les hydroperoxydes LOOH et les aldéhydes. Le complexe formé avec l'acide 2-thiobarbiturique (TBA) est suivi en lumière visible :



L'absorbance est mesurée à 532 nm (complexes TBA-MDA), mais aussi à 440 nm et 600 nm pour tenir compte des interférences dues respectivement aux réactions TBA-Sucres et à la turbidité du milieu réactionnel (Hodges *et al.* 1999). Les réactions sont donc réalisées avec un réactif contenant ou non du TBA : 20% d'acide trichloracétique (p/v), 0.01% (p/v) d'hydroxytoluène butylé (BHT) (à partir d'une solution initiale à 0,2% dans de l'éthanol) et, s'il y a présence de TBA, 0.65% (p/v) de TBA.

Les extraits ont été préparés à partir de 200 mg de matière sèche et 2 mL de mélange éthanol: eau 80:20. Après extraction 30 min à température ambiante puis centrifugation 10 min à 3000 g, le surnageant est récupéré. Il servira à préparer 4 aliquotes de 200 μ L ; 2 sont destinés à une mesure avec le réactif TBA+ et 2 pour une mesure avec le réactif TBA-. Le réactif (200 μ L) est ajouté aux aliquotes ; l'ensemble est chauffé à 95 °C 25 min. La réaction est stoppée sur la glace. L'absorbance du milieu réactionnel est mesurée à 532, 440 et 600 nm. Il a été vérifié que les absorbances des échantillons étaient bien comprises entre celles d'une gamme d'étalonnage de MDA établie entre 0 et 40 μ M.

Les résultats sont exprimés en $\text{nmol MDA}_{\text{équivalents}} \cdot \text{g}^{-1}$ poids sec. Ils sont calculés de la manière suivante :

- 1) $[(\text{Abs } 532_{+\text{TBA}}) - (\text{Abs } 600_{+\text{TBA}}) - (\text{Abs } 532_{-\text{TBA}} - \text{Abs } 600_{-\text{TBA}})] = \mathbf{A}$
- 2) $[(\text{Abs } 440_{+\text{TBA}} - \text{Abs } 600_{+\text{TBA}}) 0.0571] = \mathbf{B}$
- 3) $\text{MDA}_{\text{équivalents}} (\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}) = [(\mathbf{A} - \mathbf{B}) / 157\ 000] 10^6$

$$4) \text{MDA}_{\text{équivalents}} (\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}) = [\text{MDA}_{\text{équivalents}} (\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1}) \times 2] / (\text{g poids sec/ml extrait}).$$

3.2.9. Mesure de la capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante totale permet d'évaluer la quantité d'antioxydants dans un matériel biologique. La méthode choisie est le suivi de la disparition d'un radical libre, l'ABTS^{o+}, sous l'action un extrait contenant des antioxydants. Ce cation est généré en mélangeant 5 mL d'une solution aqueuse d'ABTS 7 mM et 88 µL de persulfate de potassium 140 mM (2,45 mM final K₂S₂O₈) suivi d'une incubation entre 12 et 16 heures à température ambiante. L'oxydation commence dès le mélange mais n'est pas stable et n'est pas maximale avant 6 h. Le réactif est stable deux jours à températures ambiante, à l'obscurité. Comme l'ABTS et le persulfate de K réagissent dans un rapport 1:0,5, l'oxydation de l'ABTS est incomplète (Pellegrini *et al.*, 1999 ; Re *et al.*, 1999). L'ABTS est incolore en solution alors que son cation donne une solution verte.

La solution radicalaire ABTS^{o+} obtenue est diluée au 1/50^e pour obtenir une absorbance de 0,7 unité ± 0,2 unité à 734 nm. Une gamme de Trolox (antioxydant de référence) est préparée pour chaque série de mesures. La solution mère 6 mM est diluée pour préparer une gamme de 0 à 40 µM pour avoir une variation linéaire en fonction de la concentration en Trolox. 10 µL d'échantillons sont mélangé avec 290 µL de réactif à l'ABTS. L'absorbance est mesurée à 734 nm.

Les résultats sont exprimés en équivalent Trolox à partir du calcul du pourcentage d'inhibition de la coloration de la solution radicalaire ABTS^{o+} :

$$1- \% \text{ d'inhibition} = 100 - (\text{DO}_{\text{essai}} * 100\% / \text{DO}_{\text{initiale}})$$

$$\text{DO}_{\text{initiale}} = \text{DO}_{\text{sans antioxydant}}$$

2- Etablissement de la gamme d'étalonnage du Trolox : % d'inhibition en fonction de la concentration en antioxydant

3- Expression des résultats des échantillons en équivalent Trolox.

3.2.10. Dosage des pigments

L'extraction des pigments est faite sur les lyophilisats broyés (MS). Les microtubes contenant 50 mg d'échantillons sont remplis de 1 mL d'acétone à 80 % puis placés sur un agitateur rotatif pendant 10 à 20 minutes (les fragments de végétaux doivent être blancs).

Après centrifugation pour éliminer les débris (5 min à 13000 g), les surnageants sont récupérés. L'absorbance des échantillons par rapport à l'acétone à 80 % est mesurée à 470, 645 et 663 nm au spectrophotomètre à plaques. Les extraits sont dilués avec de l'acétone à 80 % pour atteindre une absorbance maximale de 0,8. Les teneurs en pigments sont calculées en $\mu\text{g.mL}^{-1}$ selon les équations suivantes (Lichtenthaler et Wellburn, 1983).

$$\text{Chlorophylle a: } Ca = 12,21 \text{ DO}_{663} - 2,81 \text{ DO}_{645}$$

$$\text{Chlorophylle b: } Cb = 20,13 \text{ DO}_{645} - 5,03 \text{ DO}_{663}$$

$$\text{Chlorophylles totales : } C = Ca + Cb$$

$$\text{Caroténoïdes totaux (K), (xanthophylle+carotènes)} = (1000 \text{ DO}_{470} - 3,27 Ca - 104 Cb) / 229.$$

3.3. Extraction des cires cuticulaires

Les cires des feuilles du palmier dattier ont été extraites par trempage d'une masse sèche de 200 g de palmes découpées grossièrement. L'extraction des cires est réalisée avec 1L de dichlorométhane (DCM) mélangé doucement pendant 30 secondes. Après récupération du DCM et séchage rapide des fragments de feuilles sous la hotte, celles-ci sont ensuite trempées dans 1L de méthanol pendant 30 secondes et le méthanol récupéré. Chacun des extraits est filtré sur un filtre en quartz (PALLFLEX 2500QAT-UM 90MM). Ensuite, ils sont concentrés au rotavapor, transvasés chacun dans une fiole pré-pesée et laisser à évaporer complètement sous la hotte. La masse de la fraction organique est calculée. Les fractions sont ensuite analysées selon le protocole utilisé pour analyser les HAP décrit ci-dessous. Après séparation par chromatographie liquide sur gel de silice, la fraction hydrocarbures est obtenue avec le mélange cyclohexane/dichlorométhane (70/30) puis la fraction polaire avec du dichlorométhane /méthanol (50/50). Après séchage sous hotte, les fractions sont analysées en chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse et les HAP ont été quantifiés selon la méthode de l'étalon interne.

3.4. Dosage des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

La matière organique soluble contenue dans les matrices solides broyées est extraite de manière automatique au moyen d'un extracteur automatique sous pression ASE 200 commercialisé par Dionex. Cet appareil permet d'extraire la matière organique à haute pression et forte température ce qui a pour effet d'augmenter la mobilité des molécules

organiques et du solvant, minimisant ainsi le temps d'extraction et la quantité de solvant utilisée.

Les échantillons sont introduits dans des cellules en acier démontables constituées d'un cylindre fermé par deux embouts permettant l'entrée de solvant à une extrémité de la cellule et la sortie de l'extrait organique par l'autre extrémité (Figure 30). L'appareil est constitué de deux tourniquets, l'un pour les cellules d'extraction, l'autre pour les flacons récupérateurs contenant les extraits organiques. Un bras mécanique assure le transfert des cellules d'extraction du tourniquet vers le four. Celui-ci permet de fixer la température d'extraction et de maintenir la cellule dans une enceinte sous pression pour éviter tout risque lors de la montée en pression dans la cellule.

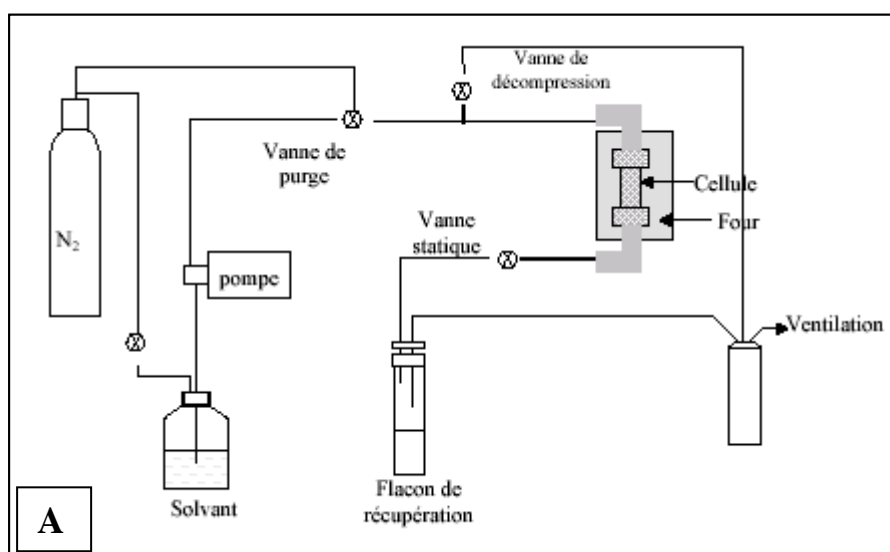




Figure 30 : A- Schéma de l'extracteur automatique ASE 200, B- Photo de l'extracteur
Le solvant d'extraction est injecté dans la cellule jusqu'à obtenir la pression sélectionnée par l'opérateur. La pression et la température sont maintenues le temps de l'extraction puis l'extrait organique est chassé de la cellule d'extraction vers le flacon de récupération par un flux de solvant frais. Les dernières traces de solvant présentes dans les tubulures et dans la cellule d'extraction sont alors chassées par un flux d'azote vers le flacon de récupération.

Avant extraction, les cellules sont rincées par un mélange dichlorométhane : méthanol (1 : 1, v : v) à 150 °C et sous 100 bar. Une fois propre, les extractions des échantillons sont réalisées avec du dichlorométhane à 100°C et sous 130 bar. Le nombre de cycles d'extraction est fonction de la matrice analysée.

Les phases organiques sont ensuite rassemblées, le volume est diminué à l'aide d'un rotavapor (Figure 31). Le volume de la solution organique est alors fixé à 10, 20 ou 50 mL, en fonction de la richesse de l'extrait, à l'aide de fioles jaugées. Un volume déterminé (0,5 ou 1 mL) est prélevé, transféré dans un flacon préalablement pesé, puis mis à sec sous un flux d'azote. Cette manipulation permet de déterminer le taux d'extrait organique en mg d'extrait organique par gramme de matrice ou bien en pourcentage de la matrice.

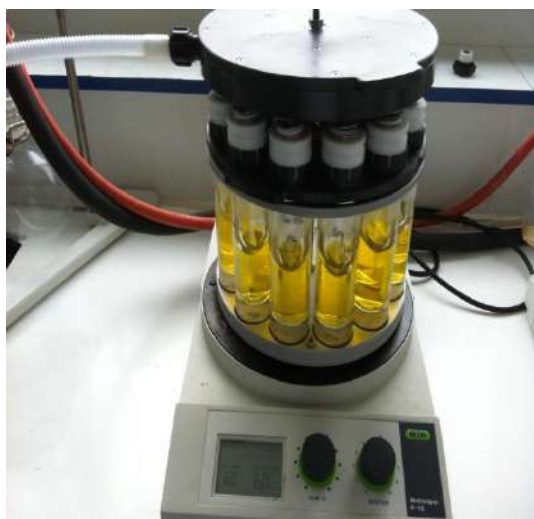
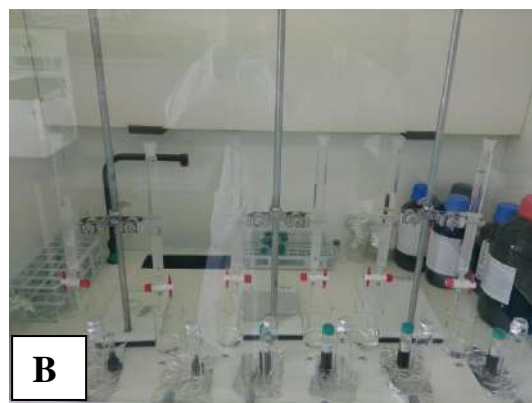


Figure 31 : Le rotavapor P-12 connecté à la pompe à vide V-700.

Les phases organiques obtenues après extraction des échantillons contiennent un large panel de molécules organiques présentant différentes polarités, différentes structures et différentes tailles. Aussi, les extraits organiques suivent un fractionnement par chromatographie liquide sur silice en amont de leurs quantifications par chromatographie gazeuse – spectrométrie de masse. Cette étape permet d'éliminer les composés polaires afin de ne conserver que la fraction « hydrocarbure » contenant les HAP.

La silice utilisée pour cette étape de fractionnement est pré-conditionnée. Préparer un gel de silice on mélangeant celle-ci avec un mélange de cyclohexane/ dichlorométhane. Le mélange contenant les hydrocarbures dilué dans le cyclohexane/ dichlorométhane est injecté en tête de colonne de silice. L'éluat contenant ces molécules est récupéré dans un flacon préalablement pesé : il constituera la fraction appelée *hydrocarbures* (Figure 32).



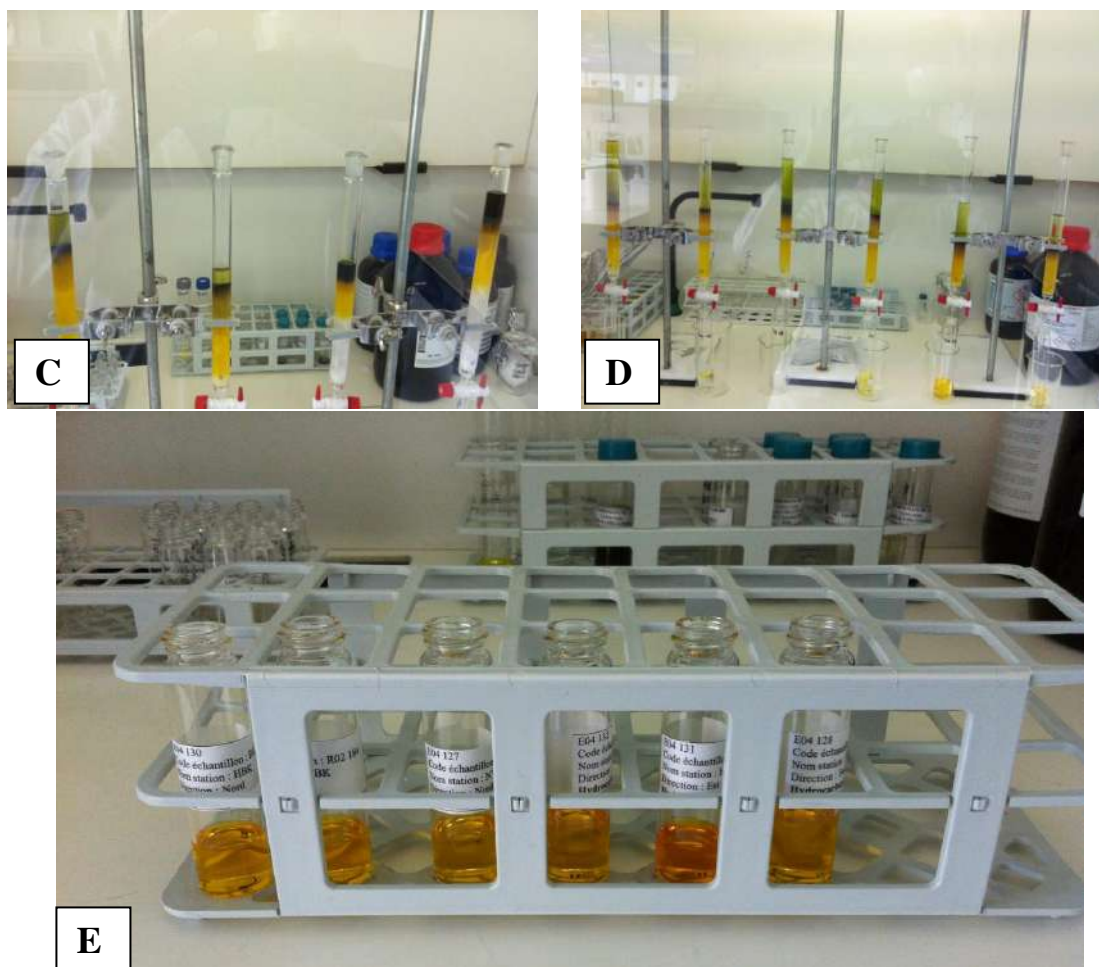


Figure 32 : A, B, C, D: les étapes de fractionnement sur gel de silice, E : les fractions récupérées.

Une fois la fraction aliphatique éluée (5ml de cyclohexane), la polarité du solvant est augmentée en utilisant un mélange cyclohexane : DCM (65 : 35, v : v). L'augmentation de la polarité de la phase mobile permet d'éluer les molécules hydrocarbonées portant des structures contenant des électrons π délocalisés. C'est le cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces molécules constituent la fraction *aromatique*. La fraction est complètement éluée quand le solvant devient incolore.

La polarité de la phase mobile est encore augmentée en utilisant un mélange DCM : MeOH (1 : 1, v : v). Aussitôt le changement de phase mobile effectué, le flacon de réception est changé par le flacon portant l'appellation *polaire*. La phase mobile est alors ajoutée jusqu'à ce que l'éluat redevienne incolore.

En fonction des masses obtenues, les différentes fractions *aliphatique*, *aromatique* et *polaire* ont leur volume fixé de manière à obtenir des solutions dont le titre massique est d'environ 4 mg/mL.

Les trois différentes fractions *aromatique*, *aliphatique* et *polaire* correspondent encore à des mélanges complexes de molécules. La détermination à l'échelle moléculaire de la composition de la matière organique nécessite une nouvelle étape de fractionnement chromatographique. Ce fractionnement est effectué par une chromatographie en phase gazeuse. Les analyses chromatographiques ont été effectuées avec un chromatographe en phase gazeuse Shimadzu 2010 équipé d'un injecteur Split-Splitless maintenu à une température de 310°C. La séparation chromatographique est réalisée avec une colonne capillaire en silice fondue DB-5 J&W Scientific (longueur : 60 m ; diamètre: 0,25 mm ; épaisseur de film : 0,1 µm à phase non polaire (5% phényl-méthylpolysiloxane).

La détection est assurée par un spectromètre de masse Shimadzu 2010+MS couplé au chromatographe par une ligne de transfert chauffée à 250°C. Le gaz vecteur est éliminé par pompage (le vide dans le spectromètre de masse est inférieur à 10^{-5} Torr) alors que les molécules arrivant successivement dans la chambre d'ionisation sont bombardées par un faisceau d'électrons à 70 eV. Les molécules s'ionisent en une espèce chimique très instable nommée cation – radical ou ion moléculaire, qui se fragmente. Les espèces portant une charge positive sont ensuite accélérées par un champ électrique qui focalise les espèces chimiques en un faisceau. Ce faisceau passe au travers d'un champ magnétique obtenu par un quadripôle (Figure 33). Les ions sélectionnés selon leur rapport masse/charge vont ensuite frapper un détecteur. Cette technique permet d'obtenir une répartition des fragments formés via l'ionisation et la fragmentation d'une molécule donnée. Le fragmentogramme obtenu permet l'identification des molécules présentes dans une fraction donnée.

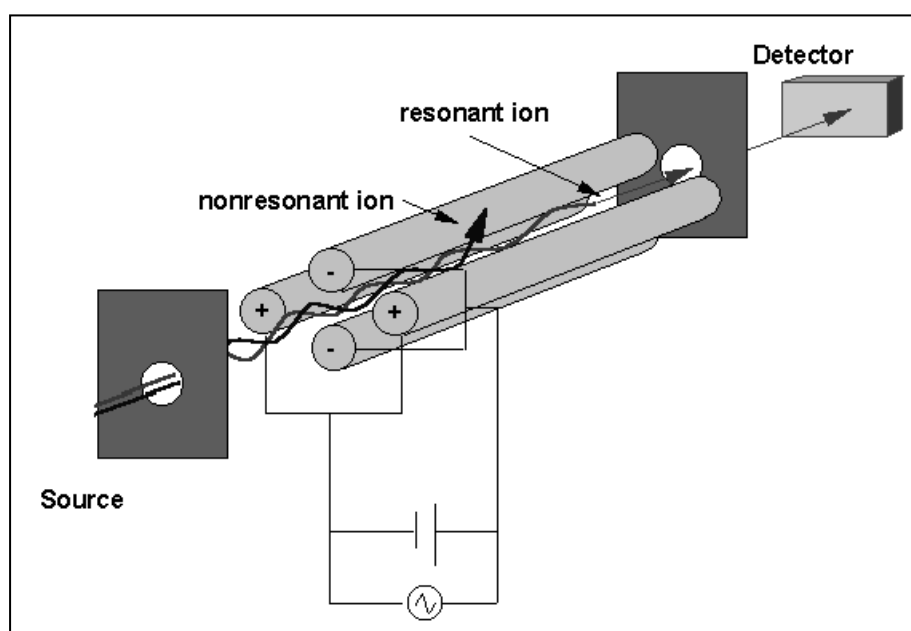


Figure 33 : Schéma de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

L'intérêt de la quantification via la méthode de l'étalon interne est d'éliminer les incertitudes liées aux effets de matrice. Pour cela un standard interne est ajouté dans la solution à analyser. Le standard interne est une molécule, qui ne se retrouve pas dans la nature, chimiquement et structurellement proche de la molécule à analyser de manière à ce que ces deux molécules subissent les mêmes effets de matrice.

3.5. Traitement des données

3.5.1. Analyses en Composantes Principales (ACP)

L'ACP est une méthode intéressante pour l'analyse de données correspondant à un nombre important de variables. En effet, c'est une technique descriptive multidimensionnelle dans laquelle chaque variable définit un vecteur. Les corrélations entre les variables sont visualisées par projection sur un plan selon deux axes construits de manière que la dispersion des données soit la plus proche possible de la configuration réelle des points dans l'espace complet. Chaque axe représente un certain pourcentage de l'information globale de l'analyse. Les échantillons peuvent aussi être représentés dans ces projections de manière à analyser leur proximité par rapport aux variables étudiées. Deux échantillons sont alors très proches si les valeurs de chaque variable sont presque égales.

Aussi, pour appréhender l'ensemble des données quantitatives obtenues pour tous les échantillons à analyser, des analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées sur le logiciel XLStat. Ces ACP sont basés sur le coefficient de corrélation de Pearson qui a pour intérêt d'attribuer le même poids à toutes les variables quel que soit leur échelle de valeur. Seuls les axes donnant les informations intéressantes seront présentés.

3.5.2. Analyses statistiques

Les données sont représentées graphiquement sous Excel par leurs moyennes et les barres d'erreur représentent les écarts standards à la moyenne ($sem = \text{écart type} / n$) (Cumming *et al.*, 2007).

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel XLstat (version 2013). La normalité et l'homoscédasticité (égalité des variances) des séries à comparer sont vérifiées à chaque fois. Le test de Shapiro-Wilk est utilisé pour tester la normalité et celui de Bartlett

pour l'homoscédasticité. Si les deux conditions sont vérifiées, une comparaison multiple des moyennes est effectuée par un test paramétrique d'analyse de variances (ANOVA) suivi d'un classement des moyennes de Tukey. Si l'une des deux conditions n'est pas vérifiée, le classement des moyennes est réalisé par une comparaison non paramétrique de Kruskal-Wallis suivie d'un classement par paire corrigé par l'ajustement de Bonferroni.

Les différences significatives sont représentées par des lettres, de « a » à « d » sur les graphiques, la même lettre pour deux échantillons indiquant l'absence de différence significative.

Chapitre 3 :

Résultats et discussions

Chapitre 3 : Résultats et discussions

Cette étude avait pour objectif d'évaluer la possibilité de détecter la pollution atmosphérique liée aux HAP dans la région de Ouargla au moyen d'une espèce végétale. La biosurveillance offre en effet, de nombreux avantages comparativement aux analyses physico-chimiques de l'air. Une première approche a consisté à tester une espèce lichénique originaire du nord de l'Algérie et implantée à Ouargla pour le temps des mesures. Cette approche a très rapidement montré ses limites et le choix d'un second modèle végétal s'est avéré indispensable. C'est pourquoi, nous avons retenu le palmier dattier pour sujet d'étude et son utilisation dans la biosurveillance. Cette étude a été basée sur l'utilisation de biomarqueurs biochimiques.

Le chapitre qui suit présentera donc tout d'abord les travaux réalisés sur le modèle lichénique *Xanthoria parietina*. Ensuite, il a été nécessaire de mieux connaître le modèle du palmier dattier utilisé comme second modèle pour rechercher ensuite de potentielles relations entre certains marqueurs biologiques et les HAP dans le modèle choisi. Une étude anatomique des feuilles directement impactées par la pollution atmosphérique et l'étude de la variabilité des marqueurs métaboliques en fonction de l'âge des couronnes ont donc été nécessaires. Après avoir retenu la couronne 4, une quantification des HAP dans cette couronne et les corrélations avec les marqueurs moléculaires ont été recherchés. Enfin, la pénétration des HAP dans les feuilles se faisant essentiellement par les cires cuticulaires, leur caractérisation et la recherche de HAP ont fait l'objet d'un dernier point.

1. Biosurveillance de la pollution atmosphérique à l'aide d'un lichen : *Xanthoria parietina*

Les travaux évaluant la possibilité d'utiliser un lichen pour la détection de la pollution atmosphérique ont fait l'objet d'une publication intégrée dans la partie qui suit :

Khelil R, Khelil A., Dadamoussa B., Cabello-Hurtado F. & Esnault M.A. 2013. Bio surveillance de la pollution de l'air à l'aide du lichen *Xanthoria parietina*. *PhytoChem & BioSub Journal* Vol. 7(2) : 41-51.

Bio surveillance de la pollution de l'air à l'aide du lichen *Xanthoria parietina*.

KHELIL R. *, KHELIL A. *, DADAMOUSA B. *, CABELLO-HURTADO F. ** & ESNAULT M.A. **

* Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-Arides
Université Kasdi Merbah, , BP 511, 30000 Ouargla, Algérie

** UMR Ecobio 6553, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France

Received: April 14, 2013; Accepted: June 06, 2013

Corresponding author Email rkhelil2002@yahoo.fr

Copyright © 2013-POSJ

Résumé- Notre travail a porté sur la biodétection de la pollution atmosphérique par les hydrocarbures dans 3 stations de la wilaya de Ouargla en zone Saharienne Algérienne, Hassi Messaoud (HMD), Haoud Berkaoui (HBK) et Ouargla centre (OGX). Les lichens prélevés sur leur support dans le nord de l'Algérie ont été utilisés comme modèle biologique pour évaluer les effets de cette pollution. Les teneurs en composés solubles dans l'hexane (CSH) dans les transplants lichéniques augmentent puis diminuent au cours du temps, tout en présentant des variations entre les 3 stations. Les lichens de la station de HMD présentent les valeurs les plus élevées par rapport aux autres stations. Globalement, le rapport MF/MS diminue pendant l'expérimentation, surtout pour HMD. Pour ce qui concerne la teneur en chlorophylle, elle diminue pour les 3 stations. Les modifications observées au cours du temps pourraient avoir pour origine deux facteurs, la pollution d'une part et la déshydratation des thalles sous l'effet de la chaleur d'autre part. Si l'accumulation de composés solubles dans l'hexane est plus probablement à relier à la pollution, la chute du rapport MF/MS est quant à elle plutôt liée à la déshydratation.

Mots-clés : lichen, transplantation, pollution atmosphérique, désert, hydrocarbures

Biomonitoring air pollution with the lichen *Xanthoria parietina*

Abstract- Our work focused on biodetection of air pollution by hydrocarbons in three stations of the Wilaya of Ouargla in Algerian Sahara namely, Hassi Messaoud (HMD), Haoud Berkaoui (HBK) and the center of Ouargla (OGX). We used lichens from the north of Algeria as biological model after transplantation in order to evaluate the effects of this pollution. The levels of hexane soluble compounds (CSH) exhibit variation (broadly increasing then decreasing) over time for all three stations taking into account that the station HMD presents the highest values compared to other stations. The ratio MF/MS reveals fluctuating but more or less declining values especially for HMD. Generally a decrease in this ratio at the end of the experiment is observed. With regard to chlorophyll content, we record the decrease of chlorophyll for the three stations. The variations in the different contents are probably due to two factors, pollution on the one hand notably for CSH, and dehydration of thalli under the effect of heat on the other hand for MF/MS notably.

Keywords: lichen, transplantation, atmospheric pollution, desert, hydrocarbon

Introduction

L'augmentation des phénomènes de pollution environnementale impliquant des conséquences sanitaire et économique ont conduit à une prise de conscience politique stimulant la recherche de moyens pour les détecter et les réduire. Ces pollutions génèrent des perturbations chez les êtres vivants (Yu et Tsunoda, 2005) et dans les compartiments abiotiques fondamentaux (eau, sol, atmosphère).

L'exploitation des gisements de pétrole qui n'a cessé d'augmenter depuis le début du siècle dernier entraîne des risques de pollution (accidentelle et chronique) pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème (Soltani, 2004). La nécessité d'estimer les quantités présentes, de contrôler l'accumulation des produits pétroliers, leur transformation et leur devenir, comme d'en estimer l'impact sur la flore, la faune et l'environnement devient une priorité. Toutefois, les processus d'analyse des compartiments abiotiques sont lourds et onéreux à mettre en oeuvre (Sanderson *et al.*, 2004). C'est pourquoi la recherche d'espèces bioindicatrices et/ou bioaccumulatrices fait l'objet de nombreux travaux (Wolterbeek, 2002 ; Guidotti *et al.*, 2003).

Les bioindicateurs sont définis comme des organismes qui répondent à un certain niveau de pollution par un changement dans leur cycle de vie ou par l'accumulation d'un polluant particulier. Garrec et Van Haluwyn (2002) définissent la biosurveillance végétale comme l'utilisation d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution. Pour l'évaluation de la pollution de l'air, les organismes ou organes bioindicateurs et/ou bioaccumulateurs les plus communément appliqués sont les aiguilles de pin (Migaszewski *et al.*, 2002), les algues marines (Stengel *et al.*, 2004), les lichens et les mousses (Gerdol *et al.*, 2002a et b ; Migaszewski *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Ra *et al.*, 2005). Les lichens sont très dépendants de la qualité de l'air et des eaux de pluie d'où ils tirent leur alimentation. Peu sensibles aux pics de pollution, ce sont des organismes intégrateurs d'une pollution de fond (Deruelle et Lallemant, 1983). Ils peuvent donc informer sur la qualité moyenne de l'air. Ils ont été largement testés comme bioindicateurs et/ou bioaccumulateurs de la pollution atmosphérique au cours des 40 dernières années depuis les travaux de Hawksworth et Rose en 1970 comme indicateurs de la concentration en SO₂ (Calatayud *et al.*, 1996 ; Garty *et al.*, 1993 ; Thomas *et al.*, 1995). Récemment, les lichens ont été utilisés pour la biosurveillance de la contamination par les oligo-éléments en Italie, dans la Province de Pise (Scerbo *et al.*, 2002) et en Vénétie (Nimis *et al.*, 2000 ; 2001), pour étudier l'effet de la pollution liée aux activités industrielles en Argentine (Gonzales *et al.*, 1996), de la contamination par les métaux lourds en zone subarctique (Thomas *et al.* 1995 ; Poblet *et al.*, 1997) et pour la détermination de la concentration en zinc dans l'Ouest de l'Irlande (Stengel *et al.*, 2004) et en Finlande (Takala *et al.*, 1998). Ils ont également été choisis comme bioindicateurs des hydrocarbures aromatiques totaux (HAP) (Migaszewski *et al.*, 2002) et se sont révélés accumuler des concentrations de HAP plus élevées que les aiguilles de pins (Augusto *et al.*, 2010).

La wilaya de Ouargla en Algérie est située dans le bassin principal de production des hydrocarbures avec deux grands champs pétroliers, au niveau de Hassi Messaoud d'une part et Haoud Berkaoui d'autre part. Entre ces deux zones pétrolières se trouve la ville de Ouargla considérée comme l'une des plus grande Oasis du Sahara Algérien. Elle occupe le centre d'une cuvette (Rouvillois-Brigol, 1975) et se trouve donc confrontée aux problèmes de pollution par les hydrocarbures.

Notre objectif était donc de rechercher une espèce végétale pouvant être bioindicatrice des niveaux de concentration en hydrocarbures totaux dans un contexte de biosurveillance. Pour cette première approche à Ouargla, notre choix s'est porté sur un lichen connu comme

bioindicateur qui a été transplanté dans la région de Ouargla afin d'évaluer son utilisation potentielle sur un court terme (quelques mois). L'étude a été faite dans trois zones, au niveau des champs pétroliers de Hassi Messaoud et Haoud Berkaoui proprement dits, et au niveau de la cuvette de la ville de Ouargla soumise aux pollutions liées à la circulation routière par ailleurs.

Matériel et méthodes

Sites d'échantillonnage et de transplantation

L'étude a été réalisée sur 3 ans pour des contraintes logistiques : Hassi Messaoud (HMD) en 2004, Ouargla (OGX) en 2005 et Haoud Berkaoui (HBK) en 2006. Aucun lichen de grande taille n'étant présent dans cette région saharienne, nous avons choisi d'introduire une espèce bien répandue dans les forêts du nord de l'Algérie. Cette méthode avait l'avantage de permettre une introduction de l'espèce sur son support donc sans léser l'échantillon. L'objectif était de déterminer si dans ces conditions, l'espèce pouvait continuer à se développer un temps suffisant sous un climat saharien pour être une espèce utilisable en bioindication ainsi que son potentiel comme bio-indicateur.

L'espèce lichénique retenue est une espèce largement répandue, récoltée au niveau de la région d'El Chut (Annaba) considérée comme une région non polluée. Il s'agit du *Xanthoria parietina* (L.) Th., espèce à thalle foliacé, nitrophile se développant sur différents phorophytes et notamment sur *Ceratonia siliqua* L. (caroubier) qui a été retenu pour la transplantation. Les branches recouvertes de thalles ont été prélevées puis fixées à l'aide d'une ficelle à une hauteur de 1,5 m du sol sur divers supports dans les trois zones de travail.

Pour mieux connaître les niveaux de pollution, il est important de mettre en place un réseau de zones de transplantation en essayant de choisir des sites en nombre suffisant et correctement répartis autour de la source de pollution. Le nombre de sites doit être plus important sous les vents dominants et plus réduits dans les autres directions (Semadi, 1989). Cinq à huit sites ont été utilisés pour les 3 stations (Tableau 1). Les résultats présentés donnent une valeur moyenne obtenue pour tous les sites dans chaque station.

Tableau 1. Listes des sites d'échantillonnage pour les 3 stations

Stations	Désignation des sites						Total de sites
HMD	CINA (3 sites)	Zone industrielle	Cité des 1850 logements	Cité des 136 logements	Bouamama	Cité des 1666 logements	8
OGX	Ouargla (2 sites)	Sokra	Ain Beida	Sidi Khouiled	Hassi Ben Abdellah	N'Goussa	7
HBK	Zone des torches	L'espace séminaire	Base de vie	Ben Kahla	Guellala	//	5

HMD : Hassi Messaoud, OGX : Ouargla, HBK : Haoud Berkaoui
CINA : Centre Industriel Naili Abdelhalim Nord

Prélèvements des échantillons

A chaque échantillonnage ou prélèvement, une partie des thalles est détaché du phorophyte à l'aide d'un couteau. Les échantillons sont placés dans des sachets en plastique, fermés afin de limiter les pertes d'eau par évapotranspiration jusqu'à l'arrivée au laboratoire.

Les prélèvements ont eu lieu tous les 15 jours ou 30 jours pour l'ensemble des sites et des stations et sur 3 mois. Les thalles transplantés sont tous prélevés le même jour pour tous les sites d'une même station. Ils sont conservés au maximum 24 h dans une boîte hermétiquement fermées afin de limiter l'évapotranspiration avant analyses.

Techniques analytiques

Les **composés solubles dans l'hexane (CSH)** sont obtenus à l'aide d'un dispositif d'extraction dit "soxhlet". La phase organique présente dans la masse biologique est ainsi extraite dans le solvant organique (N-hexane).

Dans une cartouche en cellulose préalablement conditionnée à l'hexane (pendant 4 heures), 0.5 g de thalles de lichens sont additionnés de 1g de sulfate de sodium anhydre qui permet d'éliminer toute trace d'eau. L'extraction en elle-même est effectuée avec 100 mL de N-hexane. Le tout est mis dans l'extracteur soxhlet placé sur une plaque chauffante à la température d'ébullition du N-hexane, durant 3 à 4 heures. Une éprouvette contenant une solution concentrée de NaOH, est reliée au dispositif d'extraction par un tuyau servant à l'échappement des gaz toxiques.

Après extraction, les composés sont quantifiés dans un creuset par gravimétrie. L'hexane est évaporé au bain-marie puis dans un dessiccateur contenant du gel de silice pendant 30 min. La teneur en composés solubles dans l'hexane est exprimée en mg par g de matière sèche de thalle lichénique.

Malgré la possibilité de pertes des hydrocarbures légers suite à l'évaporation du solvant, l'emploi de cette méthode est accepté quand il s'agit de quantifier les hydrocarbures totaux existant dans une zone à forte concentration en ces mêmes éléments (Quevauviller, 2001 in Rouidi, 2001).

La **matière sèche (MS)** des échantillons est déterminée après passage à l'étuve à 105°C pendant 24 heures pour déterminer le rapport MF/MS (matière fraîche/matière sèche).

La **quantification de la chlorophylle** a été réalisée en utilisant la méthode établie par Lichtenthaler et Wellburn (1983). Pour cela, 0.5 g de thalle sont pesés puis broyés au mortier en présence de 5 ml d'acétone à 80%. Le mélange obtenu est centrifugé 15 min à 4100 tours.min⁻¹, puis le surnageant est récupéré. L'absorbance (A) est mesurée au spectromètre à 663 nm et 665 nm. Les équations suivantes sont utilisées pour calculer les quantités de chlorophylle a, b (Ca, Cb) :

- Teneur en chlorophylle a (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$) : **Ca = 12,21 A663 – 2,81 A645**
- Teneur en chlorophylle b (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$) : **Cb = 20,13 A645 – 5,03 A663**
- Teneur en chlorophylle totale (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$) : **C = Ca + Cb**

RESULTATS

Variations des teneurs en composés solubles dans l'hexane (CSH).

Lors de leur installation, les lichens prélevés dans une zone considérée saine possédaient une quantité de 5600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche de CSH pour l'essai à Hassi Messaoud, 2000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pour l'essai à Ouargla et 3400 $\mu\text{g.g}^{-1}$ à Haoud Berkaoui. Après transplantation, quelque soit la date de prélèvement les teneurs en CSH dépassent celles de l'échantillon témoin et fluctuent dans le temps (Figure 1).

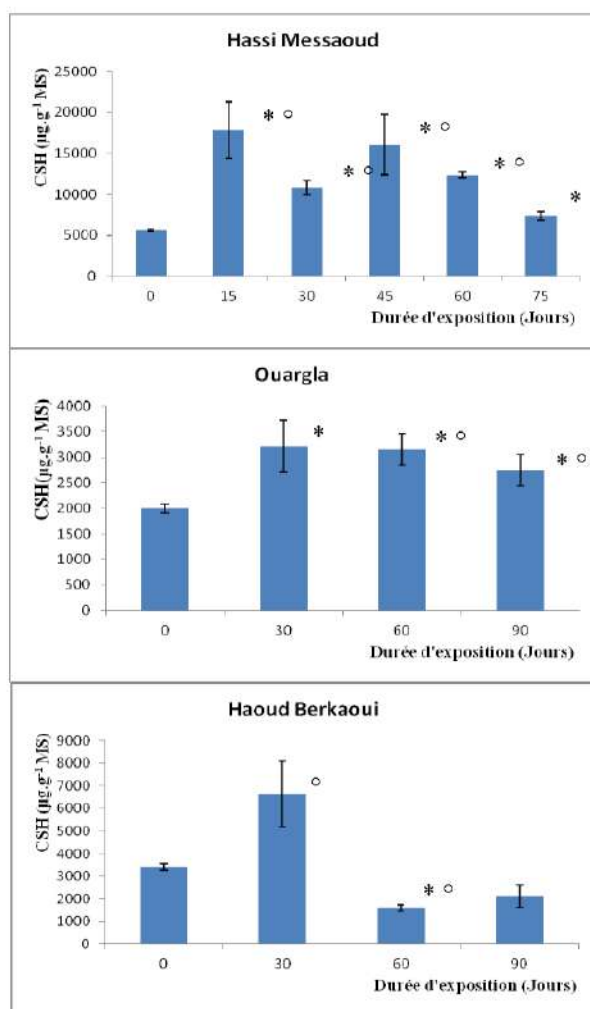


Figure 1 : Evolution des teneurs en composés solubles dans l'hexane (CSH) aux différents temps de prélèvement dans les différentes stations. La barre sur les histogrammes correspond à l'écart standard à la moyenne. Un test de student (*) et un test de Mann-Whitney (°) ont été utilisés pour comparer les mesures par rapport au témoin ($p < 0,05$).

Les lichens accumulent les CSH en fonction de la durée d'exposition jusqu'à une certaine limite. Ainsi, à Hassi Messaoud, le maximum d'accumulation est atteint après 15 jours d'exposition avec une teneur moyenne de $17825 \mu\text{g.g}^{-1}$ soit une augmentation d'un facteur 3,1. A Ouargla, le maxima de $3210 \mu\text{g.g}^{-1}$ correspond à une augmentation d'un facteur 1,6. A Haoud Berkaoui, il est de $6640 \mu\text{g.g}^{-1}$ soit une augmentation de 1,9. Après ce maxima, il y a globalement une diminution des teneurs. En fin d'expérimentation, celles-ci tendent à un retour aux valeurs initiales (respectivement 7325 , 2743 et $2120 \mu\text{g.g}^{-1}$). On peut observer des variations plus fines dans la station de Hassi Messaoud pour laquelle les récoltes ont été faites tous les 15 jours.

Variation du rapport MF/MS

Le rapport MF/MS diminue durant toute l'expérimentation essentiellement pour HMD et Ouargla. Les rapports évoluent toutefois assez peu, de 1.086 à 1.028 à la fin d'exposition à Hassi Messaoud, de 1,15 à 0,988 à Ouargla et de 1,15 à 1,094 à Haoud Berkaoui (Figure 2). On peut remarquer une forte augmentation à 30 jours pour la station de Haoud Berkaoui qui pourrait être lié à un arrosage non programmé, les transplants étant installés dans des zones de palmeraie.

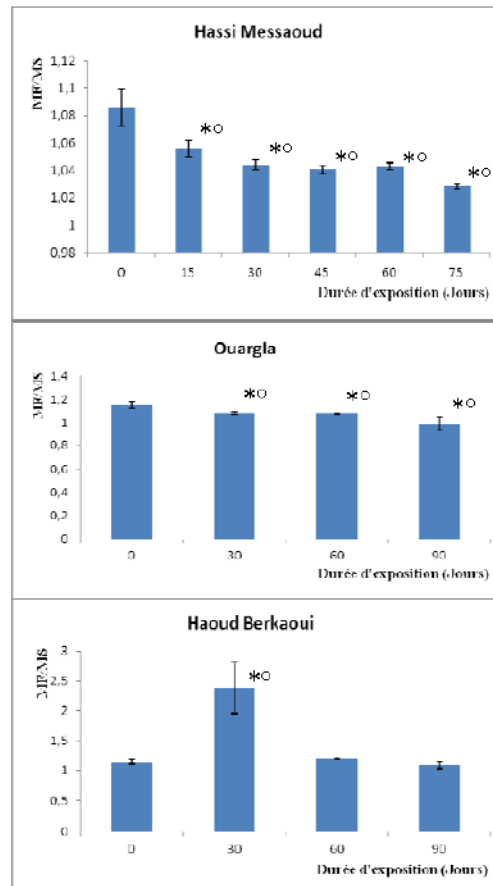


Figure 2 : Evolution du rapport MF/MS aux différents temps de prélèvement dans les différentes stations. La barre sur les histogrammes correspond à l'écart standard à la moyenne. Un test de student (*) et un test de Mann-Whitney (°) ont été utilisés pour comparer les mesures par rapport au témoin ($p < 0,05$).

Variation de la teneur en chlorophylle.

Les teneurs en chlorophylle subissent une régression remarquable à Hassi Messaoud depuis le témoin à $5,79 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS jusqu'à $1,87 \mu\text{g.g}^{-1}$ MS à la fin de l'expérimentation (Figure 3). Elle est très faible à Ouargla (de $11,15$ à $10,47 \mu\text{g.g}^{-1}$). Par contre, une chute importante est également à noter à Haoud Berkaoui (de $27,32$ à $6,92 \mu\text{g.g}^{-1}$).

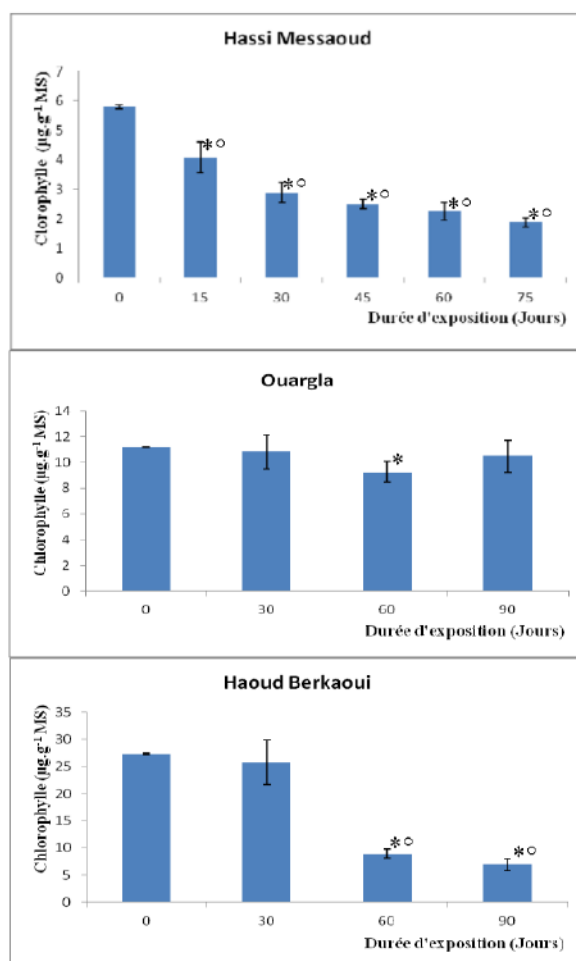


Figure 3 : Evolution de la teneur en chlorophylle aux différents temps de prélèvement dans les différentes stations. La barre sur les histogrammes correspond à l'écart standard à la moyenne. Un test de student (*) et un test de Mann-Whitney (°) ont été utilisés pour comparer les mesures par rapport au témoin ($p < 0,05$).

DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'intérêt potentiel d'un lichen comme témoin de la pollution par les hydrocarbures en zone saharienne. Les lichens n'étant pas présents au Sahara, il était nécessaire de les introduire, d'utiliser une approche par transplantation et de les évaluer comme biomarqueurs sur une période courte permettant leur survie. La teneur en composés solubles dans l'hexane varie au cours de l'expérimentation pour les 3 stations. Elles présentent une similitude dans cette variation au cours du temps. Elle est plus importante dans la station de Hassi Messaoud, située à proximité des torchères d'exploitation pétrolière qui représentent une source d'émission d'hydrocarbures. L'origine de ces composés solubles dans l'hexane peut être liée à cette pollution mais elle peut également provenir du végétal lui-même. En effet, l'hexane extrait également des molécules synthétisées par les lichens (Roux *et al.*, 2007). Toutefois, les lichens ayant une croissance extrêmement lente,

l'augmentation des teneurs en CSH dans les extraits après exposition sur une période relativement courte pour ces espèces, pourrait montrer que l'origine de ces composés serait plutôt liée à la pollution. De plus, la bioaccumulation, définie comme la somme des absorptions d'un polluant par voie directe pour une espèce végétale (Ramade, 1982) est bien connue chez les lichens. Ces phénomènes d'accumulation seraient dus aux particularités physiologiques des lichens qui ont la capacité de stocker les contaminants dans leurs tissus (Conti et Cecchetti, 2001). De ce fait, ils sont utilisés pour la mesure intégrée de la concentration des contaminants dans l'environnement. En effet, chez les lichens, le polluant ne jouerait pas de rôle fondamental dans le métabolisme et semble être stocké à l'intérieur des cellules. Lorsque sa concentration devient toxique pour la cellule, celle-ci est détruite ce qui se traduit par des symptômes de nécrose et des décolorations qui gagnent progressivement toutes les parties du thalle (Deruelle et Lallemant, 1983). Des phénomènes d'adsorption et désorption des contaminants impliquant probablement majoritairement des phénomènes passifs expliqueraient les teneurs en polluants relevées dans les études de ce type (Sloof, 1995). Cette accumulation a été démontrée dans le cas de la pollution aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (Guidotti *et al.*, 2003). Toutefois, les mécanismes impliqués n'étant pas connus, il convient de rester prudent dans l'interprétation des résultats à l'instar de Loppi *et al.* (2002, 2010).

Le rapport MF/MS constitue une bonne indication de l'état de la qualité de l'air, le développement du végétal étant perturbé par la pollution au détriment de la matière fraîche c'est-à-dire que plus l'accumulation du polluant est importante, plus le rapport MF/MS diminue (Alioua, 1995). Nous avons observé à plusieurs reprises la formation d'une fine couche blanchâtre à la surface des thalles de *Xanthoria*. Cette couche, probablement lipidique (Deruelle et Lallemant, 1983) jouerait un rôle de barrière contre l'absorption de l'eau et influencerait l'équilibre hydrique du thalle. Elle est plus imperméable et plus épaisse près d'une source de pollution. Pour ces auteurs, il est possible que le déséquilibre hydrique qu'elle engendre soit à l'origine de la contraction du thalle et de son détachement du substrat sur le bord. Le déséquilibre hydrique s'est traduit ici par une réduction du rapport MF/MS traduisant une perte d'eau pour les échantillons des trois stations. Dans notre expérimentation, il a sans doute une origine essentiellement climatique, l'augmentation de la température de l'air durant le temps d'exposition ainsi que l'ensoleillement conduisant à une diminution de l'humidité du milieu et par conséquent du rapport MF/MS par rapport au site d'origine du *Xanthoria*.

La teneur en pigments foliaires constitue une des principales signatures de l'état physiologique des plantes. Ils permettent l'assimilation de l'énergie lumineuse par la plante, interviennent lors de sa croissance et la protègent contre une multitude de facteurs tout au long de sa vie. La chlorophylle, principal pigment foliaire, est souvent utilisée comme indicateur pour évaluer le rendement potentiel d'une culture, la biomasse d'une forêt, pour détecter des carences nutritionnelles ou encore comme témoin pour divers types de pollution. Les teneurs en chlorophylle enregistrées à la fin de notre expérimentation sont très faibles dans les deux stations les plus exposées, Hassi Messaoud et Haoud Berkaoui en comparaison de celles du témoin. Ces valeurs diminuent au cours de la durée d'exposition et se traduisent visuellement par une décoloration des lobes des thalles, qui atteint par la suite tout le thalle en fonction de l'intensité de la pollution. Ces résultats peuvent être le témoin de la sensibilité de la photosynthèse et de la teneur en chlorophylle dans des conditions de pollutions. Toutefois, l'évolution du rapport MF/MS montre que le stress hydrique généré par la baisse de la teneur en eau peut aussi être impliqué. La quantification de la chlorophylle est largement utilisée pour évaluer l'état des échantillons et fournir une indication précoce du stress physiologique (Maxwell et Johnson, 2000 ; Ramade, 2007). Ainsi, elle a été utilisée pour montrer la tolérance et les effets chroniques de métaux lourds et autres xénobiotiques dans les lichens (Chettri *et al.*, 1998 ; Riga-Karandinos et Karandinos, 1998 ; Dzubaj *et al.*, 2008). Des

observations microscopiques montrent une plasmolyse progressive des cellules algales sous l'effet de la pollution qui perdent finalement leur coloration verte, à cause de la destruction des chlorophylles transformées en phaeophytine avant une dégradation complète de tous les pigments y compris les carotènes et les xanthophylles (Deruelle et Lallemand, 1983). La dégradation des chlorophylles en phaeophytine a d'ailleurs été utilisée comme une mesure des dommages causés par des concentrations élevées en SO₂ dans les lichens ou pour l'évaluation des effets de la pollution en métaux lourds dans les lichens épiphytes transplantés (Garty, 1987. Sanz *et al.*, 1992). Une étude à grande échelle des lichens a montré que la capacité de photosynthèse est fortement corrélée à la concentration de la chlorophylle a (Palmquist *et al.*, 2002).

Conclusion

Cette étude montre que les lichens accumulent probablement les polluants hydrocarbonés sur l'intervalle de temps (90 jours) utilisé ici. Compte tenu des travaux des auteurs en général dans ce domaine, *Xanthoria parietina* pourrait être une espèce modèle pour l'étude de la bioaccumulation des polluants hydrocarbonés. Les teneurs en composés solubles dans l'hexane accumulées par cette espèce ainsi que les résultats sur la teneur en chlorophylle et le rapport MF/MS, sont probablement dues, d'une part, aux facteurs intrinsèques propres à l'espèce étudiée (pouvoir accumulateur de *Xanthoria parietina*) et d'autre part, aux facteurs extrinsèques d'ordre climatiques et topographiques (pluviométrie et positionnement des sites d'échantillonnage). Cependant, l'usage des lichens pour la biosurveillance végétale pour estimer la qualité de l'air apparaît très limité dans les conditions climatiques en zone saharienne caractérisée par des fortes températures et une faible humidité. Pour cela, nous suggérons d'étendre l'approche par l'utilisation de végétaux supérieures locaux comme bioindicateurs et bioaccumulateurs de la pollution atmosphérique en zones arides et semi arides.

Références bibliographiques

- Augusto S., Máguãs C., Matos J., Pereira M.J., Branquinho C. 2010. *Environ. Pollut.* 158 : 483-489.
- Alioua A. 1995. Détection de la pollution mercurielle dans la région de Azzaba (Algérie- orientale) à l'aide des bioaccumulateurs *Xanthoria parietina*, *Olea cupea*, *Cupressus sempervirens*, *Casuarina equisetifolia* et *Triticum durum*. Mémoire. Magister. Université Annaba. 103 p.
- Calatayud M.J., Sanz M.J., Calvo E., Barreno E., Del Valle-Tascon X. 1996. Chlorophyll a fluorescence and chlorophyll content in *Parmelia quercina* thalli from a polluted region of northern Castellon (Spain). *Lichenologist*. 28: 49-65.
- Chettri M.K., Cook C.M., Vardaka E., Sawidis T., Lanaras T. 1998. The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*. *Environ. Exp. Bot.* 39: 1-10.
- Conti M.E., Cecchetti G. 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment- a review. *Environ. Pollut.* 114: 471-492.
- Deruelle S., Lallemand R. 1983. Les lichens témoins de la pollution. Vuibert (ed.). Paris 108 p.
- Dzubaj A., Backor M., Tomko J., Peli E., Tuba Z. 2008. Tolerance of the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. to metal stress. *Ecotox. Environ. Safety*. 70: 319-326.
- Garrec J.P., Van Haluwyn C. 2002. Biosurveillance végétale de la qualité de l'air. Tec & Doc ; Lavoisier (ed.). Paris. 118 p.
- Garty J. 1987. Metal amounts in the lichen *Ramalina duriae* transplanted at biomonitoring sites around a new coal-fired power station after 1 year of operation. *Environ. Res.* 43: 104-116.
- Garty J., Karary Y., Harel J., Lurie S. 1993. Temporal and spatial fluctuation of ethylene production and concentrations of sulphur, sodium, chlorine and iron on/in the thallus cortex in the lichen *Ramalina duriae* (De Not.) Bagl. *Environ. Exp. Bot.* 33: 553-563.

- Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R. 2002a. Element concentrations in the forest moss *Hylocomium splendens*: variation associated with altitude, net primary production and soil chemistry. *Environ. Pollut.* 166: 129-135.
- Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., Medici A., Pedrini P., Benedetti S., Bovolenta A., Coppi S. 2002b. Use of moss (*Tortula muralis* Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy. *Atmosph. Environ.*, 36: 4069-4075.
- Gonzalez C.M., Casanovas S.S., Pignata M.L. 1996. Biomonitoring of air pollutants from traffic and industries employing *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot. in Cordoba, Argentina. *Environ. Pollut.* 91: 269-277.
- Guidotti M., Stella D., Owczarek M., De Marco A., De Simone C. 2003. Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. *J. Chromatogr.* (volume A) 985: 185-190.
- Lichtenthaler H.K. et Welburn A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls /a/ and /b/ of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Tran.* 11: 591-592.
- Loppi S., Giordani P., Brunialti G., Isocrono D., Piervittori R. 2002. Identifying deviation from naturality of lichen diversity for bioindication purposes. In: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P., Monitoring with lichens- Monitoring Lichens. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands pp. 281-284.
- Loppi S., Nascimbene J. 2010. Monitoring H₂S air pollution caused by the industrial exploitation of geothermal energy: The pitfall of using lichens as bioindicators. *Environ. Pollut.* 158: 2635-2639.
- Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668.
- Migaszewski Z.M., Galuszka A., Paslawski P. 2002. Polynuclear aromatic hydrocarbons, phenols, and trace metals in selected soil profiles and plant bioindicators in the Holy Cross Mountains South-Central Poland. *Environ. Internat.* 28: 303-313.
- Nimis P.L., Lazzarin G., Lazzarin A., Skert N. 2000. Biomonitoring of trace elements with lichens in Veneto (NE Italy). *Sci. Total Environ.* 255: 97-111.
- Nimis P.L., Andreussi S., Pittao E. 2001. The performance of two lichen species as bioaccumulators of trace metals. *Sci. Total Environ.* 275: 43-51.
- Palmquist K., Dahlman L., Valla Dares F., Tehler A., Sancho L.G., Mattsson J-E. 2002. CO₂ exchange and thallus nitrogen across 75 contrasting lichen associations from different climate zones. *Oecologia.* 133: 295-306.
- Poblet A., Andrade S., Scagliola M., Vodopivec C., Curtosi A., Pucci A., Marcovecchio J. 1997. The use of epilithic antarctic lichens (*Usnea aurantiacoatra* and *U. antarctica*) to determine deposition patterns of heavy metals in the Shetland Islands, Antarctica. *Sci. Total Environ.* 207: 187-194.
- Ra H.S.Y., Geiser L.H., Crang R.F.E. 2005. Effects of season and low-level air pollution on physiology and element content of lichens from the U.S. pacific North West. *Sci. Total Environ.* 343: 155-167.
- Ramade F. 1982. Élément d'écologie appliquée. Ed. MC Graw Hill 50, 92-93, 452p.
- Ramade F. 2007. Introduction à l'écotoxicologie. Fondements et applications, Tec & Doc, Lavoisier (ed.), 618 p.
- Riga-Karandinos A.N., Karandinos M.G. 1998. Assessment of air pollution from a lignite power plant in the plain of Megalopolis (Greece) using as biomonitors three species of lichens; impacts on some biochemical parameters of lichens. *Sci. Total Environ.* 215: 167-183.
- Rouidi S. 2001. Cartographie de la pollution par les hydrocarbures totaux au niveau de la plate forme industrielle de Skidda. Mémoire de Magister, Université de Constantine. 111 p.
- Rouvillois-Brigol M. 1975. Le pays de Ouargla (Sahara Algérien). Variations et organisation d'un espace rural en milieu désertique. Thèse de Doctorat, spécialité Géographie de l'Université de Paris-Sorbonne. 389 p.
- Roux C., Coste C., Bricoud O. et Masson D. 2007. Lichens et champignons lichénicoles du parc national des Cévennes (France). 4- le massif de l'Aigoual- *Bull. Soc. Linn. Provence.* 58 : 103-125.
- Sanderson E.G., Ragbi A., Kyskocil A., Farant J.P. 2004. Comparaison de particulate polycyclic aromatic hydrocarbon profiles in different regions of Canada. *Atmos. Environ.* 38: 3417-3429.
- Sanz MJ., Gries C., Nash TH. 1992. Dose-reponse relationships for SO₂ fumigation in the lichens *Evernia prunastri* (L.) Ach. and *Ramalina fraxinea* (L.) Ash. *New Phytol.* 122: 313-319.

- Scerbo R., Ristori T., Possenti L., Lampugnani L., Barale R., Barghigiani C. 2002. Lichen *Xanthoria parietina* biomonitoring of trace element contamination and air quality assessment in Pisa Province (Tuscany, Italy). *Sci. Total. Environ.* 286: 27-40.
- Semadi A. 1989. Effet de la pollution atmosphérique, pollution globale, fluorée, plombique sur la végétation dans la région de Annaba (Algérie). Thèse de Doctorat en sciences naturelles : Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). 339 p.
- Sloof J.E. 1995. Lichens as quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition using transplants. *Atmosph. Environ.* 29: 11-20.
- Soltani M. 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). 284 p.
- Stengel D.B., Macken A., Morrison L., Motley N. 2004. Zinc concentrations in marine macro algae and lichen from Western Ireland in relation to phylogenetic grouping habitat and morphology. *Marine Poll. Bull.* 48: 902-909.
- Takala K., Salminen R., Olkkonen H. 1998. Geogenic and anthropogenic zinc in epiphytic and terricolous lichens in Finland. *J. Geochem. Explor.* 63: 57-66.
- Thomas H. Nash III, Gries C. 1995. The response of lichens to atmospheric deposition with an emphasis on the Arctic. *Sci. Total Environ.* 160/161: 737-747.
- Wolterbeek B. 2002. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environ. Pollut.* 120: 11-21.
- Yu M.H., Tsunoda H. 2005. Environmental toxicology: Biological and health effects of pollutants. CRC Press. Boca Raton. Florida.
- Zhang Zh. H., Chai Z. F., Mao X. Y., Chen J.B. 2002. Biomonitoring trace element atmospheric deposition using lichens in China. *Environ. Pollut.* 120: 157-161.

2. Variabilité anatomique et métabolique des couronnes du palmier dattier

L'âge des feuilles est un paramètre important à prendre en compte pour évaluer un marqueur biologique dans une approche d'écophysiologie. En effet, ces marqueurs biologiques évoluent au cours de la croissance et de la sénescence. Il y a très peu d'informations dans la bibliographie sur l'évolution des marqueurs en fonction de l'âge, tout particulièrement chez les plantes pérennes et encore plus dans un contexte d'espèces désertiques. De plus, sur des espèces de plein champ, une variabilité beaucoup plus importante en fonction des individus est à prendre en compte. Dans ce contexte, il était donc nécessaire de faire une première exploration de l'évolution des marqueurs biologiques retenus en fonction de l'âge des palmes.

Il a été décidé de retenir 5 couronnes dans les palmiers pour cette analyse. La première couronne (couronne 1) correspond aux premières palmes sorties et sont âgées de 5 ans. La couronne 5 est donc la plus récente. C'est la couronne de l'année, âgée de 6 mois environ. Au-delà de 5 ans et suivant l'individu, les feuilles sont sénescentes et souvent déjà desséchées.

Les trois stations retenues pour cette analyse avec 9 individus par station sont Ain Moussa (AM), Haoud Berkaoui (HBK), Hassi Ben Abdallah (HBA). Pour chaque couronne, les valeurs considérées pour chaque individu représentent une moyenne obtenue sur 3 extractions.

En ce qui concerne le choix des marqueurs biologiques, nous avons retenu des marqueurs liés au stress oxydant. En effet, les travaux des auteurs montrent que les HAP génèrent un stress oxydant, confirmé par les approches récentes de génomique (Weisman *et al.*, 2010 ; Immel *et al.*, 2012 ; Dumas, 2013). Nous avons choisi des marqueurs assez généraux tels que l'activité antioxydante totale, les peroxydases, GPX (=POD) et glutathion peroxydase, ou les SOD ainsi qu'une enzyme impliquée dans le cycle de détoxification du glutathion/ascorbate comme la GR (Figure 10, chapitre 1). Nous nous sommes également intéressés aux GST impliquées dans l'élimination des HAP. Les pigments généralement impactés par le stress oxydant ont aussi été utilisés comme marqueurs.

Par ailleurs, puisqu'on s'intéressait à la réponse foliaire du palmier dattier, on s'est d'abord attaché à connaître la structure de la feuille de palmier du point de vue anatomique.

2.1. Anatomie des feuilles du palmier dattier

Sur le plan botanique, les palmes correspondent aux feuilles des palmiers. Elles sont d'une grande diversité de forme et de taille suivant l'espèce (Thomas, 2011). Le palmier dattier, *Phoenix dactylifera*, possède des feuilles pennées (c'est-à-dire en forme de plume ou de peigne). Le limbe est plié le long des nervures principales et constitué de folioles (Figure 34 photos A et B). Il appartient au type des « feather-palms » ou palmiers plumeux ou à feuilles pennées (Thomas, 2011). Les palmes sont de couleur verte. D'un vert-jaune en début de croissance, elles tendent ensuite vers un gris bleuté.

Sur le plan anatomique, les coupes transversales du limbe montrent globalement une certaine symétrie avec les faisceaux conducteurs répartis régulièrement dans la coupe dans un parenchyme coloré en rose. Des faisceaux colorés en vert sont répartis sous les deux épidermes. La double coloration carmin-vert d'iode permet de colorer la cellulose en rouge et la lignine en vert. Les parties lignifiées sont à l'extérieur et au niveau des faisceaux conducteurs, par contre la partie cellulosique occupe le centre des coupes (Figure 34 C et D).

Les deux faces du limbe, inférieure (abaxiale) et supérieure (adaxiale) possèdent une cuticule qui couvre toute la surface même au niveau des stomates (Figure 34 E, F et G). Sous la cuticule, une seule couche bien distincte de cellules non colorées de sections carrées, plus au moins allongées correspond à l'épiderme. Juste sous cet épiderme, l'hypoderme est formé de 1 à 2 couches de cellules colorées en vert. Ces cellules ont un diamètre plus grand que celles de l'épiderme. Cette assise de cellules est interrompue au niveau de chaque stomate (Figure 34 E). Les stomates sont constitués des deux cellules de garde qui contrôlent les échanges gazeux et de la chambre sous stomatique ainsi que de deux cellules annexes latérales, (Figure 34 H). En dessous de l'hypoderme, les cellules cellulosiques colorées en rouge de forme allongées forment le mésophylle. C'est un parenchyme chlorophyllien (chlorenchyme).

Au niveau de ce chlorenchyme, deux types de faisceaux sont répartis dans le limbe. Il s'agit d'une part de petits faisceaux composés d'un amas de cellules lignifiées colorées exclusivement en vert, ce sont des faisceaux fibreux (photos C, D, G et K). D'autre part, des faisceaux plus grands colorés en vert et en rouge correspondent aux faisceaux mixtes ou faisceaux fibro-vasculaires de la nervation parallèle des monocotylédones. Ils assurent la circulation de la sève au niveau des palmes (Figure 34 C et D). Ces faisceaux sont constitués par du phloème coloré en rouge orienté vers la face inférieure du limbe qui conduit la sève

élaborée et de xylème coloré en vert. Celui-ci est constitué de petites cellules vers la face inférieure du limbe (protoxylème) et de grosses cellules vers la face supérieure (métaxylème). Ce sont des cellules complètement lignifiées, mortes et qui ont pour seul rôle la conduite de la sève brute. Un sclérenchyme, coloré en vert entoure ces faisceaux fibro-vasculaires (photos J et K) ainsi qu'un type de cellules régulières légèrement allongées. Ces dernières sont de type parenchymateux (Figure 34 L).

Au niveau du pli de la foliole se trouve une nervure centrale bien distincte, avec un type de cellules caractéristiques sur la face interne du limbe : les cellules bulliformes (cellules localisées au fond de creux) (Figure 34 M et N). Ces cellules ont la capacité d'augmenter de volume en se gorgeant d'eau ou de diminuer de volume en perdant de l'eau permettant ainsi l'ouverture ou la fermeture du limbe le long du pli. Elles sont donc responsables des mouvements foliaires et jouent un rôle pour diminuer sa surface d'évaporation en se repliant dès que l'air est sec (Thomas, 2011).

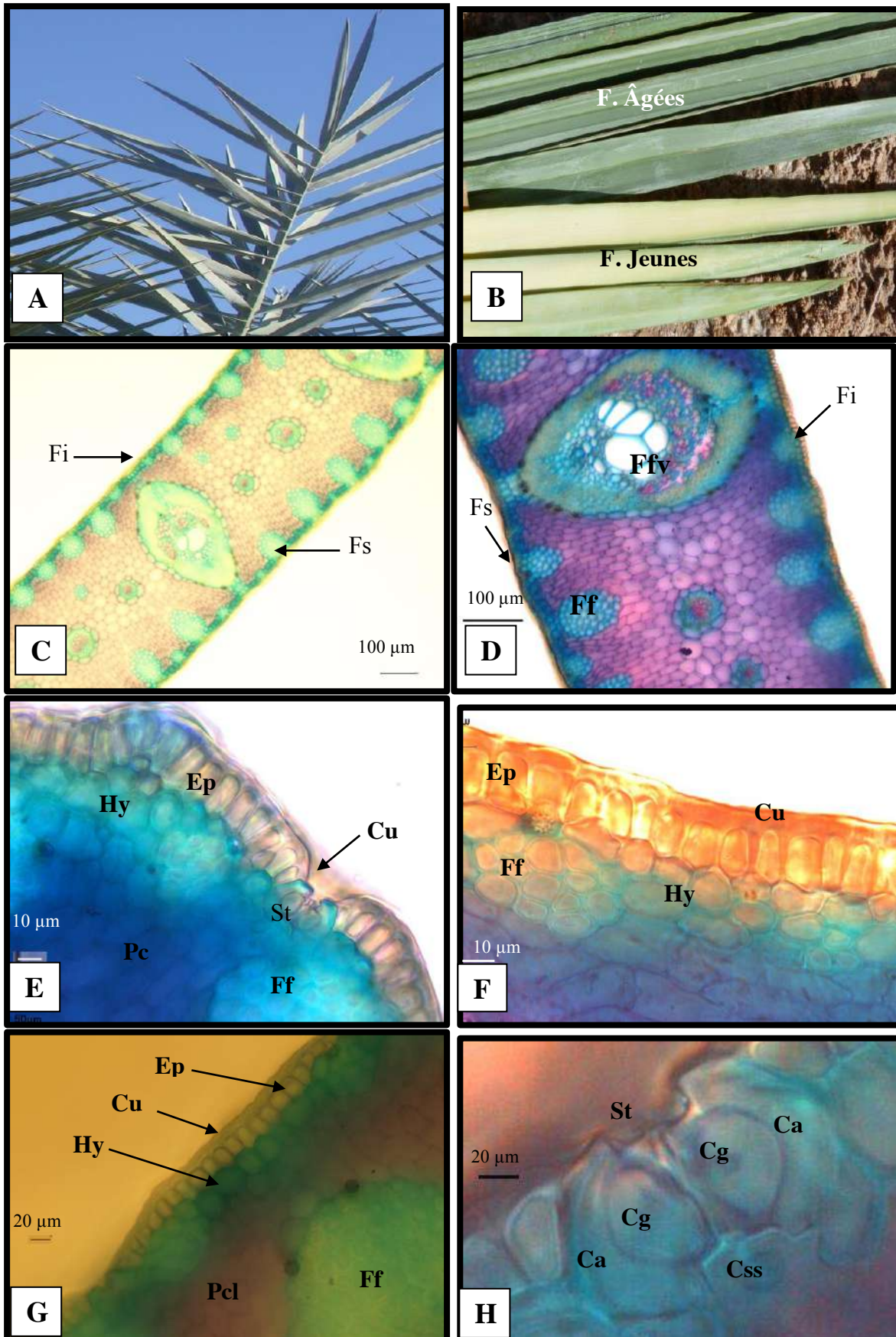


Figure 34-1^{ère} partie : Morphologie et anatomie des folioles en coupe transversale. **A:** partie supérieure d'une palme, **B:** folioles de l'année et âgées (plus d'une année), **C:** coupe dans une feuille de l'année, **D:** coupe dans une feuille âgée, **E, F et G :** agrandissement au niveau de l'épiderme, **H:** un stomate.

Fi: Face inférieure, **Fs:** Face supérieure, **Ff:** Faisceau fibreux, **Cu:** Cuticule, **Ep:** Épiderme, **Pcs:** Parenchyme sclérotique, **Ffv:** Faisceau fibro-vasculaire, **Pcl:** Parenchyme chlorophyllien (palissadique), **Cb:** Cellules bulliformes, **Hy:** Hypoderme, **St:** Stomate, **Pc:** Parenchyme, **Cg:** Cellule de garde, **Ca:** Cellule annexe latérale, **Css:** Chambre sous stomatique, **Xyl:** Xylème, **Phl:** Phloème.

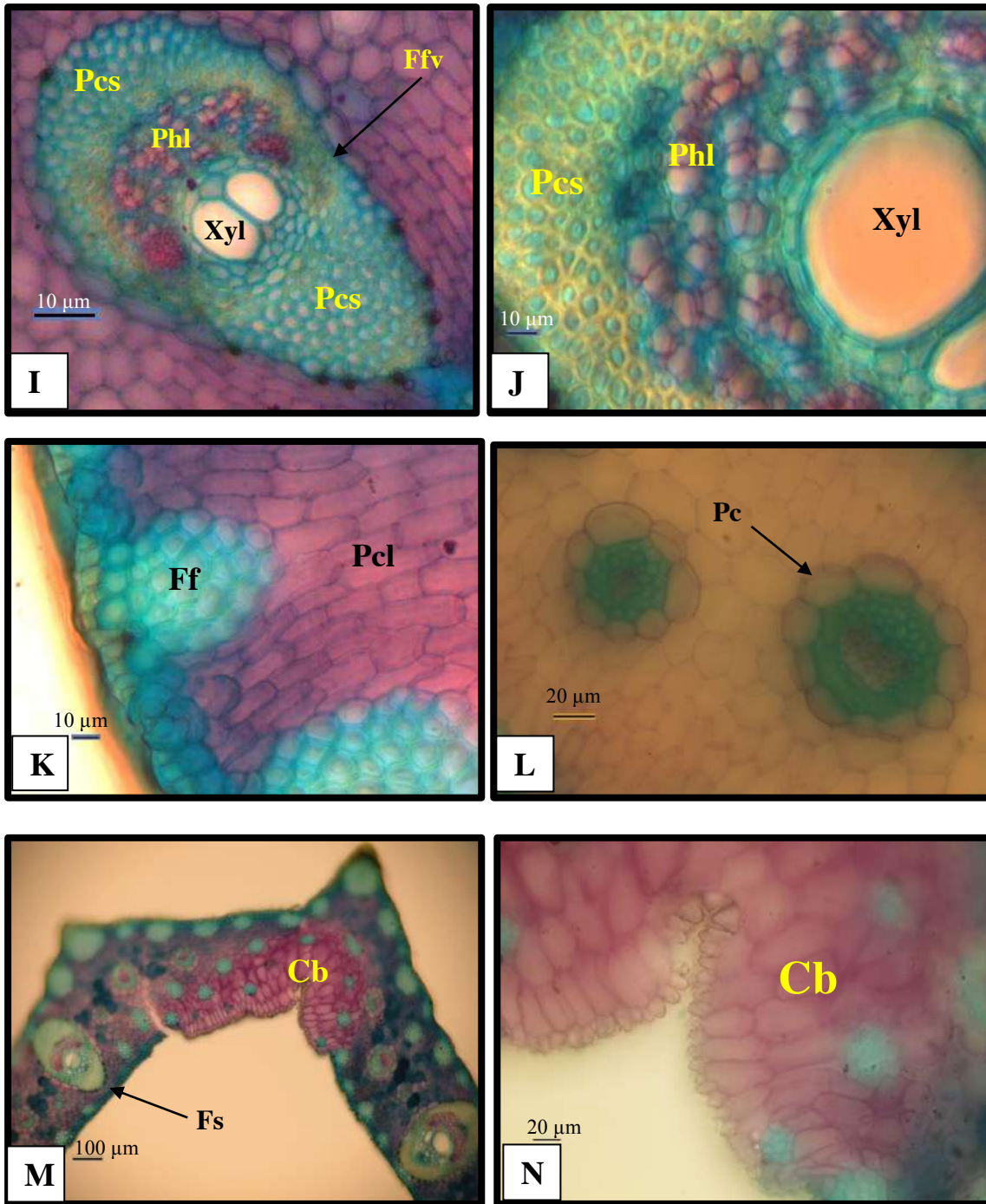


Figure 34-2^{ème} partie : Morphologie et anatomie des folioles en coupe transversale. **I , J et L:** faisceau fibro-vasculaire(1), **K :** sclérenchyme **L:** les faisceaux conducteurs, **M et N:** cellules bulliformes.

Fi: Face inférieure, *Fs:* Face supérieure, *Ff:* Faisceau fibreux, *Cu:* Cuticule, *Ep:* Épiderme, *Pcs:* Parenchyme sclérotique, *Ffv:* Faisceau fibro-vasculaire, *Pcl:* Parenchyme chlorophyllien (palissadique), *Cb:* Cellules bulliformes, *Hy:* Hypoderme, *St :* Stomate, *Pc :* Parenchyme, *Cg:* Cellule de garde, *Ca:* Cellule annexe latérale, *Css:* Chambre sous stomatique, *Xyl :* Xylème, *Phl :* Phloème.

La feuille de palmier est donc caractéristique d'une espèce végétale qui a dû s'adapter à de fortes contraintes. Ainsi, la cuticule recouvre les deux faces et donne la couleur bleutée aux feuilles. Elle agit comme une couche de protection qui permet à la palme de se protéger contre les aléas climatiques, les fortes températures et rayonnements intenses notamment tout en protégeant les échanges gazeux ainsi que contre la violence des vents et les frottements. La couche de l'épiderme et de l'hypoderme à parois épaissies, les faisceaux de sclérenchyme sont aussi des tissus qui participent à la protection face aux contraintes.

Par ailleurs, la présence de cellules bulliformes permettant des mouvements des folioles protègent aussi le limbe d'une trop forte évapotranspiration. En se repliant, la feuille réduit sa surface exposée au soleil. Ces cellules sont largement présentes chez les Poaceae comme le riz ou des bambous (Gu *et al.*, 2013 ; Monti *et al.*, 2009).

2.2. Variabilité des marqueurs métaboliques en fonction de l'âge des couronnes

2.2.1. Évolution de la teneur en pigments en fonction de l'âge des palmes

L'âge physiologique des feuilles influence les teneurs en pigments, caroténoïdes et chlorophylles ce qui se traduit souvent par des changements de coloration. Ils sont directement liés au métabolisme de base des plantes et sont donc souvent étudiés.

L'analyse de la teneur globale en chlorophylles ($a+b$) en fonction de l'âge des feuilles présente le même aspect pour les 3 stations. Les teneurs sont ainsi globalement les plus faibles dans la couronne la plus jeune (5), à l'exception de la station HBK, présentent des valeurs maximales pour la couronne 4, et diminuent ensuite avec l'âge de la couronne atteignant les valeurs les plus faibles pour la couronne 1 (la plus âgée) (Figure 35B). Concernant la comparaison entre stations (Figure 35A), les teneurs en chlorophylles des palmes des stations AM et HBA sont similaires, alors que la station HBK présente toujours des niveaux significativement plus faibles aux autres deux stations sauf pour la couronne 5.

Le rapport entre les chlorophylles a et b (Chl a/b) est globalement compris entre 3 et 4,5 (Figure 35C, D). Il est similaire pour toutes les couronnes 1 à 4 de AM et HBA. Pour HBK les rapports augmentent significativement de la couronne 1 à la couronne 5. La station HBK se différencie de nouveau avec des rapports inversement proportionnels à l'âge des couronnes de 2,75 pour la couronne 1 à 4,16 pour la couronne 5.

Les histogrammes des teneurs en caroténoïdes présentent la même allure que ceux des chlorophylles totales ($a+b$) que ce soit au niveau de la comparaison des couronnes au sein de chaque station ou au niveau de la comparaison des stations pour chaque couronne (Figure 35E, F). Les teneurs varient de 5,7 à 20 $\mu\text{g}/\text{mg}$ MS. Elles sont toujours plus faibles pour HBK sauf au niveau de la couronne 5.

Le rapport chlorophylles $a+b$ /caroténoïdes (Figure 35G, H) est compris entre 2 et 5 pour les valeurs les plus élevées. Il est identique pour AM et HBA. La station HBK se caractérise par une augmentation significative de la couronne 1 à la couronne 5. Comme précédemment, cette station se distingue des deux autres, surtout pour les couronnes 1 à 4 avec un rapport plus faible.

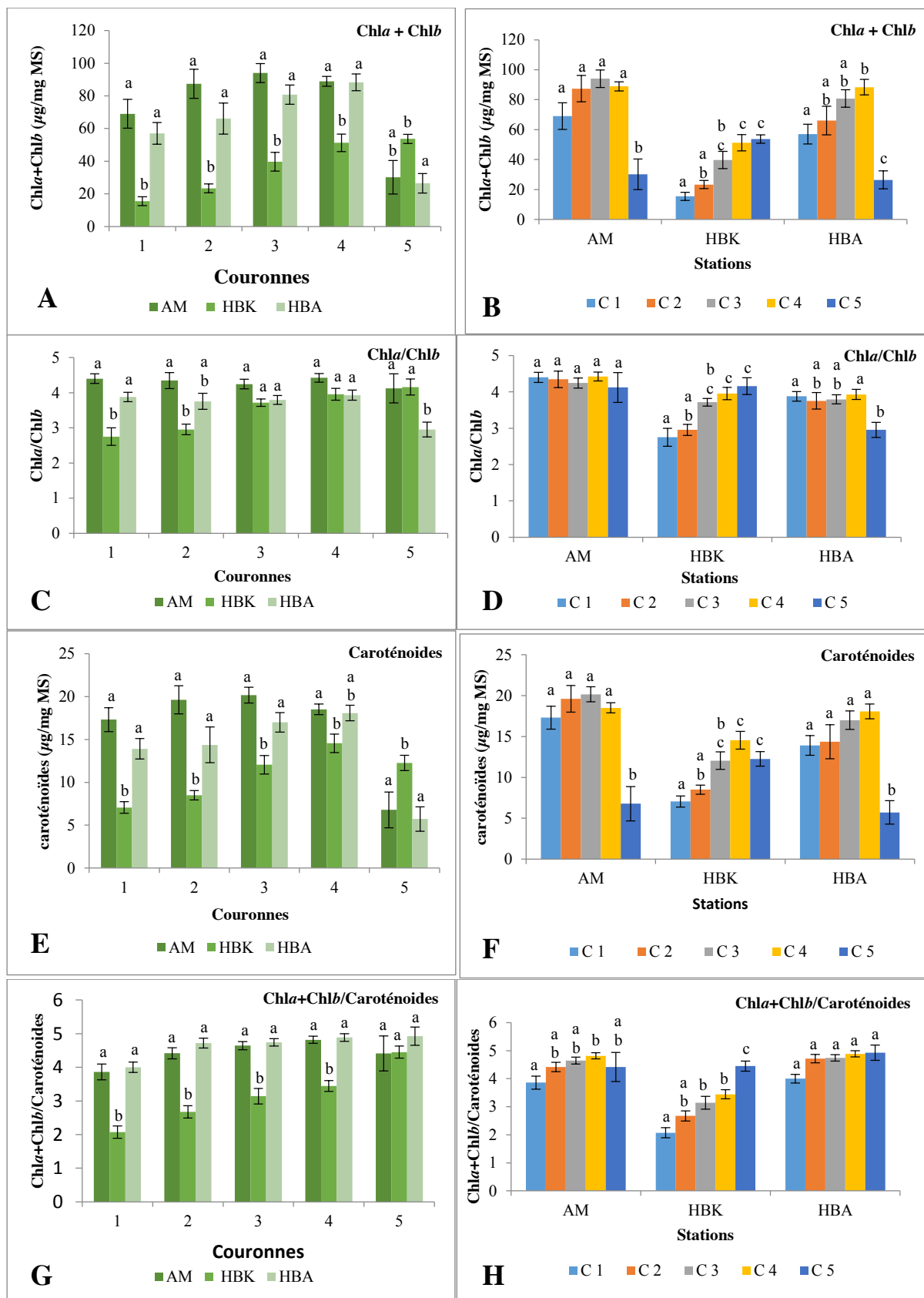


Figure 35 : Teneurs en pigments (chlorophylles *a* et *b*, et caroténoïdes) et leurs rapports dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétrique (Anova) soit non paramétrique (Kruskal-Wallis). Les tests comparent les 3 stations entre elles pour chaque

couronne (A, C, E, G)) ou comparent les 5 couronnes entre elles d'une même station (B, D, F, H).

2.2.2. Evolution des activités antioxydantes en fonction de l'âge des palmes

Le potentiel antioxydant dans les palmes a été évalué d'une part par la mesure de la capacité antioxydante totale (TEAC) et d'autre part par la mesure de l'activité enzymatique des enzymes de détoxication des formes réactives de l'oxygène.

2.2.2.1. Capacité antioxydante totale

La capacité antioxydante varie entre 0,7 et 4 $\mu\text{mol TEAC/g MS}$. Elle est significativement plus élevée pour la couronne 1 pour laquelle les valeurs sont environ le double par rapport aux autres couronnes (Figure 36).

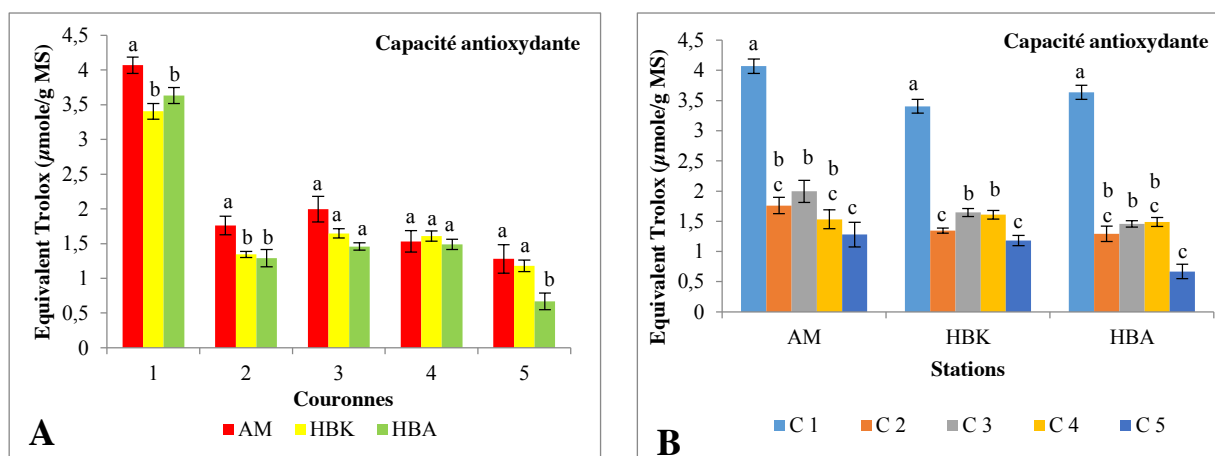


Figure 36 : Capacité antioxydante des palmes, en TEAC (Trolox-Equivalent Antioxidant Capacity). Dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétrique (Anova) soit non paramétrique (Kruskal-Wallis). Les tests comparent les 3 stations entre elles pour chaque couronne (A) ou comparent les 5 couronnes entre elles d'une même station (B).

2.2.2.2. Superoxyde dismutase (SOD)

Globalement, l'activité des SOD tend à augmenter avec l'âge de la palme d'une façon significative, la couronne 5 présentant ainsi les valeur les plus faibles, jusqu'à atteindre des valeurs pour la couronne 3 de 1437, 1216 et 1076 U/mg protéines pour les stations AM, HBK et HBA, respectivement (Figure 37). Ensuite, l'activité varie peu.

Si on compare les 3 stations, les couronnes 1, 2 et 3 de AM possèdent des valeurs de SOD supérieures à HBK puis HBA vient en dernier d'une manière significative (Figure 37A). Les valeurs sont similaires entre stations pour les couronnes 4 et 5.

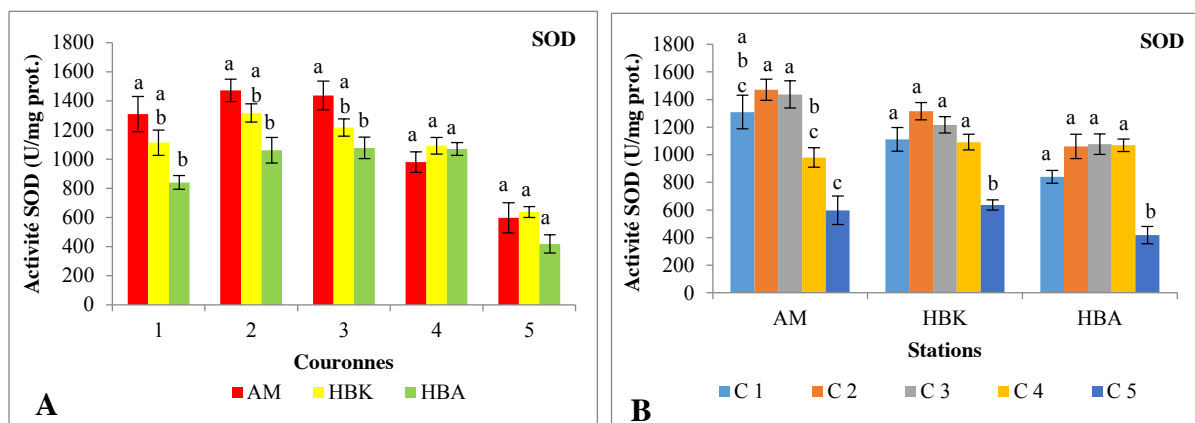


Figure 37 : L'activité Superoxyde dismutase (SOD) dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétrique (Anova) soit non paramétrique (Kruskal-Wallis). Les tests comparent les 3 stations entre elles pour chaque couronne (A) ou comparent les 5 couronnes entre elles d'une même station (B).

2.2.2.3. Gaïacol peroxydase (GPX)

En ce qui concerne la comparaison des 3 stations pour chaque couronne, HBA et AM ont encore les plus fortes activités pour les couronnes 2, 3, 4 et 5 et HBK les plus faibles (Figure 38). Pour la couronne 4, l'activité est surtout plus importante pour AM. La couronne 1 a la même activité pour les 3 stations.

L'activité GPX varie d'une station à une autre. Cette activité est maximale au niveau de la couronne la plus jeune (couronne 5) pour HBK et HBA, respectivement de 0,0029 et 0,0084 nkatal/mg protéines. La station AM par contre présente une diminution de cette activité en fonction de l'âge des feuilles pour les couronnes 1 à 3 ; le maximum d'activité est enregistré au niveau de la couronne 4 avec 0.0089 nkatal/mg protéines.

D'une façon générale la station AM présente l'activité GPX la plus grande avec des activités comprises entre 0,0024 et 0,0089 nkatal/mg de protéines, suivie par la station de HBA entre 0,0020 et 0,0084 nkatal/mg de protéines et finalement la station HBK qui a l'activité la plus faible qui est comprise entre 0,0015 et 0,0029 nkatal/mg de protéines.

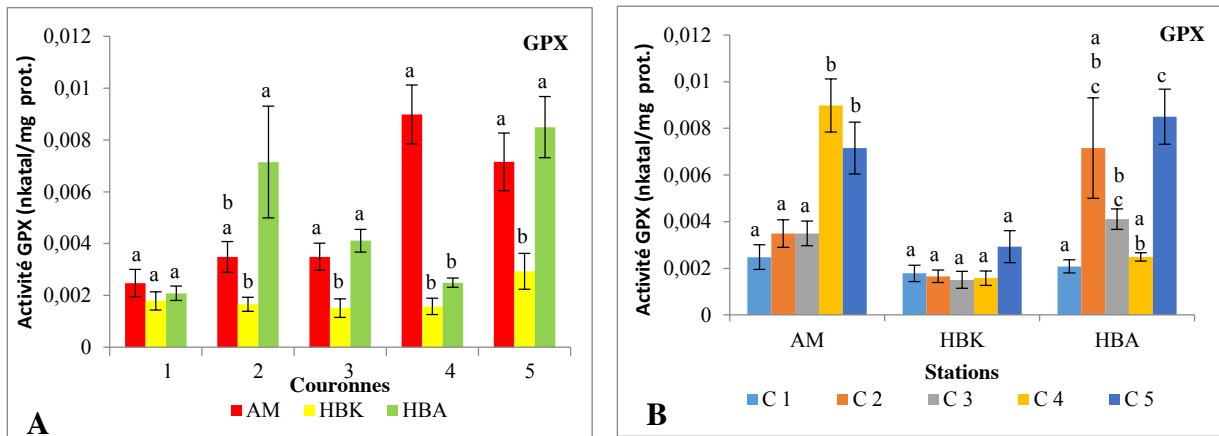


Figure 38: Activité de la Guaiacol peroxydase (GPX) dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétrique (Anova) soit non paramétrique (Kruskal-Wallis). Les tests comparent les 3 stations entre elles pour chaque couronne (A) ou comparent les 5 couronnes entre elles d'une même station (B).

2.2.2.4. Glutathion réductase (GR)

En ce qui concerne la comparaison des 3 stations pour chaque couronne, les couronnes 1, 3 et 4 présentent la même apparence avec une activité importante au niveau de AM suivie par HBA, sauf pour la couronne 2 où les 2 stations sont équivalentes (Figure 39). HBK présente les activités les plus faibles sauf pour la couronne 5.

La GR a une activité assez différente entre les 3 stations d'échantillonnage. Elle diminue significativement avec l'âge des palmes pour AM entre les couronnes 1 et 4. Par contre, elle reste constante pour HBK et HBA. La couronne 5 a donné une activité plus faible que la couronne 4 pour AM, plus forte pour HBK et identique pour HBA.

Globalement, les stations de AM et HBA ont les activités GR les plus grandes avec des valeurs variant de 0,00074 à 0,0025 nkatal/mg pour AM et entre 0,00044 et 0,0013 nkatal/mg de protéines pour HBA. HBK a de plus faibles activités entre 0,00019 et 0,0021 nkatal/mg de protéines.

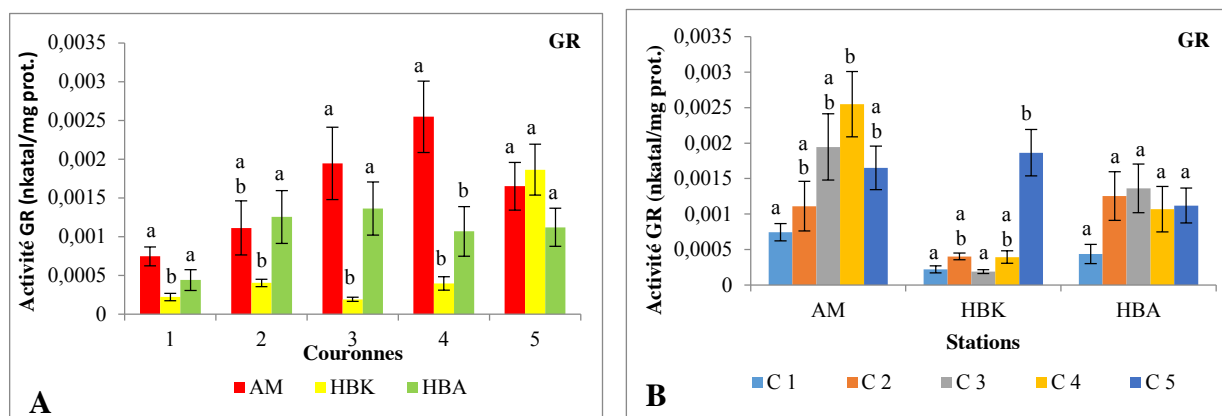


Figure 39: Activité de la Glutathion Réductase (GR) dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétrique (Anova) soit non paramétrique (Kruskal-Wallis). Les tests comparent les 3 stations entre elles pour chaque couronne (A) ou comparent les 5 couronnes entre elles d'une même station (B).

2.2.2.5. Glutathion peroxydase (GSH-PX)

Les couronnes 1, 2 et 3 présentent la même allure pour les 3 stations. Celles de AM ont les activités les plus grandes, suivie par HBA. Les 3 couronnes de HBK ont l'activité la plus faible (Figure 40). Au niveau de la couronne 4, l'activité GSH-PX de HBA dépasse celle de AM et HBK reste toujours la plus faible. Par contre, cette activité à HBK dépasse AM et HBA au niveau de la couronne 5.

Globalement, l'activité GSH-PX diminue significativement avec l'âge des palmes à partir de la couronne 3 à la couronne 1 pour les 3 stations. La GSH-PX donne un profil différent pour chaque station pour les couronnes 4 et 5 avec une activité plutôt élevée.

En général, la station AM a l'activité GSH-PX la plus élevée. Elle est comprise entre 0,0017 et 0,0063 nkatal/mg de protéines. La station HBA correspond à des activités comprise entre 0,00085 et 0,0052 nkatal/mg de protéines. Les activités pour les extraits de HBK sont de nouveau les plus faibles entre 0,00040 et 0,0059 nkatal/mg de protéines.

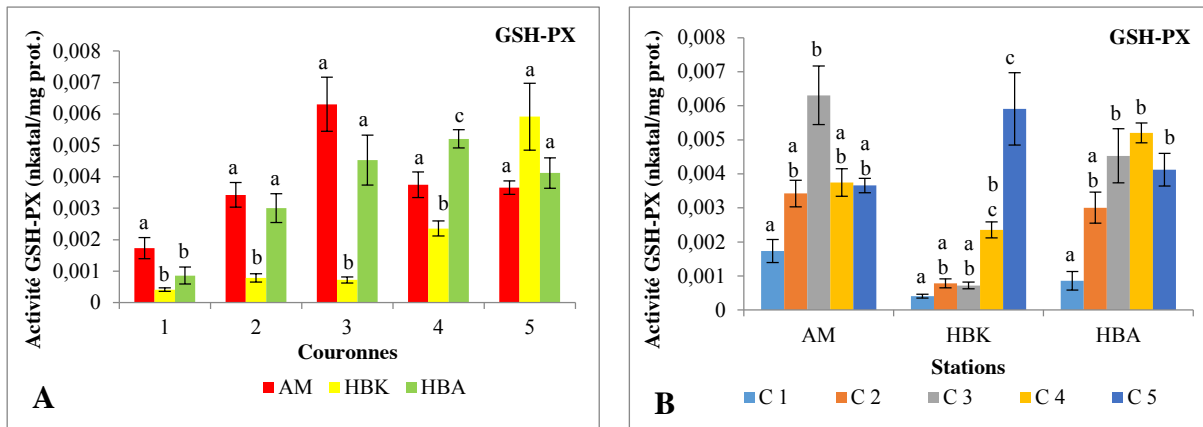


Figure 40 : Activité de Glutathion peroxydase dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétrique (Anova) soit non paramétrique (Kruskal-Wallis). Les tests comparent les 3 stations entre elles pour chaque couronne (A) ou comparent les 5 couronnes entre elles d'une même station (B).

2.2.3. Glutathion-S-transférase (GST)

L'activité de la glutathion S-transférases présente des profils d'histogrammes remarquablement comparables pour les 3 stations d'échantillonnage (Figure 41). Elle présente de très faibles variations entre stations et varie à AM entre 0,0055 et 0,015 nkatal/mg de protéines, à HBA entre 0,0051 et 0,014 nkatal/mg de protéines et à HBK entre 0,0054 et 0,013 nkatal/mg de protéines.

Elle augmente significativement des palmes les plus jeunes (couronne 5) à celles de 3 ans pour les trois stations. Ensuite, elle diminue pour les couronnes les plus âgées (2 et 1).

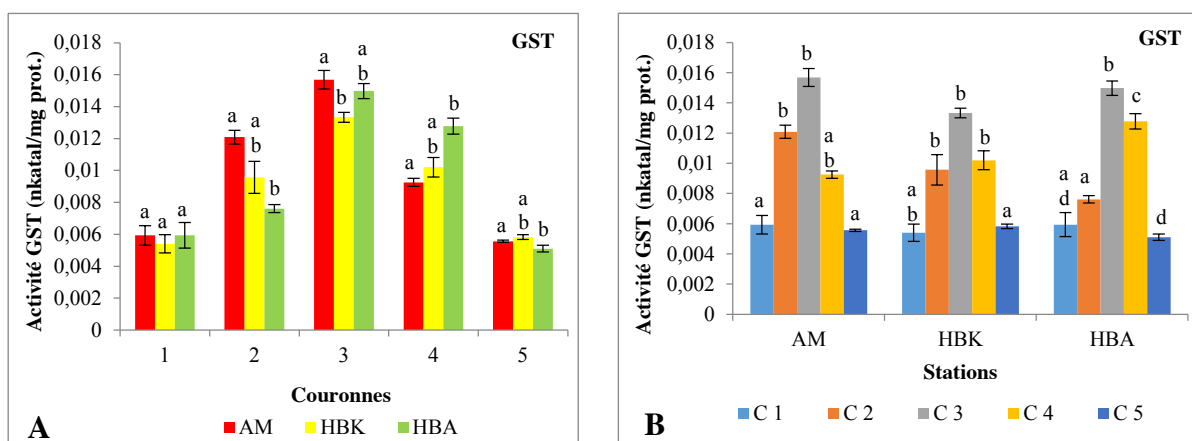


Figure 41 : Activité Glutathion S-transférases (GST) dans les 5 couronnes (C1 à C5) des palmes des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétrique (Anova) soit non paramétrique (Kruskal-Wallis). Les tests comparent les 3 stations entre elles pour chaque couronne (A) ou comparent les 5 couronnes entre elles d'une même station (B).

2.2.4. Bilan de l'analyse des marqueurs biologiques

L'analyse détaillée des teneurs en pigments, des marqueurs de l'activité antioxydante ou de détoxification des hydrocarbures en fonction de l'âge des palmes permet de dégager plusieurs éléments.

Tout d'abord l'analyse des teneurs en pigments montre deux points essentiels : les palmes de moins d'un an (couronne 5) ont des teneurs beaucoup plus faibles ce qui se traduit dans la couleur des palmes. Au niveau des stations, HBK a des teneurs en chlorophylle ou caroténoïdes nettement plus faibles que les deux autres. Les rapports sont également affectés.

En ce qui concerne, les valeurs des marqueurs de l'activité antioxydante, elles augmentent de la couronne la plus jeune (couronne 5) à la couronne de l'année précédente (couronne 4). Elles restent souvent stables entre les couronnes 3 et 4 et diminuent entre les couronnes 2 et 1. Il existe quelques exceptions pour la couronne 5 de HBA et HBK pour les GPX, GR et GSH-PX, pour la couronne 3 de AM de la GSH-PX, et pour la couronne 1 de la GPX de HBA et HBK.

Les valeurs des activités des enzymes antioxydantes sont généralement plus élevées dans la station AM sauf pour les couronnes 2 et 5 de la GPX. Elles sont les plus faibles pour HBK sauf pour la couronne 5 de la GR et GSH-PX.

Enfin, deux profils d'histogrammes sont comparables. Ils concernent les deux enzymes à glutathion : la GR et la GSH-PX et ce pour les 3 stations. Le coefficient de corrélation des activités moyennes de ces deux enzymes, calculé entre les activités des deux enzymes avec les valeurs de chaque couronne des 3 stations est de 0,708. Une certaine similitude de comportement semble donc se dégager. De la même manière, les GST et les SOD donnent des profils assez proches quoique moins nettement que les deux précédentes. Le coefficient de corrélation obtenu est de 0,63.

Pour compléter cette approche analytique séparée pour chaque marqueur, une analyse plus globale a ensuite été effectuée grâce à une analyse en composantes principales.

2.2.5. Analyse globale de l'ensemble des paramètres

L'ensemble des données a donc été analysé afin de visualiser les corrélations existant entre les échantillons. L'analyse a été réalisée avec les données de l'ensemble des couronnes dans un premier temps puis pour chaque couronne indépendamment. Seules les plans définis par les axes 1 et 2 présentant le maximum de contribution sont présentées.

Les 9 variables prises en compte dans les analyses sont : les teneurs en chlorophylle *a*, chlorophylle *b*, caroténoïdes, les activités enzymatiques SOD, GPX, GR, GSH-PX, GST et la capacité antioxydante (TEAC). Les valeurs de ces variables ont été introduites pour chacun des 27 échantillons (9 par station) des 5 couronnes, un échantillon représentant la moyenne obtenue sur un triplicata (3 extraits de la même couronne du même palmier).

L'analyse globale prenant en compte les 5 couronnes montre que les couronnes 1 et 5 se différencient assez nettement sur les axes 1 et 2 (Figure 42). La plupart des mesures de la couronne 5 (en rouge) sont en effet assez proches sur le plan défini ainsi que celles de la couronne 1 (en noir) dans une moindre mesure. Les mesures des couronnes 2 à 4 sont relativement intriquées. Les deux premiers axes F1 et F2 expliquent 65,82 % de la variance.

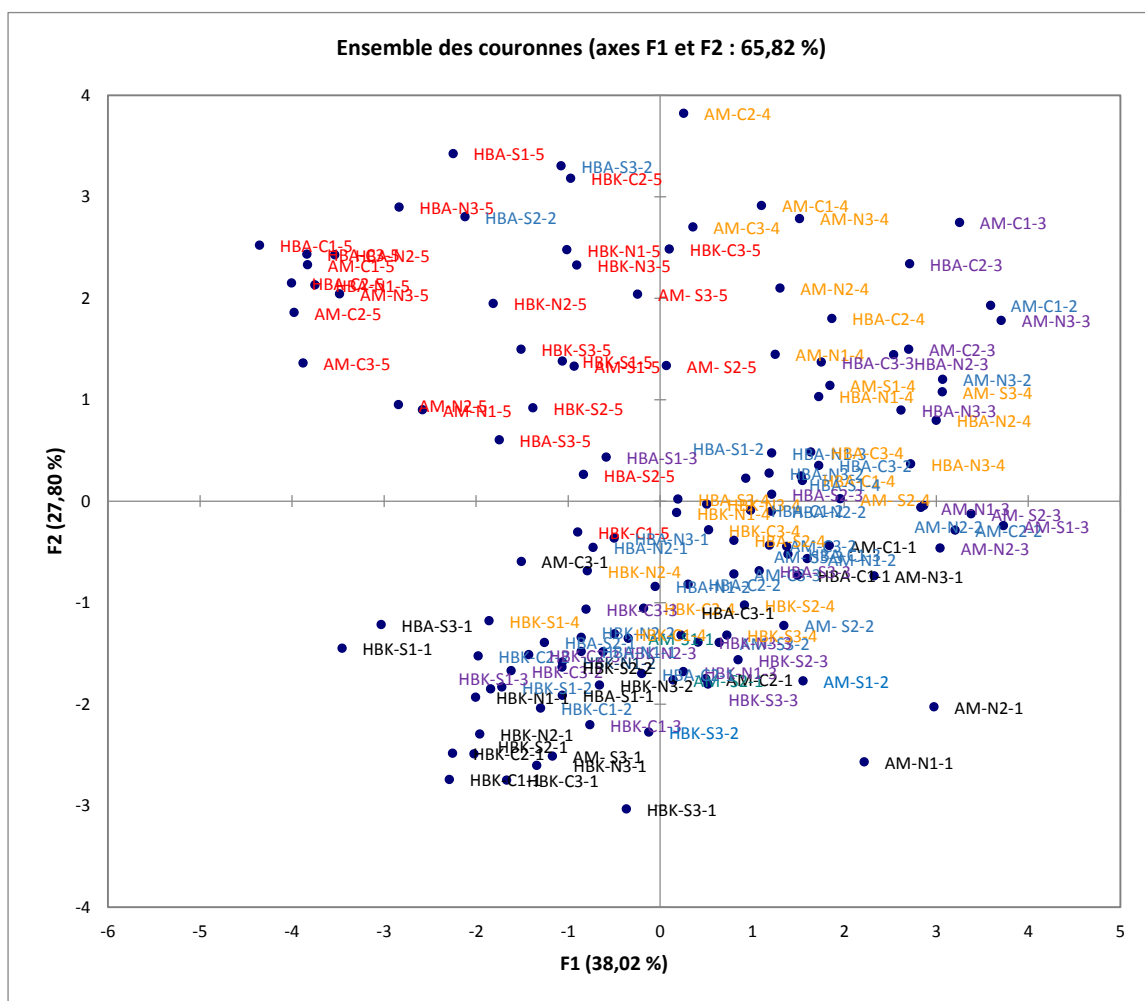


Figure 42 : ACP réalisées à partir des 9 variables quantifiées pour les 5 couronnes des 27 échantillons analysés. Seuls les axes 1 et 2 sont représentés. Le pourcentage d'information donné par chaque axe est indiqué entre parenthèse.

HBA : Hassi Ben Abdallah, AM : Ain Moussa, HBK : Haoud Berkaoui, S : palmier au sud de la station, N : au nord, E : à l'est, O : à l'ouest, C : au centre.

Les couleurs correspondent aux couronnes 1 (noir), 2 (bleu), 3 (violet), 4 (orange), 5 (rouge). Les 3 palmiers sont numérotés de 1 à 3 pour chaque orientation. Ainsi l'échantillon HBK-S3-1 correspond à un palmier au sud de la station (le n°3) et il s'agit de la couronne 1.

Ensuite, une analyse par couronne permet d'éliminer le poids des couronnes pour faire ressortir les regroupements par station (Figure 43). La contribution des axes 1 et 2 est au minimum de 61,52 % (couronne 4) et au maximum de 78,65 % (couronne 3). Pour les couronnes 1 à 4, les échantillons de la station HBK sont les plus éloignées dans la partie négative de l'axe 1 (en noir). Cette station semble plus différenciée des deux autres. Pour la couronne 5 (palmes les plus jeunes de 6 mois environ), les échantillons sont moins nettement séparés. Les proximités sont plus fortes.

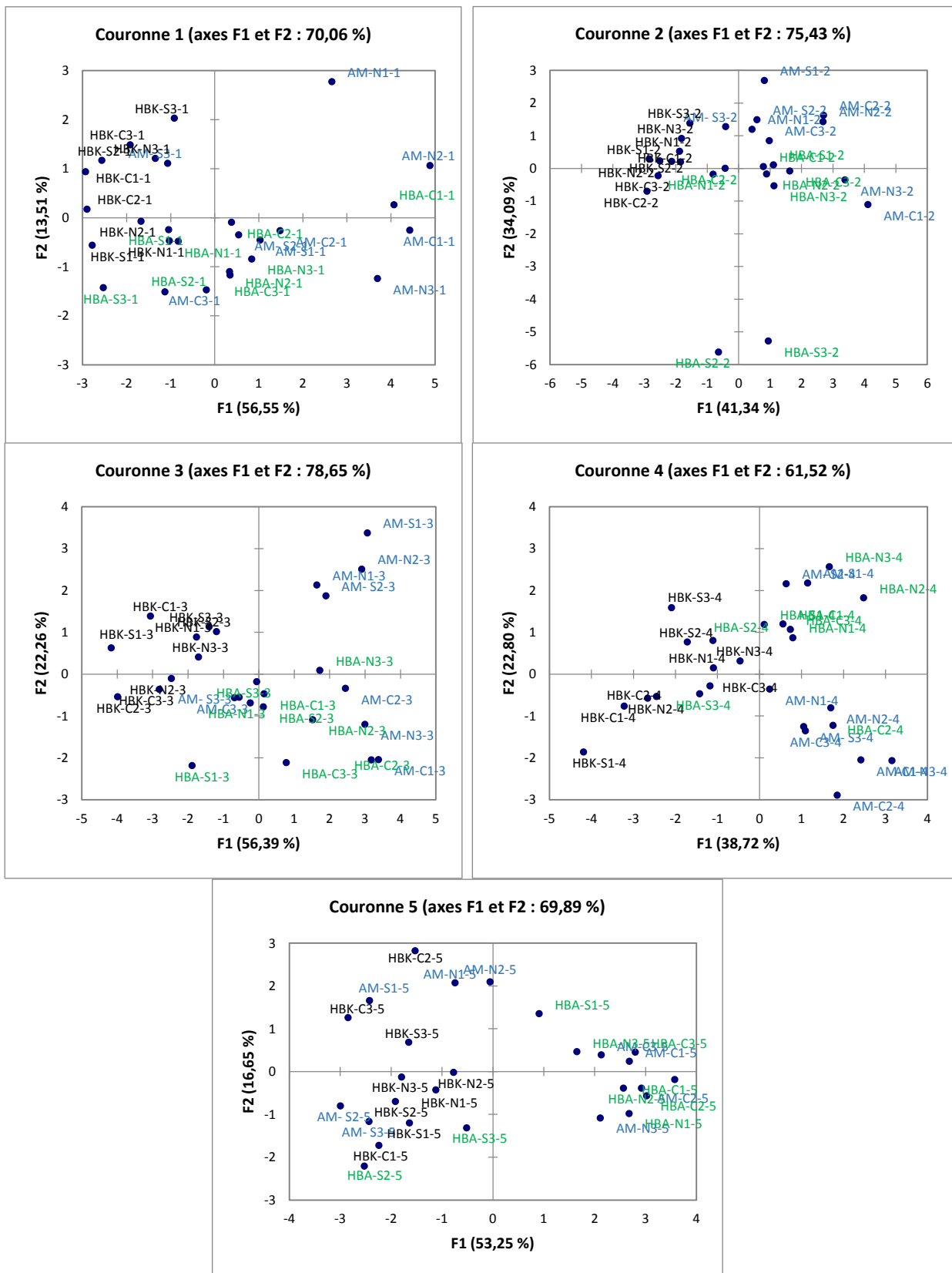


Figure 43 : ACP réalisées à partir des 9 variables quantifiées pour chacune des 5 couronnes des 27 échantillons analysés. Seuls les axes 1 et 2 sont représentés. Le pourcentage d'information donné par chaque axe est indiqué entre parenthèse.

HBA : Hassi Ben Abdallah, AM : Ain Moussa, HBK : Haoud Berkaoui, S : palmier au sud de la station, N : au nord, E : à l'est, O : à l'ouest, C : au centre.

Les couleurs correspondent aux stations HBK (noir), AM (bleu), HBA (vert). Les 3 palmiers sont numérotés de 1 à 3 pour chaque orientation. Ainsi l'échantillon HBK-S3-1 correspond à un palmier au sud de la station (le n°3) et il s'agit de la couronne 1.

Les variables qui contribuent le plus dans ces analyses sont pour l'axe 1 pour les 5 couronnes, chlorophylle *a* (16,5 % minimum), chlorophylle *b* (14,7%) et caroténoïdes (16,5 %), (Tableau 10). Comme cet axe est fortement différenciant pour les échantillons, ce sont des variables importantes pour leur séparation. Sur l'axe 2, l'activité SOD contribue fortement pour les couronnes 1 à 4 (25,7 % minimum). Suivant l'axe, les autres marqueurs contribuent de manière variable. La couronne 5 se différencie donc des 4 autres par les variables contribuant fortement à l'axe 2 ce qui pourrait expliquer des regroupements moins nets des individus dans chaque station.

Tableau 10 : Contribution les plus fortes des variables sur les axes 1 et 2, des ACP réalisées pour chaque couronne. Les chiffres entre parenthèses correspondent aux pourcentages de contribution de la variable sur l'axe. Seules sont indiquées les variables dont la contribution est supérieure à 14,5 %.

Couronne	1	2	3	4	5
Axe 1	chl <i>a</i> (17,3) caroténoïdes (16,9) chl <i>b</i> (15)	chl <i>b</i> (23,5), caroténoïdes (22,9) chl <i>a</i> (22,5) GSH-PX (15,3)	chl <i>a</i> (18,1) caroténoïdes (17,3) chl <i>b</i> (15,6)	chl <i>a</i> (24,6) chl <i>b</i> (21,5) caroténoïdes (19,6)	GPX (17,1) chl <i>a</i> (16,5) caroténoïdes (16,5) chl <i>b</i> (14,7)
Axe 2	SOD (48,6) GST (30,5)	SOD (25,7) GPX (22,9) TEAC(18,2) GR (15,1)	SOD (37,4) TEAC (35,9)	SOD (33,4) TEAC (16,1) GPX(14,7)	GR (44,5) GSH-PX (24,8)

2. 3. Discussion

Ce premier point sur le palmier dattier avait comme objectif d'évaluer la variabilité anatomique et celle de marqueurs métaboliques en fonction de l'âge des couronnes. Ceci permet de mieux connaître le modèle végétal utilisé et surtout de choisir de manière judicieuse la couronne de palmes la plus intéressante pour la recherche d'un lien entre les marqueurs choisis et la teneur en HAP.

L'âge des couronnes n'a pas d'effet remarquable sur les différentes structures anatomiques et les différents tissus des feuilles du palmier. Toutefois, la description des

structures anatomiques du palmier dattier n'avaient pas été publiées et elle apporte des éléments de compréhension de la résistance de cette espèce à des conditions de développement drastiques. La présence notamment de tissus sclérifiés est considérée comme un trait récurrent chez les plantes de la région méditerranéenne. Cette adaptation protégerait la plante notamment dans les conditions d'un stress double (Gratani et Ghia, 2002). Un seul travail sur le palmier avait pu être identifié sur l'aspect anatomie (Thomas, 2011) et il concerne presque exclusivement les stipes.

Les résultats concernant les variations de marqueurs des voies métaboliques au cours du développement du palmier dattier sont également originaux car il n'existe que très peu de travaux concernant la physiologie de cette espèce.

Les antioxydants ainsi que les enzymes du système antioxydant permettent aux plantes de lutter contre un déséquilibre entre la balance des pro-oxydants et les systèmes de défense (antioxydants). Outre les voies métaboliques de base générant des formes réactives de l'oxygène (**ROS** « Reactive Oxygen Species » ou **ERO** « Espèces Réactives de l'Oxygène »), les stress génèrent un stress oxydant. De nombreux travaux ont démontré que les plantes possèdent des systèmes de défense antioxydants efficaces pour l'élimination des ROS comme l'oxygène singulet (1O_2), les radicaux superoxydes ($O^{\bullet-2}$), les radicaux hydroxyles ($\bullet OH$), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux peroxyde ($ROO\bullet$) tout en conservant leur équilibre cellulaire face à un stress biotique ou abiotique.

Les défenses des cellules végétales impliquées contre les effets néfastes du stress oxydant impliquent à la fois des éléments enzymatique et non enzymatiques. Les éléments enzymatiques peuvent directement piéger les ERO (Espèces Réactives de l'Oxygène) ou peuvent agir en produisant un antioxydant non enzymatique tels que le carotène qui joue un rôle important dans la réponse cellulaire au stress oxydant en réduisant certains ERO (Candan et Tarhan, 2003 ; Mager et De Kruijft, 1995). Le système antioxydant implique des enzymes telles que celles que nous avons choisies dans notre étude : SOD, GPX, GR et GSH-PX, qui ont des comportements différents en fonction de l'âge des feuilles du palmier dattier.

Les principaux enzymes du système antioxydant sont présentés dans la (Figure 10) qui regroupe les différents compartiments de la cellule et la localisation de ces enzymes.

Presque tous les facteurs de stress affectent directement ou indirectement la performance de la photosynthèse de feuilles et peut modifier leurs propriétés optiques. Divers auteurs suggèrent qu'une mesure de chlorophylle peut fournir des informations sur l'état de la plante face à un stress naturel ou anthropique (Carter, 1994 ; Lichtenthaler, 1998). C'est donc

un caractère souvent suivi. En effet, la production des ERO par les photosystèmes I et II des chloroplastes est renforcée par les conditions limitant la fixation du CO₂, telles que le stress hydrique, le stress salin et les hautes ou basses températures ainsi que par la combinaison de ces conditions avec le stress lié à une lumière intense (Sharma *et al.*, 2012).

Dans les thylakoides, le photosystème II excité produit de l'oxygène singulet ¹O₂ qui sera éliminé des chloroplastes par une détoxification non-enzymatique par les caroténoïdes et la vitamine E. Le photosystème I, libère des électrons qui seront fixés par l'oxygène qui se transforme en O^{•-2} qui, à son tour, sera transformé par les SOD en H₂O₂ puis en H₂O par la GSH-PX et les APX (Shigeoka *et al.*, 2002).

Nos résultats montrent que la teneur en pigments des échantillons de palmes varie en fonction de l'âge des feuilles. Chez un arbuste méditerranéen, *Arbutus unedo*, Gratani et Ghia (2002) ont montré que la teneur en chlorophylle augmente à partir du début de la croissance de la feuille jusqu'à une valeur maximale. La chlorophylle *a* avait atteint alors 73 % du total des pigments. Pour le palmier, le rapport maximal déterminé est de 4,42, ce qui correspond à une proportion de chlorophylle *a* plus importante. Ensuite, les pigments diminuent d'une façon générale avec la sénescence ; les chlorophylles et les caroténoïdes sont faibles à la fin du cycle de la vie des feuilles dans les 3 stations d'échantillonnages. Nos données sont en accord avec les résultats de Brahmi *et al.* (2012) et Carvalho *et al.*, (2014) qui montrent que la teneur en pigments photosynthétiques est influencée par l'âge des feuilles chez l'olivier ou le *Jacobaea vulgaris* (Asteraceae) respectivement.

Les caroténoïdes ont une fonction d'antioxydants lipophiles. Ils sont capables de détoxifier divers formes de ERO. Comme antioxydant, ils captent ¹O₂ pour inhiber les dommages de l'oxydation et excitent la molécule de chlorophylle pour prévenir la formation de ¹O₂ et pour protéger l'appareil photosynthétique. Nos résultats montrent une teneur plus faible pour la couronne 1 et surtout une différence entre station. La faible teneur en pigments de la station de HBK par rapport aux 2 autres stations peut être expliquée par l'état physiologique du système photosynthétique des palmiers de cette station. Les rapports chlorophylles/caroténoïdes, révèlent de précieux renseignements sur l'état physiologique de l'appareil photosynthétique des plantes et nous permet de déterminer la capacité photosynthétique des feuilles ainsi que le fonctionnement de cet appareil (Lichtenthaler 1986 ; Babani et Lichtenthaler, 1996).

La sénescence des feuilles est un processus d'oxydation qui implique la dégradation des structures et des macromolécules cellulaires et sous-cellulaires, et la mobilisation des produits

de dégradation à d'autres parties de la plante. La susceptibilité des organismes au stress oxydant dépend de l'équilibre global entre la production d'oxydants et de la capacité antioxydante de la cellule (Del Rio *et al.*, 1998; Prochazkova *et al.*, 2001). Elle varie en fonction de l'âge des plantes (Majer et Hideg, 2012).

La méthode d'évaluation de la capacité antioxydante des échantillons de palmes dans notre étude est la TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Cette dernière est liée aux mécanismes de réaction entre les composés antioxydants du végétal et les espèces oxydées par les procédés qui sont basés sur le transfert d'électron. Le dosage par l'ABTS repose sur la capacité à réagir avec $ABTS^{\circ+}$ généré dans le système de dosage. Cette méthode est couramment utilisée pour évaluer l'activité antioxydante dans les systèmes biologiques. Nos résultats montrent que celle-ci augmente avec la sénescence des feuilles, avec une teneur très élevée au niveau des feuilles les plus âgées (couronne 1). Plus la feuille est âgée plus elle accumule des antioxydants comme les composés phénoliques et flavonoïdes abondants chez le palmier dattier. L'étude de Bilgari *et al.* (2008) a montré une forte corrélation entre l'activité antioxydante et la teneur en composés phénoliques et flavonoïdes des palmiers dattiers (Al-Mamary *et al.*, 2011). Ces composés phénoliques mettent en jeu leur effet antioxydant par divers mécanismes, y compris leur capacité à piéger les radicaux libres, des ions métalliques chélates qui servent de catalyseurs pour la production de radicaux libres ou en activant diverses enzymes anti-oxydantes et inhibent oxydases (Kulkarni *et al.*, 2004).

En ce qui concerne les activités enzymatiques, des comportements différents ont été relevés. L'activité de la SOD augmente avec l'âge des feuilles du palmier pour les 3 stations d'échantillonnage, mais diminue au niveau de la couronne la plus âgée (C1). L'activité des SOD est liée à la capacité du palmier dattier à éliminer par dismutation du superoxyde $O_2^{\cdot-}$ et le transformer en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui sera ensuite éliminé par l'action de la catalase (CAT), le gaïacol peroxydase (GPX) ou d'autres enzymes (Jaleel *et al.*, 2009). Les teneurs en chlorophylles diminuant au niveau de cette couronne, on peut penser que l'activité photosynthétique diminue également générant ainsi moins d'anion superoxyde et diminue les besoins en SOD. Les SOD constituent un important antioxydant de défense dans presque toutes les cellules exposées à l'oxygène. L'augmentation de l'activité SOD lors de la sénescence des feuilles a également été décrite chez une espèce à feuilles caduques, *Acer platanoides*. Dans le même temps, les activités ascorbate peroxydase et catalase évoluaient peu (Lepedus *et al.*, 2011).

La GPX joue un rôle dans la biosynthèse de la lignine et de la défense contre les stress biotiques par la consommation de H_2O_2 (Singh Gill et Tuteja, 2010). Cette enzyme montre une allure toute à fait différente d'une station à une autre chez le palmier. Globalement, elle a plutôt tendance à diminuer en fonction de l'âge des palmes.

Les activités GSH-PX et GR sont comparables. Au niveau de la couronne 5, leur comportement est différent pour chaque station. Ensuite, elles ont surtout tendance à diminuer avec l'âge. Ces deux enzymes interviennent dans la détoxification et l'élimination du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) des cellules. Elles ont toutes deux pour substrat le glutathion. La GSH-PX intervient directement pour éliminer le peroxyde d'hydrogène en utilisant le glutathion. La GR intervient indirectement. Elle permet de maintenir un état réduit du glutathion nécessaire pour le fonctionnement de la GSH-PX et pour la régénération de l'ascorbate dans le cycle du glutathion/ascorbate (Figure 10). Elles sont toutes deux présentes dans les mitochondries, chloroplastes et dans le cytosol.

Les glutathion S-transférases (GST) sont les enzymes impliquées dans la détoxification des cellules. Elles sont principalement dans le cytosol et impliquées dans la phase II du processus, la conjugaison. Elles permettent un couplage du xénobiotique avec des composés endogènes par formation de liaison covalente. Cette étape augmente l'hydrophilie du contaminant, simplifiant sa compartimentation. Chez le palmier dattier, l'activité des GST augmente du stade jeune jusqu'aux palmes de la couronne 3. Elles diminuent ensuite pour revenir au niveau des feuilles sénescentes à une activité similaire à celle des jeunes feuilles.

L'ensemble des critères étudiés montre bien que la couronne 5 correspond à des feuilles en sénescence. En effet, il s'agit d'un processus d'oxydation qui implique une dégradation générale des structures cellulaires et la redistribution des produits dégradés en différents compartiments de la plante. Pendant la sénescence des feuilles, beaucoup de processus ont lieu y compris la distribution d'azote et d'autres nutriments, la destruction des macromolécules telles que la chlorophylle, protéines, acides et des lipides nucléiques. Une augmentation de la peroxydation des lipides et perméabilité de la membrane cellulaire. À cause de la surproduction des ERO, la sénescence des feuilles est considérée comme un processus d'oxydation. Cette surproduction est accompagnée par un déséquilibre du système antioxydant qui provoque un stress oxydatif et qui en même temps entraîne la mort de la cellule (Qin *et al.*, 2006).

Après avoir caractérisé l'évolution des paramètres étudiés en fonction de l'âge des palmes, il est évident que le comportement de chaque couronne est différent. Aussi, pour

étudier les corrélations entre le niveau de pollution par les hydrocarbures et les marqueurs biologiques retenus, il a été nécessaire de choisir une seule couronne afin d'augmenter l'échantillonnage tout en restant dans un nombre de mesures raisonnablement raisonnables.

Les données obtenues pour les 5 couronnes montrent que les couronnes 1 et 5 ont un comportement un peu différent des 3 autres avec les valeurs souvent les plus faibles. De plus, la couronne 5 en bon état mais âgée de 6 mois seulement a peu subi la pollution atmosphérique. La couronne 1 correspond à des palmes en début de sénescence. Les marqueurs biologiques ont un comportement très différent. Les couronnes 2 à 4 sont les plus homogènes ce qui se traduit sur le plan des variables ayant la plus forte contribution dans les ACP. Notre choix pour la suite du travail s'est porté sur la couronne 4, correspondant à des palmes de 18 mois environ, ayant le moins subi l'abrasion du fait des vents ou de la récolte des dattes et ayant eu un temps d'exposition à la pollution suffisamment long pour espérer détecter des différences entre stations.

3. Évaluation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans l'air et le sol

Afin d'identifier les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) susceptibles d'être quantifiés dans les matrices végétales, nous avons procédé à des analyses préliminaires dans l'air et le sol pour déterminer les HAP présents dans ces deux matrices sur notre site d'étude.

3.1. Occurrence et quantification des HAP dans l'air.

Les HAP présents sur des filtres placés pendant 10 jours sur des palmiers de notre zone d'étude ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse. 3 HAP ont été retrouvés sur les filtres déposés dans trois stations de notre site d'étude : le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène. Il s'agissait d'une première approche préliminaire. Les stations choisies à cette étape étaient Ain Moussa (AM), Bamendil à l'ouest de Ouargla dans une zone éloignée des torches et Haoud Berkaoui (HBK).

Les concentrations relatives des 3 HAP varient d'une station à une autre ainsi que d'un HAP à l'autre. Les résultats montrent que les concentrations en HAP mesurées à AM sont plus fortes que dans les deux autres stations (Figure 44). La station de Bamendil présentant des teneurs plus élevées que celle de HBK située en plein champ pétrolier, nous avons poursuivi l'étude avec une autre station qui paraissait éloignée des sources de pollution atmosphériques émanant des torchères : HBA (Hassi Ben Abdallah).

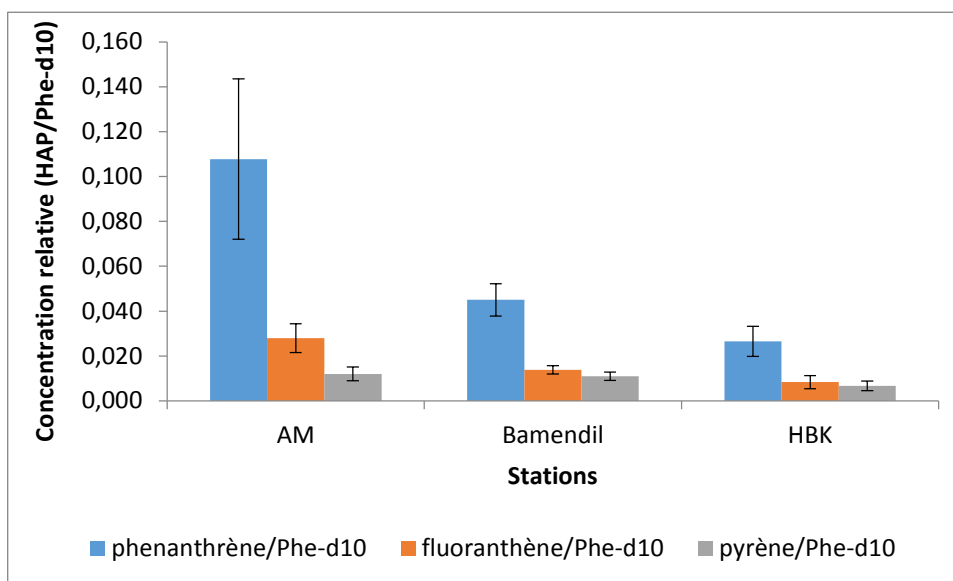


Figure 44 : Concentrations relatives en phénanthrène, fluoranthène et pyrène par rapport à Phe-d10 mesurées sur les filtres des trois stations d'échantillonnage. AM : Ain Moussa, HBK (Haoud Berkaoui).

Phe-d10 (phénanthrène-d10) est un étalon interne.

3.2. Occurrence et quantification des HAP dans les sols.

L'analyse des HAP dans les sables prélevés au pied des palmiers dattier des trois stations de notre site d'étude a mis en évidence la présence de phénanthrène, fluoranthène et pyrène dans ces matrices. La figure 45 présente les moyennes des concentrations (en ng/g) dans les sables pour ces trois molécules par orientation et par station de prélèvements. Les concentrations pour les trois molécules sont en moyenne plus importantes dans les sables collectés à Aïn Moussa (AM) par rapport aux sables collectés à Haoud Berkaoui (HBK) et à Hassi Ben Abdallah (HBA). Les résultats détaillés montrent que les concentrations en HAP varient selon l'orientation à l'intérieur d'une même station, de plus le maximum de concentration n'est pas toujours observé pour la même orientation en fonction des stations et selon la molécule considérée. Ainsi à Haoud Berkaoui (HBK), la concentration la plus forte pour le phénanthrène a été enregistrée dans les sables prélevés au centre de la station (3,22 ng/g), la concentration la plus forte pour le fluoranthène a été enregistrée dans les sables prélevés à l'ouest de la station (2,21 ng/g) et au nord pour le pyrène (2,02 ng/g). (Figure 45).

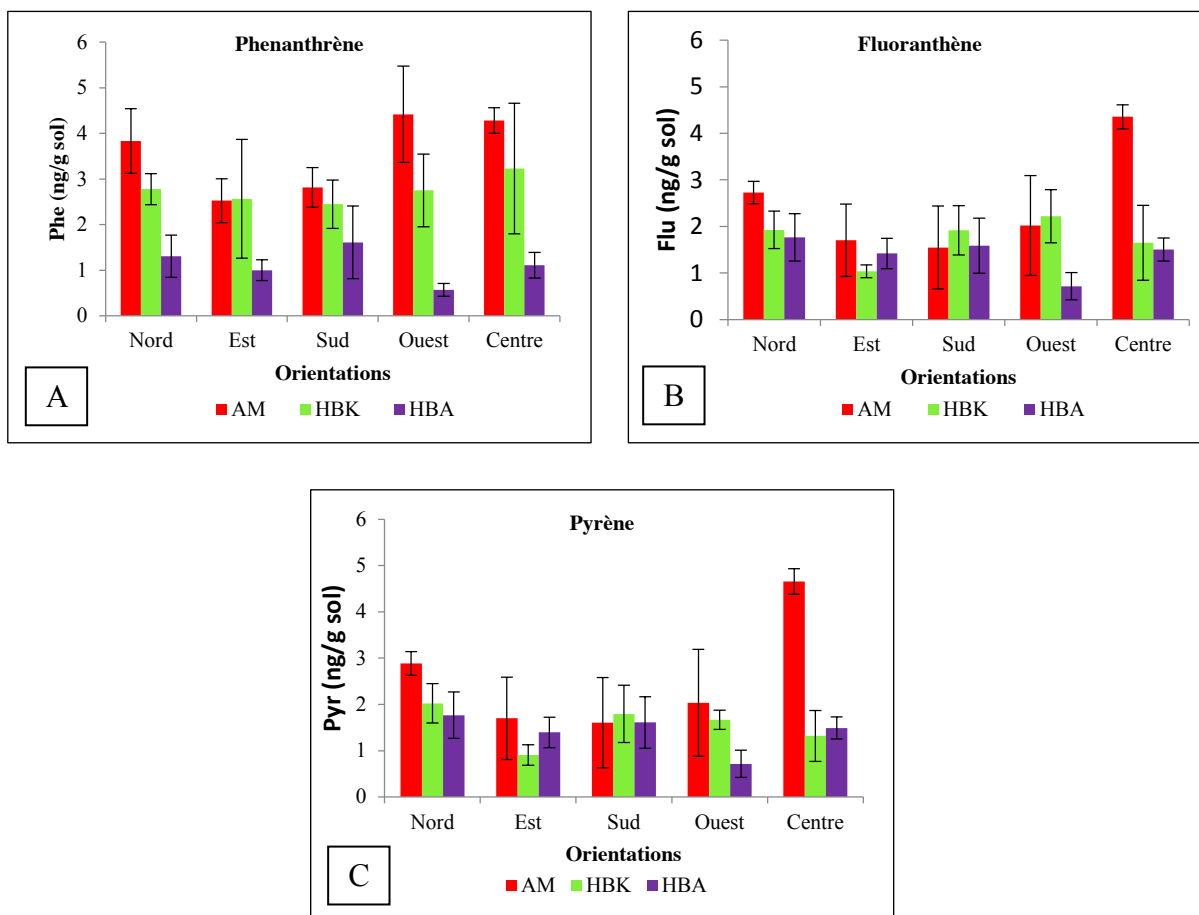


Figure 45 : Teneur en phénanthrène, fluoranthène et pyrène (en ng/g) dans les sols des stations de Aïn Moussa (AM), Haoud Berkaoui (HBK) et Hassi Ben Abdallah (HBA).

Les résultats représentés à l'échelle de chaque station montrent que les concentrations en phénanthrène sont généralement supérieures à celles du fluoranthène et du pyrène à Aïn Moussa (sauf dans les sables prélevés au centre de la station) et à Haoud Berkoui (Figure 46). Dans les sables de la station de Hassi Ben Abdallah (HBA), les concentrations moyennes en fluoranthène et pyrène sont supérieures à celles du phénanthrène sauf au sud de la station.

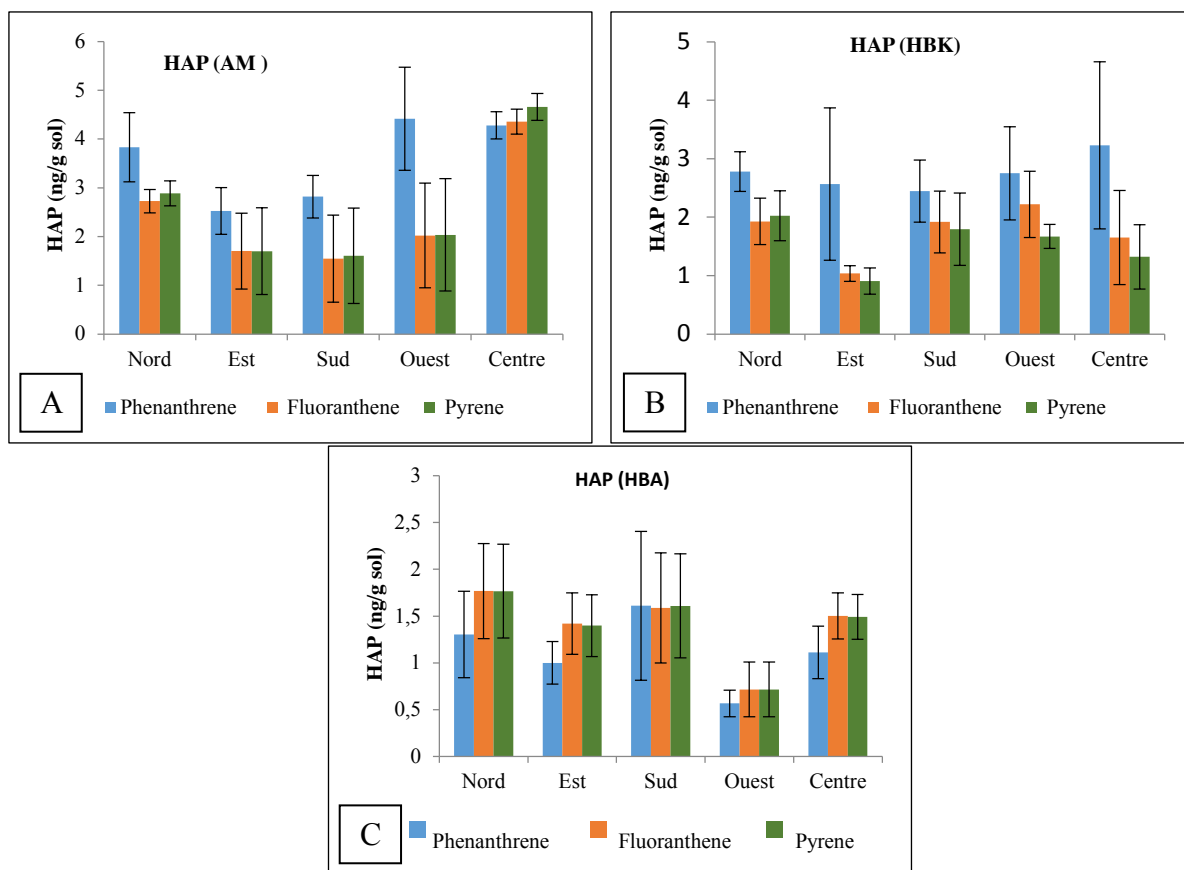


Figure 46 : Teneurs en phénanthrène, fluoranthène et pyrène dans les sables des stations de Aïn Moussa, Haoud Berkaoui et Hassi Ben Abdallah en fonction de l'orientation.

Globalement, à l'échelle de chaque station et sans différencier les orientations, les concentrations en fluoranthène, phénanthrène et pyrène sont, au total, plus importantes dans les sables de la station de Aïn Moussa que dans les deux autres stations (Figure 47). Ceci est vrai pour les 3 HAP. La station de Hassi Ben Abdallah (HBA) a les valeurs les plus faibles.

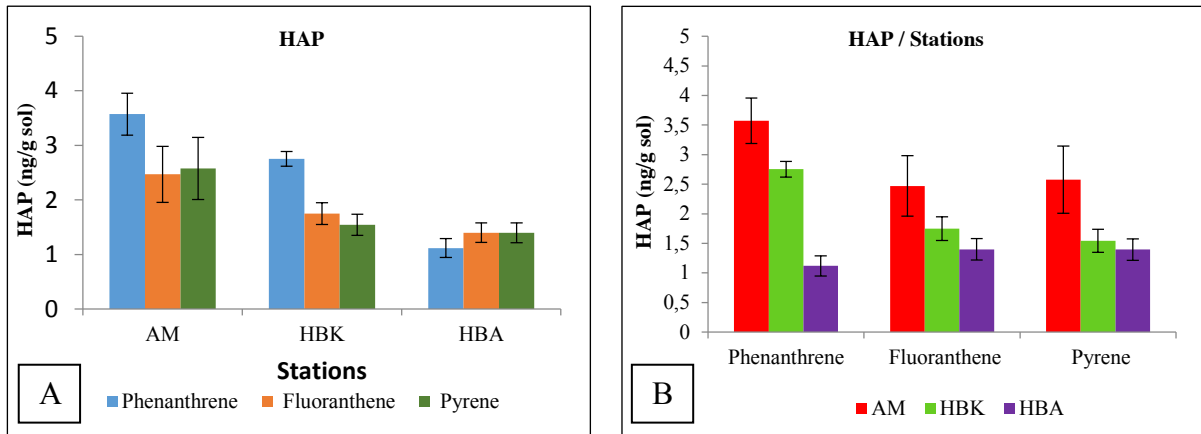


Figure 47 : Teneurs moyennes du total des HAP dans les stations de Aïn Moussa (AM), Haoud Berkaoui (HBK) et Hassi Ben Abdallah (HBA).

3.3. Discussion

Les HAP se partitionnent entre l'atmosphère, le sol et la végétation par les dépôts atmosphériques secs et humides (Srogi, 2007). Le transport et la mobilité des HAP dans l'environnement dépendent à la fois de leurs propriétés physicochimiques et des propriétés des compartiments environnementaux exposés et des conditions environnementales.

Les sols constituent le principal réservoir pour les dépôts atmosphériques des HAP (Wild et Jones, 1995 ; Lichtfouse *et al.*, 2005). Les études sur le devenir des HAP dans les sols ont toutes été menées dans le cadre de pollutions fortes industrielles ou artificielles du sol, mais pas dans le cadre de pollutions diffuses du sol d'origine atmosphérique.

Plusieurs études se sont intéressées à l'évaluation de la pollution atmosphérique par les HAP par l'analyse des poussières au niveau du désert algérien (Yessa *et al.*, 2001; Yassa et Cecinato, 2005), dans notre zone d'étude (Ouargla et Hassi Messaoud). Les résultats de ces études et d'autres travaux en milieu équivalent sont compilés dans le tableau 11.

Tableau 11 : Teneurs en HAP dans les rejets atmosphériques dans les Sahara Algérien, le Nord de l'Algérie et l'Europe.

Pays	Localisation	Phénanthrène	Fluoranthène	Pyrène	Références
Algérie (Sud)	Ouargla (Université)	11 ng/m ³	4,3 ng/m ³	3,2 ng/m ³	Yassa <i>et al.</i> , 2001
Algérie (Alger)	Ben Aknoun	1,1 ng/m ³	0,34 ng/m ³	0,4 ng/m ³	Ladji <i>et al.</i> , 2009
	Bab el Oued	1,64 ng/m ³	1,14 ng/m ³	1,28 ng/m ³	
Algérie (Nord)	Boumerdes	0,102 ng/m ³	0,044 ng/m ³	0,047 ng/m ³	Ladji <i>et al.</i> , 2009
	Rouiba-Réghaia	0,0625 ng/m ³	0,06 ng/m ³	0,078 ng/m ³	
	Chrèa	0,0605 ng/m ³	0,0125 ng/m ³	0,010 ng/m ³	
Algérie (Nord)	Oued Smar, Août - Février	6,873 ng/m ³	15,203 ng/m ³	18,054 ng/m ³	Ladji <i>et al.</i> , 2007
	Oued Smar Été - Hiver	4,449 ng/m ³	4,466 ng/m ³	3,125 ng/m ³	
Algérie (Sud)	Hassi Messaoud	20,733 ng/m ³	4 ng/m ³	2,733 ng/m ³	Yassa <i>et al.</i> et Cecinato, 2005
France (Sud)	Marseille				Albinet <i>et al.</i> , 2007
	<i>Urban</i>	8,47 ng/m ³	3,488 ng/m ³	5,83 ng/m ³	
	<i>Sub-Urban</i>	2,033 ng/m ³	0,891 ng/m ³	0,60 ng/m ³	
	<i>Rural</i>	0,57 ng/m ³	1,001 ng/m ³	12,77 ng/m ³	
Espagne	Tarragona	6,64 ng/m ³	2,477 ng/m ³	2,067 ng/m ³	Nadal <i>et al.</i> , 2009

Les sols sont des récepteurs pour une large gamme de contaminants organiques générés par les activités humaines. Les HAP sont des contaminants très répandus dans les sols. Leur présence dans les sols peut affecter les fonctions physiques et les propriétés biologiques et chimiques de ces derniers. Les HAP sont introduits dans le sol par des dépôts atmosphériques après un transport local ou à long distance sous forme de poussières de sable. Néanmoins, des sources biogéniques et anthropiques enrichies les poussières avec un certain nombre de substances organiques. Ces composés doivent être examinées plus avant et voir si les séquelles mondiales et régionales de la poussière transportée par le vent subsaharienne veulent être mieux clarifiée (Balducci *et al.*, 2014).

Notre étude montre que les 3 stations d'échantillonnage ne présentent pas une grande différence concernant la teneur en HAP des sols, elle est de 8,621, 6,045 et 3,914 ng/g de MS respectivement pour AM, HBK et HBA. La station de HBA reste celle avec la plus faible teneur en HAP et présentent des concentrations en fluoranthène et pyrène supérieures à celle du phénanthrène, contrairement aux deux autres stations.

Les valeurs des HAP dans notre cas se situaient entre 3,914 et 8,621 ng/g MS (Σ des 3 HAP) pour les 3 stations, ces valeurs ont été comparées à celles obtenues dans des études antérieures dans des sables ou des sols sablonneux en contexte désertique de Ladji *et al.*, 2010

(4,4 et 21,8 ng/g MS) et Balducci *et al.*, 2014 (5,3 et 18,4 ng/g MS). Nos valeurs avaient dans tous les cas un ordre de grandeur proche que ceux détectés par les deux études (Tableau 12).

Dans cette étude, les teneurs en HAP dans l'air et le sol ne dépendent pas obligatoirement des exploitations pétrolières et des industries pétrochimiques, mais surtout de l'activité anthropique due à la combustion incomplète de la biomasse.

Plusieurs auteurs utilisent les rapports des HAP pour déterminer les sources de la contamination en HAP et différencier les sources pyrogéniques et pétrogéniques pour les en HAP (Yunker *et al.*, 2002). Nous avons utilisé principalement le rapport Fluoranthène sur Fluoranthène plus Pyrène (Flu/Flu+Pyr) pour un diagnostic pour les différents processus de formation des HAP. Si le rapport est inférieur à 0,4, il correspond généralement à des sources pétrogéniques (pétrole, diesel, charbon,...), entre 0,4 et 0,5, il indique une source de combustion fossile liquide (véhicule et pétrole brut) tandis que les rapports supérieurs à 0,5 sont attribuables à la combustion du bois ou charbon (Yunker *et al.*, 2002).

Les rapports Flu/Flu+Pyr pour notre étude sont de 0,49 ; 0,53 et 0,50 respectivement pour AM ; HBK et HBA, ce qui signifie que nos 3 stations sont contaminées soit par le trafic routier (véhicules) ou bien par le pétrole brut (torches).

Tableau 12 : Teneur en HAP et la somme des HAP des sols sahariens et d'autres sols sableux (les valeurs des HAP sont exprimées en ng/g MS et la somme des HAP des différentes études ne concerne pas seulement les 3HAP sauf notre étude).

Pays	Localisation	Nature du sol	Phénanthrène	Fluoranthène	Pyrène	∑ HAP (ng/g)	Références
Algérie (Sud)	Hassi Messaoud (Industriel)	Sable du Sahara	2,2 ng/g	0,5 ng/g	0,48 ng/g	4,4 ng/g	Ladji <i>et al.</i> , 2010
	Laghouat (Pastoral)		0,82 ng/g	1,86 ng/g	1,75 ng/g	21,8 ng/g	
	Hassi Bahbah (Pastoral)		1,67 ng/g	1,66 ng/g	1,69 ng/g	13,6 ng/g	
	Ghardaïa (Oasis)		1,53 ng/g	1,66 ng/g	1,43 ng/g	18 ng/g	
	Touggourt (Oasis)		2,6 ng/g	0,41 ng/g	0,75 ng/g	4,5 ng/g	
Algérie (Sud) (Ouargla)	Ain Moussa (AM)	Sable du Sahara	3,57 ng/g	2,47 ng/g	2,58 ng/g	8,62 ng/g	Notre étude 2012-2013
	Haoud Berkaoui (HBK)		2,75 ng/g	1,75 ng/g	1,54 ng/g	6,04 ng/g	
	Hassi Ben Abdellah (HBA)		1,12 ng/g	1,40 ng/g	1,40 ng/g	3,91 ng/g	
Algérie (Sud) (Ouargla)	Hassi Messaoud	Sable du Sahara				11,9 ng/g	Balducci <i>et al.</i> , 2014
	Hasi Ben Abdelleh					8,7 ng/g	
	Rouissat					18,4 ng/g	
	Sidi Khouiled					7,7 ng/g	
	Ain Beida					5,3 ng/g	
Algérie (Sud) (Biskra)	El Ghrous	Sable du Sahara				3,7 ng/g	Balducci <i>et al.</i> , 2014
	Biskra					3,6 ng/g	
	Tolga					0,41 ng/g	
	Bir Naam					0,58 ng/g	
	Oumache					1,2 ng/g	
Algérie (Nord)	Bouzareah		0,15 ng/g	0,03 ng/g	0,07 ng/g	1,91 ng/g	Moussaoui <i>et al.</i> , 2013
	Rouiba		0,40 ng/g	0,12 ng/g	0,15 ng/g	3,52 ng/g	
	Ouled Moussa		0,52 ng/g	0,28 ng/g	0,20 ng/g	2,50 ng/g	
	Chrèa		0,59 ng/g	0,23 ng/g	0,17 ng/g	1,98 ng/g	
Portugal		Sols sablonneux	20 ng/g	8 ng/g	15,2 ng/g	27,3 à 769,8 ng/g	Augusto <i>et al.</i> , 2010
Chine	Profile 1	sol sablonneux (alluviaux)				3680-128 ng/g	Lu <i>et al.</i> , 2012
	Profile 2					10800-143 ng/g	

Une étude de Moussaoui *et al.*, 2013 s'ajoute à la précédente et exploite les valeurs du rapport Flu/Pyr. Le tableau 15 présente les sources anthropiques de la contamination du sol en HAP.

Tableau 13 : Sources anthropiques des HAP et les valeurs typiques du rapport Flu/Pyr (d'après la synthèse de Moussaoui *et al.*, 2013 et notre étude).

Sources	Rapport HAP	Flu/Pyr	Références
Véhicules	Mixtes	0,60	Ravindra <i>et al.</i> , 2008; Rotatori <i>et al.</i> , 2005.
	L'essence au plomb	0,50	Rogge <i>et al.</i> , 1993a; Ravindra <i>et al.</i> , 2008; Rotatori <i>et al.</i> , 2005; Bourotte <i>et al.</i> , 2005.
	Essence sans plomb	0,54	Rogge <i>et al.</i> , 1993a; Ravindra <i>et al.</i> , 2008; Rotatori <i>et al.</i> , 2005; Bourotte <i>et al.</i> , 2005.
	Diesel	0,8 - 1,1	Rogge <i>et al.</i> , 1993a; Ravindra <i>et al.</i> , 2008; Rotatori <i>et al.</i> , 2005; Bourotte <i>et al.</i> , 2005; Salzano <i>et al.</i> , 2008.
Le chauffage domestique au charbon	Bois de pin	0,78	Schmidl <i>et al.</i> , 2008.
	Bois de chêne	0,75	Schmidl <i>et al.</i> , 2008.
	Le carburant de synthèse	1,19	Cecinato <i>et al.</i> , 2005.
	Le pétrole lourd	0,83	Cecinato <i>et al.</i> , 2005.
La fumée du tabac	particules	0,96	Lu et Zhu, 2007.
Décharge	fumées	1,30	Cecinato <i>et al.</i> , 2005.
Incinérateurs urbains	fumées	~17	Bourotte <i>et al.</i> , 2005; Cecinato <i>et al.</i> , 2005.
Étude de Moussaoui <i>et al.</i> , 2013	Bouzareah (BZ) été 2006	0,5	Moussaoui <i>et al.</i> , 2013.
	Rouiba (RB) été 2006	0,82	
	Ouled Moussa (OM) été 2006	1,42	
	Chrèa (CH) été 2006	1,47	
Ladji <i>et al.</i> , 2010	Hassi Messaoud (HMD)	1,04	Ladji <i>et al.</i> , 2010.
	Laghouat	1,06	
	Hassi Bahbah	0,98	
	Ghardaia	1,16	
	Touggourt	0,55	
Milieu naturel (torches, activités anthropiques)	Ain Moussa (AM)	0,96	Notre étude (2012-2013)
	Haoud Berkaoui (HBK)	0,97	
	Hassi Ben Abdellah (HBA)	1,00	

Par manque des travaux sur les gaz torchés dans ce domaine, le tableau 13 présente les autres sources qui peuvent être une partie de l'origine de la contamination des sols en

hydrocarbures. En se référant à ce tableau, nous constatons que la valeur du rapport déterminé dans notre travail suggère que les échappements des véhicules à diesel sont les principales sources des HAP dans nos stations d'échantillonnage (Tableau 13). Il semble donc que, malgré l'éloignement des stations entre elles, les sources de contamination des sols restent principalement les mêmes et sont essentiellement dues à la circulation automobile. Les rejets liés aux gaz des torches arriveraient en quantités très faibles ou bien seraient lessivés du fait de la structure du sol qui est constitué entièrement de sable.

Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de réglementation sur les teneurs en HAP dans les sols et les eaux de surface. Concernant l'air ambiant, la valeur cible est fixée par la directive 2004/107/CE à 1 ng. m^{-3} en moyenne annuelle calculée sur le contenu de la fraction PM_{10} des poussières en suspension (JOCE, 2004). Pour l'eau destinée à la consommation, le Décret n°2001-1220 du 20 décembre 2001, relatif aux eaux destinées à la consommation humaine, à l'exclusion des eaux minérales naturelles, impose une concentration inférieure à $0,1 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ pour la somme des quatre composés suivants : benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(ghi)pérylène, indéno(1,2,3-cd)pyrène. Pour le benzo(a)pyrène, la valeur limite est de $0,01 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$. Les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé imposent dans l'eau potable une teneur limite de $0,2 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ pour les 6 HAP de la liste présentée ci-dessus : (fluoranthène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, benzo(ghi)pérylène, indéno(1,2,3, cd)pyrène, avec une valeur limite pour le benzo(a)pyrène de $0,7 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ (WHO. Guidelines for drinking-water quality, third edition – Chemical fact Sheets, p429).

4. Comportement des marqueurs métaboliques en fonction de la teneur en HAP dans les palmes de la couronne 4

La couronne 4 a été retenue pour étudier les corrélations entre le niveau de pollution par les hydrocarbures (HAP) et les marqueurs biologiques. Pour cela, 3 palmiers ont été choisis en chacun des 5 points de la station : aux 4 points cardinaux et au centre de la palmeraie. Pour chaque palmier, 3 extraits ont été analysés sur les palmes de la couronne 4 (palmes de 1 an) retenue pour cette partie du travail. Les extraits sont réalisés à partir d'une poudre homogène préparée à partir de prélèvements identiques sur les feuilles aux 4 points cardinaux du palmier.

Les marqueurs métaboliques choisis sont relatifs aux pigments, aux marqueurs du stress oxydant ainsi qu'aux GST comme précédemment. De plus, le MDA témoin de la peroxydation lipidique a été ajouté. Par ailleurs, les HAP ont été quantifiés sur les mêmes poudres de matériel végétal sec afin de rechercher des corrélations éventuelles.

L'analyse des résultats obtenus sur chaque marqueur sera d'abord présentée puis une analyse globale à l'échelle des stations à l'aide d'une ACP. Les teneurs en HAP ont été déterminées dans les palmes en parallèle. Enfin, nous rechercherons les corrélations entre le comportement des marqueurs métaboliques et les teneurs en HAP.

4. 1. Comparaison des 3 stations

4.1.1. Variabilité des marqueurs métaboliques

4.1.1.1. Évolution de la teneur en pigments

En ce qui concerne les teneurs en pigments, Ain Moussa (AM) et Hassi Ben Abdallah (HBA) présentent la teneur la plus élevée en chlorophylles totales (chl_{a+b}), (Figure 48A). Au niveau du rapport entre les deux chlorophylles (Chl_a/Chl_b), c'est HBA qui se différencie avec un rapport plus faible de 3,65 contre AM et HBK (B). Par contre pour les caroténoïdes comme pour le rapport chlorophylles/caroténoïdes (C et D) les différences entre stations ne sont pas significatives.

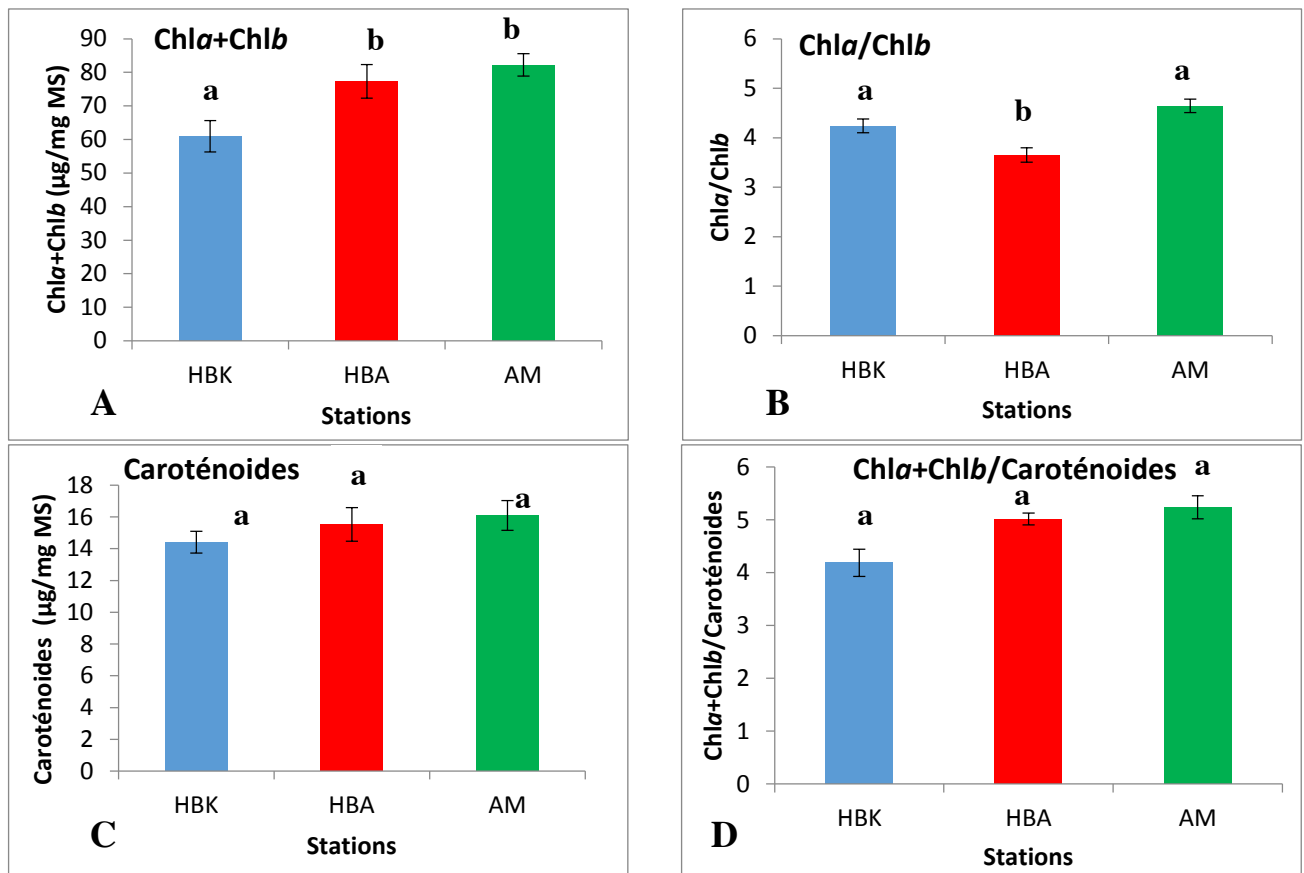


Figure 48 : Teneurs en pigments et leurs rapports dans les 3 stations étudiées. Les lettres (a, b) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétriques (Anova) soit non paramétriques (Kruskal-Wallis). Les barres d'erreurs correspondent aux SEM calculés pour 15 échantillons avec 3 répétitions techniques pour chacun.

4.1.1.2. Évolution des marqueurs de l'activité antioxydante

Les marqueurs de l'activité antioxydante sont regroupés dans la figure 49. La capacité antioxydante varie d'une station à une autre avec un TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) pour AM qui dépasse celui de HBA et significativement celui de HBK (Figure 49A). Les activités des SOD et GSH-PX sont similaires pour les 3 stations d'échantillonnages. Même si la moyenne de HBA est légèrement supérieure, les différences ne sont pas significatives.

Les activités des GPX et GR montrent le même comportement : les activités de HBK et AM sont les plus élevées; celles de HBA sont les plus faibles (Figure 49C et D). Pour la GPX, HBA diffère d'une manière significative de HBK et AM. Pour la GR, les 3 stations diffèrent entre elles significativement.

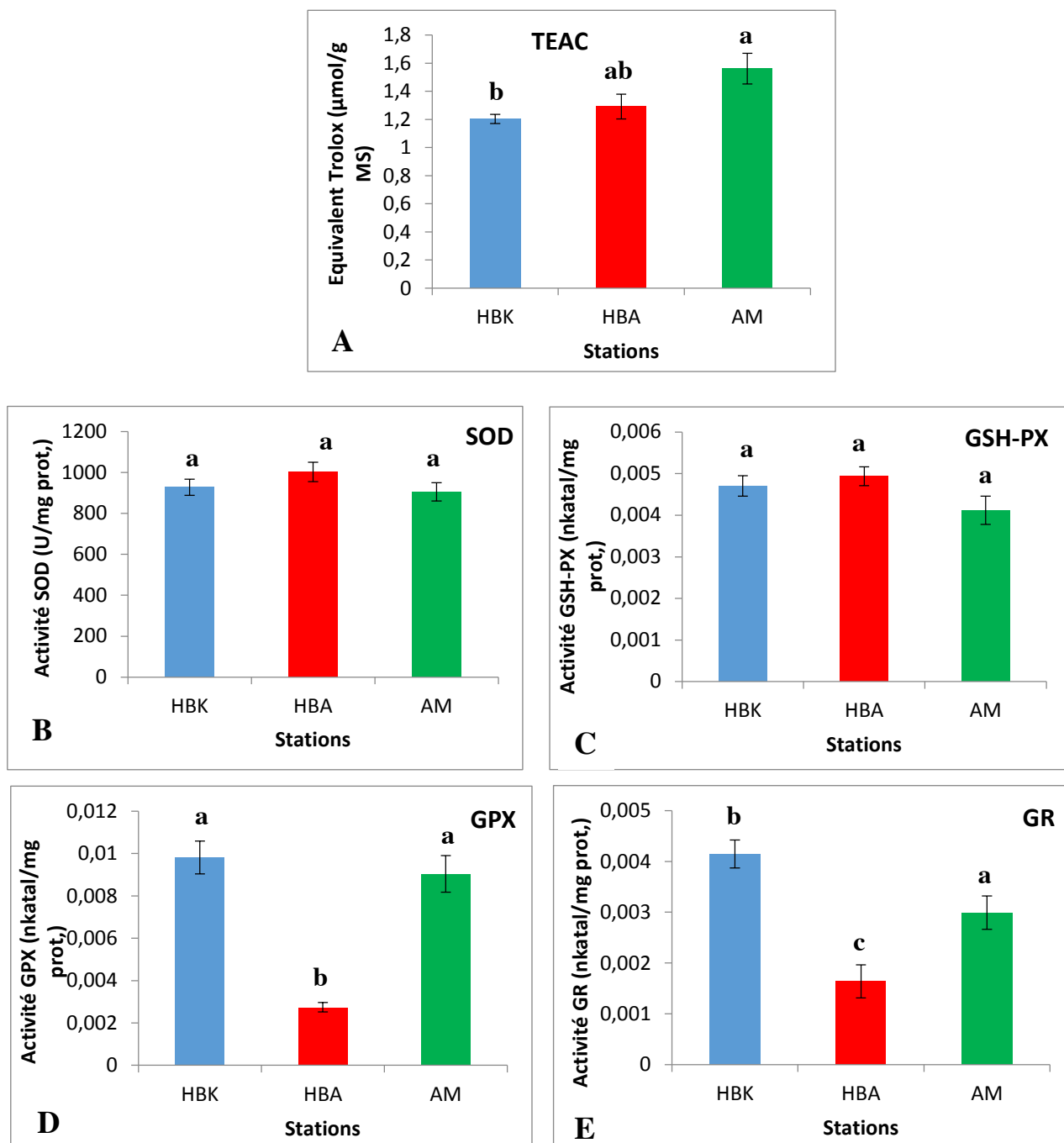


Figure 49 : Les activités antioxydantes des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétriques (Anova) soit non paramétriques (Kruskal-Wallis). Les barres d'erreurs correspondent aux SEM calculés pour 15 échantillons avec 3 répétitions techniques pour chacun.

4.1.1.3. Activité de la peroxydation lipidique : le malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation lipidique libère du MDA. Sa quantification permet donc de comparer le niveau du stress oxydant entre les stations. La teneur moyenne en MDA est significativement la plus élevée dans la station AM. Les stations de HBK et HBA donnent des résultats équivalents (Figure 50).

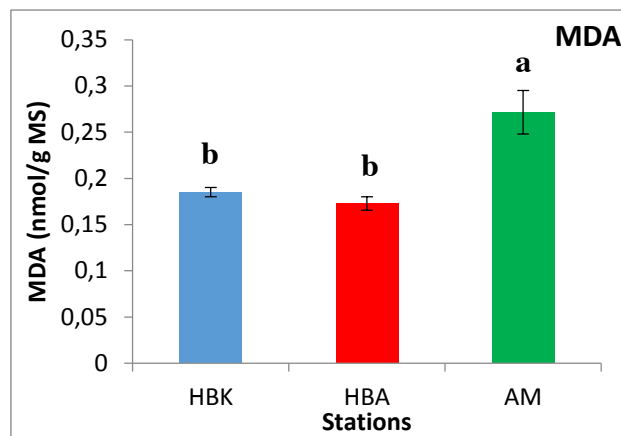


Figure 50 : Quantification du malondialdéhyde (MDA) des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétriques (Anova) soit non paramétriques (Kruskal-Wallis). Les barres d'erreurs correspondent aux SEM calculés pour 15 échantillons avec 3 répétitions techniques pour chacun.

4.1.1.4. Activités de détoxification des HAP : les Glutathion-S-transférases (GST)

L'activité des GST est en relation avec la détoxification des HAP dans les cellules. Des différences significatives caractérisent les 3 stations. L'activité est plus élevée à HBA, AM étant la station qui possède l'activité la plus faible (Figure 51).

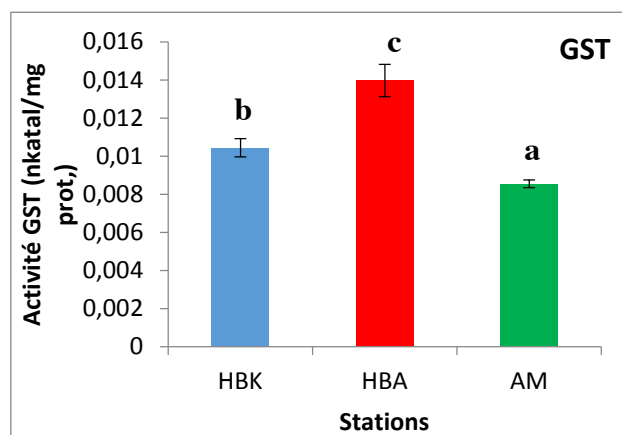


Figure 51 : Activité des Glutathion S-transférases (GST) des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétriques (Anova) soit non paramétriques (Kruskal-Wallis). Les barres d'erreurs correspondent aux SEM calculés pour 15 échantillons avec 3 répétitions techniques pour chacun.

4.1.2. Teneur des palmes en HAP

En parallèle de l'analyse des marqueurs biologiques, les HAP ont été quantifiées dans les mêmes feuilles de palmes. Les trois HAP présents dans le sable des stations ou dans l'air ont été détectés dans les feuilles : le phénanthrène (Phe), le fluoranthène (Flu) et le pyrène (Pyr).

Les teneurs en HAP ont été comparées (Figure 52). Pour chacun d'eux comme pour le total des 3 HAP, la station de HBA se distingue de AM et HBK par une teneur moyenne plus importante. Toutefois, il existe une grande variation d'un palmier à l'autre et aucune différence n'est statistiquement significative.

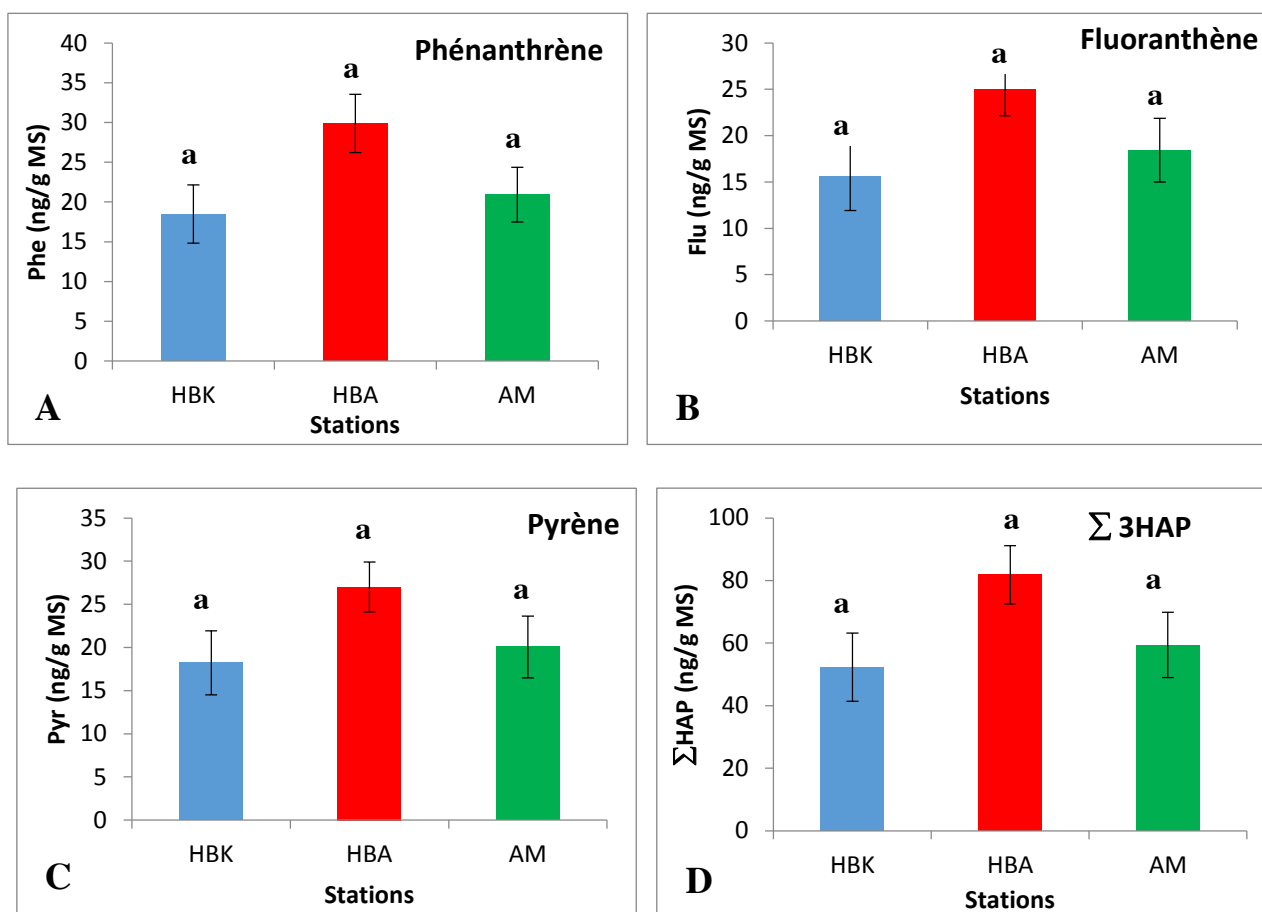


Figure 52 : Teneur en HAP et leur somme des palmes des 3 stations étudiées. Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétriques (Anova) soit non paramétriques (Kruskal-Wallis). Les barres d'erreurs correspondent aux SEM calculés pour 15 échantillons avec 3 répétitions techniques pour chacun.

4.1.3. Recherche de corrélation entre les valeurs des marqueurs biologiques et les teneurs en HAP des palmes

L'étape suivante avait pour ambition de relier les données obtenues sur les marqueurs biologiques avec celles caractérisant les teneurs en HAP. Pour rechercher des relations potentiellement existantes, le calcul du coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé. Des corrélations significatives pour un niveau de signification de 0,05 ont été obtenues entre certaines teneurs en HAP et en pigments.

4.1.3.1. Analyse de la station de Haoud Berkaoui (HBK)

Pour HBK, la corrélation est significative entre la teneur en chaque HAP et celles en chlorophylle *a* (Chla), chlorophylle *b* (Chlb), leur total (Chla+Chlb) ainsi que le rapport des chlorophylles sur les caroténoïdes (Chla+Chlb/Caroténoïdes), (Tableau 14). Les coefficients

de corrélation varient entre 0,553 pour le plus faible coefficient de corrélation entre la teneur en pyrène et en chlorophylle *a* et 0,745 pour le plus grand coefficient de corrélation entre le phénanthrène et le rapport chlorophylle *a+b*/caroténoïdes. La représentation graphique pour les coefficients de corrélation significatif est présentée Figure 53.

Tableau 14 : Coefficients de corrélation entre les marqueurs biologiques mesurés dans les palmes et les teneurs en HAP pour la station HBK (*Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification alpha=0,05*).

Station HBK				
Variables	Phénanthrène	Fluoranthène	Pyrène	Σ HAP
GPX	0,277	0,330	0,382	0,334
GSH-PX	-0,276	-0,282	-0,211	-0,260
SOD	-0,139	-0,033	0,033	-0,047
GR	0,147	0,137	0,184	0,158
GST	-0,080	0,022	0,148	0,031
TEAC	-0,287	-0,310	-0,346	-0,319
MDA	-0,187	-0,179	-0,186	-0,186
chl _a	0,660	0,589	0,553	0,609
chl _b	0,689	0,600	0,565	0,626
caroténoïdes	0,137	0,151	0,148	0,148
chl _a +chl _b	0,670	0,595	0,560	0,616
chl _a +chl _b /caroténoïdes	0,745	0,628	0,581	0,660
chl _a /chl _b	0,350	0,322	0,301	0,329

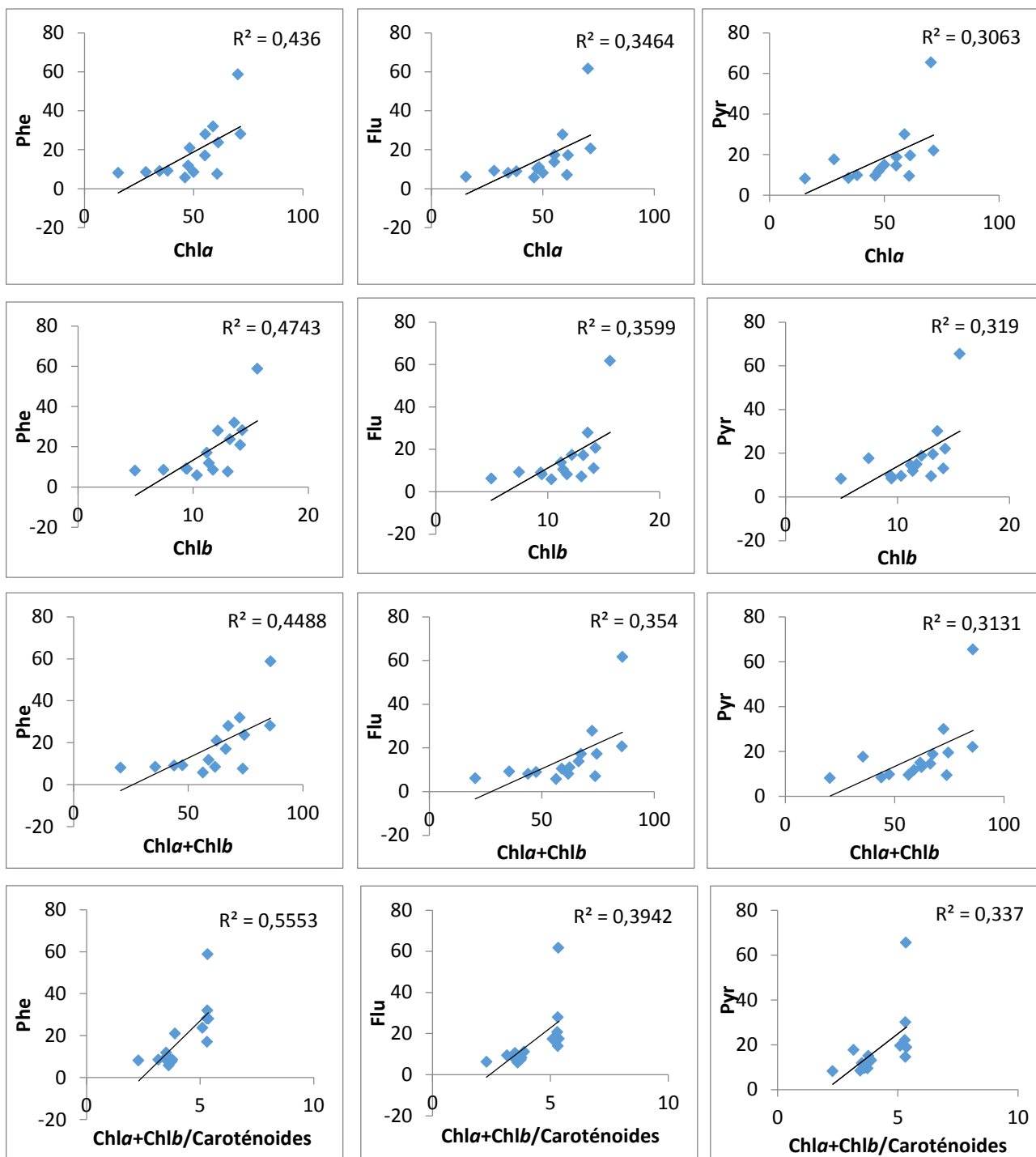


Figure 53 : Les courbes de tendances entre les teneurs en pigments des palmes et leur teneur en HAP de la station HBK, (R^2) correspond au coefficient de détermination.

4.1.3.2. Analyse de la station de Ain Moussa

Pour la station AM, comme pour HBK, le même type de corrélation entre les marqueurs biologiques et la teneur en HAP a été relevé (Tableau 15 et Figure 54). De plus, une corrélation significative s'est ajoutée entre les teneurs en HAP et celles des caroténoïdes ainsi qu'avec celle de l'activité GR. Le plus grand coefficient de corrélation ($r = 0,886$) est enregistré pour les caroténoïdes tandis que le plus faible ($r = 0,533$) concerne la GR.

On peut toutefois noter que si pour HBK, toutes les corrélations étaient positives, pour AM, elles sont négatives entre les pigments et les HAP.

Tableau 15 : Coefficients de corrélation entre les marqueurs biologiques mesurés dans les palmes et leur teneur en HAP pour la station AM (*Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$*).

Station AM				
Variables	Phénanthrène	Fluoranthène	Pyrène	Σ HAP
GPX	0,242	0,187	0,174	0,201
GSH-PX	0,454	0,502	0,494	0,486
SOD	0,118	0,129	0,134	0,128
GR	0,603	0,533	0,540	0,561
GST	0,270	0,244	0,242	0,253
TEAC	-0,440	-0,400	-0,396	-0,414
MDA	-0,381	-0,288	-0,286	-0,319
chla	-0,561	-0,575	-0,577	-0,574
chlb	-0,811	-0,813	-0,814	-0,817
caroténoïdes	-0,834	-0,886	-0,885	-0,873
chla+chlb	-0,636	-0,648	-0,650	-0,648
chla+chlb/caroténoïdes	0,618	0,689	0,686	0,668
chla/chlb	0,672	0,658	0,657	0,665

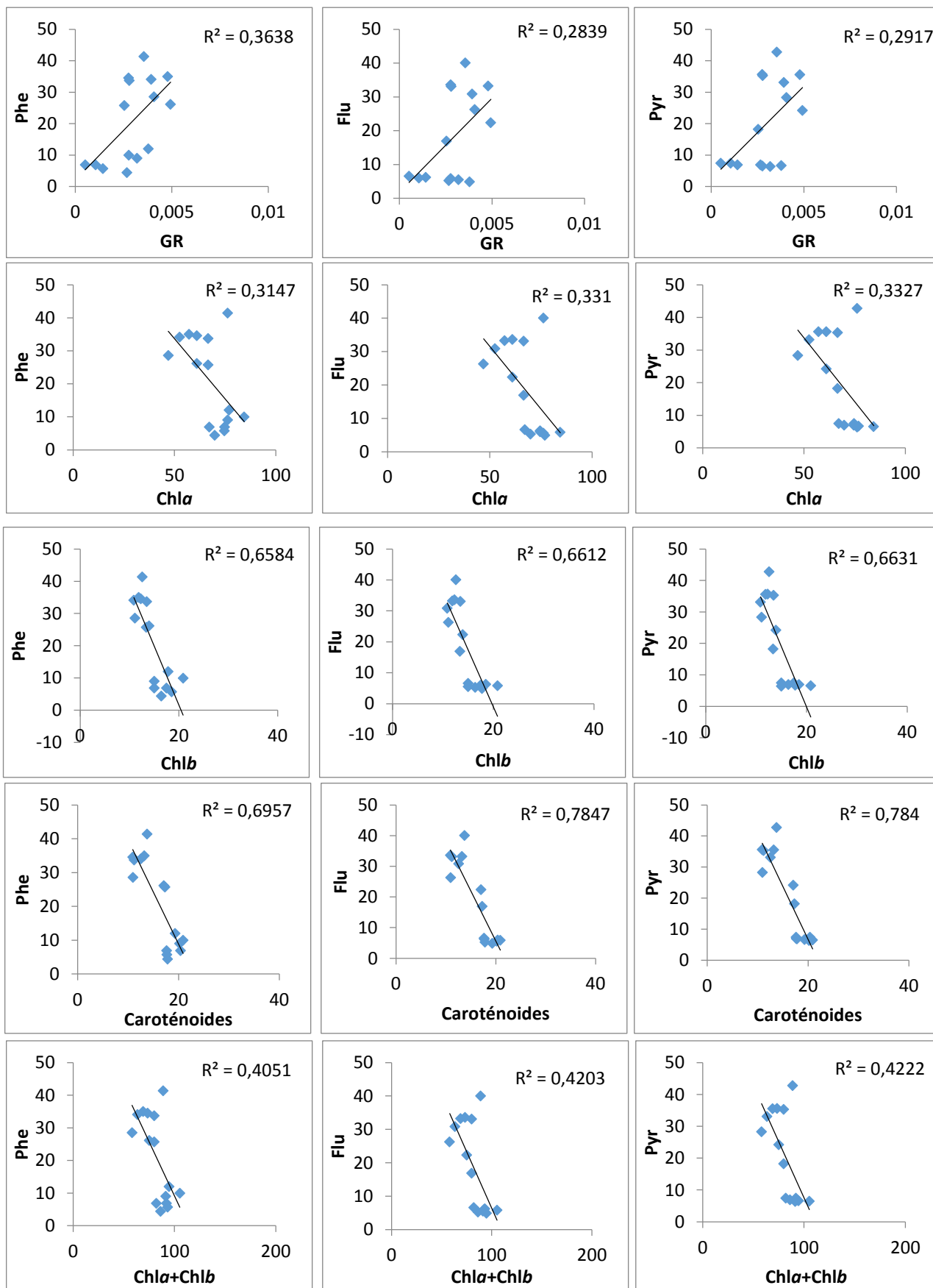


Figure 54 : Les courbes de tendances entre les teneurs en pigments des palmes, la GR et leur teneur en HAP de la station HBK, (R^2) correspondent au coefficient de détermination.

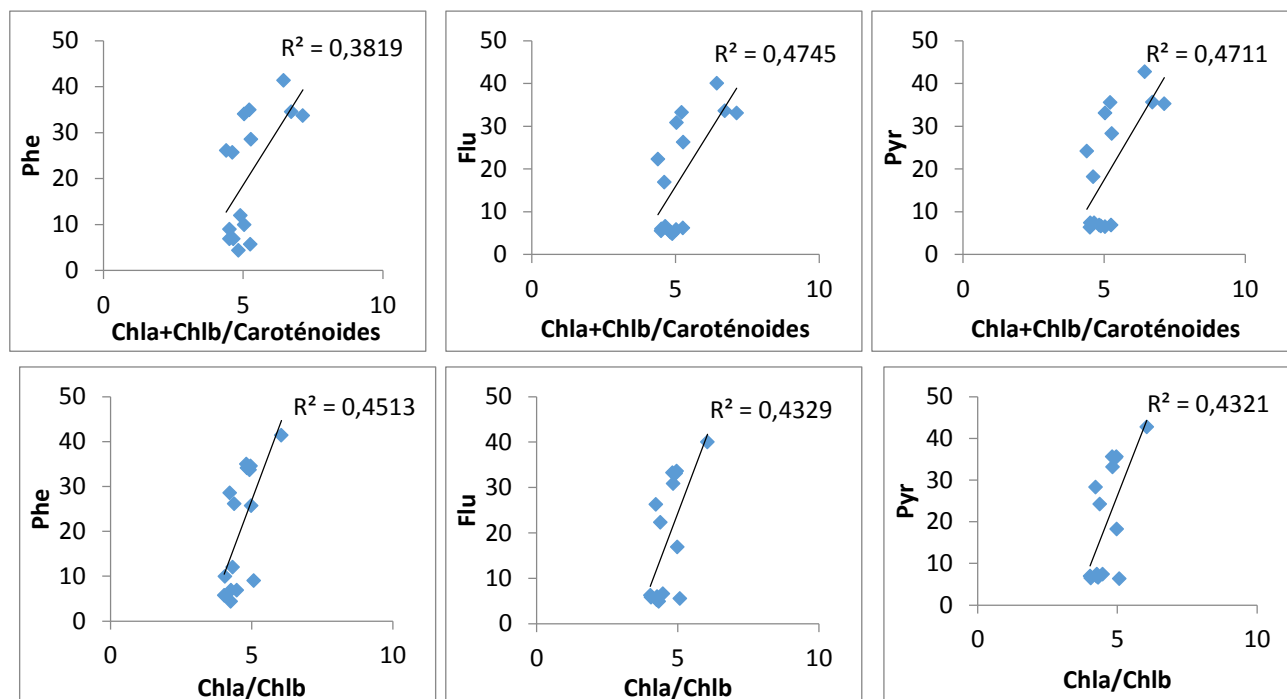


Figure 54 : Les courbes de tendances entre les teneurs en pigments des palmes, la GR et leur teneur en HAP de la station HBK, (R^2) correspondent au coefficient de détermination.

4.1.3.3. Analyse de la station de Hassi Ben Abdallah

La station de HBA ne présente aucune corrélation entre les marqueurs biologiques des feuilles du palmier et leur teneur en HAP (Tableau 16).

Tableau 16 : Coefficients de corrélation entre les marqueurs biologiques mesurés dans les palmes et leur teneur en HAP pour la station HBA (Les valeurs en gras sont différentes de 0 à un niveau de signification $\alpha=0,05$).

Station HBA				
Variables	Phénanthrène	Fluorenthène	Pyrène	Σ HAP
GPX	-0,236	-0,249	-0,271	-0,254
GSH-PX	0,360	0,233	0,282	0,301
SOD	0,023	0,138	0,171	0,105
GR	-0,169	-0,166	-0,193	-0,178
GST	-0,180	-0,203	-0,224	-0,203
TEAC	0,127	0,114	0,131	0,126
MDA	0,215	0,141	0,161	0,178
chla	-0,072	-0,144	-0,132	-0,114
chlb	0,078	0,095	0,113	0,095
caroténoïdes	-0,049	-0,151	-0,136	-0,108
chla+chlb	-0,049	-0,109	-0,095	-0,082
chla+chlb/caroténoïdes	0,064	0,214	0,211	0,157
chla/chlb	-0,157	-0,310	-0,306	-0,253

4. 2. Effet de la position des palmiers dans la palmeraie

Après cette recherche de relation entre l'expression des marqueurs biologiques et les teneurs en HAP à l'échelle des stations, une analyse plus détaillée a été réalisée dans chaque station. Nous avons cherché à déterminer si les teneurs en HAP ou les marqueurs biologiques avaient un comportement différent suivant la position des palmiers au sein de la palmeraie et en particulier par rapport à la position des torches, sources de pollution bien identifiable.

Une analyse en composantes principales a tout d'abord été effectuée. Ensuite, il a été recherché des relations entre le comportement des marqueurs biologiques et la position des palmiers.

4.2.1. Analyse en composantes principales globale

Pour l'analyse en composantes principales, tous les marqueurs biologiques ont été utilisés (Figure 55). Les teneurs en chacun des 3 HAP ont été mises en variables supplémentaires. Ainsi, elles ne contribuent pas à la formation des axes mais sont positionnées dans les représentations graphiques par rapport aux autres variables. L'analyse porte sur les 45 palmiers (15 de chaque station).

Les axes 1 et 2 représentent 55,77% de l'information. Les variables qui ont la plus forte contribution à l'axe 1 sont les chlorophylles *a* (18,8%) et *b* (18,7 %), et les caroténoïdes (17,7 %). Pour l'axe 2, ce sont la GST (31,6 %) et la GPX (21 %).

Au niveau de la répartition des individus, la population de HBA est isolée dans la partie positive de l'axe 2, tout en étant étalée le long de l'axe 1. Elle est bien séparée des deux autres populations. Les populations de AM et HBK sont placées dans la partie négative de l'axe 2 et sont assez séparées le long de l'axe 1. Seuls trois individus de AM se retrouvent parmi les palmiers de HBK. Et seuls les 3 individus de HBK qui se retrouvent dans la partie positive de l'axe 2.

Comme on l'a vu précédemment (Figure 48), les teneurs en pigments contribuent à expliquer la séparation de AM et HBK sur l'axe 1, la somme des deux chlorophylles était significativement différente. D'autres marqueurs comme le TEAC, la GR, les GST et le MDA les différenciaient également (Figures 49, 50 et 51). Pour les marqueurs séparant HBA des deux autres populations, les résultats précédents ont montré que l'activité des GPX, GR et de la GST sont significativement différentes. La GPX et la GR sont des variables qui contribuent à l'axe 2.

Si on s'intéresse à la répartition des individus en fonction de leur orientation, il ne semble pas y avoir, sur cette représentation, d'effet de la position des palmiers dans la palmeraie.

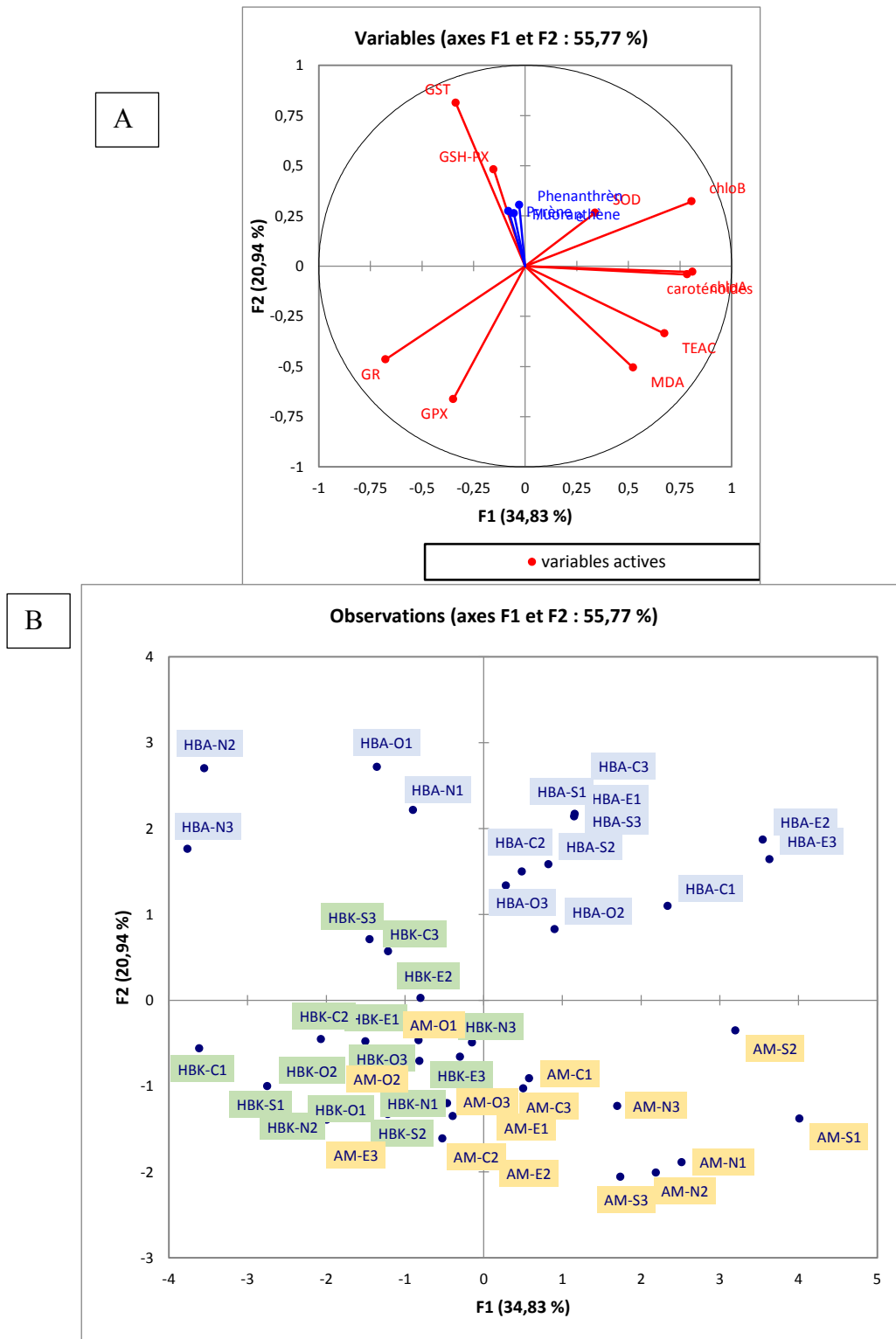


Figure 55 : Analyse en composantes principales réalisées à partir de l'ensemble des données de la couronne 4 pour les 45 palmiers. A : Position des variables (marqueurs

biologiques en rouge) sur les axes 1 et 2. Les teneurs en HAP ont été mises en variables supplémentaires (en bleu). B : Position des individus sur les axes 1 et 2.

HBA : Hassi Ben Abdallah (surligné en bleu), AM : Ain Moussa (en jaune), HBK : Haoud Berkaoui (en vert), S : palmier au sud de la station, N : au nord, E : à l'est, O : à l'ouest, C : au centre.

Les couleurs correspondent aux stations HBK (noir), AM (bleu), HBA (vert). Les 3 palmiers sont numérotés de 1 à 3 pour chaque orientation. Ainsi l'échantillon HBK-S3-1 correspond à un palmier au sud de la station (le n°3) et il s'agit de la couronne 1.

4.2.2. Comparaison des palmiers au nord et sud versus est et ouest

L'analyse des vents a montré que les vents dominants viennent majoritairement du nord-est/est. La dispersion des HAP dans l'air étant tributaire de ces vents dominants, nous avons comparé les données obtenues sur un axe nord/sud par rapport à celles obtenues sur un axe est/ouest au sein de chaque palmeraie. En effet, la palmeraie de Ain Moussa (AM) est sous l'influence des vents d'est qui amène les rejets de la torche positionnée à l'est de la station. La palmeraie de Haoud Berkaoui (HBK) se trouve dans le champ pétrolier du même nom et est donc soumise aux rejets des torches qui entourent la zone. Par contre, la palmeraie de Hassi Ben Abdallah n'est sous l'influence d'aucune torche mais à proximité d'une route nationale. Nous avons vu toutefois que la teneur en HAP au niveau des palmiers est tout aussi forte à HBA qu'à HBK.

Les données des palmiers du nord et du sud d'une palmeraie sont donc comparées à celles des palmiers de l'est et l'ouest de la même palmeraie en faisant abstraction des palmiers au centre. Pour cette comparaison, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée au sein de chaque station ainsi qu'une comparaison des moyennes des différents paramètres.

4.2.2.1. Analyse globale par une ACP pour chaque station

On peut noter que les 3 ACP sont très informatives à partir de la représentation des axes 1 et 2 puisque l'information globale obtenue pour HBK est de 64,6 %, pour HBA de 76,1 % et pour AM de 72,8 % (Figure 56).

L'analyse de la station de HBK montre une séparation pour la plupart des palmiers est/ouest d'une part et nord/sud d'autre part. Les variables ayant la plus forte contribution sur l'axe 1 sont le TEAC (11,7 %), les chlorophylles a (14,1 %) et b (13,9 %). Sur l'axe 2, ce sont surtout la GSH-PX (24,3 %) et les HAP (entre 12,9 et 13,9 %) qui contribuent à l'axe.

Pour HBA, les individus provenant des deux directions sont assez mélangés. La plupart des variables contribuent de manière équivalente à l'axe 1 sauf la GSH-PX et les HAP qui ne contribuent pas.

Pour AM, il y a une séparation très nette des individus du nord et du sud de la palmeraie par rapport à ceux de l'est et de l'ouest. Les variables qui contribuent le plus à l'axe 1 sont les chlorophylles b (12,6 %), les caroténoïdes (13,3 %) et les HAP de manière équivalente (autour de 15 % chacun).

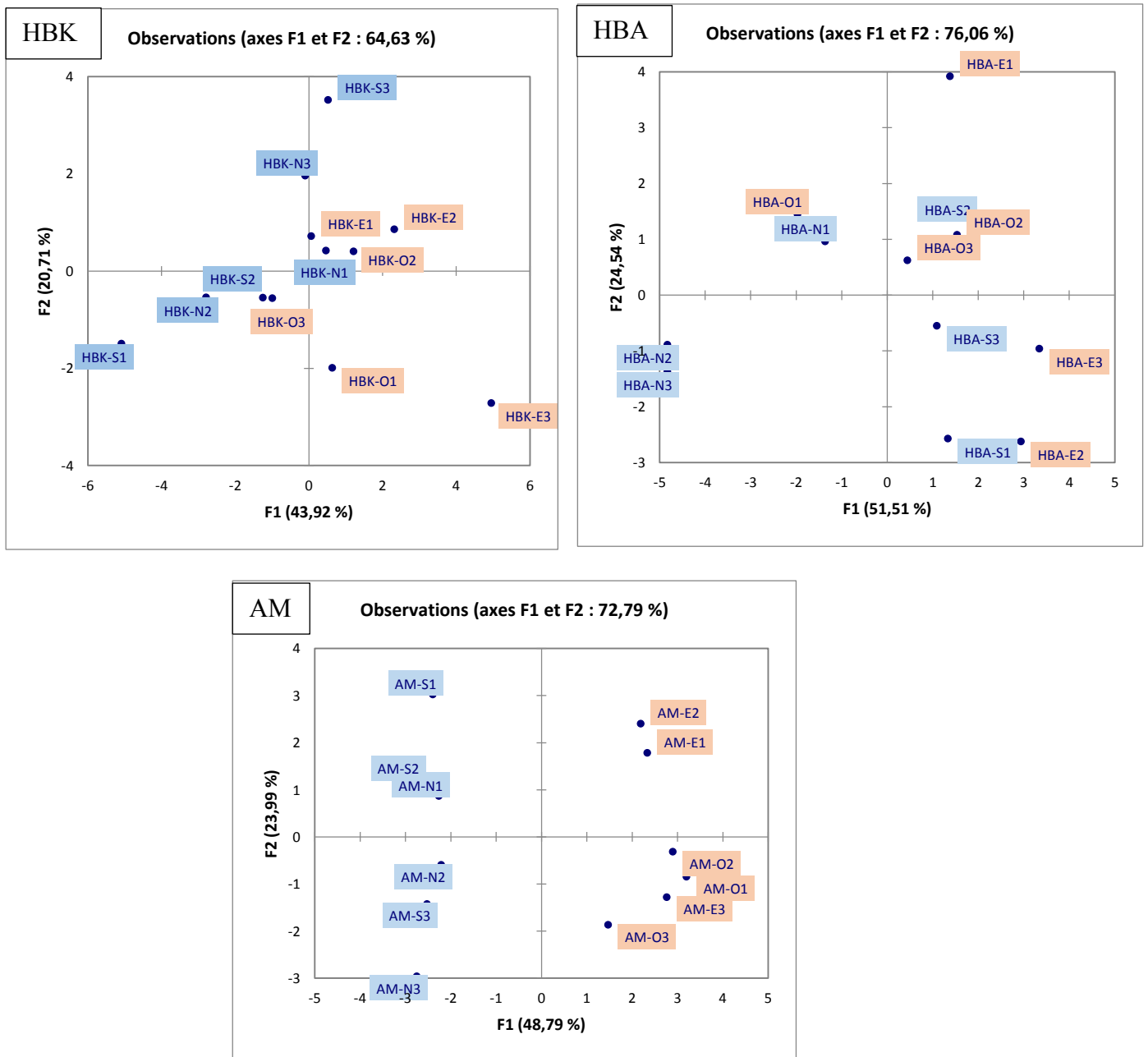


Figure 56 : Analyses en composantes principales au sein de chaque station prenant en compte les données des palmiers placés aux quatre points cardinaux de la station (sans ceux du centre de la palmeraie).

HBA : Hassi Ben Abdallah, AM : Ain Moussa, HBK : Haoud Berkaoui, S : palmier au sud de la station, N : au nord, E : à l'est, O : à l'ouest.

En bleu les palmiers au nord et au sud ; en rose, les palmiers à l'ouest et à l'est. Les 3 palmiers sont numérotés de 1 à 3 pour chaque orientation. Ainsi l'échantillon HBK-S3-1 correspond à un palmier au sud de la station (le n°3) et il s'agit de la couronne 1.

4.2.2.2. Comparaisons des moyennes dans chaque station

Après cette analyse globale, nous avons comparé les valeurs moyennes obtenues au niveau des teneurs en HAP et en pigments. Ces paramètres avaient donné des corrélations significatives pour les stations de Ain Moussa et Haoud Berkaoui. Dans chaque station, les palmiers situés au nord et au sud sont de nouveau comparés à ceux placés à l'est et l'ouest.

Globalement, pour les 3 HAP (Phe, Flu et Pyr), les teneurs moyennes dans les palmiers à l'est et l'ouest sont plus importantes que dans les palmiers du nord et du sud (Figure 57). Toutefois, les différences ne sont pas significatives dans la station HBA pour les 3 HAP comme pour le total des trois.

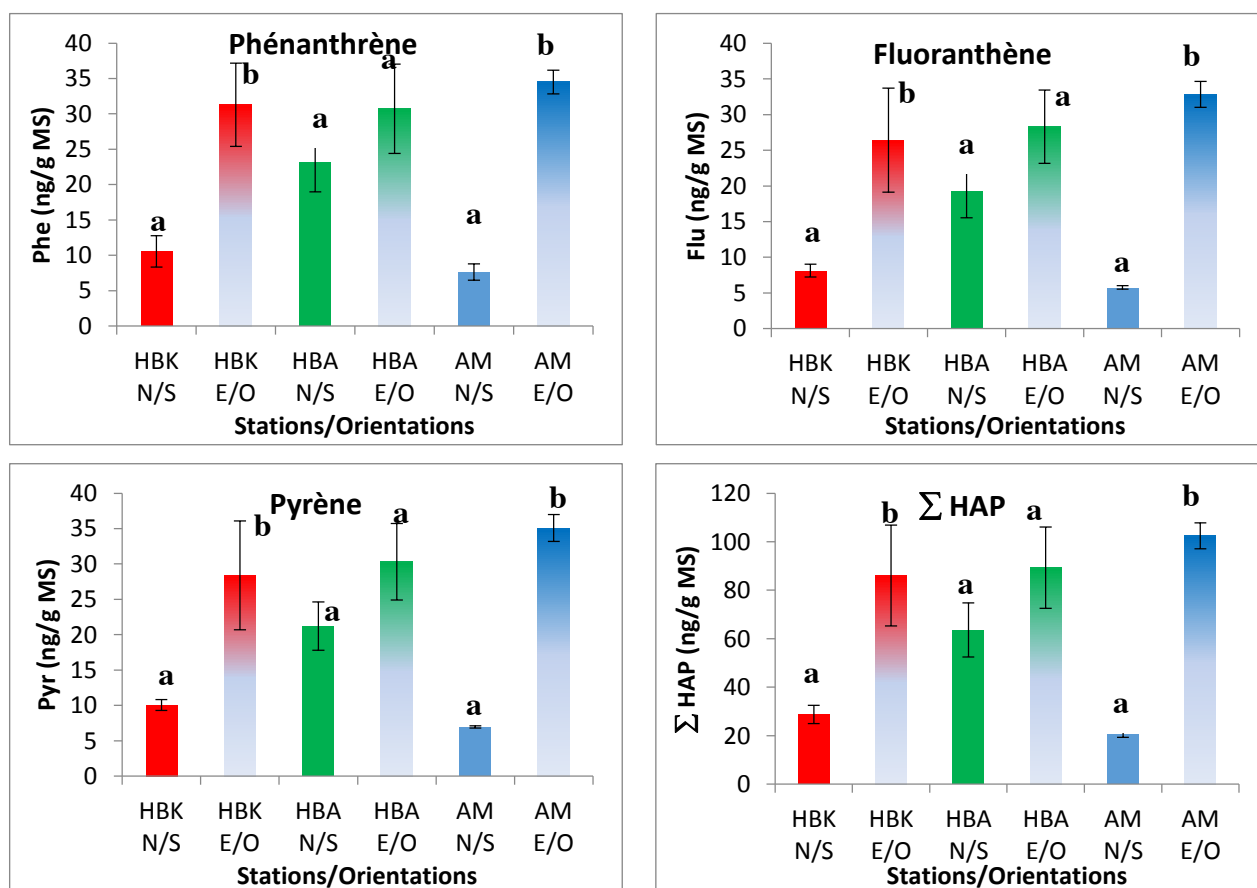


Figure 57 : Comparaison des teneurs moyennes en HAP dans les palmiers des 3 stations d'échantillonnage entre les palmiers du nord et du sud à ceux de l'est et de l'ouest.

Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétriques (Anova) soit non paramétriques (Kruskal-Wallis). Les tests ont été réalisés entre les données

des palmiers situés au nord et au sud d'une part par rapport à ceux situés à l'est et à l'ouest d'autre part, au sein de chaque station. Les barres d'erreurs correspondent aux SEM calculés pour 15 échantillons avec 3 répétitions techniques pour chacun.

Au niveau des pigments, nous constatons des différences significatives au sein des 2 stations HBK et AM de nouveau (Figure 58). Comme pour les HAP ou pour l'analyse globale par ACP, le comportement de HBA est très différent. Aucun effet de l'emplacement des palmiers dans la station n'est à relever.

Les différences significatives concernent plus particulièrement les rapports (*Chla/Chlb* et *Chla+Chlb/Caroténoïdes*) ainsi que la somme *Chla+Chlb*. Les deux rapports (*Chla/Chlb* et *Chla+Chlb/Caroténoïdes*) sont plus importants à l'est et à l'ouest pour AM comme pour HBK. Par contre, les teneurs en chacun des pigments ou la somme des chlorophylles ont un comportement différent pour les deux stations. Les valeurs sont plus élevées à l'est/ouest pour HBK alors qu'elles sont plus élevées au nord/sud pour AM.

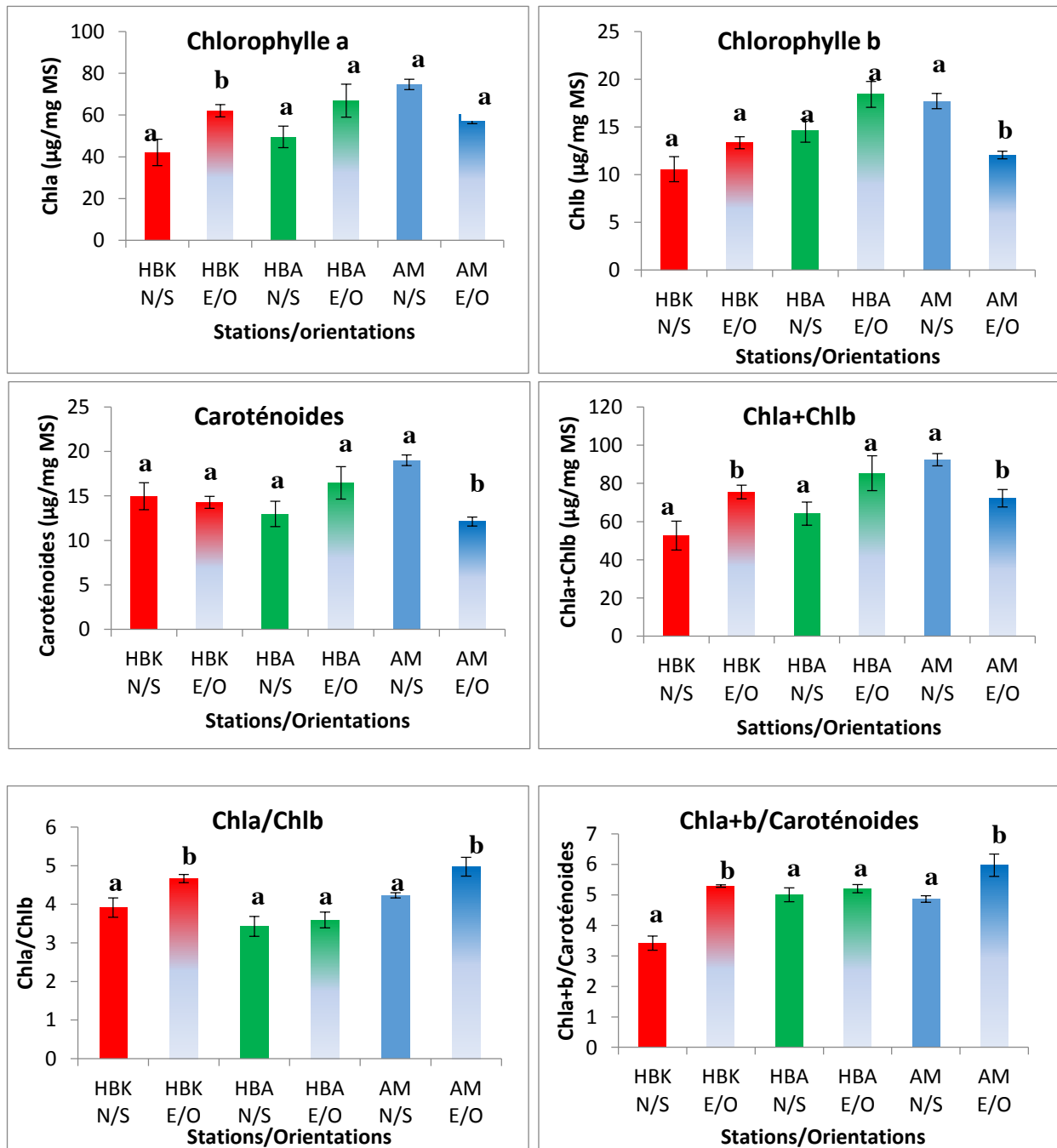


Figure 58 : Comparaison des teneurs moyennes en pigments dans les palmes des 3 stations d'échantillonnage entre les palmiers du nord et du sud à ceux de l'est et de l'ouest.

Les lettres (a, b et c) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétriques (Anova) soit non paramétriques (Kruskal-Wallis). Les tests ont été réalisés entre les données des palmiers situés au nord et au sud d'une part par rapport à ceux situés à l'est et à l'ouest d'autre part, au sein de chaque station. Les barres d'erreurs correspondent aux SEM calculés pour 15 échantillons avec 3 répétitions techniques pour chacun.

4.3. Bilan de l'analyse des palmes de la couronne 4

La comparaison des palmes des 3 stations a tout d'abord été réalisée au niveau des marqueurs métaboliques. Elle montre que seules les teneurs en chlorophylle a et b ainsi que leur rapport différencient les 3 stations (Tableau 17 et Figure 48). Les échantillons de Haoud Berkaoui (HBK) ont la teneur la plus faible. Les échantillons de Hassi Ben Abdallah (HBA) présente le rapport des chlorophylles le plus faible. En ce qui concerne les marqueurs de l'activité antioxydante, les activités des GPX et GR sont plus élevées dans les palmiers de HBK et AM (Ain Moussa). Le TEAC comme le MDA sont plus élevés dans la station AM. Les GST sont plus élevées pour HBA. Il est intéressant de relever que les palmiers de AM ont toujours les valeurs ou rapports les plus élevés sauf pour les GST.

Tableau 17 : Bilan des résultats significatifs obtenus par comparaison des marqueurs biologiques entre stations. - : valeur la plus faible obtenue, ++ et + : valeurs les plus fortes obtenues. Les lettres correspondent aux résultats des tests statistiques (Figure 48).

	HBK		HBA		AM	
Chlorophylles a + b	-	a	+	b	+	b
Chlorophylles a / b	+	a	-	b	+	a
TEAC	-	b	-	ab	+	a
GPX	+	a	-	b	+	a
GR	+	b	-	c	+	a
MDA	-	b	-	b	+	a
GST	+	b	++	c	-	a

En ce qui concerne les teneurs en HAP, elles sont les plus élevées pour HBA, pour les 3 HAP phénanthrène, fluoranthène et pyrène. Les résultats ne sont pas significativement différents malgré les écarts notables sur les moyennes. En effet, il existe une forte variabilité dans les teneurs en HAP qui peut s'expliquer par des dépôts plus ou moins aléatoires en fonction de l'environnement des palmes comme la superposition des palmes sur le palmier qui peuvent protéger plus ou moins les palmes contre les dépôts, l'effet du vent etc... Les palmes des deux stations, HBK et AM sont équivalentes sur le plan de la quantité de HAP.

La recherche de corrélations entre les valeurs des marqueurs métaboliques et les teneurs en HAP a montré des résultats significatifs seulement avec les teneurs en pigments. Par ailleurs, cela concerne uniquement les deux stations HBK et AM. On peut noter que les palmiers de ces deux stations semblent avoir un comportement similaire. Les palmiers de HBA se différencient de ceux des deux autres stations. Les marqueurs du stress oxydant n'expriment pas de différence pouvant être reliée aux teneurs en HAP pour les 3 stations étudiées.

Le vent étant un élément important pour la dispersion des polluants atmosphériques, l'impact de la position d'un palmier dans les palmeraies pour l'expression des marqueurs a été recherché. Pour les stations de HBK et AM, les données des palmiers localisés à l'est et l'ouest de la palmeraie ont le même comportement et se différencie de ceux localisés au sud et au nord de la palmeraie. Les teneurs en HAP sont significativement différentes entre les deux groupes de palmier. Sur le plan des marqueurs métaboliques, ce sont les chlorophylles qui les différencient. Ces deux palmeraies sont sous l'influence des rejets de torche. Par contre, les palmiers de HBA qui ne sont pas dans une zone où se trouve une torche et n'ont pas ce comportement malgré la teneur en HAP globalement plus élevée. L'effet des HAP semble donc induire un comportement différent suivant la source de la pollution.

4.4. Discussion

Cette partie avait comme objectif principal d'évaluer la variation et le comportement des marqueurs métaboliques d'une couronne de palmes (couronne 4) en fonction de leur teneur en HAP.

En ce qui concerne la teneur en pigments photosynthétiques, nous avons constaté une corrélation entre la teneur en pigments et en HAP pour les deux stations HBK et AM.

* pour la station HBK, seuls les teneurs en chlorophylles (Chla, Chlb et Chla+b) ainsi que le rapport chlorophylles/caroténoïdes présentent une corrélation significative avec la teneur en HAP (Tableau 16).

* la station AM présente une corrélation significative pour tous les pigments photosynthétiques (Chla, Chlb, caroténoïdes, Chla+Chlb, Chla/Chlb et Chla+Chlb/caroténoïdes), (Tableau 17). De plus, un des marqueurs du stress oxydant possède une corrélation significative avec les 3 HAP, la GR avec un r significatif de 0,53 à 0,6.

* pour la station HBA, aucune corrélation n'est significative entre les marqueurs du stress oxydant et la teneur en HAP.

L'impact ainsi observé sur les pigments est probablement lié à un effet des HAP principalement sur la photosynthèse. Les chlorophylles sont des pigments naturels de la végétation principalement présents dans les feuilles. La teneur en chlorophylles est une variable importante pour l'évaluation de l'état physiologique de la plante en tant qu'indicateur de la performance photosynthétique nécessaire pour la croissance et la survie de l'individu d'une part (Foyer *et al.*, 1982; Peng et Gitelson, 2012) et comme indicateur de mutations, de stress et de l'état nutritionnel du végétal d'autre part (Evans, 1989). Les caroténoïdes sont

aussi de bons indicateurs. Ce sont des précurseurs des molécules de signalisation qui influencent le développement de la plante et sa réponse aux stress biotiques et abiotiques (Vallabhaneni *et al.*, 2008).

Plusieurs études ont montré l'effet phytotoxique des HAP atmosphériques sur les plantes vasculaires avec des interférences sur les processus physiologiques et biochimiques telles que la perméabilité de la membrane, un dysfonctionnement enzymatique et photosynthétique. Cet effet se traduit généralement par une réduction de l'assimilation de carbone et par conséquent par une diminution du taux de la photosynthèse. Cette réduction d'assimilation carbonique par les végétaux exposés directement ou indirectement aux HAP peut s'expliquer par des dysfonctionnements au niveau des feuilles provoquant des perturbations de la photosynthèse due à l'accumulation des HAP dans les membranes des thylakoïdes, provoquant des changements dans les structures des chloroplastes et une inactivation réversible de la PSII (Desalme *et al.*, 2013; Mallakin *et al.*, 2002; Duxbury *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1997). Les HAP s'accumulent dans les membranes hydrophobes thylacoidiennes (Duxbury *et al.*, 1997). Ceci induirait des changements dans leur structure, provoquant ainsi des perturbations du transport des électrons (Aksmann et Tukaj, 2008; Kummerova *et al.*, 2008). Chez les plantes supérieures, l'exposition au phénanthrène et au pyrène provoque une diminution de la croissance et des teneurs en pigments photosynthétiques (Ahammed *et al.*, 2012). Les HAP provoquent aussi une perte de la concentration de pigments ainsi que le changement dans la composition des protéines et le rendement photosynthétique, tous ces processus étant inhibés par tous les types de HAP (Jajoo *et al.*, 2014). Les réponses des plantes aux HAP dépendent toutefois de l'intensité et la durée d'exposition à la pollution, du stade de développement de la plante et de la concentration du polluant (Wieczorek et Wieczorek, 2007).

Plusieurs marqueurs métaboliques en relation avec le stress oxydant et les GST impliquées dans la détoxification des HAP ont été suivis dans les palmes. En effet, la toxicité des HAP pourrait être fondée sur la formation intracellulaire de l'oxygène singulet et d'autres formes réactives intermédiaires des ROS qui conduisent à des dommages biologiques (Eisenberg et Cunningham, 1985 ; El-Alawi *et al.*, 2002). Desalme (2011) a constaté que les dommages cellulaires induits par les HAP atmosphériques pourraient être en rapport avec l'induction d'un stress oxydatif dans les cellules. Cette induction pourrait avoir endommagé les structures membranaires, notamment par la peroxydation des lipides membranaires.

L'altération des membranes chloroplastiques pourrait en outre être l'origine de la diminution des teneurs en chlorophylles chez le trèfle décrites ci-dessus (Desalme, 2011).

Nos résultats montrent que les marqueurs du stress oxydant ainsi que les GST ne présentent aucune corrélation significative avec la teneur des palmes en HAP pour les 3 stations d'échantillonnage. Seule, la GR donne une corrélation de 0,56 pour la station AM avec les 3 HAP. La glutathion réductase (GR) est l'un des éléments clés du système de piégeage des ROS dans les cellules et leurs produits de réaction chez les plantes (Creissen *et al.*, 1994; Gill et Tuteja, 2010). La GR joue un rôle clé dans le maintien du bon fonctionnement et pour prévenir le stress oxydant dans les cellules. Elle peut agir comme un piègeur de radicaux hydroxyle et d'oxygène singulet. Elle réduit la forme oxydée de glutathion ce qui permet de réduire aussi H₂O₂. En outre, elle joue un rôle essentiel dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques et agit comme un cofacteur pour certaines enzymes détoxifiantes. Elle participe au transport et régénère les antioxydants et leurs formes réactives (Deponce, 2013 ; Stephanssen *et al.*, 2002).

Les effets toxiques des polluants dépendent souvent de leur capacité à augmenter les niveaux cellulaires d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cela peut se produire par l'activation directe des processus qui conduisent à leur synthèse ou agir indirectement sur les enzymes (notamment SOD, CAT, GSH...) tout en diminuant ainsi les défenses cellulaires. En effet, le métabolisme de base est lui-même générateur de ROS (Figure 59). Un équilibre existe donc. Lorsque les niveaux de production des ROS dépassent les défenses antioxydantes, les cellules subissent un stress oxydant, qui provoque entre autres, la peroxydation lipidique membranaire (Viarengo, 1989). La production de formes réactives de l'oxygène (ROS) est une réponse cellulaire commune à de nombreux stress chez les végétaux (Dat *et al.*, 2000; Van Breusegem et Dat, 2006).

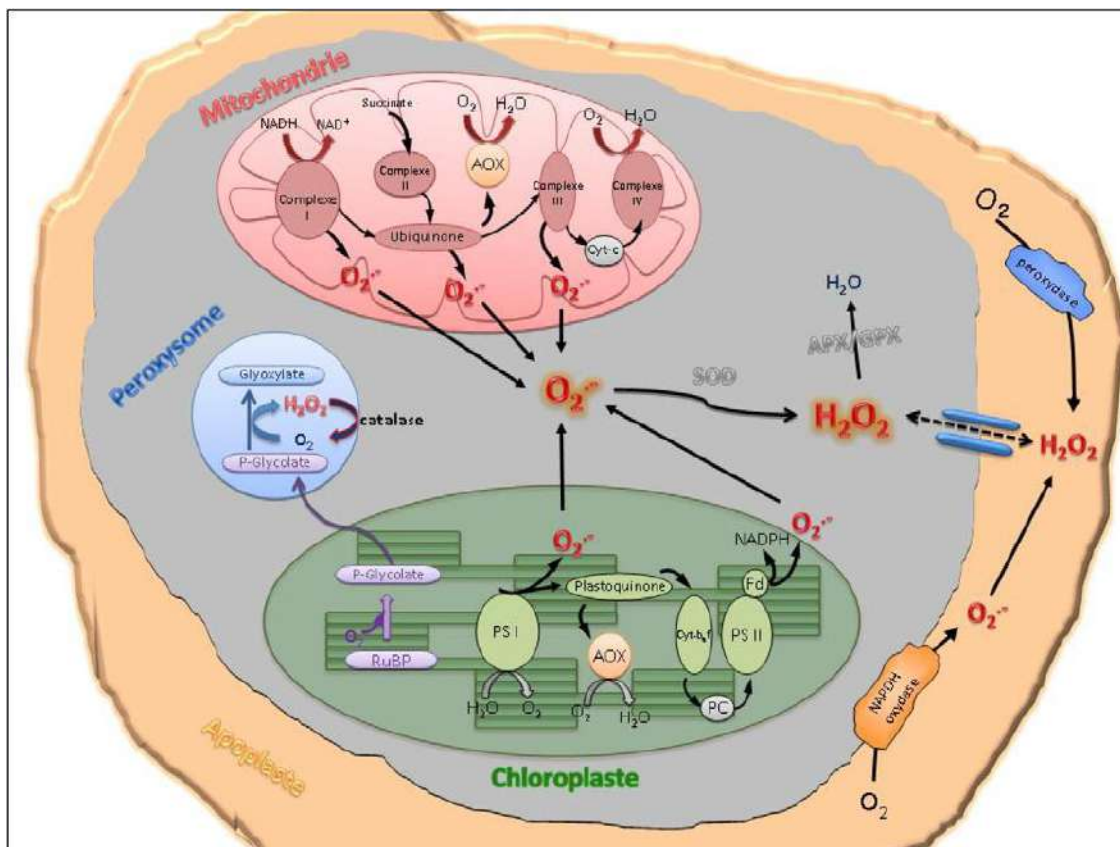


Figure 59 : Sites de production des formes réactives de l'oxygène (ROS) intra-organites dans la cellule végétale (Parent *et al.*, 2008).

L'impact de la forme physique des HAP atmosphériques sur le végétal a fait le sujet de plusieurs études car leur partition gaz/particule conditionnerait leur localisation dans les feuilles (Simonich, 1994; Kipopoulou *et al.*, 1999; McLachlan, 1999; Yang et Zhu, 2007), (Figure 64). Ces travaux ont montré que les HAP gazeux sont capables de pénétrer dans les tissus internes des feuilles tandis que les HAP particulaires restent généralement sur la cuticule. Cette distinction entre les HAP absorbés dans la feuille et ceux adsorbés à la cuticule est importante puisqu'elle conditionne leur devenir. La fraction des HAP déposée sur la cuticule est mobile car cette couche est sensible à l'altération (Howsam *et al.*, 2000; McLachlan, 1999). En conséquence, les HAP adsorbés à la cuticule peuvent être transférés au sol par lessivage.

Dans la partie la plus basse de l'atmosphère appelée la troposphère, les HAP sont soumis à différentes réactions photochimiques de dissipation, de dégradation et de transformations. Les HAP particulaires sont soumis à la photolyse qui constitue le processus de dissipation auquel les HAP gazeux semblent insensibles (Arey et Atkinson, 2003). Ensuite, la localisation des dépôts varie selon la distance à la source. Les HAP gazeux sont plus

susceptibles de subir un transport à très longue distance et d'être retrouvés dans les sites éloignés de toute source d'émission, tandis que les HAP particulaires restent plus près des sources (Nam *et al.*, 2008).

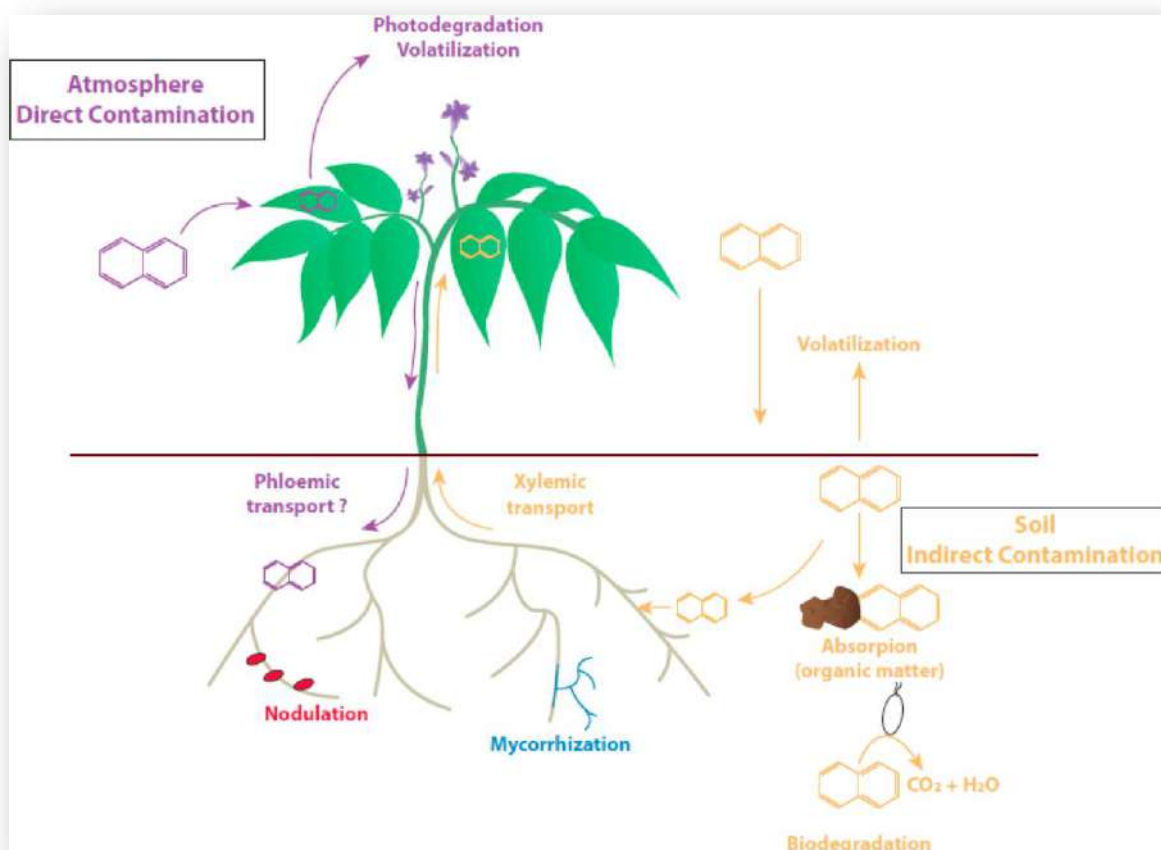


Figure 60 : Voies d'exposition aux HAP des plantes vasculaires in situ (Desalme *et al.*, 2013).

Les résultats du tableau 18, permettent de comparer les teneurs en HAP trouvées dans les palmes par rapport à ce qui a été décrit chez d'autres végétaux, Le rapport fluoranthène sur fluoranthène plus pyrène permet d'avoir des informations sur l'origine des HAP mesurés dans les feuilles. L'origine des hydrocarbures est la même pour les 3 stations à savoir une origine de combustion incomplète dans les moteurs de véhicules et une combustion de pétrole brut par les gaz des torchères. En effet le rapport est entre 0,4 et 0,5 ce qui indique une double origine.

Les teneurs trouvées dans les palmes dans ce travail sont dans du même ordre de grandeur que celles répertoriées dans d'autres espèces. Pour le phénanthrène, elles sont identiques à celle mesurée au Koweït dans la même espèce.

Tableau 18 : Comparaison des teneurs en 3 HAP majeures de différentes plantes provenant de différents milieux. Les HAP sont exprimés en ng/g MS. Le rapport Flu/(Flu+Pyr) indique la source de la pollution selon (Yunker *et al.*, 2002)

si < 0.4 l'origine est pétrogénique , si 0.4-0.5 l'origine est combustible (véhicules et pétrole brut), si > 0.5 l'origine est biomasse et la combustion du charbon.

Espèce	Localisation	Phénanthrène	Fluoranthène	Pyrène	Flu/(Flu+Pyr)	Références
Newboulda laevis (1)	Olomoro (Nigeria)	207	196	125	0,61	Sojinu <i>et al.</i> , 2010
Citrullus colocynthis		113	26	31	0,46	
Nephrolepsis bisserata		63	16	17	0,48	
Newboulda laevis (2)		36	28	55	0,34	
Manihot esculenta		104	40	79	0,34	
Pennisetum purpureum(1)		255	156	266	0,37	
Mangifera indica		99	34	40	0,46	
Pennisetum perpureum(2)		62	10	12	0,45	
Mimosa pudica		51	16	21.57		
Pennisetum pupereum(3)		193	54	40	0,57	
15 Échantillons de végétation		Tarragone (Espagne)	41	18.37	14.9	
Chêne, frêne et noisetier (Arbres à feuilles caduques)	Royaume Uni	1.9	9.1	10.3	0.47	Howsam <i>et al.</i> , 2000
		1.6	5.6	18.5	2.23	
		3	19.1	42.4	0.31	
Pin <i>Pinus nigra</i> (cires)	Cologne (Allemagne)	47	22	13	0,63	Lehndorff et Schwark 2004
Aiguille de pin (<i>Pinus pinea</i> L.)	Costa Nova (Portugal)	7.34	1.31	0.86	0.60	Ratola <i>et al.</i> , 2006
	Cerveira (Portugal)	11.60	3.77	3.98	0.49	
	Barcelone	20.42	8.40	9.13	0.48	
	Porto (Portugal)	102.91	42.85	37.11	0.53	
Lichens (<i>Parmotrema hypoleucinum</i>)	Portugal	50.8	37.3	32	0.54	Augusto <i>et al.</i> , 2010
Aiguille de pin (<i>Pinus pinea</i> L.)		47.4	17.4	14	0.55	
Palmier dattier (<i>Phoenix dactylifera</i> L.) Notre étude	Ain Moussa (AM)	20,91	18,42	20,06	0,48	Notre étude [2012-2013]
	Haoud Berkaoui (HBK)	18,49	15,58	18,22	0,46	
	Hassi Ben Abdellah (HBA)	29,88	24,98	27,01	0,48	
Palmier dattier	Koweït	26.4	//	//		Al-Omair et Helaleh 2004

Dans notre étude, il n'a pas été possible de lier les marqueurs biologiques aux teneurs en HAP même si des différences entre populations sont observables. On peut toutefois noter que pour les palmiers de HBA qui est une station non soumise à l'influence des torches, les activités de la GR et de la GPX sont nettement plus faibles que dans les deux autres stations. Ces deux enzymes sont donc les seuls marqueurs biologiques différenciant HBA des deux autres stations.

Toutefois, le comportement différent des marqueurs pour Haoud Berkaoui (HBK) et Ain Moussa (AM) d'une part et pour Hassi Ben Abdallah (HBA) d'autre part nous conduit à supposer que cela est en lien avec la pollution par les gaz des torches. En effet, HBK et AM sont sous l'influence des torches. HBA en est éloignée mais par contre, elle est sujette à la pollution par la circulation automobile. Les torches émettent dans l'atmosphère les HAP surtout sous forme gazeuse et traverserait plus facilement les cires épicuticulaires. Le trafic routier émet une pollution particulaire qui se déposerait en surface des palmes et serait éliminé par les pluies. Les HAP que nous avons quantifiées sont à la fois ceux présents dans la feuille et sur la feuille.

De plus, les stations de HBK et AM se différencient de HBA au niveau de l'importance de la position des palmiers dans la station sur les teneurs en pigments. Pour HBA, il n'y a aucune différence entre palmiers. Pour les deux autres, il y a une différence nette suivant les axes : nord-sud versus est-ouest. Les vents dominants dans la wilaya de Ouargla étant orientés est-nord/est, une pollution directement due aux torches semblent être en cause. Il y aurait ainsi des dépôts de HAP plus prononcés sur le trajet du vent lorsque les torches sont en fonction. Pour HBA en dehors de la zone de torche, ce phénomène n'a pas été retrouvé.

Le devenir des HAP dans les tissus foliaires varie beaucoup selon la localisation des études et les espèces végétales prélevées. Les HAP peuvent être retrouvés majoritairement dans la cuticule, comme c'est le cas dans les feuilles des 6 espèces d'arbres collectés dans la région de Pékin (Chine) (Wang *et al.*, 2008), ou au contraire dans les tissus internes, comme dans les feuilles de maïs récupérés dans un site rural près de Bayreuth (Allemagne) (Kaupp *et al.*, 2000). Il était donc intéressant d'évaluer l'importance de la pénétration des HAP dans les cires épicuticulaires du palmier dattier. Un dernier point de ce travail a donc porté sur les cires épicuticulaires et la recherche de HAP dans ces cires.

5. Dépôts des HAP sur les palmes

En raison de leur caractère lipophile, les HAP peuvent s'accumuler dans la couche lipidique des membranes des plantes. Il était donc intéressant dans le contexte de ce travail de les rechercher dans la cuticule des palmes. Par ailleurs, la structure et la composition chimique de la cuticule ne sont pas connues chez le palmier dattier. Nous avons donc choisi de nous intéresser à la cuticule des palmes pour tenter d'évaluer l'importance de la pénétration des HAP. L'étude a été restreinte aux cires épicuticulaires qui constituent la couche superficielle de la cuticule. Elles sont, en effet, plus accessibles pour les analyses et peuvent être plus facilement extraites de la feuille sans entraîner les lipides constitutifs des parenchymes. Par ailleurs, ce sont ces cires épicuticulaires qui sont observables en microscopie électronique à balayage.

Dans cette partie, nous décrirons donc la structure des cires épicuticulaires observées en microscopie électronique à balayage. Nous analyserons leur composition chimique à partir des données obtenues par GC-MS. Enfin, nous quantifierons la teneur en HAP dans ces cires.

Nous avons choisi deux sites pour comparer les cires des palmiers. Le premier est la palmeraie de Hassi Ben Abdallah (HBA) éloignée des torches mais comme nous l'avons vu proche d'un axe routier. Le second situé à Hassi Messaoud (HMD), avait été choisi car la ville de Hassi Messaoud est située dans le plus grand champ pétrolier de l'Algérie. Elle est régulièrement recouverte des fumées noires des torchères qui l'entourent. Trois palmes ont été récoltées dans chaque station pour l'extraction des cires.

5.1. Structures épicuticulaires des palmes

Les observations des surfaces des feuilles du palmier dattier au microscope électronique à balayage (MEB), nous permettent d'avoir une vue d'ensemble des cires de cette espèce avec ses différentes structures et l'importance de la couche protectrice. Ces cires cuticulaires constituant ce que l'on appelle aussi la pruine ont été observées à la fois dans des feuilles récemment développées mais aussi après abrasion sous l'effet de stress physiques.

Le premier point qui a été relevé lors de ces observations est qu'il n'y a pas de différences entre les cires des faces abaxiale et adaxiale. Toutefois la structure des cires épicuticulaires est modifiée au cours du temps (Figure 61 A à D). Sur les feuilles de l'année (environ 6 mois), l'épiderme est recouvert par une première couche protectrice, visible au niveau de la coupe transversale (Figure 61 A). C'est une croûte homogène de 4 à 5 nm d'épaisseur. Celle-ci est recouverte par une seconde couche continue de 2 à 4 nm d'épaisseur.

Cette dernière donne naissance à des structures cristalloïdes à la surface de la palme. Elles sont de deux types. Les plus présentes sont des structures verticales sous forme de bâtonnets de forme polygonale, présentant un axe longitudinal et qui ont tendance à se courber. Ils sont de longueur variable, de 5 à 25 nm. Les secondes structures sont des plaquettes de forme aplaties reliées à la croûte par leur côté étroit, par des angles différents. Autour des stomates, les bâtonnets forment une couche homogène et condensée, protégeant ainsi l'ouverture des stomates. Les stomates sont observables dans les dépressions bien gardées par ces cires.

Au niveau des feuilles plus âgées (5 ans), sous l'effet de l'érosion seule la première croûte au-dessus de l'épiderme reste présente. Des traces de frottements sont observables.

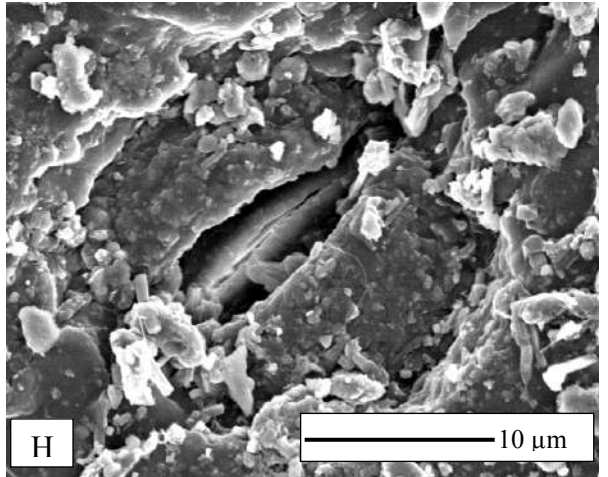
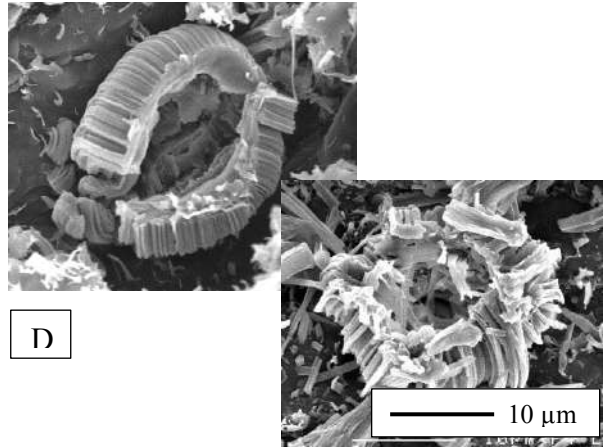
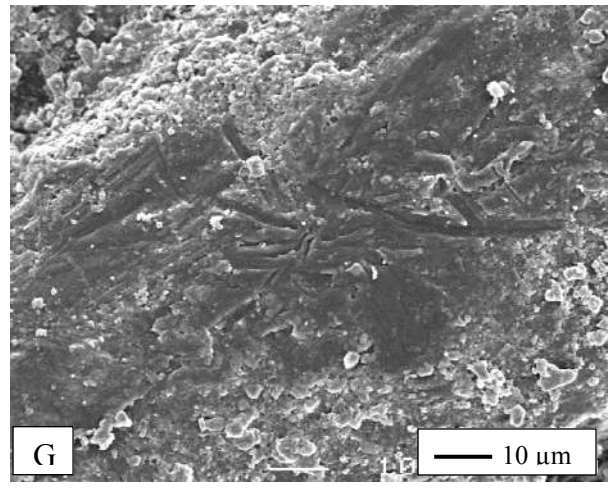
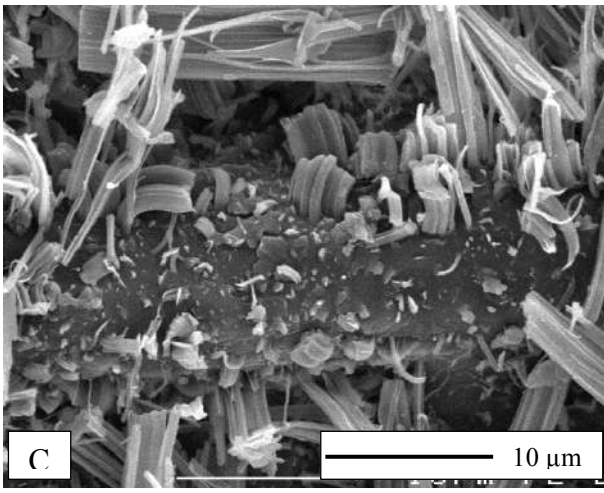
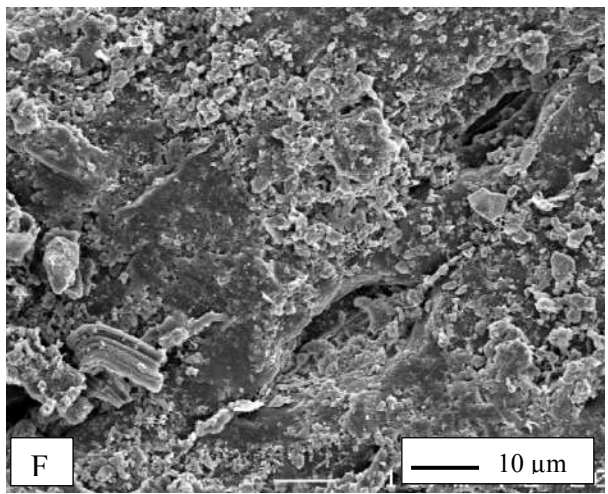
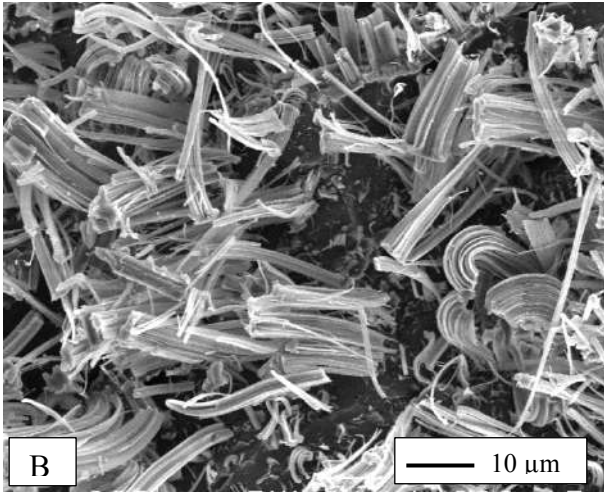
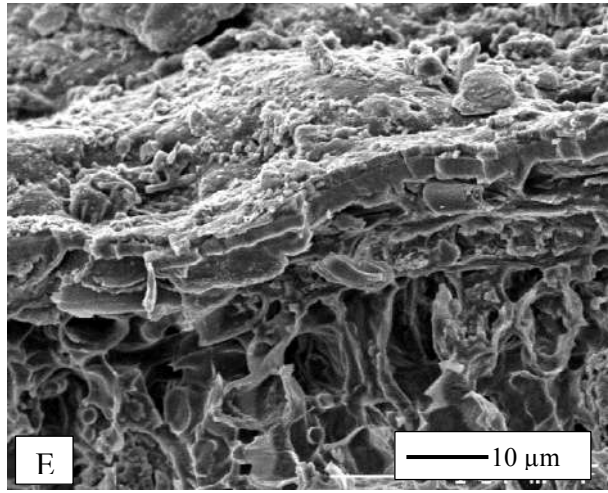
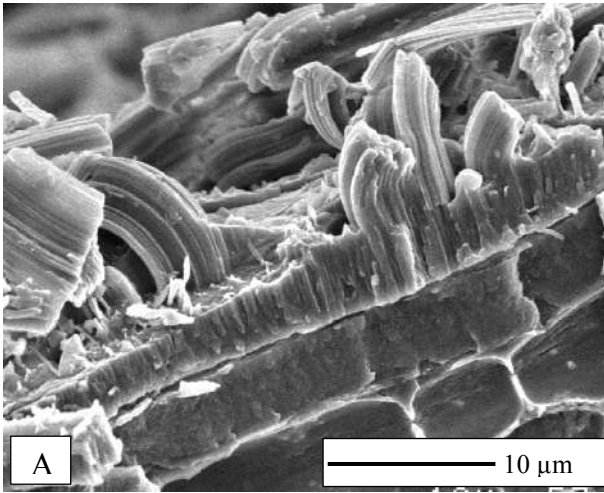


Figure 61: Structures de cire épicuticulaires de palmier dattier feuille. A à D- Feuille de six mois; E à H- Feuille de 5 ans.

A- Coupe montrant la croûte au-dessus de l'épiderme et les structures épicuticulaires en bâtonnet; B: bâtonnets; C: plaquettes et bâtonnets ;

E: Coupe montrant la disparition des structures en bâtonnets et l'érosion en surface de la croûte, F et G: croûte montrant des traces de frottement ;

D et H, Structure des cires au niveau des stomates D- stomates sur de jeunes feuilles, entourés par des bâtonnets rassemblés pour former un anneau ; H- un stomate enfoncé dans la cuticule, les bâtonnets ont disparu.

Plusieurs débris de cire sont présents sur les feuilles de 5 ans (Figure 61 E à H). Les bâtonnets de cire ne sont plus présents que, autour de certains stomates et dans les replis de la palme. On peut noter que les stomates sont beaucoup plus exposés aux conditions atmosphériques extérieures sur ces feuilles.

La structure érodée des feuilles de palmier dattier pourraient être dues à plusieurs causes. Une première cause serait relative aux frottements des palmes entre elles. De structure très rigide et riche en silice, elles sont, en effet, très abrasives. La seconde serait liée à la forte abrasion par le sable et tout particulièrement, lors des périodes de vents de sable qui ont lieu de février à mars. Enfin, la présence de dépôts de cristaux de sels sur les palmes pourrait contribuer à l'agression des structures des cires épicuticulaires. En effet, nous avons trouvé des cristaux de sels sur certaines feuilles (Figure 62).

Ces structures d'origine minérale ont été observées en utilisant les électrons rétrodiffusés. Ce mode d'observation met en évidence par leur surbrillance les cristaux d'origine minérale qui se différencient bien des structures organiques de l'échantillon. L'image obtenue est comparable à celle due à un éclairage rasant.

De plus, l'analyse sur un second microscope couplé au système EDS (Spectrométrie en énergie « Energy dispersive spectrometry ») a par ailleurs, permis d'identifier les atomes constitutifs de ces cristaux qui sont de l'oxygène, du soufre, du calcium. Ce sont des cristaux de sulfate de calcium.

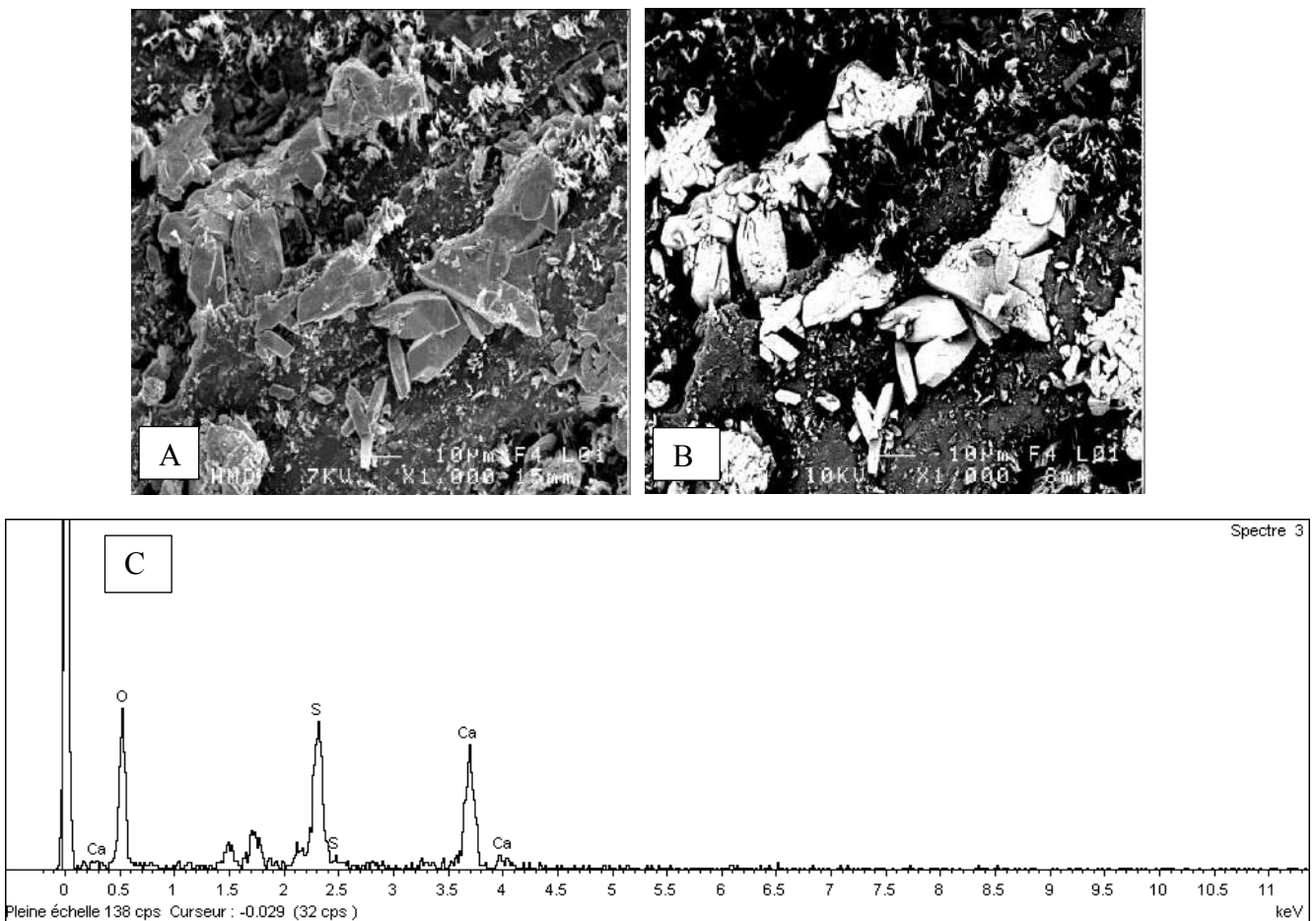


Figure 62 : Identification du contenu de cristaux observés sur les feuilles les plus âgées de Hassi Messaoud en microscopie électronique à balayage.

A : cristaux observés en mode normal; B : cristaux mis en surbrillance par l'observation avec les électrons rétrodiffusés ; C : exemple d'un spectre d'énergie obtenu avec le couplage EDS.

5.2. Composition chimique des cires épicuticulaires

La composition des cires est importante pour comprendre la pénétration des contaminants à travers cette couche protectrice. Ici, les cires des faces abaxiale et adaxiale ont été extraites ensemble sans faire de distinction.

L'extraction des cires épicuticulaires et HAP a été réalisée en deux temps avec des solvants de polarité croissante afin d'extraire toutes les molécules (dichlorométhane puis méthanol). Les extraits obtenus ont été analysés séparément. Toutefois, leur composition s'étant révélée similaire, les résultats ont été rassemblés. La fraction aliphatique comporte

uniquement des alcanes. La fraction polaire rassemble plusieurs types de molécules des classes suivantes : cétones, alcools gras, acides gras, stérols et terpènes.

La charge totale des cires des palmes est de $4761,7 \text{ ng.cm}^{-2}$ (Tableau 19, Figure 63). Les alcanes représentent la fraction la plus importante des composés identifiés avec 65,26%, tandis que la fraction polaire fait 35,018% du total (Figure 62). Les terpènes et les acides gras représentent la majeure partie des composés polaires (13,785 et 12,657%). Les stérols (5,812%), les alcools gras (1,657%) et les cétones (1,107%) sont ceux en plus faible concentration.

Tableau 19: Composants des cires du palmier dattier déterminés par GC-MS. Les données correspondent à une moyenne calculée après extraction de six palmes.

Composés	Moyenne (ng.cm^{-2})	SEM	% du total
Fraction Aliphatique			
Alcanes	3094,3	463,7	65,3
Fraction Polaire			
Cétones	52,698	3,780	1,107
Alcools gras	78,887	9,311	1,657
Stérols	276,750	36,37	5,812
		4	
<i>Cholestérol</i>	36,683	4,203	0,770
<i>Sitostérol</i>	240,067	33,662	5,042
Acides gras	602,667	45,43	12,657
		7	
Terpènes	656,418	71,09	13,785
		0	
<i>Acide ursolique</i>	315,190	76,026	6,619
<i>Bétuline</i>	341,228	41,044	7,166
Total composition cires	4761,715	496,7	100,284
		61	

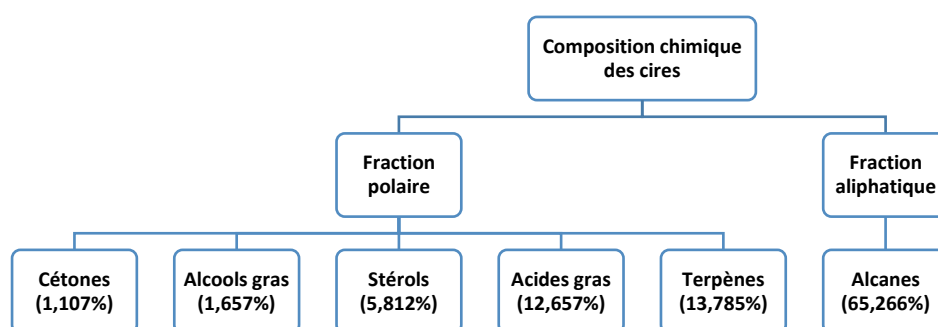


Figure 63: La composition chimique des cires du palmier dattier en % du total des cires.

Sur la base de leur teneur, l'ordre de classement des composants des cires du palmier dattier sont : Alcanes>Terpènes>Acides gras>Stérols>Alcools gras>Cétones.

Sur le total du pourcentage des alcanes (65,26%), le minimum est présenté par le n-Hexadecane C16 avec un taux de 0,008% de la fraction (alcanes) et un maximum de 24,3% de la fraction présenté par le n-Hentriacontane C31 (Figure 64). Pour les terpènes qui sont présenté par un taux de 13,78%, les deux triterpènes trouvés au niveau des cires du palmier dattier, sont l'acide ursolique avec 48,02% et la bétuline avec 51,98% de la fraction.

En ce qui concerne les acides gras (12,66% du total des cires), l'acide hexadécénoïque ou palmitoléique monoinsaturé (C16 :1) est le plus faiblement présent (1,40% du total des acides gras). Par contre, l'acide palmitique (C16 :0), est le plus présent avec 9,37% de la fraction. Les deux stérols présents dans les extraits de cires du palmier dattier sont le cholestérol avec un taux de 13,25% et le sitostérol avec un taux plus élevé qui est de 86,75% du total des stérols (Tableau 19).

En ce qui concerne les alcools aliphatiques ou gras, l'alcool en C22 (Docosanol) est majoritaire (12,2% du total de la fraction) et le C13 le moins présent (Figure 64). Pour les cétones qui constituent 1,11% du total des composés des cires, l'erucyl amide fait, le moins présent, fait 3,7% du total des cétones. Le cétone majoritaire en C23 fait 17,5%.

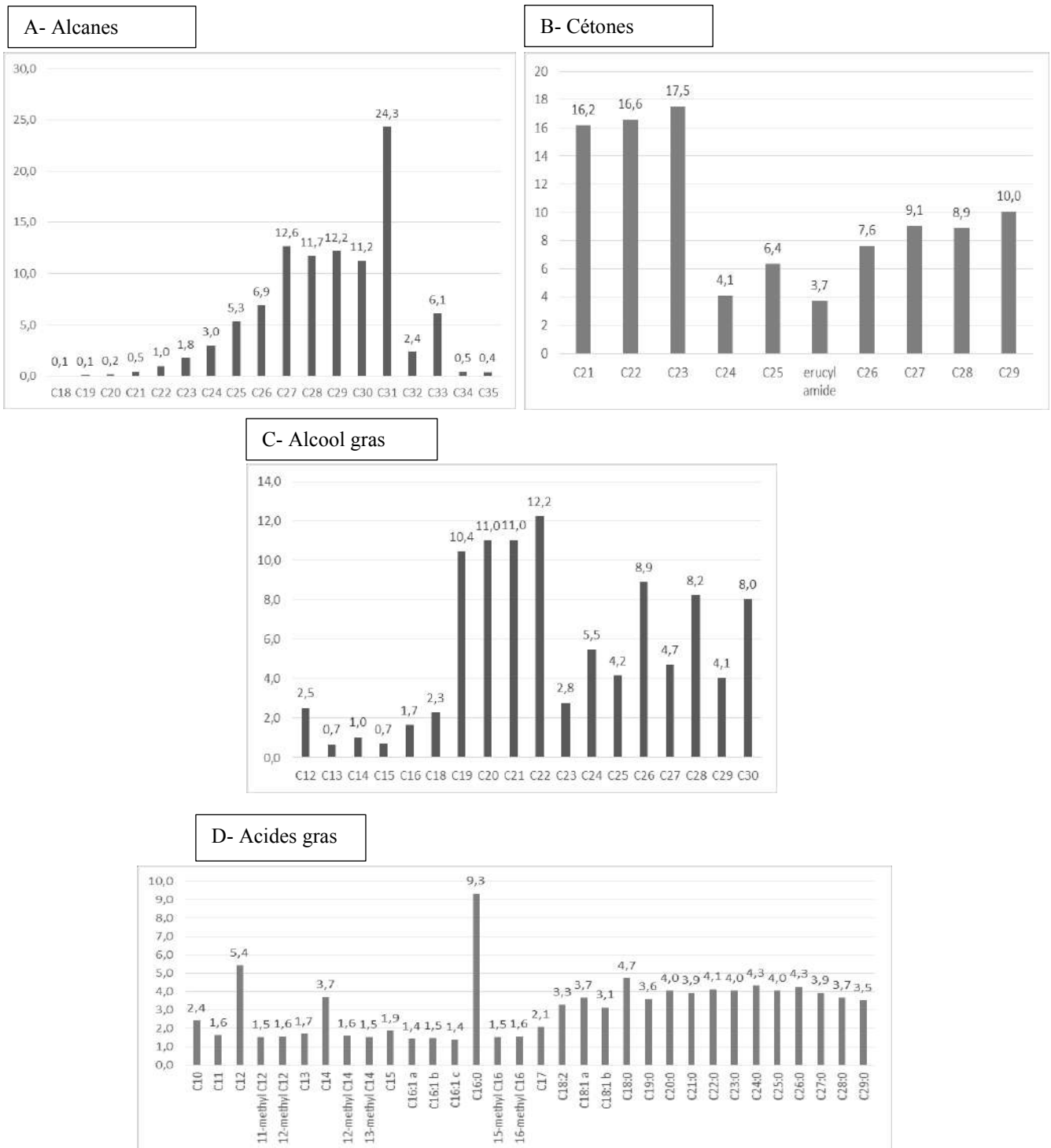


Figure 64: Les composants des cires épicuticulaires du palmier dattier. Les teneurs sont exprimées en pourcentage du total de la fraction.

5.3. Structures organiques observées sur les palmes

Une fois caractérisées les cires épicuticulaires, nous avons recherché la présence de HAP sur les palmes. En effet, l'observation en microscopie électronique à balayage a montré la présence de structure de type organique. Ces formes ont l'aspect d'un film couvrant une

partie de la surface de la feuille (Figure 65). Elles donnent l'aspect qu'aurait une gouttelette d'huile après dessèchement.

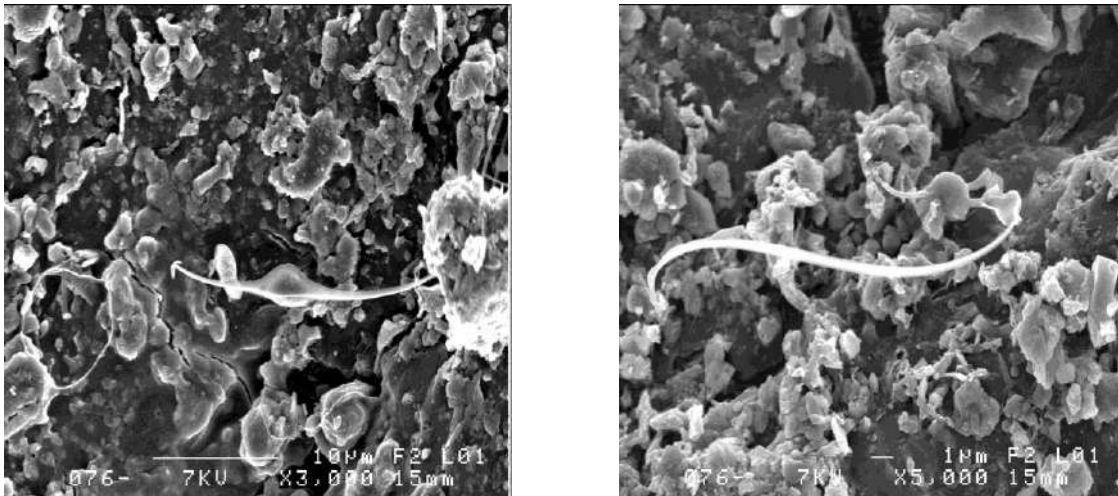


Figure 65: Observation en microscopie électronique à balayage (MEB) de formes d'origine organique à la surface des feuilles du palmier dattier au grossissement.

Pour tester cette hypothèse, nous avons mené des essais de pulvérisations de pétrole brut en suspension dans de l'eau sur la surface de palmes pour reproduire ce qui pourrait se passer dans la nature, sachant que les hydrocarbures présents dans l'atmosphère ont une composition différente du pétrole brut. Après pulvérisation, les feuilles ont été laissées à sécher sous la hotte à l'air libre. Elles ont ensuite été lyophilisées pour rester dans les mêmes conditions d'observation que les précédentes. L'utilisation de pétrole brut a montré des dépôts épais sur les feuilles, certainement plus épais que ce qui se passe dans la nature (Figure 66 A et B). Toutefois, le rendu par la diffusion des électrons montre des formes arrondies comme celles observées figure 65. Un dépôt de pétrole directement sur une lame de microscope donne des formes similaires (Figure 66C).

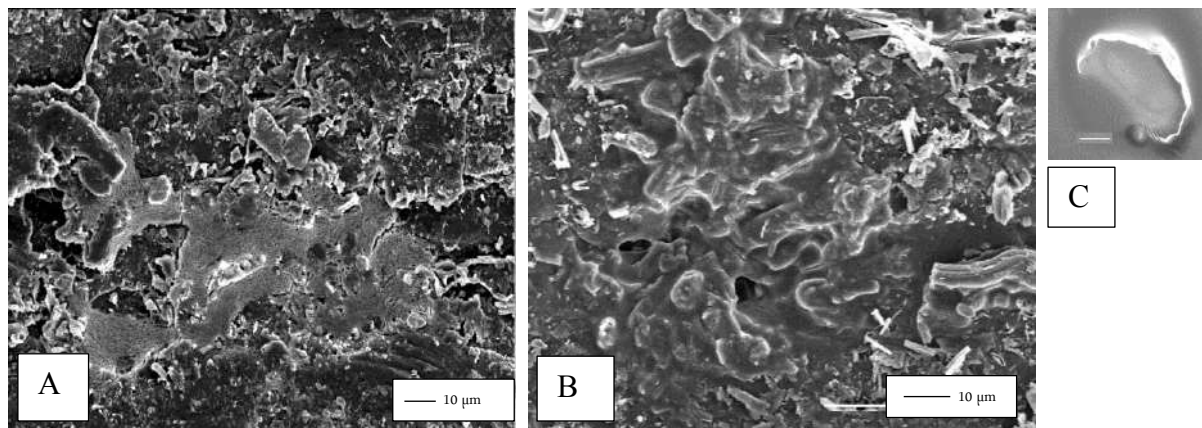


Figure 66: Observation des palmes après pulvérisation de pétrole brut en suspension dans de l'eau. A et B : deux exemples d'observation, C : dépôt de pétrole brut puis séchage sur une lame de microscope.

5.4. Recherche des HAP dans les cires épicuticulaires

Les 3 HAP identifiés jusqu'à présent dans les palmes ont également été retrouvées dans les cires épicuticulaires (phénanthrène, fluoranthène et pyrène). Elles sont présentes dans les deux extraits (dichlorométhane et méthanol) mais en plus forte quantité dans l'extrait au dichlorométhane. Les teneurs varient entre 25 et 9,9 ng.g^{-1} pour HMD et 33,6 et 8,7 ng.g^{-1} pour HBA. Les extraits au méthanol contiennent moins de HAP, entre 8,2 et 3,7 ng.g^{-1} pour HMD et entre 15,7 et 1,7 ng.g^{-1} pour HBA. Pour la suite de l'étude, les deux extraits ne présentant pas de différence de composition, ils ont été rassemblés (Figure 67).

Les valeurs moyennes en phénanthrène sont légèrement plus importantes dans les cires des palmes de HBA (33,5 ng.g^{-1}) que dans celle de HMD. Toutefois, la différence n'est pas significative. Pour le fluoranthène comme le pyrène, les teneurs sont similaires. Au niveau de la teneur totale moyenne en HAP, elle est de 66,2 ng.g^{-1} pour les cires épicuticulaires de HMD et de 72,9 ng.g^{-1} HBA. Les différences ne sont pas significatives.

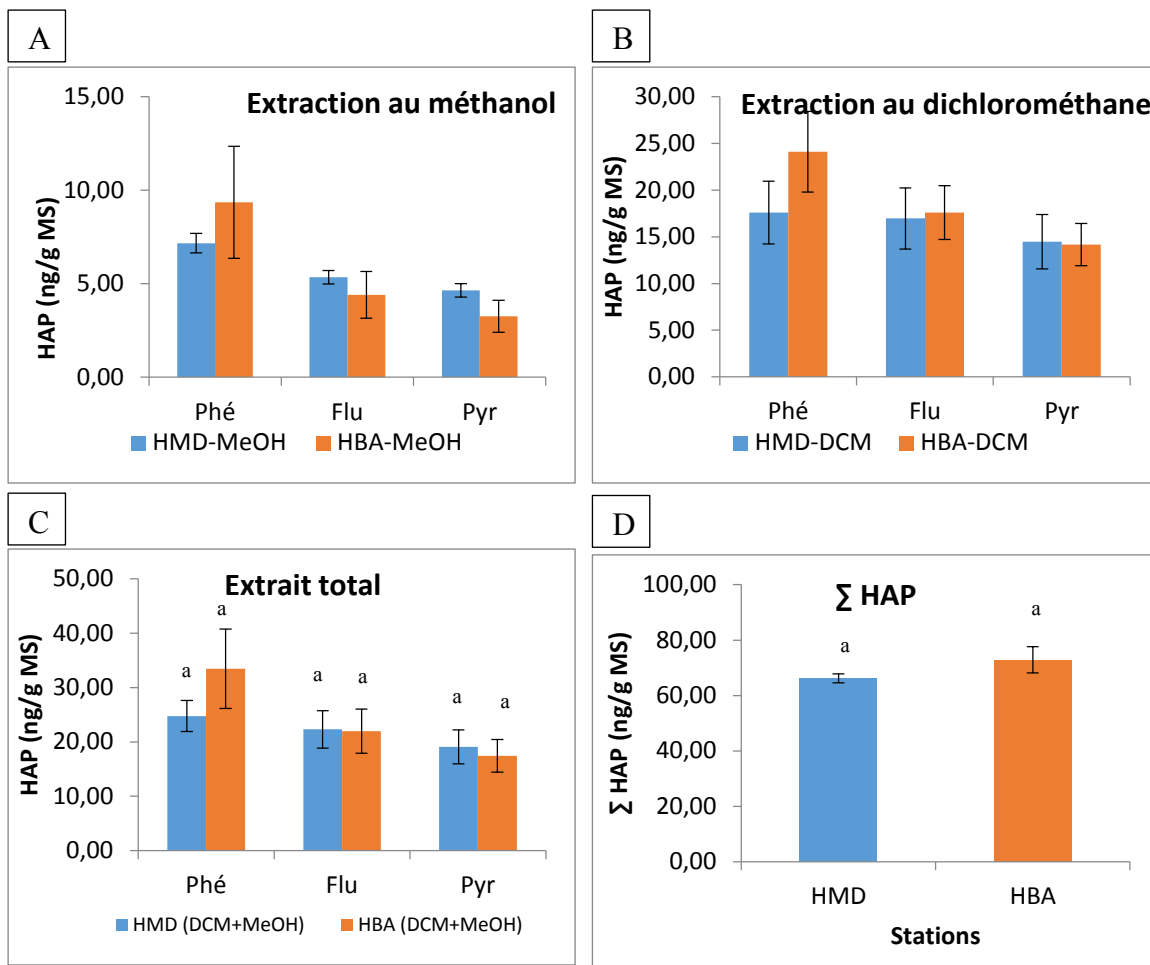


Figure 67 : Teneur des cires épicuticulaires en HAP. A : extrait obtenu avec le dichlorométhane (DCM), B : extrait obtenu avec le méthanol (MeOH), C : HAP totaux (total des deux extraits), D : teneur totale en HAP pour les deux stations. Phé : phénanthrène, Flu : fluoranthène, Pyr : Pyrène.

Les lettres (a) correspondent aux résultats des tests statistiques soit paramétriques (Anova) soit non paramétriques (Kruskal-Wallis) réalisés pour comparer les teneurs d'un HAP entre les deux stations. Les barres d'erreurs correspondent aux SEM calculés pour les 3 extraits réalisés dans la même station.

5.5. Discussion

L'examen des surfaces foliaires du palmier dattier, en microscopie électronique à balayage, a permis de montrer l'existence de deux types de cires. Une croûte épaisse de 5 nm contribue certainement à la protection contre la transpiration intense chez une plante soumise à une forte luminosité et à une chaleur exceptionnelle ainsi qu'à de multiples de stress (UV, hydrique et salin notamment). Au-dessus de cette croûte, des structures verticales de 5 à 25 nm de longueur représentent la forme principale des cires épicuticulaires du palmier dattier. Il s'agit de cristoïdes en forme de bâtonnets qui peuvent s'agréger longitudinalement.

Les couches de cires recouvrant les cellules épidermiques empêche la déshydratation des tissus (Kim *et al.*, 2007 ; Koch *et al.*, 2009a). Ainsi, l'évaporation de l'eau à travers la cuticule est réduite. Elle se produit uniquement à travers les stomates, souvent en nombre réduit et protégées au fond d'un puits par les cires épicuticulaires. Il y a ainsi réduction de la turbulence de l'air au-dessus des cellules de garde et donc de la transpiration. On associe généralement un stress hydrique à la présence d'une cuticule conséquente (Kim *et al.*, 2007). Même si ce n'est pas toujours strictement le cas, la présence d'une pruine cuticulaire est globalement une réponse des plantes relativement universelle de tolérance au stress hydrique au même titre que la présence de nombreux poils (Koch *et al.*, 2009).

Par ailleurs, les cires permettent aussi de réfléchir la lumière, réduisant ainsi la température des surfaces foliaires. Cette propriété éviterait que sous l'effet d'une luminosité importante, la photosynthèse ne soit réduite chez les plantes de milieu désertique. En effet, en milieu tempéré, une forte intensité lumineuse provoque une chute de l'activité photosynthétique ce qui n'est pas le cas en milieu désertique (Koch *et al.*, 2009). Les cires réfléchissent donc une bonne partie de lumière visible mais aussi des UV. Scriber et Riederer (1996) ont montré que la perméabilité cuticulaire est réduite chez les plantes de milieux secs.

Au niveau des feuilles âgées, les cires épicuticulaires sont endommagées par l'effet de l'érosion par des phénomènes d'abrasion due au frottement entre les feuilles, à l'effet du vent et des particules de sable ainsi qu'à la présence de sels. L'effet de l'abrasion provoque l'érosion des cires épicuticulaires et des changements au niveau de leur structures (Pitcairn *et al.*, 1986; Van Gardingen *et al.*, 1991). Ces changements structurels dans les cires ont un impact sur les propriétés de la feuille comme une plus grande perméabilité de la cuticule et la perte d'eau.

La composition de cires cuticulaires des plantes a beaucoup été étudiée en utilisant une extraction superficielle de la matière végétale intacte avec des solvants organiques (Jetter *et al.*, 2006). Les extraits de cires sont connus pour leur composition en composés aliphatiques à très longue chaîne, acides gras, aldéhydes, alcools primaires et secondaires, cétones et alcanes de chaîne de longueur C₂₀-C₃₆ ainsi que C₃₈-C₇₀ esters d'alkyle (Jetter *et al.*, 2006). Des composés comme les polysaccharides ou des composés phénoliques peuvent également être présents dans la cuticule (Chantier et Samel, 1998).

Nos résultats montrent que la composition chimique des cires épicuticulaires du palmier dattier présentent une dominance de la fraction aliphatique surtout les alcanes (65,26% du total). Nos résultats sont en accord avec ceux de Kim *et al.* (2007) et Koch *et al.*

(2008 ; 2009b) qui ont montré aussi que les cires des plantes sont constituées de composés organiques en mélange dont la composition varie en fonction des espèces. Elles sont constituées majoritairement de chaînes aliphatiques, surtout des alcanes (59% du total) et de leurs dérivés. Les n-alcanes d'après la littérature, contribuent aux propriétés hydrophobes des cires foliaires et servent de barrière entre la plante et les conditions environnementales et surtout l'évaporation des feuilles (Jetter *et al.*, 2006). Ce sont en effet, de longues chaînes aliphatiques hydrophobes. Dans les palmes du palmier dattier, le n-alcane C₃₁ prédomine et représente 24,3% du total.

L'induction des cires est un phénomène général en réponse à la sécheresse (Kim *et al.*, 2007). Ainsi chez le sésame, le stress hydrique peut provoquer une augmentation de 24% des alcanes et 13% des aldéhydes (Koch *et al.*, 2009). Pour les alcanes, les constituants les plus augmentés sont les C₂₇, C₂₉, C₃₁, C₃₃ et C₃₅ alors que pour les aldéhydes, ce sont les C₃₀, C₃₂ et C₃₄ (Tegelaar *et al.*, 1993). D'autres études ont montré que les n-alcanes s'accumulent rapidement au niveau des cires pendant la maturation des feuilles au printemps et début de l'été et que cette accumulation reste constante pendant le reste de la saison de croissance (Eglinton et Hamilton, 1967; Avato *et al.*, 1984; Gülz et Müller, 1992; Tipple *et al.*, 2013 ; Bush *et al.*, 2013). Ce qui signifie que l'accumulation des n-alcanes au niveau des cires change pendant la saison de croissance et qu'elle dépend du type des plantes et des conditions environnementales (par exemple le vent). Chez le palmier dattier, la fraction aliphatique (les alcanes) domine quantitativement les autres fractions des cires ce qui est confirmé par Garcia *et al.* (1995) dans une étude des cires des feuilles de différentes espèces de la même famille botanique que le palmier dattier (*Orbignya phalerata*, *Orbignya speciosa*, *Orbignya cohune* et *Butia capitata*). Buschhaus *et al.* (2007) confirment ont fait les mêmes observations sur les feuilles des rosiers.

Des structures de cires en batonnet voisines de celle du palmier dattier, ont montré la présence des constituants identiques au palmier. C'est le cas pour l'espèce *Gypsophila acutifolia* qui possède majoritairement l'alcane en C₃₁ comme le palmier dattier, pour *Benincasa hispida* qui contient des triterpenol-acetate. Les espèces *Convallaria majalis*, *Euphorbia myrsinites*, *Galanthus nivalis* et *Iris germanica* qui possèdent l'alcool gras C₂₆. L'espèce *Triticum aestivum* et *Convallaria majalis* qui disposent aussi l'alcool gras en C₂₈. Les espèces *Aristolochia tomentosa* et *Liriodendron chinense* qui disposent des cétones (Koch *et al.*, 2009).

Les terpènes représentent la seconde classe de composés la plus présentes dans la feuille du palmier dattier. Cordeiro et al. (2011) ont également obtenu une forte teneur en triterpènes pour une espèce, *Mandevilla moricandiana* (une Apocynaceae) présente dans les forêts atlantiques du Brésil. Les n-alcane représentent 52% des cires et les triterpènes 14% soit des teneurs très comparables à celles que nous avons obtenues pour le palmier dattier (n-alcane 65,3 %, triterpènes 13,8 %).

En ce qui concerne la teneur en HAP dans les palmes, les résultats sont assez proches pour les stations HMD et HBA. Cependant parmi les 3 HAP, le phénanthrène est légèrement supérieur à HBA qu'à HMD.

La présence des HAP au niveau des cires des palmes, suggère donc une accumulation soit en surface soit dans les cires compte tenu de leur caractère lipophile. Les valeurs relevées dans les feuilles lors des analyses précédentes (point 4) et dans les cires épicuticulaires sont relativement voisines (Tableau 20). Elles vont dans le sens des travaux qui démontrent que la majorité des HAP se situe dans les cires des feuilles et que seule, une petite fraction d'entre eux migre vers l'intérieur des feuilles (Wild *et al.*, 2006). De plus, les valeurs relevées dans ce tableau ne montrent pas de réelles différences significatives entre les palmes des trois stations (AM, HBK, HBA) comme entre les cires de HBA et HMD.

Tableau 20 : Teneurs en HAP (ng.g^{-1} de palme sèche) dans les feuilles et dans les cires épicuticulaires des palmes du palmier dattier. Les valeurs dans les feuilles correspondent aux moyennes obtenues sur les 15 palmiers analysés précédemment. Les valeurs dans les cires correspondent à la moyenne des 3 extraits de cires épicuticulaires dans chaque station.

	AM	HBK	HBA		HMD
	Feuilles	Feuilles	Feuilles	Cires	Cires
Phénanthrène	21	20,9	26,9	33,46	24,78
Fluoranthène	19,3	17,2	23,7	22	22,32
Pyrène	21	19,2	25,8	17,43	19,11

La présence de quantité équivalente de HAP dans les extraits des feuilles et dans les cires (donc en surface) va dans le sens de nombreuses études qui montrent la pénétration des HAP dans les feuilles mais que celui-ci est complexe et probablement partiel. Au cours de leur accumulation, les HAP sont adsorbés premièrement à la surface, puis diffusent dans la cuticule de la plante (Schreiber et Schönherr, 1992). Seuls, les HAP à faible poids moléculaire plus présents dans la phase gazeuse de l'atmosphère pourraient pénétrer dans la cuticule. Les HAP à haut poids moléculaire, principalement liés aux particules, resteraient à la surface de la feuille (Reischl *et al.*, 1987). Les HAP légers, tels que le phénanthrène et l'antracène sont absorbés rapidement (24-48 h) dans l'épiderme et les cellules du mésophyle puis ils seraient transportés jusqu'aux racines (Wild *et al.*, 2006). Ainsi, chez le maïs, du phénanthrène a été détecté dans les vaisseaux du xylème après pulvérisation foliaire, ce qui constituerait un argument en faveur de l'existence d'une translocation aux racines. Des HAP détectées dans les racines non soumises à la pollution suggère que les HAP absorbés dans les feuilles peuvent passés aux racines (Desalme *et al.*, 2011; Jiao *et al.*, 2007) selon deux modes différents suivant le polluant (Figure 68).

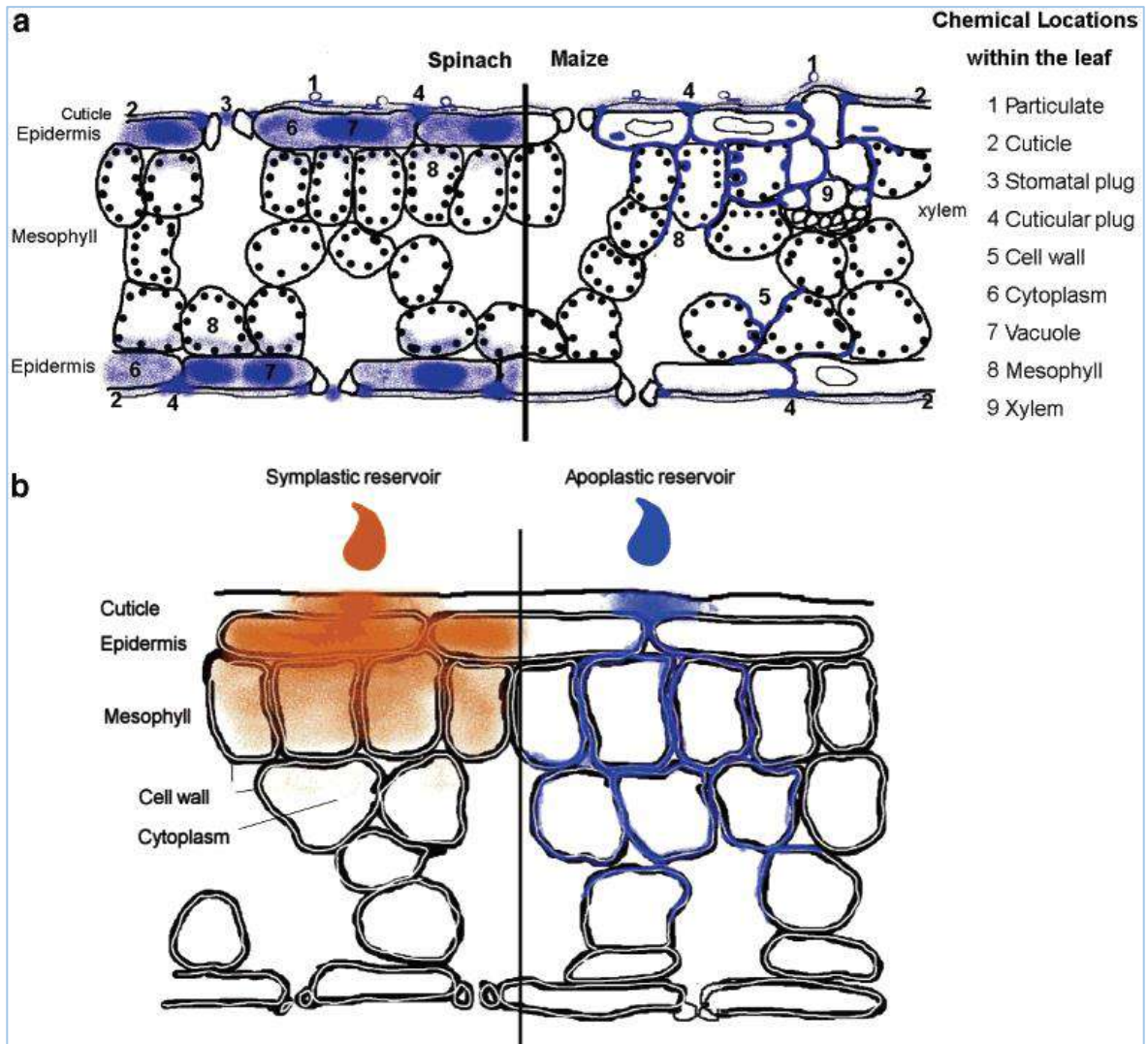


Figure 68 : Localisation du phénanthrène dans des feuilles d'épinard (gauche) et de maïs (droite) après 12 jours d'exposition à une atmosphère contaminée par le phénanthrène (Wild *et al.*, 2006).

Conclusion générale

Conclusion générale

Le travail présenté ici avait comme objectif la détection de la pollution atmosphérique en utilisant une espèce bioindiatrice. Nous avons d'abord envisagé de transplanter dans la région d'étude (Ouargla) un lichen *Xanthoria parietina*. Cependant, compte tenu des limites d'adaptation de cette espèce aux conditions climatiques de la région, le choix d'un second modèle végétal s'est avéré indispensable. C'est pourquoi, nous nous sommes réorientés vers les végétaux supérieures et nous avons retenu le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*). Il a été choisi pour sa pérennité et sa résistance aux conditions climatiques de la région d'étude.

La première approche sur les lichens a montré dans un premier temps que ceux-ci accumulent probablement les polluants hydrocarbonés sur un intervalle de temps limité par leur capacité à résister aux conditions climatiques (90 jours pour *X. parietina*). Le modèle de la transplantation pour cette espèce pourrait être envisagé pour la détection des polluants atmosphériques en Algérie mais dans d'autres conditions de température et de sécheresse. En effet, les teneurs en composés solubles dans l'hexane mesurées ainsi que les résultats sur la teneur en chlorophylle et le rapport MF/MS, sont à relier d'une part, aux facteurs intrinsèques propres à l'espèce étudiée (pouvoir accumulateur de *Xanthoria parietina*) et d'autre part, aux facteurs extrinsèques d'ordre climatiques et topographiques (pluviométrie et positionnement des sites d'échantillonnage). C'est pourquoi, l'usage des lichens pour la biosurveillance végétale pour estimer la qualité de l'air apparaît très limité dans les conditions climatiques en zone saharienne caractérisée par des fortes températures et une faible humidité.

Pour atteindre l'objectif fixé sur le palmier dattier, il était nécessaire de quantifier les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans la zone d'étude et de les mettre en lien avec des marqueurs biologiques du palmier dattier. Une première tâche a donc consisté à caractériser le palmier dattier et étudier les marqueurs biologiques dans les palmes afin de choisir celles qui seraient retenues. Ensuite, il a été nécessaire de quantifier les HAP dans les stations d'étude. Enfin, une étude approfondie devait permettre de rechercher des liens entre la teneur en HAP dans les feuilles et l'évaluation de leurs effets sur quelques voies métaboliques stratégiques pour le palmier dattier au travers de marqueurs : teneur en chlorophylles, métabolites cellulaires liés à l'impact des stress, activités enzymatiques et capacité antioxydante en réponse au stress oxydant lié aux HAP. Trois palmeraies ont été retenues : Haoud Berakaoui située en plein dans le champ pétrolier du même nom (HBK), Ain Moussa (AM) située à côté d'une torche et Hassi Ben Abdallah (HBA) qui est éloignée des torches mais à proximité d'une route nationale.

Une première étude approfondie sur le palmier dattier a concerné les structures anatomiques des palmes et a montré ainsi la présence de cellules bulliformes, propres aux monocotylédones et surtout dans les espèces des régions désertiques. L'analyse détaillée des variations métaboliques du palmier dattier en fonction de l'âge des palmes a montré que les palmes de moins d'un an (couronne 5) ont des teneurs en pigments beaucoup plus faibles ce qui se traduit dans la couleur des palmes. Au niveau des stations, les palmes de HBK ont des teneurs en chlorophylle ou caroténoïdes nettement plus faibles que les deux autres. Les rapports sont également affectés. En ce qui concerne les marqueurs de l'activité antioxydante, nous nous sommes intéressés à la mesure de l'activité antioxydante totale (TEAC), aux activités d'enzymes impliquées dans le stress oxydant (SOD, GSH-PX, GPX, GR), à l'activité d'une enzyme impliquée dans l'élimination des hydrocarbures (GST). Globalement les activités des enzymes augmentent de la couronne la plus jeune (couronne 5) à la couronne de l'année précédente (couronne 4). Elles restent souvent stables entre les couronnes 3 et 4 puis diminuent entre les couronnes 2 et 1. Il existe quelques exceptions pour la couronne 5 de HBA et HBK pour les GPX, GR et GSH-PX, pour la couronne 3 de AM de la GSHPX, et pour la couronne 1 de la GPX de HBA et HBK. Les valeurs des activités des enzymes antioxydantes sont généralement plus élevées dans la station AM sauf pour les couronnes 2 et 5 de la GPX. Elles sont les plus faibles pour HBK sauf pour la couronne 5 de la GR et GSH-PX. Enfin, deux profils d'histogrammes sont comparables. Ils concernent les deux enzymes à glutathion : la GR et la GSH-PX et ce pour les 3 stations.

L'analyse des HAP sur les filtres placés de manière à récupérer les poussières atmosphériques a permis d'identifier les 3 HAP suivis ensuite : le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène. Leur quantification dans le sol, au pied des palmiers analysés par la suite, montre que les 3 stations d'échantillonnage ne présentent pas une grande différence et que la station de HBA est celle avec la plus faible teneur en HAP. Elle présente des concentrations en fluoranthène et pyrène légèrement supérieures à celle du phénanthrène, contrairement aux deux autres stations. Les valeurs des HAP dans notre cas ont été comparées à celles obtenues dans des études antérieures dans des sables ou des sols sablonneux en contexte désertique de (Ladji *et al.*, 2010 et Balducci *et al.*, 2014). Nos valeurs avaient dans tous les cas un ordre de grandeur proche de ceux détectés par les deux études. D'une manière générale, les teneurs en HAP dans l'air et le sol ne dépendent pas obligatoirement des exploitations pétrolières et des industries pétrochimiques, mais surtout de l'activité

anthropique due à la combustion incomplète de la biomasse. Les valeurs obtenues à HBA restent toutefois proches de celles des deux autres stations bien que légèrement plus faibles.

La couronne 4 (palmes de 1 an) a été celle retenue pour l'étude des marqueurs métaboliques et pour quantifier les HAP dans les palmes. Un paramètre supplémentaire a été ajouté par rapport à l'étude sur toutes les couronnes des palmes, le MDA, témoin de la peroxydation lipidique. Une corrélation entre la teneur en pigments et les teneurs en HAP pour les 2 stations HBK et AM a été mise en évidence. Les marqueurs du stress oxydant ainsi que les GST ne présentent aucune corrélation significative avec la teneur en HAP pour les 3 stations d'échantillonnage. Seule, la GR donne une corrélation pour la station AM avec les 3 HAP. Il n'a donc pas été possible de relier l'expression de ces marqueurs aux teneurs en HAP dans les palmes même si des différences entre populations sont observables. On peut ainsi noter que pour les palmiers de HBA qui est une station non soumise à l'influence des torches, les activités de la GR et de la GPX sont nettement plus faibles que dans les deux autres stations.

Rien ne permet donc de mettre en évidence un comportement globalement différent à l'échelle des 3 palmeraies. Plusieurs éléments pourraient justifier cette absence de corrélation. Les teneurs en HAP sont peu différentes d'une station à l'autre. Ainsi, même si, au niveau des sables, HBA semblait légèrement moins pollué, la différence disparaît au niveau du contenu des palmes. La présence d'un axe routier important à proximité de HBA pourrait expliquer des teneurs en HAP similaires voir légèrement supérieures à celles des deux autres palmeraies. Par ailleurs, les mesures de HAP ont montré une grande variation d'un palmier à l'autre. De plus, le palmier dattier est une espèce adaptée à plusieurs stress. Comme les autres espèces sahariennes, il se développe en effet sous des températures et une luminosité (notamment les UV) extrêmes. Il supporte le sel et subit également des vents abrasifs du fait du sable. Ses structures anatomiques et physiologiques sont donc adaptées pour résister à ces stress. De faibles variations dans des teneurs en HAP ont donc peut être des impacts trop faibles pour être détectées. De plus, les phytotoxicités semblent varier en fonction des HAP et notamment des espèces végétales (Hwang *et al.*, 2003). La capacité de récupération et de rétention des polluants atmosphériques par les végétaux dépend de leurs propriétés intrinsèques (Bakker *et al.*, 2000; Howsam *et al.*, 2000). De nombreuses études ont tenté d'identifier les paramètres-clés conditionnant cette capacité de rétention. la surface foliaire et le taux de lipides sont les paramètres les plus documentés (Wagrowski et Hites, 1997b ; Kaupp *et al.*, 2000).

Cette absence d'effet relevé à l'échelle des stations a conduit à s'interroger sur les variations dans chaque station. L'enjeu était de déterminer si les teneurs en HAP ou les marqueurs biologiques avaient un comportement différent suivant la position des palmiers au sein de la palmeraie et en particulier par rapport aux torches, sources de pollution bien identifiable. Les données des palmiers ont été regroupées selon deux transects : un nord-sud et un autre est-ouest. Pour les stations HBK et AM, les données des palmiers localisés à l'est et l'ouest de la palmeraie ont le même comportement et se différencie de ceux localisés au sud et au nord de la palmeraie. Les teneurs en HAP sont significativement différentes entre les deux groupes de palmier. Sur le plan des marqueurs métaboliques, ce sont les chlorophylles qui les différencient. Ces deux palmeraies sont sous l'influence des rejets de torche. Les palmiers de HBA qui ne sont pas dans une zone où se trouve une torche n'ont pas ce comportement malgré la teneur en HAP globalement plus élevée. L'effet des HAP semble donc induire un comportement différent suivant la source de la pollution.

Étant donné les résultats des comportements des marqueurs biologiques des palmes face aux HAP, il paraissait également intéressant de s'intéresser aux cires épicuticulaires qui sont le point d'entrée majeure des molécules hydrophobes. Une première étape a donc consisté à extraire les cires épicuticulaires puis analyser leur composition. Ensuite, leur teneur en HAP a été déterminée. L'examen des cires épicuticulaires au microscope électronique à balayage, nous a dévoilé l'existence de deux types de cires : une croûte couvrant toute la surface des palmes et des formes verticales en bâtonnets. Les deux structures sert pour protéger la surface des feuille et de limiter les pertes d'eau par évapotranspiration. Une comparaison entre feuille jeunes et âgées nous a permet aussi de voir l'effet réel du phénomène d'abrasion qui est due dans notre cas du frottements des palmes entre eux d'une part vue leurs rapprochement les unes aux autres, et d'autre part l'effet des particules du sable et de sel transportées par le vent et déposées à la surface des feuilles.

La composition chimique des cires de surface montre la dominance de la fraction aliphatique (65,27%) et surtout les alcanes qui contribuent aux propriétés hydrophobe des cires foliaires et surtout la régulation de l'évaporation. Par contre l'autre fraction polaire ne représente que 35% du total des cires.

Les teneurs en HAP dans les cires extraites sont du même ordre de grandeur que dans les palmes pour HBA. Cela montrerait que les HAP se déposent à la surface des palmes du palmier dattier et sont en partie localisées dans les cires et qu'une petite partie traverse la cuticule pour passer dans le mésophile.

Plusieurs éléments peuvent expliquer l'absence de corrélation forte entre la majorité des marqueurs biologiques et les teneurs en HAP :

- l'absence d'une véritable station témoin que le temps nécessaire pour faire les analyses n'a pas permis de rechercher après l'obtention des résultats présentés ici,
- la grande capacité du palmier dattier à résister aux stress (UV, température, stress hydrique et salin) et donc sans doute à un autre stress comme cette pollution,
- la protection des palmes recouvertes d'une couche épaisse de cire qui protège les tissus foliaires,
- les conditions climatiques de la région qui peuvent réduire la présence des HAP sur les palmes (vents, sable et pluies).

Le présent travail ouvre la porte à de nombreuses suggestions et perspectives. Dans un premier temps, il conviendra de poursuivre cette étude en cherchant une vraie station témoin loin de toute activité anthropique, afin de la comparer aux stations les plus exposées aux polluants. L'effet de la position des palmiers selon leur position dans la palmeraie sur la teneur en HAP montre en effet que la présence de torches a un impact sur les végétaux. Les pigments se sont révélés de bons marqueurs pour identifier cet impact et ils pourraient constituer de bons indicateurs faciles à utiliser à condition d'être toujours mis en relation avec les données d'une station témoin fiable. Des mesures d'activité photosynthétique *in situ* pourraient compléter l'approche. Il a été démontré que les substances polluantes pourraient inhiber l'activité de l'appareil photosynthétique (Marwood *et al.*, 2001).

Le modèle du palmier peut être retenu pour poursuivre le travail. On pourra limiter l'analyse maintenant à la couronne 4 en ce qui concerne le choix des palmes. L'allégement du travail ainsi induit permettra d'avoir un échantillonnage plus important dans chaque palmeraie. Il sera aussi intéressant de quantifier les HAP sur/dans les dattes en fonction de leur stade de maturation. Les quantités de HAP pourraient être comparées aux teneurs en polyphénols afin d'évaluer l'importance de la pollution et l'effet sur la qualité des dattes.

Dans un domaine de recherche voisin, il sera très important d'acquérir des données plus précises sur le devenir des HAP dans la chaîne alimentaire et aussi la prise en compte des mécanismes de transfert de telles molécules dans les différents compartiments des écosystèmes en relation avec les pratiques humaines. Cela reste une étape essentielle dans l'évaluation des risques sanitaires et environnementaux associés à ces polluants.

Le financement de cette thèse étant assuré dans le cadre de la coopération Algéro-Française par un projet Tassili (CMEP11DMU822) (4 ans), une bourse BAF (18 mois) et une bourse de l'école doctorale VAS de Rennes 1 (6 mois).

*Références
Bibliographiques*

Références Bibliographiques

A

- Acevers M. and Grimalt JO. 1993. Seasonally dependent size distributions of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols from densely populated areas. *Environmental Science and Technology* 27: 2896-2908.

- Allen JO., Durant JL., Dookeran NM., Taghizadeh K., Plummer EF., Lafleur AL., Sarofim AF., Smith KA. 1998. Measurement of C₂₄H₁₄ polycyclic aromatic hydrocarbons associated with a size-segregated urban aerosol. *Environmental Science and Technology* 32: 1928-1932.

-Ahammed GJ., Gao C-J., Ogweno JO., Zhou Y-H., Xia X-J., Mao W-H., Shi K., Yu J-Q. 2011. Brassinosteroids induce plant tolerance against phenanthrene by enhancing degradation and detoxification in *Solanum lycopersicum* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80: 28-36.

-Ahammed GJ., Yuan HL., Ogweno JO., Zhou YH., Xia XJ., Mao WH., Shi K., Yu JQ. 2012. Brassinosteroid alleviates phenanthrene and pyrene phytotoxicity by increasing detoxification activity and photosynthesis in tomato. *Chemosphere* 86: 546-555.

-Aksmann A., Tukaj Z. 2008. Intact anthracene inhibits photosynthesis in algal cells: a fluorescence induction study on *Chlamydomonas reinhardtii* cw92 strain. *Chemosphere* 74: 26-32.

-Aksoy A., Ozturk MA. 1997. *Nerium oleander* L. as a biomonitor of lead and other heavy metal pollution in Mediterranean environments. *Science of Total Environment* 205 (2-3): 145-150.

-Aksoy A., Ozturk MA., 1997. *Nerium oleander* L. as a biomonitor of lead and other heavy metal pollution in Mediterranean environments. *Science of the Total Environment* 205 (2-3) : 145-150.

-Albano PO. 2004. Le palmier pas à pas. Edisud, Aix-en-Provence 95 p.

-Albinet A., Leoz-Garziandia E., Budzinski H., Villenave E. 2006. Simultaneous analysis of oxygenated and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons on standard reference material 1649a (urban dust) and on natural ambient air samples by gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionisation. *Journal of Chromatography (A)* 1121: 106-113.

-Albinet A., Leoz-Garziandia E., Budzinski H., Villenave E. 2006. Simultaneous analysis of oxygenated and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons on standard reference material 1649a (urban dust) and on natural ambient air samples by gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionisation. *Journal of Chromatography (A)* 1121 :106-113.

-Aldjain IM., Al-Whaibi MH., Al-Showiman SS., Siddiqui MH. 2011. Determination of heavy metals in the fruit of date palm growing at different locations of Riyadh. *Saudi Journal of Biological Sciences* 18: 175-180.

-Alfani A., De Nicola F., Maisto G., Prati MV. 2005. Long-term PAH accumulation after bud break in *Quercus ilex* L. leaves in a polluted environment. *Atmospheric Environment* 39: 307-314.

-Al-Khashman OA., Al-Muhtaseb AH., Ibrahim KA. 2011. Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaves as biomonitors of atmospheric metal pollution in arid and semi-arid environments. *Environmental Pollution* 159 : 1635-1640.

- Al-Khlaifat AL., Al-Khashman OA. 2007. Atmospheric heavy metal pollution in Aqaba city, Jordan, using *Phoenix Dactylifera* L. leaves. *Atmospheric Environment* 41 : 8891-8897.
- Allen JO., Dookeran NM., Smith KA., Sarofim AF., Taghizadeh K., Lafleur AL. 1996. Measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with size-segregated atmospheric aerosols in Massachusetts. *Environmental Science and Technology* 30: 1023.
- Allen JO., Dookeran NM., Taghizadeh K., Lafleur AL., Smith KA., Sarofim AF. 1997. Measurement of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons associated with a size-segregated urban aerosol. *Environmental Science and Technology* 31: 2064-2070.
- Allen JO., Durant JL., Dookeran NM., Taghizadeh K., Plummer EF., Lafleur AL., Sarofim AF. Et Smith KA. 1998. Measurement of C₂₄H₁₄ polycyclic aromatic hydrocarbons associated with a size-segregated urban aerosol. *Environmental Science and Technology* 32: 1928-1932.
- Almeida M., Mucha A., Delgado M., Caçador I., Bordalo A., Vasconcelos T. 2008. Can PAHs influence Cu accumulation by salt marsh plants? *Marine Environmental Research* 66: 311-318.
- Al-Shayeb SM. 2002a. Lead and other elements in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits (dates). *Asian Journal of Chemistry* 14:577-582.
- Al-Shayeb SM. 2002b. Comparison study of *Phoenix dactylifera* L. and *Nerium oleander* L. as biomonitors for lead and other elements. *Asian Journal of Chemistry* 14: 597-601.
- Al-Shayeb SM., Al-Rajhi MA., Seaward MRD. 1995. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) as a biomonitor of lead and other elements in arid environments. *Science of the Total Environment* 168: 1-10.
- Al-Shayeb SM., Seaward MRD. 2000a. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fibre as a biomonitor of lead and other elements in arid environments. *Asian Journal of Chemistry* 12: 954-966.
- Al-Shayeb SM., Seaward MRD. 2000a. The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fibre as a biomonitor of lead and other elements in arid environments. *Asian Journal of Chemistry* 12: 954-966.
- Al-Shayeb SM., Seaward MRD. 2000b. Sampling standardization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) leaflets as a biomonitor of metal pollutants in arid environments. *Asian Journal of Chemistry* 12: 977-989.
- Arey J., Atkinson R. 2003. Photochemical Reactions in the Atmosphere. In: P. E. T. Douben ed. *PAHs: An Ecotoxicological Perspective* Chichester, England.
- Augusto S., Catarino F., Branquinho C. 2007. Interpreting the dioxin and furan profiles in the lichen *Ramalina canariensis* Steiner for monitoring air pollution. *Science of the Total Environment* 377: 114-123.
- Augusto S., Maguas C., Matos J., Joao Pereira M., Branquinho C. 2010. Lichens as an integrating tool for monitoring PAH atmospheric deposition: A comparison with soil, air and pine needles. *Environmental Pollution* 158: 483-489.
- Augusto S., Pinho P., Branquinho C., Pereira M.J., Soares A., Catarino F. 2004. Atmospheric dioxin and furan deposition in relation to land-use and other pollutants: a survey with lichens. *Journal of Atmospheric Chemistry* 49: 53-65.
- Avato P., Bianchi G., Mariani G. 1984. Epicuticular waxes of *Sorghum* and some compositional changes with plant age. *Phytochemistry* 23: 2843-2846.

B

- Besombes JL., Maitre A., Patissier O., Marchand N., Chevron N., Stoklov M., Masclet P. 2001. Particulate PAHs observed in the surrounding of a municipal incinerator. *Atmospheric Environment* 35: 6093-6104.
- Buschhaus C., Herz H., Jetter R. 2007b. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on the adaxial sides of *Ligustrum vulgare* leaves. *New Phytol.* 176 : 311-316.
- Bačkor M., Fahselt D. 2004. Physiological attributes of the lichen *Cladonia pleurota* in heavy metal-rich and control sites near Sudbury (Ont., Canada). *Environmental and Experimental Botany* 52 : 149-159.
- Bačkor M., Zettková J. 2003. Effects of copper, cobalt and mercury on the chlorophyll content of lichens *Cetraria islandica* and *Flavocetraria cucullata*. *Journal Hattori Botanical Laboratory* 93: 175-187.
- Bakker MI., Koerselman JW., Tolls J., Kollóffel C. 2001. Localization of deposited polycyclic aromatic hydrocarbons in leaves of plantago. *Environmental Toxicology and Chemistry* (20) 5: 1112- 1116.
- Bargagli R. 1998. Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. *Springer, Berlin*, 324 pp.
- Bartók K., Nicoara A., Bercea V., Osváth, T. 1992. Biological responses in the lichen *Xanthoria parietina* transplanted in biomonitoring stations. *Revue Roumaine de Biologie. Série Biologie végétale* 37: 135-142.
- Beech M. 2003. Archaeobotanical evidence for early date consumption in the Arabian Gulf. The Date palm: from traditional resource to green wealth. *The Emirates Center for Strategic Studies and Research*, Abu Dhabi: 11-31.
- Beech M., Shepherd E. 2001. Archaeobotanical evidence for early date consumption on Dalma Island, United Arab Emirates. *Antiquity* 75: 83-89.
- Behymer TD. et Hites RA. 1985. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on simulated atmospheric particulates. *Environmental Science and Technology* 19: 1004-1006.
- Bernard A., Joubès J. 2013. Arabidopsis cuticular waxes: advances in synthesis. Export and regulation. *Progress in Lipid Research* 52 : 110-129.
- Besombes JL., Maître A., Patissier O., Marchand N., Stoklov M., Masclet P. 2001. Particulate PAHs observed in the surrounding of a municipal incinerator. *Atmospheric Environment* 35: 6093-6104.
- Biglari F., AlKarkhi AFM, Mat Easa A. 2008. Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry* 107: 1636-1641.
- Blasco M., Domeno C., Bentayeb K., Nerín C. 2007. Solid-phase extraction cleanup procedure for the analysis of PAHs in lichens. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 87 : 833-846.
- Blasco M., Domeno C., Nerín C. 2006. Use of lichens as pollution biomonitors in remote areas: comparison of PAHs extracted from lichens and atmospheric particles sampled in and around the Somport tunnel (Pyrenees). *Environmental Science and Technology* 40: 6384-6391.
- Blasco M., Domeno C., Nerín C. 2008. Lichens biomonitoring as feasible methodology to assess air pollution in natural ecosystems: combined study of quantitative PAHs analyses and lichen biodiversity in the Pyrenees Mountains. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391: 759-771.

-Bondada BR., Oosterhuis DM., Murphy JB., Kim KS. 1996. Effect of water stress on the epicuticular wax composition and ultrastructure of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) leaf, bract and boll. *Environment and Experimental Botany* 36: 61-69.

-Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

-Branquinho C., Brown DH., Catarino F. 1997. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence. *Environmental and Experimental Botany* 38: 165-179.

-Buschhaus C., Herz H., Jetter R. 2007a. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. *Annals of Botany* 100: 1557-1564.

-Bush RT., Francesca A., McInerney FA. 2013. Leaf wax n-alkane distributions in and across modern plants: Implications for paleoecology and chemotaxonomy. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 117: 161-179.

C

-Calamari D., Bacci E., Focardi S., Gaggi C., Morosini M., Vighi M. 1991. Role of plant biomass in the global environmental partitioning of chlorinated hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 25 : 1489-1495.

-Cecinato A., Mabilia R., Tomasi Scianò MC., Brachetti A. 2005. Uso delle impronte digitali dei micro-componenti organici delle emissioni per la caratterizzazione delle sorgenti – Le emissioni veicolari (indagine preliminare). In: Minoia, C., Valerio, F., Spezia, S., Turci, R. (Eds.), Benzene, Idrocarburi Policiclici Aromatici e Polveri Sottili. *New Press Publisher* Como, Italy, pp. 53–62.

-Celik A., Kartal A., Akdogan A., Kaska Y. 2005. Determination of heavy metal pollution in Denizli (Turkey) by using Robinio Pseudo-acacia L. *Environment Internatinal* 31: 105-112.

-Chen Z., Young TE., Ling J., Chang SC., Gallie DR. 2003. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (100) 6: 3525-3530.

Chettri MK., Cook CM., Vardaka E., Sawidis T., Lanaras T. 1998. The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*. *Environmental and Experimental Botany* 39: 1-10.

-Conti ME., Cecchetti G.2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment- a review. *Environmental Pollution* 114: 471-492.

-Cuny D., Davranche L., Thomas P., Kempa M., Van Haluwyn C. 2004. Spatial and temporal variations of trace element contents in *Xanthoria parietina* thalli collected in a highly industrialized area in northern France as an element for a future epidemiological study. *Journal of Atmospheric Chemistry* 49 : 391-401.

D

-Dajoz R. 1986. Précise d'écologie Ed : DUNOD Gauthier-Villars Paris pp. 323-341.

-Dat J.F., Van Breusegem F., Vandennebeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inze D.2000. Dual action of active oxygen species during plant stress responses, *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779-795.

- De Nicola F., Claudia L., MariaVittoria P., Giulia M., Anna A. 2011. Biomonitoring of PAHs by using *Quercus ilex* leaves: Source diagnostic and toxicity assessment. *Atmospheric Environment* 45: 1428-1433.
- De Nicola F., Maisto G., Prati MV., Alfani A. 2005. Temporal variations in PAH concentrations in *Quercus ilex* L. (holm oak) leaves in an urban area. *Chemosphere* 61: 432-440.
- Del Rio LA., Pastori GM., Palma JM., Sandalio LM., Sevilla F., Corpas FJ., Jiménez A., Lopez-Huertas E., Hernández JA. 1998. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology* 116: 1195-1200.
- Deponte M., Urig S., Arscott LD., Fritz-Wolf K., Reau R., Herold-Mende C., Koncarevic S., Meyer M., Davioud-Charvet E., Ballou DP., Williams Jr CH., Becker K. 2005. Mechanistic studies on a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase. *Journal and Biologie Chemistry* 280 : 20628-20637.
- Deruelle S., Lallemand R. 1983. Les lichens témoins de la pollution. Editions Vuibert. Université de biologie, Paris p. 108.
- Desalme D., Binet P., Bernard N., Gilbert D., Toussaint M-L., Chiapusio G. 2011. Atmospheric Phenanthrene Transfer and Effects on Two Grassland Species and Their Root Symbionts: A Microcosm Study. *Environmental and Experimental Botany* 71(2): 146-151.
- Desalme D., Binet P., Epron D., Bernard N., Gilbert D., Toussaint M-L., Plain C., Chiapusio G. 2011. Atmospheric phenanthrene pollution modulates carbon allocation in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Environmental Pollution* 159 : 2759-2765.
- Domeno C., Blasco M., Sanchez C., Nerín C. 2006. A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichen samples used as biomonitors of air pollution: dynamic sonication versus other methods. *Analytica Chimica Acta* 569 : 103-112.
- Domenó C., Blasco M., Sánchez C., Nerín C. 2006. A fast extraction technique for extracting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from lichen samples used as biomonitors of air pollution: dynamic sonication versus other methods. *Analytica Chimica Acta* 569: 103-112.
- Dubief J. 1963. Le climat du Sahara . Tome I Mém. Inst. Rech. Saha. Univ. Alger, 312p.
- Dubost D. 1991. Ecologie aménagement et développement agricole des oasis Algériennes. Thèse de doctorat, Université François Rabelais, 548p.
- Duxbury C.L., Dixon D.G., Greenberg B.M. 1997. Effects of simulated solar radiation on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the duckweed *Lemna gibba*, *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 : 1739-1748.
- Dzubaj A., Backor M., Tomko J., Peli E., Tuba Z. 2008. Tolerance of the lichen *Xanthoria parietina* (L) Th. Fr. to metal stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70: 319-326.

E

- Eglinton G., Hamilton RJ. 1967. Leaf epicuticular waxes. *Science* 156: 1322-1335.
- Eisenberg WC., Cunningham DLB. 1985. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel emissions using high performance liquid chromatography: a methods development study. In: Cook, M., Dennis, A.J. (Eds.), *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Mechanisms Methods, and Metabolism*. Columbus, *Battelle Press, OH*, pp. 79-393.

-El Mardi MO., Salama SB., Consolacion E., Al-Shabibi MS. 1995. Effect of treated sewage water on vegetative and reproductive growth of date palm. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 26: 1895-1904.

-El Mardi MO., Salama SB., Consolacion EC., Al-Solomi M. 1998. Effect of treated sewage water on the concentration of certain nutrient elements in date palm leaves and fruits. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 29: 763-776.

-El-Alawi YS., McConkey BJ., Dixon DG., Greenberg BM. 2002. Measurement of short and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51: 12-21.

-Elichegaray C. 2008. La pollution de l'air sources, effets, prévention, Editions Dunod. 211p.

-EPA (Environment Protection Authority). 1996. National Air Quality Status and Trends Brochure, Office of Air & Radiation (OAR). Pub: US-EPA, Lead.htm., 2 pp.

-Evans JR. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. *Oecologia* 78: 9-19.

F

-FAO ,2003. ISBN 92-5-204986-X (www.fao.org/docrep/006/j0083f/j0083f00.HTM).

-FAO, 2004. <http://www.fao.org/newsroom/fr/news/2004/48147/>. Consulté le 10/10/2013.

-Foyer C., Leegood R., Walker D. 1982. What limits photosynthesis? *Nature* 298-326.

G

-Garrec JP., Van Haluwyn C. 2002. Biosurveillance végétale de la qualité de l'air. Paris. Pp 1-6 et 35-36.

-Garty J. 1992. Lichens and heavy metals in the environment. In: Vernet, J.P. (Ed.), *Impact of Heavy Metals on the Environment*, Vol. 2. Elsevier, Amsterdam, pp. 55-131.

-Garty J. 1993. Lichens as biomonitors for heavy metal pollution. In: Markert, B. (Ed.), *Plants as Biomonitors: Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment*. VCH, Weinheim, Germany, pp. 193-263.

-Garty J. 2000a. Environment and elemental content of lichens. In: Markert, B., Friese, K. (Eds.), *Trace Elements -Their Distribution and Effects in the Environment*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 245-276.

-Garty J. 2000b. Trace metals, other chemical elements and lichen physiology: research in the nineties. In: Markert, B., Friese, K. (Eds.), *Trace Elements-Their Distribution and Effects in the Environment*. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 277-322.

-Garty J. 2001. Biomonitoring heavy metals with lichens: theory and application. *Critical Reviews in Plant Sciences* 20: 309-371.

-Garty J., Garty-Spitz RL. 2011. Neutralization and neoformation: Analogous processes in the atmosphere and in lichen thalli. *Environmental and Experimental Botany* 70: 67-79.

-Garty J., Kunin P., Delarea J., Weiner S. 2002. Calcium oxalate and sulphatecontaining structures on the thallial surface of the lichen *Ramalina lacera*: response to polluted air and simulated acid rain. *Plant Cell and Environment* 25: 1591-1604.

-Garty J., Ronen R., Galun M. 1985. Correlation between chlorophyll degradation and the amount of some elements in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Jatta. *Environmental and Experimental Botany* 25: 67-74.

- Garty J., Weissman L., Tamir O., Beer S., Cohen Y., Karnieli A., Orlovsky L. 2000. Comparison of five physiological parameters to assess the vitality of the lichen *Ramalina lacera* exposed to air pollution. *Physiologiae Plantarum* 109: 410-418.
- Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R. 2002b. Element concentrations in the forest moss *hylocomium splendens*: variation associated with altitude, net primary production and soil chemistry. *Environmental Pollution* 166: 129-135.
- Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., Medici A., Pedrini P., Benedetti S., Bovolenta A., Coppi S. 2002a. Use of moss (*tortula muralis* Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy. *Atmospheric Environment* 36: 4069-4075.
- Giannopolitis CN., Ries SK. 1977. Superoxide Dismutases, I- Occurrence in higher plants. *Plant physiology* 59: 309-314.
- Goujon M. 2004. Connaitre pour agir, Lichens et biosurveillance de la qualité de l'air, pp 1-4.
- Gratani L, Ghia E. 2002. Changes in morphological and physiological traits during leaf expansion of *Arbutus unedo*. *Environmental and Experimental Botany* 48: 51-60.
- Gries C. 1996. Lichens as indicators of air pollution, In: Nash III, T. H. (Ed), *Lichen Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 240-254.
- Gu Y., Zhao Z., Pearsall DM. 2013. Phytolith morphology research on wild and domesticated rice species in East Asia. *Quaternary International* 287(21) :141-148.
- Guelle et Emmanuel. 1998. Etat de l'air pour étude des impacts des transports routiers à proximité des autoroutes. Editions ADEME. pp 70-72.
- Guidotti M., Stella D., Owczarek M., De Marco A., De Simone C. 2003. Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. *Journal of Chromatography* (volume A) 985: 185-190.
- Gulz PG., Muller E. 1992. Seasonal variation in the composition of epicuticular waxes of *Quercus robur* leaves. *Zeitschrift für Naturforschung* 47C: 800-806.

H

- Hoyau V., Jaffrezo JL., Garrigues PH., Clain MP., Masclet P. 1996. Deposition of aerosol in polar regions-contamination of the ice sheet by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromatic Compounds* 8: 35-44.
- Habig WH., Pabst MJ., Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acidformation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139.
- Hale MEJ. 1983. *The Biology of Lichens*, third editions Edward Arnold, London.
- Hamdi aissa B. 2001. Le fonctionnement actuel et passé de sol du nord de Sahara (Cuvette de Ouargla). Approche micromorphologique, géochimique, minéralogique et organisation spatiale, Thèse Doctorat, Institut National d'Agronomie, Paris, Grignon,
- Hawksworth DL., Rose, F. 1970. Qualitative scale for estimating sulphur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature* 227 (254): 145-148.
- Hawsam M., Jones KC., Ineson P. 2001. Dynamics of PAH deposition, cycling and storage in a mixed-deciduous (*Quercus Fraxinus*) woodl and ecosystem. *Environmental Pollution* 113: 163-176.
- HBK 2004. Direction régionale de HaoudBerkaoui.
- HBK 2011. Rapport d'audit environnemental direction de HaoudBerkaoui SONATRACH.

-Henner P., Schiavon M., Druelle V., Lichtfouse E. 1999. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Organic Geochemistry* 30: 963-969.

-Herzig R. 1989. Multi-residue analysis with passive biomonitoring: a new approach for volatile multi-elements, heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons with lichens in Switzerland and the principality of Liechtensein. In: Markert, B. (Ed.), *Plants as Biomonitors for Heavy Metals in the Terrestrial Environment*, pp. 285-328. Weinheim.

-Hodges DM., DeLong JM., Forney CF., Prange RK. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207: 604-611.

-Holoubek I., Korinek P., Seda Z., Schneiderova E., Holoubkova I., Pacl A., Triska J., Cudlin P., Caslavsky J. 2000. The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environmental Pollution* 109: 283-292.

-Holovska K., Lenartova V., Pedrajas JR., Peinado J., Lopez-Barea J., Rosival I., Legath J. 1996. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in sheep organs. *Comparative Biochemistry Physiology* 115(B):451-456.

-Howsam M., Jones KC., Ineson P. 2000. PAHs Associated with the Leaves of Three Deciduous Tree Species. I - Concentrations and Profiles. *Environmental Pollution* 108(3): 413-424.

-Huang XD., McConkey BJ., Babu TS., Greenberg BM. 1997. Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants: inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (Duckweed). *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1707-1715.

I

-Immel F., Renaut J., Masfarauda J-F. 2012. Physiological response and differential leaf proteome pattern in the European invasive Asteraceae *Solidago Canadensis* colonizing a former cokery soil. *Journal of proteomic (S)* 7 5: 1129 -1143.

J

-Jeffree CE. 2006. The fine structure of plant cuticle. In: Riederer M., Muller C. (Eds.), *Biology of the plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.,pp. 11-125.

-Jetter R., Kunst L., Samuels A. 2006. Composition of plant cuticular waxes. In: Riederer, M., Müller, C. (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle*. Annual Plant Reviews, vol. 23. Blackwell, Oxford, pp. 145-181.

-Jiao XC., Xu FL., Dawson R., Chen SH., Tao S. 2007. Adsorption and Absorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons to Rice Roots. *Environmental Pollution* 148(1): 230-235.

-Jouraeva VA., Johnson DL., Hasset JP., Nowak DJ. 2002. Differences in accumulation of PAHs and metals on the leaves of *Tilia xeuchlora* and *Pyrus calleryana*. *Environmental Pollution* 120: 331-338.

K

-Katz M. and Chan C. 1980. Comparative distribution of eight polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates collected by conventional high-volume sampling and by seize fractionation. *Environmental Science and Technology* 14: 838-843.

-Kaupp H., Blumenstock M., McLachlan MS. 2000. Retention and Mobility of Atmospheric Particle-Associated Organic Pollutant PCDD/Fs and PAHs in Maize Leaves. *New Phytologist* 148(3): 473-480.

-Kim KS., Park SH., Jensks MA. 2007. Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants exposed to water deficit. *Journal of Plant Physiology* 164: 1134-1143.

-Kipopoulou AM., Manoli E., Samara C., Smith KEC., Thomas GO., Jones KC., Simonich SL., Hites RA. 1999. Bioconcentration of PAHs in Vegetables Grown in an Industrial Area. *Environmental Pollution* 106: 369-380.

-Kiss G., Varga-Puchony Z., Rohrbacher G., Hlavay J. 1998. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons on atmospheric aerosol particles of different sizes. *Atmospheric Research* 46: 253-261.

-Koch K., Bhushan B., Barthlott W. 2009b. Multifunctional surface structures of plants: an inspiration for biomimetics. *Progress in Materials Science* 54: 137-178.

-Koch K., Dommissie A., Niemietz A., Barthlott W., Wandelt K. 2009a. Nanostructure of epicuticular plant waxes: self-assembly of wax tubules. *Surface Sciences* 603: 1961-1968.

-Koch K., Ensikat HJ. 2008. The hydrophobic coatings of plant surfaces: epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron* 39: 759-772.

-Korfmacher WA., Natusch D., Taylor D., Whery E. et Mamantov G. 1979. Thermal and photo chemical decomposition of particulate aromatic hydrocarbons. *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons* 165-170.

-Kovacs M., Podani J., Klincsek P., Dinka M., Torok, K. 1981. Element composition of the leaves of some deciduous trees and the biological indicators of heavy metals in an urban-industrial environment. *Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 27: 43-52.

-Kummerova M., Krulova J., Zezulka S., Triska J. 2006. Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence. *Chemosphere* 65: 489-496.

-Kummerova M., Vanova L., Krulova J., Zezulka S. 2008. The use of physiological characteristics for comparison of organic compounds phytotoxicity, *Chemosphere* 71: 2050-2059.

L

-Ladji R., Yassaa N., Balducci C., Cecinato A. 2010. Organic components of Algerian desert dusts. *Chemosphere* 81: 925-931.

-Landers DH., Simonich S., Jaffe D., Geiser L., Campbell DH., Schwindt A., Schreck C., Kent M., Hafner W., Taylor HE., Hageman K., Usenko L., Schrlau J., Rose N., Blett T., Erway, MM. 2008. The Fate, Transport and Ecological Impacts of Airborne Contaminants in Western National Parks. EPA/600/R-07/138 Available online at:http://www.nature.nps.gov/air/Stuides/air_toxics/wacap.cfm.

-Lefebvre G. 1978. Chimie des hydrocarbures. *Editions Technip*. pp 53-69.

-Lehndorff E., Schwark L. 2004. Biomonitoring of air quality in the Cologne conurbation using pine needles as a passive sampler – part II: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Atmospheric Environment* 38: 3793-3808.

-Lehr R., Jerina DM. 1977. Metabolic activations of polycyclic hydrocarbons. *Archives of Toxicology* 39: 1-6.

-Lepedus H., Vlatka G., Viljevac M., Kova S., Fulgosi H., Simi D., Jurkovi V., Cesar V. 2011. Changes in photosynthetic performance and antioxidative strategies during

maturation of Norway maple (*Acer platanoides* L.) leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 368-376.

-Lescole C. 2002 : Les feux d'hydrocarbures, Centre de Secours de Divonne, 20p.

-Lichtenthaler HK., Wellburn RR. 1983. Determination of total carotenoids and chlorophylls *a* and *b* of extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 603: 591-592.

-Limon-Pacheco J., Gonsebatt ME. 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research* 674: 137-147.

-Lin H., Tao S., Zuo Q., Coveney RM. 2007. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. *Environmental Pollution* 148: 614-619.

-Liu H., Weisman D., Ye Y-B., Cui B., Huang Y-H., Colon-Carmona A., Wang Z-H. 2009. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 176: 375-382.

-Lodovici M., Akpan V., Casalini C., Zappa C., Dolara P. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in *Laurus nobilis* leaves as a measure of air pollution in urban and rural sites of Tuscany. *Chemosphere* 36: 1703-1712.

-Loppi S, Putortì E, Signorini C, Fommei S, Pirintsos SA, De Dominicis V.A. 1998. Retrospective study using epiphytic lichens as biomonitors of air quality: 1980 and 1996 (Tuscany, central Italy). *Acta Oecologica* 19:405-408.

M

-Majer P., Hideg E. 2012. Developmental stage is an important factor that determines the antioxidant responses of young and old grapevine leaves under UV irradiation in a greenhouse. *Plant Physiology and Biochemistry* 50: 15-23.

-Mallakin A., Babu TS., Dixon DG., Greenberg BM. 2002. Sites of toxicity of specific photooxidation products of anthracene to higher plants: Inhibition of photosynthetic activity and electron transport in *Lemna gibba* L. G-3 (duckweed). *Environmental Toxicology* 17 (5): 462-471.

-McLachlan MS. 1999. Framework for the interpretation of measurements of SOCs in plants. *Environmental Science and Technology* 33 (11): 1799-1804.

-Migaszewski ZM., Galuszka A., Paslawski P. 2002. Polynuclear aromatic hydrocarbons, phenols, and trace metals in selected soil profiles and plant bioindicators in the Holy Cross Mountains South-Central Poland. *Environment International* 28: 303-313.

-Miguel AH., Kirchstetter TW., Harley RA. 1998. On-road emissions of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons and black carbon from gasoline and diesel vehicles. *Environmental Science and Technology* 32: 450-455.

-Munier P. 1973. Le palmier dattier. Paris, Maisonneuve et Larose, coll. Techniques agricoles et production tropicales, 221p.

N

- Nikolaou K., Masclet P., Mouvier G. 1984. Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere- A critical review. *The Science of the Total Environment* 32: 103-132.

-Nadal M., Mari M., Schuhmacher M., Domingo JL. 2009. Mulyi-compartmental environmental surveillance of petrochemical area: Levels of micropollutants. *Environment International* 35: 227-235.

-Naeth MA., Wilkinson SR. 2008. Lichens as biomonitors of air quality around a diamond mine, Northwest Territories, Canada. *Journal of Environmental Quality* 37:1675-1684.

-Nam JJ., Thomas GO., Jaward FM., Steinnes E., Gustafsson O., Jones KC. 2008. Pahs in Background Soils from Western Europe: Influence of Atmospheric Deposition and Soil Organic Matter. *Chemosphere* 70(9): 1596-1602.

-Nash III TH. 1989. Metal tolerance in lichens. In: Shaw, A.J. (Ed.), Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspect. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 119-131.

-Nash III TH., Sommerfeld MR. 1981. Elemental concentrations in lichens in the area of the Four Corners Power Plant, New Mexico. *Environmental and Experimental Botany* 21: 153-162.

-Nash III TH., Gries C. 1995. The response of lichens to atmospheric deposition with an emphasis on the Arctic. *The Science of the Total Environment* 160/161: 737-747.

-Nash TH. 1996a. Introduction. In: Nash, T.H. (Ed.), Lichen Biology. University Press, Cambridge, pp. 1-7.

-Nash TH. 1996b. Nutrients, elemental accumulation and mineral cycling. In: Nash, T.H. (Ed.), Lichen Biology. University Press, Cambridge, pp. 136-153.

-Neff JM. 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, Sources. Fates and Biological Effects pp. 1-262. Applied Science Publishers, Essex.

-Nepovim A., Podlipná R., Soudek P., Schröder P., Vaněk T. 2004. Effects of heavy metals and nitroaromatic compounds on horseradish glutathione S-transferase and peroxidase. *Chemosphere* 57: 1007-1015.

-Nimis PL., Andreussi S., Pittao E. 2001. The performance of two lichen species as bioaccumulators of trace metals. *Science of the Total Environment* 275: 43-51.

O

- Offenberg J. H. et Baker J. E. 1999. Aerosol size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban and over-water atmospheres. *Environmental Science and Technology* 33: 3324-3331.

-Offenberg, J.H., Baker, J.E., 1999. Aerosol size distributions of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban and over-water atmospheres. *Environmental Science and Technology* 33: 3324-3331.

-Oguntimehin I., Eissa F., Sakugawa H. 2008. Negative effects of fluoranthene on the ecophysiology of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill) Fluoranthene mists negatively affected tomato plants. *Chemosphere* 78: 877-884.

-Onianwa PC. 2001. Monitoring atmospheric metal pollution: a review of the use of mosses as indicators. *Environmental Monitoring and Assessment* 71: 13-50.

-Owczarek M., Guidotti M., Blasi G., De Simone C., De Marco A., Spadoni M. 2001. Traffic pollution monitoring using lichens as bioaccumulators of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Fresenius Environmental Bulletin* 10 (1): 42-45.

-Ozenda P., Clauzade G. 1970. Les lichens : étude biologique et flore illustrée. Paris : Masson, 801 p.

P

- Parent C., Capelli N., Dat J. 2008. Reactive oxygen species, stress and cell death in plants. *Comptes Rendus Biologies* 331 (4): 255-261.
- Pawlik-Skowronńska B., di Toppi LS., Favali MA., Fossati F., Pirszel J., Skowronski T. 2002. Lichens respond to heavy metals by phytochelatin synthesis. *New Phytologist* 156: 95-102.
- Peng Y., Gitelson AA. 2012. Remote estimation of gross primary productivity in soybean and maize based on total crop chlorophyll content. *Remote Sensing of Environment* 117 : 440-448.
- Peyron G. 2000. Cultiver le palmier dattier; Montpellier, Gridao, Diffusion « La librairie du Cirad ». 113p.
- Piccardo MT., Coradeghini R., Valerio F. 2001. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollution in Native and Caged Mussels. *Marine Pollution Bulletin* (42) 10: 951-956.
- Pillay AE., Williams JR., El Mardi MO., Al Lawati SMH., Al Hadabbi MH., Al Hamdi A. 2003. Risk assessment of chromium and arsenic in date palm leaves used as livestock feed. *Environment International* 29: 541-545.
- Pillay AE., Williams JR., El Mardi MO., Hassan SM., Al-Hadabbi MH., Al-Hamdi A. 2002. Monitoring of cadmium in “on” and “off” date palms. *Environment International* 28: 273-276.
- Pitcairns CER., Jeffree CE., Grace J. 1986. Influence of polishing and abrasion on the diffusive conductance of leaf surfaces of *Festuca arundinacea* Schreb. *Plant and Cell Environment* 9: 191-196.
- Puckett KJ. 1988. Bryophytes and lichens as monitors of metal deposition. In: Nash III, T.H., Wirth, W. (Eds.), Lichens, Bryophytes and Air Quality. *Bibl. Lichenol.* Vol. 30. Cramer in der Gebruder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Berlin, pp. 231-267.
- Purvis OW., Halls C. 1996. A review of lichens in metal-enriched environments. *Lichenologist* 28 : 571-601.

R

- Ramade F. 2007. Introduction à l'écotoxicologie fondements et applications, Editions TEC et DOC Lavoisier, 618p.
- Ramade F. 1982. Écologie appliquée, Eléments d'écologie. Editions TEC et DOC Lavoisier pp. 69-79.
- Ratola N., Lacorte S., Alves A., Barcelo D., 2006. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles by gas chromatography-mass spectrometry : Comparison of different extraction and clean-up procedures. *Journal of Chromatography (A)* 1114: 198-204.
- Re R., Pellegrini N., Proleggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26: 1231-1237.
- Reischl A., Reissinger M., Hutzinger O. 1987. Occurrence and distribution of atmospheric organic micropollutants in conifer needles. *Chemosphere* 16:2647-2652.
- Riedacker A et al., 1990. Physiologie des arbres et arbustes en zone aride, *John Libbey Eurotext* 323-324-325-327 p.
- Risom L., Møller P., Loft S. 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research* 592: 119-137.

-Rogge WF., Mazurek MA., Hildemann LM., Cass GR. 1993a. Quantification of urban organic aerosols at a molecular level: identification, abundance and seasonal variation. *Atmospheric Environment* 27: 1309-1330.

-Rotatori M., Cecinato A., Sbrilli A., Guerriero E., Bianchini M., Colamonici V., Gigliucci PF., Tamburo D., Tomasi Scianò MC. 2005. Modelli di distribuzione degli IPA nelle emissioni: uso dei "fingerprints" per la caratterizzazione delle sorgenti stazionarie. Risultati d'una indagine preliminare. In: Minoia, C., Valerio, F., Spezia, S., Turci, R. (Eds.), Benzene, Idrocarburi Policiclici Aromatici e Polveri Sottili. *New Press Publisher*, Como, Italy, pp. 73-82.

-Rouvillois-Brigol M. 1975. Le pays de Ouargla (Sahara Algérien) variation et organisation rurale en milieu désertique, Ed : Département de Garg, université de Sorbonne. 202p.

S

- Seinfeld JH., Pandis SN. 1998. Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change. *Wiley-Interscience*: 1326p.

-Sanitādi Toppi L., Marabottini R., Vattuone Z., Musetti R., Favali MA., Sorgonā A., Badiani M. 2005. Cell wall immobilization and antioxidant status of *Xanthoria parietina* thalli exposed to cadmium. *Functional Plant Biology* 32: 611-618.

-Sanitādi Toppi L., Musetti R., Marabottini R., Corradi MG., Vattuone Z., Favali MA., Badiani M. 2004. Responses of *Xanthoria parietina* thalli to environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium. *Functional Plant Biology* 31: 329-338.

-Scerbo R., Possenti L., Lampugnani L., Ristori T., Barale R., Barghigiani C. 1999. Lichen (*Xanthoria parietina*) biomonitoring of trace element contamination and air quality assessment in Livorno Province (Tuscany, Italy). *Science of the Total Environment* 241: 91-106.

-Scerbo R., Ristori T., Possenti L., Lampugnani L., Barale R., Barghigiani C. 2002. Lichen (*Xanthoria parietina*) biomonitoring of trace element contamination and air quality assessment in Pisa Province (Tuscany, Italy). *Science of the Total Environment* 286: 27-40.

-Schnelle-Kreis J., Gebefugi I., Welzl G., Jaensch T., Kettrup A. 2001. Occurrence of particle-associated polycyclic aromatic compounds in ambient air of the city of Munich. *Atmospheric Environment* 35 (supplement): 71-81.

-Schreiber L., Schonherr, J. 1992. Analysis of foliar uptake of pesticides in barley leaves: role of epicuticular waxes and compartmentation. *Pesticide Science* 36: 213-221.

-Sczepaniak K., Biziuk M. 2003. Aspects of the biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution. *Environmental Research* 93:221-230.

-Semadi A. 1989. Effet de la pollution atmosphérique, pollution globale, fluorée, plombique sur la végétation dans la région de Annaba (Algérie). Thèse de Doctorat en sciences naturelles : Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). 339 p.

-Sharma P., Jha BA., Dubey RS., Pessarakli M. 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damagemand Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. Hindawi Publishing Corporation. *Journal of Botany*. Article ID 217037. 26 pages.

-Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K. 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, N°272, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue, pp. 1305-1319, May 2002.

- Shukla V., Upreti DK. 2009. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in lichen, *Phaeophyscia hispidula* of DehraDun City, Garhwal Himalayas. *Environmental Monitoring and Assessment* 149: 1-7.
- Simonich SL., Hites RA. 1994a. Importance of vegetation in removing polycyclic aromatic hydrocarbons from the atmosphere. *Nature* 370: 49-51.
- Simonich SL., Hites RA. 1994b. Vegetation-atmosphere partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 28: 939-943.
- Sims R., Overcash MR. 1988. Fate of polynucleararomatic compounds (PNAs) in soil-plant system. *Residue Revision* 88:1-68.
- Sloof JE., De Bruin M., Wolterbeek H. Th. 1988. Critical evaluation of some commonly used biological monitors for heavy metal air pollution. In *Proc. Int. Conf. Environmental Contamination, Venice, 2988* (edited by Orio A. A.), pp. 296-298. CEP Consultants Ltd., Edinburgh.
- Sloof JE. 1993. Environment lichenology: biomonitoring trace-element air pollution. Thesis, Delft University of Technology, Delft. Netherlands.
- Sloof JE. 1994. Lichens as quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition, using transplants. *Atmospheric Environment* Vol. 29, No. 1: 11-20.
- Sojinu OS., Sonibare OO., Ekundayo O., Zeng EY. 2010. Biomonitoring potentials of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by higher plants from an oil exploration site, Nigeria. *Journal of Hazardous Materials* 184: 759-764.
- Soltani M. 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6. 284p.
- Sonatrach 2008; Atlas des pratiques d'exploitation Région de Hassi Messaoud, Stah, le lundi 30 juin 2008.
- Sonatrach 2011. Rapport d'Audit Environnemental du Sonatrach. BOOTS & COOTS en collaboration avec le cabinet ERM France. 27 janvier 2011 P 300.
- Srivastava OP., Van Huystee RB. 1977. IAA oxidase and polyphenol oxidase activities of peanut peroxidase isoenzymes. *Phytochemistry* 16: 1527-1530.
- Srogi K. 2007. Monitoring of Environmental Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review. *Environmental Chemistry Letters* 5(4): 169-195.
- Steinnes E. 1989. Biomonitors of air pollution by heavy metals. In *Control and Fate of Atmospheric Trace Metals* (edited by Pacyna J. M. and Ottar B.), pp. 321-338. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Stengel DB., Macken A., Morrison L., Motley N. 2004. Zinc concentrations in marine macro algae and lichen from Western Ireland in relation to phylogenetic grouping habitat and morphology. *Marine pollution Bulletin* 48: 902-909.
- Stephensen E., Sturve J., Forlin L. 2002. Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 133 (3): 435-442.
- Szczepaniak K., Biziuk M. 2003. Aspects of biomonitoring studies using mosses and lichens as indicators of metal pollution. *Environmental Research* 93: 221-230.

T

- Tabeaud M. 2000. La climatologie. Paris. 175p.
- Terral JF., Ivorra S., Tito C., Newton C., Tengberg M., Pintaud JC. 2010. De la diversité actuelle aux vestiges archéologiques du palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.). In : « Aberlenc-Bertossi F. Biotechnologies du palmier dattier ». IRD Editions. 127-135.

-Thomas R. 2011. Anatomie comparée des palmiers, Identification-assistée par ordinateur, Application en paléobotanique et en Archéobotanique. Thèse de doctorat du Muséum national d'histoire naturelle, 370 pages.

-Tipple BJ., Berke MA., Doman CE., Khachatryan S., Ehleringer JR. 2013. Leaf-wax n-alkanes record the plant-water environment at leaf flush. *Proceedings of National Academy of Sciences* 110: 2659-2664.

-Toutain G. 1979. Eléments d'agronomie saharienne: de la recherche au développement, Paris, Gret, INRA, 276p.

V

-Van Breusegem F., Dat JF. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death, *Plant Physiology* 141: 384-390.

-Van Gardingen PR., Grace J., Jeffree CE. 1991. Abrasive damage by wind to the needle surfaces of *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. and *Pinus sylvestris* L. *Plant Cell and Environment*. 14: 185-193.

-Van Haluwyn C., Lerond M. 1993. Guide des lichens. Paris, Lechevalier 344p.

-Van Vaeck L., Van Cauwenberghe K. 1978. Cascade impactor measurements of size distribution of the major classes of organic pollutants in atmospheric particulate matter. *Atmospheric Environment* 12: 2229-2239.

-Vanacker H., Garver TLW., Foyer CH. 1998. Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology* 117: 1103-1114.

-Vanova L., Kummerova M., Klems M., Zezulka S. 2009. Fluoranthene influences endogenous abscisic acid level and primary photosynthetic processes in pea (*Pisum sativum* L.) plants in vitro. *Plant Growth Regulation* 57: 39-47.

-Vanova L., Kummerova M., Votrubova O. 2011. Fluoranthene-induced production of ethylene and formation of lysigenous intercellular spaces in pea plants cultivated in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 1037-1042.

-Venkataraman C., Lyons JM., Friedlander SK. 1994. Size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and elemental carbon. 1. Sampling, measurement methods and source characterization. *Environmental Science and Technology* 28: 555-562.

-Venkataraman, C., Friedlander, S.K., 1994. Size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons and elemental carbon. 2. Ambient measurements and effects of atmospheric processes. *Environmental Science and Technology* 28: 563-572.

-Vidal ML., Narbonne JF. 2000. Characterization of glutathione S-transferase activity in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 64:455-462.

-Villeneuve J., Fogelqvist E., Cattini C. 1988. Lichens as bioindicators for atmospheric pollution by atmospheric pollution by chlorinated hydrocarbons. *Chemosphere* 17:399-403.

W

-Wang YQ., Tao S., Jiao XC., Coveney RM., Wu SP., Xing BS. 2008. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Leaf Cuticles and Inner Tissues of Six Species of Trees in Urban Beijing. *Environmental Pollution* 151: 158-164.

-Watts A., Ballesteros T., Gardner K. 2006. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in salt marsh plants *Spartina alterniflora* grown in contaminated sediments. *Chemosphere* 62: 1253-1260.

-White KL. 1986. An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Carcinogen Research* 2: 163-202.

-Wieczorek JK., Wieczorek ZJ. 2007. Phototoxicity and accumulation of anthracene applied to the foliage and sandy substrate in lettuce and radish plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 369-377.

-Wild E., Dent J., Thomas GO., Jones KC. 2006. Visualizing the Air-to-Leaf Transfer and within-Leaf Movement and Distribution of Phenanthrene: Further Studies Utilizing Two-Photon Excitation Microscopy. *Environmental Science and Technology* 40(3): 907-916.

-Wild SR., Jones KC. 1995. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environmental Pollution* 88: 91-108.

Williams JR., Pillay AE., El Mardi MO., Al-Lawati SMH., Al-Hamd A. 2005. Levels of selected metals in the Fard cultivar (date palm). *Journal of Arid Environments* 60: 211-225.

-Williams JR., Pillay AE. 2011. Metals, Metalloids and Toxicity in Date Palms: Potential Environmental Impact. *Journal of Environmental Protection* 2: 592-600.

-Wolterbeek B. 2002. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution* 120: 11-21.

-Wolterbeek HT., Garty J., Reis MA., Freitas MC. 2003. Biomonitoring in use: lichens and metal air pollution. In: Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (Eds.), *Bioindicators & Biomonitoring, Principles, Concepts and Applications*. Elsevier, Amsterdam, pp. 377-419.

Y

-Yang Z., Zhu L., 2007. Performance of the partition-limited model on predicting ryegrass uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere* 67: 402-409.

-Yassaa N., Meklati BY., Brancaloni E., Frattoni M., Ciccioli P. 2001b. Polar and non-polar volatile organic compounds (VOCs) in urban Algiers and saharian sites of Algeria. *Atmospheric Environment* 35: 787-801.

-Yassaa N., Meklati BY., Cecinato A. 2001c. Chemical characteristics of organic aerosols in Algiers city area. Influence of a fat manufacture plant. *Atmospheric Environment* 35: 6003-6013.

-Yassaa N., Meklati BY., Cecinato A., Marino F. 2001a. Organic aerosols in urban and waste landfill of Algiers metropolitan area: occurrence and sources. *Environmental Science and Technology* 35 : 306-311.

-Yassaa N., Meklati BY., Cecinato A., Marino F., Balducci C. 2001d. Organic content of particulate matter in the atmosphere of Ouargla city, Algeria. *Annali di Chimica* 91: 577-585.

-Yassaa N., Cecinato A. 2005. Composition of torched crude oil organic particulate emitted by refinery and its similarity to atmospheric aerosol in the surrounding area. *Chemosphere* 60: 1660-1666.

-Yassaa N., Ciccioli P., Brancaloni E. 2011. Ambient measurements of selected VOCs in populated and remote sites of the Sahara desert. *Atmospheric Research* 100: 141-146.

-Yousif AK., Benjamin ND., Kado A., Alddin SM., Ali SM. 1982. Chemical composition of four Iraqi date cultivars. *Date Palm Journal* 1: 285-294.

-Yu MH. Tsunoda H. 2005. *Environmental toxicology: Biological and health effects of pollutants*. CRC Press. Boca Raton. Florida.

-Yunker MB., Macdonald RW., Vingarzan R., Mitchell RH., Goyette D., Sylvestre S. 2002. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry* 33(4):489-515.

Z

-Zechmeister HG., Grodzinska K., Szarek-Lukaszewska G. 2003. Bryophytes. In: Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G. (Eds.), *Bioindicators/Biomonitoring (Principles, Assessment, and Concepts)*. Elsevier, *Amsterdam*, pp. 329-374.

Résumés

Résumé

L'objectif de l'étude était d'évaluer l'impact de la pollution atmosphérique due aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans la région de Ouargla sur deux modèles végétaux en vue de leur utilisation potentielle comme espèce sentinelle. Le premier modèle appartient aux lichens, connus comme sensibles à des doses infimes de polluants et utilisés comme bioindicateurs. Le second est le palmier dattier, une espèce pérenne, locale et adaptée aux conditions climatiques de la zone d'étude.

L'espèce lichénique, *Xanthoria parietina* a été transplantée dans 3 stations de la wilaya de Ouargla, Hassi Messaoud (HMD), Haoud Berkaoui (HBK) et Ouargla centre (OGX). Une augmentation suivie d'une diminution de la teneur en composés solubles dans l'hexane après transplantation a été mise en évidence. Les lichens de la station de HMD présentent les valeurs les plus élevées par rapport aux autres stations. Globalement, le rapport MF/MS diminue pendant l'expérimentation, surtout pour HMD. La teneur en chlorophylle diminue pour les 3 stations. Cependant, si l'accumulation de composés solubles dans l'hexane est plus probablement liée à la pollution, la chute du rapport MF/MS est quant à elle plutôt liée à la déshydratation des thalles sous l'effet de la chaleur. En conséquence, la suite du travail s'est focalisée sur une espèce locale, le palmier dattier (*Phoenix dactylifera L.*), bien répandue et pouvant servir de sentinelle.

Trois stations ont été échantillonnées, Ain Moussa (AM), Haoud Berkaoui (HBK) et Hassi Ben Abdallah (HBA). Une étude préliminaire au niveau de l'air (filtres) et du sol (sable) des stations échantillonnées, a montré la présence de 3 HAP : le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène avec des teneurs de l'ordre de 2 à 8 ng/g de sol. Ces 3 HAP sont également présentes dans les palmiers du palmier dattier pour des teneurs entre 15 et 35 ng/g de matière sèche. Leurs concentrations relatives varient d'une palmeraie à une autre, d'un HAP à l'autre et selon l'orientation. L'effet de la position des palmiers dans la palmeraie sur la teneur en HAP a aussi été démontré et peut être mis en relation avec l'orientation des vents dominants.

Ces données ont été corrélées à plusieurs marqueurs biologiques mesurés sur les palmiers. Toutefois, au préalable, il a été nécessaire de mieux connaître le modèle biologique et de déterminer quelle était la couronne de palmiers la plus judicieuse pour suivre les marqueurs biologiques. Un suivi de la teneur en pigments et de marqueurs du stress oxydant a donc été réalisé sur les 5 couronnes de 27 palmiers. Suivant les enzymes, l'activité est maximale dès la première année de croissance (glutathion peroxydase, glutathion réductase, glutathion peroxydase), à 3 ans de croissance (glutathion S-transférase) ou en fin de vie (superoxyde dismutase).

Une corrélation entre la teneur en pigments et les teneurs en HAP a été mise en évidence pour HBK et AM sur la couronne de palmiers retenue pour la suite de l'étude. Ainsi, les pigments se sont révélés de bons marqueurs pour identifier l'impact des HAP. Il n'a pas été possible de mettre en évidence de lien entre les activités antioxydantes et la teneur en HAP. Les marqueurs du stress oxydant ainsi que les GST ne présentent aucune corrélation significative avec la teneur en HAP pour les 3 stations d'échantillonnage. Les GST, impliqués dans la détoxification, sont plus élevés à Hassi Ben Abdallah (HBA) où l'on a pu mettre en évidence les teneurs les plus élevées en HAP. Par ailleurs, l'effet des HAP semble induire un comportement différent des palmiers suivant la source de la pollution.

L'examen des cires épicuticulaires au microscope électronique à balayage a montré la présence de structures de protection, une croûte couvrant toute la surface des palmiers, surmontée de cires épicuticulaires en forme de bâtonnets. Par ailleurs, ces cires contiennent les 3 HAP avec des teneurs similaires à celles quantifiées dans les palmiers pour HBA. Cela suggère que les HAP se déposent à la surface des palmiers du palmier dattier. Elles sont ainsi en partie localisées dans les cires et seule une petite partie traverserait la cuticule pour passer dans le mésophile.

Summary

The objective of the study was to evaluate the impact of air pollution from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Ouargla's region on two plant models for their potential use as sentinel species. The first model is for lichens, known as sensitive to small doses of pollutants and used as bio-indicators. The second one is the date palm, a perennial species, local and adapted to climatic conditions of the study area.

The lichen species, *Xanthoria parietina* was transplanted into three stations of the province of Ouargla, Hassi Messaoud (HMD), Haoud Berkaoui (HBK) and center of Ouargla (OGX). An increase followed by a decrease of the soluble content in the hexane after transplantation has been demonstrated. Lichens of HMD station have the highest values compared to other stations. Overall, the MF / MS ratio decreases during the experiment, especially for HMD. Chlorophyll content decreases for the three stations. However, if the accumulation of soluble compounds in hexane is most likely related to pollution, the collapse of MF / MS ratio is itself rather related to dehydration frond under the effect of heat. Accordingly, further work has focused on a local species, the date palm (*Phoenix dactylifera* L.), although widespread and can serve as sentinel.

Three stations were sampled, Ain Mousa (AM), Haoud Berkaoui (HBK) and Hassi Ben Abdallah (HBA). A preliminary study at the air level (filters) and soil (sand) of the sampled stations, showed the presence of 3 PAHs: phenanthrene, fluoranthene and pyrene with grades in the range of 2 to 8 ng / g soil. These 3 PAHs are also found in the palms of the date palms for contents between 15 and 35 ng / g dry matter. Their relative concentrations vary from one palm grove to another, a PAH to another and depending on the orientation. The effect of the position of the date palm in the grove on the PAH content was also shown and can be correlated with the direction of the prevailing wind.

These data were correlated to several biomarkers measured on the palms. However, previously it was necessary to better know the biological model and determine which was the crown of the wisest palms to track biomarkers. Monitoring the pigment content and markers of oxidative stress has been made on the 5 rings of 27 palm date. Following enzymes, activity is highest in the first year of growth (guaiacol peroxidase, glutathione reductase, glutathione peroxidase), 3 years of growth (glutathione S-transferase) or end of life (superoxide dismutase).

A correlation between the pigment content and PAH was demonstrated for HBK and AM on the crown of palms retained for further study. Thus, pigments proved good markers to identify the impact of PAHs. It was not possible to identify a link between antioxidant activities and the PAH content. Markers of oxidative stress and the GST are not significantly correlated with PAH content for 3 sampling stations. The GST, involved in detoxification, are higher in Hassi Ben Abdallah (HBA) where we could highlight the high levels of PAH. Furthermore, the effect of PAH appears to induce different behavior date palms following the source of the pollution.

Examination of the epicuticular waxes by scanning electron microscope showed the presence of protective structures, a crust covering the entire surface of the palms, surmounted by epicuticular waxes in the form of sticks. Moreover, these waxes contain 3 PAHs with similar grades to those quantified in palms for HBA. This suggests that PAHs are deposited on the surface of the date palm palms. They are thus partially localized in waxes and only a small part would cross the cuticle to pass in the mesophilic.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو تقييم تأثير التلوث الجوي من الهيدروكربونات العطرية متعددة الحلقات (في منطقة ورقلة باستعمال نموذجين من النباتات لاستخدامهم المحتمل كأنواع دالة. النموذج الأول هو الأشنات و المعروفة بحساسيتها لجرعات صغيرة من الملوث و استخدامها كمؤشرات حيوية. و الثاني هو النخيل, ككونها نوع معمر, محلية و لتكيفها مع الظروف المناخية لمنطقة الدراسة.

نوع الأشنات (*Xanthoria parietina*) الذي ازدرع في ثلاث محطات لولاية ورقلة، حاسي مسعود (HMD)، حوض بركاوي (HBK) ومركز ورقلة (OGX)، أظهرت تغيرات في مستويات المركبات القابلة للذوبان في الهكسان (CSH) وذلك بارتفاع ثم انخفاض على مر الزمن. الأشنات في محطة HMD تحتوي على أعلى المستويات مقارنة الي المحطات الأخرى . بشكل عام نسبة المادة الطرية على المادة الجافة (MF/MS) تنخفض خلال التجربة و خاصة في محطة (HMD)، كما لوحظ انخفاض محتوى الكلوروفيل في المحطات الثلاث. ومع ذلك، إذا كان تراكم المركبات القابلة للذوبان في الهكسان يرتبط بالتلوث، فمن الأرجح ان انخفاض نسبة MF/MS هو في حد ذاته نتيجة جفاف الاشنات تحت تأثير الحرارة. وفقا لذلك, ركز مزيد من العمل على الأنواع المحلية, نخيل التمور (*Phoenix dactylifera L.*) واسعة النطاق و يمكن ان تكون بمثابة الدالة.

أخذت عينات على مستوى الهواء (المرشحات) و التربة (الرمل) من ثلاثة محطات و هي : عين موسى (AM) , حوض بركاوي (HBK) و حاسي بن عبدالله (HBA), و أظهرت نتائج الدراسة الأولية وجود 3 هيدروكربونات عطرية متعددة الحلقات (HAP), فينانتران, فليرونتان و بيران مع الدرجات من 2 الى 8 نانوغرام/ غرام من التربة و كما تم العثور على هذه المكونات في أوراق النخيل بمحتويات تتراوح بين 15 و 35 نانوغرام/غرام من المادة الجافة. تركيزاتهم النسبية تختلف من غابة إلى أخرى ومن (HAP) إلى آخر وحسب الاتجاه, ويظهر أيضا تأثير موضع النخيل داخل غابة النخيل على محتوى (HAP) ويمكن أن يرتبط مع اتجاه الرياح السائدة. هذه البيانات ارتبطت مع العديد من المؤشرات الحيوية التي قيست على مستوى أوراق النخيل ومع ذلك كان من الضروري معرفة أفضل نموذج بيولوجي وتحديد اي تاج من أوراق النخيل الأحسن لاتباع المؤشرات الحيوية سابقا. مراقبة محتوى الصباغ وعلامات الاجهاد التأكسدي الذي تم احرازه في 5 تيجان من 27 نخلة على حسب الإنزيمات , بين ان النشاط الأعلى في السنة الأولى من النمو (glutathion peroxydase, glutathion reductase, glutathion S-transférase) أو في نهاية الحياة (superoxyde dismutase).

لوحظ وجود علاقة بين محتوى الصباغ و (HAP) في محطة (AM) و(HBK) على مستوى التاج الذي تم الاحتفاظ به لما تبقى من الدراسة. وهكذا أثبتت الأصباغ أنها علامات جيدة للتعرف على تأثير (HAP) بينما لم يكن من الممكن تحديد وجود علاقة بين الأنشطة المضادة للأكسدة ومضمون (HAP) , كما لم يظهر وجود ارتباط كبير بين محتوى (HAP) و علامات الإجهاد التأكسدي و كذلك (GST) على مستوى المحطات الثلاث . GST المشاركة في ازالة السموم , أعلى في حاسي بن عبد الله (HBA) حيث يمكننا تسليط الضوء على مستويات عالية من HAP, وعلاوة على ذلك يظهر تأثير HAP للحث على مختلف سلوك أشجار النخيل حسب مصدر التلوث.

أظهرت دراسة الشموع السطحية باستعمال المجهر الالكتروني للمسح , وجود هياكل واقية, قشرة تغطي كامل سطح أوراق النخيل تعلوها الشموع السطحية في شكل العصى . وعلاوة على ذلك, فإن هذه الشموع تحتوي على 3 (HAP) مع درجات مماثلة لتلك التي تم العثور عليها في أوراق النخيل لمحطة (HBK), وهذا يوحي بأن (HAP) تترسب على سطح أوراق النخيل فقط. وبالتالي جزء منها متركز في الشموع وجزء صغير منها يعبر البشرة ليمر إلى البشرة المتوسطة.

Publications

PhytoChem & BioSub Journal

Peer-reviewed research journal on Phytochemistry & Bioactives Substances

ISSN 2170 - 1768



PCBS Journal

Volume 7 N° 1, 2 & 3

2013

PhytoChem & BioSub Journal (PCBS Journal) is a peer-reviewed research journal published by Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory. The PCBS Journal publishes innovative research papers, reviews, mini-reviews, short communications and technical notes that contribute significantly to further the scientific knowledge related to the field of Phytochemistry & Bioactives Substances (Medicinal Plants, Ethnopharmacology, Pharmacognosy, Phytochemistry, Natural products, Analytical Chemistry, Organic Synthesis, Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Chemistry, Biochemistry, Computational Chemistry, Molecular Drug Design, Pharmaceutical Analysis, Pharmacy Practice, Quality Assurance, Microbiology, Bioactivity and Biotechnology of Pharmaceutical Interest)

It is essential that manuscripts submitted to PCBS Journal are subject to rapid peer review and are not previously published or under consideration for publication in another journal. Contributions in all areas at the interface of Chemistry, Pharmacy, Medicine and Biology are welcomed.

Editor in Chief

Pr Abdelkrim CHERITI

Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory

Co-Editor

Dr Nasser BELBOUKHARI

Bioactive Molecules & Chiral Separation Laboratory

University of Bechar, 08000, Bechar, Algeria

Editorial Board

Afaxantidis J. (France), Akkal S. (Algeria), Al Hamel M. (Morocco), Al Hatab M. (Algeria), Aouf N. (Algeria), Asakawa Y. (Japan), Atmani A. (Morocco), Awad Allah A. (Palestine), Azarkovitch M. (Russia), Baalioumer A. (Algeria), Badjah A.Y. (KSA), Balansard G. (France), Barkani M. (Algeria), Belkhiri A. (Algeria), Benachour D. (Algeria), Ben Ali Cherif N. (Algeria), Benayache F. (Algeria), Benayache S. (Algeria), Benharathe N. (Algeria), Benharref A. (Morocco), Bennaceur M. (Algeria), Bensaid O. (Algeria), Berada M. (Algeria), Bhalla A. (India), Bnouham M. (Morocco), Bombarda E. (France), Boucekara M. (Algeria), Boukebouz A. (Morocco), Boukir A. (Morocco), Bressy C. (France), Chehma A. (Algeria), Chemat F. (France), Chul Kang S. (Korea), Dadamoussa B. (Algeria), Daiche A. (France), Daoud K. (Algeria), De la Guardia M. (Brazilia), Dendoughi H. (Algeria), Derdour A. (Algeria), Djafri A. (Algeria), Djebar S. (Algeria), Djebli N. (Algeria), Dupuy N. (France), El Abed D. (Algeria), EL Achouri M. (Morocco), Ermel G. (France), Esnault M. A. (France), Govender P. (South Africa), Jouba M. (Turkey), Hacini S. (Algeria), Hadj Mahamed M. (Algeria), Halilat M. T. (Algeria), Hamed El Yahia A. (KSA), Hamrouni A. (Tunisia), Hania M. (Palestine), Iqbal A. (Pakistan), Gaydou E. (France), Ghanmi M. (Morocco), Gharabli S. (Jordan), Gherraf N. (Algeria), Ghezali S. (Algeria), Gouasmia A. (Algeria), Greche H. (Morocco), Kabouche Z. (Algeria), Kacimi S. (Algeria), Kajima J.M. (Algeria), Kaid-Harche M. (Algeria), Kessat A. (Morocco), Khelil-Oueld Hadj A. (Algeria), Lahreche M.B. (Algeria), Lanez T. (Algeria), Leghseir B. (Algeria), Mahiuo V. (France), Marongu B. (Italia), Marouf A. (Algeria), Meddah B. (Morocco), Meklati F. (Algeria), Melhaoui A. (Morocco), Merati N. (Algeria), Mesli A. (Algeria), Mushfik M. (India), Nefati M. (Tunisia), Ouahrani M. R. (Algeria), Oueld Hadj M.D. (Algeria), Pons J.M. (France), Radi A. (Morocco), Rahmouni A. (Algeria), Raza Naqvi S. A. (Iran), Reddy K.H. (South Africa), Reza Moein M. (Iran), Rhouati S. (Algeria), Roussel C. (France), Saidi M. (Algeria), Salgueiro L.D (Portugal), Salvador J. A. (Spain), Seghni L. (Algeria), Sharma S. (India), Sidiqi S. K. (India), Sour E. (Turkey), Tabti B. (Algeria), Taleb S. (Algeria), Tazerouti F. (Algeria), Vantune N. (France), Villemin D. (France), Yayli N. (Turkey), Youcefi M. (Algeria), Ziyat A. (Morocco), Zouieche L. (Algeria), Zyoud H. (Palestine).

PhytoChem & BioSub Journal

Peer-reviewed research journal on Phytochemistry & Bioactives Substances

ISSN 2170 - 1768

PCBS Journal

*PCBS
Journal*

Volume 7 N° 2

2013



Edition LPSO
Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory
<http://www.pcbsj.webs.com> , Email: phytochem07@yahoo.fr

Bio surveillance de la pollution de l'air à l'aide du lichen *Xanthoria parietina*.

KHELIL R.*, KHELIL A.*, DADAMOUSA B.*, CABELLO-HURTADO F.** & ESNAULT M.A.**

* *Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-Arides*
Université Kasdi Merbah, , BP 511, 30000 Ouargla, Algérie

** *UMR Ecobio 6553, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France*

Received: April 14, 2013; Accepted: June 06, 2013

Corresponding author Email rkhelil2002@yahoo.fr

Copyright © 2013-POSL

Résumé- Notre travail a porté sur la biodétection de la pollution atmosphérique par les hydrocarbures dans 3 stations de la wilaya de Ouargla en zone Saharienne Algérienne, Hassi Messaoud (HMD), Haoud Berkaoui (HBK) et Ouargla centre (OGX). Les lichens prélevés sur leur support dans le nord de l'Algérie ont été utilisés comme modèle biologique pour évaluer les effets de cette pollution. Les teneurs en composés solubles dans l'hexane (CSH) dans les transplants lichéniques augmentent puis diminuent au cours du temps, tout en présentant des variations entre les 3 stations. Les lichens de la station de HMD présentent les valeurs les plus élevées par rapport aux autres stations. Globalement, le rapport MF/ MS diminue pendant l'expérimentation, surtout pour HMD. Pour ce qui concerne la teneur en chlorophylle, elle diminue pour les 3 stations. Les modifications observées au cours du temps pourraient avoir pour origine deux facteurs, la pollution d'une part et la déshydratation des thalles sous l'effet de la chaleur d'autre part. Si l'accumulation de composés solubles dans l'hexane est plus probablement à relier à la pollution, la chute du rapport MF/ MS est quant à elle plutôt liée à la déshydratation.

Mots-clés : lichen, transplantation, pollution atmosphérique, désert, hydrocarbures

Biomonitoring air pollution with the lichen *Xanthoria parietina*

Abstract- Our work focused on biodetection of air pollution by hydrocarbons in three stations of the Wilaya of Ouargla in Algerian Sahara namely, Hassi Messaoud (HMD), Haoud Berkaoui (HBK) and the center of Ouargla (OGX). We used lichens from the north of Algeria as biological model after transplantation in order to evaluate the effects of this pollution. The levels of hexane soluble compounds (CSH) exhibit variation (broadly increasing then decreasing) over time for all three stations taking into account that the station HMD presents the highest values compared to other stations. The ratio MF/ MS reveals fluctuating but more or less declining values especially for HMD. Generally a decrease in this ratio at the end of the experiment is observed. With regard to chlorophyll content, we record the decrease of chlorophyll for the three stations. The variations in the different contents are probably due to two factors, pollution on the one hand notably for CSH, and dehydration of thalli under the effect of heat on the other hand for MF/ MS notably.

Keywords: lichen, transplantation, atmospheric pollution, desert, hydrocarbon

Introduction

L'augmentation des phénomènes de pollution environnementale impliquant des conséquences sanitaire et économique ont conduit à une prise de conscience politique stimulant la recherche de moyens pour les détecter et les réduire. Ces pollutions génèrent des perturbations chez les êtres vivants (Yu et Tsunoda, 2005) et dans les compartiments abiotiques fondamentaux (eau, sol, atmosphère).

L'exploitation des gisements de pétrole qui n'a cessé d'augmenter depuis le début du siècle dernier entraîne des risques de pollution (accidentelle et chronique) pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème (Soltani, 2004). La nécessité d'estimer les quantités présentes, de contrôler l'accumulation des produits pétroliers, leur transformation et leur devenir, comme d'en estimer l'impact sur la flore, la faune et l'environnement devient une priorité. Toutefois, les processus d'analyse des compartiments abiotiques sont lourds et onéreux à mettre en oeuvre (Sanderson *et al.*, 2004). C'est pourquoi la recherche d'espèces bioindicatrices et/ou bioaccumulatrices fait l'objet de nombreux travaux (Wolterbeek, 2002 ; Guidotti *et al.*, 2003).

Les bioindicateurs sont définis comme des organismes qui répondent à un certain niveau de pollution par un changement dans leur cycle de vie ou par l'accumulation d'un polluant particulier. Garrec et Van Haluwyn (2002) définissent la biosurveillance végétale comme l'utilisation d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution. Pour l'évaluation de la pollution de l'air, les organismes ou organes bioindicateurs et/ou bioaccumulateurs les plus communément appliqués sont les aiguilles de pin (Migaszewski *et al.*, 2002), les algues marines (Stengel *et al.*, 2004), les lichens et les mousses (Gerdol *et al.*, 2002a et b ; Migaszewski *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Ra *et al.*, 2005). Les lichens sont très dépendants de la qualité de l'air et des eaux de pluie d'où ils tirent leur alimentation. Peu sensibles aux pics de pollution, ce sont des organismes intégrateurs d'une pollution de fond (Deruelle et Lallemand, 1983). Ils peuvent donc informer sur la qualité moyenne de l'air. Ils ont été largement testés comme bioindicateurs et/ou bioaccumulateurs de la pollution atmosphérique au cours des 40 dernières années depuis les travaux de Hawksorth et Rose en 1970 comme indicateurs de la concentration en SO₂ (Calatayud *et al.*, 1996 ; Garty *et al.*, 1993 ; Thomas *et al.*, 1995). Récemment, les lichens ont été utilisés pour la biosurveillance de la contamination par les oligo-éléments en Italie, dans la Province de Pise (Scerbo *et al.*, 2002) et en Vénétie (Nimis *et al.*, 2000 ; 2001), pour étudier l'effet de la pollution liée aux activités industrielles en Argentine (Gonzales *et al.*, 1996), de la contamination par les métaux lourds en zone subarctique (Thomas *et al.* 1995 ; Poblet *et al.*, 1997) et pour la détermination de la concentration en zinc dans l'Ouest de l'Irlande (Stengel *et al.*, 2004) et en Finlande (Takala *et al.*, 1998). Ils ont également été choisis comme bioindicateurs des hydrocarbures aromatiques totaux (HAP) (Migaszewski *et al.*, 2002) et se sont révélés accumuler des concentrations de HAP plus élevées que les aiguilles de pins (Augusto *et al.*, 2010)..

La wilaya de Ouargla en Algérie est située dans le bassin principal de production des hydrocarbures avec deux grands champs pétroliers, au niveau de Hassi Messaoud d'une part et Haoud Berkaoui d'autre part. Entre ces deux zones pétrolières se trouve la ville de Ouargla considérée comme l'une des plus grande Oasis du Sahara Algérien. Elle occupe le centre d'une cuvette (Rouvillois-Brigol, 1975) et se trouve donc confrontée aux problèmes de pollution par les hydrocarbures.

Notre objectif était donc de rechercher une espèce végétale pouvant être bioindicatrice des niveaux de concentration en hydrocarbures totaux dans un contexte de biosurveillance. Pour cette première approche à Ouargla, notre choix s'est porté sur un lichen connu comme

bioindicateur qui a été transplanté dans la région de Ouargla afin d'évaluer son utilisation potentielle sur un court terme (quelques mois). L'étude a été faite dans trois zones, au niveau des champs pétroliers de Hassi Messaoud et Haoud Berkaoui proprement dits, et au niveau de la cuvette de la ville de Ouargla soumise aux pollutions liées à la circulation routière par ailleurs.

Matériel et méthodes

Sites d'échantillonnage et de transplantation

L'étude a été réalisée sur 3 ans pour des contraintes logistiques : Hassi Messaoud (HMD) en 2004, Ouargla (OGX) en 2005 et Haoud Berkaoui (HBK) en 2006. Aucun lichen de grande taille n'étant présent dans cette région saharienne, nous avons choisi d'introduire une espèce bien répandue dans les forêts du nord de l'Algérie. Cette méthode avait l'avantage de permettre une introduction de l'espèce sur son support donc sans léser l'échantillon. L'objectif était de déterminer si dans ces conditions, l'espèce pouvait continuer à se développer un temps suffisant sous un climat saharien pour être une espèce utilisable en bioindication ainsi que son potentiel comme bio-indicateur.

L'espèce lichénique retenue est une espèce largement répandue, récoltée au niveau de la région d'El Chut (Annaba) considérée comme une région non polluée. Il s'agit du *Xanthoria parietina* (L.) Th., espèce à thalle foliacé, nitrophile se développant sur différents phorophytes et notamment sur *Ceratonia siliqua* L. (caroubier) qui a été retenu pour la transplantation. Les branches recouvertes de thalles ont été prélevées puis fixées à l'aide d'une ficelle à une hauteur de 1,5 m du sol sur divers supports dans les trois zones de travail.

Pour mieux connaître les niveaux de pollution, il est important de mettre en place un réseau de zones de transplantation en essayant de choisir des sites en nombre suffisant et correctement répartis autour de la source de pollution. Le nombre de sites doit être plus important sous les vents dominants et plus réduits dans les autres directions (Semadi, 1989). Cinq à huit sites ont été utilisés pour les 3 stations (Tableau 1). Les résultats présentés donnent une valeur moyenne obtenue pour tous les sites dans chaque station.

Tableau 1. Listes des sites d'échantillonnage pour les 3 stations

Stations	Désignation des sites						Total de sites
HMD	CINA (3 sites)	Zone industrielle	Cité des 1850 logements	Cité des 136 logements	Bouamama	Cité des 1666 logements	8
OGX	Ouargla (2 sites)	Sokra	Ain Beida	Sidi Khouiled	Hassi Ben Abdellah	N'Goussa	7
HBK	Zone des torches	L'espace séminaire	Base de vie	Ben Kahla	Guellala	//	5

HMD : Hassi Messaoud, OGX : Ouargla, HBK : Haoud Berkaoui
CINA : Centre Industriel Naili Abdelhalim Nord

Prélèvements des échantillons

A chaque échantillonnage ou prélèvement, une partie des thalles est détaché du phorophyte à l'aide d'un couteau. Les échantillons sont placés dans des sachets en plastique, fermés afin de limiter les pertes d'eau par évapotranspiration jusqu'à l'arrivée au laboratoire.

Les prélèvements ont eu lieu tous les 15 jours ou 30 jours pour l'ensemble des sites et des stations et sur 3 mois. Les thalles transplantés sont tous prélevés le même jour pour tous les sites d'une même station. Ils sont conservés au maximum 24 h dans une boîte hermétiquement fermées afin de limiter l'évapotranspiration avant analyses.

Techniques analytiques

Les **composés solubles dans l'hexane (CSH)** sont obtenus à l'aide d'un dispositif d'extraction dit "soxhlet". La phase organique présente dans la masse biologique est ainsi extraite dans le solvant organique (N-hexane).

Dans une cartouche en cellulose préalablement conditionnée à l'hexane (pendant 4 heures), 0.5 g de thalles de lichens sont additionnés de 1g de sulfate de sodium anhydre qui permet d'éliminer toute trace d'eau. L'extraction en elle-même est effectuée avec 100 mL de N-hexane. Le tout est mis dans l'extracteur soxhlet placé sur une plaque chauffante à la température d'ébullition du N-hexane, durant 3 à 4 heures. Une éprouvette contenant une solution concentrée de NaOH, est reliée au dispositif d'extraction par un tuyau servant à l'échappement des gaz toxiques.

Après extraction, les composés sont quantifiés dans un creuset par gravimétrie. L'hexane est évaporé au bain-marie puis dans un dessiccateur contenant du gel de silice pendant 30 min. La teneur en composés solubles dans l'hexane est exprimée en mg par g de matière sèche de thalle lichénique.

Malgré la possibilité de pertes des hydrocarbures légers suite à l'évaporation du solvant, l'emploi de cette méthode est accepté quand il s'agit de quantifier les hydrocarbures totaux existant dans une zone à forte concentration en ces mêmes éléments (Quevauviller, 2001 in Rouidi, 2001).

La **matière sèche (MS)** des échantillons est déterminée après passage à l'étuve à 105°C pendant 24 heures pour déterminer le rapport MF/MS (matière fraîche/matière sèche).

La **quantification de la chlorophylle** a été réalisée en utilisant la méthode établie par Lichtenthaler et Wellburn (1983). Pour cela, 0.5 g de thalle sont pesés puis broyés au mortier en présence de 5 ml d'acétone à 80%. Le mélange obtenu est centrifugé 15 min à 4100 tours.min⁻¹, puis le surnageant est récupéré. L'absorbance (A) est mesurée au spectromètre à 663 nm et 665 nm. Les équations suivantes sont utilisées pour calculer les quantités de chlorophylle a, b (Ca, Cb) :

□□ Teneur en chlorophylle a (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$) : **Ca = 12,21 A663 – 2,81 A645**

□□ Teneur en chlorophylle b (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$) : **Cb = 20,13 A645 – 5,03 A663**

□□ Teneur en chlorophylle totale (en $\mu\text{g.mL}^{-1}$) : **C = Ca + Cb**

RESULTATS

Variations des teneurs en composés solubles dans l'hexane (CSH).

Lors de leur installation, les lichens prélevés dans une zone considérée saine possédaient une quantité de 5600 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de matière sèche de CSH pour l'essai à Hassi Messaoud, 2000 $\mu\text{g.g}^{-1}$ pour l'essai à Ouargla et 3400 $\mu\text{g.g}^{-1}$ à Haoud Berkaoui. Après transplantation, quelque soit la date de prélèvement les teneurs en CSH dépassent celles de l'échantillon témoin et fluctuent dans le temps (Figure 1).

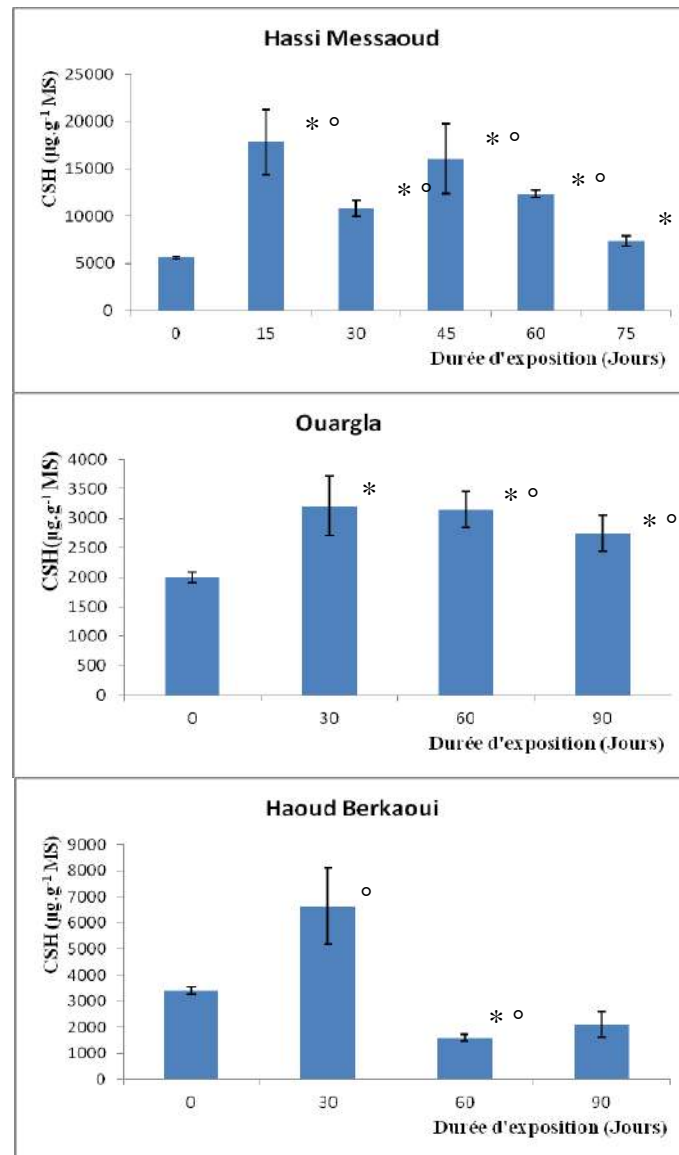


Figure 1 : Evolution des teneurs en composés solubles dans l'hexane (CSH) aux différents temps de prélèvement dans les différentes stations. La barre sur les histogrammes correspond à l'écart standard à la moyenne. Un test de student (*) et un test de Mann-Whitney (°) ont été utilisés pour comparer les mesures par rapport au témoin ($p < 0,05$).

Les lichens accumulent les CSH en fonction de la durée d'exposition jusqu'à une certaine limite. Ainsi, à Hassi Messaoud, le maximum d'accumulation est atteint après 15 jours d'exposition avec une teneur moyenne de $17825 \mu\text{g.g}^{-1}$ soit une augmentation d'un facteur 3,1. A Ouargla, le maxima de $3210 \mu\text{g.g}^{-1}$ correspond à une augmentation d'un facteur 1,6. A Haoud Berkaoui, il est de $6640 \mu\text{g.g}^{-1}$ soit une augmentation de 1,9. Après ce maxima, il y a globalement une diminution des teneurs. En fin d'expérimentation, celles-ci tendent à un retour aux valeurs initiales (respectivement 7325 , 2743 et $2120 \mu\text{g.g}^{-1}$). On peut observer des variations plus fines dans la station de Hassi Messaoud pour laquelle les récoltes ont été faites tous les 15 jours.

Variation du rapport MF/MS

Le rapport MF/MS diminue durant toute l'expérimentation essentiellement pour HMD et Ouargla. Les rapports évoluent toutefois assez peu, de 1.086 à 1.028 à la fin d'exposition à Hassi Messaoud, de 1,15 à 0,988 à Ouargla et de 1,15 à 1,094 à Haoud Berkaoui (Figure 2). On peut remarquer une forte augmentation à 30 jours pour la station de Haoud Berkaoui qui pourrait être lié à un arrosage non programmé, les transplants étant installés dans des zones de palmeraie.

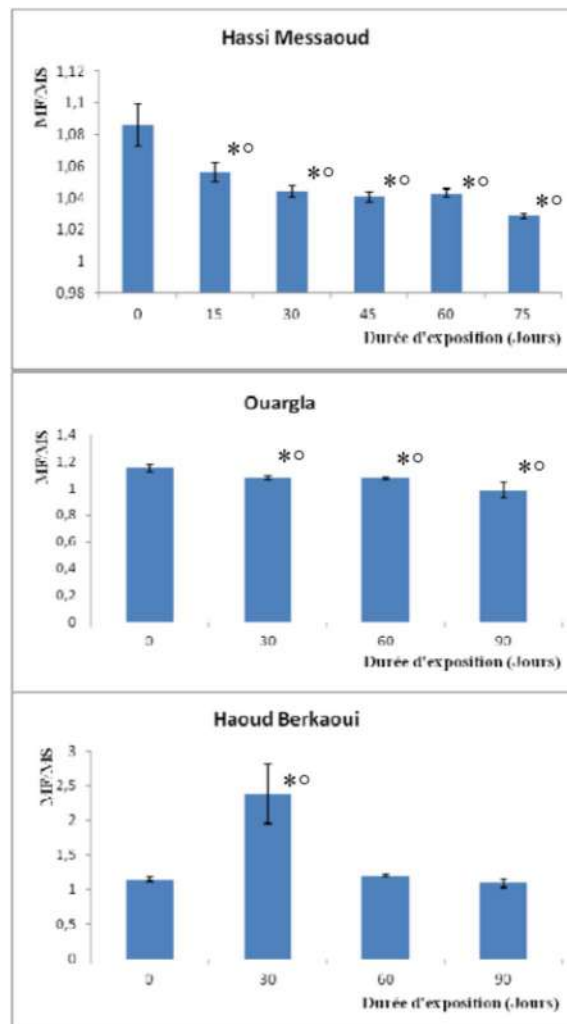


Figure 2 : Evolution du rapport MF/MS aux différents temps de prélèvement dans les différentes stations. La barre sur les histogrammes correspond à l'écart standard à la moyenne. Un test de student (*) et un test de Mann-Whitney (°) ont été utilisés pour comparer les mesures par rapport au témoin ($p < 0,05$).

Variation de la teneur en chlorophylle.

Les teneurs en chlorophylle subissent une régression remarquable à Hassi Messaoud depuis le témoin à $5,79 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS jusqu'à $1,87 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS à la fin de l'expérimentation (Figure 3). Elle est très faible à Ouargla (de $11,15$ à $10,47 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Par contre, une chute importante est également à noter à Haoud Berkaoui (de $27,32$ à $6,92 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

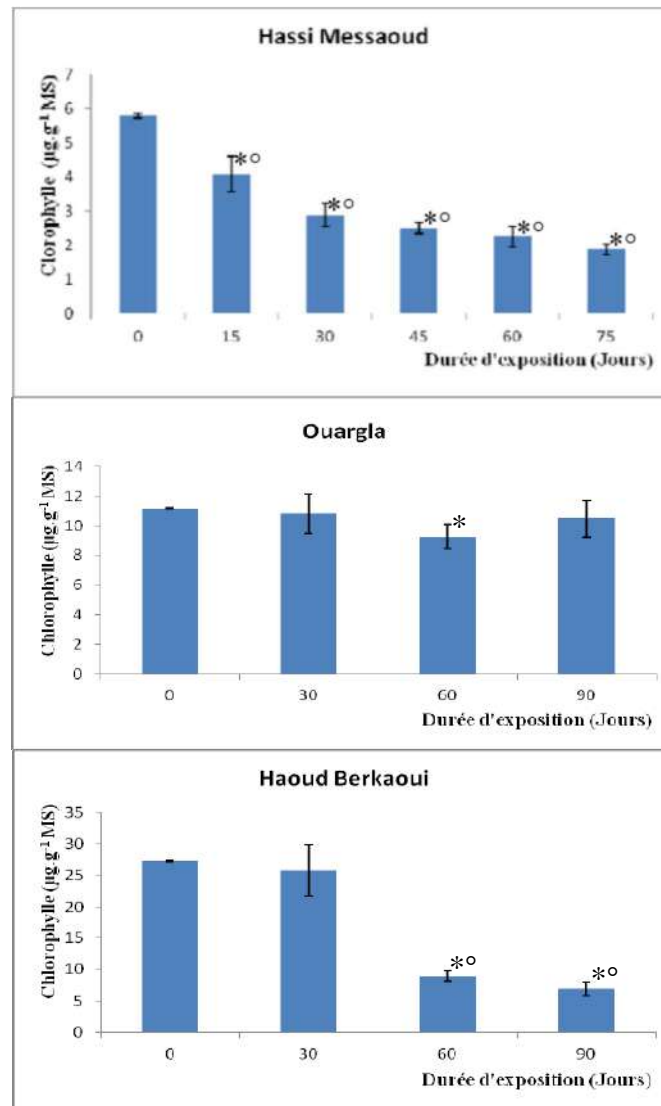


Figure 3 : Evolution de la teneur en chlorophylle aux différents temps de prélèvement dans les différentes stations. La barre sur les histogrammes correspond à l'écart standard à la moyenne. Un test de student (*) et un test de Mann-Whitney (°) ont été utilisés pour comparer les mesures par rapport au témoin ($p < 0,05$).

DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'évaluer l'intérêt potentiel d'un lichen comme témoin de la pollution par les hydrocarbures en zone saharienne. Les lichens n'étant pas présents au Sahara, il était nécessaire de les introduire, d'utiliser une approche par transplantation et de les évaluer comme biomarqueurs sur une période courte permettant leur survie.

La teneur en composés solubles dans l'hexane varie au cours de l'expérimentation pour les 3 stations. Elles présentent une similitude dans cette variation au cours du temps. Elle est plus importante dans la station de Hassi Messaoud, située à proximité des torchères d'exploitation pétrolière qui représentent une source d'émission d'hydrocarbures. L'origine de ces composés solubles dans l'hexane peut être liée à cette pollution mais elle peut également provenir du végétal lui-même. En effet, l'hexane extrait également des molécules synthétisées par les lichens (Roux *et al.*, 2007). Toutefois, les lichens ayant une croissance extrêmement lente,

l'augmentation des teneurs en CSH dans les extraits après exposition sur une période relativement courte pour ces espèces, pourrait montrer que l'origine de ces composés serait plutôt liée à la pollution. De plus, la bioaccumulation, définie comme la somme des absorptions d'un polluant par voie directe pour une espèce végétale (Ramade, 1982) est bien connue chez les lichens. Ces phénomènes d'accumulation seraient dus aux particularités physiologiques des lichens qui ont la capacité de stocker les contaminants dans leurs tissus (Conti et Cecchetti, 2001). De ce fait, ils sont utilisés pour la mesure intégrée de la concentration des contaminants dans l'environnement. En effet, chez les lichens, le polluant ne jouerait pas de rôle fondamental dans le métabolisme et semble être stocké à l'intérieur des cellules. Lorsque sa concentration devient toxique pour la cellule, celle-ci est détruite ce qui se traduit par des symptômes de nécrose et des décolorations qui gagnent progressivement toutes les parties du thalle (Deruelle et Lallemand, 1983). Des phénomènes d'adsorption et désorption des contaminants impliquant probablement majoritairement des phénomènes passifs expliqueraient les teneurs en polluants relevées dans les études de ce type (Sloof, 1995). Cette accumulation a été démontré dans le cas de la pollution aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (Guidotti *et al.*, 2003). Toutefois, les mécanismes impliqués n'étant pas connus, il convient de rester prudent dans l'interprétation des résultats à l'instar de Loppi *et al.* (2002, 2010).

Le rapport MF/MS constitue une bonne indication de l'état de la qualité de l'air, le développement du végétal étant perturbé par la pollution au détriment de la matière fraîche c'est-à-dire que plus l'accumulation du polluant est importante, plus le rapport MF/MS diminue (Alioua, 1995). Nous avons observé à plusieurs reprises la formation d'une fine couche blanchâtre à la surface des thalles de *Xanthoria*. Cette couche, probablement lipidique (Deruelle et Lallemand, 1983) jouerait un rôle de barrière contre l'absorption de l'eau et influencerait l'équilibre hydrique du thalle. Elle est plus imperméable et plus épaisse près d'une source de pollution. Pour ces auteurs, il est possible que le déséquilibre hydrique qu'elle engendre soit à l'origine de la contraction du thalle et de son détachement du substrat sur le bord. Le déséquilibre hydrique s'est traduit ici par une réduction du rapport MF/MS traduisant une perte d'eau pour les échantillons des trois stations. Dans notre expérimentation, il a sans doute une origine essentiellement climatique, l'augmentation de la température de l'air durant le temps d'exposition ainsi que l'ensoleillement conduisant à une diminution de l'humidité du milieu et par conséquent du rapport MF/MS par rapport au site d'origine du *Xanthoria*.

La teneur en pigments foliaires constitue une des principales signatures de l'état physiologique des plantes. Ils permettent l'assimilation de l'énergie lumineuse par la plante, interviennent lors de sa croissance et la protègent contre une multitude de facteurs tout au long de sa vie. La chlorophylle, principal pigment foliaire, est souvent utilisée comme indicateur pour évaluer le rendement potentiel d'une culture, la biomasse d'une forêt, pour détecter des carences nutritionnelles ou encore comme témoin pour divers types de pollution. Les teneurs en chlorophylle enregistrées à la fin de notre expérimentation sont très faibles dans les deux stations les plus exposées, Hassi Messaoud et Haoud Berkaoui en comparaison de celles du témoin. Ces valeurs diminuent au cours de la durée d'exposition et se traduisent visuellement par une décoloration des lobes des thalles, qui atteint par la suite tout le thalle en fonction de l'intensité de la pollution. Ces résultats peuvent être le témoin de la sensibilité de la photosynthèse et de la teneur en chlorophylle dans des conditions de pollutions. Toutefois, l'évolution du rapport MF/MS montre que le stress hydrique généré par la baisse de la teneur en eau peut aussi être impliqué. La quantification de la chlorophylle est largement utilisée pour évaluer l'état des échantillons et fournir une indication précoce du stress physiologique (Maxwell et Johnson, 2000 ; Ramade, 2007). Ainsi, elle a été utilisée pour montrer la tolérance et les effets chroniques de métaux lourds et autres xénobiotiques dans les lichens (Chettri *et al.*, 1998 ; Riga-Karandinos et Karandinos, 1998 ; Dzubaj *et al.*, 2008). Des

observations microscopiques montrent une plasmolyse progressive des cellules algales sous l'effet de la pollution qui perdent finalement leur coloration verte, à cause de la destruction des chlorophylles transformées en phaeophytine avant une dégradation complète de tous les pigments y compris les carotènes et les xanthophylles (Deruelle et Lallemand, 1983). La dégradation des chlorophylles en phaeophytine a d'ailleurs été utilisée comme une mesure des dommages causés par des concentrations élevées en SO₂ dans les lichens ou pour l'évaluation des effets de la pollution en métaux lourds dans les lichens épiphytes transplantés (Garty, 1987. Sanz *et al.*, 1992). Une étude à grande échelle des lichens a montré que la capacité de photosynthèse est fortement corrélée à la concentration de la chlorophylle a (Palmquist *et al.*, 2002).

Conclusion

Cette étude montre que les lichens accumulent probablement les polluants hydrocarbonés sur l'intervalle de temps (90 jours) utilisé ici. Compte tenu des travaux des auteurs en général dans ce domaine, *Xanthoria parietina* pourrait être une espèce modèle pour l'étude de la bioaccumulation des polluants hydrocarbonés. Les teneurs en composés solubles dans l'hexane accumulées par cette espèce ainsi que les résultats sur la teneur en chlorophylle et le rapport MF/MS, sont probablement dues, d'une part, aux facteurs intrinsèques propres à l'espèce étudiée (pouvoir accumulateur de *Xanthoria parietina*) et d'autre part, aux facteurs extrinsèques d'ordre climatiques et topographiques (pluviométrie et positionnement des sites d'échantillonnage). Cependant, l'usage des lichens pour la biosurveillance végétale pour estimer la qualité de l'air apparaît très limité dans les conditions climatiques en zone saharienne caractérisée par des fortes températures et une faible humidité. Pour cela, nous suggérons d'étendre l'approche par l'utilisation de végétaux supérieures locaux comme bioindicateurs et bioaccumulateurs de la pollution atmosphérique en zones arides et semi arides.

Références bibliographiques

- Augusto S., Máguãs C., Matos J., Pereira M.J., Branquinho C. 2010. *Environ. Pollut.* 158 : 483-489.
- Alioua A. 1995. Détection de la pollution mercurielle dans la région de Azzeba (Algérie- orientale) à l'aide des bioaccumulateurs *Xanthoria parietina*, *Olea cupea*, *Cupressus sempervirens*, *Casuarina equisetifolia* et *Triticum durum*. Mémoire. Magister. Université Annaba. 103 p.
- Calatayud M.J., Sanz M.J., Calvo E., Barreno E., Del Valle-Tascon X. 1996. Chlorophyll a fluorescence and chlorophyll content in *Parmelia quercina* thalli from a polluted region of northern Castellon (Spain). *Lichenologist.* 28: 49-65.
- Chettri M.K., Cook C.M., Vardaka E., Sawidis T., Lanaras T. 1998. The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*. *Environ. Exp. Bot.* 39: 1-10.
- Conti M.E., Cecchetti G. 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment- a review. *Environ. Pollut.* 114: 471-492.
- Deruelle S., Lallemand R. 1983. Les lichens témoins de la pollution. Vuibert (ed.). Paris 108 p.
- Dzubaj A., Backor M., Tomko J., Peli E., Tuba Z. 2008. Tolerance of the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. to metal stress. *Ecotox. Environ. Safety.* 70: 319-326.
- Garrec JP., Van Haluwyn C. 2002. Biosurveillance végétale de la qualité de l'air. Tec & Doc ; Lavoisier (ed.). Paris. 118 p.
- Garty J. 1987. Metal amounts in the lichen *Ramalina duriae* transplanted at biomonitoring sites around a new coal-fired power station after 1 year of operation. *Environ. Res.* 43: 104-116.
- Garty J., Karary Y., Harel J., Lurie S. 1993. Temporal and spatial fluctuation of ethylene production and concentrations of sulphur, sodium, chlorine and iron on/in the thallus cortex in the lichen *Ramalina duriae* (De Not.) Bagl. *Environ. Exp. Bot.* 33: 553-563.

- Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R. 2002a. Element concentrations in the forest moss *Hylocomium splendens*: variation associated with altitude, net primary production and soil chemistry. *Environ. Pollut.* 166: 129-135.
- Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., Medici A., Pedrini P., Benedetti S., Bovolenta A., Coppi S. 2002b. Use of moss (*Tortula muralis* Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy. *Atmosph. Environ.*, 36: 4069-4075.
- Gonzalez C.M., Casanovas S.S., Pignata M.L. 1996. Biomonitoring of air pollutants from traffic and industries employing *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot. in Cordoba, Argentina. *Environ. Pollut.* 91: 269-277.
- Guidotti M., Stella D., Owczarek M., De Marco A., De Simone C. 2003. Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. *J. Chromatogr.* (volume A) 985: 185-190.
- Lichtenthaler H.K. et Welburn A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls /a/ and /b/ of leaf extracts in different solvents. *Biochem. Soc. Tran.* 11: 591-592.
- Loppi S., Giordani P., Brunialti G., Isocrono D., Piervittori R. 2002. Identifying deviation from naturality of lichen diversity for bioindication purposes. In: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P., Monitoring with lichens- Monitoring Lichens. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands pp. 281-284.
- Loppi S., Nascimbene J. 2010. Monitoring H₂S air pollution caused by the industrial exploitation of geothermal energy: The pitfall of using lichens as bioindicators. *Environ. Pollut.* 158: 2635-2639.
- Maxwell K., Johnson G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-668.
- Migaszewski Z.M., Galuszka A., Paslawski P. 2002. Polynuclear aromatic hydrocarbons, phenols, and trace metals in selected soil profiles and plant bioindicators in the Holy Cross Mountains South-Central Poland. *Environ. Internat.* 28: 303-313.
- Nimis P.L., Lazzarin G., Lazzarin A., Skert N. 2000. Biomonitoring of trace elements with lichens in Veneto (NE Italy). *Sci. Total Environ.* 255: 97-111.
- Nimis P.L., Andreussi S., Pittao E. 2001. The performance of two lichen species as bioaccumulators of trace metals. *Sci. Total Environ.* 275: 43-51.
- Palmquist K., Dahlman L., Valla Dares F., Tehler A., Sancho L.G., Mattsson J-E. 2002. CO₂ exchange and thallus nitrogen across 75 contrasting lichen associations from different climate zones. *Oecologia.* 133: 295-306.
- Poblet A., Andrade S., Scagliola M., Vodopivec C., Curtosi A., Pucci A., Marcovecchio J. 1997. The use of epilithic antarctic lichens (*Usnea aurantiacoatra* and *U. antarctica*) to determine deposition patterns of heavy metals in the Shetland Islands, Antarctica. *Sci. Total Environ.* 207: 187-194.
- Ra H.S.Y., Geiser L.H., Crang R.F.E. 2005. Effects of season and low-level air pollution on physiology and element content of lichens from the U.S. pacific North West. *Sci. Total Environ.* 343: 155-167.
- Ramade F. 1982. Elément d'écologie appliquée. Ed. MC Graw Hill 50, 92-93, 452p.
- Ramade F. 2007. Introduction à l'écotoxicologie. Fondements et applications, Tec & Doc, Lavoisier (ed.), 618 p.
- Riga-Karandinos A.N., Karandinos M.G. 1998. Assessment of air pollution from a lignite power plant in the plain of Megalopolis (Greece) using as biomonitors three species of lichens; impacts on some biochemical parameters of lichens. *Sci. Total Environ.* 215: 167-183.
- Rouidi S. 2001. Cartographie de la pollution par les hydrocarbures totaux au niveau de la plate forme industrielle de Skidda. Mémoire de Magister, Université de Constantine. 111 p.
- Rouvillois-Brigol M. 1975. Le pays de Ouargla (Sahara Algérien). Variations et organisation d'un espace rural en milieu désertique. Thèse de Doctorat, spécialité Géographie de l'Université de Paris-Sorbonne. 389 p.
- Roux C., Coste C., Bricoud O. et Masson D. 2007. Lichens et champignons lichénicoles du parc national des Cévennes (France). 4- le massif de l'Aigoual- *Bull. Soc. Linn. Provence.* 58 : 103-125.
- Sanderson E.G., Ragbi A., Kyskocil A., Farant J.P. 2004. Comparaison of particulate polycyclic aromatic hydrocarbon profiles in different regions of Canada. *Atmos. Environ.* 38: 3417-3429.
- Sanz MJ., Gries C., Nash TH. 1992. Dose-reponse relationships for SO₂ fumigation in the lichens *Evernia prunastri* (L.) Ach. and *Ramalina fraxinea* (L.) Ash. *New Phytol.* 122: 313-319.

- Scerbo R., Ristori T., Possenti L., Lampugnani L., Barale R., Barghigiani C. 2002. Lichen *Xanthoria parietina* biomonitoring of trace element contamination and air quality assessment in Pisa Province (Tuscany, Italy). *Sci. Total. Environ.* 286: 27-40.
- Semadi A. 1989. Effet de la pollution atmosphérique, pollution globale, fluorée, plombique sur la végétation dans la région de Annaba (Algérie). Thèse de Doctorat en sciences naturelles : Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). 339 p.
- Sloof J.E. 1995. Lichens as quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition using transplants. *Atmosph. Environ.* 29: 11-20.
- Soltani M. 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris 6). 284 p.
- Stengel D.B., Macken A., Morrison L., Motley N. 2004. Zinc concentrations in marine macro algae and lichen from Western Ireland in relation to phylogenetic grouping habitat and morphology. *Marine Poll. Bull.* 48: 902-909.
- Takala K., Salminen R., Olkkonen H. 1998. Geogenic and anthropogenic zinc in epiphytic and terricolous lichens in Finland. *J. Geochem. Explor.* 63: 57-66.
- Thomas H. Nash III, Gries C. 1995. The response of lichens to atmospheric deposition with an emphasis on the Arctic. *Sci. Total Environ.* 160/161: 737-747.
- Wolterbeek B. 2002. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environ. Pollut.* 120: 11-21.
- Yu M.H., Tsunoda H. 2005. Environmental toxicology: Biological and health effects of pollutants. CRC Press. Boca Raton. Florida.
- Zhang Zh. H., Chai Z. F., Mao X. Y., Chen J.B. 2002. Biomonitoring trace element atmospheric deposition using lichens in China. *Environ. Pollut.* 120: 157-161.

PhytoChem & BioSub Journal

Peer-reviewed research journal on Phytochemistry & Bioactives Substances

ISSN 2170 - 1768



*PCBS
Journal*


ISSN 2170-1768



Edition LPSO
<http://www.pcbsj.webs.com>
Email: phytochem07@yahoo.fr



EFFET DE LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE PAR LES HYDROCARBURES SUR LE LICHEN *Xanthoria parietina* (L.) Th (TELOSCHISTACEAE) DANS LA ZONE DE HASSI MESSAOUD (SAHARA SEPTENTRIONAL EST ALGERIEN)

KHELIL Rahma¹, OULD EL HADJ-KHELIL Aminata¹, DADAMOUSA Belkeir¹, CABELLO-HURTADO Francisco² et ESNAULT Marie-Andrée².

⁽¹⁾ *Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-Arides*
Université de Ouargla, 30000 Ouargla, Algérie

⁽²⁾ *UMR Ecobio 6553, Université de Rennes 1*
Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France

Résumé.- *Le présent travail porte sur la bio-détection de la pollution atmosphérique par les hydrocarbures dans la zone de Hassi Messaoud située dans la région de Ouargla (Sahara septentrional Est algérien). Les lichens prélevés sur leur support dans le nord-est de l'Algérie (Annaba), sont utilisés comme modèle biologique pour évaluer les effets de cette pollution par transplantation pendant 75 jours. Les teneurs en composés solubles dans l'hexane (CSH) au niveau des transplants lichéniques augmentent puis diminuent au cours du temps d'exposition. La teneur en chlorophylle diminue en fonction de la période d'échantillonnage. Les modifications observées au cours du temps pourraient avoir pour origine deux causes, la pollution atmosphérique d'une part et la déshydratation des thalles sous l'effet de la température du milieu d'autre part.*

Mots-clés : *Lichen, transplantation, pollution atmosphérique, hydrocarbures.*

THE EFFECT OF AIR POLLUTION BY HYDROCARBONS ON THE LICHEN *XANTHORIA PARIETINA* (TELOSCHISTACEAE) IN THE AREA OF HASSI MESSAOUD (SOUTH-EASTERN ALGERIA)

Abstract.- *This work is focused on bio-detection air pollution by hydrocarbons in the area of Hassi Messaoud Ouargla region (Northern Sahara Algerian East). Lichens collected on their support in the northeast of Algeria (Annaba), are used as a biological model to assess the effects of this pollution transplantation for 75 days. The levels of soluble compounds in hexane (CSH) at the lichen transplants increase and then decrease during the exposure time. With respect to the chlorophyll content, it decreases as the sampling period. The changes observed over time could have originated two causes of air pollution on the one hand and dehydration thalli under the effect of the temperature of the other areas.*

Key words: *lichen, transplantation, air pollution, hydrocarbons.*

Introduction

L'exploitation des gisements de pétrole qui n'a cessé d'augmenter avec l'avènement de l'ère industrielle au XIX^{ème} siècle, entraîne des risques de pollution (accidentelle et chronique) pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème [1]. La nécessité d'estimer les quantités présentes, de contrôler l'accumulation des produits pétroliers, leur transformation et leur devenir, comme d'en estimer l'impact sur la flore, la faune et l'environnement devient une priorité. Toutefois, les processus d'analyse des compartiments abiotiques sont lourds et onéreux à mettre en œuvre [2]. C'est pourquoi la recherche d'espèces bio-indicatrices et/ou bio-accumulatrices a fait l'objet de nombreux

travaux [3,4].

GARREC et VAN HALUWYN (2002) définissent la bio-surveillance végétale comme l'utilisation d'un organisme ou d'un ensemble d'organismes à tous les niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique, tissulaire, morphologique, écologique) pour prévoir et/ou révéler une altération de l'environnement et pour en suivre l'évolution. Pour l'évaluation de la pollution de l'air, les organismes ou organes bio-indicateurs et/ou bio-accumulateurs les plus communément appliqués sont les aiguilles de pin [5], les algues marines [6], les lichens et les mousses [7, 8, 5, 9,10].

Les lichens sont très dépendants de la qualité de l'air et des eaux de pluie d'où ils tirent leur alimentation. Ils sont peu sensibles aux pics de pollution, ce sont des organismes intégrateurs d'une pollution de fond [11]. Ils peuvent donc nous informer sur la qualité de l'air. Ils ont été largement testés comme bio-indicateurs et/ou bio-accumulateurs de la pollution atmosphérique au cours des 40 dernières années depuis les travaux de HAWKSORTH et ROSE en 1970 comme indicateurs de la concentration en SO₂ [12, 13,14].

Récemment, les lichens ont été utilisés pour la bio-surveillance de la contamination par les oligo-éléments en Italie, dans la Province de Pise [15] et en Vénétie [16, 17], pour étudier l'effet de la pollution liée aux activités industrielles en Argentine [18], de la contamination par les métaux lourds en zone subarctique [14, 19] et pour la détermination de la concentration en zinc dans l'Ouest de l'Irlande [6] et en Finlande [20]. Ils ont également été choisis comme bio-indicateurs des hydrocarbures aromatiques totaux (HAP) [5] et se sont révélés accumuler des concentrations de HAP plus élevées que les aiguilles de pins [21].

L'objectif de la présente étude est donc de rechercher une espèce végétale pouvant être bio-indicatrice des niveaux de concentration en hydrocarbures totaux dans un contexte de bio-surveillance. Le choix s'est porté sur un lichen connu comme bio-indicateur du degré de pollution atmosphérique d'où il a été transplanté dans la zone de Hassi Messaoud afin d'évaluer son utilisation potentielle sur une période de 75 jours.

1.- Matériel et méthodes

L'étude a été réalisée dans la localité de Hassi Messaoud (HMD). Aucun lichen de grande taille n'étant présent dans cette zone saharienne, pour cela nous avons choisi d'introduire une espèce bien répandue dans les forêts du nord de l'Algérie (Annaba) comme exemple. Cette méthode avait l'avantage de permettre une introduction de l'espèce sur son support donc sans léser l'échantillon. L'objectif était de déterminer si dans les conditions sahariennes, l'espèce pouvait continuer à se développer pendant le temps d'exposition pour être une espèce utilisable en bio-indication.

L'espèce lichénique retenue est une espèce largement répandue, récoltée au niveau de la localité d'El Chut dans la région d'Annaba (Algérie). Il s'agit du *Xanthoria parietina* (L.) Th. (Teloschistaceae), espèce à thalle foliacé, nitrophile se développant sur différents phorophytes et notamment sur le caroubier *Ceratonia siliqua* L. (Fabaceae) qui a été retenu pour la transplantation. Les branches recouvertes de thalles sont prélevées puis fixées à l'aide d'une ficelle à une hauteur de 1,5 m du sol.

A chaque échantillonnage ou prélèvement, quelques thalles sont détachés du phorophyte à l'aide d'un couteau. Les échantillons sont placés dans des sachets en plastique, afin de limiter les pertes d'eau par évapotranspiration jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Les prélèvements ont lieu tous les 15 jours pendant 75 jours. Les thalles transplantés sont tous prélevés le même jour et soumis aux dosages des CSH et de la chlorophylle.

Pour une connaissance des niveaux de pollution dans une zone d'étude, il est important de mettre en place un réseau d'échantillonnage en essayant de choisir des sites en nombre suffisant et répartis autour de la source de pollution. Le nombre de sites doit être plus important sous les vents dominants et plus réduits dans les autres directions [22]. Pour couvrir la zone d'échantillonnage, huit sites sont choisis à Hassi Messaoud, dont 3 sites au niveau du Centre Industriel Naili Abdelhalim (CINA) au Nord de Hassi Messaoud, un site au niveau de la zone industriel au centre de Hassi Messaoud, 4 sites au niveau des cités à densité de population élevée de Hassi Messaoud (cité 1850 logements, cité 136 logements, cité Bouamama et en fin la cité 1666 logements), pour avoir un totale de 8 sites.

Il est à noter qu'il est procédé au dosage de tous les composés solubles dans l'hexane y compris les hydrocarbures (dosage indirecte des hydrocarbures).

Les composés solubles dans l'hexane (CSH) sont obtenus par extraction au soxhlet. La phase organique présente dans la masse biologique est ainsi extraite dans le solvant organique (N-hexane). Dans une cartouche en cellulose préalablement conditionnée à l'hexane (pendant 4 heures), 0.5 g de thalles de lichens sont additionnés de 1g de sulfate de sodium anhydre pour éliminer toute trace d'eau. L'extraction est effectuée avec 100 ml de N-hexane. Le tout est mis dans l'extracteur soxhlet placé sur une plaque chauffante à la température d'ébullition du N-hexane (70°C), durant 3 à 4 heures. Une éprouvette contenant une solution concentrée de NaOH, est reliée au dispositif d'extraction par un tuyau servant à l'échappement des gaz toxiques. Après extraction, les composés sont quantifiés dans un creuset par gravimétrie. L'hexane est évaporé au bain-marie, puis dans un dessiccateur contenant du gel de silice pendant 30 min. La teneur en composés solubles dans l'hexane est exprimée en mg.g^{-1} de matière sèche de thalle lichénique [23].

La quantification de la chlorophylle est effectuée en utilisant la méthode établie par LICHTENTHALER et WELLBURN (1983). Pour cela, 0.5 g de thalle sont pesés puis broyés au mortier en présence de 5 ml d'acétone à 80%. Le mélange obtenu est centrifugé 15 min à 4100 tours.min⁻¹, puis le surnageant est récupéré. L'absorbance (A) est mesurée au spectromètre à 663 nm et 645 nm. Pour calculer les quantités de chlorophylle a et b (Chl a, Chl b), les équations ci-dessous sont utilisées [24]:

- Teneur en chlorophylle a ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)

$$\text{Chl a} = 12,21 A_{663} - 2,81 A_{645}$$

- Teneur en chlorophylle b ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)

$$\text{Chl b} = 20,13 A_{645} - 5,03 A_{663}$$

- Teneur en chlorophylle totale ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)

$$C = \text{Chl a} + \text{Chl b}$$

2.- Résultats

2.1.- Variations des teneurs en composés solubles dans l'hexane (CSH)

Lors de leur installation, les lichens prélevés de la région de Annaba (El chut), une zone loin de toute source de pollution ou *Xanthoria parietina* se développe considérablement, cette espèce végétale renferme une quantité de $5600\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS de GSH qui est retenue comme valeur témoin de la présente étude (T0 avant transplantation). Après transplantation, quelle que soit la date de prélèvement les teneurs en CSH dépassent celles de l'échantillon témoin et fluctuent dans le temps (fig. 1).

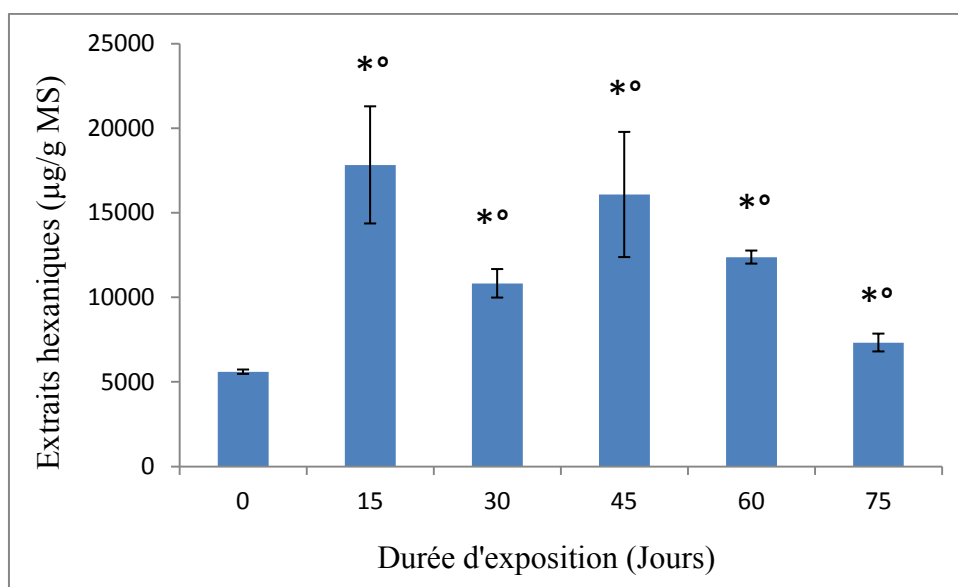


Figure 1.- Evolution des teneurs en composés solubles dans l'hexane (CSH) aux différents temps de prélèvement. La barre sur les histogrammes correspond à l'écart standard à la moyenne. Un test de student (*) et un test de Mann-Whitney (°) ont été utilisés pour comparer les mesures par rapport au témoin ($p < 0,05$).

Les lichens accumulent les CSH en fonction de la durée d'exposition jusqu'à une certaine limite. Le maximum d'accumulation est atteint après 15 jours d'exposition avec une teneur moyenne de $17825\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, soit une augmentation d'un facteur 3,1. Après ce maxima, il y a eu globalement une diminution avec des fluctuations des teneurs en CSH. En fin d'expérimentation (après 75 jours), celles-ci tendent à un retour aux valeurs initiales.

2.2.- Variation de la teneur en chlorophylle

Les teneurs en chlorophylle subissent une régression remarquable dans la zone d'étude, depuis le témoin qui montre une valeur de chlorophylle totale de $5,79\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS jusqu'à la valeur de $1,87\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MS à la fin de l'expérimentation (fig. 2).

3.- Discussion

La zone de Hassi Messaoud, située à proximité des torchères d'exploitation pétrolière qui représentent une source d'émission d'hydrocarbures, présente des teneurs en

composés solubles dans l'hexane qui varient au cours de l'expérimentation. L'origine de ces composés solubles dans l'hexane peut être liée à cette pollution mais elle peut également provenir du végétal lui-même. En effet, l'hexane extrait également des molécules synthétisées par les lichens [25]. Toutefois, les lichens ayant une croissance extrêmement lente en raison de quelques millimètres par an, l'augmentation des teneurs en CSH dans les extraits après exposition sur une période relativement courte (75 jours) pour ces espèces, pourrait montrer que l'origine de ces composés serait plutôt liée à la pollution. De plus, la bio-accumulation, définie comme la somme des absorptions d'un polluant par voie directe pour une espèce végétale, est bien connue chez les lichens [26]. Ces phénomènes d'accumulation seraient dus aux particularités physiologiques des lichens qui ont la capacité de stocker les contaminants dans leurs tissus [27]. Pour cela, ils sont utilisés pour la mesure intégrée de la concentration des contaminants dans l'environnement. En effet, chez les lichens, le polluant ne jouerait pas de rôle fondamental dans le métabolisme et semble être stocké à l'intérieur des cellules. Lorsque sa concentration devient toxique pour la cellule, celle-ci est détruite ce qui se traduit par des symptômes de nécrose et des décolorations qui gagnent progressivement toutes les parties du thalle [11]. Des phénomènes d'adsorption et désorption des contaminants impliquant probablement majoritairement des phénomènes passifs expliqueraient les teneurs en polluants relevées dans les études de ce type [28]. Cette accumulation a été démontée dans le cas de la pollution aux hydrocarbures aromatiques polycycliques [4]. Toutefois, les mécanismes impliqués n'étant pas connus, il convient de rester prudent dans l'interprétation des résultats à l'instar de LOPPI *et al.* (2002, 2010) [29, 30].

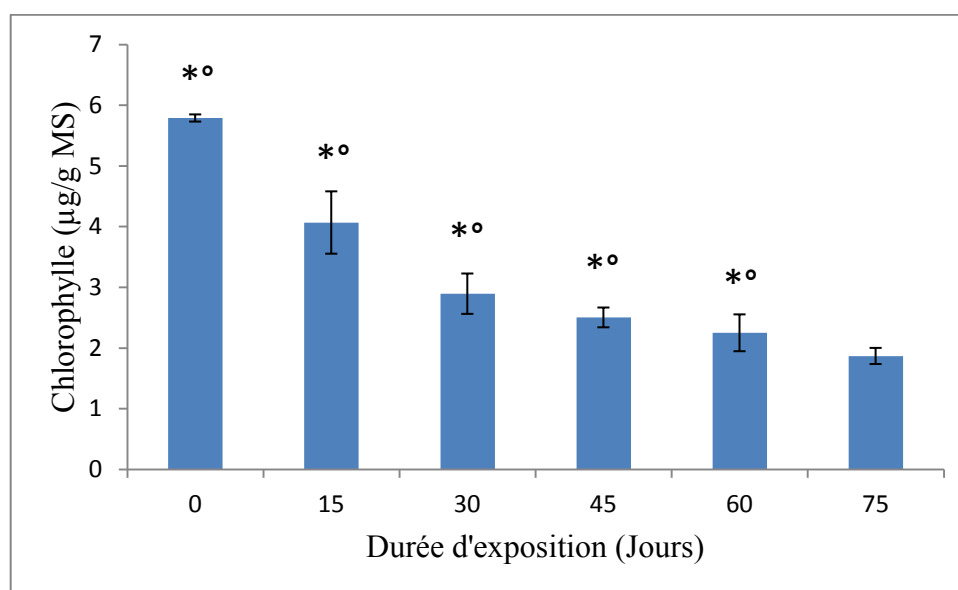


Figure 2.- Evolution de la teneur en chlorophylle des différents temps de prélèvement. La barre sur les histogrammes correspond à l'écart standard à la moyenne. Un test de student (*) et un test de Mann-Whitney (°) ont été utilisés pour comparer les mesures par rapport au témoin ($p < 0,05$).

La teneur en pigments foliaires constitue une des principales signatures de l'état physiologique des plantes. Ils permettent l'assimilation de l'énergie lumineuse par la plante, interviennent lors de sa croissance et la protègent contre une multitude de facteurs tout au long de sa vie. La chlorophylle, principal pigment foliaire, est souvent utilisée comme indicateur pour évaluer le rendement potentiel d'une culture, la biomasse d'une forêt, pour

détecter des carences nutritionnelles ou encore comme témoin pour divers types de pollution. Les teneurs en chlorophylle enregistrées à la fin de l'expérimentation sont très faibles. Ces valeurs diminuent au cours de la durée d'exposition et se traduisent par une décoloration des lobes des thalles, qui atteint par la suite tout le thalle en fonction de l'intensité de la pollution. Ces résultats peuvent être le témoin de la sensibilité de la photosynthèse et de la teneur en chlorophylle dans des conditions de pollutions. La quantification de la chlorophylle est largement utilisée pour évaluer l'état des échantillons et fournir une indication précoce du stress physiologique [31, 32]. Ainsi, elle a été utilisée pour montrer la tolérance et les effets chroniques de métaux lourds et autres xénobiotiques dans les lichens [33, 34, 35]. D'après DERUELLE et LALLEMANT (1983), des observations microscopiques montrent une plasmolyse progressive des cellules algales sous l'effet de la pollution qui perdent finalement leur coloration verte, à cause de la destruction des chlorophylles transformées en phaeophytine avant une dégradation complète de tous les pigments y compris les carotènes et les xanthophylles. La dégradation des chlorophylles en phaeophytine a d'ailleurs été utilisée comme une mesure des dommages causés par des concentrations élevées en SO₂ dans les lichens ou pour l'évaluation des effets de la pollution en métaux lourds dans les lichens épiphytes transplantés [36, 37]. Une étude à grande échelle des lichens a montré que la capacité de la photosynthèse est fortement corrélée à la concentration de la chlorophylle a [38].

Conclusion

Les lichens accumulent les polluants hydrocarbonés sur un intervalle de temps bien déterminé (75 jours). Suite aux résultats obtenus dans la présente étude et compte tenu des travaux antérieurs, *Xanthoria parietina* pourrait être une espèce modèle pour l'étude de la bio-accumulation des polluants hydrocarbonés. Les teneurs en composés solubles dans l'hexane accumulées par cette espèce ainsi que les résultats sur la teneur en chlorophylle, sont probablement dues, d'une part, aux facteurs intrinsèques propres à l'espèce étudiée (pouvoir accumulateur de *Xanthoria parietina*) et d'autre part, aux facteurs climatiques de la zone d'étude. Cependant, l'usage des lichens pour la bio-surveillance végétale pour estimer la qualité de l'air apparaît très limité dans le temps vu les conditions climatiques en zone saharienne caractérisée par des fortes températures et une faible humidité. Pour cela, nous suggérons d'élargir cette approche par l'utilisation d'autres modèles de bio-surveillance comme les végétaux supérieures locaux déjà adaptant aux conditions climatique désertique. Citant le palmier dattier comme bio-indicateurs et bio-accumulateurs de la pollution atmosphérique en zones arides et semi arides.

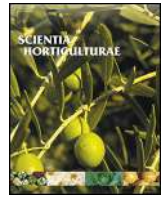
Références bibliographiques

- [1] - Soltani M., 2004.- Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, 284 p.
- [2] - Sanderson E.G., Ragbi A., Kyskocil A., Farant J.P., 2004.- Comparaison of particulate polycyclic aromatic hydrocarbon profiles in different regions of Canada. Atmospheric Environment, 38: 3417-3429.
- [3]- Wolterbeek B., 2002.- Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. Environmental Pollution, 120: 11-21.

- [4]- Guidotti M., Stella D., Owczarek M., De Marco A., De Simone C., 2003.- Lichens as polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulators used in atmospheric pollution studies. *Journal Chromatography (A)*, 985: 185-190.
- [5]- Migaszewski Z.M., Galuszka A., Paslawski P., 2002.- Polynuclear aromatic hydrocarbons, phenols, and trace metals in selected soil profiles and plant bioindicators in the Holy Cross Mountains South-Central Poland. *Environmental International*, 28: 303-313.
- [6]- Stengel D.B., Macken A., Morrison L., Motley N., 2004.- Zinc concentrations in marine macro algae and lichen from Western Ireland in relation to phylogenetic grouping habitat and morphology. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 902-909.
- [7]- Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., 2002.- Element concentrations in the forest moss *Hylocomium splendens*: variation associated with altitude, net primary production and soil chemistry. *Environment Pollution*, 166: 129-135.
- [8]- Gerdol R., Bragazza L., Marchesini R., Medici A., Pedrini P., Benedetti S., Bovolenta A., Coppi S., 2002.- Use of moss (*Tortula muralis* Hedw.) for monitoring organic and inorganic air pollution in urban and rural sites in Northern Italy. *Atmospheric Environment*, 36: 4069-4075.
- [9]- Zhang Zh. H., Chai Z. F., Mao X. Y., Chen J.B., 2002.- Biomonitoring trace element atmospheric deposition using lichens in China. *Environmental Pollution*, 120: 157-161.
- [10]- Ra H.S.Y., Geiser L.H., Crang R.F.E., 2005.- Effects of season and low-level air pollution on physiology and element content of lichens from the U.S. Pacific North West. *Science of the Total Environment*, 343: 155-167.
- [11]- Deruelle S., Lallemand R., 1983. *Les lichens témoins de la pollution*. Ed. Vuibert. Université de biologie, Paris 108 p.
- [12]- Calatayud M.J., Sanz M.J., Calvo E., Barreno E., Del Valle-Tascon X., 1996.- Chlorophyll a fluorescence and chlorophyll content in *Parmelia quercina* thalli from a polluted region of northern Castellon (Spain). *Lichenologist*, 28: 49-65.
- [13]- Garty J., Karary Y., Harel J., Lurie S., 1993.- Temporal and spatial fluctuation of ethylene production and concentrations of sulphur, sodium, chlorine and iron on/in the thallus cortex in the lichen *Ramalina duriaei* (De Not.) Bagl. *Environmental and Experimental Botany*, 33: 553-563.
- [14]- Thomas H. Nash III, Gries C., 1995.- The response of lichens to atmospheric deposition with an emphasis on the Arctic. *Science of the Total Environment*, 160/161: 737-747.
- [15]- Scerbo R., Ristori T., Possenti L., Lampugnani L., Barale R., Barghigiani C., 2002.- Lichen *Xanthoria parietina* biomonitoring of trace element contamination and air quality assessment in Pisa Province (Tuscany, Italy). *Science of the Total Environment*, 286: 27-40.

- [16]- Nimis P.L., Lazzarin G., Lazzarin A., Skert N., 2000.- Biomonitoring of trace elements with lichens in Veneto (NE Italy). *Science of the Total Environment*, 255: 97-111.
- [17]- Nimis P.L., Andreussi S., Pittao E., 2001.- The performance of two lichen species as bioaccumulators of trace metals. *Science of the Total Environment* 275: 43-51.
- [18]- Gonzalez C.M., Casanovas S.S., Pignata M.L., 1996.- Biomonitoring of air pollutants from traffic and industries employing *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey. and Flot. in Cordoba, Argentina. *Environmental Pollution*, 91: 269-277.
- [19]- Poblet A., Andrade S., Scagliola M., Vodopivec C., Curtosi A., Pucci A., Marcovecchio J., 1997.- The use of epilithic antarctic lichens (*Usnea aurantiacoatra* and *U. antarctica*) to determine deposition patterns of heavy metals in the Shetland Islands, Antarctica. *Science of the Total Environment*, 207: 187-194.
- [20]- Takala K., Salminen R., Olkkonen H., 1998.- Geogenic and anthropogenic zinc in epiphytic and terricolous lichens in Finland. *Jornal of Geochemical Exploration*, 63: 57-66.
- [21]- Augusto S., Máguãs C., Matos J., Pereira M.J., Branquinho C., 2010.- Lichens as an integrating tool for monitoring PAH atmospheric deposition: A comparison with soil, air and pine needles. *Environmental Pollution*, 158: 483-489.
- [22]- Semadi A. 1989.- Effet de la pollution atmosphérique, pollution globale, fluorée, plombique sur la végétation dans la région de Annaba (Algérie). Thèse de Doctorat en sciences naturelles : Université Pierre et Marie Curie, 339 p.
- [23]- Rouidi S., 2001.- Cartographie de la pollution par les hydrocarbures totaux au niveau de la plate-forme industrielle de Skidda. Mémoire de Magister, Université de Constantine, 111 p.
- [24]- Lichtenthaler H.K., Wellburn R.R. 1983.- Determination of total carotenoids and chlorophylls a and b of extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 603: 591-592.
- [25]- Roux C., Coste C., Bricoud O. et Masson D., 2007.- Lichens et champignons lichénicoles du parc national des Cévennes (France). 4- le massif de l'Aigoual- *Bull. Soc. Linn. Provence*, 58 : 103-125.
- [26]- Ramade F., 1982.- *Elément d'écologie appliquée*. Ed. MC Graw Hill 50, 92-93, 452 p.
- [27]- Conti M.E., Cecchetti G., 2001.- Biological monitoring: lichens as bio-indicators of air pollution assessment- a review. *Environmental Pollution*, 114: 471-492.
- [28]- Sloof J.E., 1995.- Lichens as quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition using transplants. *Atmospheric Environment*, 29: 11-20.
- [29]- Loppi S., Giordani P., Brunialti G., Isocrono D., Piervittori R., 2002.- Identifying

- deviation from naturalness of lichen diversity for bioindication purposes. In: Nimis P.L., Scheidegger C., Wolseley P., Monitoring with lichens- Monitoring Lichens. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands : 281-284.
- [30]- Loppi S., Nascimbene J., 2010.- Monitoring H₂S air pollution caused by the industrial exploitation of geothermal energy: The pitfall of using lichens as bio-indicators. *Environmental Pollution*, 158: 2635-2639.
- [31]- Maxwell K., Johnson G.N., 2000.- Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 51: 659-668.
- [32]- Ramade F., 2007.- Introduction à l'éco-toxicologie. Fondements et applications. Ed. Tec et Doc, Lavoisier, Paris, 618 p.
- [33]- Chettri M.K., Cook C.M., Vardaka E., Sawidis T., Lanaras T., 1998.- The effect of Cu, Zn and Pb on the chlorophyll content of the lichens *Cladonia convoluta* and *Cladonia rangiformis*. *Environmental and Experimental Botany*, 39: 1-10.
- [34]- Riga-Karandinos A.N., Karandinos M.G., 1998.- Assessment of air pollution from a lignite power plant in the plain of Megalopolis (Greece) using as biomonitors three species of lichens; impacts on some biochemical parameters of lichens. *Science of the Total Environment*, 215: 167-183.
- [35]- Dzubaj A., Backor M., Tomko J., Peli E., Tuba Z., 2008.- Tolerance of the lichen *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr. to metal stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70: 319-326.
- [36]- Garty J., 1987.- Metal amounts in the lichen *Ramalina duriae* transplanted at biomonitoring sites around a new coal-fired power station after 1 year of operation. *Environmental Research*, 43: 104-116.
- [37]- Sanz M.J., Gries C., Nash TH. 1992. Dose-response relationships for SO₂ fumigation in the lichens *Evernia prunastri* (L.) Ach. and *Ramalina fraxinea* (L.) Ash. *New Phytologist*, 122: 313-319.
- [38]- Palmquist K., Dahlman L., Valla Dares F., Tehler A., Sancho L.G., Mattsson J-E., 2002.- CO₂ exchange and thallus nitrogen across 75 contrasting lichen associations from different climate zones. *Oecologia*, 133: 295-306.



Structure and composition of the wax of the date palm, *Phoenix dactylifera* L., from the septentrional Sahara

Rahma Khelil^a, Emilie Jardé^b, Francisco Cabello-Hurtado^c, Aminata Ould-el-Hadj Khelil^a, Marie-Andrée Esnault^{c,*}

^a Laboratoire de Protection des Ecosystèmes en Zones Arides et Semi-Arides, Université Kasdi Merbah, BP 511, 30000 Ouargla, Algeria

^b UMR Géosciences, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France

^c UMR Ecobio 6553, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 January 2016

Accepted 2 February 2016

Keywords:

Wax

Rodlet

Ultrastructure

n-Alkane

Triterpenoid

Date palm

Septentrional Sahara

ABSTRACT

The date palm, *Phoenix dactylifera* L. is an important economic species in arid regions of the septentrional Sahara. As this species survives under drastic conditions, the waxes of the leaf, as a strategy in response to stress, were the focus of these studies. From a structural point of view, the cuticle is overlaid with crystalline waxes corresponding to epicuticular wax. The majority of these waxes were polygonal rodlets forming rings around the stomata, corresponding to the 'Strelitzia Type'. The effects of intense erosion were observed on the oldest leaves. From a chemical aspect, the wax primarily comprised *n*-alkanes (65.0% of the total wax), the most abundant of which is *n*-hentriacontane (24.3% of the *n*-alkanes). In the polar fraction, the triterpenoids represented the highest percent (19.6% of the total wax). The widely distributed ursolic acid and betulin were the most important triterpenoids identified, and the two other compounds were sterols. Betulin is an uncommon triterpenoid. According to previous studies, we hypothesized that the two main classes, *n*-alkanes and triterpenoids, are involved in formation of the rodlet wax structure. Fatty acids, aliphatic alcohols and ketones were also identified. A homologous series of aliphatics were described.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The date palm, *Phoenix dactylifera* L. (Arecaceae, monocotyledon) is widely cultivated in arid and semiarid regions of the Middle East and North Africa. The earliest records of date palm cultivation date from approximately 7000 years in the lower Mesopotamian basin (Zohary et al., 2012; Yannopoulos et al., 2015). In traditional Saharan oases, the date palm is a keystone species, from an economical or social point of view, based on the traditional uses of the products and by-products of this plant. In the oasis agrosystems, the date palm grove hosts a wide array of other crops important for local production. *P. dactylifera* is also an important species for the implementation of economic investment plans while managing water resources in order to develop a sustainable agriculture (Valipour, 2015a,b; Valipour et al., 2015d). The development of traditional

practices is one of the pathways that could reduce poverty while maintaining economic activity in North Africa (Valipour, 2015c).

On an ecological level, this species survives the drastic conditions of the desert when enough irrigation occurs. High temperature, intense light, UV, salt and sand erosion are the main stresses encountered. In a broad sense, the extremely xeric conditions of this environment lead to the development of morphological, physiological and molecular strategies for the survival of these plants. Thus, the formation of soils through the accumulation and dissolution of organic materials is reduced. The soil comprises sand or stony grounds with extremely low water storage capacity and is often salty. Among various strategies, the massive deposition of wax layers covering the epidermal cells prevents the dehydration of tissues and reflects solar radiation (Shepherd and Griffiths, 2006; Kim et al., 2007; Koch et al., 2009a). Thus, the evaporation of water through the cuticle is reduced, and only occurs through the stomata, which are often reduced in number, and protected at the bottom of a pit by the epicuticular waxes to reduce air turbulence above the guard cells and therefore prevent sweating. The cuticle is essential for maintaining the physiological integrity of the plant and incorporates other numerous functions of major importance for plant life. Indeed, this structure is also involved in the transport of lipophilic compounds, as a barrier limiting the loss of ions and

* Corresponding author.

E-mail addresses: rkhelil2002@yahoo.fr (R. Khelil), emilie.jarde@univ-rennes1.fr (E. Jardé), francisco.cabello@univ-rennes1.fr (F. Cabello-Hurtado), aminatakhelil@yahoo.fr (A. Ould-el-Hadj Khelil), marie-andree.esnault@univ-rennes1.fr (M.-A. Esnault).

as a general protection against biotic or abiotic stresses. Other general properties have also been attributed to the cuticle, such as the reduction of surface temperature (Müller and Riederer, 2005; Koch et al., 2009a; Bernard and Joubès, 2013).

The cuticle is a film comprising polymeric lipids, the polyester cutins, and soluble waxes localized to the outer surface of the cells of the epidermis (Jeffree, 2006). Compounds, such as polysaccharides or phenolics might also be present in the cuticle. The incorporated waxes are called intracuticular waxes. On the surface, crystals of varying shapes visible under scanning electron microscopy are epicuticular waxes. The cuticle covers all parts of the plant and can be reduced to a thin film of less than 0.5 μm or a microscopic film 100 μm thick (Koch et al., 2009a). The cuticle is occasionally visible as a glaucous or bluish wax covering leaves or fruits. Quantitatively, the waxes might only cover 1 mg per cm^2 on the leaves of plants in temperate environments, while the palm waxes of *Copernicia prunifera* (Mill.) H.E. Moore (*C. cerifera* (Arruda) Macedo), a species of the arid Brazilian region, possesses several mg per cm^2 waxes that can be mechanically extracted (Jeffree, 2006). The waxes comprise a mixture whose composition varies depending on the species, organ, developmental stage and environmental constraint. These waxes primarily contain aliphatic hydrocarbon chains and derivatives (alkanes, alcohols, aldehydes, acids, etc.), predominantly comprising alkanes (Kim et al., 2007; Koch and Ensikat, 2008; Koch et al., 2009b). The chain lengths are predominantly 20 and 40 carbon atoms, with some monoester corresponding to chains up to 60 carbon atoms (Domínguez and Heredia, 1998; Koch et al., 2009b). Among the derivatives, primary and secondary alcohols, ketones, fatty acids, aldehydes and some aromatic compounds, such as triterpenoids (Koch et al., 2009b), are often present.

The waxes are at the interface between the plant and the environment. Wax accumulates in response to environmental factors,

such as light or wind. Considering the economic importance of these plants and the objective of further studies on the response of this species to environmental constraints, the aim of the present study was to determine the composition of the waxes of date palms. Indeed, even if there is a variability in the amount of each wax compound according to the environmental conditions, the composition is markedly stable (Paroul et al., 2009). In addition, the physiology of the date palm has never been studied and deserves further clarification. To this end, in the present study, we examined the structure and the chemical composition of these waxes. The epicuticular and intracuticular waxes were not separated for this first study even if the short time used for extraction preferentially targeted the epicuticular wax (Buschhaus and Jetter, 2011).

2. Materials and methods

2.1. Materials

The palms were collected in Algeria in the Wilaya of Ouargla, in the septentrional Sahara. All samples were collected in the same week to avoid potential variations in the chemical composition of the waxes, as reported for other species. For the wax extraction, the palm leaves of three different plants were harvested in a palm grove (Hassi Ben Abdallah) in the surrounding area of Ouargla and three other in Hassi Messaoud, located 80 km from Ouargla. Ouargla is in the 'Deglet Nour' region, containing many traditional palm groves. In Hassi Messaoud, the date palms are urban plantations cultivated along the street. The leaves were collected from the 'Deglet Nour' cultivar. For scanning electron microscopy (SEM), we prepared the palm using a freeze-drying method to dehydrate the leaves after simple air-drying according to Pathan et al. (2008). Indeed, the lamina of the leaves had low water content (40–50%) and dried out easily and pretreatment at the critical point removed a part of the

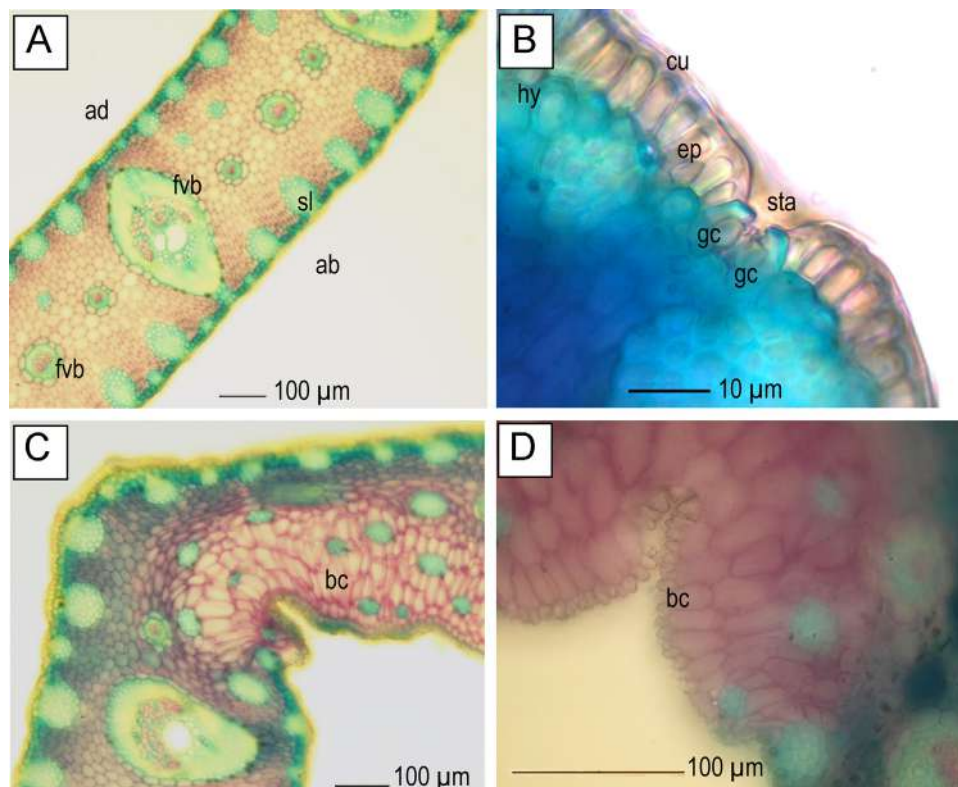


Fig. 1. Transverse section of date palm leaf. (A) Fibro-vascular bundles and mass of the sclerenchyma cells; (B) detail of the epidermis area with stomata; (C and D) bulliform cells in the midrib. ad, adaxial side; ab, abaxial side; bc, bulliform cell; cu, cuticle; ep, epidermis; gc, guard cell; hy, hypodermis; fvb, fibro-vascular bundle; sl, sclerenchyma; sta, stomatal aperture.

Table 1

Primary components identified in palm date waxes. The data correspond to the mean and SE (standard error of the mean) calculated after date the extraction, fractionation and GC–MS analysis of six palms.

Compounds	Mean (ng cm ⁻²)	SE
Low polar fraction <i>n</i> -alkane	3 094.3	463.7
Polar fraction		
Fatty acids	602.7	45.4
Fatty alcohols	78.9	9.3
Ketones	50.7	3.7
Sterols	276.7	36.4
	Cholestérol	4.2
	β-Sitosterol	33.7
Other triterpenoid	656.4	71.1
	Ursolic acid	76.0
	Betulin	41.0
Amide	Erucyl amide	0.4

Among the triterpenoids and amides, the identified compounds are in bold and italics.

waxes. The leaves were collected at six months (young leaves) and five years (old leaves). The samples were prepared after affixing to an adhesive microscope stub, followed by sputter coating with a thin gold layer of JEOL (Japan Electron Optics Laboratory Company Limited, Tokyo) JFC 1100 and investigated through scanning electron microscopy using a JEOL JSM 6301F (FEG = field emission gun) at the SEM facility of the University of Rennes 1 (Scanning Electron Microscopy and Microanalysis Centre). The crystal composition was analyzed using a conventional JEOL JSM 6400 and Link OXFORD INCA energy dispersion spectrometer.

For optical microscopy, the leaflets were collected and preserved in alcohol (100%). After cutting, the preparations were stained in a combination of alum carmine and iodine green and mounted with synthetic resin onto a glass slide.

2.2. Wax extraction

A very short dipping time is widely used by authors to preferentially probe the epicuticular wax (Buschhaus and Jetter, 2011). For this first study, we decided to use this method to identify the different classes of molecules in palm date waxes. The waxes were extracted from a sample of 250 g of finely cut dry leaves. To avoid any effect due to age, the palms used were three years old. Extraction with two solvents of intermediate polarity was performed to maximize the solubility of all constituents according to Jetter et al. (2006). The extraction was performed through incubation with 1 L of methanol. The dewaxing procedure was repeated with 1 L of dichloromethane, generating two fractions (GC grade). The samples were incubated in each solvent 30 s under gentle agitation to avoid extracting pigments according to Holloway (1984). To eliminate the solid parts, the extracts were filtered through a quartz filter (Whatman Glass microfiber filters GF/F) and subsequently evaporated under vacuum using a rotary evaporator. The water bath temperature was 50 °C for dichloromethane and 55 °C for methanol. The extracted waxes were weighed to calculate the total wax yield (μg cm⁻²). The dried residue was subsequently prepared for fractionation prior to gas chromatography–mass spectrometry analysis (GC–MS). The organic extracts were fractionated through liquid chromatography on a silica micro-column (1 g) previously washed with 200 mL of each solvent and activated at 150 °C for 4 h. The organic extract was diluted with 3 mL of cyclohexane/dichloromethane (2/1, v/v) and then quantitatively transferred to the top of the micro-column of activated silica to perform the elution of the hydrocarbons. The elution of polar compounds was carried out with 10 mL of methanol/dichloromethane (1/1, v/v). The two fractions (hydrocarbons and polar fractions) were sub-

sequently dried under a gentle flux of nitrogen and weighed for quantification.

2.3. Gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

The hydrocarbon fractions were directly analyzed and the polar fractions were analyzed after derivatization using BSTFA–TMCS [N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide and trimethylchlorosilane (Schummer et al., 2009; Salih and Çelikbıçak, 2011). Derivatization replaces the active hydrogen of the –COOH or –OH functional group to reduce dipole–dipole interactions and to increase the volatility of the polar compounds.

One microliter of the hydrocarbon or polar fraction was injected onto a Shimadzu QP2010-MS gas chromatograph/mass spectrometer (Shimadzu, Tokyo, Japan). The injector was operated in splitless mode and maintained at a temperature of 310 °C. The chromatographic separation was performed on a fused silica SLB-5 ms capillary column (from Supelco, length = 60 m, diameter = 0.25 mm, film thickness = 0.25 μm) under the following temperature program: 70 °C (held for 1 min) to 130 at 15 °C min⁻¹, followed by 130–300 °C (held for 15 min) at 3 °C min⁻¹. The helium flow was maintained at 1 mL min⁻¹. The chromatograph was coupled to the mass spectrometer through a transfer line heated to 250 °C. The analyses were performed in SIM mode (selective ion monitoring). The quantifications of the wax compounds was performed through the addition of internal standards in the solutions containing hydrocarbons and polar compounds (α-cholestane, perdeuterated *n*-eicosane, *n*-tetracosane and *n*-triacontane). The quantification method utilized a five-point calibration curve (0.1, 0.5, 1, 5, and 10 μg mL⁻¹) with a constant internal standard concentration of 4 μg mL⁻¹.

The detailed composition of the extracts obtained with dichloromethane or methanol were similar. Therefore, these results were pooled together for the data analysis. The units were standardized to ng cm⁻² ± SD (standard deviation). The leaf surface was easily determined because the leaflets, cut into 10-cm pieces, are regular and comparable to a rectangle.

The wax compound yield is presented as the means ± SE (standard error of the mean) of three independent extracts, and significant variations between the two stations of Ouargla and Hassi Messaoud were examined using the Mann–Whitney test (*p*-value < 0.05).

3. Results

The date palm leaves were first observed at the anatomical level prior to focusing more specifically on the ultrastructure of the epicuticular waxes. Then the chemical composition of the waxes was analyzed.

3.1. Leaf structure and epicuticular wax

The leaves of *P. dactylifera*, called fronds or palms, are pinnate and comprise longitudinally folded and hard leaflets arranged in a spiral pattern on the trunk or stipe. The leaflets are approximately 30 cm long and 2 cm wide with an anatomy typical of a monocot with an adaxial (lower) side that did not differ from the abaxial (upper) side in both outer appearance and inner architecture (Fig. 1). The epidermis comprises rectangular cells and has a single layer covered with a thick cuticle. Stomata are present on both epidermal layers with the two guard kidney-shaped cells classically surrounding the slit-shaped stomatal aperture and the substomatal chamber below the aperture (Fig. 1B). Under the epidermis, one to two other layers corresponding to the hypodermis were observed. Similar to other Arecaceae (Horn et al., 2009), two types of

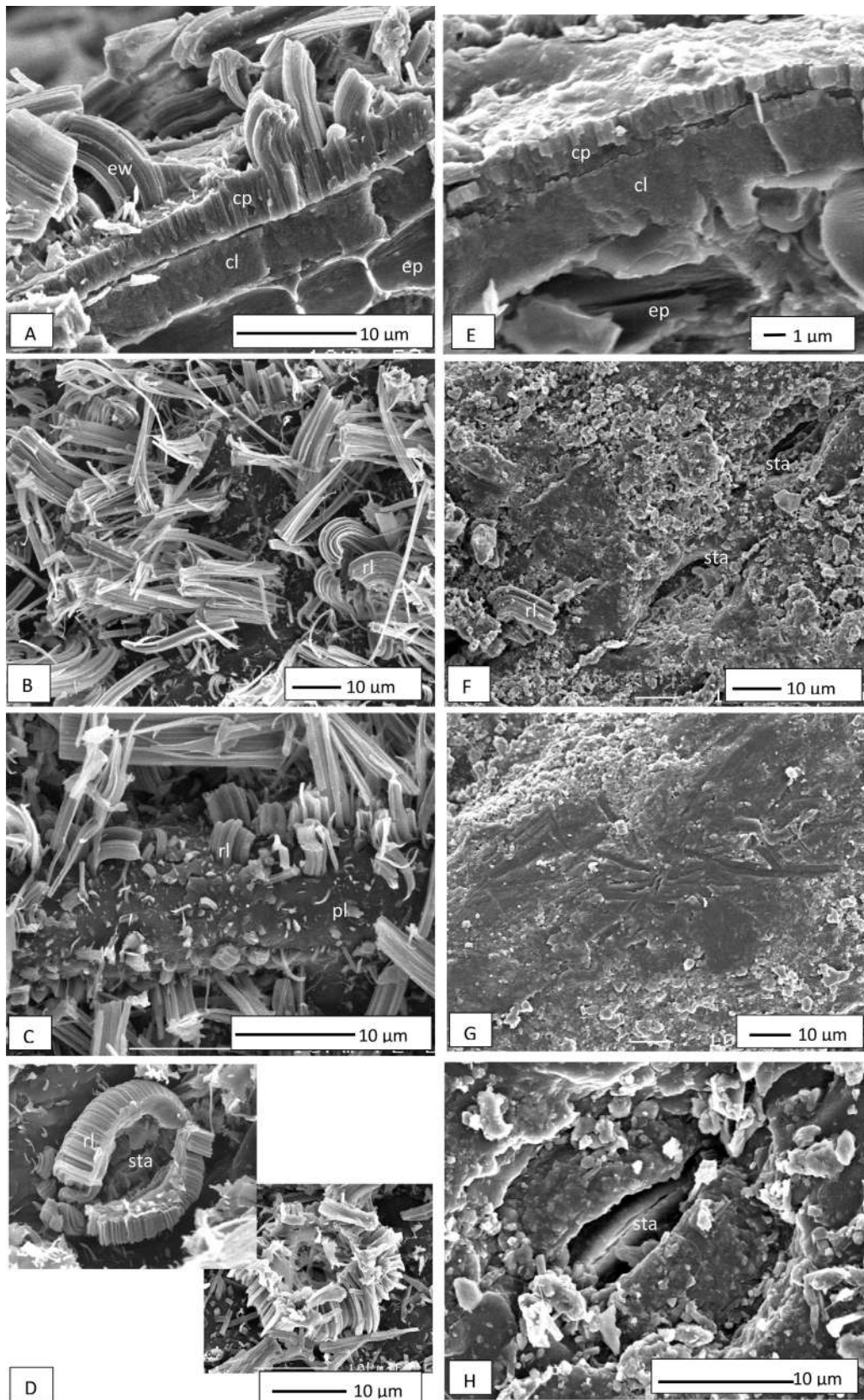


Fig. 2. Epicuticular wax structures of the date palm leaf. (A–D) Young leaves of six months old; (E–H) oldest photosynthetic leaves of five years old. A and E to H were observed from the adaxial side. B to D were observed from the abaxial side. A: Cross section showing the cuticle proper (cp) and epicuticular wax (ew) above the cuticular layer (cl) and the epidermis (ep) on a young leaf; B: rodlets (ri); C: platelets (pl) and rodlets; E: cross section of a 5-years-old leaf showing only a crust on the cuticle proper; the rodlets have disappeared on the oldest leaves; F and G: crust on an old leaf with traces of friction (G); D and H, stomatal aperture (sta) D—the stomatal aperture on a young leaf is surrounded by condensed rodlets forming a ring, H—the stomatal aperture in the dip formed in the epidermis without rodlet.

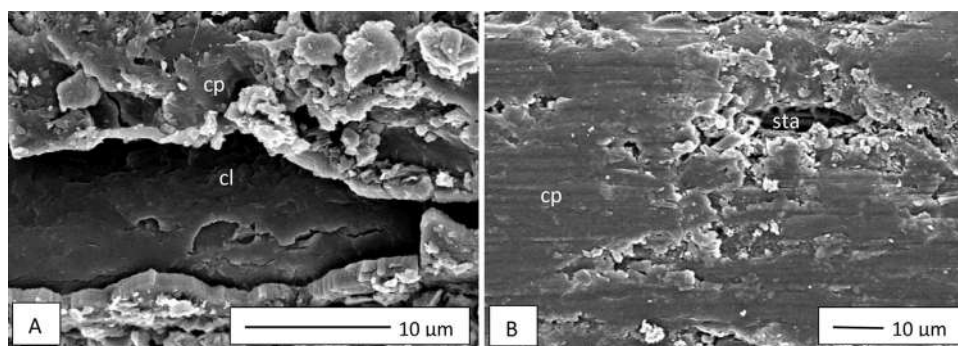


Fig. 3. Leaf surface after the extraction of the crystalloids of the waxes. (A) Cross-section of the cuticle showing the disappearance of the crystalloids. The cuticle proper (cp) and the cuticular layer (cl) remained intact. (B) The crystalloids also disappeared around the stomata (sta: stomatal aperture).

fibro-vascular bundles, large and small, and sclerenchymatous non-vascular fibre bundles are regularly distributed in the parenchyma, but without connection to the surface layer. Elsewhere, an important area of bulliform cells is located in the midrib (Fig. 1C and D).

The date palm produces a palm crown every year. The palms are generally physiologically active for five years and then become yellowish. The older palms remain attached to the stipe following senescence and must be manually removed. During the first month, the young leaves are rolled and remain protected in the centre of the crowns from major wind attacks. These leaves begin to flatten in shape from six months. During this state, both sides of the leaflets of the young leaves are covered with epicuticular sculptures in a similar manner (Fig. 2A–D). The epidermis is overlaid with an initial continuous layer (cuticular layer) identified only on a cross section or after artificial cracking. This layer is up to 5- μm thick (Fig. 2A). Above this layer, a second continuous layer, the cuticle proper (2–4 μm) give rises to the crystalloids, corresponding to the epicuticular wax (Fig. 2B). Among plants, the epicuticular waxes exhibit micromorphological diversity. The crystalloids vary in shape and size and appear in specific arrangements. Thus, herein we use the terminology of Barthlott et al. (1998) who investigated 13,000 plants species, to describe the crystalloids. In *P. dactylifera* wax, the most important crystalloids are rodlets. These structures have a polygonal morphology with a distinct longitudinal axis, and often bend. The lengths of the rodlets vary in size up to 25 μm above the continuous layer. Alternatively, some distinct wax projections are present with an irregular and sparse distribution. These projections appear as flat crystalloids connected to the crust at different angles through a narrow side, likely corresponding to platelets, the most common crystalloids (Fig. 2C). However, the structures of these crystalloids are not regular, and some of these projections could also correspond to rodlets in development. Around the stomata pores, the rodlets are well developed, protecting the stomata opening. These structures appear as palisades that can be densely packed, forming protrusions or rings (Fig. 2D).

On the oldest leaves, some effects of intense erosion were observed. Only a continuous crust remained (Fig. 2 E–H). Much debris and sand grains were present. The rodlets had almost completely disappeared, only remaining partially present in the folds of the leaflets and around some stomata. Signs of friction, reflecting rubbing and sand abrasion, were observed. Sand grains and calcium sulphate crystals were identified through energy dispersive spectrometry (data not shown). Many important salty areas corresponding to shallow temporary salt lakes, characteristic of north-central Algeria, called “chotts”, were present in this region, likely reflecting the origin of these crystals.

3.2. Wax composition

Observations using scanning electron microscopy after wax extraction to control the surface of the leaves showed that the crystalloids disappeared and the intracuticular layer remained intact (Fig. 3). Thus, the dipping time of 30s probably preferentially extracted the epicuticular waxes. However, in the absence of a specific extraction of epicuticular waxes, we will consider that the two types of waxes may be mixed in this study. The analysis of the wax composition showed similar results for the palms of both stations (Ouargla and Hassi Messaoud). The results of the Mann–Whitney test, demonstrated no significant variations between the two stations for all classes of compounds. Thus, the data were gathered and corresponded to the average of six palms. The yield of cuticular wax extracted from the palm was 78.03 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (SE \pm 11.31).

The low polar fraction was quantitatively the most important, solely represented by *n*-alkanes accounting for 65.0% of the total identified wax (Table 1). In the polar fraction, the mixture predominantly comprised triterpenoids (19.6%), with two identified compounds, ursolic acid (= 3- β -3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic-acid; 6.6%) and betulin (= Lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol; 7.2%). Among the triterpenoids, sterols were primarily represented by β -sitosterol (5.0%) and a weak content of cholesterol (0.8%). The low polar fraction also contained fatty acids (12.7% of the total), fatty alcohols (1.7%) and ketones (1.1%).

In all *n*-alkanes, fatty acids, fatty alcohols and ketones, a homologous series of aliphatics were identified with chain-length distributions typical for cuticular waxes. The *n*-alkanes ranged from C₁₅ to C₃₅, with a strong predominance of *n*-hentriacontane, with an average of 24.3% (Fig. 4). The C₂₇ to C₃₀ *n*-alkanes were present in a similar amount (approximately 11.6–12.7%). No branched alkanes were detected. Fatty acids with odd and even numbers of carbons from C₁₀ to C₂₉ were identified. The most important fatty acid was palmitic acid (9.1% of the fatty acids). Six branched *iso*- or *anteiso*-methyl fatty acids were found. Fatty alcohols from C₁₂ to C₃₀ were detected. The four main compounds, from C₁₉ to C₂₂, represented 46.2% of this class of molecules. No diols were detected. Three ketones, C₂₁, C₂₂ and C₂₃, represented 52.8% of the fraction. Only one amide, erucyl amide (0.04%), was identified. The waxes did not contain aldehydes.

4. Discussion

4.1. Date palm leaf characteristics

From a botanical point of view, the pinnate leaves are the most characteristic trait of the genus *Phoenix* in the palm family (Horn

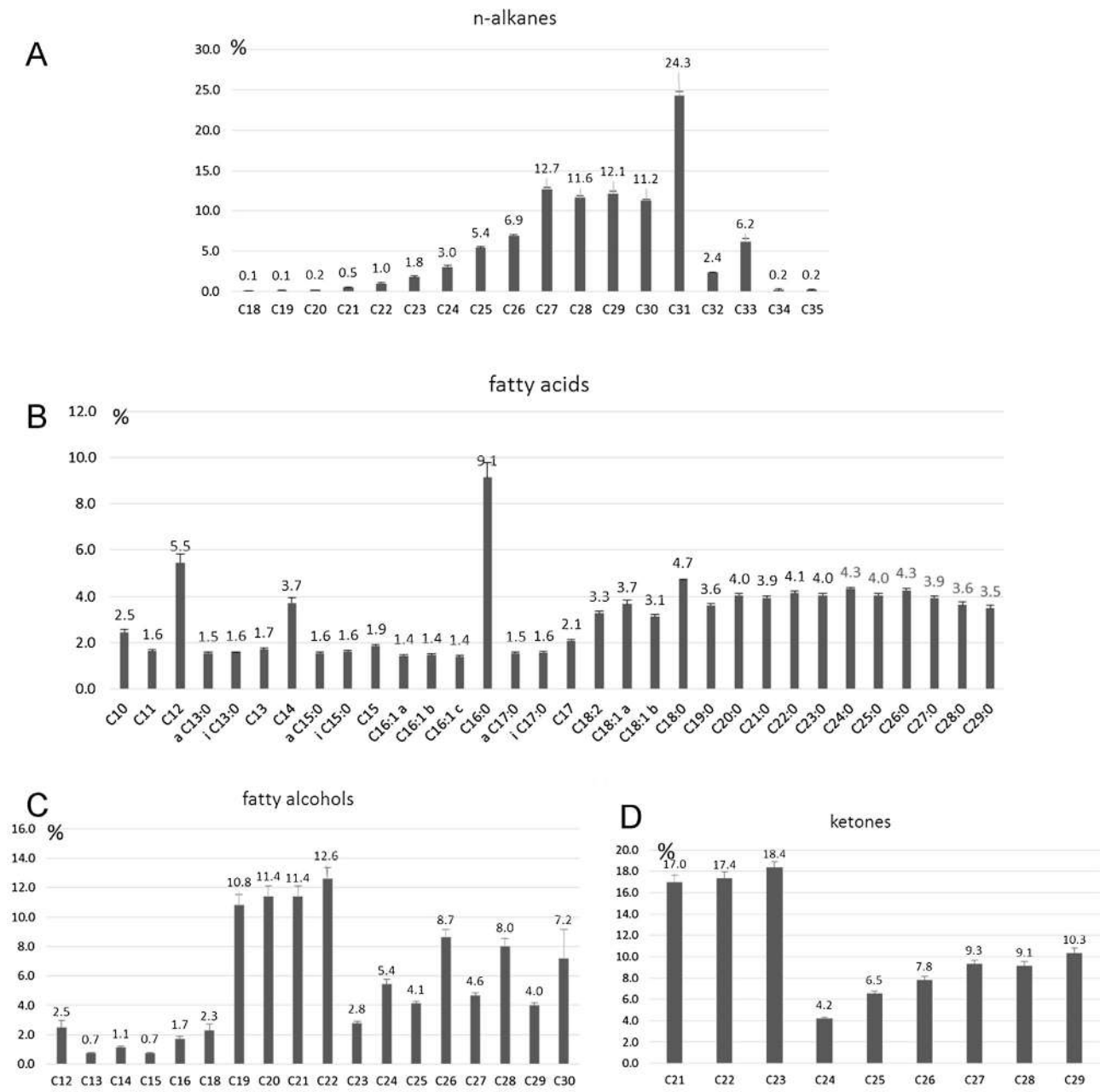


Fig. 4. Composition of the waxes of date palms. The compounds are listed according to the chain lengths in the homologous series of aliphatic compounds. Relative quantities are expressed as a percent of each compound in the class. A: *n*-alkanes, B: fatty acids, D: fatty alcohols, and E: ketones. The quantities are expressed as the relative yield (%) of the compound in the series (\pm standard deviation; $n=6$). Only main *n*-alkanes are represented (contributing for more than 0.1% of the total alkanes). Some isomeric fatty acids (a, b or c) were separated but could not be precisely identified.

et al., 2009). In the date palm, the anatomical characters of the lamina demonstrate the functional adaptation of these plants to xeric conditions, particularly the thick cuticle, the protection of the stomatal opening and the presence of bulliform cells. The bulliform cells, also called motor cells, function in the leaf movements. Most of the monocots possess specific, large and highly vacuolated cells involved in xeric resistance and surface-reducing movements through the modulation of leaf rolling to reduce evapotranspiration (Itoh et al., 2005; Xiang et al., 2012). These cells also show a reduction in the initial volume under xeric conditions and return to the initial volume when rehydrated.

A significant proportion of adaptations to xeric conditions also involve the presence of leaf wax and the protection of the stomata.

In *P. dactylifera*, the cuticle up to 34 μm above the epidermis and around the opening of the stomata contributes to the resistance of this species. Based on anatomical characters, the genus *Phoenix* is closely related to *C. prunifera* (Horn et al., 2009). This species is known for its thick layer of wax and harvested for economical uses as carnauba wax.

In the young date palm leaves, the main epicuticular waxes were represented by rodlets. In the date palm, the rodlets were up to 25 μm above the crust. In plants, the rodlets could range from 0.2 to 100 μm (Koch et al., 2009b). In the date palm, the rodlets merged together and bent inwards around the stomata, which is protected in a well. According to Barthlott and Frölich, (1983), these structures corresponded to the 'Strelitzia-Type', characteristic of some

subclasses of monocotyledons, such as Arecidae, Zingiberidae and Commelinidae (Barthlott et al., 1998; Koch et al., 2009b). These structures were similar to those of *Phenakospermum guyanense* (A.Rich.) Endl. ex Miq. (Strelitziaceae), which presented longitudinally aggregated rodlets (Barthlott et al., 1998). Aggregated rodlets were also present on the lower side of the leaves of *Musa* species (Koch et al., 2009b). Some platelets were also present on the leaves of the date palm. They are the most common crystalloids in all major plant groups (Barthlott et al., 1998).

The rodlets and platelets are aerial structures that emerged above the crust. With respect to both classifications of Barthlott et al. (1998) and Jetter et al. (2006), the crusts are massive wax coverings, characteristic of many succulents in Apocynaceae (ex Asclepiadaceae) or Cactaceae families. The wax crusts are substantial in Arecaceae (up to 10 nm in *Copernicia cowellii* Britton & P. Wilson for example) or Euphorbiaceae. In the date palm, the crust was up to 5 μm . The oldest leaves showed an important erosion of epicuticular waxes. In two Arecaceae of the genus *Butia* and *Syagrus*, (from Brazil and Uruguay), Paroul et al. (2009) showed crust and threads, respectively, but did not provide information concerning the age of the leaf. In *P. dactylifera*, the rodlets disappeared under erosion and remained only under depression or around some stomata. The crust resulted from the erosion of crystalloids. Indeed, the wax crystals were breakable and easily damaged through abrasion phenomena, reflecting rubbing between the leaves or particles distributed by wind (Van Gardingen et al., 1991). The effect of abrasion causes the erosion of epicuticular waxes and relieves the disappearance of these structures (Pitcairns et al., 1986; Barthlott et al., 1998; Van Gardingen et al., 1991). The structural changes in waxes impact leaf properties, such as a higher permeability of the cuticle and loss of water.

4.2. Wax composition

According to species (*Ligustrum vulgare* L., *Pisum sativum* L. or different *Nepenthes* sp.), total wax quantities varied from 8 $\mu\text{g cm}^{-2}$ to nearly 40 $\mu\text{g cm}^{-2}$ and epicuticular wax from 5 $\mu\text{g cm}^{-2}$ to 30 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (Buschhaus and Jetter, 2011). However, according to the method used, variations could be found. Thus, in *L. vulgare*, which possess leaves with an important cuticle, the weight of epicuticular waxes extracted with gum arabic adhesive represented 28 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (SD ± 3) (Buschhaus et al., 2007b). In *P. dactylifera*, the wax represented 78.0 $\mu\text{g cm}^{-2}$ (SE ± 11.31). In a species of the same family as the date palm, *Cocos nucifera* L., the total yield of leaf wax extracted after 40 s in hexane varied from 0.5 to 1.5 mg dm^{-2} (= 0.5–15 $\mu\text{g cm}^{-2}$) according to the ecotype (Arroyo-Serralta et al., 2012). In the plantlets of *P. dactylifera* cultivated in a greenhouse, Zaid and Hughes (1995) obtained an important efficiency of 1.7 g m^{-2} (SE ± 0.002) of wax (= 174 $\mu\text{g cm}^{-2}$) for the same cultivar, Deglet Nour. Most of the other studied cultivars had similar wax contents, except 'Zahidi' seedlings. However, these authors extracted the epicuticular wax using three successive incubations (30 s each) in chloroform and likely extracted more than the epicuticular wax. In the two previous Arecaceae, the average yields of crude epicuticular waxes from different species were 0.31% from dry leaves for *Butia* and 0.28% from *Syagrus* samples (Paroul et al., 2009). In *P. dactylifera*, wax represented an average of 0.44%.

In date palm leaves, the main components were *n*-alkanes (65.0%). These compounds represented an important part of the wax, contributing to the hydrophobic properties of the cuticle and representing the first barrier from external attacks. In the two previous Arecaceae, the yield of *n*-alkanes was lower, representing only 15.3% of the wax in *Butia* and 13.7% of the wax in *Syagrus* (Paroul et al., 2009). For other more phylogenetically distant species, the *n*-alkanes also corresponded to an important part of the wax, e.g., 52% in *Rosa canina* Siev. (Buschhaus et al., 2007a),

55% in *L. vulgare* L. (Buschhaus et al., 2007b), 20–28% in *Mandevilla guanabaria* Casar. Ex M.F. Sales, Kin-Gouv & A.O. Simões and 73% in *M. moricandiana* (A.D.C.) Woodson (Cordeiro et al., 2011). In the date palm, there is a wide distribution of alkanes ranging from C_{18} to C_{35} (Fig. 4) as is often the case in many species including other Arecaceae such as *Allagoptera* (Del Nero Rodriguez and Salatino, 2006). Amongst the *n*-alkanes, both graminoids and woody angiosperms produced C_{29} and C_{31} in abundance relative to other *n*-alkane chain lengths and differed substantially from gymnosperms, such as *Taxus baccata* L. (Bush and McInerney, 2013; Parsons et al., 2013; Wen et al., 2006). In the date palm, the aliphatic chains ranged from C_{15} to C_{35} . The main *n*-alkane, *n*-hentriacontane (C_{31}), represented an average of 24.3% of these compounds. In the *Butia* and *Syagrus* samples, hentriacontane (C_{31}) and tritriacontane (C_{33}) corresponded to 81.7% and 72.3% of the *n*-alkanes, respectively (Paroul et al., 2009). In many species, the epicuticular wax components were also dominated by *n*-alkanes, such as the tritriacontane in *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier (Van Maarseveen and Jetter, 2009) or *Sesamum indicum* L. (Kim et al., 2007).

In the date palm, triterpenoids and sterols represented 19.6% of the wax. Commonly, the triterpenoids were a variable percent of wax components in leaves. These compounds are often entirely restricted to the intracuticular wax layer (Buschhaus and Jetter, 2011). Thus, triterpenoids were absent in the leaves of *L. vulgare* L. or *Rubus fruticosus* L. (Buschhaus et al., 2007b; Haas and Rentschler, 1984). In *Ricinus communis* L., triterpenoids represented only 2.3–3.3% of the wax (Guhling et al., 2006) and 2.3–9.9% in different species of *Salix* (Tece et al., 2008). In contrast, in *Eucalyptus gunnii* Hook.f. leaves, the main wax components were triterpenoids (Koch et al., 2006). In *M. guanabaria* leaves, these compounds represented 55–63% of the waxes and 14% of the waxes in *M. moricandiana* (Cordeiro et al., 2011). In pepper fruit, the main wax constituents (up to 99% of the total) were *n*-alkanes, triterpenoids and phytosterols (Parsons et al., 2013). Using new technology, ToF-SIMS, Jetter and Sodhi (2011) demonstrated that the triterpenoids were present in both the very surface of the wax and in much deeper layers. In other Arecaceae, such as *C. nucifera*, 95% of the wax primarily comprised triterpenoids (Arroyo-Serralta et al., 2012). Particularly, in *P. dactylifera*, two terpenoids were identified, ursolic acid, belonging to the ursane family, and the betulin belonging to the lupane family. Ursolic acid is common in many species. Screening 39 rich triterpenoid species, Jäger et al. (2009) detected this acid in a maximum of 2.95 g/100 g of leaves. When expressed in the same unit, ursolic acid represented 0.94 g/100 g (SE ± 0.23) in *P. dactylifera*. In contrast, betulin was less common (7.16% of the total wax). Jäger et al. (2009) quantified this compound only in the bark of *Betula alba* L. (10.5–18.3 g/100 g) and detected traces in the bark of *Olea Europea* L., *Platanus acerifolia* (Aiton) Willd and *Sambucus nigra* L. In the date palm, betulin represented 1.0 g/100 g (SE ± 0.12). Betulin was also identified in *E. gunnii* leaves, but the yield was not indicated (Koch et al., 2006). We detected two sterols in the wax of date palm leaves, cholesterol and β -sitosterol. In the stems of the same species, Fernandez et al. (1983) identified sterols, such as lupeol, β -sitosterol, stigmastanol and campesterol, and steroid diones, such as 5 α -stigmast-22-en-3,6-dione and 5 α -campestan-3,6-dione. However, the extraction likely generated a total extract of stem compounds and not only the waxes.

In the date palm, in addition to *n*-alkanes, the aliphatic compounds also included fatty acids (12.7%) and in small amounts, fatty alcohols (1.7%) and ketones (1.1%). These three classes of compounds are common in leaves but could be detected in variable amounts (for a review on wax compound, see Jetter et al., 2006). Thus, in alfalfa leaves (*Medicago sativa* L.), the cuticular waxes predominantly comprised primary alcohols (41.7–54.2%), alkanes (13.2–26.9%) and terpenoids (17.5–28.9%), with small amounts of

aldehydes (1.4–3.4%) (Ni et al., 2012). Diols could be present in high amounts in other species, such as *T. baccata*, where these compounds are predominately detected in the epicuticular layer (Wen et al., 2006). In *L. vulgare*, fatty acids represented 18% of the compounds (Buschhaus et al., 2007b), and in the mature hypocotyls of *R. communis*, the fatty acids (79.3%) and aldehydes (3.7%) were the two main classes (Guhling et al., 2006). In the carnauba wax (*C. prunifera*), a palm species of economic importance, in addition to the alkanes from C₁₆ to C₃₃, Vandenberg and Wilder (1970) identified alkanols from C₂₁ to C₃₄, alkanediols from C₁₉ to C₃₄ and hydroxyalkanoic acids from C₁₆ to C₃₂. Among the fatty acids in the date palm, six compounds were branched-chain fatty acids. These molecules are common constituents of the lipids of bacteria and animals and are less common in plants. Thus, branched-chain fatty acids were detected in sugar polyesters secreted from Solanaceous plants (Van der Hoeven and Steffens, 2000).

One amide was detected, erucyl amide (*cis*-13-docosenamide), representing 0.04% of the all compounds. This compound, also known as erucamide, is frequently obtained from erucic acid (C22: 1) and is of high importance worldwide for its, cold stability, fire resistance and industrial use as a slip agent (Wypych, 2005). Erucamide has also been used as a surfactant for wastewater processing (Zhu et al., 2010) and cosmetics. This compound has also been studied for effects on animals and humans (Bertin et al., 2012; Farrell and Merkle, 2008).

Previous studies have shown correlations between epicuticular wax structures and dominant wax compounds (Barthlott et al., 1998; Jetter et al., 2006). Indeed, some plants possess specific epicuticular wax patterns. In *K. daigremontiana* leaf wax, the *n*-alkanes are dominated by tritriacontanes and triterpenoids are dominated by glutinols and friedelins (Van Maarseveen and Jetter, 2009). It has been suggested that this composition could be involved in crystal formation. In other studies, both alkanes and triterpenoids have been implicated in wax patterns or the formation of the crystalloids of different species (Jetter et al., 2006). *n*-Alkanes and triterpenoids have also been implicated in various shapes of crystalloids, including platelets and rodlets. In this context, we hypothesized that the high yield of *n*-alkanes and triterpenoids in *P. dactylifera* reflects the patterns in epicuticular wax. However, a more specific extraction of epicuticular waxes will be needed to confirm this hypothesis. The 'Strelitzia' wax type is typically observed in monocotyledons and some dicotyledons (Meusel et al., 1994). After screening four species, the authors concluded that the rodlets in the three monocotyledons exclusively comprise aliphatic wax lipids, particularly wax esters. In the dicotyledon, *Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn., the longitudinal ridged rodlets, similar to the date palm rodlets, comprised triterpenols. In *Strelitzia reginae* Banks, the reference for crystalloids, the aliphatic compounds included alkanes C₁₉ to C₃₁ (2%), esters C₄₂ to C₅₂ (43%), aldehydes C₂₄ to C₃₂ (11%), primary alcohols C₁₆ to C₃₂ (23%) and fatty acids C₁₆ to C₃₂ (6%). The aliphatic wax composition of date palm leaves was different, and the crystalloid pattern was obviously not the reflection of only one composition. Consequently, these results were consistent with those of Meusel et al. (1994) who concluded that the formation of rodlets could be interpreted as ultrastructural convergence rather than a typical chemical constitution. However, some specific composition, such as compounds with mid-chain oxy-substituents, β-diketones, hydroxyl-β-diketones, diols and secondary alcohols, associated with tubes, could be closely associated with crystalloid patterns (Jeffrey, 2006; Shepherd and Griffiths, 2006). Similarly, Cameron et al. (2002) suggested that the crystalline wax structure between *Salix* and *Populus* species might reflect a combination of components rather than the predominance of a single component. Wen et al. (2006) reported that the presence or absence of diols in wax components from the abaxial or adaxial surface of

needles of *T. baccata* did not affect the formation of tubular crystalloids.

5. Conclusion

In conclusion, the anatomy of date palm leaves and ultrastructure of the waxes demonstrate functional adaptation to the drastic conditions of the desert. Indeed, this species grows in sandy areas subject to sandstorms. The cuticle shows traces of the attacks on older leaves. It would therefore be interesting to follow the evolution of epicuticular wax compounds, depending on the age of the leaf, and to measure the impact of erosion on stress markers, such as oxidative stress, to better understand the physiology of this species.

The waxes comprise a high proportion of *n*-alkanes and triterpenoids that could be implicated in the rodlet structure. The pharmacological relevance of this class of compounds has increased, considering the properties of some of the molecules, such as wound healing, anti-inflammatory, anti-bacterial, antiviral, hepatoprotective and anti-tumoural effects (Jäger et al., 2009). For example, *P. dactylifera* could be a new source of betulin considering the high amount of leaf material and could offer new perspectives for economical use. However, it is now necessary to selectively separate the epicuticular wax from the intracuticular wax to deepen our knowledge of the palm date leaf waxes. After that, sampling must be widened in order to analyze the variability of palm date wax in the Sahara and under different climate conditions.

Acknowledgements

This work was funded through the International Programme Partenariat Hubert Curien Tassili 11MDU822 in France and Algeria. The SEM was performed at the Scanning Electron Microscopy and Microanalysis Centre at the University of Rennes 1.

References

- Arroyo-Serralta, G.A., Zizumbo-Villareal, D., Escalante Erosa, F., Peña-Rodríguez, L.M., 2012. Cuticular wax composition of coconut palms and their susceptibility to lethal yellowing disease. *J. Mex. Chem. Soc.* 56, 67–71.
- Barthlott, W., Neinhuis, C., Cutler, D., Ditsch, F., Meusel, I., Theisen, I., et al., 1998. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Bot. J. Linn. Soc.* 126, 237–260.
- Barthlott, W., Frölich, D., 1983. Mikromorphologie und orientierungsmuster epicuticularer wachskristalloide, ein neues systematisches merkmal bei monokotylen. *Plant Syst. Evol.* 142, 171–185.
- Bernard, A., Joubès, J., 2013. Arabidopsis cuticular waxes: advances in synthesis, export and regulation. *Prog. Lipid Res.* 52, 110–129.
- Bertin, M.J., Zimba, P.V., Beauchesne, K.R., Huncik, K.M., Moeller, P.D.R., 2012. Identification of toxic fatty acid amides isolated from the harmful alga *Prymnesium parvum* carter. *Harmful Algae* 20, 111–116.
- Buschhaus, C., Herz, H., Jetter, R., 2007a. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on adaxial sides of *Rosa canina* leaves. *Ann. Bot.* 100, 1557–1564.
- Buschhaus, C., Herz, H., Jetter, R., 2007b. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on the adaxial side of *Ligustrum vulgare* leaves. *New Phytol.* 176, 311–316.
- Buschhaus, C., Jetter, R., 2011. Composition differences between epicuticular and intracuticular wax substructures: how do plants seal their epidermal surfaces? *J. Exp. Bot.* 62, 841–853.
- Bush, R.T., McInerney, F.A., 2013. Leaf wax *n*-alkane distributions in and across modern plants: implications for paleoecology and chemotaxonomy. *Geochim. Cosmochim. Acta* 117, 161–179.
- Cameron, K.D., Teece, M.A., Bevilacqua, E., Smart, L.B., 2002. Diversity of cuticular wax among *Salix* species and *Populus* species hybrids. *Phytochemistry* 60, 715–725.
- Cordeiro, S.Z., Simas, N.K., Carmo de Oliveira Arruda, R., Sato, A., 2011. Composition of epicuticular wax layer of two species of *Mandevilla* (Apocynaceae, Apocynaceae) from Rio de Janeiro, Brazil. *Biochem. Syst. Ecol.* 39, 198–202.
- Del Nero Rodriguez, C., Salatino, A., 2006. Hydrocarbons from epicuticular waxes of *Allagoptera* (Arecaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 265–266.
- Domínguez, E., Heredia, A., 1998. Waxes: a forgotten topic in lipid teaching. *Biochem. Educ.* 26, 315–316.
- Farrell, E.K., Merkle, D.J., 2008. Biosynthesis, degradation and pharmacological importance of the fatty acid amides. *Drug Discov. Today* 13, 558–568.

- Fernandez, M.A., Pedro, J.R., Seoane, E., 1983. Constituents of a hexane extract of *Phoenix dactylifera*. *Phytochemistry* 22, 2087–2088.
- Guhling, O., Hobl, B., Yeats, T., Jetter, R., 2006. Cloning and characterization of a lupeol synthase involved in the synthesis of epicuticular wax crystals on stem and hypocotyl surfaces of *Ricinus communis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 448, 60–72.
- Haas, K., Rentschler, I., 1984. Discrimination between epicuticular and intracuticular wax in blackberry leaves: ultrastructural and chemical evidence. *Plant Sci. Lett.* 36, 143–147.
- Holloway, P.J., 1984. Surface lipids of plants and animals. In: Mangold, H.K., Zweig, G., Sherma, J. (Eds.), *Handbook of Chromatography, Lipids*, 1. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 347–380.
- Horn, J.W., Fisher, J.B., Tomlinson, P.B., Lewis, C.E., Laubengayer, K., 2009. Evolution of lamina anatomy in the palm family (*Arecaceae*). *Am. J. Bot.* 96, 1462–1486.
- Itoh, J.-I., Nonomura, K.-I., Ikeda, K., Yamaki, S., Inukai, Y., Yamagishi, H., Kitano, H., Nagato, Y., 2005. Rice plant development: from zygote to spikelet. *Plant Cell Physiol.* 46, 23–47.
- Jäger, S., Trojan, H., Kopp, T., Laszczyk, M.N., Scheffler, A., 2009. Pentacyclic triterpene distribution in various plants—rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* 14, 2016–2031.
- Jeffree, C.E., 2006. The fine structure of plant cuticle. In: Riederer, M., Müller, C. (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 11–125.
- Jetter, R., Kunst, L., Samuels, A.L., 2006. Composition of plant cuticular waxes. In: Riederer, M., Müller, C. (Eds.), *Biology of the Plant Cuticle*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 145–181.
- Jetter, R., Sodhi, R., 2011. Chemical composition and microstructure of waxy plant surfaces: triterpenoids and fatty acid derivatives on leaves of *Kalanchoe daigremontiana*. *Surf. Interface Anal.* 43, 326–330.
- Kim, K.S., Park, S.H., Jenks, M.A., 2007. Changes in leaf cuticular waxes of sesame (*Sesamum indicum* L.) plants exposed to water deficit. *J. Plant Physiol.* 164, 1134–1143.
- Koch, K., Bhushan, B., Barthlott, W., 2009b. Multifunctional surface structures of plants: an inspiration for biomimetics. *Prog. Mater. Sci.* 54, 137–178.
- Koch, K., Dommisse, A., Niemietz, A., Barthlott, W., Wandelt, K., 2009a. Nanostructure of epicuticular plant waxes: self-assembly of wax tubules. *Surf. Sci.* 603, 1961–1968.
- Koch, K., Ensikat, H.J., 2008. The hydrophobic coatings of plant surfaces: epicuticular wax crystals and their morphologies, crystallinity and molecular self-assembly. *Micron* 39, 759–772.
- Koch, K., Hartmann, K.D., Schreiber, L., Barthlott, W., Neinhuis, C., 2006. Influences of air humidity during the cultivation of plants on wax chemical composition, morphology and leaf surface wettability. *Environ. Exp. Bot.* 56, 1–9.
- Meusel, I., Leistner, E., Barthlott, W., 1994. Chemistry and micromorphology of compound epicuticular wax crystalloids (*Strelitzia* type). *Plant Syst. Evol.* 193, 115–123.
- Müller, C., Riederer, M., 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *J. Chem. Ecol.* 31, 2621–2651.
- Ni, Y., Guo, Y.J., Guo, Y.J., Han, L., Tang, H., Conyers, M., 2012. Leaf cuticular waxes and physiological parameters in alfalfa leaves as influenced by drought. *Photosynthetica* 50, 458–466.
- Paroul, N., Cansian, R.L., Rossato, M., Pualetti, G.F., Serafini, L.A., Rota, L., Moyna, P., Heinzen, H., 2009. Use of palmar wax hydrocarbon fractions as chemotaxonomical markers in *Butia* and *Syagrus*. *Braz. J. Biol.* 69, 353–361.
- Parsons, E.P., Popovskiy, S., Lohrey, G.T., Alkalai-Tuvia, S., Perzelan, Y., Bosland, P., Bebeli, P.J., Paran, I., Fallik, E., Jenks, M.A., 2013. Fruit cuticle lipid composition and water loss in a diverse collection of pepper (*Capsicum*). *Physiol. Plant.* 149, 160–174.
- Pathan, A.K., Bond, J., Gaskin, R.E., 2008. Sample preparation for scanning electron microscopy of plant surfaces—horses for courses. *Micron* 39, 1049–1106.
- Pitcairns, C.E.R., Jeffree, C.E., Grace, J., 1986. Influence of polishing and abrasion on the diffusive conductance of leaf surfaces of *Festuca arundinacea* Schreb. *Plant Cell Environ.* 9, 191–196.
- Salih, B., Çelikbiçak, Ö., 2011. Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications. InTech, Rijeka, Croatia, 358p.
- Schummer, C., Delhomme, O., Appenzeller, B.M.R., Wenning, R., Millet, M., 2009. Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* 77, 1473–1482.
- Shepherd, T., Griffiths, D.W., 2006. The effects of stress on plant cuticular waxes. *New Phytol.* 171, 469–499.
- Teece, M.A., Zengeya, T., Volk, T.A., Smart, L., 2008. Cuticular wax composition of *Salix* varieties in relation to biomass productivity. *Phytochemistry* 69, 396–402.
- Valipour, M., 2015a. Future of agricultural water management in Africa. *Arch. Agron. Soil Sci.* 61, 907–927.
- Valipour, M., 2015b. What is the tendency to cultivate plants for designing cropping intensity in irrigated area? *Adv. Water Sci. Technol.* 2, 01–12.
- Valipour, M., 2015c. Land use policy and agricultural water management of the previous half of century in Africa. *Appl. Water Sci.* 5, 367–395.
- Valipour, M., Ahmadi, M.Z., Raeini-Sarjaz, M., Sefidkouhi, M.A.G., Shanazari, A., Fazlola, R., Darzi-Naftchali, A., 2015d. Agricultural water management in the world during past half century. *Arch. Agron. Soil Sci.* 61, 657–678.
- Van der Hoeven, R.S., Steffens, J.C., 2000. Biosynthesis and elongation of short- and medium-chain-length fatty acids. *Plant Physiol.* 122, 275–282.
- Van Gardingen, P.R., Grace, J., Jeffree, C.E., 1991. Abrasive damage by wind to the needle surfaces of *Picea sitchensis* (Bong.) Carr. and *Pinus sylvestris* L. *Plant. Cell Environ.* 14, 185–193.
- Van Maarseveen, C., Jetter, R., 2009. Composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on *Kalanchoe daigremontiana* (Hamet et Perr. De la Bathie) leaves. *Phytochemistry* 70, 899–906.
- Vandenburg, L.E., Wilder, E.A., 1970. The structural constituents of Carnauba wax. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 47, 514–518.
- Wen, M., Buschhaus, C., Jetter, R., 2006. Nanotubules on plant surfaces: chemical composition of epicuticular wax crystals on needles of *Taxus baccata* L. *Phytochemistry* 67, 1808–1817.
- Wypych, G., 2005. *Handbook of Antiblocking, Release, and Slip Additives*. ChemTec Publishing Toronto, pp. 327.
- Xiang, J.-J., Zhang, G.-H., Qian, Q., Xue, H.-W., 2012. SEMI-ROLLED LEAF1 encodes a putative glycosylphosphatidylinositol-anchored protein and modulates rice leaf rolling by regulating the formation of bulliform cells. *Plant Physiol.* 159, 1488–1500.
- Yannopoulos, S., Lyberatis, G., Theodossiou, N., Li, W., Valipour, M., Tamburrino, A., Angelakis, A.N., 2015. Evolution of water lifting devices (pumps) over the centuries worldwide. *Waters* 7, 5031–5060.
- Zaid, A., Hughes, H., 1995. In vitro acclimatization of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plantlets: a quantitative comparison of epicuticular leaf wax as a function of polyethylene glycol treatment. *Plant Cell Rep.* 15, 111–114.
- Zhu, Y., Wen Huang, W., Ni, J., 2010. A promising clean process for production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright. *J. Clean. Prod.* 18, 242–247.
- Zohary, D., Hopf, M., Weiss, E., 2012. *Domestication of Plants in the Old World*, 4th ed. Oxford University Press Inc., New York, pp. 328.