

Réponses d'antioxydants chez *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale à la pollution atmosphérique au niveau de deux zones urbaine et semi-urbaine dans la région d'Annaba (Est de l'Algérie)

Responses of antioxidants in *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale to the atmospheric pollution air at two urban and semi-urban areas in the region of Annaba (East of Algeria)

Monia Serradj Ali Ahmed^{1*}, Zine Eddine Boumedris^{2**}, Mohamed Reda Djebar¹, Ali Tahar²

Résumé

Le but de cette étude était d'identifier chez le lichen *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, des biomarqueurs de stress oxydants qui pourraient fournir des indications de stress dû à la pollution de l'air. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale a été transplanté de son habitat naturel non pollué (forêt de Bougous) à deux zones polluées urbaine et semi-urbaine, pour une période maximale de 4 mois.

Les premiers signes de stress ont été détectés par l'augmentation des teneurs des protéines d'une façon significative d'une station à une autre. Par la suite, par l'augmentation très hautement significative de l'activité des enzymes Ascorbate peroxydase (APX) et Gaiacol-peroxydase (GPX) d'un site à un autre, la Catalase (CAT) présente une activité significative dans l'espace. Nous avons constaté une nette augmentation de ces paramètres dans les transplants de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale au niveau de la zone urbaine par rapport à la zone semi-urbaine. Par contre, la teneur des protéines et l'activité des différents enzymes sont très faibles au niveau de la zone témoin (forêt de Bougous).

Rares sont les publications qui traitent de l'interaction des polluants métalliques et gazeux, alors qu'ils peuvent être présents ensemble sur un même site (urbain ou industriel) et ainsi agir de concert sur la physiologie des lichens. Effectivement, nos résultats reflètent très bien ce phénomène (interaction plomb et polluants gazeux, tels que les NOx) à travers l'augmentation des taux des protéines qui, normalement, sous l'effet d'un stress, verront leur catabolisme augmenter.

Mots-clés

lichen, pollution atmosphérique, stress, transplantation, enzymes, protéines

Abstract

The purpose of this study was to identify, in the lichen *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, antioxidants that may provide indications of stress of air pollution. *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale was transplanted from its natural habitat relatively unpolluted (forest of Bougous) in two polluted areas: urban and semi-urban, for a maximum period of 4 months.

The first signs of stress were detected by the increase in the contents of proteins in a significant way in space thereafter, by the increase very highly significant in the activity of the enzymes Ascorbate peroxidase (APX) and Guaiacol-peroxidase (GPX) in space, on the other hand Catalase (CAT) presents only significant activity in space. We noted a clear increase in these parameters in the transplants of *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale on the level of the urban area compared to the semi urban area. On the other hand, the content of protein and the activity of different enzymes is very low at the control region (forest of Bougous).

There are few publications dealing with the interaction of metallic and gaseous pollutants, while they may be present together on the same site (urban or industrial) and thus act in concert on the physiology of lichens. Indeed, our results reflect very well this phenomenon (interaction lead and gaseous pollutants such as the NOx) through increased levels of proteins that normally under the effect of stress will increase their catabolism.

Keywords

lichen, atmospheric pollution, stress, transplantation, enzymes, protein

(1)(*) Laboratoire de biologie végétale et environnement. Département de biologie. Faculté des sciences, université Badji Mokhtar, BP 23000 Annaba, Algérie. Email : serradj.moniam@gmail.com

(2)(**) Laboratoire de toxicologie cellulaire. Département de biologie. Faculté des sciences, université Badji Mokhtar, BP 23000 Annaba, Algérie. Email : zinoss05@hotmail.com

Introduction

En Algérie, la détection et la mesure de la pollution atmosphérique sont à l'ordre du jour. En effet, il y a plus de deux décennies que les autorités publiques ont pris conscience des problèmes liés à l'environnement. La région d'Annaba est en butte à un problème aigu de pollution atmosphérique urbaine et industrielle générée par différentes sources (unités industrielles, urbanisation anarchique, développement des voies de communication et extension du parc automobile) engendrant des rejets de polluants non contrôlés (Rahali, 2002).

L'établissement d'un réseau de surveillance basé sur des capteurs physiques est extrêmement onéreux pour mesurer la pollution atmosphérique d'une ville comme Annaba et sa périphérie. Pour pallier à ce problème, la bio-indication lichénique est un choix tout à fait justifié, c'est un outil simple et complémentaire des mesures physico-chimiques réalisées par ce réseau.

Les lichens sont d'excellents indicateurs des effets des polluants sur l'environnement (Deruelle, 1978). Contrairement aux végétaux supérieurs, ils n'ont pas de vaisseaux conducteurs ni de système racinaire, ce qui assure d'une exposition quasi exclusive aux composés d'origine atmosphérique.

Ce constat a incité les chercheurs à utiliser les lichens de diverses manières. La sensibilité intrinsèque de ces espèces face aux phytotoxiques urbains permet d'établir l'ampleur des effets des polluants sur des espèces sentinelles de l'environnement (McCarthy et Vaughan, 2004).

Dans le même contexte se résume l'objectif de notre travail qui est l'étude de la réponse d'un lichen foliacé transplanté de la forêt de Bougous, *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, au stress causé par la pollution atmosphérique au niveau de deux zones urbaine et semi-urbaine à travers un dosage de paramètres biochimiques, tels que les protéines et les enzymes Ascorbate peroxydase (APX), Gaïacol-peroxydase (GPX) et la Catalase (CAT).

1. Matériels et méthodes

1.1. Présentation de la zone d'étude

Annaba est située à l'est de l'Algérie, entre les latitudes (36°30) et (37°30) Nord et les longitudes (07°20) et (08°40) Est.

Elle est bordée au nord par la Méditerranée, à l'est par le département d'El-taref, au sud par le département de Guelma, et à l'ouest par le département de Skikda. Elle couvre une superficie de 1411,98 km².

Annaba présente toutes les caractéristiques d'un relief en forme de cuvette, d'où un risque élevé d'inversion thermique (effets de brises de terre et de mer soufflant dans des sens contraires). Les polluants émis par les unités industrielles et balayés par la brise de terre se heurtent contre le flanc du mont Edough pour se rabattre sur l'agglomération.



Figure 1. Localisation géographique de la région d'étude (Annaba) et le témoin (El Kala) (Source : Ali Ahmed, 2007).

Geographical localization of the study region of Annaba and the control (El Kala).

Tableau 1. Données thermiques d'Annaba (2009-2012).

Thermal data of Annaba (2009-2012).

Mois	Température maximale M (°C)	Température maximale moyenne (M+m)/2 (°C)	Température minimale m (°C)	Amplitude thermique (M-m) (°C)
Janvier	16	11,5	7	9
Février	17	12	7	10
Mars	19	9	8	11
Avril	21	15,5	10	11
Mai	25	19	13	12
Juin	28	22	16	12
Juillet	32	25,5	19	13
Août	32	26	20	12
Septembre	29	23,5	18	11
Octobre	27	21	15	12
Novembre	21	16	11	10
Décembre	17	12,5	8	9
Moyenne	23,66	17,79	12,66	11

1.2. Secteurs industriels

Annaba, par sa position stratégique, compte une base industrielle de transformation des matières premières locales, notamment le minerai de fer.

Cette base repose principalement sur le complexe sidérurgie Metal Steel, le plus grand complexe sidérurgique d'Afrique, le grand complexe d'engrais phosphatés Fertial, et les anciens ateliers de transformation métallique Ferrovial. Viennent ensuite la zone d'activité commerciale, les zones industrielles. Ces bases sont à l'origine d'importantes émissions (voir figure 1).

1.3. Trafic routier

Annaba, de par sa position géographique privilégiée (situation de carrefour) et de son développement, a polarisé jusqu'à ce jour un fort trafic routier autour de l'agglomération ; en effet, le nombre de véhicules, estimé à 149 843 en 2011, est principalement concentré autour de la zone centrale, principalement El-Bouni, Sidi Amar et El-hadjar.

1.4. Données climatiques

À l'instar des autres régions côtières de l'Algérie, Annaba présente dans son ensemble des traits de types méditerranéens avec des étages bioclimatiques subhumide et humide, c'est-à-dire une saison humide douce et humide sèche. Certains paramètres climatiques sont pris en considération dans notre étude car ils ont un rôle particulièrement important dans la dispersion des polluants.

1.4.1. Température

La température constitue un des facteurs déterminants du comportement des végétaux dans leur milieu. Les paramètres thermiques (température maximale moyenne (M+m)/2) et amplitude thermique (M-m) sont consignés dans le tableau 1.

Nous remarquons la faiblesse des écarts de l'amplitude thermique d'un mois à l'autre. Les valeurs mensuelles permettent de calculer les paramètres annuels : la température moyenne annuelle est de 17,79 °C, avec une température maximale annuelle moyenne de 23,66 °C et une température minimale annuelle moyenne de 12,66 °C. L'amplitude thermique moyenne annuelle est de 11°.

1.4.2. Pluviométrie

La pluie, la neige et autres formes de précipitations atmosphériques réalisent le lavage, l'absorption et l'entraînement vers le sol des impuretés de l'air ; la pluviométrie moyenne annuelle durant la période 2009-2012 est de 674,83 mm. Décembre est le mois le plus pluvieux avec une valeur de 310,42 mm, tandis que la valeur minimale a été enregistrée au mois de juillet avec 33,74 mm (donnés 2009/2012).

1.4.3. Humidité

Dans la région d'Annaba, le degré hygrométrique est très élevé tout au long de l'année, il est de 74,083 % durant la période (2009-2012)¹.

(1) <http://www.tutiempo.net/clima/Annaba/603600.htm>

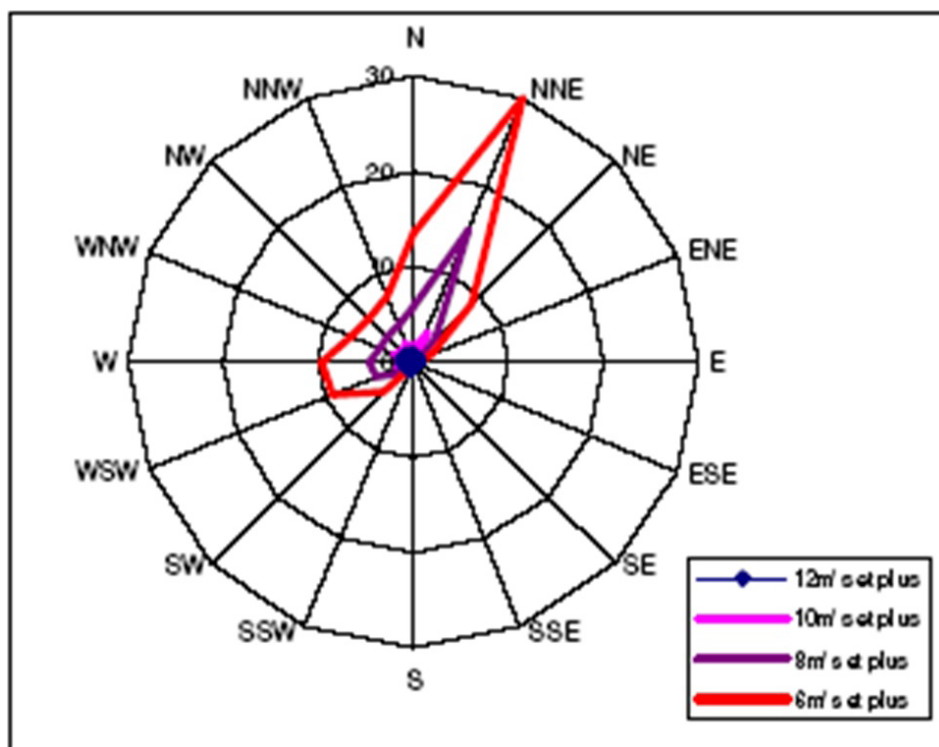


Figure 2. Rose des vents 2009 (Source : Meteorological Station Airport Salines, Annaba).

Rose of winds, 2009.

1.4.4. Vents

Les vents dominants sont désignés par la direction à partir de laquelle le mouvement de l'air se produit le plus souvent au cours de l'année. Ceci s'établit par la représentation graphique sous forme de roses des vents. Ainsi, les vents dominants durant l'année 2009 sont de secteur nord-est/sud-ouest (figure 2).

2. Méthodes d'études

2.1. Choix du matériel végétal

Dans cette étude, notre choix s'est porté sur une espèce lichénique, *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, à thalle très développé, et très abondante au niveau de la forêt de Bougous qui représente notre station témoin.

2.2. Choix des sites

Notre choix s'est porté sur deux zones différentes : zone urbaine (agglomération d'Annaba) sous l'emprise de différentes sources de pollutions (urbanisation anarchique, unités industrielles, trafic routier très intense) ; l'autre zone est semi-urbaine (Sidi Aissa), située vers le Nord de l'agglomération d'Annaba, faiblement urbanisée et à trafic routier très faible.

La station témoin est à 100 km d'Annaba. Le choix de notre station témoin, où se développe naturellement notre espèce, s'est porté sur le parc national d'el Kala « PNEK », faisant partie des sites RAMSAR, et plus précisément sur la forêt de Bougous, zone non polluée abritant une flore lichénique très développée et d'une diversité remarquable (Slimani *et al.*, 2013), avec notamment la présence d'une espèce foliacée, *Lobaria pulmonaria*, indicatrice d'une continuité forestière (Lacoux et Engler, 2004 ; Signoret, 2001).

La région d'El Kala est située dans l'étage subhumide. La pluviométrie annuelle moyenne est située entre 700 et 800 mm et s'étale essentiellement du début du mois d'octobre jusqu'à la fin mars. La région est caractérisée par deux saisons, l'une sèche, de mai jusqu'à septembre, et l'autre humide, de septembre à avril. La température moyenne de l'air est de 17,50 °C.

2.3. Technique de transplantation

La technique de « transplants de lichens », mise au point par Brodo (1961), consiste à prélever des échantillons dans une station de référence non contaminée et à les installer dans le site à étudier. Cette technique est d'un intérêt certain lorsque la flore lichénique est absente du site d'étude. Il est important que les lichens subissent

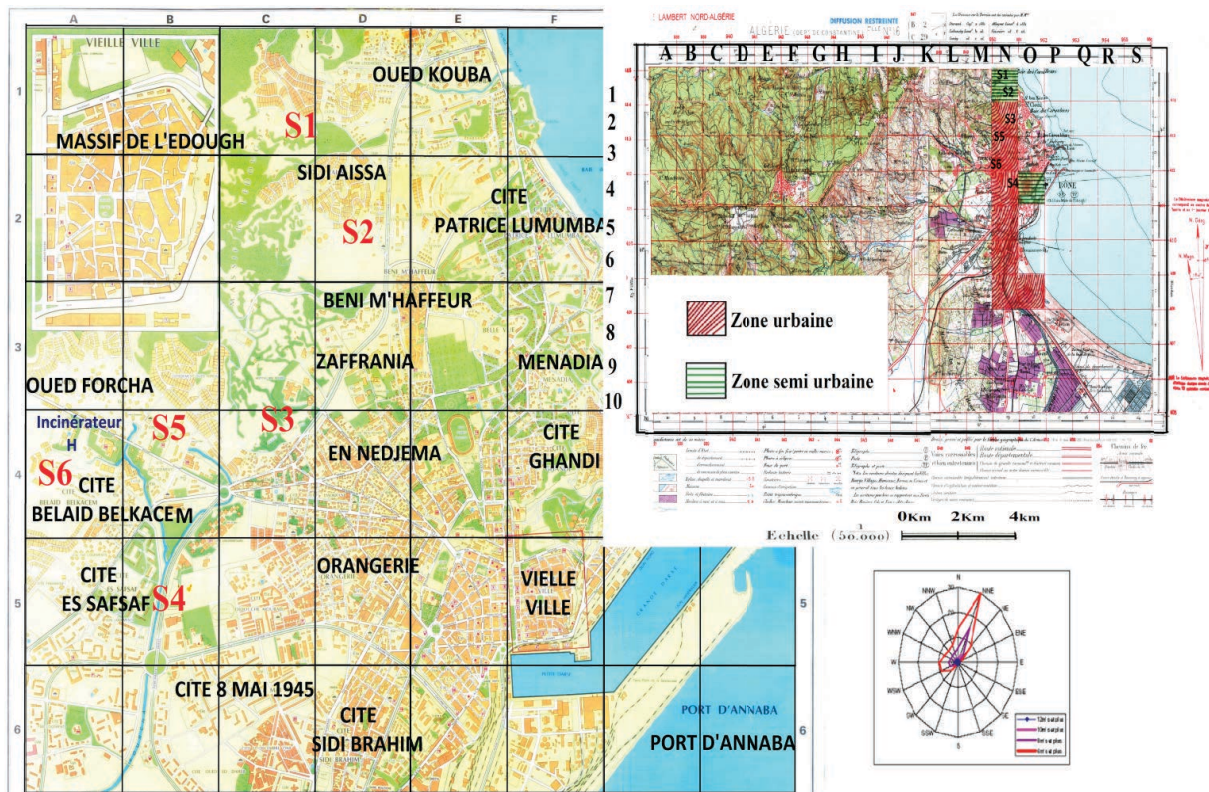


Figure 3. Localisation des zones des transplants lichéniques au niveau de la région d'Annaba (source : Institut national de cartographie, Annaba).

Location of areas of lichen transplants at the Annaba region.

le moins de perturbations possible au cours du prélèvement et, pour cette raison, on prélève généralement le lichen avec son support (fragment d'écorce ou branches).

La technique des transplantations, déjà largement répandue dans les études de bioaccumulation, a été utilisée plus récemment pour la recherche de bio-marqueurs (fluorescence et teneur en chlorophylle, teneur en ATP, paramètres du stress oxydant, etc.).

Au niveau de la station témoin, nous avons fixé 3 transplants (rameaux couverts de *Flavoparmelia caperata*, d'une longueur de 10 à 50 cm, fixés à l'aide d'une ficelle à une hauteur de 1,5 à 2 m du sol) sur phorophytes (*Quercus canariensis*), distants de 100 m les uns des autres ; la même méthode de transplantation a été appliquée sur *Fraxinus angustifolia* phorophyte, le plus représenté au niveau des stations polluées ; ceci pendant 4 mois, durée permettant au lichen d'absorber les différents polluants émis dans l'atmosphère.

2.4. Méthodes analytiques

Après 4 mois d'exposition, nous avons recueilli les 18 transplants ainsi que les 3 échantillons témoins afin d'effectuer les dosages suivants :

2.4.1. Dosage des protéines

La concentration totale en protéines dans le thalle de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale est déterminée par la technique mise au point par Bradford (Bradford, 1976). Cette technique utilise du bleu de Coomassie qui a la propriété de s'adsorber sur les protéines de manière non spécifique et indépendamment de leur séquence. Cette adsorption s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption de la molécule, qui est décalé vers le bleu.

On réalise une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA) dont on mesure l'absorption à 590 nm. La courbe de référence est une droite qui présente une rupture de pente. La mesure de l'absorption du lysat cellulaire permet de déterminer la concentration en protéines totale de chaque préparation d'échantillon.

2.4.2. Dosages enzymatiques

Préparation de l'extrait enzymatique

La méthode adaptée afin d'obtenir l'extrait enzymatique du végétal est celle de Loggini *et al.* (1999).

Tableau 2. Différentes stations de transplantation.

Different stations of transplantation.

<i>Stations</i>	<i>Localisation</i>	<i>Nature de la zone d'étude</i>
Témoin Lat : 36°38'33.02»N Long : 8°22'3.75»E	3 arbres au sein de la forêt de Bougous à El Kala	Témoin
Station 1 (Sidi Aissa) Lat : 36°55'30.84»N Long : 7°44'52.56»E	Arbre 1 : situé dans le jardin d'une maisonnette isolée, et éloigné de la route Arbre 2 : se situe à proximité d'un petit chantier. Arbre 3 : comme pour l'arbre 1, dans une propriété privée éloignée de la route	Semi-urbaine
Station 2 (Route de la Baie des Corailleurs) Lat : 36°54'44.40»N Long : 7°45'1.98»E	Arbre 1 : au bord d'une petite route peu fréquentée par les véhicules Arbre 2 : à proximité d'un chantier en construction Arbre 3 : au bord d'une petite route peu fréquentée par les véhicules	Semi-urbaine
Station 3 (Pont Blanc) Lat : 36°54'21.00»N Long : 7°44'26.49»E	Arbre 1 : à proximité du rond-point qui est hautement fréquenté par différents véhicules Arbre 2 : au sein de la cité universitaire du rond-point, mais cela n'exclut pas la grande fréquentation des véhicules de tous types dans le secteur Arbre 3 : au sein du CHU de l'Orangerie, près de la clôture de l'établissement qui se trouve en face d'une route fortement fréquentée.	Urbaine
Station 4 (Es Safsaf) Lat : 36°54'39.21»N Long : 7°43'49.03»E	Les trois échantillons sont transplantés dans des arbres d'alignement se trouvant au bord d'une autoroute qui traverse cette station	Urbaine
Station 5 (Oued Forcha) Lat:36°54'39.21»N Long7°43'49.03»E	Les trois arbres sont placés au bord des routes qui traversent cette station.	Urbaine
Station 6 (Cité Belaid Belgacem à Oued Forcha) Lat : 36°54'18.73»N Long : 7°43'50.97»E	Les échantillons sont transplantés sur des arbres d'alignement se trouvant au bord d'une route qui traverse cette station, l'arbre 1 se trouve près d'une station taxi.	Urbaine

Après quatre mois, nos transplants et les échantillons témoins ont été récoltés et broyés à froid à l'aide d'un mortier dans un tampon phosphate (50 ml NaK, pH = 7,2) à raison de 1 ml du tampon pour 1 g de MF. L'homogénat est ensuite filtré puis centrifugé à froid à 12 000 g pendant 20 minutes (centrifugeuse sigma 3-16K). Le surnageant obtenu sera utilisé comme extrait pour la détermination des différents extraits enzymatiques.

Dosage de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX)

L'activité ascorbate-peroxydase est réalisée suivant le protocole adopté par Nakano et Azada (1987). Le volume réactionnel final de 3 ml contient : 100 µl d'extrait enzymatique, 50 µl d'H₂O₂ à 0,3 % et 2850 µl de tampon phosphate NaK-Ascorbate (50mM NaK, 0,5mM ascorbate, pH = 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La lecture est effectuée à 290 nm (Spectrophotomètre JENWAY 6300) pendant 1 minute, et ce pour un coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 2800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l'activité APX est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

Dosage de l'activité Catalase (CAT)

L'activité catalase (CAT) est réalisée suivant la méthode de Cakmak et Horst (1991). La décroissance de l'absorbance est enregistrée pendant trois minutes par un spectrophotomètre (JENWAY 6300) pour une longueur d'onde de 240 nm et un coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 39400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{L}$. Pour un volume final de 3 ml, le mélange réactionnel contient : 100 µl de l'extrait enzymatique brut, 50 µl de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0,3 % et 2850 µl de tampon phosphate (50mM, pH = 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'addition d'eau oxygénée. L'activité catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

Dosage de l'activité gaïacols-peroxydase (GPX)

L'activité gaïacol peroxydase (GPX) est déterminée selon la méthode de Fielding *et al.* (1978). Pour un volume final de 3 ml, le mélange réactionnel contient : 100 µl d'extrait enzymatique, 50 µl d'H₂O₂ à 0,03 % et 2850 µl de tampon phosphate-Gaïacol (50mM NaK, 8mM de gaïacol, pH = 7,2). L'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'ajout du peroxyde d'hydrogène. La lecture de l'absorbance est effectuée à 470 nm (spectrophotomètre Jenway 6300), et ce pour un coefficient d'extinction linéique molaire $\epsilon = 2470 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. L'activité GPX est exprimée en nmol/min/mg de protéines.

Quantification des mesures spectrophotométriques : la formule suivante est utilisée dans la quantification des

différentes mesures spectrophotométriques suite aux dosages enzymatiques de la GPX, APX et CAT (Servais, 2004).

$$Act. = \frac{\Delta A \cdot V_t}{\epsilon \cdot \Delta t \cdot V_e \cdot p}$$

Act : activité enzymatique en nmole/min/mg de protéines

ϵ : coefficient d'extinction linéique molaire en M

Δ : différence moyenne de l'absorbance

V_t : volume totale du mélange réactionnel en ml

V_e : volume de l'extrait enzymatique en ml

L : largeur de la cuve de mesure en cm

P : teneur en protéine en mg

T : temps de lecture en min

2.4.3. Étude statistique

Il existe une seule variable, celle de la localisation du transplant (7 modalités). Pour cette dernière, on distingue quatre variables dépendantes, qui sont les teneurs thallines en protéines et les trois paramètres enzymatiques (APX, GPX, CAT). De plus, trois réplicats ont été récupérés, soit 21 échantillons (3 réplicats x 7 sites de transplantation).

Afin de tester la significativité des différences de moyennes pour chaque variable dépendante, nous avons utilisé les analyses de variances univariées (ANOVA) et leurs tests *post-hoc*, tels que le test de Tukey avec lequel on a pu déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes homogènes, et le test de Dunett avec lequel on a pu déterminer les différences significatives entre la moyenne du témoin et les moyennes des autres groupes (Dagnelie, 1999).

3. Résultats

3.1. Variations de la concentration en protéines au niveau des transplants de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale

D'après les résultats présentés dans la figure 4, nous enregistrons une augmentation significative du taux de protéines au niveau de toutes les stations par rapport au témoin, nous constatons que le taux de protéines est principalement très élevé au niveau de la station 6, avec une moyenne de 17.93 µg/g, et de même au niveau de la station 4 (17.4 µg/g).

Selon le test d'ANOVA, la comparaison de la teneur moyenne des protéines chez les transplants de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale montre que la variation des protéines est seulement significative entre stations ($p = 0,01^{*2}$).

(2) * = significatif ; ** = hautement significatif ; *** = très hautement significatif.

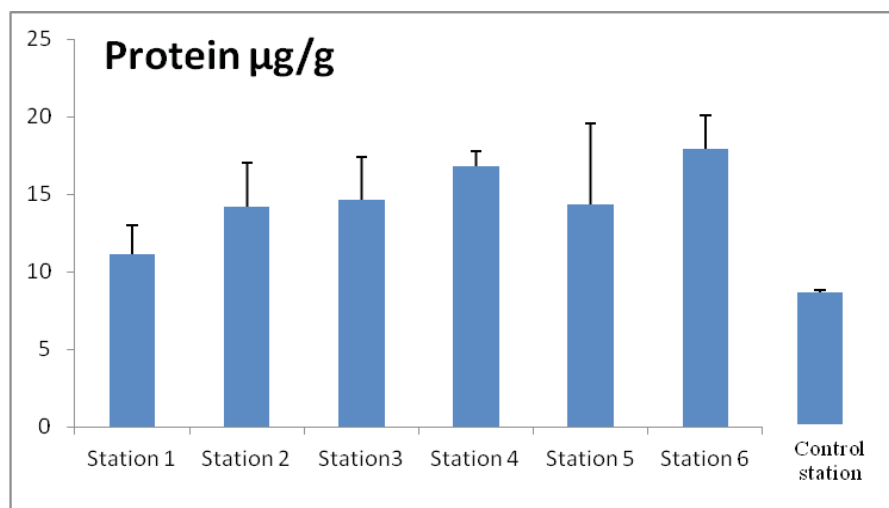


Figure 4. Variations spatiales des protéines au niveau des transplants de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale.

*Spatial variations of proteins at transplants *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale.*

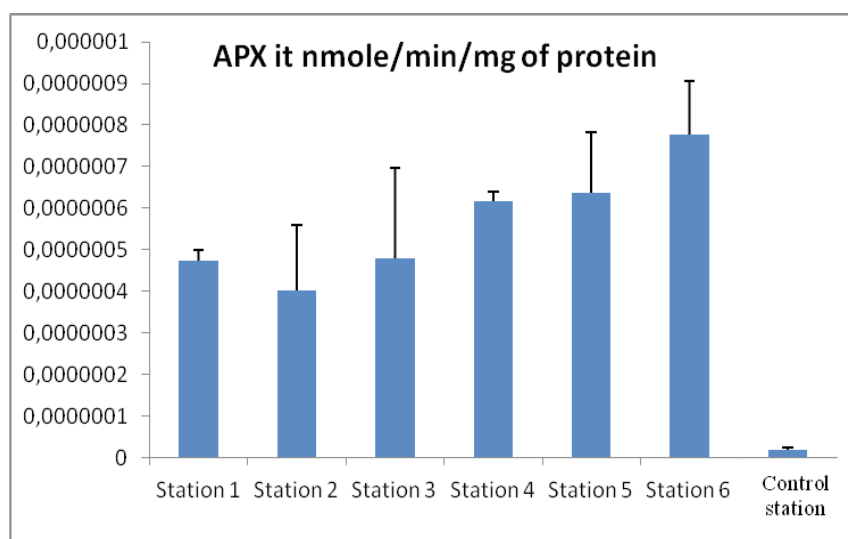


Figure 5. Variations spatiales du taux de l'activité Ascorbate-peroxydase (APX) en nmole/minute/mg en protéines de la *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale.

*Spatial variations of rate of activity ascorbate peroxidase (APX) in nmole/min/mg protein in the *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale.*

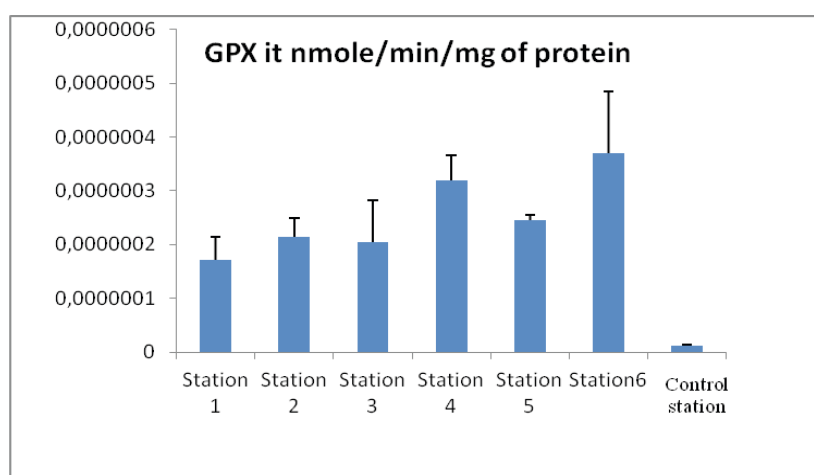


Figure 6. Variations spatiales du taux de l'activité Gaïacol-peroxydase (GPX) en nmole/minute/mg en protéine de la *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale.

*Spatial variations of rate of activity Gaïacol-peroxydase (GPX) in nmole/min/mg, of the *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale protein.*

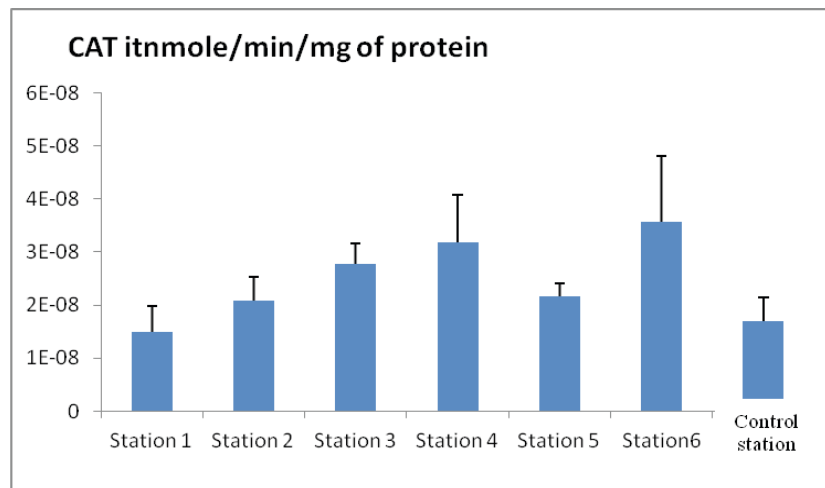


Figure 7. Variations spatiales du taux de l'activité catalase (CAT) en nmole/minute/mg en protéines de la *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale.

Spatial variations of rate of activity catalase (CAT) in nmole/minute/mg of the Flavoparmelia caperata (L.) Hale protein.

D'après le test de Dunnett, la différence des moyennes des stations 4 et 6 est significative avec le témoin (0,009* ; 0,003*).

3.2 Variations de l'activité Ascorbate-peroxydases (APX)

Nous constatons au niveau de la figure 5 une très faible activité de l'Ascorbate peroxydase au niveau du témoin. Par contre, son augmentation, d'une station à une autre, est très nette, et particulièrement au niveau des stations 4, 5 (6.00E-07) et 6 (8.00E-07).

La comparaison de la teneur moyenne de l'activité APX chez les transplants de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale montre que la variation de l'activité APX est très hautement significative entre station ($p = 0,000$).

D'après le test de Dunnett, la différence des moyennes des stations 1, 2 et 3 est significative avec le témoin (0,003, 0,011 et 0,003) ; par contre, la différence des moyennes des stations 4, 5 et 6 est très hautement significative ($p = 0,000$) avec le témoin.

3.3 Variations de l'activité Gaïacol-peroxydases (GPX)

D'après la figure 6, la comparaison de la teneur moyenne de l'activité GPX chez les transplants de *Parmelia caperata* montre que la variation de l'activité GPX est très hautement significative entre stations ($p = 0,000$).

D'après le test de Dunnett, la différence de moyenne des stations 2 et 3 est significative (0,004* et 0,006*) avec le témoin. Cette différence des moyennes au

niveau de la station 5 est hautement significative ($p = 0,001$) ; par contre, elle est très hautement significative au niveau des stations 4 et 6.

3.4 Variations de l'activité Catalase (CAT)

Nous constatons d'après la figure 7 que l'activité de l'enzyme catalase CAT au niveau de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale est élevée au niveau du témoin (1.05E-08) ; elle est très proche de celle du site 1, puis présente des fluctuations d'un site à un autre. Par contre, cette activité augmente au niveau de la station 6.

La comparaison de la teneur moyenne de l'activité CAT chez les transplants de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale montre que la variation de l'activité CAT est seulement significative entre stations ($p = 0,01$).

Selon le test de Dunnett, la différence de moyenne de toutes les stations n'est pas significative avec le témoin.

Nous avons réalisé une ANOVA qui conclut à une différence entre les groupes. On souhaite répondre à la question suivante : « quelles sont les paires de groupes pour lesquelles les différences sont significatives ? »

4. Discussion

D'après Nieboer *et al.* (1978), les lichens accumulent les métaux de leur environnement par une variété de mécanismes, y compris le piégeage des particules, échange d'ions, hydrolyse et absorption intracellulaire.

Une des conséquences de l'exposition des êtres vivants aux métaux est l'accroissement du stress.

Tableau 3. Variations des paramètres physiologiques dans le transplant de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale, selon le test d'ANOVA.

Variations in physiological parameters in transplant Flavoparmelia caperata (L.) Hale by ANOVA.

Variable	DDL	SC E	CM	F observe	P
APX	6	1,05	0,17	10,91	0,000***
GPX	6	0,69	0,11	48,21	0,000***
CAT	6	0,10	0,01	3,89	0,01*
Protéine	6	184,80	30,80	4,46	0,01*

Tableau 4. Analyse des différences entre les moyennes de chaque paramètre au niveau des différentes stations.

Test de Tukey, les lettres différentes pour un paramètre donné indiquent des différences significatives à un niveau de confiance de 95,0 %.

Analysis of differences between the means of each parameter at different stations. Tukey test, different letters in a parameter indicate significant differences at a confidence level of 95.0%.

Stations	PROTEINES	GPX	APX	CAT
1	10,9 ^{ab}	0,2 ^b	0,5 ^{ab}	0,1 ^b
2	14,1 ^{ab}	0,2 ^b	0,4 ^b	0,2 ^{ab}
3	14,7 ^{ab}	0,3 ^b	0,5 ^{ab}	0,3 ^{ab}
4	16,8 ^a	0,4 ^a	0,6 ^{ab}	0,3 ^{ab}
5	14,5 ^{ab}	0,5 ^a	0,6 ^{ab}	0,2 ^{ab}
6	17,9 ^a	0,6 ^a	0,8 ^a	0,4 ^a
Témoin	8,7 ^b	0,0 ^c	0,0 ^c	0,2 ^{ab}

Il existe différents types de stress ; le plus répandu est le stress oxydant (Faburé, 2009).

Un stress oxydant est un déséquilibre entre la production d'ERO et les mécanismes de défense antioxydants pouvant entraîner des altérations moléculaires et cellulaires (Goudable et Favier, 1997 ; Blokhina *et al.*, 2003). Dans les cellules végétales, la formation des radicaux libres peut se produire dans différents compartiments et organites : chloroplastes, mitochondries, réticulum, peroxysomes, membrane plasmique et parois cellulaires (Borg et Reeber, 2004). Une cellule soumise à un stress oxydant peut subir des dommages dont les cibles seront les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

Les protéines intracellulaires et extracellulaires sont des cibles critiques de l'attaque des radicaux libres en raison de leurs activités catalytiques. Plusieurs constituants amino-acyl (cystéine, méthionine, tryptophane) cruciaux pour leurs fonctions sont particulièrement vulnérables aux dommages induits par les espèces radicalaires. Les ERO peuvent agir directement et simultanément sur plusieurs de ces sites, et ce, préférentiellement au niveau des groupements -SH et -NH₂ (Haliwell et Gutteridge, 1989). Les conséquences de ces attaques consistent en des agrégations et des

pontages, des fragmentations et des cassures, et des modifications des groupements thiols (Horton et Fairhurst, 1987 ; Pre, 1991 ; Rice-Evans *et al.*, 1991 ; Doyotte, 1998 ; Ezzine et Ghorbel, 2006).

Selon Heckathorn *et al.* (2004) et Stout et Al-Niemi (2002), l'expression des protéines augmente lorsque l'organisme est exposé à des métaux.

L'augmentation des teneurs en protéines peut être due aussi à une activation d'un ensemble de gènes permettant la synthèse des protéines spécifiques associées aux stress, telles que les protéines « LEA » qui assurent une protection de l'ensemble vital des protéines cellulaires (David et Grongnet, 2001).

En effet, cette augmentation des protéines a été observée au niveau de nos transplants de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale exposés pendant quatre mois au niveau des stations les plus polluées situées dans la zone urbaine (S3, S4, S5 et S6), ceci par rapport aux échantillons de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale se développant au niveau de la zone témoin. Par contre, le taux des protéines dans les transplants de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale situés au niveau de la zone semi-urbaine (S1 et S2) est faible.

Ces résultats montrent bien qu'il existe effectivement une pollution spécifique aux métaux lourds, et principalement le plomb qui vient s'ajouter aux divers polluants émis dans l'atmosphère. L'étude faite par Maizi, en 2010, le confirme. En effet, la valeur maximale de plomb accumulée par des transplants de *Ramalina farinacea* au niveau de l'agglomération d'Annaba est de 431.25 ($\mu\text{g/g}$). D'autres travaux sont en accord avec nos résultats, comme ceux de Alioua (2001), dans l'agglomération de Skikda, qui confirment aussi la présence des taux élevés de plomb dans l'atmosphère, et où la teneur en plomb au niveau des sites pollués dépasse souvent les 300 $\mu\text{g/g}$ chez les transplants de *Ramalina farinacea*.

D'après les analyses de la variance (ANOVA) et des tests (de Dunnett et de Tukey), des relations statistiquement significatives ont été observées principalement entre les stations les plus polluées S4 et S6. Ceci est lié à un certain nombre de facteurs : forte urbanisation, trafic routier intense lié à un réseau routier et un parc automobile très importants, émission d'un cocktail de polluants provenant de différentes sources industrielles, caractéristiques topographiques de la région favorisant le phénomène d'inversion thermique, facteurs climatiques (humidité très élevée de 74,083 % empêchant la diffusion des polluants).

Pour répondre aux dommages que peuvent causer les polluants, plusieurs études ont mis en évidence que les organismes photosynthétiques développent une large gamme de mécanismes de protection contre les radicaux libres, avant que ces derniers ne causent des dommages importants au niveau de membranes lipidiques (Arora *et al.*, 2002 ; Pinto *et al.*, 2003).

Enfin, les catalases, possédant un groupement hème (fer), catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Elles possèdent également une activité peroxydase : le peroxyde d'hydrogène réagit avec le fer du site actif de l'enzyme pour former un composé non réactif (Chance *et al.*, 1979). Ces enzymes sont toutes des métalloprotéines et agissent de façon coordonnée.

Parmi ces enzymes, nous avons étudié l'activité de l'ascorbate peroxydase APX dans les transplants de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale au niveau d'une zone urbaine (représentée par les stations S3, S4, S5 et S6 où l'activité est très forte), d'une zone semi-urbaine (S1 et S2 où l'activité est moins élevée), ceci par rapport au témoin (El Kala), où l'activité est très faible.

De même, l'augmentation de l'activité de Gaïacol peroxydase GPX dans les transplants met en évidence l'existence d'un stress oxydant. En effet, nous avons constaté son augmentation qui est hautement significative au niveau des stations 2 et 3, et très hautement significative au niveau des stations 5 et 6, ceci par rapport au témoin où l'activité est faible.

La catalase (CAT) réduit très efficacement le H_2O_2 en libérant du dioxygène et de l'eau à une vitesse extrêmement rapide. Elle est présente chez tous les organismes aérobies, et localisée dans les peroxy-somes, mais elle est absente dans les chloroplastes (Scandalios, 2005). Son activité au niveau des transplants de *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale est seulement significative d'une station à une autre ; d'après le test de Dunnett, la différence de moyenne de toutes les stations n'est pas significative avec le témoin. L'activité de la catalase dans les lichens a été démontrée et varie considérablement entre les espèces (Mayaba *et al.*, 2001). Elle est synthétisée majoritairement par le champignon (Weismann, 2005).

Conclusion

Dans cette étude, nous avons utilisé deux types de biomarqueurs : biochimique et physiologique, mesurés au niveau d'une espèce lichénique *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale sensible à la pollution atmosphérique transplantée au niveau de différentes stations urbaines et semi-urbaines de la région d'Annaba.

En conclusion, la région d'Annaba, et particulièrement son agglomération, sont sous l'influence d'une pollution azotée et plombique bien plus forte que celle d'autres types de polluants. Le choix de cette espèce (la *Flavoparmelia caperata* (L.) Hale) témoigne bien du bon choix du bio-indicateur et confirme son pouvoir comme biomarqueur de stress oxydant.

Références bibliographiques

- Al-Niemi T.-S., Stout R.-G. (2002). Heat-shock protein expression in a perennial grass commonly associated with active geothermal areas in western North America. *Journal of Thermal Biology*, n° 27, p. 547-553.
- Ali Ahmed M. (2007). Évaluation de la pollution acide à l'aide de deux bioindicateurs : écorce de *Fraxinus angustifolia* et lichen *Xanthoria parietina*. Impact sur la végétation. Thèse de doctorat d'État en science, université de Badji Mokhtar, Algérie, 19 p.
- Alioua A. (2001). Détection de la pollution plombique d'origine automobile à l'aide de bioindicateurs végétaux dans l'agglomération de Skikda (Algérie). Thèse de doctorat, université Joseph Fourier, Grenoble, 136 p.
- Arora A., Sairam R.-K., Srivastava G.-C. (2002). Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Curr. Sci.*, n° 82, p. 1227-1238.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, n° 91, p. 179-194.
- Borg J., Reeber A. (2004). Biochimie métabolique. Ellipses, p. 126-145.
- Bradford M. (1961). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, n° 72, p. 248-254.
- Brodo I.-M. (1961). Des expériences de transplantations avec lichens coricolous en utilisant une nouvelle technique. *Ecology*, n° 42, p. 838-841.
- Brodo I.-M. (1961). Transplant Experiments with Corticolous Lichens Using a New Technique. *Ecology*, n° 42, p. 838-841.
- Cakmak I., Horst W.-J. (1991). Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (glycine max). *Physiol. Plant.*, n° 83, p. 463-468.
- Caviglia A.-M., Nicora P., Giordani P. et al. (2001). Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (Lichenes), *Il Farmaco*, n° 56 (5-7), p. 379-382.
- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979). Hyperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Review*, n° 59, p. 527-605.
- Deruelle S. (1978). Étude comparée de la sensibilité de trois méthodes d'estimation de la pollution atmosphérique, en utilisant les lichens comme indicateurs biologiques dans la région de Mantes (Yvelines). *Rev. Bryol. Lichénol.*, n° 44 (4), p. 429-441.
- David J.-C., Grongnet, J.-F. (2001). Les protéines de stress. *INRA Prod. Anim.*, n° 14(1), p. 29-40.
- Ezzine M., Ghorbel M.-H. (2006). Physiological and biochemical responses resulting from nitrite accumulation in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Ibiza F1). *J Plant Physiol.*, n° 163, p. 1032-1039.
- Faburé J. (2009). Étude de l'accumulation et des effets des composés organiques volatils (BTEX) chez les bryophytes. Thèse de doctorat à l'université de Lille-Nord de France, 296 p.
- Fielding J.-L., Hall J.-L. (1978). A biochemical and cutochemical study of peroxidase activity in roots of *Pisum sativum*. 1. A comparaison of DAB-peroxidase and guaiacol-peroxidase with particular emphasis on the properties of cell wall activity. *J. Exp. Bot.*, n° 29, p. 969-981.
- Goudable J., Favier A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutr Clin Mdtabol*, n° 11, p. 115-120.
- Halliwell B., Gutteridge J.-M., (1989). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 2nd ed.

Heckathorn, D.-D., Semaan S., Broadhead R.-S., Hughes J.-J. (2002). Extensions of Respondent-Driven Sampling: A New Approach to the Study of Injection Drug Users Aged 18-25. *AIDS and Behavior*, n° 6(1), p. 55-67.

Horton A., Fairhurst A. (1987). Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, n° 18, p. 27-79.

Lacoux D., Engler R. (2004). *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm., un lichen à protéger. *Fiche des lichens de l'Association Mycologique et Botanique de l'Hérault et des Hauts Cantons (AMBHHC)*.

Loggini F., (1999). Effets de deux fongicides Artea et Punch nouvellement introduits en Algérie sur la physiologie et le métabolisme respiratoire du blé dur (*Triticum durum* Desf). Thèse de magister de l'université Badji Mokhtar de Annaba.

Mayaba N., Beckett R.-P. (2001). The effect of desiccation on the activities of antioxidant enzymes in lichens from habitats of contrasting water status. *Symbiosis*, n° 31, p. 113-121.

McCarthy D.-P., Vaughan H. (2004). Lichens arboricoles : indicateurs préliminaires de Hamilton qualité de l'air. Au près, au portant : une conférence pratique sur l'amélioration de la qualité de l'air. 29-30 mars, Hamilton Convention Centre, Hamilton, Ontario.

Maizi N., Alioua A., Tahar A. *et al.*, (2010). The use of inferior plants as bioindicators of automobile lead pollution in the area of Annaba (Algeria) (Utilisation des végétaux inférieurs comme bio-indicateurs de la pollution plombique d'origine automobile dans la région de Annaba (Algérie)). *J. Mater. Environ. Sci.*, n° (4), p. 251-266.

Nakano Y., Azada K. (1987). Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts: its inactivation in ascorbate depleted medium and reactivation by mono dehydro ascorbate radical. *Plant Cell Physiol*, n° 28, p. 131-140.

Niober E.-A., Richardson, D.-H., Tomassini F.-D. (1978). Mineral Uptake and Release by Lichens: An Overviewed. *Bryologist*, n° 81, p. 226-246.

Pinto E., Sigaud-Kutner T.-C., Leitao M.-A. *et al.* (2003). Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol*, n° 39, p. 1008-1018.

Rahali M. (2002). Cartographie de la pollution de la région d'Alger en utilisant un lichen *Xanthoria parietina* comme bio-accumulateur. *Pollution Atmosphérique*, n° 175, p. 421-432.

Servais S. (2004). Altération mitochondriale et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone : effet de l'âge et d'une supplémentation en oméga-3. Thèse de doctorat de l'université Claude Bernard, Lyon 1, p. 17-40.

Scandalios J.-G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res*, n° 38, p. 995-1014.

Signoret J. (2001). Le lichen pulmonaire en Lorraine et des régions voisines, ~université de Metz. France. Disponible en ligne sur : http://www.nature-en-lorraine.net/images/images_lobaria/lobaria.pdf

Slimani A., Serradj Ali Ahmed M., Hamel T., Clothier C. (2013). Contribution à l'étude de la flore lichénique dans la zènaie de Bougous (forêt de Ramel Toul) au niveau du parc national d'El Kala (P.N.E.K.), Nord-Est algérien. *Revue Synthèse*, n° 27, université Badji Mokhtar, Annaba, octobre, p. 22-29.

Weissman L., Garty J., Hochman A. (2005). Rehydration of the lichen *Ramalina lacerata* results in production of reactive oxygen species and nitric oxide and a decrease in antioxidants. *Appl. Environ. Microbiol*, n° 71, p. 2121-2129.