

Remerciement

Nos sincères gratitudees à notre promoteur Mr BENCHABANE pour la qualité de leur enseignement, leur conseils, leur confiance en nous, leur soutien, leur patience et leur encouragement pour mener à bien ce travail.

On tient à remercier les membres du Jury : Mme SABRI, Mme BENKORTEBY, Mr BENCHABANE et Dr MEKHALDI d'avoir accepté d'évaluer notre travail. Merci à vous d'avoir pris le temps de lire ce manuscrit.

On remercie également tous les enseignants qui ont contribué à notre formation.

Un grand merci également à tous les étudiants de notre promotion, merci pour les moments de joies et de stresse passé ensemble.

Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à toutes les personnes proches de mon cœur,
mes parents pour leur éducation, soutien, encouragement et leurs
précieux conseils.*

*A mon marie qui m'a soutenu et ma comblé de sa générosité sans limite,
tout le long du parcours du Master et la réalisation de cette thèse.*

A mes deux sœurs et mes neveux.

A toute ma belle famille

*Et a tous les personnes qui ont participé de près ou de loin à
l'accomplissement de ce mémoire.*

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude.

A l'âme de ma grande mère que dieu vous garde dans son vaste paradis, Mes Grands-pères et ma grande mère «Zohra».

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et ma source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que dieu te garde toujours à côté de moi, à toi mon père.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés maman que j'adore.

A mes sœurs : IKRAM, SALSABIL, ABIR

A la personne que j'aime beaucoup et qui m'a soutenu tout au long de ce travail, à

Mon mari SALAH EDINNE

A mes beaux parents :

Cher ABI LAID chère OUMI FATIMA je vous suis très reconnaissante, et je ne vous remercierais jamais assez pour votre amabilité, votre encouragement pour être toujours parmi les meilleures

Aux personnes dont j'aurais bien aimé leurs présences dans ce jour, mon frère **MONCEF** mes oncles **Mohamed, NADIR, LAKHDER**, mes tantes **Nadjia, MIMA, HAYET, NOURA, HALIMA**.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé, qui étaient toujours à mes côtés, mes aimables amis, collègues d'étude, et sœurs de cœur : **MIMI, ASMA , SIHEM, FELLA, FATIMA KARA, INES, BOUTHINA, HANA, khawolla** .

Des fois, les mots ne suffisent pas pour exprimer tout le bien qu'on ressent ! Juste ...
MERCI à vous.

Résumé

La pollution du sol par les métaux lourds, est l'un des problèmes majeurs qui touche l'environnement, elle est due principalement aux activités industrielles et agricoles. Cette pollution chimique menace l'écosystème et la diversité biologique, notamment les activités microbiennes. Les bactéries ont naturellement un arsenal génétique accompagné de mécanismes de résistances aux métaux lourds, telles que : la séquestration, les systèmes d'efflux, la conversion enzymatique. Ces mécanismes microbiologiques peuvent être exploités dans la bioremédiation. Cette dernière est considérée comme une technique durable et respectueuse de l'environnement, préservant notre environnement et la santé des êtres vivants.

Les objectifs de cette étude, réalisée *in silico*, est de connaître les principaux mécanismes de résistances aux métaux lourds chez les bactéries du sol : *Pseudomonas putida*, *Cupriavidus metallidurans* et *Bacillus ceureus*. Il en ressort que les mécanismes de résistance bactérienne face aux métaux lourds sont codés par plusieurs gènes, dont les principaux sont *cadA* pour la résistance au cadmium, *czcA* qui code pour la résistance aux Cobalt (Co), au Zinc (Zn) et au Cadmium (Cd).

Mots clés : Pollution, sol, métaux lourds, bactéries gènes, résistance, bioremédiation.

Abstract

Heavy metals soil pollution is one of the major environmental problems, mainly due to industrial and agricultural activities. This chemical pollution threatens the ecosystem and biological diversity, including microbial activities. Bacteria, naturally, present a genetic arsenal accompanied by mechanisms of resistance to heavy metals, such as: sequestration, efflux systems, enzymatic conversion. These microbiological mechanisms can be exploited in bioremediation. which is considered a sustainable and environmentally friendly technique, preserving our environment and the health of living beings.

The objectives of this study, carried out *in silico*, is to know the main mechanisms of resistance to heavy metals in soil bacteria: *Pseudomonas putida*, *Cupriavidus metallidurans* and *Bacillus ceureus*. It emerges that the mechanisms of bacterial resistance to heavy metals are encoded by several genes, the main ones being *cadA* for resistance to cadmium(Cd), *czcA* which codes for resistance to Cobalt (Co), Zinc (Zn) and Cadmium (Cd).

Keywords: Pollution, soil, heavy metals, bacteria genes, resistance, bioremediation.

ملخص

يعد تلوث التربة بالمعادن الثقيلة من المشكلات البيئية الرئيسية، ويرجع ذلك أساسًا إلى الأنشطة الصناعية والزراعية. هذا التلوث الكيميائي يهدد النظام البيئي والتنوع البيولوجي، بما في ذلك الأنشطة الميكروبية. تمثل البكتيريا، بطبيعتها، ترسانة وراثية مصحوبة بآليات مقاومة المعادن الثقيلة، مثل: العزل، وأنظمة التدفق، والتحويل الأنزيمي. يمكن استغلال هذه الآليات الميكروبيولوجية في المعالجة الحيوية. يعتبر هذا الأخير أسلوبًا مستدامًا وصديقًا للبيئة، يحافظ على بيئتنا وصحة الكائنات الحية.

تهدف هذه الدراسة التي أجريت *in silico* إلى معرفة الآليات الرئيسية لمقاومة المعادن الثقيلة في بكتيريا التربة *Bacillus ceureus* و *Cupriavidus metallidurans* و *Pseudomonas putida* يتضح أن آليات المقاومة البكتيرية للمعادن الثقيلة مشفرة بعدة جينات، أهمها *cadA* لمقاومة الكاديوم (Cd)، *czcA* يرمز لمقاومة الكوبالت (Co) والزنك (Zn) والكاديوم (Cd).

الكلمات المفتاحية: التلوث، التربة، المعادن الثقيلة، جينات بكتيرية، المقاومة، المعالجة حيوية.

Liste d'abréviation

ABC : ATP Building Cassette
ADN : Acide Desoxyribonucléique
Ag : Argent
agr : résistance à l'argent (gène)
ars : résistance à l'arsenic (gène)
As : Arsenic
ATP : Adénosine Triphosphate
BLAST : Basic Local Aligement Search Tool
cad : résistance au cadmium (gène)
Cd : Cadmium
CDF : Cation Diffusion Facilitators
chr : résistance au chrome (gène)
cnr : résistance à cobalt, nickel (gène)
cop : résistance au cuivre (gène)
Cr : Chrome
Cu : Cuivre
czc : résistance au cadmium, zinc, cobalt (gène)
EPS : Exopolysaccharides
ETM : Élément Trace Métallique
FASTA : Fast Aligement
Fe : Fer
Hg : Mercure
HGT : Transfer Horizontal de gènes
K : Potassium
kb : kilo bases
mer : résistance au mercure (gène)
MFS : Major Facilitation Superfamily
MT : Métallothionéines
N : Azote
NCBI : National Center for Biotechnologie Information
ncc : résistance au nickel, cobalt, cadmium (gène)
Ni : Nickel
O₂ : Oxygène
P : Phosphore
Pb : Plomb
pbr : résistance au plomb (gène)
pH : Potentiel d'Hydrogène
RND : Résistance Nadulation cell Division
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
Se : Sélénium
SPE : Substance Polymères Extracellulaires
Zn : Zinc

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique Origine de la pollution du sol.....	6
Figure 2 : Effets toxiques des métaux lourds sur les microorganismes.....	15
Figure 3 : Représentation schématique de techniques de biosparging	17
Figure 4 : Représentation schématique de techniques de Landfarming	19
Figure 5 : Mécanismes bactériens de résistance aux métaux toxiques.	21
Figure 6 : L'homéostasie cellulaire du zinc	22
Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme de l'interaction EPS avec les métaux lourds.....	23
Figure 8 : Architecture générale du transporteur ABC.....	25
Figure 9 : Structure schématiques des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds	26
Figure 10 : Mécanisme modèle de fonctionnement des protéines RND	27
Figure 11 : Interaction des transporteurs de différentes familles d'efflux de métaux dans la détoxification des métaux	28
Figure 12 : Modèle de mécanisme de résistance au Pb(II) chez <i>C. metallidurans</i> CH34.....	30
Figure 13 : Contexte génomique du gène <i>cadA</i> chez <i>C. metallidurans</i> isolat NDB4NOLI.....	40
Figure 14 : Région génomique du gène <i>cadA</i> chez <i>C. metallidurans</i> isolat NDB4NOLI.....	40
Figure 15 : Le format FASTA de la séquence nucléotidique NZ_FYAX01000032.1.....	41
Figure 16 : Arbre phylogénique du gène <i>cadA</i> chez <i>C.metallidurans</i> isolate NDB4MOLI.....	42
Figure 17 : contexte génomique du gène <i>czcA</i> chez <i>C. metallidurans</i> isolate NDB4MOLI.....	44
Figure 18 : Région génomique du gène <i>czcA</i> chez <i>C. metallidurans</i> isolate NDB4MOLI.....	44
Figure 19 : Format FASTA de la séquence nucléidique NZ_FYAX0100010.1.....	45
Figure 20 : Arbre phylogénique du gène <i>czcA</i> chez <i>C.metallidurans</i> isolate NDB4MOLI.....	47
Figure 21 : contexte génomique du gène <i>cadA</i> chez <i>P.putida</i>	50
Figure 22 : Région génomique du gène <i>cadA</i> chez <i>P.putida</i> NBRC 14164.....	50
Figure 23 : Format FASTA de la séquence nucléotidique NC_021505.1.....	51
Figure 24 : Arbre phylogénique du gène <i>cadA</i> chez <i>P.putida</i> NBRC 14164.....	53
Figure 25 : Région génomique du gène <i>czcA</i> chez <i>P.putida</i> NBRC 14164.....	54
Figure 26 : Format FASTA de la séquence nucléotidique NC_021505.1.....	55
Figure 27 : Arbre phylogénique du gène <i>czcA</i> chez <i>P.putida</i> NBRC 14164.....	57

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification périodique des éléments.....	7
Tableau 2 : Production minière mondiale de métaux lourds.....	8
Tableau 3 : Capacité de biosorption des éléments traces métalliques par les EPS bactériennes.....	24
Tableau 4 : Numéros d'accèsion des gènes <i>cadA</i> et <i>czcA</i> chez <i>Cupriavidus metallidurans</i> isolat <i>NDB4NOLI</i>	34
Tableau 5 : Numéros d'accèsion des gènes <i>cadA</i> et <i>czcA</i> chez <i>Pseudomonas putida</i> <i>NBRC14164</i>	34
Tableau 6 : Résultat de recherche de <i>Cupriavidus metallidurans</i> sur NCBI.....	39
Tableau 7 : Alignements significatifs de la séquence NZ_FYAX01000032.1	42
Tableau 8 : Résultats de recherche du gène <i>czcA</i> chez <i>C.metallidurans</i> isolate <i>NDB4MOLI</i>	43
Tableau 9 : Alignements significatifs de la séquence NZ_FYAX0100010.1.....	46
Tableau 10 : Résultat de recherche de <i>Pseudomonas putida</i> sur NCBI.....	48
Tableau 11 : Résultats de recherche du gène <i>cadA</i> chez <i>P.putida</i>	49
Tableau 12 : Alignements significatifs de la séquence NC_021505.1.....	52
Tableau 13 : Résultats de recherche du gène <i>czcA</i> chez <i>P.putida</i>	54
Tableau 14 : Alignements significatifs de la séquence NC_021505.1.....	56
Tableau 15 : Résultat de recherche de <i>Bacillus cereus</i> sur NCBI.....	58

Sommaire

Introduction.....	1
I. Pollution des sols par les métaux lourds	4
1. Importance du sol	4
1.1 Sol et microorganismes	5
1.2 Bactérie du sol	5
2. Pollution du sol	6
3. Métaux lourds	7
3.1 Evolution dans le temps	8
3.2 Classification des métaux lourds	8
3.2.1 Métaux toxiques.....	9
3.2.1.1 Plomb.....	9
3.2.1.2 Arsenic.....	9
3.2.1.3 Cadmium.....	10
3.2.1.4 Mercure.....	10
3.2.2 Métaux essentiels ou micronutriments	11
3.2.2.1 Fer	11
3.2.2.2 Zinc.....	11
3.2.2.3 Nickel.....	12
3.3 Toxicité des métaux lourds	12
3.4 Origine des pollutions	13
3.4.1 Origine naturelle	13
3.4.2 Origine anthropique.....	13
3.5 Disponibilité des métaux lourds dans les sols	13
3.6 Interaction plantes – métaux lourds.....	14
3.7 Interaction microorganismes – métaux lourds	15
II. Bioremédiation bactérienne des métaux lourds.....	16
1. Bioremédiation	16
1.1 Bioremédiation <i>in situ</i>	16
1.1.1 Bioremédiation intrinsèque.....	17
1.1.2 Bioventing.....	17
1.1.3 Biosparging.....	17
1.1.4 Bio augmentation.....	18
1.1.5 Bio stimulation.....	18
1.2 Bioremédiation <i>ex situ</i>	18
1.2.1 Bioréacteurs à boues.....	18
1.2.2 Biopiles de sol.....	19
1.2.3 Compostage.....	19

1.2.4 Landfarming.....	19
2. Bioremédiation bactérienne.....	20
2.1 Acquisition des métaux par les bactéries.....	20
2.2 Mécanismes de résistances des bactéries aux métaux lourds.....	21
2.2.1 Séquestration.....	21
2.2.1.1 Séquestration intracellulaire.....	21
2.2.1.2 Séquestration extracellulaire.....	22
2.2.1.2.1 Biosorption.....	23
2.2.1.2.2 Biominéralisation.....	24
2.2.2 Transporteurs primaires.....	24
2.2.2.1 Transporteurs ABC.....	24
2.2.2.2 ATPases type P.....	25
2.2.3 Transporteurs secondaires.....	26
2.2.3.1 Systèmes RND (chimiosmotiques).....	26
2.2.3.2 Système CDF (Cation Diffusion Facilitators).....	27
2.2.3.3 Protéines MFS (Major Facilitator Superfamily).....	28
2.2.4 La conversion enzymatique.....	28
3- Bactéries métalloresistantes.....	29
3.1 <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34.....	29
3.1.1 Résistance au Nickel (Ni) et au Cobalt (Co).....	29
3.1.2 Résistance au Mercure (Hg).....	29
3.1.3 Résistance au Cuivre (Cu).....	29
3.1.4 Résistance au Zinc (Zn).....	30
3.1.5 Résistance au Plomb (Pb).....	30
3.2 <i>Pseudomonas putida</i>	31
3.2.1 Résistance au Cuivre (Cu) et au Zinc (Zn).....	31
3.2.2 Résistance à l'Arsenic (As).....	31
3.2.3 Résistance au Cadmium (Cd).....	31
3.3 <i>Bacillus ceureus</i>	31
III. Matériel et méthodes.....	33
1- Données biologiques.....	33
1.1 Espèces bactériennes.....	33
1.2 Gènes étudié.....	34
2- Format FASTA.....	35
3- Recherche de similarité.....	35
3.1 BLAST (Basic Local Alignement Search Tool).....	35
3.1.1 Score.....	36
3.1.2 Identité (%).....	36
3.1.3 E- value.....	36

3.2 Modules de BLAST.....	36
4- Arbre phylogénique.....	37
IV. Résultats et discussion.....	39
1- <i>Cupriavidus metallidurans</i>	39
1.1 Gène <i>cadA</i>	39
1.2 Gène <i>czcA</i>	43
2- <i>Pseudomonas putida</i>	48
2.1 Gène <i>cadA</i>	48
2.2 Gène <i>czcA</i>	53
3- <i>Bacillus cereus</i>	57
4- Discussions.....	59
Conclusion.....	62
Références bibliographiques.....	65

INTRODUCTION

Introduction

Le sol abrite une large part de la biodiversité terrestre mais de nos jours, l'homme est devenu le premier responsable de sa pollution, par les retombées directes de son accélération effrénée pour son développement économique. Les activités agricoles, urbaines et industrielles sont l'origine de contaminations de l'environnement, par la libération de molécules non biodégradables, comme les métaux lourds dans les eaux et les sols.

La contamination par les métaux lourds est un problème environnemental sérieux, car plus de 12% à 25% des terres agricoles sont déjà polluées par les métaux lourds dans le monde (Brian, 2013). Cette contamination dégrade la fertilité des sols et limite la productivité des plantes et menace la santé humaine.

Les principaux métaux lourds émis dans l'environnement sont le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le plomb (Pb), le chrome (Cr), le sélénium (Se), l'arsenic (As), le mercure (Hg) et le cadmium (Cd). Le mercure, le plomb et le cadmium font l'objet d'une attention particulière, car ils sont très toxiques (effets sur le système nerveux) et ont une durée de vie très longue (Fabrégat, 2010). Donc la dépollution est nécessaire, mais les techniques classiques ne sont pas efficaces, en dépit de leurs coûts qui sont très coûteux. A cet effet, le recours aux pratiques biotechnologiques de bioremédiation, nouvellement développées et adoptées, peut participer, même à titre partiel, dans l'atténuation des méfaits de la pollution chimique.

La biorémediation est une technique qui utilise les organismes vivants pour la dépollution des sites contaminés. Parmi les types de biorémediation on a la biorémediation bactérienne qui consiste en l'utilisation de bactéries pour assainir les sols contaminés par les métaux lourds. Les bactéries interviennent dans de nombreux processus géochimiques, telles que la précipitation, la dissolution, la sorption ou l'accumulation d'éléments en traces métalliques, ce qui a déjà facilité leur utilisation dans ce domaine. Les bactéries présentent naturellement des aptitudes leur permettant de mobiliser, d'immobiliser et / ou de transformer les métaux par des mécanismes spécifiques.

Parmi ces bactéries, *Cupriavidus metallidurans* est considéré comme modèle de résistance aux métaux lourds (Janssen et al., 2010), aussi *Pseudomonas putida* et *Bacillus ceureus* grâce à leurs capacités de multirésistance (Cánovas et al., 2003).

En plus de réaliser une étude bibliographique sur la bioremédiation bactérienne face aux métaux lourds, à travers la recherche de publications et de travaux scientifiques dans ce domaine, le but de notre étude consiste aussi à réaliser une investigation *in silico* sur les gènes de résistance aux métaux lourds pouvant exister chez ces bactéries du sol.

L'analyse *in silico* est l'ensemble de méthodes, de logicielles, et d'application en ligne qui permettent de gérer, manipuler, et analyser des données biologiques, ainsi décrit l'identification des gènes dans les bases de données à l'aide de la bioinformatique. Actuellement il s'agit d'un moyen et de méthodes offrant des outils scientifiques indispensables aux biotechnologues (Gabriel, 2002).

Dans notre travail, réalisé en ligne sur le site web de NCBI (National Center for Biotechnology Information), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), l'intérêt porte sur les gènes : *cadA* impliqué dans la translocation du Cadmium(Cd) et *czcA* impliqué dans la translocation du Cobalt (Co), du Zinc (Zn) et du Cadmium(Cd).

***SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE***

I : POLLUTION DES SOLS PAR LES METAUX LOURDS

1- Importance du sol

C'est une matrice complexe formée par des morceaux de roches, des grains de différentes tailles (sables, limons, argiles), des restes de plantes et d'animaux morts. Les interstices entre ces éléments (pores) sont occupés par de l'eau et de l'air mais aussi par une multitude de micro-organismes qui y vivent (Brian, 2013).

Le sol est un milieu vivant qui recèle une incroyable diversité et densité d'organismes. Plus précisément, 25% de la diversité actuellement décrite sur terre serait hébergée dans le sol. Cependant, celle-ci est encore largement méconnue du grand public (Brian, 2013). Il remplit beaucoup de fonctions essentielles à la vie, et qui dépendent souvent les unes des autres :

- Le sol est une source de nutrition mondiale (Bliffert et Peraud, 2004).
- Le sol est un filtre et un tampon qui permet d'avoir de l'eau potable et de réguler les inondations (Umme et *al.*, 2016).
- Le sol participe aux cycles de l'azote (N), du phosphore (P) et du potassium (K), éléments nécessaires au développement des plantes et des cultures (Umme et *al.*, 2016).
- Le sol est un lieu de vie, riche en espèces et en êtres vivants. Ainsi la biodiversité souterraine est supérieure à celle qui se trouve en surface (Imtiaz et *al.*, 2016).
- Il est aussi le témoin de notre histoire (fouilles archéologiques) (Vodyanitskii, 2016).
- Le sol est une ressource limitée (l'administration de l'environnement et de l'énergie, 2020).

1.1 Sol et microorganismes

Le sol héberge une très forte diversité d'organismes vivants, notamment les microorganismes, (Imtiaz et *al.*, 2016), notamment les eucaryotes (champignons, algues et protozoaires) et les procaryotes (bactéries et cyanobactéries). Leur biodiversité est considérable ainsi que leur distribution qui est en fonction non seulement de la présence de substrats énergétiques (essentiellement des résidus végétaux) et d'éléments minéraux, mais aussi de nombreux facteurs physiques et chimiques caractérisant chaque sol, notamment la structure, l'aération, le pH, la température et la teneur en eau (Ghoreishi et *al.*, 2017).

Les microorganismes du sol assurent des fonctions clés dans la circulation du flux d'énergie et de la matière dans l'environnement comme : la biodégradation de la matière organique, la production de nutriments pour les plantes, la fixation de l'azote, la biodégradation des polluants, etc. (Hien et *al.*, 2010).

En outre, il a été démontré que la structure du sol est non seulement influencée par les constituants minéraux du sol mais aussi par la présence de micro-organismes qui favorisent la formation d'agrégats et de pores (Chesnokova et *al.*, 2016).

1.2 Bactéries du sol

Le sol est considéré comme l'un des environnements les plus complexes de la biosphère et à ce titre, il est un réservoir majeur de la diversité microbienne, il abrite une variété d'espèces bactérienne de forte densité de l'ordre de 10 000 à 100 000 espèces bactériennes par gramme de sol (Akbar et Sultan, 2016). Les bactéries du sol ont plusieurs rôles environnementaux majeurs (Ritchie et Raina , 2016). :

- La fixation du carbone et de l'azote atmosphérique et l'accumulation de nutriments dans les sols.
- La décomposition de la matière organique, formant l'humus et libérant des nutriments disponibles pour les plantes.
- La formation des associations symbiotiques avec les plantes comme les Rhizobiums qui forment des nodules fixateurs d'azote au niveau des racines des légumineuses.
- Favorisant ainsi la croissance des plantes dans les sols pauvres en azote.

2- Pollution du sol

La pollution du sol est indiquée par des concentrations élevées de composés chimiques potentiellement dangereux (métaux lourds, hydrocarbures, solvants halogénés, etc.) pour l'environnement et la santé des êtres vivants (Huamain et *al.*, 1999).

Les événements climatiques tels que les crues, les tornades fréquentes, les tempêtes et les vents de haute vitesse, les pluies de forte intensité, et la sécheresse sont parmi les causes naturelles de dégradation de la qualité des sols (Fernández et *al.*, 2018).

L'origine anthropique de la dégradation du sol est due la plupart du temps aux diverses activités humaines (de l'agriculture aux industries) qui appauvrissent les sols en matières organiques, en éléments minéraux et en microorganismes, les transformant en sols pollués (Qi et *al.*, 2015). A titre d'exemples, quelques sources anthropiques de la dégradation des sols (figure 1) :

- La déforestation et les incendies de forêts qui engendrent une perte de la couverture végétale et accélèrent l'érosion du sol (Wenyou et *al.*, 2018)
- La sur-urbanisation de sols à vocation agricole : les surfaces bétonnées qui couvrent le sol empêchent l'eau de pénétrer dans la terre et sans eau, aucune vie ne peut se développer (Shixue et *al.*, 2018)
- Les émissions intenses des rejets toxiques et polluants riches en métaux lourds par les industries et par la circulation automobile (Pengyan et *al.*, 2018).
- Le dépôt et l'accumulation des boues de station d'épuration, des déchets industriels et ménagers sur les sols sous forme de décharges autorisées ou sauvages (Pengyan et *al.*, 2018).

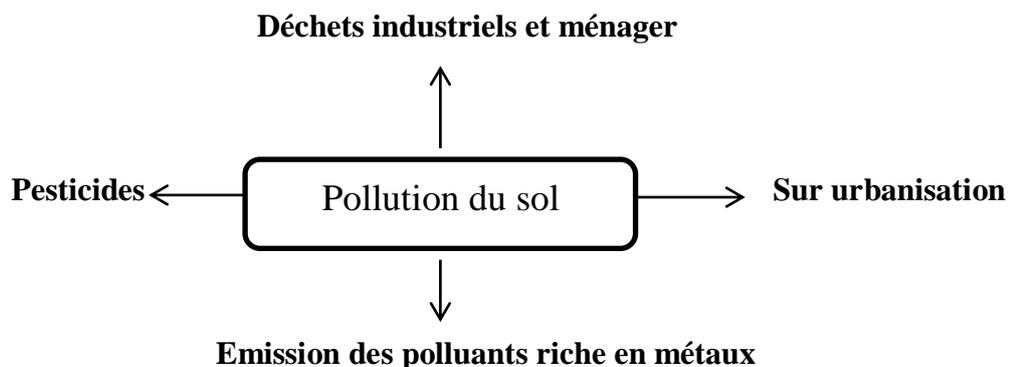


Figure 1 : Représentation schématique Origine de la pollution du sol.

Un sol pollué devient à son tour une source possible de diffusion directe ou indirecte de polluants dans l'environnement, via l'eau, les envols de poussières, ou via un transfert de polluants par des organismes vivants le long de la chaîne trophique. Les conséquences sont surtout la perte de la biodiversité végétale et animale et à la perturbation de l'équilibre dans les différents écosystèmes environnementaux (Lei et al., 2016).

Un sol pollué présentant un risque pour la santé humaine, en effet de nombreuses substances chimiques (dont les métaux lourds) mesurées dans des sols pollués sont connues pour générer des effets gravissimes sur la santé. La contamination se fait alors soit par voie digestive (consommation d'eau polluée ou plantes et animaux contaminés), ou par voie respiratoire (inhalation de poussières des sols pollués rejetées dans l'atmosphère). Ces effets peuvent provoquer divers troubles, notamment neurologiques aigus et chroniques, hépato-rénaux, cardio-respiratoires, digestifs et cancérigène, etc. (Jun et al., 2018).

3- Métaux lourds

On appelle en générale métaux lourds « Heavy metal » les éléments métalliques naturels, de densité supérieure à 5 g/cm³ et tout métal ayant un numéro atomique élevé, en général supérieur à celui du sodium (z=11). Ils sont présents dans tous les compartiments, mais en général en quantités très faibles sous forme de traces (tableau 1) (Fourest, 1993).

Tableau 1 : Classification périodique des éléments (Fourest, 1993).

Bloc S		<div style="display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="width: 15px; height: 15px; background-color: #cccccc; margin-right: 5px;"></div> Métaux lourds de densité > 5 </div>										Bloc p					
H																	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg	Bloc d										Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Te	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Bloc f														
Lanthanides		Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
Transuraniens		Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Cf	Bk	Es	Fm	Md	No	Lr		

3.1 Evolution dans le temps

La production de cuivre est la plus élevée de tous les métaux indiqués et a plus que doublé avec celle de Zn et Ni au cours de ces dernières décennies. L'argent (Ag) a augmenté d'environ 60 % au cours de cette période. Le plomb a diminué entre 1973 et 1994, avec des augmentations progressives par la suite pour atteindre des tonnages de production totale plus élevés d'ici 2010. Une diminution importante en production du mercure (Hg) entre 1973 et 1994, puis la production totale relativement similaire au cours des 16 années suivantes est particulièrement remarquable et est due à des changements dans l'utilisation d'Hg et à l'introduction de contrôles environnementaux plus stricts. (Tableau 2).

Tableau 2 : Production minière mondiale de métaux lourds (Brian, 2013)

Element	Symbol	World production			
		1973 [11]	1994 [3]	2004 [3]	2010 [10]
Antimony	Sb	–	106,000	112,000	135,000
Arsenic	As	–	43,000	37,500	54,500
Barium ^a (59%)	Ba	–	4,300,000	6,900,000	6,900,000
Cadmium	Cd	17,200	18,100	17,200	22,000
Chromium ^b (46.5%)	Cr	–	9,570,000	17,000,000	22,000,000
Cobalt	Co	–	18,500	46,900	88,000
Copper	Cu	7,116,900	9,430,000	14,500,000	16,200,000
Gold	Au	–	2,300	2,470	2,500
Lead	Pb	3,487,000	2,800,000	3,150,000	4,100,000
Manganese ^c (35–40%)	Mn	–	7,190,000	11,000,000	13,000,000
Mercury	Hg	9,300	1,760	1,750	1,960
Molybdenum	Mo	–	104,000	139,000	234,000
Nickel	Ni	710,000	906,000	1,400,000	1,550,000
Selenium	Se	–	1,880	1,500	2,260
Silver	Ag	–	13,900	19,500	22,200
Thallium (kg)	Tl	–	15,000	15,000	10,000
Tin	Sn	233,800	184,000	250,000	261,000
Tungsten	W	–	26,000	60,000	61,000
Vanadium	V	–	33,900	44,000	56,000
Zinc	Zn	5,709,400	6,810,000	9,100,000	12,000,000

3.2 Classification des métaux lourds

D'après Huynh (2009) sur le plan biologique et selon leurs effets physiologiques et de toxicité, on distingue deux types d'ETM :

3.2.1 Métaux toxiques

3.2.1.1 Plomb

- Symbole : Pb
- Numéro atomique : 82
- Masse atomique : 207,2 u
- Groupe, période, bloc : 14, 6, p
- Etat d'oxydation : Pb^{+2} , Pb^{+4}

Le plomb est l'un des métaux lourds les plus toxiques qui existent dans la croûte terrestre sous diverses formes, il est toxique pour les plantes et les animaux en raison de sa nature non biodégradable. Il inhibe la germination des graines et la viabilité via l'altération de la transcription du profil d'ADN génomique (Sethy et Ghosh , 2013). Il retarde également le développement des plantes, la biosynthèse de la chlorophylle et la division cellulaire (Kumar et *al.*, 2017).

3.2.1.2 Arsenic

- Symbole : As
- Numéro atomique : 33
- Masse atomique : 74,92 u
- Groupe, période, bloc : 15, 4, p
- Etat d'oxydation : As^{+3} , As^{+5}

Selon l'organisation mondiale de la santé (2018) l'arsenic est un élément naturel de la croûte terrestre et il est largement présent dans l'environnement, que ce soit dans l'air, dans l'eau ou dans la terre. Il est très toxique sous forme inorganique.

Il est rejeté par les applications agricoles (insecticides, fongicides, algicides) et industriels (produits de préservation du bois, colorants, minerais métalliques, verrerie)

L'exposition prolongée à l'arsenic inorganique, principalement en buvant de l'eau contaminée ou en mangeant des aliments préparés avec cette eau ou provenant de cultures irriguées avec des eaux riches en arsenic, peut entraîner une intoxication chronique. Les lésions et les cancers de la peau sont les effets les plus caractéristiques.

3.2.1.3 Cadmium

- Symbole : Cd
- Numéro atomique : 48
- Masse atomique : 112,411 u
- Groupe, période, bloc : 12, 5, d
- Etat d'oxydation : Cd⁺²

En raison de sa nature hydrophile, le Cd est considéré comme l'un des métaux lourds les plus phyto toxiques. À très faible concentration, le Cd peut inhiber certaines enzymes clés impliquées dans le cycle de Calvin, un élément présent en faible quantité dans la croûte terrestre (Gill and Tuteja, 2011). C'est un métal blanc, étroitement lié aux minéraux de zinc et de plomb. Le cadmium est présent dans l'alimentation, la fumée de cigarette et dans l'air atmosphérique des agglomérations urbaines (Biomnis, 2012).

3.2.1.4 Mercure

- Symbole : Hg
- Numéro atomique : 80
- Masse atomique : 200,59 u
- Groupe, période, bloc : 12, 6, d
- Etat d'oxydation : Hg⁺, Hg⁺²

Le mercure est un métal présent naturellement dans l'environnement. Il pénètre dans l'environnement lors de la rupture naturelle des minéraux dans les roches et le sol exposé au vent et à l'eau. La plupart du mercure rejeté par les activités humaines est rejeté dans l'air, lors de la combustion de combustibles fossiles, de l'exploitation minière, la fonderie, et la combustion des déchets solides. Certaines activités rejettent du mercure directement dans le sol ou dans l'eau, par exemple l'application de fertilisants agricoles et les rejets d'eaux usées industrielles. Tout le mercure rejeté dans l'environnement finit finalement dans les sols ou les eaux de surface (Lenntech, 2021).

3.2.2 Métaux essentiels ou micronutriments

Comme les métaux lourds sont très toxiques pour l'environnement, ils sont nécessaires pour la croissance et le fonctionnement des plantes citent :

3.2.2.1 Fer

- Symbole : Fe
- Numéro atomique : 26
- Masse atomique : 55,845 u
- Groupe, période, bloc : 8, 4, d
- Etat d'oxydation : Fe^{+2} , Fe^{+3} , Fe^{+4} , Fe^{+6}

Constituant des cytochromes (protéines de transfert d'électrons) et des métalloenzymes et est essentiel pour de nombreux processus biochimiques et physiologiques chez les plantes. Ils comprennent: la photosynthèse, l'utilisation de N et S, la production de l'hormone végétale éthylène et la biosynthèse de la chlorophylle (Brian, 2013).

3.2.2.2 Zinc

- Symbole : Zn
- Numéro atomique : 30
- Masse atomique : 65,409 u
- Groupe, période, bloc : 12, 4, d
- Etat d'oxydation : Zn^{+2}

Constituant de plusieurs enzymes ayant des rôles dans la synthèse des glucides et des protéines, la régulation des gènes, la structure et l'intégrité des biomembranes, la protection des cellules contre les dommages dus aux radicaux libres, la régulation de la synthèse de l'auxine et la formation du pollen(Brian,2013)

3.2.2.3 Nickel

- Symbole : Ni
- Numéro atomique : 28
- Masse atomique : 58,69 u
- Groupe, période, bloc : 10, 4, d
- Etat d'oxydation : Ni⁺², Ni⁺³

Constituant de l'enzyme uréase et donc essentiel pour les quelques espèces végétales qui produisent cette enzyme et d'autres plantes alimentées en urée comme seule source de N. Le nickel est également un composant de l'enzyme hydrogénase impliquée dans la fixation de l'azote par les bactéries (Brian, 2013).

3.3 Toxicité des métaux lourds

Les métaux lourds les plus couramment disponibles dans l'environnement sont As, Cd, Cr, Cu, Pb, Ni et Zn. Certains métaux lourds en faibles concentrations sont essentiels pour les processus biochimiques et physiologiques au sein des organismes vivants; cependant, ils peuvent devenir toxiques à des concentrations plus élevées (Jaishankar et *al.*, 2014).

Il faut souligner que plusieurs métaux lourds sont extrêmement toxiques même à de faibles niveaux d'exposition (Tchounwou et *al.*, 2012). Ces substances toxiques systémiques sont l'arsenic, le cadmium, le chrome, le plomb et le mercure et peuvent provoquer des dommages à plusieurs organes (Guha et *al.*, 2017).

Les métaux lourds sont toxiques à cause de leur : (Christophe M, 2020).

- Non-dégradable et donc leur persistance dans les milieux.
- Leur toxicité à faible concentration.
- Leur tendance à s'accumuler dans les organismes vivants et à se concentrer le long des chaînes trophiques.

3.4 Origine des pollutions

Leur présence dans les sols peut être naturelle ou anthropogénique.

3.4.1 Origine naturelle

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique. Les sources naturelles les plus importantes sont altération des minéraux, érosion et activité volcanique (Bourrelier et Berthelin., 1998). La concentration naturelle de ces métaux lourds dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge (Singh et *al.*, 2003).

3.4.2 Origine anthropique

Les activités humaines anthropiques ajoutent des concentrations significatives de métaux lourds à l'activité naturelle. Ces activités ont donné lieu à la propagation de nombreux métaux polluants toxiques de la croûte terrestre vers divers compartiments environnementaux (Teklić et *al.*, 2008; Shahid et *al.*, 2014).

Par conséquent, les écosystèmes sont menacés pour les métaux lourds provenant de diverses sources, y compris l'extraction et le raffinage des minerais, les applications d'engrais et de pesticides, la fabrication de batteries, les produits chimiques, l'élimination des déchets solides (y compris le traitement des boues d'épuration), l'irrigation avec les eaux usées, les émissions d'échappement des véhicules et la plupart des activités industrielles (Teklić et *al.*, 2008; Shahid et *al.*, 2014).

3.5 Disponibilité des métaux lourds dans les sols

La quantité de métaux lourds disponible dans l'environnement dans le sol comprend la fraction dissoute dans l'eau interstitielle ainsi que la quantité déjà absorbée dans les particules de sol. La quantité de métaux lourds absorbée par le sol n'est pas une fraction fixe, mais doit être considérée comme une fonction du temps d'exposition. Les métaux lourds potentiellement disponibles pour l'absorption ont diverses cinétiques de désorption, en fonction de leur chimie ainsi que des propriétés du sol, telles que le pH et la texture (Kim et *al.*, 2015). Les propriétés physico-chimiques du sol sont un facteur décisif dans la concentration des métaux lourds dans les sols disponibles pour l'absorption des plantes. La solubilité des métaux dans le sol est dictée par la valeur du pH et le pourcentage d'argile dans le sol (Golia et *al.*, 2008).

3.6 Interaction plantes – métaux lourds

Les métaux lourds pénètrent dans les plantes principalement via les racines de la solution du sol et voyagent le long de la chaîne alimentaire. La majorité des métaux lourds absorbés sont stockés dans les racines où ils précipitent sous forme de sels métalliques insolubles, immobilisés par de la pectine chargée négativement dans la paroi cellulaire, précipitent dans l'espace intercellulaire ou s'accumulent dans les vacuoles (Muhammad et *al.*, 2015).

Une accumulation excessive de métaux lourds dans les tissus végétaux altère le phytométabolisme directement ou indirectement et entraîne plusieurs effets négatifs entraînant une baisse de la productivité des cultures. L'accumulation de métaux lourds dans les tissus végétaux entraîne une germination réduite des graines, une diminution de l'allongement des racines, une diminution de la biomasse végétale et une inhibition de la biosynthèse de la chlorophylle. À l'intérieur d'une cellule, le plomb affecte la photosynthèse, la respiration, les réactions enzymatiques, la nutrition minérale et plusieurs autres facteurs physiologique (Muhammad et *al.*, 2015).

L'un des effets les plus courants de la toxicité des métaux lourds dans les plantes est la surproduction de ROS, qui est le résultat de l'interférence des métaux lourds avec les activités de transport d'électrons. Les plantes ont développé plusieurs mécanismes de détoxification afin de faire face à la surproduction de ROS (Muhammad et *al.*, 2015).

ROS : (espèces réactives de l'oxygène) sont un groupe de radicaux libres, de molécules réactives et d'ions qui sont dérivés d'O₂ (Asada et Takahashi., 1987). Les ROS sont générés par les activités de transport d'électrons de chloroplaste, mitochondries et membrane plasmique ou comme sous-produit de diverses voies métaboliques localisées dans différents compartiments cellulaires. Dans des conditions de croissance normales, la production de ROS dans divers compartiments cellulaires est faible. Cependant, divers stress environnementaux tels que la sécheresse, salinité, refroidissement, toxicité des métaux, en cas de prolongation dans une certaine mesure, perturber l'homéostasie cellulaire et améliore leur production. ROS joue deux divergents rôles dans les plantes; à faible concentration, ils servent de signalisation molécules qui interviennent dans plusieurs réponses végétales chez la plante, y compris les réponses sous stress. Un niveau amélioré de ROS provoque des dommages oxydatifs aux lipides, aux protéines et à l'ADN entraînant une altération des propriétés de la membrane comme la fluidité, le

transport d'ions, la perte d'activité enzymatique, réticulation des protéines, inhibition des protéines de synthèse, dommages à l'ADN, entraînant finalement la mort cellulaire (Pallavi et al.,2012).

3.7 Interaction microorganismes – métaux lourds

Les fortes concentrations en métaux lourds influencent fortement les communautés microbiennes dans deux différentes façons (figure 2) (Jacob-Dubuisson et *al.*, 2018) :

- a) inhibition de la fonction métabolique : d'inhiber les différents processus physiologiques tels que la dénaturation de la membrane cellulaire, inhibition de la division cellulaire et de l'activité enzymatique et dénaturation de protéine.
- b) modulation dans le matériel génétique : endommager le matériel génétique et inhibent le processus de transcription

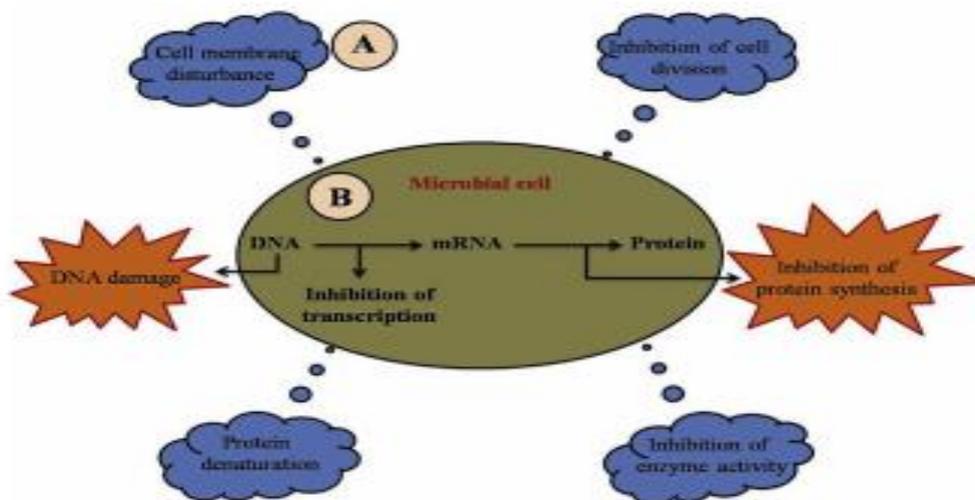


Figure 2 : Effets toxiques des métaux lourds sur les microorganismes. Toxicité des métaux lourds sur les micro-organismes se produisent en deux phases (A) inhibition des fonctions métaboliques et (B) modulation dans le matériel génétique (Jacob-Dubuisson et *al.*, 2018).

II : BIOREMEDIATION BACTERIENNE DES METAUX LOURDS

Les nombreux cas de pollution par les métaux lourds génèrent autant de site contaminés qu'il faut réhabiliter. Les méthodes physico-chimiques de dépollution de ces sites utilisées *in situ* et *ex situ* présentent l'inconvénient d'être coûteuses et lourdes à mettre en œuvre. De plus, elles perturbent fortement l'activité biologique des sols et altèrent leur structure physique (Glick, 2007). Le besoin de nouvelles techniques économiquement compétitives et pouvant préserver les caractéristiques du sol s'est fait sentir et l'utilisation des biotechnologies s'est avérée être une alternative intéressante et de plus en plus sollicitée.

1- Bioremédiation

Le terme de bioremédiation est composé de «Bio» qui signifie la vie et se réfère aux organismes vivants et «remédies» qui signifie résoudre un problème (Banerjee et al, 2013). C'est une des options les plus valables pour l'assainissement de sols contaminés par les composés organiques et inorganiques, considérés comme nuisibles à la santé et à l'environnement.

Le procédé de la bioremédiation consiste à exploiter la capacité naturelle que possèdent de nombreux organismes vivants, la plupart des temps microscopiques (bactéries, micro algues, champignons...etc), à dégrader les polluants en composés inertes, comme l'eau et le gaz carbonique (Vidali, 2001). Ces organismes peuvent être indigènes (déjà présents dans la zone polluée), ou exogènes (introduits au milieu), ou encore être prélevés directement sur le site contaminé, cultivés au laboratoire puis réintroduits dans le sol (Mulligan and Yong, 2004).

La bioremédiation se déroule généralement en conditions d'aérobies, cependant l'application de systèmes de bioremédiation en conditions d'anaérobies permet la dégradation d'un certain nombre de molécules récalcitrantes (Charissou et Lejeune, 2009).

1.1 Bioremédiation *in situ*

La bioremédiation est une option intéressante, il s'agit de traitements biologiques directement appliqués sur le site à dépolluer (Hanna, 2004). Ces traitements ont l'avantage de ne pas nécessiter d'excavation et de permettre une dépollution par les microorganismes (Banerjee et al., 2016).

1.1.1 Bioremédiation intrinsèque

Alternativement appelée bioremédiation passive ou atténuation naturelle, la bioremédiation intrinsèque est un processus de dégradation naturelle qui ne dépend que du métabolisme des microorganismes natifs, pour détruire les contaminants dangereux, en n'utilisant aucune étape artificielle pour améliorer l'activité de biodégradation (Kumar et *al.*, 2018).

1.1.2 Bioventing

Le bioventing implique une stimulation contrôlée du flux d'air, fournissant de l'oxygène pour augmenter l'activité microbienne, et par conséquent améliorer la biorestauration (Brown et *al.*, 2017).

1.1.3 Biosparging

Dans le biosparging (figure 3), l'air est introduit dans le sol pour favoriser la capacité de dégradation des microorganismes. Contrairement au bioventing, l'air est introduit à l'intérieur de la zone saturée, provoquant le mouvement ascendant des polluants volatils. L'efficacité du biosparging dépend de la perméabilité du sol, qui détermine la disponibilité des polluants pour les microorganismes ainsi pour la biodégradabilité des polluants (Godheja et *al.*, 2019).

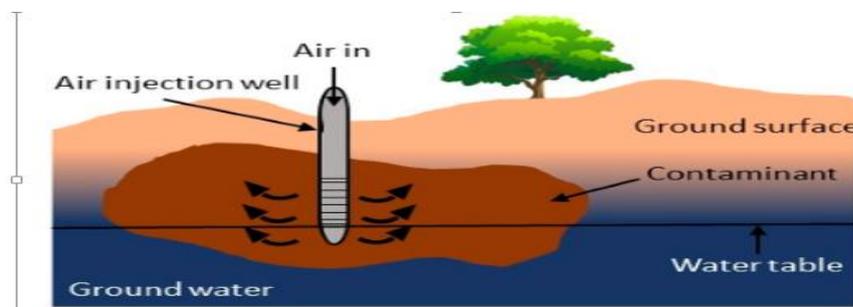


Figure 3 : Représentation schématique de techniques de biosparging (Kumar et *al.*, 2018).

1.1.4 Bio augmentation

La bio augmentation est une technique consiste à l'ajout de cultures de microorganismes à la surface du milieu contaminé pour augmenter la biodégradation des contaminants organiques. Elle est largement utilisée pour décontaminer les sites pollués par des hydrocarbures.

La bio augmentation est principalement efficace dans les sites où les concentrations des polluants sont très élevées (Lyoune et al., 2001).

1.1.5 Bio stimulation

La bio stimulation est une technique d'assainissement très efficace, rentable et écologique (Tribadai et al., 2018). Le principe de cette technique consiste à stimuler le site pour le développement des microorganismes indigènes en optimisent les conditions de l'aération, l'ajout de nutriments (phosphore, azote), le pH et contrôler la température (Endeshaw et al., 2017).

1.2 Bioremédiation *ex situ*

Les techniques *ex situ* permettent un meilleur contrôle des conditions environnementales, conduisant à une augmentation du taux de biodégradation par rapport aux techniques de traitement *in situ*. De plus, grâce à la possibilité d'homogénéisation du sol pollué, l'opération est généralement plus uniforme et prend moins de temps. Cependant, ces techniques sont plus coûteuses en raison de l'excavation, de l'assainissement du site et du traitement. De plus, l'excavation du sol entraîne une augmentation de la mobilité des polluants et de leur exposition (Azubuiké et al., 2018).

1.2.1 Bioréacteurs à boues

Le terme " bioréacteur " fait référence à tout équipement ou installation manufacturée qui prend en charge un système. Les bioréacteurs à boues sont utilisés pour traiter les polluants d'hydrocarbures en toute sécurité et facilement. Les contaminants sont conservés dans un conteneur de confinement où, à l'aide de divers types de dispositifs pour mélanger les boues. Un mélange est obtenu consistant en un système triphasé solide, liquide et gazeux. Le biofilm formé stimule la biodégradation des polluants et augmente le niveau de biomasse (Salehi et al., 2017).

1.2.2 Biopiles de sol

La bioremédiation par les biopiles consiste en l'empilement de sols contaminés et l'aération pour favoriser la biodégradation principalement en améliorant l'activité microbienne. Les éléments de technologie sont l'arrosage, l'aération et la lixiviation. Son utilisation est de plus en plus prise en compte grâce à ses caractéristiques de construction et au rapport coût bénéfice favorable qui permettent une bioremédiation efficace, à condition qu'un contrôle adéquat des nutriments, de la température et de l'aération soit assuré (Whelan, et al., 2015).

1.2.3 Compostage

Le compostage est un processus contrôlé de dégradation des constituants organiques d'origine végétale et/ou animale par une succession de communautés microbiennes évoluant en conditions aérobiques, entraînant une montée en température. Et conduisent à l'élaboration d'une matière organique humifiée et stabilisée (Francou, 2004).

1.2.4 Landfarming

Le landfarming est l'un des technologies de bioremédiation les plus élémentaires en raison de son faible coût et le faible encombrement (figure 4). Le landfarming peut être classé comme technologie *ex situ* ou *in situ* selon l'endroit où le traitement a lieu. Il existe certaines limitations et inconvénients liés à cette technique, tels que la nécessité d'un grand espace de travail, la limitation de l'activité microbienne en raison d'un environnement défavorable, le coût d'excavation supplémentaire et la faible efficacité dans l'élimination des polluants inorganiques. L'un des principaux inconvénients de la mise en décharge sont la libération de composés organiques volatils dans l'environnement (Ortega et al., 2018).

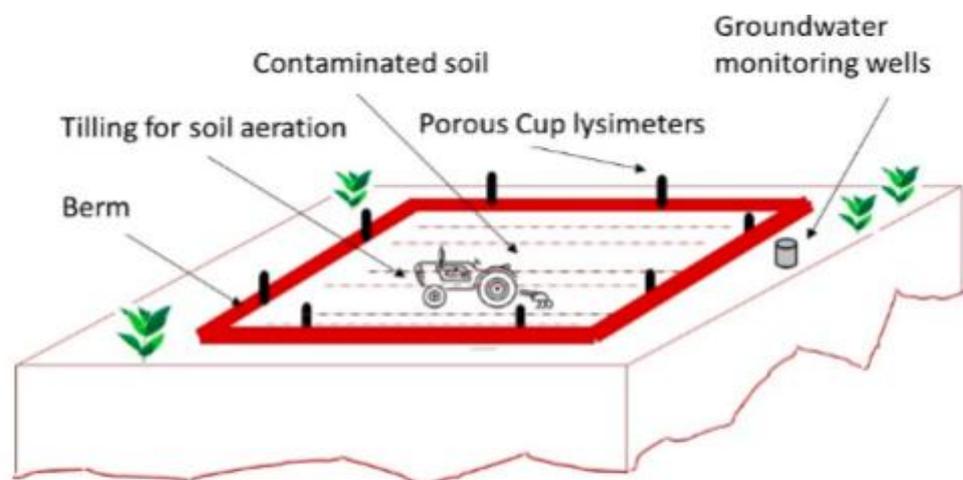


Figure 4 : Représentation schématique de techniques de Landfarming (Ortega et al., 2018)..

2- Bioremédiation bactérienne

La bioremédiation bactérienne utilise des espèces bactériennes, afin de dégrader des polluants *in situ* ou *ex situ* (Boopathy, 2000). L'isolement de bactéries de milieux pollués en métaux est la première étape vers la création d'outils de bioremédiation. Ces micro-organismes sont naturellement capables de résister aux éléments toxiques auxquels ils ont été exposés (Jones, 1998 ; Watanabe et *al.*, 2001).

Les bactéries sont capables de réduire, oxyder, séquestrer, volatiliser les polluants. Ces mécanismes bactériens permettent l'exploitation de leur capacités métaboliques et d'envisager leur utilisation dans des procédés efficaces et peu coûteux de bioremédiation des sols contaminés par les métaux lourds (Ledin, 2000).

2.1 Acquisition des métaux par les bactéries

Les bactéries représentent le plus grand nombre d'organismes dans les sols. En raison de leur petite taille, les bactéries présentent un volume important qui leur confèrent une grande surface de contact pour interagir avec l'environnement. En plus de ces caractéristiques, c'est plus particulièrement la charge nette négative de leur enveloppe cellulaire qui fait que ces organismes sont capables de fixer et d'accumuler les cations métalliques dans l'environnement (Fein et *al.*, 1997 ; Yee and Fein, 2001).

L'interaction bactéries-métaux lourds a été surtout étudiée dans les environnements extrêmes. La nature des interactions dépend du rôle biologique du métal dans la cellule. Certains métaux lourds (Ni, Co, Fe, Zn, Cu ...) sont des cofacteurs indispensables de certaines protéines, pour leur stabilisation ou leur conformation, mais deviennent toxiques à haute concentration, par exemple, le nickel est un cofacteur des uréases (Dosanjh et *al.*, 2007).

Les parois cellulaires bactériennes comprennent une variété de groupes fonctionnels organiques de surface, qui offrent une forte affinité pour se lier aux métaux lourds. Par conséquent, la biosorption des métaux lourds par la paroi cellulaire bactérienne, est en pratique depuis longtemps (Daughney et *al.*, 2002).

Les métaux sont prélevés activement par les bactéries en deux temps : les ions métalliques sont initialement adsorbés à la surface extracellulaire (mécanisme passif ou biosorption). Puis, des systèmes de transport spécialisés (protéines de transport), qui s'accompagnent en général d'une dépense d'énergie (hydrolyse d'ATP) sont activés pour faire entrer le métal à l'intérieur de la cellule (mécanisme actif) (Nies, 1999).

2.2 Mécanismes de résistances des bactéries aux métaux lourds

Chez les bactéries il existe divers mécanismes qui peuvent intervenir directe ou indirecte dans la résistance aux métaux lourds (figure 5).

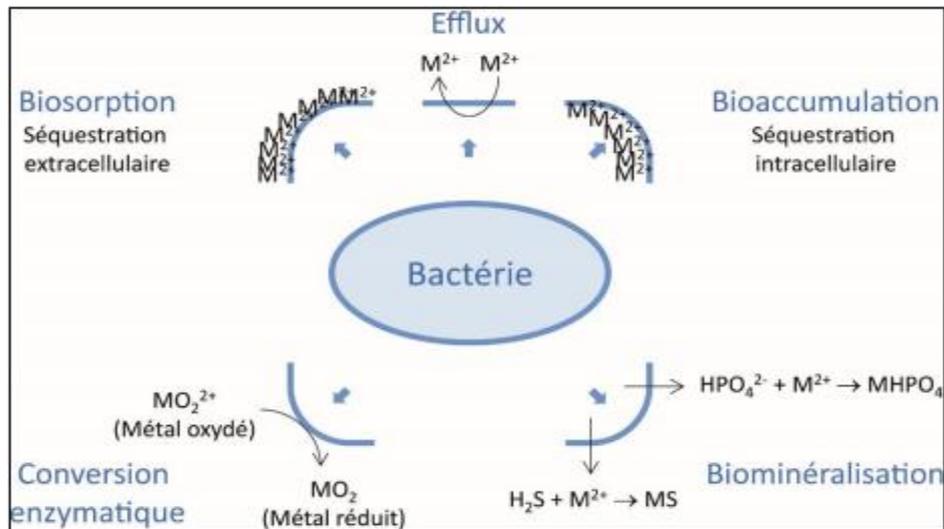


Figure 5 : Mécanismes bactériens de résistance aux métaux toxiques. M^{2+} correspond dans ce schéma au métal sous forme cationique pris en charge par la bactérie (Bauvais,2015).

2.2.1 Séquestration

La séquestration des ions métalliques, qui peut être intra- ou extracellulaire, permet d'immobiliser rapidement les métaux par des interactions physico-chimiques et en limiter les effets toxiques en combinaison avec d'autres mécanismes de résistances (Gadd, 1990).

2.2.1.1 Séquestration intracellulaire

La séquestration intracellulaire ou bioaccumulation (figure 5) correspond à l'accumulation de métaux dans le cytoplasme pour en diminuer la biodisponibilité et préserver les composants cellulaires essentiels. Elle se fait par l'association des métaux comme le mercure, le cadmium, le plomb, le zinc, l'argent et le cuivre avec des protéines de haute affinité pour les ions métalliques (Blindauer et al., 2002).

Les métallothionéines (MT) sont un groupe de protéines de liaison aux métaux intracellulaires omniprésentes de faible masse moléculaire et riches en cystéine (30%). En

raison de leur richesse en thiol, les MT se lient à un certain nombre de métaux traces, notamment le cadmium, le mercure, le platine et l'argent, et protègent également les cellules et les tissus contre la toxicité des métaux lourds. De plus, les MT sont parmi les aspects intracellulaires les plus abondants pour les métaux biologiquement essentiels, le zinc et le cuivre. (Kondo et al., 1995). La transcription du gène MT est induite par un certain nombre de métaux (Susan et Lashitew, 1997).

La première métallothionéine caractérisée chez les bactéries (SntA) de *Synechococcus* PCC7942, séquestre et détoxifie le Zn^{+2} et Cd^{+2} (Gupta et al., 1992 ; Tuner et al., 1993). Ces protéines ont été trouvées en plus chez les bactéries du sol (*Pseudomonas putida*) (Blindauer et al., 2002).

La mobilisation du zinc dans ou hors du cytosol est dirigée par deux familles de transporteurs de zinc, ZIP et ZnT. Dans le cytosol, les MT lient le Zn pour réserver, tamponner et chélater (figure 6) (Tomoki et Taiho, 2016).

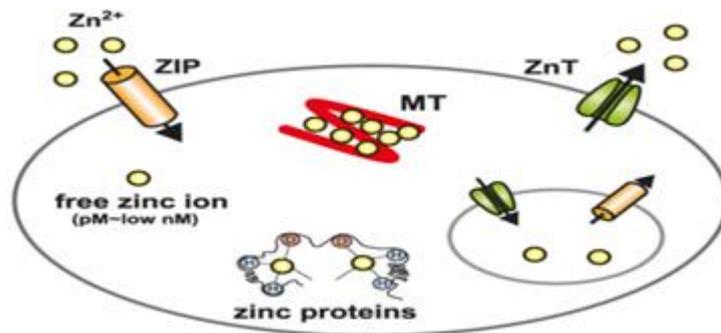


Figure 6 : L'homéostasie cellulaire du zinc est contrôlée par la fonction coopérative des métallothionéines (MT) et des protéines de type ZIP et des transporteurs ZnT (Tomoki et Taiho, 2016)

2.2.1.2 Séquestration extracellulaire

La séquestration extracellulaire correspond à deux processus cellulaires : la biosorption et la biominéralisation (figure 5).

2.2.1.2.1 Biosorption

La biosorption se fait via l'interaction des métaux avec les groupements anioniques de la paroi cellulaire (groupements thiol, hydroxyle, carboxyl, sulfonate, amine, amide, phosphonate) ou par association à des substances polymériques extracellulaires (polysaccharides, protéines, acides nucléiques ou acides gras) (Scott et Palmer, 1990).

Les substances polymères extracellulaires (SPE) sont une barrière protectrice hautement hydratée qui joue un rôle dans la survie des bactéries, puisqu'elle permet de tamponner les variations physicochimiques du milieu naturel (Harrah et al., 2006). Elles assurent des fonctions variées comme la résistance aux antibiotiques, la capture des minéraux essentiels et des nutriments et la biosorption des métaux (De Philippis et al., 2011).

La propriété anionique des SPE est due à la présence de groupes phosphate, carboxylate, acétate, amine et plus rarement sulfate ionisables chargés négativement, qui réagissent à leur tour avec des ions métalliques chargés positivement (figure 6) (Liu et Fang, 2002).

Les groupes carboxyle ou hydroxyle sont en outre impliqués dans le processus de liaison des métaux en formant des liaisons de coordination qui confèrent une stabilité aux complexes polymères d'ions métalliques (Cozzi et al., 1969).

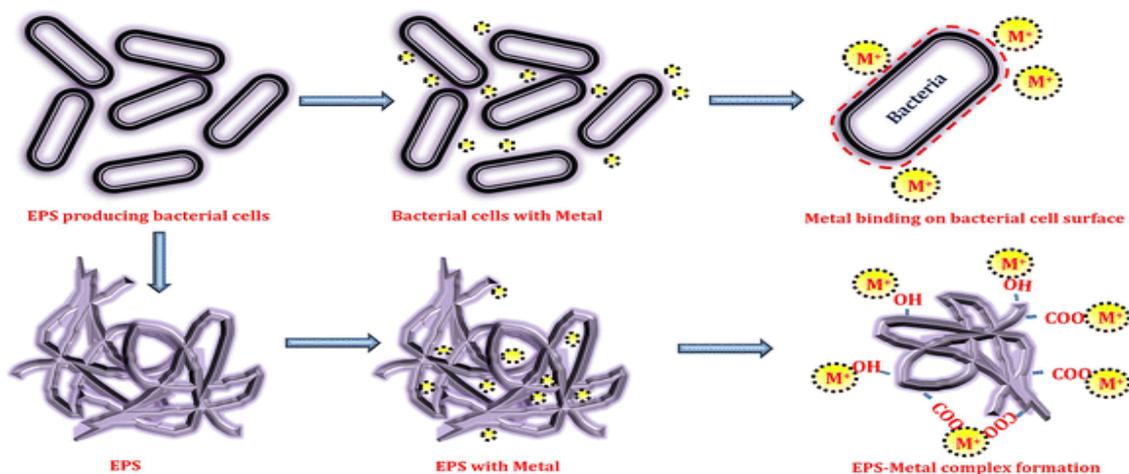


Figure 7 : Représentation schématique du mécanisme de l'interaction EPS avec les métaux lourds (Mohit et al., 2017) .

Il a été montré que les bactéries pouvaient produire une large variété de polymères et certains auteurs ont évalué la fixation des métaux par ces polymères (Tableau3).

Tableau 3 : Capacité de biosorption des éléments traces métalliques par les EPS bactériennes

Souche bactérienne	Métal sorbé	Quantité, mg.g ⁻¹ EPS	Référence
Bactérie marine réductrice de sulfate	Mo(VI)	2.14	(Beech and Cheung, 1995)
	Ni(II)	0.43	
	Cr(III)	0.2	
<i>Methylobacterium organophilum</i>	Pb(II)	184.2	(Kim et al., 1996)
	Cu(II)	200.3	
<i>Alteromonas macleodii</i> subsp. <i>fifiensis</i>	Pb(II)	316	(Loačec et al., 1997)
	Cd(II)	125	
	Zn(II)	75	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Cu ^r	Cu(II)	320	(Kazy et al., 2002)
<i>Enterobacter cloacae</i> AK-I-MB-71a	Cr(VI)	8.3	(Iyer et al., 2004)
<i>Chryseomonas luteola</i> TEM05	Cd(II)	64.1	(Ozdemir et al., 2005)
	Co(II)	55.2	
<i>Paenibacillus polymyxa</i> P13	Cu(II)	1602	(Prado Acosta et al., 2005)
	Pb(II)	228	
<i>Paenibacillus jamilae</i> CECT 5266	Cd(II)	55	(Morillo Pérez et al., 2008)
	Cu(II)	40	
	Zn(II)	37	
	Ni(II)	15	
	Co(II)	10	
<i>Pseudomonas putida</i>	Cd(II)	-	(Ueshima et al., 2008)
	Pb(II)	-	
Boues activées (consortium bactérien)	Cd(II)	-	(Guibaud, 2003; Comte, Guibaud, and Baudu, 2006a, 2006b)
	Cu(II)	-	
	Ni(II)	-	

2.2.1.2.2 Biominéralisation

La séquestration peut aussi se faire sous forme de cristaux (biominéralisation) (figure 5), liée à une alcalinisation du milieu résultant de l'activité cellulaire, et à la formation de carbonates à la surface cellulaire, qui lorsqu'il y a sursaturation et cristallisation avec les ions métalliques présents. Les cristaux formés peuvent s'adsorber de manière non spécifique sur la paroi extracellulaire (Diels et *al.*, 1995; Podda et *al.*, 2000).

Les systèmes d'efflux les plus connues sont des systèmes primaires et des systèmes secondaires.

2.2.2 Transporteurs primaires

2.2.2.1 Transporteurs ABC

Les transporteurs de la cassette de liaison à l'ATP (ABC) sont des protéines membranaires intégrales qui transportent activement des molécules à travers la membrane lipidique contre un gradient de concentration, en utilisant l'énergie dérivée de l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Cette classe omniprésente de transporteurs est présente dans pratiquement

tous les organismes vivants et est responsable d'une grande variété de processus (Linton et Higgins, 1998).

Les types de transporteurs ABC spécialisés transportent une large gamme de substrats allant de petites molécules, telles que des ions, des sucres ou des acides aminés à des composés plus gros tels que des antibiotiques, des médicaments, des lipides et des oligopeptides. Les transporteurs ABC participent à l'absorption de nutriments ou à la sécrétion de toxines dans les bactéries (Saier et *al.*, 1998).

Comme l'illustre la figure 7, tous les transporteurs ABC partagent une structure de base commune indépendamment de leur fonction d'importateur ou d'exportateur ou des substances transportées. Les transporteurs ABC sont composés de deux domaines transmembranaires (TMD en bleu) qui sont les protéines membranaires intégrales et de deux domaines de liaison nucléotidique (NBD en vert), des protéines hydrosolubles associées aux TMD d'un côté de la membrane. Les NBD sont les moteurs d'un transporteur ABC, car ils lient et hydrolysent l'ATP (Hollenstein et *al.*, 2007).

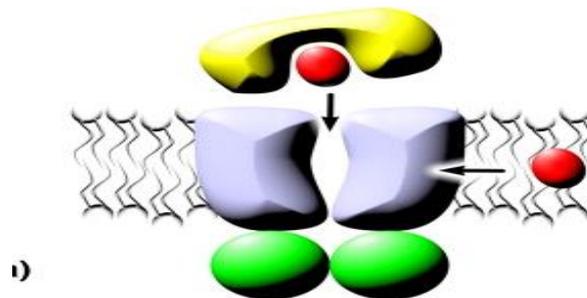


Figure 8 : Architecture générale du transporteur ABC (Hollenstein et *al.*, 2007).

2.2.2.2 ATPases type P

Les ATPases type P sont un grand groupe de pompes ioniques et lipidiques que l'on trouve chez les bactéries, les archées et les eucaryotes. Ils forment une grande famille de protéines membranaires. Les ATPases de type P constituent une superfamille de protéines qui transportent des ions contre le gradient de concentration, en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. L'énergie libérée par l'élimination du γ -phosphate de l'ATP est couplée à la translocation d'un ion à travers les membranes biologiques. (Axelsen et Palmgren, 1998).

L'ATPases type P contient 5 sites (figure 8) ; le site phosphatase (TGES), le site de phosphorylation (DKTGT) et le site de fixation de l'ATP (GDGXNDXP) sont communs à toutes les ATPases de type P1. Les sites CPX, HP et les sites de fixation au métal (poly-His, CXXC) sont spécifiques des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds (Monchy, 2007).

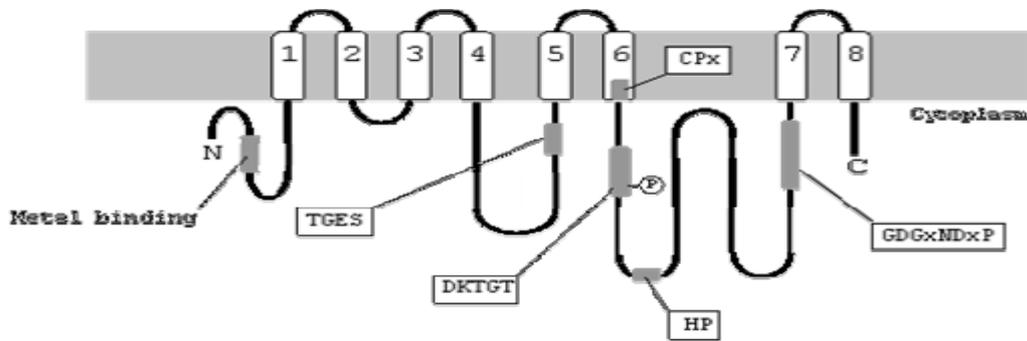


Figure 9 : Structure schématiques des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds (Monchy ,2007).

2.2.3 Transporteurs secondaires

2.2.3.1 Systèmes RND (chimiosmotiques)

Les transporteurs bactériens impliqués dans la résistance, la nodulation et la division cellulaire constituent la base de la superfamille des systèmes RND (Resistance-Nodulation-Cell Division) (Dong et Mergeay, 1994). Ce type de transporteur intervient dans la résistance aux métaux lourds, le transport de molécules organiques, la nodulation, chez *Rhizobium*, ou la division cellulaire chez *Escherichia coli* (Saier et al., 1999). Ce système à trois composants est constitué d'une protéine de membrane externe (de la famille OMF: Outer Membrane Factor), d'une protéine transpériplasmique (de la famille MFP: Membrane Fusion Protein) qui couple les deux protéines membranaires et principalement d'une pompe localisée dans la membrane interne (de la famille RND). L'ensemble des trois protéines forme un canal par lequel les ions sont extrudés à l'extérieur de la cellule sans nécessiter d'apport énergétique. L'expression des systèmes RND est souvent régulée par un système senseur/régulateur (dit à deux composants). Lorsque le senseur lie un ion métallique pour lequel il a une affinité suffisante, il change de conformation, et peut phosphoryler le régulateur afin de l'activer. Le régulateur active la transcription des gènes de l'opéron qui codent pour les trois composants du système d'extrusion (figure 9) (Diels et al., 1995).

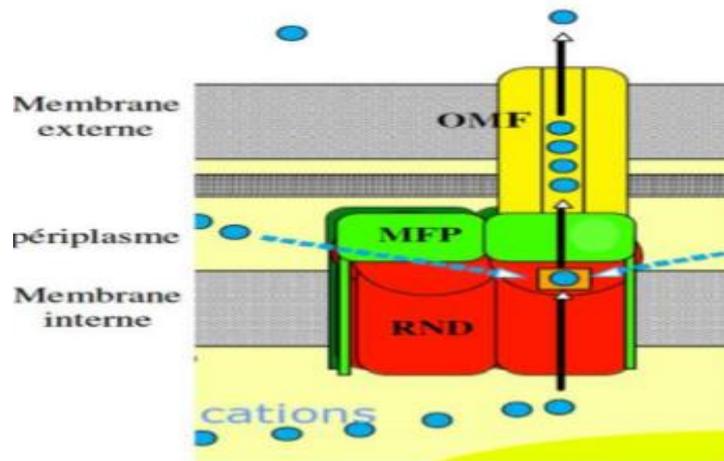


Figure 10 : Mécanisme modèle de fonctionnement des protéines RND (Nies, 2003).

2.2.3.2 Système CDF (Cation Diffusion Facilitators)

Les protéines « Cation Diffusion Facilitators » (CDF) forment une famille de transporteurs de métaux présents chez tous les règnes vivants. Elles sont constituées de systèmes composés d'une seule protéine formant un canal emprunté par les ions pour sortir de la cellule par simple diffusion. Les principaux substrats sont le Zn^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} et le Fe^{+2} . Leur transport se fait grâce à un gradient chimiosmotique (une différence de potentiel ou de pH) ou un gradient de potassium (Nies, 2003).

Les protéines CDF sont présentes dans tous les organismes vivants avec, par exemple, CzcD et CnrT chez *Cupriavidus metallidurans* (Nies, 1992), *MTP1* chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Desbrosses-Fonrouge et al., 2005) et *ZNT4* chez l'homme (Zalewski et Macphee., 2005).

En général, les ATPases de type P et les transporteurs CDF sont couramment trouvés parmi différentes espèces bactériennes, alors que la présence d'un transporteur RND est exceptionnel et indique une résistance élevée aux ions de métaux lourds (Nies, 2003). Les ATPases de type P et les transporteurs CDF exportent les ions métalliques du cytoplasme au périplasma; alors que les transporteurs RND détoxifient principalement le périplasma, c'est-à-dire que les transporteurs RND éliminent davantage les ions dans le périplasma qui sont

transportés par les ATPases ou les transporteurs CDF ou avant que les ions n'y soient entrés dans le cytoplasme (figure 11) (Scherer et *al.*, 2009).

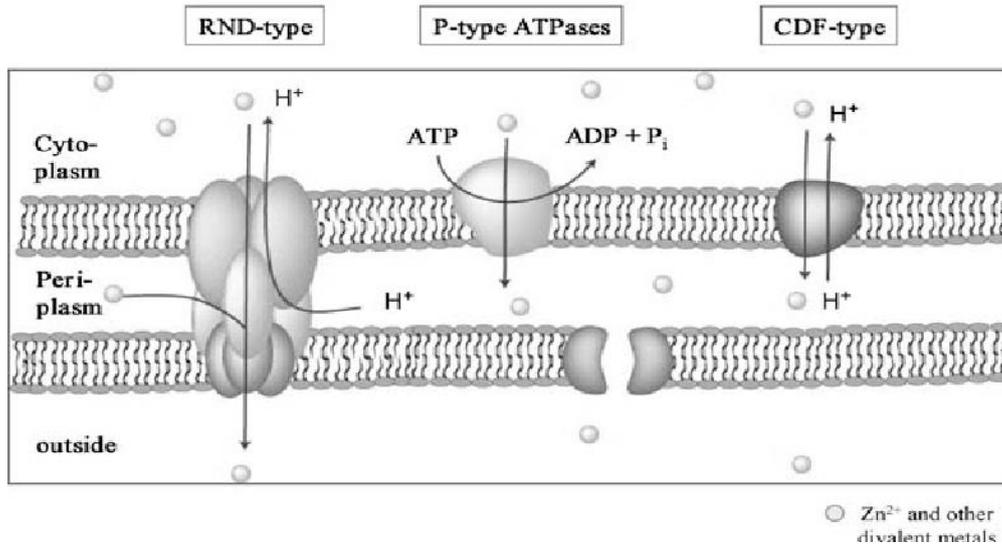


Figure 11: Interaction des transporteurs de différentes familles d'efflux de métaux dans la détoxification des métaux (Scherer et *al.*, 2009).

2.2.3.3 Protéines MFS (Major Facilitator Superfamily)

Les protéines MFS (Major Facilitator Superfamily) forment une vaste famille de transporteurs membranaires que l'on retrouve chez les bactéries, les archées et les eucaryotes (Saier et *al.*, 1999). Ce sont des protéines membranaires qui assurent l'importation et l'exportation de substrats spécifiques dans et hors des cellules. Elles sont impliquées dans le transport des sucres, des métabolites, des médicaments, des oligosaccharides et les ions essentielles (Yin et *al.*, 2006).

2.2.4 La conversion enzymatique

La conversion par des enzymes oxydo réductrices et métal-spécifiques consiste à transformer un cation métallique en un élément de niveau d'oxydation moins toxique, ou sous une forme soluble qui peut être efficacement éliminée par la cellule. En effet, pour éviter la réoxydation des composés métalliques réduits, les métaux doivent pouvoir diffuser à l'extérieur de la cellule grâce à un système d'efflux (Silver et Phung, 1996). Par exemple La réduction du chrome hexavalent (chromate) en chrome trivalent moins toxique par la chromate réductase de *Pseudomonas putida PRS2000* (Guo et al, 1990).

3- Bactéries métalloresistantes

3.1 *Cupriavidus metallidurans* CH34

La bactérie *Cupriavidus metallidurans* CH34 gram négatif a été isolée en 1976 par Christian Houba dans les sols Métallurgie.

C. metallidurans CH34 est considérée comme une bactérie spécialisée dans la résistance aux métaux lourds car elle en contient quasiment la plus part des mécanismes décrits à ce jour. De nombreux gènes de résistance parmi les plus importants ont d'ailleurs été décrits pour la première fois chez CH34 (*czc*, *cnr*, *ncc*, *chr*, *pbr*...) (Diels, 1985 ; Ledrich et al., 2005).

3.1.1 Résistance au Nickel (Ni) et au Cobalt (Co)

Les ions Ni(II) et Co(II) utilisent des transporteurs identiques pour entrer et sortir de la cellule. Leur expulsion nécessite la présence d'un système d'efflux chimioosmotique à antiport cation/proton (RND) leurs résistances est modulé par les déterminants *cnr* (Tibazarwa et al., 2000).

3.1.2 Résistance au Mercure (Hg)

Les ions mercuriques sont extrêmement toxiques pour les bactéries à cause de leurs interactions avec les groupes thiol (-SH) des protéines. Un mécanisme complexe de résistance, bien conservé chez les bactéries et codé en majorité par des gènes portés par des éléments génétiques mobiles (Silver et Phung, 1996). La résistance au mercure est codé par le gène « *mer* ».

3.1.3 Résistance au Cuivre (Cu)

La résistance au cuivre chez *C. metallidurans* CH34, ce faite par le système d'efflux ATPases, codé par le gène *copA* est localisée sur le chromosome de *C. metallidurans* CH34, les gènes *agr* et *cus* respectivement identifiés sur le chromosome et le méga plasmide de CH34 codé pour le système RND (Nies, 2000).

3.1.4 Résistance au Zinc (Zn)

Le système de résistance RND impliqué dans la résistance aux ions Zn, la région *czc* portée par le plasmide pMOL30 de *C. metallidurans* CH34 codé pour cette résistance (Nies, 2000).

3.1.5 Résistance au Plomb (Pb)

Le mécanisme de résistance nécessite l'importation, l'extrusion et la séquestration du métal l'opéron *pbr* de *C. metallidurans* CH34 localisé sur le plasmide PMOL30 est le seul à avoir été caractérisé chez les bactéries (Borremans et al., 2001). La résistance au plomb est basée sur l'import, la séquestration et l'expulsion du métal (figure 13). La protéine responsable de l'éjection de Pb(II) est une ATPase de type P similaire à celle expulsant le cadmium (Monchy et al., 2007).

La résistance au Pb(II) (figure13) implique le passage des ions Pb(II) du périplasma vers le cytoplasme grâce à PbrT. Au niveau intracellulaires, les cations Pb(II) dépriment le promoteur *pbrA* ce qui provoque l'expression des gènes de structure *pbrABCD*. PbrA expulse alors les cations Pb(II) du cytoplasme, moyennant un apport en énergie sous la forme de l'hydrolyse de l'ATP (Borremans et al., 2001).

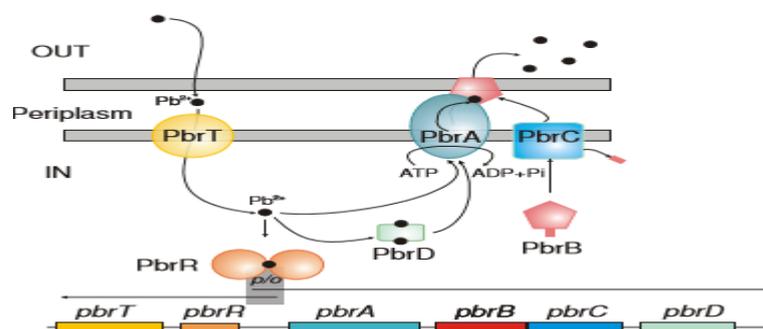


Figure 12: Modèle de mécanisme de résistance au Pb(II) chez *C. metallidurans* CH34 (Borremans et al., 2001).

3.2 *Pseudomonas putida*

Pseudomonas putida est une bactérie du sol gram négatif, saprophyte et ubiquitaire, son génome code pour une tolérance aux métaux lourds (David et al ., 2003).

3.2.1 Résistance au Cuivre (Cu) et au Zinc (Zn)

La résistance au cuivre et le zinc par la bioaccumulation (la séquestration extracellulaire) est par les par la synthèse des métallothionéines à faible poids moléculaire, riches en cystéines. Les gènes qui code pour ce système restent inconnus (Cánovas et al ., 2003).

3.2.2 Résistance à l'Arsenic (As)

La résistance par le système d'efflux active les gènes codés pour la résistance à l'arsenic portés sur l'opéron *arsRBCH* qui se trouvent sur le chromosome (Cánovas et al ., 2003).

3.2.3 Résistance au Cadmium (Cd)

La résistance au cadmium ce fait par les systèmes d'efflux ATPases, et les opérons localisée sur le chromosome, les systèmes. RND, CDF, ABC sont impliquée dans la résistance au cadmium mais les gènes sont inconnus (Cánovas et al ., 2003).

3.3 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est une bactérie du sol a gram positif qui représente une forte tolérance aux métaux lourds, parmi c'est dernier on a l'Arsenic(As), le Plomb(Pb), le Crome(Cr), et le Zinc(Zn).

Bacillus cereus utilise des mécanismes, notamment des pompes à efflux, une accumulation intracellulaire et extracellulaire en parallèle afin de maintenir les niveaux de métaux en dessous d'un seuil toxique et de surmonter les effets des concentrations élevées.

L'adsorption extracellulaire dans la membrane agit comme une première défense contre la toxicité des métaux grâce à la présence des groupements fonctionnelles produisant des changements dans la morphologie cellulaire (Ayangbenro et Babalola.,2020).

***MATERIEL ET
METHODES***

III : MATERIEL ET METHODES

Après consultation de nombreuses publications et ouvrages scientifiques, portants sur la résistance bactérienne aux métaux lourds, nous avons retenu les principaux gènes connus chez *Cupriavidus metalidurans* et *Pseudomonas putida* (Cánovas et al.,2003 ; Janssen J et al., 2010).

Ces publication reportées sur NCBI (National Center for Biotechnologie Information) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) intitulé < *Heavy metal tolerance and metal homeostasis in Pseudomonas putida*>,< *The Complete Genome Sequence of Cupriavidus metallidurans*> et < *Analyse génomique de Bacillus cereus* > (Cánovas et al.,2003 ; Janssen J et al., 2010 ; Ayangbenro et al.,2020).

1- Données biologiques

Notre travail s'est réalisé avec trois espèces bactériennes et les gènes impliqués dans leur résistance aux métaux lourds.

1.1 Espèces bactériennes

- *Cupriavidus metalidurans* isolat **NDB4NOL1** : est une bactérie Gram négative , *aérobie-anaérobie facultative*, appartient au Protéobactéries , Bêtaprotéobactéries ,Burkholderiales ,Burkholderiacées ,*Cupriavidus*. Adaptée pour survivre dans des conditions extrêmement pollués aux métaux lourds . Elle n'est pas pathogène, elle est utilisée pour l'assainissement des sols (Janssen J et al., 2010).
- *Pseudomonas putida* **NBRC14164** : est une bactérie Gram négative appartient au *Proteobacteria*, *Gammaproteobacteri*, *Pseudomonadales*, *Pseudomonadaceae*, *Pseudomonas*. Elle est métaboliquement polyvalente, aérobie (Kampers et al.,2021).
- *Bacillus cereus* **NWUAB01** : est une bactérie Gram positive appartient au *Firmicutes*, *Bacilli*, *Bacillales*, *Bacillaceae*, *Bacillus*. C'est un grand bacille en forme de bâtonnet, retrouvé de manière ubiquitaire dans le sol, est fréquemment responsable d'intoxications alimentaires (Ayangbenro et al.,2020)

1.2 Gènes étudiés

Nous avons exécuté notre analyse bioinformatique avec deux gènes :

- *cadA* : impliqué dans la translocation du Cadmium(Cd).
- *czcA* : impliqué dans la translocation du Cobalt (Co),du Zinc (Zn) et du Cadmium(Cd).

Les numéros d'accèsion des gènes sont dans les tableaux 4 et 5.

Tableau 4 : Numéros d'accèsion des gènes *cadA* et *czcA* chez *Cupriavidus metallidurans* isolat *NDB4NOLI*

<i>Cupriavidus metallidurans</i> isolat <i>NDB4NOLI</i>	
Gènes	Numéro d'accèsion
<i>cadA</i>	60824536
<i>czcA</i>	60820444

Tableau 5 : Numéros d'accèsion des gènes *cadA* et *czcA* chez *Pseudomonas putida* *NBRC14164*

<i>Pseudomonas putida</i> <i>NBRC14164</i>	
Gènes	Numéro d'accèsion
<i>cadA</i>	45523043
<i>czcA</i>	16136096

Au niveau du site internet NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), dans l'interface d'accueil nous avons saisi les mots clé comme suit : *cadA Cupriavidus metallidurans* ,*czcA Cupriavidus metallidurans* ,*cadA Pseudomonas putida* , *czcA Pseudomonas putida*, *cadA Bacillus cereus* , *czcA Bacillus cereus* .

NCBI (National Center for Biotechnology Information) est créé en 1988 par Bethesda dans le Maryland (USA), abrite une série de bases de données pertinentes pour la biotechnologie et les sciences médicales. Cette banque de données propose des ressources importantes, des outils et des services pour réaliser toutes les étapes d'analyses bioinformatiques (Misener et *al.*, 2000).

Les principales recherches et analyses exécutées en lieu sur le site web NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Concernant la recherche de similarités entre les séquences des deux gènes, nous avons exécuté les formats FASTA et l'outil BLAST.

2- Format FASTA

FASTA (Fast -Alignements) est un format de fichier texte utilisé pour stocker des séquences biologiques de nature nucléique ou protéique. Ces séquences sont représentées par une suite de lettres codant pour des acides nucléiques ou des acides aminés. Pour lire et traiter les séquences, nous avons choisi le format FASTA qui est le plus répandu et le plus simple.

Les fichiers FASTA sont très utilisés pour annoter les séquences en bio-informatique et sont requis par plusieurs programmes. Un fichier FASTA contient une ou plusieurs séquences, soit de nucléotides ou d'acides aminés. Chaque séquence est précédée d'une ligne débutant par le symbole(>) suivi d'un entête contenant normalement le nom de la séquence et les informations complémentaires qu'on veut y ajouter. Ensuite la séquence est écrite en entier sans aucune autre annotation. (Charlebois et *al.*, 2007) .

3- Recherche de similarités

La similarité est la présence d'un ensemble de positions identiques et conservatives des séquences, réalisées deux a deux en utilisant le logiciel BLAST.

3.1 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est un programme de recherche de similarité de séquences qui peut être utilisé via une interface Web ou comme outil autonome pour comparer la requête d'un utilisateur à une base de données de séquences. L'analyse repose sur des calculs matriciels ou des algorithmes complexes qui rendent les résultats sous forme de données statistiques, (score, identité % , e- value) (Altschul SF et *al.*, 1990).

3.1.1 Score

Le score d'alignement est calculé en attribuant une valeur à chaque paire de lettres alignées, puis en additionnant ces valeurs sur la longueur de l'alignement.

Les alignements de nucléotides chez BLAST utilise une récompense : +2 pour les paires alignées deux lettres identiques, et une pénalité de -3 pour chaque paire alignée non identiques. La création d'un écart dans un alignement entraîne une pénalité de « création d'écart », chaque extension d'un écart préexistant entraîne une pénalité moindre. Pour un traitement détaillé de la théorie de scoring d'alignement (Altschul et Gish., 1996).

3.1.2 Identité (%)

L'identité (%) est la mesure dans laquelle deux séquences (nucléotidiques ou d'acides aminés) ont les mêmes résidus aux mêmes positions dans un alignement, souvent exprimée en pourcentage (Fassler et *al.*, 2011) .

3.1.3 E- value

E- value est un paramètre qui décrit le nombre de résultats que l'on peut « s'attendre » à voir par hasard lors d'une recherche dans une base de données d'une taille particulière. Il diminue de façon exponentielle à mesure que le Score (S) de l'identité augmente. Plus la valeur E est faible, ou plus elle est proche de zéro, plus la correspondance est "significative" (Fassler et *al.*, 2011).

3.2 Modules BLAST

Avec l'outil BLAST, NCBI offre plusieurs modules d'applications en fonction de la nature des séquences biologiques. BLAST compare toutes les combinaisons de requêtes de nucléotides ou de protéines avec des bases de données de nucléotides ou de protéines qui sont (Altschul SF et *al.*, 1990) :

- Blastn : Compare une séquence nucléique d'intérêt aux séquences d'une base de données d'acides nucléiques.
- Blastp : Compare une séquence d'acides aminés d'intérêt aux séquences d'une base de données de protéines.
- Blastx : Compare une séquence nucléique d'intérêt traduite dans tous les cadres de lecture aux séquences d'une banque de données de protéines. Vous pourriez utiliser cette option pour trouver les produits de traduction d'une séquence nucléique inconnue.

- Tblastn : Compare une séquence d'acides aminés d'intérêt aux séquences d'une base de données d'acides nucléiques dont la traduction a été faite dans tous les cadres de lecture.
- Tblastx : Compare les traductions dans les six cadres de lectures d'une séquence nucléique d'intérêt aux séquences d'une base de données d'acides nucléiques traduites.

4- Arbre phylogénique

Un arbre phylogénique est un graphe non cyclique constitué de plusieurs nœuds qui sont les unités taxonomiques évolutives (OTUs : Operational Taxonomic Unit), c'est-à-dire les individus à partir desquels nous avons récolté les données sous forme phénotypiques, tels que les caractères biochimiques bactériens ou génotypiques comme les séquences d'un gène particulier. Ces nœuds sont reliés entre eux par des branches dont la signification est relative aux types de données utilisées pour remonter la phylogénie (Felsenstein.2004).

La construction de l'arbre phylogénique est basé sur le calcul de distances, obtenus à partir des calculs d'alignement par la méthode de Neighbor-joining (NJ).

Neighbor-joining (NJ) est une méthode phénétique de reconstruction d'arbres phylogénétiques. La méthode NJ est fondée sur l'exploitation de matrices de distances génétiques ou morphologiques comme toutes les méthodes phénétiques. Elle tient compte du biais des différences de vitesse d'évolution entre les différentes branches de l'arbre phylogénétique à reconstruire en essayant de conserver l'additivité des distances. Cette méthode fournit un arbre non enraciné et non ultramétrique. L'arbre obtenu ne reflète donc pas la similarité globale entre les différentes espèces, mais bien leurs relations de parenté. Utilisée généralement pour les arbres de données basés sur l'ADN ou les séquences de protéines. L'algorithme requiert la connaissance de la distance entre chaque paire d'OTU (Operational Taxonomic Unit) dans l'arbre à reconstruire. Ces distances peuvent être estimées par diverses méthodes mais leur additivité doit être respectée (distance de Manhattan par exemple, par contre une distance euclidienne ne convient pas) (Saito et Nie.,1987).

RESULTATS ET DISCUSSION

IV : RESULTATS ET DISCUSSION

1- *Cupriavidus metallidurans*

Les résultats obtenus lors de la recherche de la bactérie *Cupriavidus metallidurans* dans la base de données NCBI (tableau 6), révèlent plus de six-mille publications sur Gènes, presque soixante-six mille publications sur Protéines et quatre-vingt-sept publications dans les structures protéiques. Plus de Cent quatre-vingts publications dans PubMed, mille vingt publications dans Centrale PubMed et quarante bioprojets. La majorité de ces projets sont basés sur les capacités génétiques d'adaptation sur des milieux pollués aux métaux lourds pour des intérêts biotechnologiques environnementales tel que la dépollution des sols et des eaux (Top et al., 1995).

Tableau 6 : Résultat de recherche de *Cupriavidus metallidurans* sur NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=Cupriavidus%20metallidurans%20>)

Bases de données	Nombres de publications
Gènes	6 301
Livres	5
PubMed	187
PubMed Central	1 020
Protéines	65 412
Structures protéiques	87
BioProject	40

1.1 Gène *cadA*

Les résultats pour le gène *cadA* ont révélé qu'il est impliqué dans le codage des protéines ATPase de type P pour la translocation du Cadmium(Cd).

Le contexte et la région génomique du gène sont illustrés dans les figures 13 et 14.

Ces résultats (figure 13) montrent que le gène *cadA* est localisé sur la séquence NZ_FYAX01000032.1 entre NDB4MOL1_RS21095 (qui code pour les protéines hypothétiques) et le gène NDB4MOL1_RS21065 (qui code pour les protéines hypothétique). On distingue 4 variant des pseudos gènes : NDB4MOL1_RS21070, NDB4MOL1_RS21075, NDB4MOL1_RS21085, NDB4MOL1_RS21090.

La longueur de la séquence génomique NZ_FYAX01000032.1 est entre 7879 – 12551 kb.

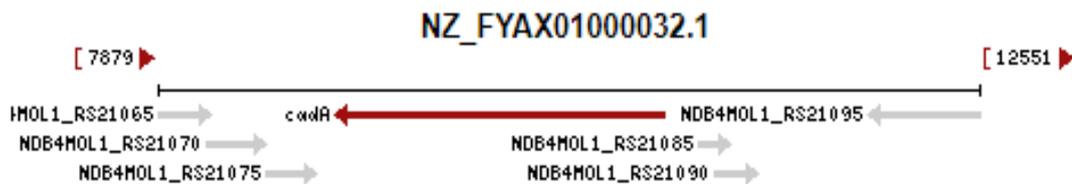


Figure 13 : Contexte génomique du gène *cadA* chez *C. metallidurans* isolat *NDB4NOLI*
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=CadA%20Cupriavidus%20metallidurans%20>

La figure 14 montre l'emplacement exact du gène, il est situé entre 8.6 - 11 kb et sa longueur est de 1.878 kb.

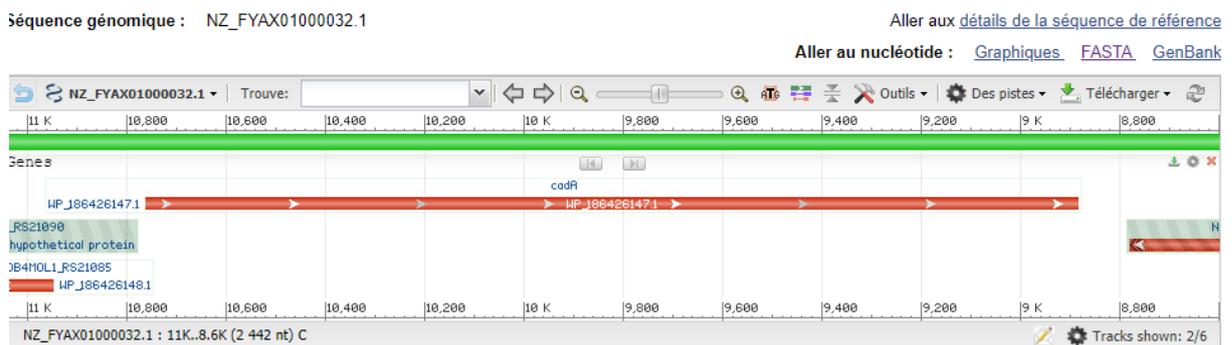


Figure 14 : Région génomique du gène *cadA* chez *C. metallidurans* isolat
NDB4NOLI

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=CadA%20Cupriavidus%20metallidurans%20>

Les résultats du fichier texte FASTA de la séquence nucléidique NZ-FYAX01000032.1 sont lustrés dans la figure 15 :

D'après la figure16, la séquence nucléique NZ_FYAX01000032.1 contient 8 883-10 760 nucléotides.

```

NCBI Reference Sequence: NZ_FYAX01000032.1
GenBank Graphics
>NZ_FYAX01000032.1:c10760-8883 Cupriavidus metallidurans isolate NDB4MOL1
shotgun sequence
ATGGAATCTACCCGACCGGGCGCGCCGCGCTACGGGGGCTTTGCCGCACTGATGTGCGGACATCGCTGGC
TCGAGGTGGGCAGAATTGCGCTGACCGGCGTGGTGGCGCTGCTCTACTGGCGCCAGTCCCTCTCGATCGC
CTGGCTATGGGCGGGCGGTTGCCATCGGCTCTATCCGCTAGTCAAGACCGGCCTGCGAGGACTTGGTCCAT
GAGCGCAAGATCGGCACAGAGATCTTCGTGACGATCGCGACGCTGATCGCGTTGCTCGGCGGGCAGACGG
TGGCGGGCGCCGTGCTGATGGTCACTTCTGATCGCCGAATTCATTGACAGACCTGAATACCGAGCGGGC
GCGTGCATCGATCAAGGCGCTGATCGGCGCCGTGCCCGCAGGTTGCGCTGGTGGCGGACGATAGTGGTGAG
CGGACAGTCCCAGTTGCCGAGGTCAGGCTGGCGACATCGTGTGGTGGCGCACCGGGCGAGAAGATTCCGG
TCGACGGCCAGGTCGAGGGTGGTCAAGGTTCCGGCGAACGAGGCGATCGATCACGGGCGAAAAGCTGCCCAA
GGATAAGCGCGAGGGCGATGAGGTCTTCGACAGGGACGCTGCTGGAGTCGGGCGCAC TGGATGTTGCGAGC
GTCGCGTGGGGCGGACACGACGTTCTCGCGCATCATCGCGATGGTGGAGGAGGC GGAGGCACATCAGG
CGCCGGTACAAAAGCTCGCCGACCGGGTCCGCCCTGGCTCATTCCAGTGGTCCCTCGTCTTCTGGTGGG
GGTCTACGTGGTCACGCGTGACGTGCGCATGATCGTCACTGCTGATCTTTACCTACCCGCGAACTT
GGCTCGCCACGCGCTGGTCAATGATCGCGGCGATTGCGCGTGGCGCGCTAGCGGCGATCCTGATCAAGG
GGGCTTTTACCTCGAACTCCTCGCGAGGGTCGATGTGATGGTGTTCGACAAGACCGGTACATTGACCGC
CAATCAGCCGCGAGGTCGTGCGAGCCAGGGCCTGGATCCGGCCATTCCC GAAAATGAGTTGCTGCGCTG
GCCGCCGCGCGGACCGCAGGTCGGCCATCCGCTGGCGCTGGCGGTGCTGGCCGCGGACGCAACCGGG
ACCTGGACTTTCCCGAGCCAGGGGAGTTTGAGCAGGTACAAGGGAGGGGCGTCAAGGCCCGCGTGGATGG
TCGCGCGGTATTGGTTGGCAACCGGGCGTTGCTCGAGGAAGCCGGGATTGGTGGTCTGCCAACCACCCG
CAAGATGCGGAGACAGCGGTCACGTCGCGATCGATGGCCGGCTCGCCGGCATCCTCTTATTGCTGACA
CGTGGCGCCGCGGCGCGCGGAGGCGCTCGAAGCCTTGGCAAGAGCGGCGTGGCGGCGGATTGCGATGTT
GACTGGCGACAACGTTGCCGCGGCGGAGGCGGTAGCCGCGGCGCTGCCGATCGACGAGGTGCGCGCGGAA
CTGCTTCTGCCGACAAAGTTGAGGCGATCACCAGTTCAGCGCCACGCGCGGGCGCGTGGCGATGGTCG
GGGATGGCGTCAATGATGCGCCGGCGCTGGCCCGGGCGGATGTGGGGATCGCCATGGGCGCACGGGGCAC
GCAGGCGGCTCTGGAGACCGCGGACGTGGCGCTCATGACGGACGACCTATCAAAGATCGCCGCGGACGCG
CGATCGCGCGCGGGCCTACCGGACCATTCAGGAGAAC TTGTTTGTGGCGTGGCGTGGTCCATGTGC
TTGGCATCACGGCGGCGCTCATGGGCTGGATCGGGCCGATTGAGGCTGCAATCCTGCACCTTGGCCCGA
CGTATTGGTGTTCGTTAACTCCGTCAAACCTGCTGCGGGTGGCGCATCGAGGGCACGTAA

```

Figure 15 : Le format FASTA de la séquence nucléotidique NZ_FYAX01000032.1

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_FYAX01000032.1?report=fasta&from=8883&to=10760&strand=true)

La recherche des régions de similitudes entre cette séquence et d'autres séquences par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sont illustrés dans le tableau 7

Les résultats de la recherche des régions similaires entre la séquence analysée et d'autres séquences (tableau 7) montrent que les deux séquences *Brenneria goodwinii souche FRB141*, *Sodalis glossinidius str* présentent le score le plus élevée (97.1- 82.2) avec E- value (1e-15^e) et une forte identité varié entre 89.47 et 88.24. Cela signifie la présence d'une positions identique et conservative entre les deux séquences et la séquence analysée.

Tableau 7: Alignements significatifs de la séquence [NZ_FYAX01000032.1](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Brenneria goodwinii strain FRB141, complete genome	Brenneria goodwinii	97.1	97.1	4%	5e-15	89.47%	5360730	CP014137.1
<input checked="" type="checkbox"/> Sodalis glossinidius str. 'morsitans' isolate B4 genome assembly, chromosome: SgGMMB4_chro...	Sodalis glossinidius str. 'morsi...	82.4	82.4	3%	1e-10	88.24%	4171874	LN854557.1
<input checked="" type="checkbox"/> Sodalis glossinidius str. 'morsitans' DNA, complete genome	Sodalis glossinidius str. 'morsi...	82.4	82.4	3%	1e-10	88.24%	4171146	AP008232.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhodobacter sp. CZR27 chromosome, complete genome	Rhodobacter sp. CZR27	69.4	69.4	4%	1e-06	82.14%	3335106	CP023548.1
<input checked="" type="checkbox"/> Rhizorhabdus dicambivorans strain Ndbn-20 plasmid p1, complete sequence	Rhizorhabdus dicambivorans	65.8	65.8	6%	1e-05	75.97%	163626	CP023450.1
<input checked="" type="checkbox"/> Sphingomonas sp. JJ-A5 plasmid pHSL4, complete sequence	Tardibacter chloracetimidivorans	65.8	65.8	6%	1e-05	75.97%	182640	CP018225.1

Avec les résultats du tableau 7 on va exécuter l'arbre de distance par la méthode de Neighbor-joining (NJ).

L'arbre phylogénique (figure 16) révèle que le gène *cadA* de la souche *Cupriavidus metallidurans* isolate *NDB4MOL1* présente une similarité avec *Brenneria goodwinii* strain *FRB141* et *Sodalis glossinidius* ce lien peut être dû à un transfert des gènes.

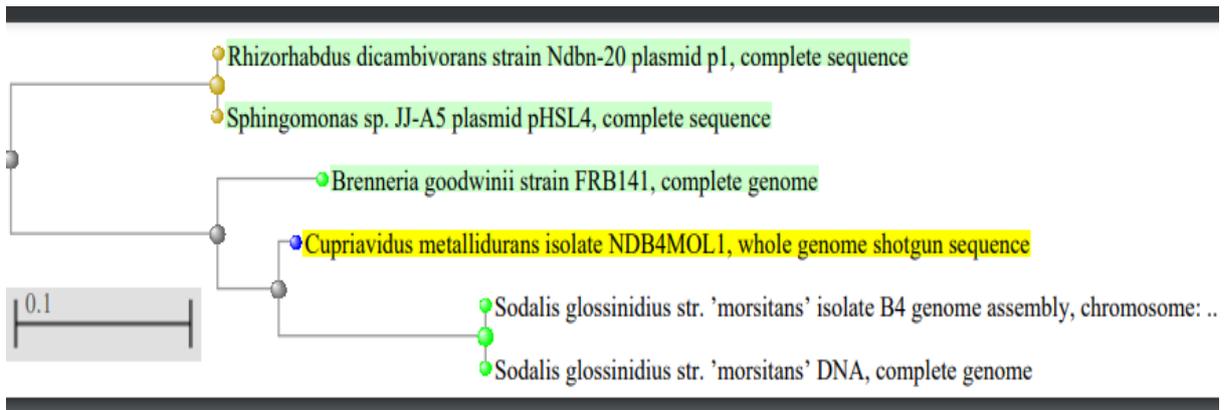


Figure 16 : Arbre phylogénique du gène *cadA* chez *C.metallidurans* isolate *NDB4MOL1* (couleur jaune pour la souche étudiée et couleur verte pour les bactéries pressantes un lien de parenté)

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi?request=page&blastRID=D3WABBK201N&queryID=ref|NZ_FYAX01000032.1|&entrezLim=&ex=&exl=&exh=&ns=100)

1.2 Gène *czcA*

Nous avons obtenu les résultats (tableau 8) qui résume les recherches pour les gènes *czcA* chez *C.metallidurans* isolate *NDB4MOL1*.

Ces résultats (tableau 8) révèlent que ce gène existe sous différente forme chez *C.metallidurans* isolate *NDB4MOL1*. Nous avons sélectionné le 1^{er} gène classé dans le tableau 8.

Tableau 8 : Résultats de recherche du gène *czcA* chez *C.metallidurans* isolate *NDB4MOL1* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=czcA%20cupriavidus%20metallidurans%20>)

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input checked="" type="checkbox"/> czcA ID: 60820444	heavy metal efflux RND transporter CzcA [<i>Cupriavidus metallidurans</i>]		NDB4MOL1_RS00230, NDB4MOL1_00052
<input type="checkbox"/> NDB4MOL1_RS28175 ID: 60825932	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter [<i>Cupriavidus metallidurans</i>]		NDB4MOL1_RS28175, NDB4MOL1_05616
<input type="checkbox"/> NDB4MOL1_RS21120 ID: 60824544	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter [<i>Cupriavidus metallidurans</i>]		NDB4MOL1_RS21120, NDB4MOL1_04191
<input type="checkbox"/> NDB4MOL1_RS30985 ID: 60826478	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter [<i>Cupriavidus metallidurans</i>]		NDB4MOL1_RS30985, NDB4MOL1_06168
<input type="checkbox"/> NDB4MOL1_RS30935 ID: 60826468	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter [<i>Cupriavidus metallidurans</i>]		NDB4MOL1_RS30935, NDB4MOL1_06158
<input type="checkbox"/> NDB4MOL1_RS20855 ID: 60824495	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter [<i>Cupriavidus metallidurans</i>]		NDB4MOL1_RS20855, NDB4MOL1_04142
<input type="checkbox"/> NDB4MOL1_RS19860 ID: 60824302	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter [<i>Cupriavidus metallidurans</i>]		NDB4MOL1_RS19860, NDB4MOL1_03945
<input type="checkbox"/> cnrA ID: 60825772	nickel efflux RND transporter permease subunit CnrA [<i>Cupriavidus metallidurans</i>]		NDB4MOL1_RS27335, NDB4MOL1_05455

Les résultats pour le gène *czcA* ont révélé qu'il est impliqué dans le codage des protéines RND (résistance-nodulation-division) pour la translocation du Cobalt(Co), du Zinc(Zn) et du Cadmium(Cd).

Le contexte et la région génomique du gène est illustré dans les figures 17,18.

Ces résultats (figure17) montrent que le gène *czcA* est localisé sur la séquence NZ_FYAX0100010.1 qui est de longueur de 3976 – 11700 kb, il est porté sur l'opérons *czc* entre le gène *czcC* (code pour le système d'efflux RND pour le transport des métaux lourds), le gène *czcR* (est un régulateur de réponse de système à deux composants pour l'homéostasie des métaux lourds). Et deux autres gènes qui sont : *czcB* (code pour le système RND) et le gène *NDB4MOL1_RS00225* (code pour le système CDF).

Cupriavidus metallidurans isolate NDB4MOL1, who

NCBI Reference Sequence: NZ_FYAX01000010.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NZ_FYAX01000010.1:c8847-5656 Cupriavidus metallidurans isolate NDB4MOL1, w
shotgun sequence
ATGTTTGAACGTATCATTAGTTTCGCCATCCAGCAGCGATGGCTGGTCCGCTCGCCGTGTTTGGAAATGG
CCGGGTTAGGGATTTTCAGCTACAACCGACTACCGATCGACGCGGTCCCTGACATTACCAACGTTCCAGGT
TCAGGTCAATACCTCGGCACCAGGCTATTACCGCTCGAAACCGAACAGCGTGTTACGTATCCGATCGAG
GTCGTGATGGCCGGCCTGCCGGGACTCGAACAGACGCGTTCCTGTCCCCTATGGCTTGTGCGAGGTGA
CGGTCATCTTCAAGGATGGCACGACGTCTATTCGCGCGCCAACCTCGTCAACCAGCGCATCCAGGAAGC
CAAGGACAATCTGCCTGAAGGCGTTGTGCCGGCGATGGGGCCTATTCGACCGGCCTCGGGGAGATCTAT
CTATGGACCGTTGAAGCCGAAGAGGGTGTCTGCAAAGCTGACGGGACTGCCTATACGCCGACAGATTTGC
GCGAAATCCAGGATTGGGTGGTACGGCCGCAACTGCGTAACGTGCCGGTGTACCCGAGATCAATACTAT
CGGTGGTTTCAACAAGCAGTACCTGGTCGCGCCGAGTCTTGAACGGCTAGCGTGTACGGGCTGACGCTG
ACCGACGTCGTCAATGCGCTGAACAAGAACAACGACACACGTGGGTGCGGGCTACATCGAGCGTAGGGGGC
AGCAGTATCTGGTTCGTGCGCCGGGTCAGGTTGCGTCCGAAGACGACATCCGCAACATTATTGTCCGTAC
AGCGCAGGGGACGCCGATCCGCATTGCGGACATCGGGGATGTGGAGATTGGCAAGGAAC TCGTACCGGT
GCGGCAACCGAGAATGGCAAGGAAGTTGTGCTGGGCACGGTATTATGCTCATCGGCGAAAAACAGCCGGG
CTGTGTCAAAAGCGGTGATGAAAAGGTCGCTTCCATTAACCGTACGATGCCGGAAGGTGTGAAGATCGT
AACGGTATACGACCCGGACACGTCTGGTCGACAAGGCCATTGCGACCGTCAAGAAGAACC TTCTGAAGGC
GCGGTGCTCGTCATCGTAATTCTGTTCC TTTTCTGGGTAAACATCCGCGCGGCGCTGAT TACCGCGACGA
TCATTCCGCTGGCGATGTTGTTACCTTACGCGGGATGGTGAAC TACAAGATCAGTGCGAACCTGATGAG
CTTGGGCGCGCTCGACTTCGGCATCATCATCGATGGCGCGGTGGT GATTGTGAAAACGTGTGAGGGCGA
CTGGCGCATGCGCAGGAACACCATGGCCGGCCATTGACGCGCTCCGAGCGGTTCCATGAGGTGTTTGGCG
CAGCGAAGGAGGCGCGTCCGCCACTGATCTTCGGTCAGTCATCATTATGATCGTCTACCTGCCGATCTT
TGCGCTGACGGGGGTGGAAGGCAAGATGTTCCACCCGATGGCGTTCACGGTGTCTTGGCGCTGCTGGGC
GCGATGATTCTGTCCGTGACGTTCCGTTCCGGTGCGGTGCCTTGTTCATCGGCGAACGGGTGGCCGAGA
AAGAAAATCGTCTCATGCTCTGGGCGAAGCGTCGCTACGAGCCGCTGCTGGAAAAGTCGCTCGCGAACAC
GGCCGTTGATTGACGTTTCCGCGGGTGTCAATTGTTCTGTGCGTGGCCATTGCGGGCCGCTGGGCGAGC
GAGTTCATCCCAATCTGAACGAAGGCGACATTGCCATCCAGGCGCTGCGCATTCTGGCACGAGCCTGT
CGCAGTCCGTGGAGATGCAGAAAGACGATCGAGACGACCTCAAGGCAAAATTCGCCGAAATCGAGCGCGT
GTTTGC GCGGACAGGTACGGCGGAGATTGCATCCGATCCGATGCCGCCGAATATTTGGATGGCTACATC
ATGCTCAAGCCTGAGAAGGATTGGCCAGAGCCGAAGAAAACACATGCCGAACTGCTGTCCGCCATCCAGG
```

Figure 19 : Format FASTA de la séquence nucléidique NZ_FYAX01000010.1

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_FYAX01000010.1?report=fasta&from=5656&to=8847&strand=true)

La recherche des régions de similitudes entre cette séquence et d'autres séquences par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sont illustré dans le tableau 9:

Tableau 9 : Alignements significatifs de la séquence NZ_FYAX0100010.1 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus gilardii strain FDAARGOS_639 chromosome 2, complete sequence	Cupriavidus gilardii	5895	5895	100%	0.0	100.00%	3485840	CP054626.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus oxalaticus strain T2 plasmid unnamed1, complete sequence	Cupriavidus oxalaticus	5895	9609	100%	0.0	100.00%	568815	CP032520.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus campinensis strain MJ1 plasmid unnamed1, complete sequence	Cupriavidus campine...	5895	5895	100%	0.0	100.00%	2786414	CP043441.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus metallidurans strain BS1 chromosome c2, complete sequence	Cupriavidus metallid...	5895	8437	100%	0.0	100.00%	2861767	CP037901.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus taiwanensis isolate Cupriavidus taiwanensis STM 6041 genome assembly, plasmid: II	Cupriavidus taiwane...	5895	5895	100%	0.0	100.00%	276139	LT984800.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus metallidurans strain Ni-2 chromosome, complete genome	Cupriavidus metallid...	5895	5895	100%	0.0	100.00%	6543877	CP026544.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus sp. USMAA2-4 plasmid unnamed1, complete sequence	Cupriavidus sp. USM...	5895	11791	100%	0.0	100.00%	544877	CP017750.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus nantongensis strain X1 chromosome 1, complete sequence	Cupriavidus nantong...	5895	5895	100%	0.0	100.00%	4619440	CP014844.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus basilensis strain DSM 11853 plasmid pRK1-3, complete sequence	Cupriavidus basilensis	5895	5895	100%	0.0	100.00%	125309	CP062807.1
<input checked="" type="checkbox"/> Ralstonia pickettii 12J chromosome 1, complete sequence	Ralstonia pickettii 12J	5895	5895	100%	0.0	100.00%	3942557	CP001068.1
<input checked="" type="checkbox"/> Alcaligenes sp. czc genes for CzcC, CzcB, CzcA and CzcD, complete cds	Alcaligenes sp.	5895	5895	100%	0.0	100.00%	7076	D67044.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus gilardii CR3 chromosome 1, complete sequence	Cupriavidus gilardii ...	5890	5890	100%	0.0	99.97%	3539530	CP010516.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus sp. ISTL7 chromosome 1	Cupriavidus sp. ISTL7	5888	5888	100%	0.0	99.97%	3539422	CP066227.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus metallidurans strain FDAARGOS_675 plasmid unnamed2	Cupriavidus metallid...	5884	5884	100%	0.0	99.94%	255356	CP046332.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cupriavidus metallidurans CH34 plasmid pMOL30, complete sequence	Cupriavidus metallid...	5884	5884	100%	0.0	99.94%	233720	CP000354.2
<input checked="" type="checkbox"/> Ralstonia metallidurans CH34 plasmid pMOL30	Cupriavidus metallid...	5884	5884	100%	0.0	99.94%	233755	X71400.2
<input checked="" type="checkbox"/> Uncultured beta proteobacterium clone MR-CH-12 heavy metal resistance protein (nccA) gene, complete...	uncultured beta prot...	5875	5875	100%	0.0	99.87%	3192	KR476581.1
<input checked="" type="checkbox"/> Ralstonia sp. CH34 czcN, czcI, czcB, czcA, czcD, czcR, and czcS genes	Cupriavidus metallid...	5862	5862	100%	0.0	99.81%	11300	X98451.1

Les résultats de la recherche des régions similaires entre la séquence analysée et d'autres séquences, montrent 100 séquences qui présentent une similarité avec la séquence analysée et le score le plus élevée chez 11 séquences est de 5895. Les 100 séquences présentent une E-valeur égale 0 avec une identité variée entre 75-100% qui signifie une forte présence des positions identique et conservative entre ces séquences est la séquence analysée (tableau 9).

Avec les résultats du tableau 9 on va exécuter l'arbre de distance par la méthode de Neighbor-joining (NJ).

Les résultats de la construction de l'arbre phylogénique montrent que le gène *czcA* présente une forte similarité avec le gène *czcA* des bêta protéobactéries (figure 20), ce résultat est attendu vu que la souche étudiée appartient à la famille des bêta protéobactéries .

Un lien de parenté entre *Cupriavidus metallidurans NDB4MOL1* et *Cupriavidus metallidurans CH34*, ce lien de parenté peut être dû à un transfert horizontal de gènes.

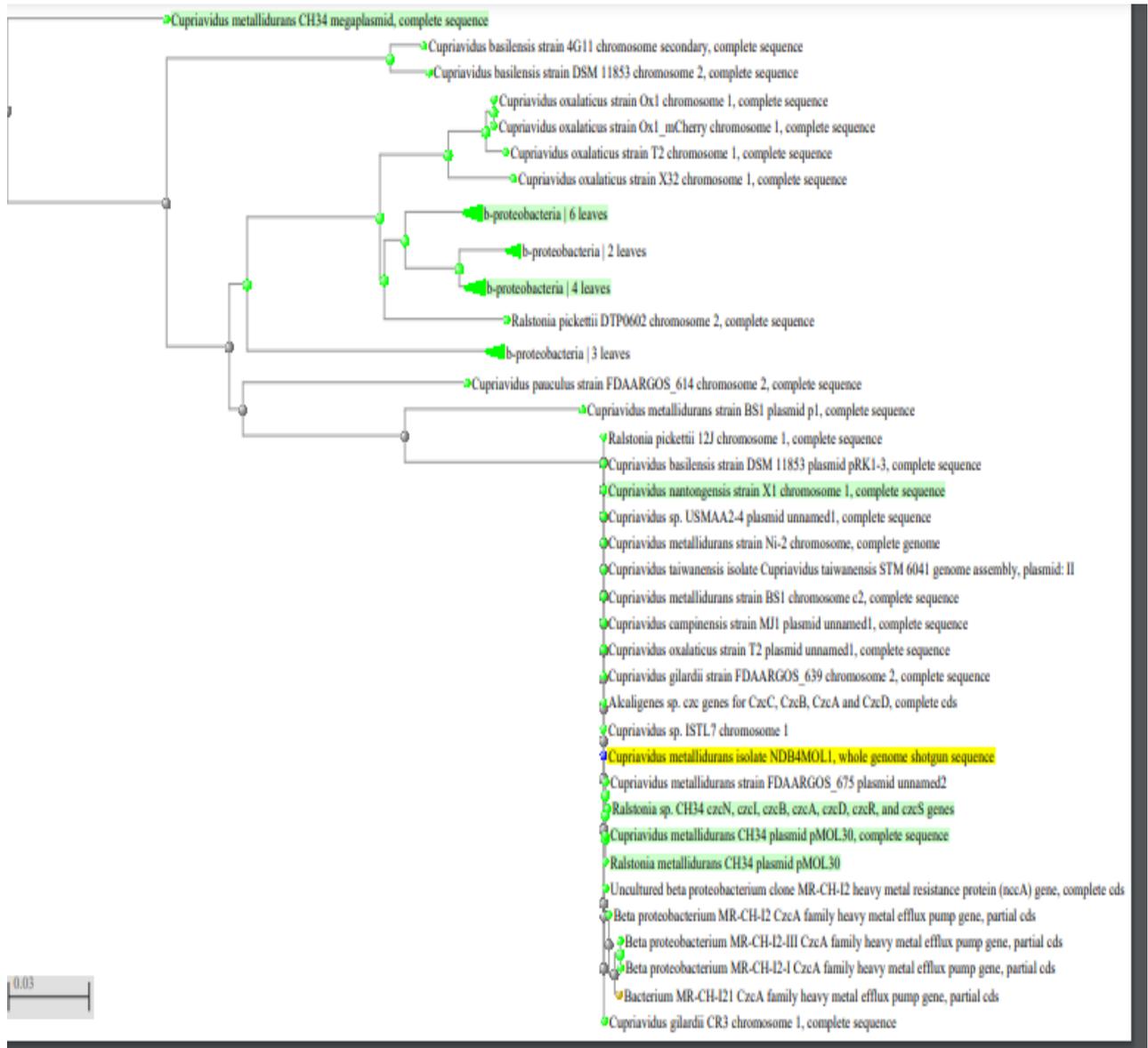


Figure 20 : Arbre phylogénique du gène *czcA* chez *C.metallidurans* isolate *NDB4MOL1* (couleur jaune pour la souche étudiée et couleur verte pour les bactéries pressant un lien de parenté)

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi?request=page&blastRID=D42MB09B013&queryID=ref|NZ_FYAX01000010.1&entrezLim=&ex=&exl=&exh=&ns=100)

2- *Pseudomonas putida*

Les résultats obtenus (tableau 10) de la recherche de cette bactérie sur la base de données NCBI révèle plus de huit mille publications sur Gènes, presque un million et demi de publications sur Protéines et huit cent dix structures protéiques, trente-cinq livres publiés pour cette bactérie, presque huit mille publications sur PubMed et plus de dix-neuf mille publications sur PubMed Central, et plus de cinq cent BioProject (grâce à sa capacité de multiresistance).

Tableau 10 : Résultat de recherche de *Pseudomonas putida* sur NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=Pseudomonas+putida>)

Bases de données	Nombres de publications
Gènes	8574
Livres	35
PubMed	7992
PubMed Central	19527
Protéines	1474508
Structures protéiques	810
BioProject	521

2.1 Gène *cadA*

Nous avons obtenu les résultats (tableau 11) qui résume les recherches pour les gènes *cadA* chez *Pseudomonas putida* NBRC 14164

Ces résultats (tableau 11) révèlent que ce gène existe sous différentes formes chez *Pseudomonas putida* NBRC 14164. Nous avons sélectionné le 3^{ème} gène classé dans le tableau 10.

Tableau 11: Résultats de recherche du gène *cadA* chez *P.putida* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=cadA%20Pseudomonas%20putida%20>)

Consulté le 24/06/2012

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input type="checkbox"/> cadA ID: 43865876	cadmium-translocating P-type ATPase [<i>Pseudomonas putida</i>] ⚠ discontinued		AW38_RS12120
<input type="checkbox"/> cadA ID: 12523096	heavy metal translocating P-type ATPase [<i>Pseudomonas putida BIRD-1</i>] ⚠ discontinued	NC_017530.1 (5517278..5519542, complement)	PPUBIRD1_4929
<input type="checkbox"/> cadA ID: 45523043	cadmium-translocating P-type ATPase [<i>Pseudomonas putida NBRC 14164</i>] ⚠ discontinued	NC_021505.1 (1747364..1749838, complement)	PP4_RS07710, PP4_15110
<input type="checkbox"/> cadA ID: 13339954	heavy metal translocating P-type ATPase [<i>Pseudomonas putida DOT-T1E</i>] ⚠ discontinued	NC_018220.1 (3079261..3081258, complement)	T1E_2820
<input type="checkbox"/> cadA ID: 1041698	cadmium-translocating P-type ATPase [<i>Pseudomonas putida KT2440</i>] ⚠ discontinued	NC_002947.4 (4845251..4847725)	PP_RS22125, PP_4261
<input type="checkbox"/> cadA ID: 2663504	hypothetical protein [<i>Bordetella bronchiseptica RB50</i>] ⚠ discontinued	NC_002927.3 (766922..768568)	BB0732
<input type="checkbox"/> PP4_RS26220 ID: 45526680	heavy metal translocating P-type ATPase [<i>Pseudomonas putida NBRC 14164</i>] ⚠ discontinued	NC_021505.1 (5894286..5896538, complement)	PP4_RS26220, PP4_52040

Les résultats pour le gène *cadA* ont révélé qu'il est impliqué dans le codage des protéines ATPase de type P pour la translocation du Cadmium(Cd).

Le contexte et la région génomique du gène sont illustrés dans les figures 21,22.

Les résultats (figure 21) montrent que le gène *cadA* est localisé sur la séquence NC_021505.1 qui est de longueur de 1745006 – 1751952 kb, on distingue 5 autres gènes sur cette séquence qui sont :

- *ccoG* qui code pour une protéine accessoire de cytochrome c oxydase qui intervient dans la respiration cellulaire.

- PP4_RS07715 qui code pour les protéines de la famille FixH pour la fixation de l'azote.

- PP4_RS07700 qui code pour les protéines exportateurs de sulfites de la famille TauE/SafE.
- hemN qui code pour les protéines Oxygen-independent coproporphyrinogen III oxydase impliqué dans la biosynthèse de l'hème servant à accueillir le dioxygène (O₂).
- ccoS qui code pour une protéine d'assemblage de cytochrome oxydase de type cbb3 qui intervient dans la respiration cellulaire.

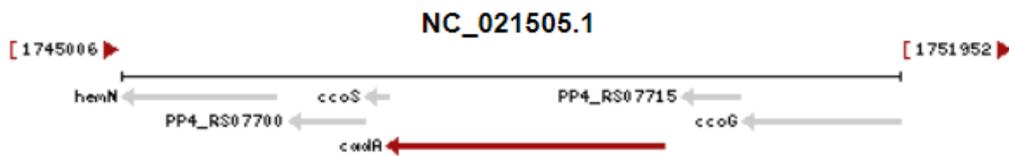


Figure 21 : contexte génomique du gène *cadA* chez *P.putida* NBRC 14164
[\(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/45523043>\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/45523043)

La figure 22 montre l'emplacement exact du gène, il est situé entre 1.7- 1.8 kb et sa longueur est de 2.475 kb.

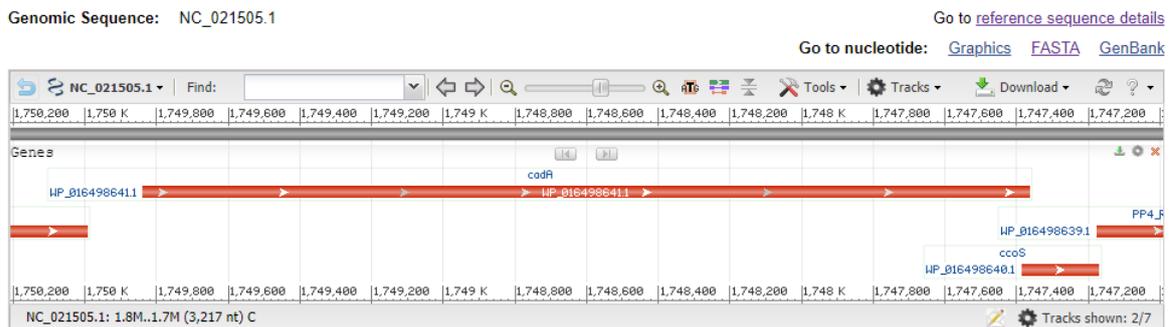


Figure 22 : Région génomique du gène *cadA* chez *P.putida* NBRC 14164
[\(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/45523043>\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/45523043)

Le rapport FASTA (Fast-Alignements) de la séquence nucléique NC_021505.1 est illustré dans la figure 23 :

D'après la figure 23, la séquence nucléique NC_021505.1 contient 1747364- 1749838 nucléotides.

Pseudomonas putida NBRC 14164, complete sequence

```
NCBI Reference Sequence: NC_021505.1
GenBank Graphics
>NC_021505.1:c1749838-1747364 Pseudomonas putida NBRC 14164, complete sequence
ATGACCCAGCCACCCCTGCTACCACTGCGCCCTGCCCCGTCCCCGCGGCAGCCGCTTTAACGCCGTGG
TCCTCGGCGAGCCCCGGCAGTTCTGCTGCCCGGGCTGCCAGGCGGTGGCCGAGTCGATCGTCGCCGTGG
CCTGGAGCACTACTACAGCACCAGTGCACAAAGCGCCAACCCCGAGGCCCTGCCAGGCAGTTGCAA
GACGAACTGGCCCTGTACGACCCGACGCGACGTGCAGCAAACCTTCGTCCGCCACCAGGGCGAGCTGGCCG
AAACTACCTGCTGGTGAAGGACATCAGCTGCGCCGCTGCGGGCTGGCTGATCGAGAAGCACCTGCGCAA
CCTGCCCGGGCTCGCCGAGGCGCGCCTTAACCTGTCCAACCACCGCCTGCTGCTGAGCTGGGACGACAAG
CAACTGCGCTGTACACCTGCTCGCCGAGTTGCGCCAGATCGGTTACGCCGCCACCCCTACCAGCCCG
ACAAGGCGCCGAGCAACTGGCCCAAGAGAACCGTAGCGCTTTGCGCCGCTGGGCGTGGCCGGGCTGCT
GTGGTTCCAGGCGATGATGGCGACCATGGCCACCTGGCCGGAATTAACATCGACCTGTACCCGAACTG
CACACCATCTGCGCTGGGTGGCCCTGTTCTGACCATCCCATCGTCTTCTACAGCTGCGCGCCGTTCT
TCAAAGGCGCAGCACGCGACCTGCGCACACGCCACC TGACCATGGACGTTTCGGTGTGCTGGCCATCGC
CCTGGCTTCGCGCCCGGCATCTGGACCGCGATCACCGGACGCGGTGAGCTGTATTTGACACCCGTGGG
ATGTGCGCCCTGTTCTGCTCACCGCCGCTACCTGGAGCGCCGTGCCCGCGAACGACGGCTGCGGCCA
CCGCGCAGCTGGTCAACTGCTGCCCGGCTCGTGCC TGCGCCTGGACGCCCTTGGCCGACGCGAGCGCAT
TCTGCTCAGCGAGCTGCACTGCGGTGACACGGTGCAGGGTGTGCCCGGCGCGTTATCCCCGCCGACGGG
CGCATCGTGAAGGCGCGCTCCAGCATCGACGAGTGCCTGCTGACCGGCGAATACCTGCCGCAACCGCGCC
GCGTGGGCGAGCGGGTCAACCGCGGTACGCTGAATGTGAAAGCACCCCTGAAAGTGGAAAGTGAAGCCCT
GGGCCAAGATTGCGGGCTTCGCGCCATCGTCCGCTGCTGGAACGCGCCAGACCGAAAAACCGCGCCTG
GCCGAAATCGCCGACCGGGCCCTCGCAGTGGTTTCTGCTGTTCTGCTGGTGGCTGCCGTGGCCATCGGCC
TGTGGTGGTGGTACCTGGACCTGACGCGGGCTTCTGGATCGTGTGGCCATGCTGGTAGCCACCTGCC
CTGCGCGCTGTCCCTGGCCACGCTACGGCAC TGAC TGCCGCCACCGGCCACCTTGCAACAAGTGGGCTG
CTGATAACCCGCGGCATGTCTCGAAGGCTCAACAGATCGACACCGTAATCTTCGACAAAACCGGCA
CATTGACCGAAGGCCGCTGACTTTGCGCAGCATCCGCCGCTCGGCGAGCGTACC CGCTGACCGCTGCC
GGCCCTGGCCGCGCCCTGGAAAACCGCTCCGAAACACCCCATCGCCCGCGCATTGCGCCGTAACGCGATA
CCCGCCGACGATGTACAGACCGTGCAGGCCCTGGGCTGGAAGGACTGGTTCGACGGCCAAACGCTGCGTA
TCGGCCAGGCCACCTTCGTGTCGCCCTGAGCGGTGCGGAAATCCCCGGCGTGCAGAGCCCGCGGCCA
GTGGCTGCTACTGGGTGACCGCCAGGGGCCGCTGGCCTGGTTTGGCTGGACGACCGCCTGCGCGAGGAA
GCCCGGCCCTGCTGCGCCCTGCAAGGCGCGAGGC TGCGCACGCTGCTGCTGTCGGGCGACAGTTCGC
CGATGGTTCGCGAAGTGGCCGCGCAACTGGGTATCGACAGGCCATTGGTGGCTGCGCCCGGACGACAA
GCTGGACCGGCTGAAGGCGCTGCAGGGCGCCGGGCGCAAGGTGCTGATGCTCGGCGACGGGTCAACGAC
GTGCGAGTGTGGCCGCGCCGACATCAGCATCGCCATGGGCGAGCGCCACCGACCTTGCCAAAGACAGCG
CCGACCGCTGCTGTGTCCAACCGCTTGAAGCCCTGGTGCAGGCCCTTCGACCTGGCCCGCCGCGCACCCG
CCGCAACATCTCGAGAACCTGCTGTGGGCCACCCGTGATAATGGCCTGATGTTGCCGTTTGGCCGCGTC
GGCTGGATCACCCGGTGTGGGCGGCCATCGGCATGTCGGT CAGCTCGTGTGCTGCTGGTGTGCTCAATGCC
TGCGCTGACCCGCGATGCCGCTGGTATCGGGCTTGGCGAAAACCGAAGCACCCCTTGGCCGGGAGGAAGT
GCCATGCCCCGCTCTATGTCATGA
```

Figure 23 : Format FASTA de la séquence nucléotidique NC_021505.1

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_021505.1?report=fasta&from=1747364&to=1749838&strand=true)

La recherche des régions de similitudes entre cette séquence et d'autres séquences par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sont illustré dans le tableau 12.

Après analyse BLAST, les résultats montrent que plusieurs séquences présentent une similarité avec la séquence analysée, *Comamonas sp. souche XL8* représente le score le plus élevé qui est de 4554 et un pourcentage d'identité de 99.88% et une valeur de E valu qui est de 0.0 cela indique une forte identité (tableau 12).

Tableau 12: Alignements significatifs de la séquence NC_021505.1 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida NBRC 14164 DNA, complete genome	Pseudomonas putida NBRC 14164	4571	4571	100%	0.0	100.00%	6156701	AP013070.1
<input checked="" type="checkbox"/> Comamonas sp. strain XL8 cadmium-translocating P-type ATPase mRNA, complete cds	Comamonas sp.	4554	4554	100%	0.0	99.88%	2475	MT783397.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain JQ581 chromosome, complete genome	Pseudomonas putida	4421	4421	100%	0.0	98.91%	6656695	CP050951.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida S13.1.2, complete genome	Pseudomonas putida S13.1.2	4050	4050	100%	0.0	96.20%	6621848	CP010979.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain B1 chromosome, complete genome	Pseudomonas putida	3740	3740	100%	0.0	93.94%	6368486	CP022560.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida H8234, complete genome	Pseudomonas putida H8234	3729	3729	100%	0.0	93.86%	6870827	CP005976.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain ZXPA-20 chromosome, complete genome	Pseudomonas putida	3712	3712	100%	0.0	93.74%	6511858	CP061723.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida DNA, complete genome, strain: KF715	Pseudomonas putida	3701	3701	100%	0.0	93.66%	6583377	AP015029.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. FGI182, complete genome	Pseudomonas sp. FGI182	3535	3535	100%	0.0	92.45%	5891312	CP007012.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. DRA525 genome	Pseudomonas putida	3513	3513	100%	0.0	92.29%	6267580	CP018743.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. LTGT-11-2Z chromosome, complete genome	Pseudomonas sp. LTGT-11-2Z	3480	3480	100%	0.0	92.04%	6073276	CP033104.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas monteilii strain B5 chromosome, complete genome	Pseudomonas monteilii	3480	3480	100%	0.0	92.04%	5948598	CP022562.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas asiatica strain C1 chromosome, complete genome	Pseudomonas asiatica	3474	3474	100%	0.0	92.00%	5698558	CP061335.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain SWMUB4 chromosome, complete genome	Pseudomonas putida	3469	3469	100%	0.0	91.96%	5824126	CP063456.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas asiatica strain C3 chromosome, complete genome	Pseudomonas asiatica	3463	3463	100%	0.0	91.92%	5581518	CP061848.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. 13159349 chromosome, complete genome	Pseudomonas sp. 13159349	3458	3458	100%	0.0	91.88%	5977292	CP045553.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain PP112420, complete genome	Pseudomonas putida	3452	3452	100%	0.0	91.85%	6031212	CP017073.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida HB3267, complete genome	Pseudomonas putida HB3267	3452	3452	100%	0.0	91.84%	5875750	CP003738.1

Avec les résultats du tableau 12 on va exécuter l'arbre de distance par la méthode de Neighbor-joining (NJ).

L'arbre phylogénique (figure 24) révèle que le gène *cadA* de la souche *Pseudomonas putida NBRC 14164* présente une similarité avec d'autres souche de *Pseudomonas* cela peut être dus à la capacité de *Pseudomonas* a s'adapté aux milieux extrêmes, et nous avons remarqué aussi qu'il y a un lien de parenté entre *Pseudomonas putida NBRC 14164* et *Comamonas sp. souche XL8*, ce lien de parenté peut être dû à un transfert de gène entre *Pseudomonas putida NBRC 14164* et *Comamonas sp. souche XL8* .

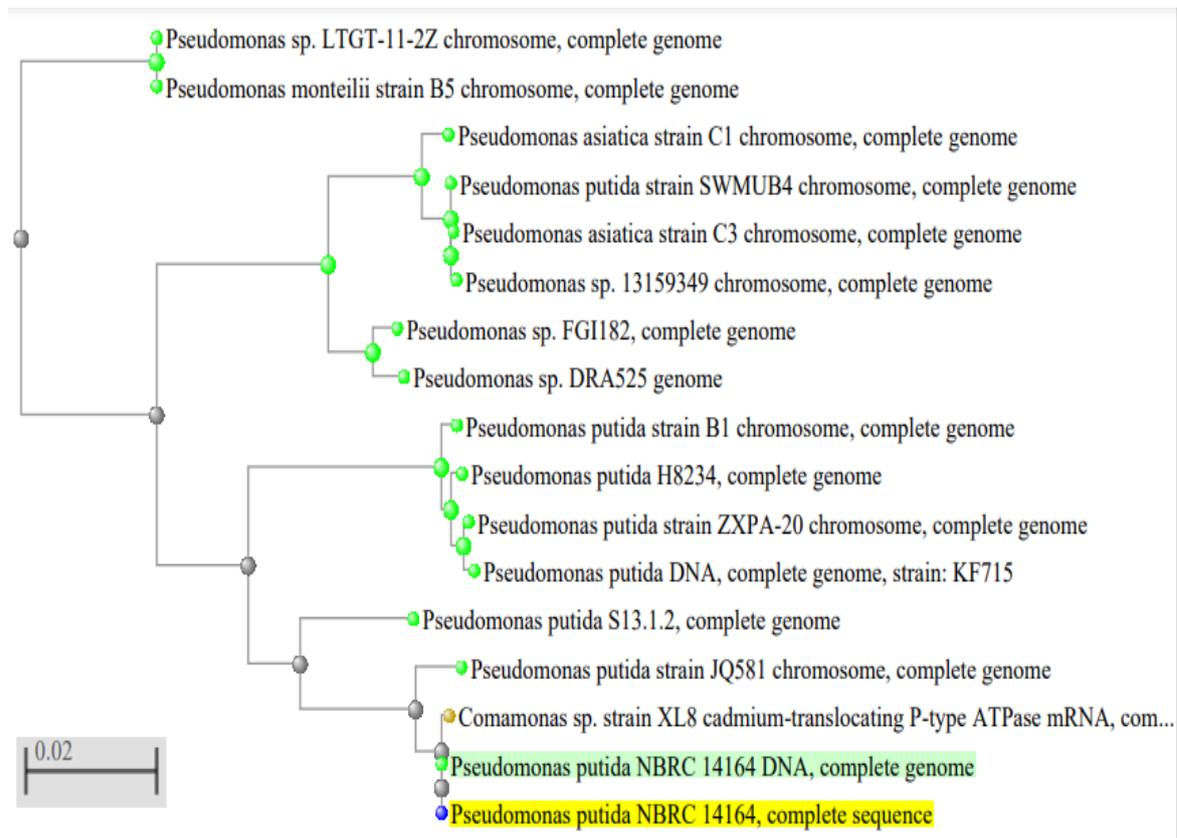


Figure 24 : Arbre phylogénique du gène *cadA* chez *P.putida* NBRC 14164 (couleur jaune pour la souche étudiée et couleur verte pour les bactéries pressantes un lien de parenté)

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi?request=page&blastRID=DBDM TYZA013&queryID=ref|NC_021505.1|&entrezLim=&ex=&exl=&exh=&ns=100)

2.2 Gène *czcA*

Nous avons obtenu les résultats (tableau13) qui résume la recherche pour les gènes *czcA* chez *Pseudomonas putida* NBRC 14164

Ces résultats (tableau13) révèlent que ce gène existe sous différente forme chez *Pseudomonas putida* NBRC 14164 et la majorité de ces gènes sont incomplets . Nous avons sélectionné le premier gène classé dans le tableau 13.

Tableau 13 : Résultats de recherche du gène *czcA* chez *P.putida* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=czcA%20Pseudomonas%20putida>) consulté le 24/06/2021.

Name/Gene ID	Description	Location	Aliases
<input type="checkbox"/> czcA ID: 16136096	heavy metal resistance protein CzcA [<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164] ⚠ discontinued	NC_021505.1 (3870051..3873197, complement)	PP4_34040
<input type="checkbox"/> czcA ID: 16133794	heavy metal resistance protein CzcA [<i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164] ⚠ discontinued	NC_021505.1 (37078..40239, complement)	PP4_00340
<input type="checkbox"/> czcA ID: 13343635	Cation efflux system protein czcA [<i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E] ⚠ discontinued	NC_018220.1 (5127041..5130202, complement)	T1E_4694
<input type="checkbox"/> AYO28_RS19875 ID: 31686443	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter [<i>Pseudomonas putida</i>] ⚠ discontinued		AYO28_RS19875, AYO28_24995
<input type="checkbox"/> AW38_RS26220 ID: 43868649	CusA/CzcA family heavy metal efflux RND transporter [<i>Pseudomonas putida</i>] ⚠ discontinued		AW38_RS26220

Les résultats de ce gène révèlent qu'il est impliqué dans le codage des protéines de système d'efflux RND impliqué dans la translocation du Cobalt (Co), du Zinc (Zn) et du Cadmium (Cd).

Nous n'avons pas pu obtenir le contexte génomique de ce gène car tous les enregistrements Gènes pour ce génome ont été interrompus (arrêté le 3 février 2015) en raison d'un changement de portée pour les génomes procaryotes dans Gene.

Au moment où cet enregistrement génétique a été interrompu, nous avons obtenu la région génomique de ce gène (figure 25).

Selon la figure 25 nous avons pu déduire que ce gène est porté sur la séquence génomique NC_021505.1, il est situé entre 3,870- 3,873kb et sa longueur est de 3 147 kb.

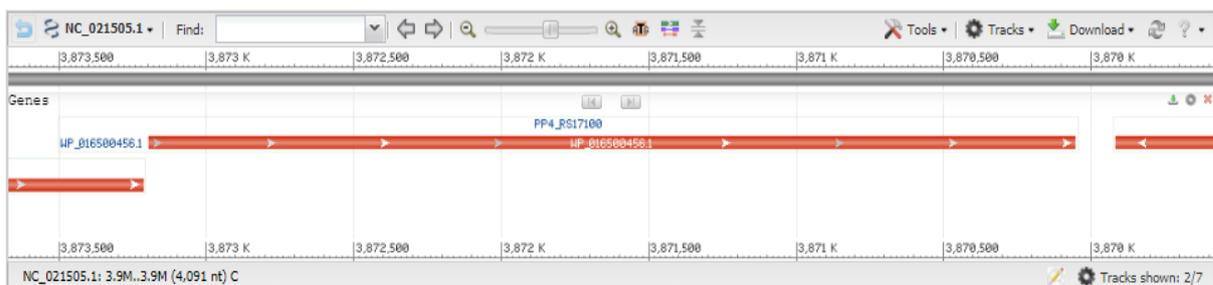


Figure 25: Région génomique du gène *czcA* chez *P.putida* NBRC 14164 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/16136096>)

Le rapport FASTA (Fast-Alignements) de la séquence nucléique NC_021505.1 est illustré dans la figure 26 :

D'après la figure 26, la séquence nucléique NC_021505.1 contient 3870051 – 3873197 nucléotides.

Pseudomonas putida NBRC 14164, complete sequence

NCBI Reference Sequence: NC_021505.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

>NC_021505.1:c3873197-3870051 Pseudomonas putida NBRC 14164, complete sequence

```

ATGTTTCAACGCCTGATCCAATTTGCCATCGAGCAGCGCTGGTGGTGTGCTGGCCGTGGTCTGATGG
CCGCGGTGGGTATCCACAGCTACCAGAACTGCCGATCGACGCTGTACCGGACATCACCACGTCAGGT
GCAGATCAACACCGCCGCGCTGGCTACTCGCCGCTGGAGACCGAGCAGCGCATCACCTTCGCCATCGAG
ACCGCATGGCCGGCTGCCAGGGCTGAAGCAGACCGCTCGCTGTGCGGTCGGGCTGTCTCAGGTCA
CGGTGATTTTCGATGACGGCACCGACCTGTTCTCGCCCGCCAGTTGGTCAACGAGCGCTGCAAGTGGC
CCGTGAGCAATTGCCCGAAGGCATAGAAGCGGGCATGGGGCCGATCTCCACCGGGCTGGGCGAAATCTTC
CTGTGGACCGTGGAGGGCGAAAGGGCGCACTCAAGGAGGATGGCACCCCGTACACCCGTGACCGGACCTGC
GGGTGATCCAGGACTGGATCATCAAGCCGAGTTGCGCAATGTGCCGGGGTGGCCGAAGTGAACAGCAT
CGGTGGCCATGCCAAGCAGTACCTGATTGCACCGGAGCCCAAGCGGCTGGCGGCTATAAGCTCACCCCTC
AACGACCTGATCGCGGCCCTGGAGCGTAACAACGGTAACGTTGGCGCCGGTACATCGAACGCAATGGCG
AGCAGTTGCTGATCCGGGCACCGGGCCAGGTGACCTCGGCCGAAGCATCGCCAATATCGTCATTTCCAG
TGTGATGGCACCGCGATTCGCGCTCAGCCATGTGGCCGAGGTTGGCCCTGGGCGAAGAACTGCGCTCAGGC
GGGCCACCGAAGCGGTCCGGGAAGTGGTGGCTGGGCACGGTATTTCATGCTGGTTGGCGAGAAGCAGCCCA
CAGTGTCCAGGCCGTTGCCGCCAACTGGTGGAGATCAACCGCAACTGCCCAAGGGTGGTGGTGGTGGT
GACCGTGTATGACCGCACCAACTGGTGGAAAAGCCATCGCCACAGTGAAGAAGAACTGATCGAAGGC
GCGATTCGGTTCATCGCCGTGCTGTTCTGTTCTGGGCAACATCCGCGCCGCACTGATCACCGCATGG
TCATCCGCTGTGATGCTGTTTACCTTCACCGGCATGTTACGCAACAAAGTCAAGCGCCAACTGATGAG
CCTGGGGGCACTGGACTTTGGCATCATCGTCGACGGCGCGTGGTTATCGTGGAAAAGCCATCCGCCG
CTGGCCATGACAGCAACGCCACGGCCGATGCTGACCCGACGCGAGCGCTTCCATGAAAGTGTTCGCCG
CCGCCCGGAGGCGCGTCCGCCACTGATCTACGGGCAAGTTGATCATCATGGTGGTGTACCTGCCGATCCT
TGCCCTGACCGGGTTCGAGGGCAAGATGTTCCACCCCATGGCCCTTACCGTGGTTCATGGCCCTGCTCGG
GCCATGATCCTTTCGGTACGTTTCGTGCCGGCGGCCATCGCCCTGTTTCGTACCGGCAAGGTCAAGGAGG
AGGAAGGCCTGGTGTGCGCACGGCGCGTCAAGCGCTATGCCCGGTGCTGGCTGGTGGTGGTGGGCGGCG
CAAGCTGGCGTTTCCCGCCGCGGCTAGCTTGGTGGTGTGCTCCGGGGTTCATGGCCAGCCGATGGGACAG
GAGTTCATCCCGAGCTCAGCGAGGGCGACTTTCCTTGCAGGCGCTGCGCGTACCGGGTACCGAGCTGT
GCGAGTGGTGCAGATGCAAGCAGCGCTGGAGCAGCGATCATCGCCAGGTGCCGAAGTGGAGCGGT
GTTCCGCGTACCGGACTGCGAGATCGCTCCGACCCGATGCCACCGAATCTCCGACGCTATGTG
ATGTTGCGCCCGCGCAGCAGTGGGTAGACCCCGGCAAGCCGCGTGCAGAACTGATCGCCGAGGTACAAC
GTGCTGCCCGCCAGCGTGC CGGGCAGCAACCAAGAGCTGTGCGAGCCGATCCAGTTGCGCTTCAACGAGCT
GATTTCCGGGTGCGCAGCGATGTGGCGGTGAAGTTGTTGGTGGTGTGATGATGGATGTGCTCAACCGTACC
GCCGCGCAGATCGCCAGCAGCTGCAAGGGGTAGCGGGTGCCTCCGAGGTGAAGGTGAGCAGACCAAGCG
GCCTGCCGGTGTGACCATCGACATCGACCGCGGCAAGGGCGGCTCGCCATGGCCCTGAACGTGGGGCAGCT
GCAGGACGCGCATCGCCATTCGCGTGGGTGGCCGACCGCGGGCAGCGTGTATGAAGGTGACCGGCGCTTC
GACATGGTGGTGGCTTCCCGGAAACCTTGGCCACGGATGTGGACGGGCTTCCAGCTGCTGATTCGGG

```

Figure 26 : Format FASTA de la séquence nucléotidique NC_021505.1

(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_021505.1?report=fasta&from=3870051&to=3873197&strand=true)

La recherche des régions de similitudes entre cette séquence et d'autres séquences par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sont illustré dans le tableau 14.

Après analyse BLAST, les résultats montrent que plusieurs séquences présentent une similarité avec la séquence analysée, *Pseudomonas putida souche JQ581* représente le score le plus élevé qui est de 5640 et un pourcentage d'identité de 99.01% et une valeur de E valu qui est de 0.0 cela indique une forte identité.

Tableau 14: Alignements significatifs de la séquence NC_021505.1 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida NBRC 14164 DNA, complete genome	Pseudomonas putida...	5812	7778	100%	0.0	100.00%	6156701	AP013070.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain JQ581 chromosome, complete genome	Pseudomonas putida	5640	7606	100%	0.0	99.01%	6656695	CP050951.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida S13.1.2, complete genome	Pseudomonas putida...	5042	5042	100%	0.0	95.58%	6621848	CP010979.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain B1 chromosome, complete genome	Pseudomonas putida	4876	6842	100%	0.0	94.63%	6368486	CP022560.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida DNA, complete genome, strain: KF715	Pseudomonas putida	4865	4865	100%	0.0	94.57%	6583377	AP015029.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain ZXP4-20 chromosome, complete genome	Pseudomonas putida	4848	6814	100%	0.0	94.47%	6511858	CP061723.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida H8234, complete genome	Pseudomonas putida...	4843	6877	100%	0.0	94.44%	6870827	CP005976.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida GB-1 chromosome, complete genome	Pseudomonas putida...	4704	6664	100%	0.0	93.64%	6078430	CP000926.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain PP112420, complete genome	Pseudomonas putida	4665	6631	100%	0.0	93.42%	6031212	CP017073.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. 13159349 chromosome, complete genome	Pseudomonas sp. 13...	4433	6399	100%	0.0	92.09%	5977292	CP045553.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas plecoplossida strain NyZ12, complete genome	Pseudomonas pleco...	4433	6399	100%	0.0	92.09%	6233254	CP010359.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas asiatica strain C1 chromosome, complete genome	Pseudomonas asiatica	4427	6426	100%	0.0	92.06%	5698558	CP061335.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. FGI182, complete genome	Pseudomonas sp. F...	4416	4416	100%	0.0	91.99%	5891312	CP007012.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas asiatica strain C3 chromosome, complete genome	Pseudomonas asiatica	4416	6382	100%	0.0	91.99%	5581518	CP061848.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain DLL-E4, complete genome	Pseudomonas putida	4410	6376	100%	0.0	91.96%	6484062	CP007620.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas monteilii SB3101, complete genome	Pseudomonas monte...	4410	6376	100%	0.0	91.96%	5945120	CP006979.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas monteilii SB3078, complete genome	Pseudomonas monte...	4410	6376	100%	0.0	91.96%	6000087	CP006978.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas sp. JS425 chromosome, complete genome	Pseudomonas sp. JS...	4410	6376	100%	0.0	91.96%	6275689	CP073661.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain SVMUB4 chromosome, complete genome	Pseudomonas putida	4410	6454	100%	0.0	91.96%	5824126	CP063456.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas monteilii STW0522-72 DNA, complete genome	Pseudomonas monteilii	4410	6443	100%	0.0	91.97%	5675201	AP022473.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas monteilii strain 170620603RE chromosome, complete genome	Pseudomonas monteilii	4405	6371	100%	0.0	91.93%	5801662	CP043396.1
<input checked="" type="checkbox"/> Pseudomonas monteilii strain 170918607 chromosome, complete genome	Pseudomonas monteilii	4405	6371	100%	0.0	91.93%	5802791	CP043395.1

Avec les résultats du tableau 14 on va exécuter l'arbre de distance par la méthode de Neighbor-joining (NJ).

L'arbre phylogénique (figure 27) révèle que le gène *czcA* de la souche *Pseudomonas putida NBRC 14164* présente une certaine similarité aux gènes *czcA* des gamma protéobactéries vu que la souche étudiée appartient à la famille des gamma protéobactéries.

En plus l'arbre montre un lien de parenté entre *P.putida NBRC 14164* et *Pseudomonas entomophila L48* ce lien de parenté peut être dû à un transfert de gène entre c'est deux souches.

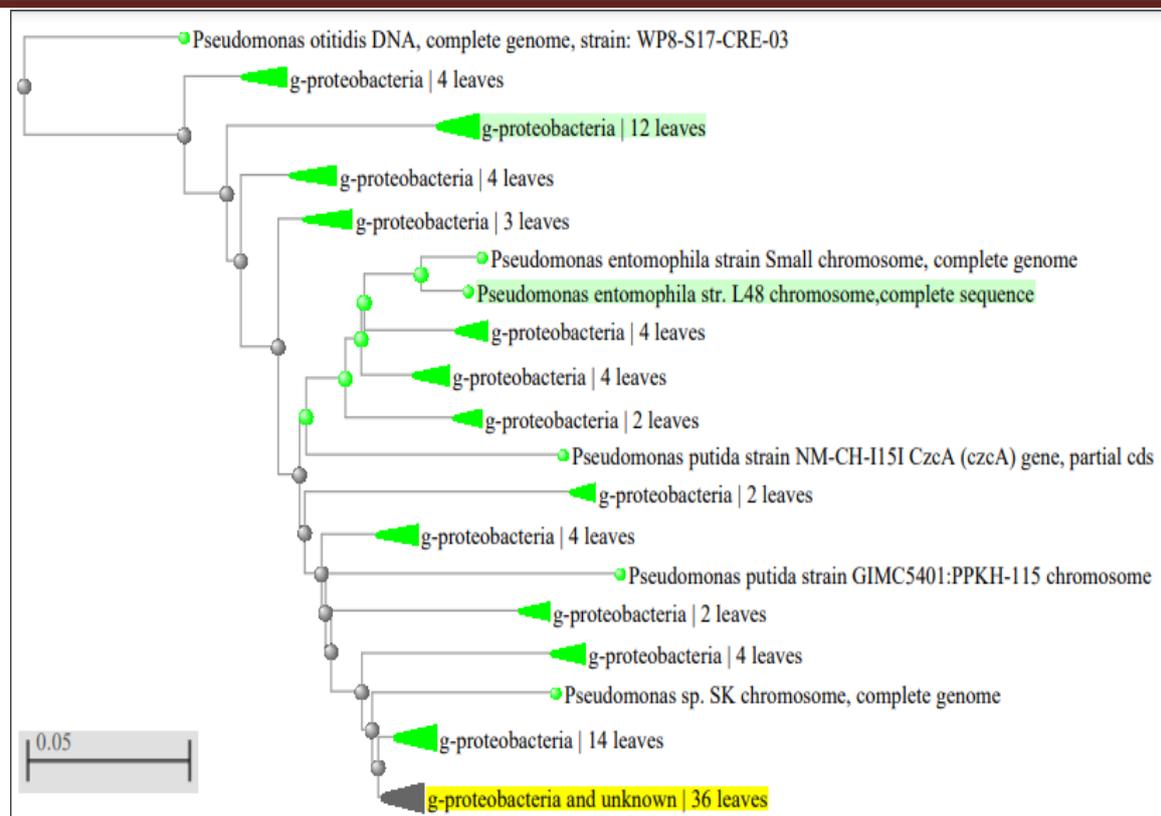


Figure 27 : Arbre phylogénique du gène *czcA* chez *P.putida* NBRC 14164 (couleur jaune pour la souche étudiée et couleur verte pour les bactéries pressantes un lien de parenté)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi?request=page&blastRID=DC43XEHW016&queryID=ref|NC_021505.1|&entrezLim=&ex=&exl=&exh=&ns=100

3- *Bacillus cereus*

Le résultat obtenu de la recherche de cette bactérie sur la base de données NCBI (tableau 15) révèle presque soixante-quinze milles publications sur Gènes, plus de sept millions et demi publication sur Protéines et cinq cent quarante-trois structures protéiques. Cent quatre-vingt-treize livres publiés pour cette bactérie, presque onze milles publications sur PubMed et plus de vingt-trois milles publications sur Central PubMed, et presque six cent BioProjet. La majorité de cette dernière est basée sur le séquençage du génome, car cette bactérie est multirésistante (résistance aux antibiotiques, résistance aux métaux lourds...) mais son génome est inconnu.

Tableau 15 : Résultat de recherche de *Bacillus cereus* sur NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=Bacillus%20cereus%20>)

Bases de données	Nombres de publications
Gènes	74.638
Livres	193
PubMed	10.680
PubMed Central	23.307
Protéines	7.740.068
Structures protéiques	543
BioProject	575

Les résultats de l'étude *in silico* des gènes *cadA* et *czcA* de la souche *Bacillus cereus* *NWUAB01* n'ont pas été détectés sur NCBI, cela veut dire que cette bactérie a la capacité de résister aux métaux lourds mais l'identification des gènes de résistance n'est pas encore réalisée.

4- Discussion

La résistance des métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* et *Pseudomonas putida* se réalise principalement via les systèmes d'efflux d'ions: les familles de pompes à ions ATPase type P et les RND (Résistance, Nodulation, cell Division). Ces systèmes d'exportation peuvent agir sur une gamme de cations, notamment Cu^{+2} , Ag^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} et le Zn^{+2} (Shamim et al., 2014). Il convient de mentionner que les systèmes RND ont été découverts pour la première fois chez *C. metallidurans CH34* avec les déterminants *czcCBA* conférant une résistance au Co, Zn et Cd (Mergeay et al., 1985).

Nous avons obtenu comme résultats que le gène *cadA* est présent chez *C. metallidurans* isolat *NDB4NOL1* et *P. putida NBRC14164* se localise sur le chromosome, alors que le premier *cadA* détecté était sur l'opéron *cad* porté par le plasmide *PI258* chez *Staphylococcus aureus* (Novick et Roth., 1968).

D'après les arbres phylogénique du gène *cadA* chez *Cupriavidus metallidurans*, elles représentent 3 ancêtres communs : le premier (le plus ancien) et le deuxième ancêtre, représente une homologie (évolution divergente) qui a généré un événement de spéciation due probablement à une pression évolutive (mutation, ou par le transfert horizontal de gène)

Le Transfer horizontal de gènes (HGT, ou transfert latéral de gènes) est un des mécanismes majeurs contribuant à la diversification des génomes microbiens, Le HGT est dominant parmi les groupes variés de procaryotes (Doolittle, 1999), il joue un rôle clé dans l'évolution biologique. La pression évolutive provoque le transfert horizontal des gènes par la conjugaison. La conjugaison est un transfert d'ADN entre une bactérie donatrice et une bactérie réceptrice, qui nécessite le contact et l'appariement entre les bactéries, et repose sur la présence dans la bactérie donatrice ou mâle d'un facteur de sexualité ou de fertilité (facteur F) (Koraimann G. 2004).

Le 3^{ème} ancêtre commun représente un phénomène de duplication où les sous espace : *Cupriavidus metallidurans NDB4MOL1* et *Sodalis glossinidusstr* représente un groupe para phylétique et les distance génétique entre elles sont lointaines.

Les résultats de l'arbre phylogéniques du gène *cadA* code pour la résistance au Cadmium(Cd) chez *Pseudomonas putida* représente 16 ancêtres :

Le 1^{er}, le 7^{ème}, 14^{ème}, 15^{ème}, 16^{ème} ancêtres représentent une homologie (évolution divergent) qui a généré par un évènement de duplication due probablement à une mutation ou pression enviromentale.

Du 2^{ème} au 6^{ème} aussi que du 8^{ème} au 11^{ème} ancêtres représentent des événements de spéciation due à une pression évolutive.

Les résultats de l'arbre phylogénétique du gène *czcA* présent chez *C. metallidurans* isolat *NDB4MOLI* présent 16 ancêtres communs : Le premier le quatrième ancêtre représente une évolution divergente donc un événement de spéciation peut être due à une pression évolutive (mutation ou par Transfer horizontale).

Le 2^{ème}, 3^{ème}, 5^{ème}, 6^{ème}, 7^{ème}, 8^{ème}, 10^{ème}, 11^{ème} ancêtres représentent des événements de duplication qui permet l'apparition de gène *czcA* chez plissures espèces (*Cupriavidus metallidurans*, *Ralostonia pickettii*, *Alcaligenese sp* et la bactéries non cultivable *beta portéiobactéria*) qui sont très proche dans l'évolutions donc cela signifiee un taux de similarités très élèves .

Le gène *czcA* est présent chez *Cupriavidus metallidurans* isolat *NDB4NOLI* sur l'opéron *czc* alors que chez *C. metallidurans* *CH34*, est localise sur l'opéron *czcCBA* porté par le plasmide pMOL30 (Monsieurs et al, 2011). Chez *P.putida* les études sont interrompues en raison d'un changement de portée pour les génomes procaryotes dans la base de données Gène.

D'autres recherches ont découvert que *P. putida* possède d'autres mécanismes de résistance telle que la séquestration intracellulaire régulé par le gène *MT* codent pour les métallothionines (Shamim et al., 2014).

D'apprêt les arbres phylogéniques on a confirmé que l'environnement est le principal facteur qui peut influencer la résistance aux métaux lourds. Chez *C. metallidurans* vie dans les sols industriels, qui sont considérés comme des sites fortement pollués avec le (Pb, Cu, CO, Zn, Ni). Ces conditions extrêmes influencent *C. metallidurans* en causant des variations génétique par l'acquisitions des gènes. La différence entre *C. metallidurans* et *P. putida* est que leurs biotope sont différent, car cette dernière appartient aux sols agricole qui présent une concentration en métaux lourds moins toxiques par rapport aux sols industriels. Cela révèle que *P. putida* et moins résistante par rapport aux *C.métallidurans* .

Pour *Bacillus cureuse* qui appartient aux biotopes miniers, des travaux montrent qu'elle développe des mécanismes de résistances aux métaux lourds localises en grande partie sur les parois et les membranes cellulaires car chez les bactéries Gram positif la paroi est plus épaisse que chez les bactéries Gram négatif (Dario et Jenny ,2015).

CONCLUSION

Conclusion

La pollution des sols par les métaux lourds est devenue, ces dernières années avec l'accélération des activités humaines agricoles et industrielles, un problème majeur avec des retombées dramatiques sur les systèmes biologiques. Les techniques de dépollution développées, en parallèle, ne sont pas en mesure d'apporter des satisfactions tant environnementales que sanitaire. Les effets néfastes, souvent irréversibles, sont très marquants et subsistent pratiquement dans la quasi-totalité des sols travaillés à des fins agricoles, industrielles ou urbanistiques.

Devant l'impossibilité et les limites des techniques classiques (physiques et/ou chimiques) dans les processus de dépollution, le recours aux potentialités microbiennes existantes dans le sol est une voie salutaire qui pourra participer, même à titre partiel, dans l'atténuation des niveaux de la pollution. Les micro-organismes notamment les bactéries ont élaboré plusieurs mécanismes de résistance aux métaux lourds, telles que la séquestration ou la conversion enzymatique, qui sont de véritables résistances aux métaux lourds. La résistance en question est liée à la présence de gènes chromosomiques ou protégés par des éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides. Des investigations et des travaux scientifiques ont mis en évidence que l'exploitation des capacités bactériennes résistances aux métaux lourds, dans les techniques de bioremédiation, est une option valable pour l'assainissement des sols contaminés par les composés organiques et inorganiques. L'exemple des bactéries, objet de notre étude, *Cupriavidus metallidurans*, *Pseudomonas putida* et *Bacillus cereuse* sont des bons candidats pour des applications biotechnologiques, visant la dépollution des sols, grâce à des mécanismes bactériens tel que les transporteurs ATPase P qui sont codé par le gène *cadA* pour la translocation du Cadmium (Cd) et les systèmes RND (Resistance Nodulation cell Division) qui sont codé par le gène *czcA* pour la translocation du Cadmium (Cd), du Zinc (Zn), et du Cobalt (Co) chez *C. metallidurans* et *P. putida*.

Les perspectives qui résultent de ce travail :

- D'un point de vue, il est nécessaire de connaître les mécanismes de résistances aux métaux lourds par l'utilisation des techniques de biologies moléculaire.
- Des essais à l'échelle moléculaire sont nécessaires pour sélectionner des gènes de résistances aux métaux lourds, afin de favoriser leur transfert horizontal entre les bactéries du sol.

- Il serait aussi souhaitable de sélectionner et d'identifier des métabolites secondaires plus performante pour une utilisation directe pour l'assainissement des sols pollués aux métaux lourds.
- Engager des études de suivi de l'efficacité et des possibilités de la bioremédiation à long terme.
- La conception de sites expérimentaux, *in situ* et *ex-situ* , pour teste les capacités de souches bactériennes sélectionnées au préalable sur des critères génétiques, écologiques, métaboliques et fonctionnelles en bioremédiation.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

-A-

1. Akbar S , Sultan S.,2016- Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), DOI:10.1016/j.bjm.2016.04.009.
2. Altschul SF., Gish W., Miller W, Myers EW, Lipman ED.,1990- Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
3. Asada K et Takahashi M., 1987 -*Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis*, in *Photoinhibition: Topics of Photosynthesis*.Ed. D. J. Kyle, C. B. Osmond, et C. J. Arntzen, Amsterdam, pp. 227–287.
4. Axelsen K et Palmgren M.,1998- Evolution of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta*, 10;1365(1-2):37-45. DOI: 10.1016/s0005-2728(98)00041-3.
5. Ayangbenro A et Babalola O.,2020- Genomic analysis of *Bacillus cereus* NWUAB01 and its heavy metal removal from polluted soil. [en ligne].Disponible sur :<<https://doi.org/10.1038/s41598-020-75170-x>>.
6. Azubuike C.C., Chikere C.B., Okpokwasili G.C.,2018 -Bioremediation techniques–classification based on site of application: Principles, advantages, limitations and prospects. *WorldJ. Microbiol. Biotechnol.*32, e180.

-B-

7. Banerjee A., Roy A., Dutta S., Mondal S., 2016 -*Bioremediation of hydrocarbon*. 4 :1303–1313.
8. Bauvais C .,2015 - *Diversité chimique et bactéries associées à *Spongia officinalis*, une éponge marine accumulatrice de métaux* [en ligne]. Thèse de doctorat d'écologie chimique et microbienne.,Univ. Pierre et Marie Curie Paris, France ,215p.
9. Beech, I.B., Cheung, C.W.S., 1995- *Interactions of exopolymers produced by sulphate reducing bacteria with metal ions*. *Int. Biodeter. Biodegrad* 35, 59-72.
10. Biomnis., 2012- Cadmium. *Précis de biopathologie analyses médicales spécialisées*, pp 01.
11. Bliffert C. et Peraud R., 2004- *Chimie de l'environnement : air, eau, sol et déchets*. Ed. Boeck, 477 p.
12. Blindauer C, Harrison M, Robinson A, Parkinson J, Bowness P, Sadler P.,2002- Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers. [en ligne].Disponible sur :< <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03109.x>>.
13. Boopathy, R., 2000- Factors Limiting Bioremediation Technologies. *Bioresource Technology*, 74 : 63-67. [en ligne].Disponible sur :< [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3)>.
14. Borremans B., Hobman J. L., Provoost A., Brown N. L et Van Der Lelie D., 2001- Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of *Ralstonia metallidurans* CH34. *J Bacteriol* 183 : 5651-5658.
15. Bourrelrier P.H. et Berthelin J.,1998- *Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion*. Ed. Lavoisier, Paris,42p.
16. Brian A., 2013-Heavy Metals in Soils : Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability, *Environmental Pollution* 22.BJ Alloway, UK, 613p.
17. Brown LD., Cologgi DL., Gee KF., Ulrich AC., 2017- Bioremediation of Oil Spills on Land. *Elsevier Inc.*Amsterdam,Pays-Bas.

-C-

18. Cánovas D , Cases I et Lorenzo V.,2003- Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environmental Microbiolog*, 5(12), 1242–1256. doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00463.x
19. Charissou A-M., Lejeune PH .,2009- Etat de l'art sur les potentialités des techniques de bioaugmentation dans le traitement des déchets, sédiments et sols pollués. pp .100.
20. Chesnokova MG., Shalaj ., Kraus YA., Cherkashina NV., Mironov A., 2016- Analysis of corrosion defects on oil pipeline surface using scanning electron microscopy and soil thionic and sulfate-reducing bacteria quantification. *Procedia Engineering*, 152, 247 -250.
21. Christophe M .,2020- Les métaux lourds ou éléments trace métalliques [en ligne].Disponible sur :< https://www.notre-planete.info/environnement/metaux_lourds.php> (consulté le 15/04/2020).
22. Cozzi D., Desideri PG et Lepri L.,1969 - Le mécanisme d'échange d'ions avec l'acide algénique. *Journal of Chromatography A*, 40 , 130–137.

-D-

23. Daughney J., Siciliano SD., Rencz A., Lean D., 2002- Hg(II) Adsorption by Bacteria: A Surface Complexation Model and Its Application to Shallow Acidic Lakes and Wetlands in Kejimikujik National Park, Nova Scotia, Canada. *Environmental Science and Technology*, 36(7):1546-53. DOI:10.1021/es010713x
24. De Philippis R, Colica G et Micheletti E., 2011- Exopolysaccharide-producing cyanobacteria in heavy metal removal from water: molecular basis and practical applicability of the biosorption process. *Appl Microbiol Biotechnol* 92 : 697–708. [en ligne]. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3601-z>>.
25. Diels L., Dong Q., van der Lelie D., Baeyens W et Mergeay M., 1995- The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *Journal of Industrial Microbiology* 14, 142-153.
26. Diels L., Faelen M., Mergeay M et Nies D., 1985- Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *Arch. Intern. Physiol. Bioch.* 93 : 27-28.
27. Dong Q et Mergeay M., 1994- *Czc/cnr* efflux: a three-component chemiosmotic antiport pathway with a 12-transmembrane-helix protein. *Molecular Microbiology* 14 : 185-187.
28. Dosanjh, N. S., Hammerbacher, N. A. & Michel, S. L. (2007). Characterization of the *Helicobacter pylori* NikR-P(ureA)() DNA Interaction: Metal Ion Requirements and Sequence Specificity. *Biochemistry* 46, 2520-2529.

-F-

29. Fabrégat s., 2010- *Les métaux lourds : une pollution de long terme* [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.actu-environnement.com/ae/dossiers/air/metaux-louids.php4>> consulté le 22/06/2021.
30. Fassler J., Ph.D. et Cooper Ph.D., 2011- BLAST Glossary. . [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK62051/>>.
31. Fein J., Daughney C., Yee N., Davis T., 1997- A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surfaces. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61, 3319-3328.
32. Fernández S., Cotos-Yáñez T., Roca-Pardiñas J., Ordóñez C., 2018- *Geographically Weighted Principal Components Analysis to assess diffuse pollution sources of soil heavy metal: Application to roughmountain areas in Northwest Spain*. *Geoderma*, 31, 120-129.
33. Fourest E., 1993- *Etude des mécanismes de biosorption des métaux lourds par des biomasses fongiques industrielles en vue d'un procédé d'épuration des effluents aqueux contaminés* (thèse) [en ligne]. Disponible sur <http://www.theses.fr/1993GRE10142>.
34. Francou C., 2004- Stabilisation de la matière organique au cours du compostage de déchets urbain influence de la nature des déchets et du procédé de compostage recherche indicateurs pertinents :290.

-G-

35. Gadd et G.M. ., 1990- Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia* 46: 834–840.
36. Ghoreishi G., Alemzadeh A., Mojarrad M., Djavaheri M., 2017- Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. *Sustainable Environment Research*, 27, 195-202.
37. Gill SS., Tuteja N ., 2011- *Cadmium stress tolerance in crop plants: probing the role of sulfur*. *Plant Signal Behav* 6:215–222. disponible sur < <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14880>>.
38. Glick BR., 2007- Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Plant. Sci.* 26 :227–242.
39. Godheja J., Modi D.R., Kolla V., Pereira A.M., Bajpai R., Mishra M., Sharma S.V., Sinha K., Shekhar S.K., 2019 -Environmental remediation: Microbial and nonmicrobial prospects. *In Microbial Interventions in Agriculture and Environment*. Springer. Singapore, 1 :379–409 .
40. Golia EE., Dimirkou A., Mitsios IK ., 2008- Influence of some soil parameters on heavy metals accumulation by vegetables grown in agricultural soils of different soil orders. *Bull Environ Contam Toxicol* 81:80–84.
41. Guha N., Loomis D., Guyton KZ., Grosse Y., El Ghissassi F., Bouvard V., Benbrahim-Tallaa L., Vilahur N., Muller K., Straif K., 2017- *International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group Carcinogenicity of welding, molybdenum trioxide, and indium tin oxide*. *Lancet Oncol* 18:581–582.

42. Guibaud G., 2003-Relation between extracellular polymers' composition and its ability to complex Cd, Cu and Pb. *Chemosphere* 52, 1701-1710.
43. Guo X, Yoshinobu J, et Yates T.,1990-Decomposition of an organophosphonate compound (dimethylmethylphosphonate) on the nickel(111) and palladium(111) surfaces. 94(17) :6839–6842.
44. Gupta A, Whitton B, Morby A, Huckle J et Robinson J.,1992- Amplification and Rearrangement of a Prokaryotic Metallothionein Locus smt in *Synechococcus* PCC 6301 Selected for Tolerance to Cadmium. *Biological Sciences*,248(1323) :273-281.

-H-

45. Hanna K., 2004- Etude de faisabilité de l'utilisation de molécules « cage » dans la dépollution des sols : solubilisation et extraction de polluants organiques par les cyclodextrines. Thèse doctorat. Université Lyon. France, P 59.
46. Harrah T, Panilaitis B ET Kaplan D.,2006- Microbial Exopolysaccharides. *Prokaryotes*. 1:766–776. DOI: 10.1007/0-387-30741-9_21.
47. Hien E., Favre-Bonte S., Masse D.et Nazaret S., 2010- Impact de l'épandage de déchets urbains sur les communautés bactériennes de sols agricoles dans la périphérie de Ouagadougou, Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4, (5), 1721-1729.
48. Hollenstein K., Frei D et Locher K.,2007- Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature* 446, 213–216 . [en ligne].Disponible sur :< <https://doi.org/10.1038/nature05626>>.
49. Huamain C., Chunrong Z., Cong and T., Yongguan Z., 1999- *Heavy Metal Pollution in Soils in China: Status and Countermeasures*. *Ambio*, 28, 130-134.
50. Huynh., 2009 *-Impact des métaux lourds sur l'interaction plantes/ verre le terre/ icroflore tellurique*.thèse de Doctorat .Univ-Paris Est p169.

-I-

51. Imtiaz MR., Mujawara LH., Shahzade T., Almeelbia T., Ismaila I, Oves M., 2016- Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiological Research*, 183, 26-41.
52. Iyer A., Mody K., Jha B., 2004- *Accumulation of hexavalent chromium by an exopolysaccharide producing marine Enterobacter cloacae*. *Mar. Pollut. Bull.* 49.

-J-

53. Jacob-Dubuisson F, Mechaly A, Betton J, Rudy A.,2018- Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nat Rev Microbiol*. 16(10):585-593. DOI: 10.1038/s41579-018-0055-7.
54. Jaishankar M., Tseten T., Anbalagan N., Mathew BB.et Beeregowda KN .,2014- Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip Toxicol* 7:60–72.
55. Janssen J , Houdt RV, Moors H, Monsieurs P, Morin N, Michaux A, Benotmane M, Leys N, Vallaeys T, Lapidus A, Monchy S, Médigue C, Taghavi S, McCorkle S, Dunn J, Lelie D, Mergeay M.,2010- *The Complete Genome Sequence of Cupriavidus metallidurans Strain CH34, a Master Survivalist in Harsh and Anthropogenic Environments*[en ligne].Disponible sur :<doi.org/10.1371/journal.pone.0010433>consulté le 12/05/2021.
56. Jones, C., 1998- Interpreting the Perceptions of Past People. *Archaeological Review from Cambridge*. 15(1) : 7-22.
57. Jun W., Jian L., Leiming L., Xiuyun M., Yongming L., 2018-*Pollution, ecological-health risks, and sources of heavy metals in soil of the northeastern Qinghai-Tibet Plateau*. *Chemosphere*, 201, 234-242.

-K-

58. Kampers, L.F.C, Koehorst J.J, van Heck R.J.A,Suarez-Diez M ,Stams A et Schaap P. ,2021- A metabolic and physiological design study of *Pseudomonas putida* KT2440 capable of anaerobic respiration. *BMC Microbiol* 21, 9.<https://doi.org/10.1186/s12866-020-02058-1>.
59. Kazy S.K., Sar P., Singh S.P., Sen A.K., D'Souza S.F., 2002-Extracellular polysaccharides of a copper-sensitive and copper-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain: synthesis, chemical nature and copper binding. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 583-588.
60. Kim R-Y., Yoon J-K., Kim T-S., Yang JE., Owens G., Kim K-R ., 2015- Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation—a critical review. *Environ Geochem Health* 37:1041–1061.

61. Kim S.Y., Kim J.H., Kim C.H., Oh D.K., 1996- Metal adsorption of the polysaccharide produced from *Methylobacterium organophilum*. *Biotechnol. Lett.* 18, 1161-1164.
62. Kondo Y., Woo ES., Michalska AE., Choo KH., Lazo JS., 1995- *Les cellules nulles de métallothionéine ont une sensibilité accrue aux médicaments anticancéreux*. *Cancer Res*; 55 : 2021-2023.
63. Koraimann G., 2004-Bacterial conjugation: cell-cell contact-dependent horizontal gene spread. In: Miller RV, Day MJ (eds) *Microbial evolution: gene establishment, survival and exchange*. ASM Press, Washington, DC, pp. 111–124 .
64. Kumar B, Smita K, Flores LC ., 2017- *Plant mediated detoxification of mercury and lead*. *Arab J Chem* 10:2335–2342. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu117>.
65. Kumar V., Shahi S.K., Singh S., 2018-Bioremediation: Aneco-sustainable approach for restoration of contaminated sites. In *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*. Springer: Singapore, pp. 115–136.

-L-

66. Ledin M., 2000-Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*. 51 : 1–31.
67. Ledrich M. L., Stemmler S., Laval-Gilly P., Foucaud L et Falla J., 2005- Precipitation of silver-thiosulfate complex and immobilization of silver by *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Biometals* 18 : 643-650.
68. Lei C., Guobo W., Yucen Z., Zhenyao S., 2016- Evaluating the impacts of soil data on hydrological and nonpoint source pollution prediction. *Science of the Total Environment*, 564, 19-28.
69. Lenntech., 2021- Mercure – Hg. [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.lenntech.fr/data-perio/hg.htm> >.
70. Linton K.J., C.F., 1998- Higgins The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins *Mol. Microbiol.*, 28 , pp. 5-13.
71. Liu, H., et Fang, HH ., 2002- Caractérisation des sites de liaison électrostatique de polymères extracellulaires par analyse de programmation linéaire des données de titrage. *Biotechnology and Bioengineering*, 80 (7), 806–811.
72. Loaëc M., Olier R., Guezennec J., 1997- Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water. Res.* 31, 1171-1179.
73. Lyoun ., D.4, Vogel ., T.M., 2001-Bioaugmentation as a strategy for the treatment of persistent pollutants in : Moo-Young, M (Ed), *Comprehensive Biotechnology* (Second Edition) , Academic Press , Burlington , pp.69-81 .

-M-

74. Mergeay M, Nies D, Schlegel HG, Gerits J, Charles P, et al., 1985- *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J Bacteriol.* Pp.162:328–334.
75. Misener., Stephen., Krawetz., Stephen A., 1999- Bioinformatics Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. [en ligne]. Disponible sur : < <https://www.springer.com/gp/book/9780896037328> >.
76. Mohite B., Koli S., Narkhede C et Patil S., 2017- Prospective of Microbial Exopolysaccharide for Heavy Metal Exclusion. *Appl Biochem Biotechnol* 183, 582–600. . [en ligne]. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2591-4> >.
77. Mohite B.V., Koli S.H., Narkhede C.P., 2017- Prospective of Microbial Exopolysaccharide for Heavy Metal Exclusion. *Appl Biochem Biotechnol* 183, 582–600. Disponible sur : < <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2591-4> >.
78. Monchy S., 2007- *Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez Cupriavidus metallidurans CH34*. Thèse de Sciences. UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES, 19 p.
79. Monsieurs P, Moors H, Van Houdt, R, Janssen A, Coninx I, Mergeay M, et Leys N., 2011- Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network. *Biometals* 24, pp.1133–1151. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9473-y>.
80. Morillo P, J.A., García-Ribera R., Quesada T., Aguilera M., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M., 2008- Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J Microbiol Biotechnol* 24, 2699-2704.
81. Muhammad S., Sana K., Ghulam A ., Naeem S., Muhammad N., Muhammad S., Muhammad A., et Camille D., 2015 -Heavy Metal Stress and Crop Productivity , pp.14-15 in : Khalid Rehman Hakeem. *Crop Production and Global Environmental Issues*. [en ligne]. Disponible sur :

<https://www.researchgate.net/publication/286922829_Heavy_metal_stress_and_crop_productivity>
(consulté le 01/05/2021).

82. Mulligan C.N., Yong R.N., et Gibbs B.F., 2004-Remediation technologies for metalcontaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60: 193-207.

-N-

83. Nies D. H., 1992- CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 174 : 8102-8110.
84. Nies D. H., 2003- Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27 : 313-339.
85. Nies D.H., 2000-Heavy metal-resistant bacteria as extremophiles: molecular physiology and biotechnological use of *Ralstonia* sp. CH34. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions* 4 : 7782.
86. Nies DH ., 1999- *Microbial heavy-metal resistance.Applied Microbiology and biotechnology* .51 : 730-750.
87. Novick, R. P. & Roth, C. ,1968- Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 95, pp.1335-1342.

-O-

88. Organisation mondiale de la santé., 2018-Arsenic [en ligne].Disponible sur :< <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>>.
89. Ortega M.F., Guerrero D.E., García., Martínez M.J., Bolonio D., Llamas J.F., Canoira L., Gallego J.L.R., 2018-Optimization of landfarming amendments based on soil texture and crude oil concentration. *Water Air Soil Pollut.* 229 .
90. Ozdemir G., Ceyhan N., Manav E., 2005- Utilization of an exopolysaccharide produced by TEM05 in alginate beads for adsorption of cadmium and cobalt ions. *Bioresource Technology* 96, 1677-1682.

-P-

91. Pallavi S., Ambuj B., Rama S., et Mohammad P. ,2012- Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* ,pp 16-17.
92. Pengyan Z., Chengzhe Q., Xin H., Guohua K., Mingzhou Q., Dan Y., Bo P., Yanyan L., Jianjian H., Richard PD., 2018- Risk assessment and source analysis of soil heavy metal pollution from lower reaches of Yellow River irrigation in China. *Science of the Total Environment*, 633, 1136- 1147.
93. Podda F., Zuddas P., Minacci A., Pepi M et Baldi F.,2000- Heavy metal coprecipitation with hydrozincite [Zn(5)(CO(3))(2)(OH)(6)] from mine waters caused by photosynthetic microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 66, 5092-5098.
94. Prado Acosta M., Valdman E., Leite S.G.F., Battaglini F., Ruzal S.M., 2005- Biosorption of Copper by *Paenibacillus polymyxa* Cells and their Exopolysaccharide. *World J Microbiol Biotechnol* 21, 1157-1163.

-Q-

95. Qi W., Zhiyi X., Fangbai L., 2015. Using ensemble models to identify and apportion heavy metal pollution sources in agricultural soils on a local scale. *Environmental Pollution*, 206, 227-235.

-R-

96. Ritchie M, Raina R.,2016- Effects of herbivores on nitrogen fixation by grass endophytes, legume symbionts and free-living soil surface bacteria in the Serengeti. *Pedobiologia*,59(5),pp. 233-241. doi.org/10.1016/j.pedobi.2016.09.001.
97. Saier M. H., Jr., Beatty J. T., Goffeau A., Harley K. T., Heijne W. H., Huang S. C., Jack D. L., Jahn P. S., Lew K., Liu J., Pao S. S., Paulsen I. T., Tseng T. T et Virk P. S., 1999- The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1 : 257-279.
98. Saito N,Nei M., 1987-The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*,4(4),p. 406-425.
99. Salehi M.A., Hakimghiasi N.,2017- Hydrodynamics and mass transfer inthree-phase airlift reactors for activated carbon and sludge filtration. *Adv. Environ. Technol.* 2 : 179-184.
100. Scherer J, Dietrich H et Nies.,2009- CzcP is a novel efflux system contributing to transition metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34. [en ligne].Disponible sur :< <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06792.x>>.
101. Scott J.A. et Palmer S.J. ., 1990- Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 33: 221-225.
102. Sethy SK, Ghosh S.,2013- *Effect of heavy metals on germination of seeds.* *J Nat Sci Biol Med* 4:272-275.

103. Shamim S, Rehman A et Qazi M.H .,2014 - Cadmium-Resistance Mechanism in the Bacteria *Cupriavidus metallidurans* CH34 and *Pseudomonas putida* mt2. *Arch Environ Contam Toxicol* 67, 149–157 (2014). <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0009-7>.
104. Shixue W., Xinran L., Min L., Xing C., Sai L., Chenga L., Xianbiao L., Ye L., 2018-Sources, influencing factors and environmental indications of PAH pollution in urban soil columns of Shanghai, China. *Ecological Indicators*, 85, 1170-1180.
105. Silver S., Phung L.T., 1996-Bacterial heavy metal resistance : new surprises. *Annu Rev. Microbiol* 50 : 753-789
106. Singh O.V., Labana S., Pandey G., Budhiraja R., et Jain R.K.,2003-phytoremediation :an overview of metallic ion decontamination from soil.*Appl.Microbiol.Biotechnol.*61,405-412,SL.
107. Susan L.-A. Samson Lashitew Gedamu.,1997 - Molecular Analyses of Metallothionein Gene Regulation. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*,vol(59), pp. 257-288 ;doi : 10.1016/S0079-6603(08)61034-X.

-T-

108. Tchounwou PB., Yedjou CG., Patlolla AK. et Sutton DJ., 2012- Heavy metal toxicity and the environment. In: *LUCH A (ed) Molecular, clinical and environmental toxicology, Environmental toxicology*, vol 3. Basel, Springer.
109. Teklić T., Hancock JT., Engler M., Paradicović N., Cesar V., Lepeduš H., Štolfa I. et Bešlo D., 2008 -*Antioxidative responses in radish (Raphanus sativus L.) plants stressed by copper and lead in nutrient solution and soil.* *Acta Biol Crac* 50:79–86.
110. Tibazarwa C., Wuertz S., Mergeay M., Wyn L et Van Der Lelie D., 2000- Regulation of the *cnr* cobalt and nickel resistance determinant of *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) CH34. *J Bacteriol* 182 : 1399-1409.
111. Tomoki K., et Taiho K .,2016 - The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 336; doi:10.3390/ijms17030336.

-U-

112. Ueshima M., Ginn B., Haack E., Szymanowski J., Fein J., 2008- Cd adsorption onto *Pseudomonas putida* in the presence and absence of extracellular polymeric substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72, 5885-5895.
113. Umme A., Adeel M., Sidra W., Riffat -Naseem M., 2016-*Enrichment, geo accumulation and risk surveillance of toxic metals for different environmental compartments from Mehmood Booti dumping site, Lahorecity,Pakistan.* *Chemosphere*, 144, 2229-2237.

-V-

114. Vidali M., 2001-bioremediation. *Pure Appl. Chzm.* 73(7) : 1163-1172.
115. Vodyanitskii YN., 2016- Biochemical processes in soil and groundwater contaminated by leachates from municipal landfills (Mini review). *Annals of agrarian science*, 14, 249 -256.

-W-

116. Wenyou H., Huifeng W., Lurui D., Biao H., OleK B., Hans Christian BH., Yue H et Peter EH., 2018- Source identification of heavy metals in peri-urban agricultural soils of southeast China: An integrated approach. *Environmental Pollution* , 23 , 650-661.
117. Whelan M.J., Coulon F., Hince G., Rayner J., McWatters R., Spedding T., Snape I., 2015 - *Fate and transport of petroleum hydrocarbons in engineered biopiles in polar regions.* *Chemosphere*, 131 : 232–240.

-Y-

118. Yee N et Fein J., 2001- Cd adsorption onto bacterial surfaces: A universal adsorption edge?. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(13):2037-2042.
119. Yin Y., He X., Szewczyk P., Nguyen T et Chang G., 2006- Structure of the multidrug transporter EmrD from *Escherichia coli*. *Science* 312 : 741-744.

-Z-

120. Zalewski A et Macphee C, 2005-Role of Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ in Atherosclerosis. *Biology, Epidemiology, and Possible Therapeutic Target.*25(5) : 923–931.