

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et De la Recherche Scientifique**



**Université de BLIDA-1**

Faculté des Sciences De La Nature et De La Vie

Département de biotechnologie

**Mémoire de fin d'études**

**En vue de l'obtention du diplôme de Master En Biologie**

**Option :**

**BIOTECHNOLOGIE MICROBIENNE**

**Thème :**

Identification et caractérisation des bactéries  
marine résistantes au métaux lourds et ses  
applications

**Présenté par :**

Melle DERIOUCHE Meriem

**Date de soutenance:**

Le 20/09/2020

Devant le jury:

BENKORTEBY.H

MAA ( USDB, Blida1)

president

AMMAD.F

MCA ( USDB, Blida1)

Promotrice

YALA.A

( USDB, Blida1)

Examinatrice

**Promotion: 2019/2020**

## **Remerciements**

*Je remercie Dieu, le Tout Puissant, le Miséricordieux, qui m'a donné l'opportunité de mener à bien ce travail.*

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma reconnaissance à tous les membres de ce jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail.*

*Que Mme **Hinde Benkorteby**, trouve ici l'expression de mes vifs remerciements pour l'honneur qu'elle me fait en président ce jury, et pour sa douceur lors des cours donnés.*

*Je suis très heureuse de compter dans ce jury, **Mme Ania Yala**, qui me fait l'honneur de juger ce travail. Ses remarques me seront certainement profitables et enrichissantes.*

*Au même titre je voudrai remercier **Mme AMMAD Faiza**, ma promotrice qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect pour leurs confiance en moi, leurs soutien, leurs patience, et leurs encouragement pour mener à bien ce travail, sans oublier les valeurs de travail, de rigueur et de valeurs humaine qu'elle m'a pu me transmettre. Elle a su me donner confiance en mes compétences*

*Mes remerciements vont également à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation pour m'avoir transmis l'amour de la recherche scientifique.*

*Aux **Etudiants de ma promotion**, je leurs dis merci pour les moments de joies et de stress passés ensemble.*

## 🌀 DÉDICACE 🌀

Avant tout je remercie **ALLAH** pour les tout, la santé le Savoir et la patience...

*J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail ...*

✍ *A ma tendre mère **Atika**, et mon cher père **Ahmed***

*Qui m'ont appris tout ce que je sais*

*Qui m'ont guidé vers le tunnel éclairé du savoir*

*Qui m'ont nourri d'amour, enveloppé de confort*

✍ *A Mes chers sœurs **Lamia** et **faiza***

*Je vous remercie d'être toujours à mes côtés de me soutenir, aimer,*

*Protéger et pour tout ce que vous avez fait pour moi.*

✍ *A Mon fiancé **Djahid** pour leur aide et surtout leur soutien moral.*

✍ *A mes très chères nièces **Marwa**, **Malek**, **Yasmine**, **Nihel** et **Maram** et mes chers neveux **Islam***

*et **Mohamed** que j'aime tant*

✍ *A mes meilleurs amis : **Chaima**, **Fouzia**, **Chaima**, **Roumaissa**, **Manel** et **Alia***

✍ *A mon frère **Karim** et toute la famille **Driouèche** sans exception.*

✍ *A tous les enseignants qui ont participé dans ma formation.*

✍ *Ainsi qu'à tous les collègues de la promotion BTM 2020*

✍ *A tous ceux qui me sont chers, à tous ceux qui m'aiment, à tous que j'aime, je dédie ce travail.*

## Résumé

La pollution par les métaux lourds constitue une menace importante pour tous les écosystèmes de l'environnement et la santé humaine, donc des solutions efficaces, économiques et non toxiques doivent être instaurées rapidement afin de restaurer l'équilibre naturel.

Afin de trouver si possible, une solution permanente au problème des environnements contaminés par les métaux lourds Ce travail se propose d'étudier les mécanismes de résistances au métaux lourds (Cd, Pb, Cu, Zn, Hg ) chez les bactéries marines et les gènes qui contrôlent les différents stratégies de résistance chez *metallidurans CH34* : ( Un modèle de tolérance aux métaux lourds) .

**Mots clés:** pollution, métaux lourds, bioremédiation, , bactéries marines

**Summary:**

Heavy metal pollution poses a significant threat to all environmental ecosystems and human health, Therefore, effective, economical and non-toxic solutions must be implemented quickly in order to restore the natural balance.

In order to find, if possible, a permanent solution to the problem of heavy metal-contaminated environments This work proposes to study the mechanisms of resistance to heavy metals (Cd, Pb, Cu, Zn, Hg ) in marine bacteria and the genes that control the different resistance strategies in *metallidurans* CH34 (a bacterium specialized in heavy metal resistance).

**Key words:** pollution, heavy metals, bioremediation, , marine bacteria

يشكل التلوث بالمعادن الثقيلة تهديداً كبيراً لجميع النظم البيئية وصحة الإنسان ، لذلك يجب تنفيذ حلول فعالة واقتصادية وغير سامة بسرعة من أجل استعادة التوازن الطبيعي.

لإيجاد حل دائم لمشكلة البيئات الملوثة بالمعادن الثقيلة ، إن أمكن ، يهدف هذا العمل إلى دراسة آليات مقاومة البكتيري البحرية المعادن الثقيلة (الكادميوم والرصاص والنحاس والزنك والزنابق) و كذا دراسة الجينات التي تتحكم استراتيجيات المقاومة المختلفة في

(بكتيريا متخصصة في مقاومة المعادن الثقيلة) *Cupriavidus metallidurans CH34*

**الكلمات المفتاحية:** التلوث ، المعادن الثقيلة ، المعالجة الحيوية ، البكتيريا البحرية

## Liste d'abréviation

**Ag(I)** : argent

**AND**: Acide Désoxyribonucléique

**Bi(III)** : bismuth

**Cd(II)** : cadmium

***cnr*** : résistance à cobalt, nickel (gène)

**Co(II)** : cobalt

***cop*** : résistance au cuivre "copper" (gène)

**CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : chromate

**Cu(I)** ou **Cu(II)** : cuivre

***czc***: résistance au cadmium, zinc, cobalt (gène)

**ETM**: Element trace métallique.

**HAE-RND** : Hydrophobic and Amphiphilic compounds - Export Resistance-Nodulation-Cell Division

**Hg(II)** : mercure

**HME-RND** : Heavy Metal Efflux – Resistance-Nodulation-Cell Division

**Mb** : mégapaire de base

***mer*** : résistance au mercure (gène)

**Mn(IV)** : manganèse

**MPL** : MegaPLasmide

***ncc*** : résistance au nickel, cobalt, cadmium (gène)

**OMP** : Outer Membrane Protein

**ORF** ou **orf** : Open Reading Frame

**pb** : paire de bases

**Pb(II)** : plomb

***pbr*** : résistance au plomb (gène)

**RND** : Resistance-Nodulation-Cell Division

**Tl(I)** : thallium

**Zn(II)** : zinc

**SWNA** : seawater nutrient agar

## Glossaire

**Bioaccumulation** : Est un processus par lequel certaines substances endogènes ou exogènes, présentes en faible quantité, voient leur concentration augmenter dans un organe, un organisme, une chaîne alimentaire (ou trophique), un écosystème.

**Biorémediation** : Est une technique consistant à augmenter la biodégradation ou la biotransformation, en inoculant des micro-organismes spécifiques (bioaugmentation) ou en stimulant l'activité de populations microbiennes indigènes, par biostimulation, par apport de nutriments et par ajustement des conditions de milieu (potentiel d'oxydoréduction, humidité).

**Biosorption** : Est un processus physico-chimique naturel et passif (c'est-à-dire qu'il ne requiert pas d'énergie), agissant chez certaines espèces de bactéries, champignons, plantes ou animaux (dans un organe particulier souvent), leur permettant de bioconcentrer passivement certains métaux, radionucléides, minéraux ou molécules organiques toxiques.

**Biotechnologie** : Application des principes scientifiques et de l'ingénierie à la transformation de matériaux par des agents biologiques pour produire des biens et services.

**Coloration Gram** : Technique de coloration des bactéries permettant de les classer en deux familles selon la composition de leur paroi. Les bactéries à Gram positif apparaissent mauves et leur paroi est composée d'une épaisse couche de peptidoglycane dans laquelle sont insérés des acides teichoïques. Les bactéries à Gram négatif apparaissent roses et leur paroi est composée d'une mince couche de peptidoglycane entre la membrane interne et la membrane externe.

**Métaux lourds** : Eléments métalliques ayant une masse volumique supérieure à une certaine valeur (4000- 5000  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) selon les auteurs.



## Liste des figures

Figure 1: Distribution des concentrations de Cu, Zn, Pb et Hg dans les sédiments superficiels des ports d'Oran, Alger et d'Annaba .....	11
Figure 2 : Schéma simplifié des mécanismes de résistance aux métaux dans le milieu extracellulaire .....	13
Figure 3 : Structure schématiques des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds .....	14
Figure 4 : Représentation schématique d'un complexe de type RND.....	15
Figure 5 : Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds sur le chromosome de <i>C. metallidurans</i> CH34 .....	22
Figure 6 : Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds sur le mégaplasme de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	23
Figure 7 : Carte du plasmide pMOL28 .....	24
Figure 8: Carte du plasmide pMOL30 .....	25
Figure 9 : Mécanisme proposé pour la résistance au plomb liée au pMOL30 .....	27
Figure 10: Quelques pistes de développement pour les bactéries marines.....	31
Figure 11 : aspect microscopique de <i>Bacillus pumilus</i> G × 100 .....	42
Figure 12 : aspect macroscopique de <i>Bacillus pumilus</i> .....	43
Figure 13 : aspect microscopique de <i>Brevibacterium iodinum</i> (G × 100) .....	43
Figure 14 : aspect microscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G × 100) .....	43
Figure 15 : aspect macroscopique de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	44
Figure 16: aspect microscopique de <i>Alcaligenes faecalis</i> (G × 100) .....	44
Figure 17: aspect macroscopique de <i>Alcaligenes faecalis</i> .....	44
Figure 18: la Cinétique du taux d'élimination du mercure par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	47
Figure 19 : L'élimination de cadmium par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Alcaligenes faecalis</i> et le contrôle négative.....	48
Figure 20: Les concentrations de Cadmium ( $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt. h <sup>-1</sup> ) dans les boulettes de cellules .....	49
Figure 21 : Élimination du plomb du milieu par les 3 isolats lorsqu'ils sont cultivés dans un bouillon nutritif d'eau de mer modifié avec différentes concentrations de Pb .....	50

## ***Liste des tableaux***

Tableau 1: les différents métaux lourds et leurs risques pour l santé .	9
Tableau 2 : symboles des gènes de résistance	17
Tableau 3: Distribution des protéines de <i>R. solanacearum</i> conservées dans d'autres organisme	19
Tableau 4 : Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds sur le chromosome de <i>C. metallidurans</i> CH34	20
Tableau 5: L'identification des souches isolées par 16S rDNA	45
Tableau 6: Caractéristiques biochimiques des BHRM	46

## Sommaire

I.	Introduction générale .....	1
II.	Les Polluants métalliques et leurs impacts .....	3
A.	Les métaux lourds .....	3
B.	Les différents métaux lourds et leurs impact sur l'environnement et les organismes marins: 4	
1.	Le cadmium.....	4
2.	Le mercure.....	5
3.	Le plomb.....	6
4.	Le cuivre.....	7
5.	Le zinc .....	7
C.	les différents métaux lourds et leurs risques pour la santé.....	9
D.	Degré de pollution marine par les métaux lourds dans les sédiments marins des ports algériens.....	11
III.	Les Mécanismes de résistance des bactéries aux éléments traces métalliques .....	12
A.	Les Mécanismes de résistance aux ETM au niveau de milieu extracellulaire.....	12
1.	Immobilisation.....	13
2.	biosorption.....	13
3.	biominéralisation des métaux.....	14
B.	Les Mécanismes de résistance aux ETM au niveau de la membrane cellulaire .....	14
1.	Les transporteurs primaires .....	14
2.	Les transporteurs secondaires.....	15
C.	Les Mécanismes de résistance aux ETM dans le milieu intracellulaire .....	16
1.	Les chélateurs intracellulaires .....	16
2.	La Conversion enzymatique.....	16
IV.	Etudes bioinformatique des gènes de résistance .....	17
A.	Aperçu de la recherche de la résistance aux métaux.....	17

B.	Généralité sur <i>Cupriavidus metallidurans</i> CH34 et les gènes de résistance.....	18
C.	Structure du génome et caractéristiques générales .....	19
D.	Les gènes de résistance aux métaux lourds chez <i>C. metallidurans</i> CH34 .....	20
	1. Les gènes de la famille des HME-RND .....	20
	2. Les gènes codant pour les ATPases de type P.....	20
	3. Les gènes des familles CDF, CHR et ars .....	21
	4. Les gènes impliqués dans la régulation .....	22
E.	Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds .....	22
	1. Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds sur le chromosome de <i>C. metallidurans</i> CH34.....	22
	2. Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds sur le .....	23
	1. ....	23
F.	Les Plasmides.....	23
	1. Caractéristiques générales des plasmides pMOL28 et pMOL30. ....	24
G.	gènes transmis par les plasmides pour la résistance au plomb (exemple ) .....	25
V.	Les bacteries marines et leurs applications ( la bioremédiation ).....	28
A.	Généralité sur les bacteries marines .....	28
B.	Les bacteries marines hautement résistantes au mercure (BHRM) .....	29
C.	Biotechnologies bleues et bacteries . ....	29
D.	La bioremédiation des métaux lourds par des bacteries marines.....	31
	1. La bioremédiation.....	31
	2. Les principales méthodes de la bioremédiation .....	32
VI.	Matériel et méthodes .....	35
VII.	Isolement et caractérisation des bacteries .....	35
A.	Milieux utilisés pour l'isolement des bacteries.....	35
B.	Purification des souches bacteriennes.....	35
C.	Identification des bacteries étudiées .....	36
	1. Identification morphologique .....	36

2. Identification moléculaire.....	37
3. Caractérisation biochimique.....	37
VIII. Détoxification des métaux lourds par des bactéries résistantes au mercure (inspiré des travaux déjà réalisés).....	38
1. Détoxification du mercure.....	38
2. Désintoxication du Cadmium.....	39
3. Désintoxication du Plomb.....	40
IX. Résultats et discussion.....	42
A. Identification morphologique.....	42
1. Macroscopique.....	42
2. Microscopique.....	42
3. Exemple des quelques bactéries marines résistantes au métaux lourds (les resultats attendus).....	42
B. Identification moléculaire :.....	45
C. Caractérisation biochimique.....	46
Détoxification des métaux lourds par des bactéries résistantes au mercure (inspiré des travaux déjà réalisés).....	47
1. L'élimination du Mercure.....	47
2. Désintoxication du Cadmium.....	48
3. Désintoxication du Plomb.....	50
Conclusion et perspectives.....	53
Références bibliographiques.....	54

## **I. Introduction générale**

Avec l'accélération du développement économique, l'homme est de plus en plus responsable de la pollution de l'environnement. La diversité des produits d'origine industrielle conduit à une augmentation considérable du nombre de substances totalement étrangères au monde vivant, dites xénobiotiques. Certains de ces polluants ont contaminé les sols et proviennent des décharges, des installations industrielles, comme conséquence d'accidents de transport ou encore par le biais des rejets urbains et industriels ou en raison de pratiques agricoles.

La nécessité de dépolluer les sites contaminés a conduit au développement de nouvelles technologies de l'environnement qui ont pour objectif de détruire les composés xénobiotiques plutôt que de les accumuler dans les décharges. La bioremédiation est une option qui offre la possibilité de détruire les polluants ou de rendre moins toxiques, en utilisant des activités biologiques naturelles.

Les organismes marins qui contribuent directement à la dégradation des polluants sont principalement les bactéries et, à un degré moindre (ou indirectement), des champignons, des protozoaires. Les micro-organismes présents dans les environnements contaminés ont développé une résistance au mercure et jouent un rôle majeur dans la décontamination naturelle (Cursino et al. 1999 ; De et al. 2003). Les bactéries marines résistantes au mercure sont adaptées à la toxicité de divers produits chimiques généralement présents dans les eaux côtières. Les stratégies de bioremédiation du mercure toxique comprennent principalement la réduction enzymatique par microbes du mercure toxique (inorganique et organique) en mercure élémentaire volatil.

Les réorganisations génétiques telles que la réplication d'un certain nombre de gènes structurels et les mutations spontanées aident à la sélection naturelle (Cairns et al. 1988) de microbiote tolérant la toxicité.

Dans notre travail Nous avons visé deux objectifs le premier est d'isoler et identifier des bactéries marines résistantes aux métaux lourds. Et le deuxième est d'étudier la capacité de dégradation des métaux lourds par les souches isolées.

Ce travail vise à étudier deux parties une théorique contenant 4 chapitres :

Chapitre I : I. Les Polluants métalliques et leurs impacts.

Chapitre II : Les Mécanismes de résistance des bactéries aux ETM.

Chapitre III : Etudes bioinformatique des gènes de résistance .

Chapitre IV : Les bactéries marines et leurs applications ( la bioremédiation ).

Et autre expérimentale s'exprimée par 2 chapitre :

Chapitre IV : Matériel et méthodes.

Chapitre V : résultat et discussion

Et nous terminerons par une conclusion.

## II. Les Polluants métalliques et leurs impacts

Les polluants présents dans l'environnement peuvent être naturellement présents dans les milieux ou être d'origine anthropique : métaux lourds (Cu, Pb, Cr...) issus des industries minières et métallurgiques, fabrication de peinture et de colorant, combustion du charbon... quant à la pollution organique (HAP, PCB, furanne, dioxine...), elle est issue des industries agroalimentaires et des rejets industriels, domestique et urbains. Ces substances ont un caractère toxique affirmé. Dans le cadre de cette étude nous nous sommes intéressés plus spécialement aux polluants métalliques.

Selon Baize (1997) la contamination d'un milieu par les métaux lourds signe une augmentation des teneurs totales de ces éléments dans le milieu suite à des apports anthropiques importants. Selon Akujobi (2012), les métaux lourds constituent de sérieux polluants environnementaux, en particulier dans les zones à haute pression anthropique ; leur présence dans l'atmosphère, le sol et l'eau, même sous forme de traces, peut causer de graves problèmes à tous les organismes vivants.

### A. Les métaux lourds

Le terme métaux lourds est un mot ambigu dont la définition varie d'une source à l'autre (Baker et Walker, 1990) ; il tend à être remplacé par la notion d'éléments-traces métalliques (ou ETM) (Miquel, 2001).

La dénomination « métaux lourds » représente selon les auteurs, un éventail d'éléments parfois variable. Pendant longtemps, deux notions étaient le plus souvent prises en compte :

- une notion de densité :  $d > 5 \text{ kg/dm}^3$
- une notion de toxicité incluant parfois des éléments légers (Al, Be...) (Gadd, 1992 ; Nies, 1999).

La définition proposée au cours du congrès de Heidelberg de septembre 1983 inclut ces deux notions en les associant dans une classification en trois groupes basée sur l'activité et la toxicité biologique des éléments et sur leur chimie :

- classe A : affinité pour l'oxygène
- classe B ; affinité pour le soufre
- classe intermédiaire : entre les deux.

La toxicité étant croissante de la classe A à la classe B, et le terme « métaux lourds » désignant les métaux et métalloïdes toxiques indépendamment de leur densité (Bicocchi, 1998).



Certains de ces éléments, présents à l'état de trace, sont essentiels pour les organismes vivants (Cu, Zn, Co, Fe, Mn, Ni, Cr, V, Mo, Se, Sn), mais l'augmentation de leur concentration peut aboutir à des phénomènes de toxicité. D'autres éléments ne produisent que des effets néfastes (Pb, Hg, Cd) (Bonnet , 2000).

La toxicité des métaux lourds vis a vis des organismes vivants dépend de leur nature, la concentration, le mode d'action, la spéciation et de leur biodisponibilité (Alzieu ,1999 ; Bonnet , 2000).

## **B. Les différents métaux lourds et leurs impact sur l'environnement et les organismes marins:**

Les métaux lourds sont d'importants contaminants des écosystèmes et du réseau trophique. A la différence de plusieurs autres polluants, ils ne sont pas biodégradables.

### **1. Le cadmium**

Le cadmium figure parmi les métaux d'origine tellurique les plus préoccupants aussi bien du point de vue écotoxicologique que sanitaire. Comme pour la plupart des autres métaux, son cycle biogéochimique et son transfert éventuel dans les chaînes alimentaires dépendent en grande partie de l'activité des microorganismes, qui peuvent modifier sa forme chimique (Nelson et Donkin, 1985) et gouverner ainsi sa mobilité dans les milieux physiques ou biologiques (Gauthier et al., 1984).

Les aspects les plus importants des interactions entre le cadmium et les bactéries résident dans la fixation du métal par les cellules, son accumulation et sa transformation sous une forme plus ou moins accessible et utilisable par les autres organismes. De ce point de vue, les espèces bactériennes à Gram négatif caractérisent généralement par une capacité d'accumulation moins grande que celle des espèces à Gram positif ( Galdiero et al., 1968; Beveridge et Koval, 1981 ; Macaskie et Dean, 1982).

#### **a) Impact du cadmium sur l'environnement**

Il est assez mobile et facilement disponible, il risque soit de passer dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire des végétaux pour lesquelles il présente une forte phytodisponibilité, il peut s'accumuler dans les racines ou les parties aériennes (Grant et al., 1998), comme il peut migrer en profondeur pour aller contaminer les nappes phréatiques (Jacobs et Foreman, 2005).

## **b) Impact du cadmium sur les organismes marins**

Les concentrations de 0.05 à 1.2 µg/l peuvent provoquer des effets physiologiques et des inhibitions de croissance chez les organismes marins ( Chiffolleau et al.,2001), les crustacés étant beaucoup plus sensibles que les poissons ( Belhoucine, 2012). La pollution chronique des poissons se traduit par la perturbation du système nerveux centrale, la nécrose des gonades males au-delà de 25µg/l et la nécrose des lamelles branchiales (Augier, 2008).

## **2. Le mercure**

Le mercure est le plus toxique des métaux lourds (Gerlach, 1981) , il occupe la sixième position du liste des composés dangereux (Nascimento et Chartone-Souza, 2003). Il pénètre directement ou indirectement les écosystèmes sous diverses formes, les principales étant: métallique (HgO), ionique (Hg<sup>++</sup>), phénylmercurique (~5-Hg<sup>+</sup>), méthylmercurique (CH<sub>3</sub>-Hg<sup>+</sup>) ou alkoxyméthylmercurique (CH<sub>3</sub> - O - CH<sub>2</sub> - Hg<sup>+</sup>). Selon les organismes impliqués et les conditions physico-chimiques existantes, le mercure subit diverses transformations dans l'environnement.

Le mercure est le seizième élément le plus rare sur terre ; Toutefois, les concentrations de mercure dans le monde ont été multipliées par trois environ en raison de diverses activités anthropiques et les océans du monde sont les principaux réservoirs de son dépôt (Mason et al. 2012 ; De et al. 2014 ). il est suggéré que les sources naturelles représentent environ 10 % des 5 500 à 8 900 tonnes de mercure estimées en cours de libération dans l'atmosphère de toutes les sources (De et al. 2014). Comme la combustion du charbon les produits pétroliers, les obturations dentaires, l'utilisation des fongicides mercuriels dans l'agriculture, la fabrication du papier et les catalyseurs au mercure dans les industries.

Le premier cas d'empoisonnement grave au mercure a été découvert dans la baie de Minamata, au Japon en 1956 chez les personnes qui ont consommé des poissons de mer contaminés par le mercure . Des milliers de personnes ont été touchées et 887 personnes ont été tuées (Nascimento et Chartone- Souza , 2003 ).

## **a) Impact du mercure sur l'environnement**

Dans le monde, de nombreuses zones contaminées par du mercure constituent une menace pour les gens et l'environnement (Fukuda et al., 1999; Horvat et al.,1999).

Le méthylmercure est le plus toxique de toutes les formes de mercure, (De et al. 2014 ). Le mercure est toxique car il se lie à des groupes sulfhydryles d'enzymes et de protéines, ce qui inactive les fonctions cellulaires et les processus métaboliques comme la respiration et la photosynthèse (De Fillipis, 1981).

Les plantes sont hautement sensibles aux métaux lourds, leur croissance et leur métabolisme cellulaire sont gravement altérés (Hewitt, 1959; Foy, Chaney et White, 1978), selon Ovemell (1976) la photosynthèse est le premier processus physiologique affecté par le mercure .

### **b) Impact du mercure sur les organismes marins**

La dilution , la dispersion de mercure dissous et naturel ainsi les causes d'origine humaine ( Les composés inorganiques et organiques du mercure tels que le mercure ( $Hg^0$  ), ( $Hg^{+2}$  ), le chlorure de méthylmercure (MMC) et diméthylmercure sont rejetés par des eaux usées non traitées dans le milieu marin )(Wang et al, 2004 ; Das, 2012 ; De et al, 2014 ). Ce qui entraînent une augmentation des concentrations de mercure dans le milieu marin. De plus, le mercure a une affinité à se lier aux matières organiques se formant généralement complexes organomercuriels récalcitrants et hautement toxiques dans les sédiments marins (Gerlach, 1981 ; Misra,1992) .

## **3. Le plomb**

Le plomb est un élément chimique toxique, cumulatif pour l'homme, la faune et la flore (Chassard-Bouchaud, 1995). Sa présence dans les eaux ou le sol ne peut être que néfaste.

La dispersion du plomb dans l'environnement par l'activité humaine existe depuis plus de 5 000 ans et les effets toxiques de ce métal sur l'homme se sont fait sentir dès l'antiquité (Daniel et al., 1993). Le saturnisme chez la classe au pouvoir a même été suggéré comme une des causes de la chute de l'Empire romain (Nriagu, 1983). .

### **a) Impact du plomb sur l'environnement**

Le plomb présente une toxicité aiguë pour l'ensemble des organismes, de plus cet élément se concentre de manière irréversible tout au long de la chaîne alimentaire (Gaujous, 1993). La toxicité du plomb vis-à-vis des plantes dépend de l'espèce considérée et du substrat de culture dans une fourchette de 25 ppm pour la tomate à plus de 2000 ppm pour le riz (Adriano, 2001). L'excès de plomb dans les plantes induit des troubles physiologiques et biochimiques diminuant la photosynthèse et la transpiration induisant ainsi un retard de croissance (Bazzaz et al., 1974). il diminue aussi la croissance des racines spécialement les racines principales même en présence de faibles concentrations. Elles deviennent épaisses, courtes et très ramifiées. Aussi, des précipitations de plomb ont été observées dans les zones apicales chez les plantes traitées par le plomb (Kopittke et al., 2007a.b). Cette toxicité vis-à-vis de la flore et faune du sol peut aboutir à l'inhibition de la nitrification.

## **b) Impact du plomb sur les organismes marins**

partir de 1 µg/l, apparition d'effets se traduisant par des perturbations du métabolisme des autres métaux divalents, notamment le calcium, le magnésium et le cuivre ( Marchand et Kantin, 1997). La forme la plus absorbée est le Pb<sup>++</sup> (Bisson et al., 2003). Les invertébrés marins au stade embryonnaire sont plus sensibles que les adultes (Marchand et Kantin, 1997).

## **4. Le cuivre**

Le cuivre est un élément essentiel chez l'homme et l'animal. il est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques, notamment pour la formation d'hémoglobine et la maturation des polynucléaires neutrophiles (OMS.IPCS, 1998) . il est assez fréquemment retrouvé dans la nature, par exemple sous forme de chalcoppyrite. Ses caractéristiques chimiques n'autorisent cependant pas l'existence de fortes concentrations dans les eaux naturelles (Baize, 1997).

### **a) . Impact du cuivre sur l'environnement**

Cependant, chez les plantes, le cuivre peut provoquer une phytotoxicité dans certains cas. Il induit des symptômes de la chlorose ferrique et une diminution de l'absorption du fer et du phosphore (Loué, 1986). Il induit également une réduction de la photosynthèse et une réduction de la croissance des feuilles et des racines (Pedersen et al., 2000 ; Mateos-Naranjo et al., 2008) et diminue la nodulation des légumineuses même à faible concentration (Kopittke et al., 2007a). Aussi, le cuivre s'accumule dans les racines (Pedersen et al., 2000 ; Kopittke et al., 2009). Pour cette raison, la concentration de Cu dans les plantes est très bien réglementée (Peñarrubia et al., 2010).

### **b) Impact du cuivre sur les organismes marins**

Sa toxicité vis à vis des organismes marins dépends de la forme chimique du cuivre et de son état d'oxydation ( Chiffolleau, 2001). Le cuivre complexé est moins toxique que le cuivre à l'état ionique (Casas, 2005). Il devient toxique pour les larves d'huitres lorsque sa concentration dépasse 10 µg/g, avec des effets sur la reproduction et l'éclosion des œufs (Bisson et al., 2005) et il inhibe la croissance du phytoplancton à partir de 4 µg/l (Chiffolleau, 2001).

## **5. Le zinc**

Le Zn est un élément essentiel et peu toxique pour l'homme et ses dangers résultent plutôt d'une déficience (Bourrelier et Berthelin, 1998). L'agence américaine de protection de l'environnement

(EPA) affirme que le zinc se trouve à l'état naturel, principalement sous forme de sulfure de métal, et plus spécifiquement de sulfure de plomb, de cuivre, de cadmium, de fer. Pitt et al. (1994)

#### **a) Effets du zinc sur la santé**

Le zinc est un oligoélément essentiel pour l'homme. Il est nécessaire au fonctionnement de nombreuses métalloenzymes (alcool déshydrogénases, phosphatases, ADN et ARN polymérase...). Il est donc indispensable pour maintenir un métabolisme normal des acides nucléiques, des protéines et des membranes et joue un rôle important dans la division cellulaire et le maintien de la structure des gènes. De ce fait, les effets toxiques du zinc peuvent être liés soit à une carence soit à une surexposition à ce métal (Bisson et al. 2005).

#### **b) Impact du zinc sur l'environnement**

A fortes doses, le zinc peut impacter les poissons, les plantes et s'accumuler dans les sols avant d'atteindre les nappes (Pardo et al., 2003), il est présent naturellement dans l'air, l'eau et le sol. La plus grande partie du zinc est rejetée par les activités industrielles, telles que l'exploitation minière, la combustion du charbon et des déchets et l'industrie de l'acier. Les eaux naturelles sont polluées au zinc du fait de sa présence en grandes quantités dans les eaux usées, non traitées de façon satisfaisante, avec pour conséquence une redéposition du zinc sur les rives de rivières. Le zinc est une sérieuse menace pour la production végétale dans les terres agricoles. Malgré cela les engrais contenant du zinc sont toujours utilisés parce qu'il est un oligoélément essentiel pour le fonctionnement de nombreuses métalloenzymes et indispensable pour maintenir un métabolisme normal chez les plantes . Enfin le zinc peut affecter l'activité biologique du sol, car il a une influence négative sur l'activité des micro-organismes et les vers de terre, impactant ainsi la décomposition de la matière organique (Bisson et al. 2005). Il est fortement phytodisponible, et se trouve en quantité plus élevées dans les racines que dans les parties aériennes. Il est peu phytotoxique (Long et al., 2003 ; Kim and McBride, 2009), sauf sur les sols fortement pollués.

Le zinc affecte la croissance et la production de la matière sèche, en particulier des racines, il affecte aussi la teneur en chlorophylle et d'autres pigments et l'efficacité photosynthétique. Il influence également la nutrition minérale et peut entraîner une déficience en fer induisant la chlorose (Sagardoy et al., 2009 ; Manivasagaperuma et al., 2012).

#### **c) Impact du zinc sur les organismes marins**

selon Asso (1982), Le zinc à une concentration élevée a un effet inhibiteur de la croissance et néfaste sur la reproduction des organismes marins . D'après Augier (2008), il induit la formation de

composés insolubles au niveau des branchies des mollusques et des poissons, ce qui conduit à une perturbation de la fonction respiratoire.

### C. les différents métaux lourds et leurs risques pour la santé

L'exposition à une fortes doses de métaux lourds cause de nombreuses pathologies sévères des maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et de Parkinson), les cancers du poumon, des voies respiratoires et digestives ou encore l'insuffisance rénale. Ils pourraient même jouer un rôle dans le déclenchement de troubles psychologiques et neurologiques comme l'autisme et plein d'autres . les sources d'exposition et les risques sanitaires des méteaux sont présentés dans le tableau suivant (tableau 1 ). (Ruggieri et al., 2017).

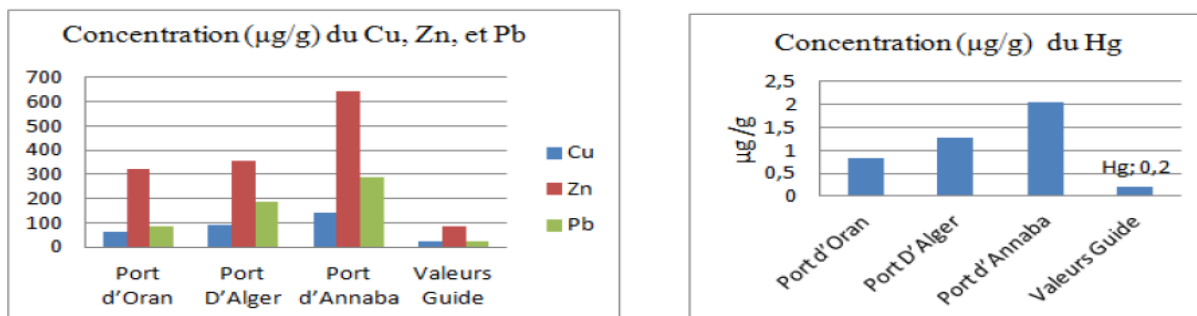
**Tableau 1: les différents métaux lourds et leurs risques pour l santé (Ruggieri et al., 2017).**

<b>Composé</b>	<b>sources d'exposition pour la population générale</b>	<b>risques sanitaires</b>
<b>Antimoine</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– retardateurs de flamme</li> <li>– plastique PET, matériaux pigmentés</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– irritant pour la peau, les muqueuses, et l'appareil digestif si ingestion</li> <li>– très toxique sous forme de gaz</li> </ul>
<b>Arsenic</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– eau et alimentation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>–cancérogène</li> <li>– perturbateur endocrinien</li> </ul>
<b>Cadmium</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– alimentation</li> <li>– alliages, revêtements</li> <li>– pigments</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– très toxique</li> <li>– troubles osseux</li> <li>– cancérogène</li> </ul>
<b>Chrome</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– industrie</li> <li>– produits de tannerie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– cancers</li> <li>– troubles gastro-intestinaux</li> <li>– troubles hématologiques</li> </ul>
<b>Cuivre</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– produits médicaux</li> <li>– tubes et tuyaux</li> <li>– ustensiles de cuisine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– hépatotoxique et néphrotoxique</li> <li>– irritant</li> <li>– reprotoxique</li> </ul>

<b>Plomb</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– habitations : tuyaux, peintures anciennes</li> <li>– batteries</li> <li>– pigments et composés chimiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– saturnisme : baisse du QI, anémie, troubles du comportement, problèmes rénaux, pertes auditives</li> </ul>
<b>Mercure</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– alimentation (poissons)</li> <li>– dispositifs médicaux</li> <li>– piles</li> <li>– lampes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– toxique pour les voies respiratoires, les reins et le cerveau</li> <li>– toxique pour le fœtus</li> </ul>
<b>Nickel</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– revêtements</li> <li>– bijouterie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– très allergisant</li> <li>– certains composés cancérigènes</li> </ul>
<b>Sélénium</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– agriculture</li> <li>– pigments</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– nausées, diarrhées</li> <li>– fragilisation des ongles, perte de cheveux</li> <li>asthénie</li> </ul>
<b>Tellure</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– optique infrarouge</li> <li>– caoutchouc, céramiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– irritant</li> <li>– troubles digestifs</li> <li>– somnolence, céphalées</li> <li>– atteintes du foie et du système nerveux central</li> </ul>
<b>Thallium</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– éclairage</li> <li>– médecine</li> <li>– insecticides</li> </ul>	Neurotoxique
<b>Étain</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– objets quotidiens</li> </ul>	peu toxique

## D. Degré de pollution marine par les métaux lourds dans les sédiments marins des ports algériens

La distribution des métaux lourds dans les sédiments marins des ports Algériens (Fig 1) est régie par plusieurs facteurs : la granulométrie, la teneur en matière organiques et la localisation des sources de pollution (Atroun, 2015) .



**Figure 1: Distribution des concentrations de Cu, Zn, Pb et Hg dans les sédiments superficiels des ports d'Oran, Alger et d'Annaba (Atroun, 2015).**

La comparaison du degré de contamination des métaux lourds des sédiments superficiels des 3 ports choisies montrent clairement que le port de Annaba est le plus pollué puis le port d'Alger et en fin le port d'Oran.



### **III. Les Mécanismes de résistance des bactéries aux éléments traces**

#### **métalliques**

Les microorganismes, en particulier les bactéries, peuvent interagir avec les métaux via différents mécanismes (Ledin, 2000). à cause de la grande variété des ETM et de leurs effets opposés, ils doivent contrôler de façon stricte la concentration intracellulaire en ETM, réguler et maintenir l'homéostasie (Nies, 1999) et développer des stratégies de résistance aux ions métalliques, qu'ils sont liés à leur valence, leur taille, leur indice de solubilité, leur potentiel redox ainsi que la forme sous laquelle l'élément il se trouvent dans l'environnement (Sébastien, 2007).

En réponse à la présence de métaux, les processus cellulaires sont réarrangés de manière à répondre le plus précisément possible au stress induit par l'élément métallique. Nous pouvons observer une réponse en deux temps :

Dans un premier temps, une réponse précoce permet l'induction de gènes impliqués dans le remplacement des protéines endommagées et la synthèse de molécules nécessaires à l'acclimatation à la nouvelle stoechiométrie métallique (régulateurs de transcription, protéases, transporteurs intracellulaires, synthèse de protéines, systèmes antioxydants, chélateurs et protéines membranaires d'export). (Kaur et al. 2006 ; Yepiskoposyan et al. 2006).

Dans un deuxième temps, seule subsiste l'induction de gènes spécifiques au stress métallique (systèmes antioxydants, chélateurs, transporteurs membranaires) (Kaur et al. 2006 ; Yepiskoposyan et al. 2006).

#### **A. Les Mécanismes de résistance aux ETM au niveau de milieu extracellulaire**

Les cellules excrètent et libèrent des molécules organiques qui vont se lier aux métaux, les immobiliser dans le milieu et limiter leur réactivité. Ces molécules peuvent être non spécialisées (acides nucléiques, exopolysaccharides, acides organiques) ou spécialisées (chélateurs spécifiques) (Schalk et al. 2011) (Fig 2) . Tous les mécanismes sont interconnectés et leur importance va dépendre du type de métal, du type d'organismes, des concentrations en métaux et en ligands, du potentiel redox, du pH et de la cinétique des transferts de molécules.

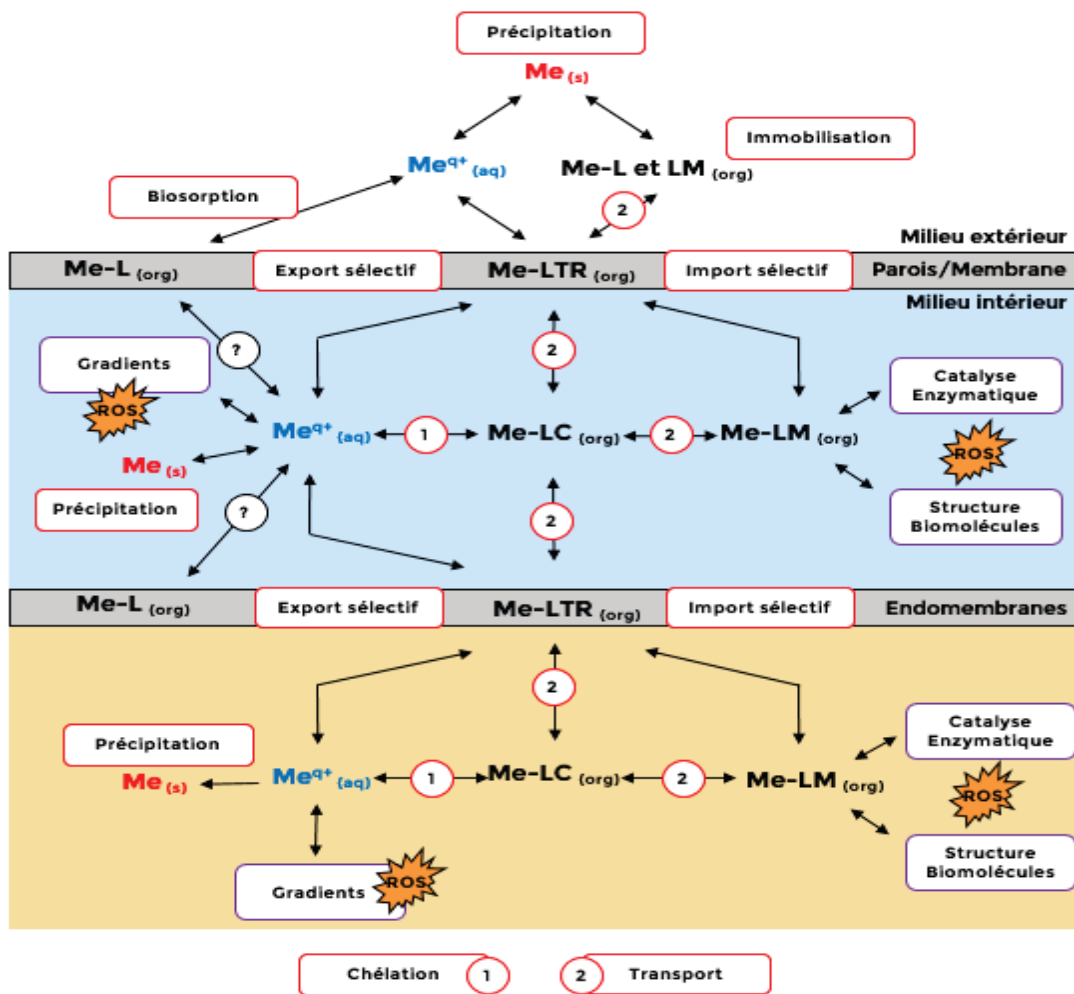


Figure 2 : Schéma simplifié des mécanismes de résistance aux métaux dans le milieu extracellulaire (Schalk et al. 2011).

(LC) : des chélateurs, (LTR) : des transporteurs ou des récepteurs membranaires, (LM) : des molécules intervenant dans le métabolisme comme les protéines, lipides et saccharides, Me(s): Métaux en phase solide  $Me_{q+}(aq)$  : Cations métalliques en phase aqueuse où  $q+$  représente la charge , Me-L (org) : Métaux liés à un ligand en phase organique.

Les mécanismes de régulation des métaux sont entourés en rouge alors que les fonctions métaboliques, dans lesquels les métaux sont impliqués, sont entourées en violet.

## 1. Immobilisation

## 2. biosorption

Biosorption : Il s'agit d'une approche largement utilisée pour la bioremédiation des métaux et des radionucléides, impliquant la séquestration passive des métaux par leur interaction avec des entités biologiques vivantes ou mortes. Elle est utilisée efficacement dans le traitement des eaux usées (Schiewer et Volesky 2000 ; Jang et al. 2001).

### 3. biominéralisation des métaux

La biominéralisation est un processus de précipitation d'un métal insoluble avec l'interaction des produits métaboliques des microbes. Ces processus aboutissent à la formation de minéraux et à des dépôts géochimiques. La biominéralisation ajoute de la valeur à la recherche sur l'interaction métal-microbe (Ehrlich 1999 ; Banfield et al. 2000 ; White et Gadd 2000).

#### B. Les Mécanismes de résistance aux ETM au niveau de la membrane cellulaire

Les transporteurs membranaires permettent des échanges constants d'éléments entre les milieux intra- et extracellulaire. En fonction des familles de transporteurs (Nies 1999 ; Srivastava & Kowshik 2013)

Chez les bactéries, la résistance aux métaux lourds nécessite, le plus souvent, un système d'efflux ou extrusion (Monchy ,2007 ). Chez les bactéries Gram-, ce transport actif, qui doit être capable de faire passer les ions à travers deux membranes, est principalement assuré par les transporteurs primaires et secondaires. Pour les premiers, le transport est directement couplé à l'hydrolyse de l'ATP (transporteur ABC, ATPase). Pour les seconds, le passage au travers de la membrane se fait grâce à un gradient électrochimique (protéines RND, MFS, CDF).

#### 1. Les transporteurs primaires

##### a) ATPases de type P

Les ATPases de type P sont des acteurs majeurs dans la résistance aux cations divalents en assurant leur extrusion de la cellule (Fig 3) Il contient 5 sites . 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 lourd(Monchy ,2007 ).

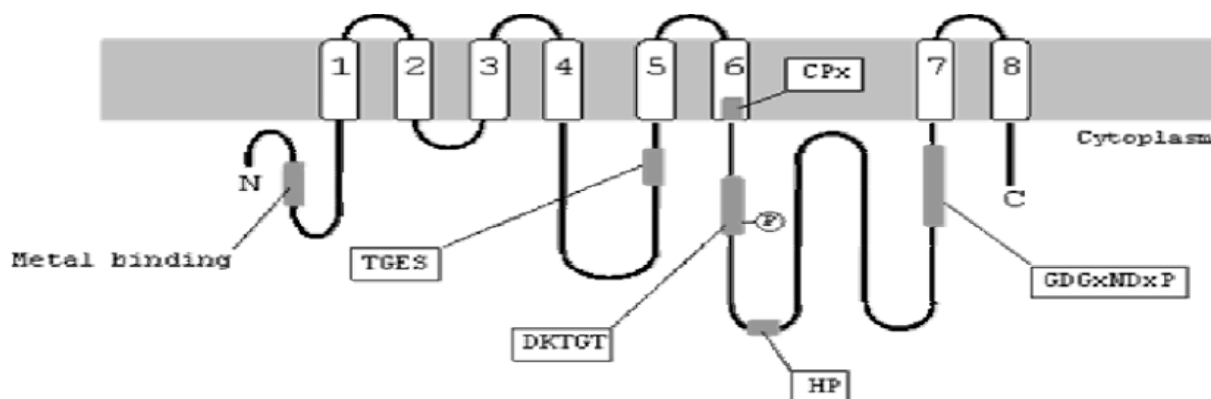


Figure 3 : Structure schématiques des ATPases de type P1 impliquées dans le transport des métaux lourds . (Monchy,2007 ).

## 2. Les transporteurs secondaires

### a) Les systèmes Resistance Nodulation-Cell Division (chimioosmotiques)

Les transporteurs bactériens impliqués dans la résistance, la nodulation et la division cellulaire constituent la base de la superfamille des systèmes RND ( Fig 4 ) (Resistance Nodulation-Cell Division) (Dong & Mergeay, 1994; Saier et al., 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* (Tang et al., 1999).

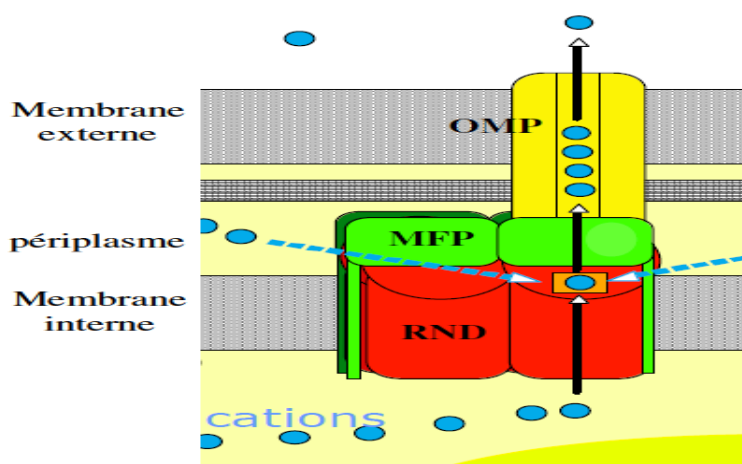


Figure 4 : Représentation schématique d'un complexe de type RND(Monchy,2007 ).

### b) Le système CDF (Cation Diffusion Facilitators)

La famille des "Cation Diffusion Facilitators" ou CDF est constituée de systèmes composés d'une seule protéine. Elle forme un canal emprunté par les ions pour sortir de la cellule de manière passive, par simple diffusion. Ces systèmes existent chez les procaryotes et chez les eucaryotes(Paulsen & Saier, 1997) La plupart des protéines CDF identifiées transportent le cobalt, le cadmium et/ou le zinc. Le transport est assuré par un gradient chimioosmotique (gradient de potentiel ou de pH) ou un gradient de potassium (Nies, 1992).

### c) Les 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).

## **C. Les Mécanismes de résistance aux ETM dans le milieu intracellulaire**

Une fois dans le cytosol, les métaux libres réactifs sont pris en charge par plusieurs types de molécule organique. Ces molécules ou ligands (chélateurs intracellulaires, acides organiques) peuvent se lier à plusieurs métaux différents comme par exemple les métallothionéines qui peuvent se lier au  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{+}$ ,  $Cd^{2+}$  ou les phytochélatines se liant au  $Cd^{2+}$  (Blindauer *et al.*, 2002).

### **1. Les chélateurs intracellulaires**

Les chélateurs intracellulaires sont des protéines de petite taille et contiennent des régions riches en acides aminés à forte affinité pour les métaux comme les Cys, Glu, Gly, His,... Ils permettent le transport des éléments métalliques vers des organites et le transfert des métaux à d'autres molécules organiques. Afin d'assurer les processus cellulaires de base, un pool de chélateurs doit être maintenu dans le cytosol. La production de certains d'entre eux est par ailleurs souvent induite par différents stress et notamment la présence de métaux. (Sies 1999 ; O'Halloran & Culotta 2000 ; Palumaa 2013). Ces chélateurs sont des molécules centrales dans le métabolisme et la résistance métallique car ils régulent les flux de métaux cellulaires.

### **2. La Conversion enzymatique**

La conversion enzymatique ou La bio-atténuation consiste à convertir le métal en une forme moins toxique ou en une autre forme qui peut être plus facilement et plus rapidement évacuée de la cellule. Cette transformation peut se faire par voie enzymatique, par oxydation ou par réduction jusqu'à un état d'oxydation moins toxique pour éliminer les ETM (Silver et Phung, 1996). par exemple, la mercurique réductase qui catalyse la réduction de l'ion  $Hg^{2+}$  en  $Hg^0$  (Mukhopadhyay et al. 2002).  $Hg^0$  forme volatile (moins toxique) .

## IV. Etudes bioinformatique des gènes de résistance

### A. Aperçu de la recherche de la résistance aux métaux

En ce qui concerne la résistance aux métaux lourds, les premières études ont porté sur le locus *czc* (résistance au Cd (II), Zn (II) et Co (II)) situé sur pMOL30 ( Nies et al.,1987 ; Nies et al.,1989 ; Mergeay et al., 2003) pour les transposons au mercure Tn 4378 (pMOL28) et Tn 4380 (pMOL30) (Diels et al 1985), à la résistance au Ni (II), puis au locus *cnr* correspondant sur pMOL28 ( Liesegang, et al.,1993). La résistance au chromate a également été étudiée très tôt (Nies et al.,1989 ). Dans la souche apparentée *Ralstonia metallidurans* 31A (anciennement *Alcaligenes xylooxidans* 31A ou parfois *Achromobacter xylooxidans* s 31) (Brim et al., 1999 ; Goris et al., 2001) ,la résistance médiée par le *ccn* au Ni (II) s'est avérée très élevée avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 40 mM (la valeur CMI pour le Ni (II) conférée par le *cnr* le déterminant génétique de la souche CH34 n'est pas supérieur à 2,5 mM) (Schmidt et al., 1994) . Parmi tous les métaux pour lesquels une résistance plasmidique des bactéries hétérotrophes a été rapportée, une telle résistance élevée n'a été observée que pour Ni (II) (Stoppel et al.,1995). Un niveau élevé de résistance similaire au Ni (II) a été décrit dans la souche *Arthrobacter ilicis* qui a été isolée dans des sédiments riches en nickel d'une usine métallurgique au Tyrol, en Autriche (Margesin et al.,1997).

**Tableau 2 : symboles des gènes de résistance (Benotmane, 2007)**

<i>Symbole</i>	Gène
<i>Ars</i>	résistance à l'arsenic
<i>Cnr</i>	résistance à cobalt, nickel
<i>Cop</i>	résistance au cuivre "copper"
<i>Czc</i>	résistance au cadmium, zinc, cobalt
<i>Mer</i>	résistance au mercure
<i>Ncc</i>	résistance au nickel, cobalt, cadmium
<i>Pbr</i>	résistance au plomb
<i>Sil</i>	résistance à l'argent "silver"
<i>Chr</i>	Résistance au chromate

## B. Généralité sur *Cupriavidus metallidurans* CH34 et les gènes de résistance

De nombreux microbes environnementaux ont développé des stratégies nouvelles ou meilleures pour survivre aux conditions de stress des métaux via l'échange d'ADN, c'est-à-dire par transfert de gènes. Novick et Roth C (1968) ont été parmi les premiers à rendre compte de la résistance aux métaux lourds à médiation plasmidique lorsqu'ils ont découvert des loci génétiques distincts sur les plasmides de *Staphylococcus aureus* codan. Depuis lors, le transfert de gènes impliqués dans la résistance aux métaux lourds a été documenté pour de nombreuses espèces bactériennes différentes (Silver, 1996 ; Nies, 1999 ; Mergey, 2000) la résistance à l'arsénite, l'antimoine, le plomb, le cadmium, le zinc et le mercure (Novick et Roth, 1968).

De nombreuses bactéries présentes dans l'environnement se sont adaptées à la présence de métaux lourds toxiques. Au cours des 30 dernières années, cette tolérance aux métaux lourds a fait l'objet de recherches approfondies. *C. metallidurans* CH34 est considérée comme une bactérie spécialisée dans la résistance aux métaux lourds car elle contient quasiment tous les 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; Nies *et al.*, 1987; Nies *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1991; Nies, 1992; Liesegang *et al.*, 1993; Schmidt & Schlegel, 1994; Nies, 1995; Tibazarwa *et al.*, 2000 ; Borremans *et al.*, 2001; Juhnke *et al.*, 2002; Nies, 2003; Ledrich *et al.*, 2005; Nies *et al.*, 2006). Cette souche tolère des concentrations élevées d'ions de métaux lourds, y compris mais sans s'y limiter nécessairement  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Au}^{3+}$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{AsO}_2^-$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{SeO}_3^{2-}$ ,  $\text{SeO}_4^{2-}$  et  $\text{Sr}^{2+}$ , avec au moins 24 groupes de gènes répartis sur quatre réplicons, (Janssen, 2010)

quelques observations importantes liées au transfert horizontal de gènes et à l'acquisition de HMR peuvent être faites.

- lors de sa découverte, la souche CH34 a été décrite comme un bon accepteur de gènes étrangers (Lejeune *et al.*, 1983).
- la souche CH34 est un bon receveur de grands plasmides qui sont impliqués dans l'HMR ou l'hydrogénéotrophie d'autres souches de *Cupriavidus* (Diels *et al.*, 1995) .
- la souche CH34 a servi de receveur et de donneur dans les microcosmes du sol pour évaluer la dissémination des gènes (recombinants) favorisée par les plasmides à large spectre d'hôtes (Top *et al.*, 1990 ; De Rore *et al.*, 1994) ou pour capturer directement de nouveaux plasmides à large spectre d'hôtes (van Elsas *et al.*, 1998 ; Tauch *et al.*, 2002) et des plasmides porteurs de gènes de dégradation des xénobiotiques (Dielset *et al.*, 1993).

*C. metallidurans* CH34 réalise la détoxification des métaux par l'action concertée de systèmes d'efflux comprenant au moins huit ATPases de type P et une grande variété de systèmes pour RND (pour la résistance, la nodulation et la division cellulaire) et le CDF (pour la facilitation de la diffusion cationique). Il contient également des transporteurs spécialisés pour certains ions métalliques, où l'efflux peut être suivi d'une séquestration ou d'une complication des métaux (Hynninen et al., 2009 ; Janssen, 2010).

### C. Structure du génome et caractéristiques générales

la séquence complète du génome de la souche CH34 et l'annotation manuelle de tous ses gènes. Le génome de *C. metallidurans* CH34 est composé de deux grands chromosomes circulaires CHR1 et CHR2 de respectivement 3 928 089 pb et 2 580 084 pb et de deux mégaplasmides pMOL28 et pMOL30, respectivement, 171 459 pb et 233 720 pb. Au moins 25 loci pour la résistance aux métaux lourds (HMR) sont répartis sur les quatre réplicons (Van Houdt et al., 2009)

Les génomes de *R. solanacearum* et *R. metallidurans* semblent partager un grand nombre de séquences orthologues ( tableau 4 ). De plus, les principales réplicons de *R. solanacearum* contiennent un certain nombre de gènes qui présentent une similitude de séquence substantielle avec les gènes d'autres bactéries ( tableau 4): le chromosome de 3,5 Mo de *R. solanacearum* contient jusqu'à 65% des gènes présentant une bonne identité avec celles de *R. metallidurans* alors que ce pourcentage tombe à 30% dans le mégaplasmide. Ces chiffres sont beaucoup plus élevés que les chiffres obtenus dans la comparaison de *R. solanacearum* avec les génomes disponibles d'autres protéobactéries  $\beta$  et  $\gamma$  ( tableau 3). (Mergey et al., 2003).

**Tableau 3: Distribution des protéines de *R. solanacearum* conservées dans d'autres organismes ( Mergey et al., 2003).**

	Chromosome	Megaplasmid
<i>Ralstonia metallidurans</i>	2148	661
<i>Neisseria meningitidis</i>	856	124
<i>Xylella fastidiosa</i>	792	137
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1558	588
<i>Escherichia coli</i>	1133	322
Protéines inconnues	315	433



**Tableau 4 : Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds sur le chromosome de *C. metallidurans* CH34 (Janssen , 2010).**

Replicon	Gene cluster <sup>b</sup>	Metal(s)
CHR1+%44	<i>103+5cdfX pbrR<sub>2</sub> cadA pbrC<sub>2</sub>, pbrR<sub>3</sub></i>	Pb <sup>2+</sup>
CHR1	<i>merRTPA9A0</i>	Hg <sup>2+</sup>
CHR2	<i>chrBAF</i>	CrO <sub>4</sub>
CHR2	<i>cusDCBAF</i>	Ag <sup>+</sup> , Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup>
CHR2	<i>copSRABCD</i>	Cu <sup>2+</sup>
CHR2	<i>zntA czcICDBA ubiG czc SRL/ hns mmmQ (}</i>	Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>
CHR2	<i>nimBA AC (*)</i>	Ni <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>
CHR1	<i>arsPHC<sub>1</sub>BC<sub>2</sub>IRM</i>	HAsO <sub>4</sub> , AsO <sub>2</sub>
CHR1	<i>Cupric</i>	Ag <sup>+</sup> , Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup>
CHR1	<i>hmzRS yodB hmzBDA</i>	divalent metals

## **D. Les gènes de résistance aux métaux lourds chez *C. metallidurans* CH34**

### **1. Les gènes de la famille des HME-RND**

Il existe 13 gènes codant pour un système d'efflux à trois composants de la famille des HME-RND ont été identifiés dans le génome de *C. metallidurans* CH34 . L'un est localisé sur le plasmide pMOL28 (*cnr*) , trois sur le plasmide pMOL30 (*czc*, *sil* et *ncc*) , sept sur le mégaplasmide (*cus*, *nim*, *hmu*, *hmv*, *hmw*, *hmx*, *hmy*) et enfin deux sont portés par le chromosome (*agr* et *hmz*) .

### **2. Les gènes codant pour les ATPases de type P**

Il existe 11 gènes relatifs à des ATPases de type P. Quatre sont localisés sur le chromosome, *cupA*, *cadA*, *fixI1* et *fixI2* , un, *zntA*, sur le mégaplasmide , et trois sur pMOL30 , *czcP*, *pbrA* et *copF* . En nombre de gènes, les ATPases de type P sont, après les HME-RND, le mécanisme de résistance le plus représenté chez *C. metallidurans* CH34.

### 3. Les gènes des familles CDF, CHR et ars

Les CDF : le génome de *Cupriavidus metallidurans* contient trois gènes codant pour des CDF : *czcD* localisé dans la région *czc* de pMOL30, et deux localisés sur les mégaréplicons mais qui ne semblent pas appartenir à des opérons de résistance aux métaux lourds (Nies, 2003).

Les CHR : cette famille de transporteurs du chromate est caractérisée par la pompe ChrA codé par l'opéron *chrIBACEF* localisé sur pMOL28 (Juhnke *et al.*, 2002). Trois gènes similaires à *chrA* sont présents dans le génome de *C. metallidurans*, un sur le mégaplasmide dans l'opéron *chrBAF*, et deux sur le chromosome.

Les gènes *ars* : *Cupriavidus metallidurans* est résistante à l'arsenic et possède sur son chromosome un opéron *arsR-DarsR-ORF-arsC-arsB/C-arsC-arsH* similaire à celui trouvé chez *Herminiimonas arsenicoxydans* (Muller *et al.*, 2007).

#### 4. Les gènes impliqués dans la régulation

Les gènes de régulation sont souvent proches des gènes de structure qu'ils contrôlent, soit en aval dans le même sens de transcription (ex: *copABCD copRS* ; *czcCBA czcDRS*), soit en amont avec une transcription divergente (*copSR copABCD* ; *merR merTPAD* ; *pbrTR pbrABCD*).

### E. Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds

#### 1. Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds sur le chromosome de *C. metallidurans* CH34

Le chromosome de CH34 (3928089 pb) (Fig 5) est orienté en fonction de son origine de réplication (*repA*). Les groupes de gènes soulignés en bleu correspondent à des systèmes d'extrusion de type cation-proton antiporter à trois composants, les groupes de gènes soulignés en rouge codent pour des ATPases d'extrusion de type P. L'opéron *ars* une gènes *arsR* tronqué, et. la flèche indique la position et l'orientation des transposons "thallium" (Fig 5) (monchy,2007).

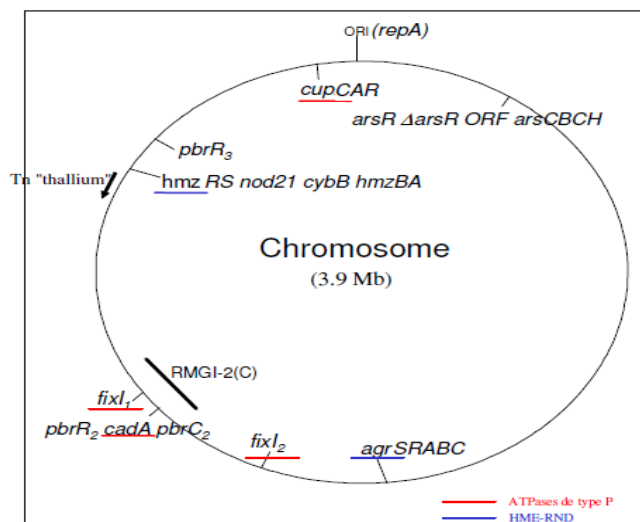


Figure 5 : Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds sur le chromosome de *C. metallidurans* CH34 (monchy,2007) .

## 2. Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds sur le mégaplasmide de *C. metallidurans*CH34.

Le mégaplasmide de *C. metallidurans*CH34 est orienté en fonction de son origine de réplication (*repA*). Les groupes de gènes soulignés en bleu codent pour des systèmes d'extrusion à trois composants à antiport de cation-proton, les groupes de gènes soulignés en rouge codent pour des systèmes d'extrusion de type ATPasique. Les flèches indiquent la position et l'orientation des transposons "thallium".(Fig 6) (monchy,2007).

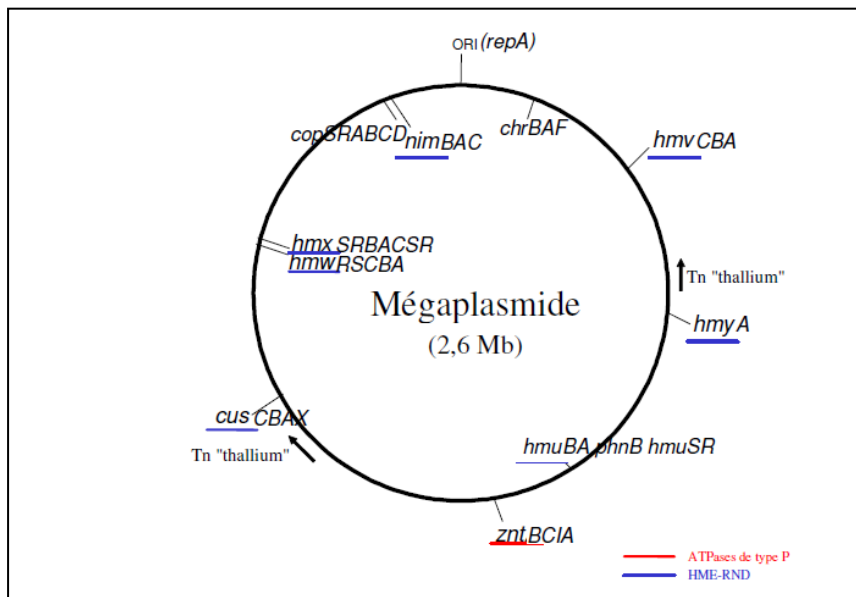


Figure 6 : Localisation des gènes de résistance aux métaux lourds sur le mégaplasmide de *C. metallidurans*CH34. (monchy,2007)

### F. Les Plasmides

Le caractère plasmidique de la résistance à Cd (II), Zn (II), Co (II) et Ni (II) dans la souche CH34 a été démontré par des expériences de durcissement et de transfert appropriées: résistance à Zn (II), Cd (II) et Co (II) étaient liées au plasmide pMOL30 (~250 kb) tandis que la résistance à Co (II) et Ni (II) ainsi que la résistance au chromate étaient liées au plasmide pMOL28 (180 kb) (Taghavi et al., 1997) . De plus, il a été démontré que les deux plasmides codent pour la résistance à Tl (I) et Hg (II), ce dernier étant codé par les deux transposons au mercure Tn 4378 (pMOL28) et Tn 4380 (pMOL30) (Diels et al., 1985).

## 1. Caractéristiques générales des plasmides pMOL28 et pMOL30.

Les plasmides pMOL28 (171 459 pb) (Fig 7 ) et pMOL30 (233 720 pb) (Fig) ont respectivement une teneur moyenne en G + C de 60,4 et 60,1%, tandis que le chromosome et le mégaplasmide ont une teneur moyenne en G + C de 63,0%. Au total, 164 ORF ont été identifiés sur pMOL28 et 247 ORF ont été identifiés sur pMOL30; les pourcentages de séquences codantes étaient de 87% pour pMOL28 et de 80% pour pMOL30 (Sébastien et al., 2007).

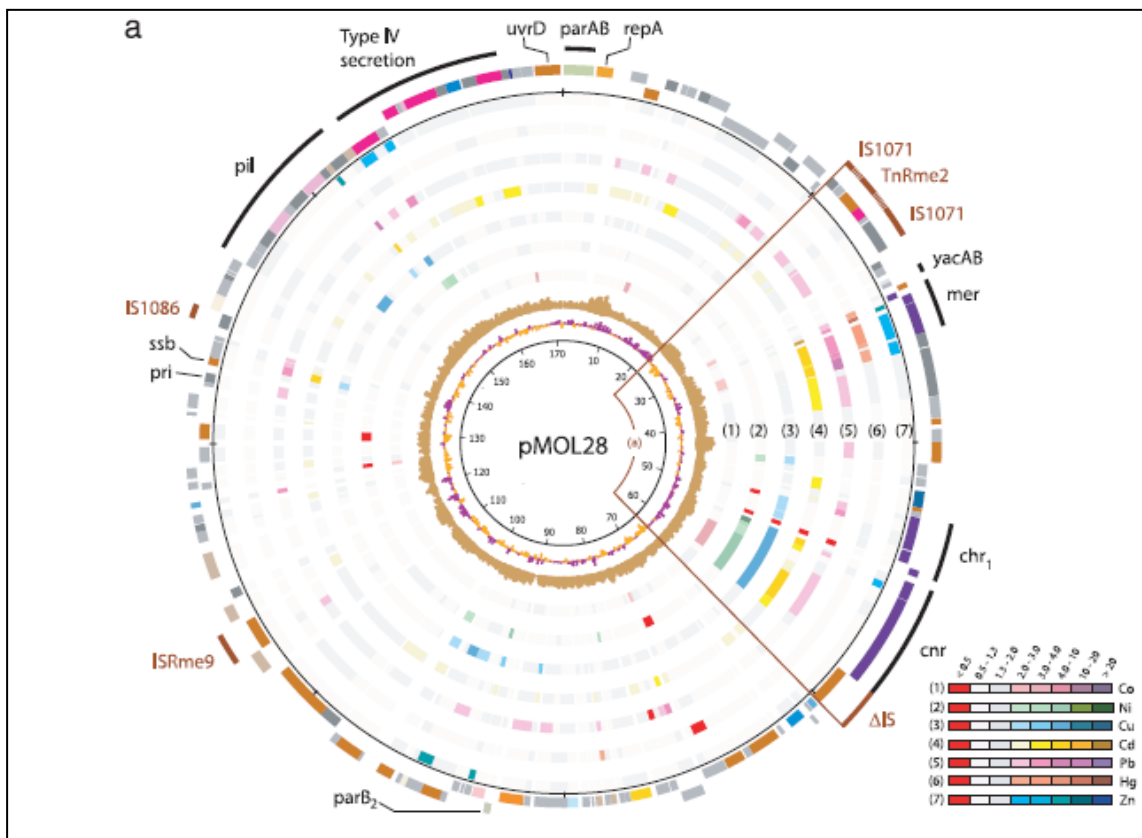
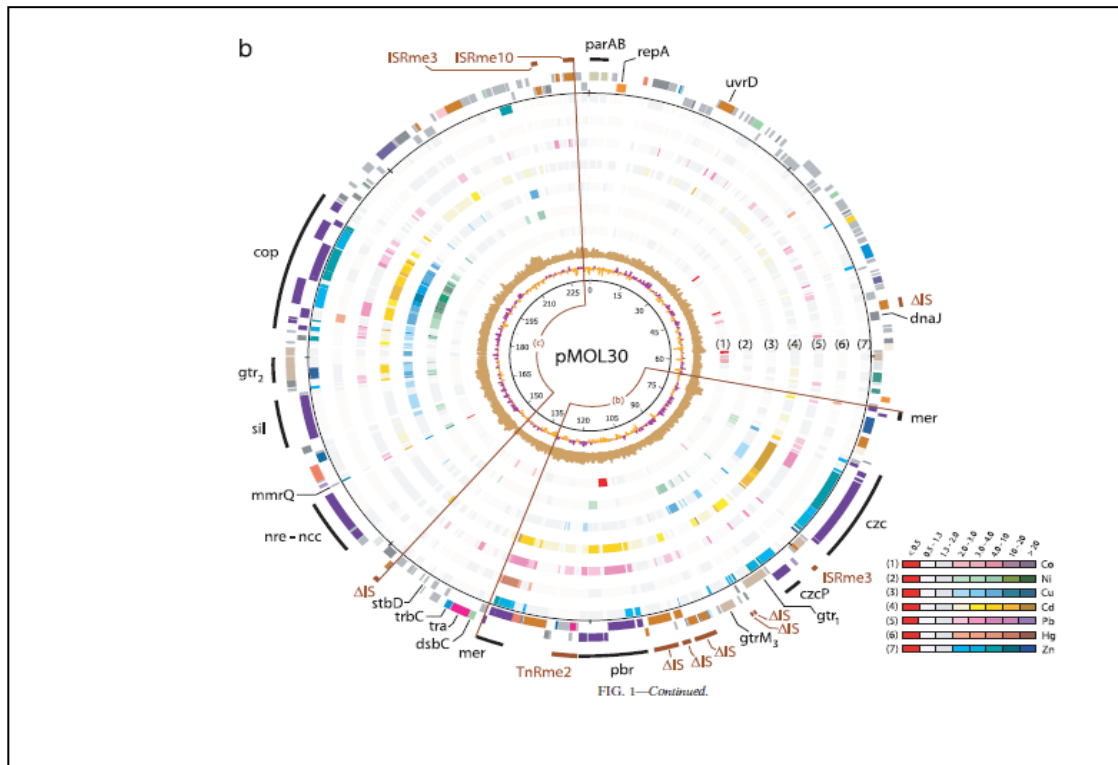


Figure 7 : Carte du plasmide pMOL28 (Janssen et al., 2010).



**Figure 8: Carte du plasmide pMOL30(Janssen et al., 2010)**

### **G. gènes transmis par les plasmides pour la résistance au plomb (exemple )**

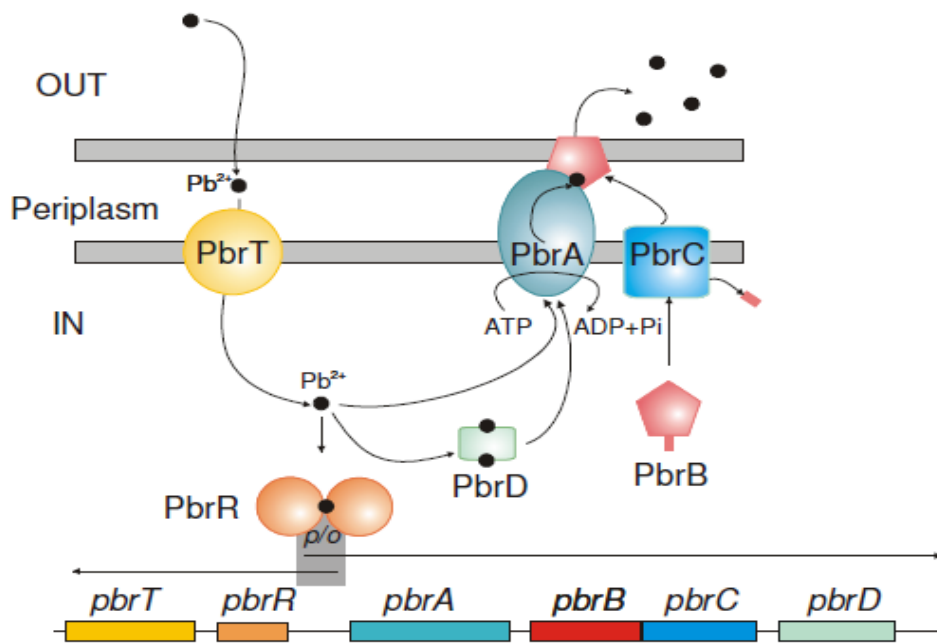
La résistance au plomb a été rapidement reconnue comme transmise par les plasmides chez *R. metallidurans* (Diels et al., 1989), bien qu'elle ne soit décrite que récemment au niveau moléculaire (Borremans et al., 2001). Cependant, des données sur la résistance au plomb ont également été signalées pour *Arthrobacter* sp. et d'autres Firmicutes qui ont été isolés du site de déchets d'une usine australienne de batteries au plomb (Trajanovska et al., 1997). *Pseudomonas marginalis* montrant une exclusion extracellulaire du plomb et *Bacillus megaterium* démontrant une accumulation intracellulaire de plomb cytoplasmique ont été isolés d'autres sols contaminés au plomb (Roane, 1999)

L'opéron de résistance au plomb, *pbr*, de *R. metallidurans* CH34 est unique, car il combine les fonctions impliquées dans l'absorption, l'efflux et l'accumulation de Pb (II) (Borremans et al., 2001). (Fig 9 ). Un régulateur de type MerR, PbrR, contrôle la transcription des gènes structurels *pbrABCD* à partir du promoteur *P pbrA*, le premier gène en aval de l'opérateur / promoteur *pbr* codant une ATPase de type P. Contrairement aux opérons *cad* et *znt*, qui semblent tous deux comprendre un gène régulateur plus une ATPase d'efflux uniquement, des protéines

supplémentaires sont nécessaires pour une résistance maximale au Pb (II) chez *R. metallidurans* CH34. Ce sont PbrT, PbrB, PbrC et PbrD. La première étape de *pbr*La résistance au Pb (II) codée implique un système d'absorption du Pb (II) codé par PbrT. L'expression de PbrT en l'absence de PbrABCD entraîne une hypersensibilité au Pb (II), probablement en raison d'une absorption accrue de Pb (II) dans le cytoplasme. Le résultat de cette absorption de Pb (II) serait de réduire l'interaction du Pb (II) libre avec les chaînes latérales de la membrane et les protéines périplasmiques, ce qui causerait des dommages cellulaires importants. Une fois que le Pb (II) est entré dans le cytoplasme, il peut être exporté par la PbrA Pb (II) efflux ATPase ou être lié par la protéine PbrD, qui peut fonctionner comme chaperon pour le Pb (II). La PbrD n'est pas absolument requise pour la résistance au Pb (II), mais les cellules dépourvues de PbrD montrent une accumulation réduite de Pb (II) par rapport aux cellules de type sauvage, et cette accumulation peut protéger contre le Pb (II) exporté gratuitement et le cycle futile de Pb (II) adoption et exportation (Borremans et al., 2001).

L'ATPase d'efflux de PbrA Pb (II) s'est avérée fonctionnelle et capable de compenser l'absorption de Pb (II) entraînée par PbrT. Cependant, pour une résistance totale au Pb (II), PbrB et PbrC sont nécessaires. Le PbrB et les protéines apparentées pourraient faire partie d'une nouvelle famille de transporteurs aidant les protéines de résistance (TAR). La comparaison de PbrB avec la base de données EMBL a donné 16 résultats. Cependant, à l'exception de la protéine BcrC de *Bacillus licheniformis*, toutes les autres étaient des protéines membranaires (lipo) hypothétiques. La protéine BcrC de *B. licheniformis* code pour une protéine membranaire hydrophobe qui, avec la protéine membranaire BcrB, fonctionne comme des composants membranaires du transporteur ABC résistant à la bacitracine (Podlesek et al., 1995). L'inactivation de BcrC entraîne une sensibilité à la bacitracine et l'inactivation de PbrB entraîne une sensibilité à Pb (II). La lipoprotéine PbrB peut favoriser le transfert de Pb (II) du périplasma à la membrane externe. Cela entraînerait une diminution de l'absorption de Pb (II) par PbrT.

À des concentrations accrues de Pb (II), une élimination des métaux de la solution a été observée pour la souche CH34 pendant la phase exponentielle tardive et la phase stationnaire, ainsi qu'une augmentation progressive du pH (jusqu'à 9). À ce pH accru, la formation de complexes de plomb avec de l'hydroxyde et des carbonates sera fortement favorisée et devrait jouer un rôle important pour éviter la rentrée de Pb (II). Un phénomène similaire a été décrit pour le système de résistance *czc* Cd (II) -Zn (II) -Co (II) de *R. metallidurans* CH34 (Diels et al., 1995).



**Figure 9 : Mécanisme proposé pour la résistance au plomb liée au pMOL30 ( Borremans et al., 2001).**

Ce modèle implique les protéines suivantes: PbrT, qui transporte le Pb(II) dans cytoplasme; PbrA, l'ATPase d'efflux; PbrB et PbrC, qui correspondent respectivement à une lipoprotéine facilitant le transport du Pb(II) et une peptidase de peptide signal nécessaire à la maturation de PbrB; et PbrD une protéine impliquée dans la séquestration du Pb(II) présent dans le cytoplasme. La protéine PbrR régule l'expression de l'opéron pbr. de ( Borremans et al., 2001).



## V. Les bactéries marines et leurs applications ( la bioremédiation )

### A. Généralité sur les bactéries marines

Microbe marin : est un organisme plus petit qu'environ 100  $\mu\text{m}$ , ne pouvant pas être vu à l'oeil nu, et vivant dans un environnement marin.

Cette définition simple cache en fait une multitude d'êtres vivants connus et inconnus, appartenant à différents groupes évolutifs et jouant des rôles écologiques très variés, mais tous fondamentaux pour la structure et le fonctionnement des écosystèmes marins. Il s'agit de procaryotes (archées et bactéries) et d'eucaryotes unicellulaires (protistes).

Les nombres totaux de cellules bactériennes de  $1.0 \times 10^{29}$ ,  $1.7 \times 10^{28}$  et  $1.0 \times 10^{26}$  ont été calculés pour les eaux pélagiques marines, les sédiments de surface et les eaux côtières, respectivement (Whitman et al. 1998). La biomasse bactérienne globale dans le sous-sol marin la biosphère est estimée à  $5.4 \times 10^{29}$  cellules (Parkes et al. 2014), ce qui représente  $\sim 24\%$  du nombre global de la biomasse des bactéries et des archées (recalculé sur la base de la de Whitman et al. 1998). Ces chiffres montrent que la biomasse bactérienne de la haute mer et du sous-sol marin est similaire à celle de ce qui est présent dans les sols ( $2.6 \times 10^{29}$  cellules) et que les bactéries marines et les archaebactéries constituent une partie considérable de la biomasse microbienne sur terre. (Lucas, 2016).

Ils prospèrent dans des conditions très diverses, du très froid (dans les canaux d'eau sur la banquise en Arctique) au très chaud (près des sources hydrothermales), sous des pressions importantes (sur le plancher océanique), dans des eaux très salées (Mer Morte) ou au contraire plus douces (Mer Baltique) dans des zones riches en nutriments, dites eutrophes (régions côtières) ou pauvres en nutriments, dites oligotrophes (océan ouvert), etc. Cette extrême versatilité fait des microbes marins le groupe d'organismes le plus abondant sur la planète, mais également explique leur implication dans pratiquement tous les processus biogéochimiques de l'océan (Kirchman , 2008).

Basée sur des estimations, la biomasse totale des microbes marins excède celle de tous les animaux et zooplancton réunis. Cette biomasse représente 95% de la respiration totale. Si on considère de plus que c'est par leur surface que les organismes interagissent avec le milieu, et donc que ce paramètre est plus pertinent que la masse pour évaluer la contribution relative au fonctionnement d'un écosystème, on constate même que les bactéries surpassent tous les autres groupes de microbes (Lucas, 2016).

## **B. Les bactéries marines hautement résistantes au mercure (BHRM)**

Certaines souches environnementales de bactéries ont acquis des mécanismes de résistance très spécifiques pour le mercure. Il existe de nombreuses preuves concernant la résistance au mercure chez les espèces microbiennes communes (Canstein et al., 1999 ; Macalady et al., 2000 ; Barkay et al., 2003). Les bactéries très résistantes au mercure sont extrêmement importantes pour la détoxification de la les composés du mercure (Nakamura et al., 1990).

Bien que le plasmide de la résistance au Hg a été liée à la résistance aux antibiotiques et aussi à l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (Ka et al., 1994).

Les bactéries marines résistantes au mercure se révèlent très prometteuses dans le traitement du mercure et de nombreux autres métaux lourds hautement toxiques et les xénobiotiques.

Par exemple *Pseudomonas aeruginosa* CH07 a pu dégrader divers congénères de PCB, notamment

une dégradation complète des CB-126 et CB-181. La culture a pu retirer plus de 70% de Cd du milieu de croissance. La même bactérie a rapidement biotransformé/éliminé le mercure toxique des eaux usées dans un système de bioréacteur.

Les bactéries marines très résistantes au mercure (BHRM) montre une désintoxication efficace non seulement du Hg, mais également du Cadmium et Plomb .

Ces bactéries ont éliminé plus de 70 % de Cd et 98% de Pb dans 72 et 96 h respectivement, à compter du qui avait des concentrations initiales de métaux de 100 ppm.

Leur efficacité de détoxification pour le Hg, le Cd et le Pb indique un bon potentiel d'application dans la biorestauration des les métaux lourds toxiques.

## **C. Biotechnologies bleues et bacteries .**

La biotechnologie bleue ou biotechnologie marine est définie comme l'application des sciences et des technologies à la transformation des ressources marines par des procédés de biotechnologies et ce pour des applications dans les domaines de la santé, cosmétique, agro-alimentaire, aquaculture, environnement, etc... Il est estimé pour ces seules « biotechnologies bleues », une croissance annuelle de 6 à 8 % pour les 5 prochaines années avec des revenus annuels supérieurs au milliard d'Euros (Proksch , 2006).

En règle générale quand on parle de biotechnologies marines ou bleues on évoque comme organismes marins principaux les macro-algues, certaines espèces comme les serpents marins, les

poissons venimeux, les cônes et leurs venins, ou encore éponges, bryozoaires, crustacés, etc...(Guézennec , 2014).

Et les bactéries dans tout cela ? Et si nous avons tout simplement négligé le « microscopique », l'invisible ?

Notons qu'il y a effectivement une augmentation très significative du nombre de nouveaux produits issus de microorganismes marins. Fin 2010, plus de 3 000 produits naturels ont été répertoriés avec pour origine des microorganismes marins. L'augmentation est encore plus sensible si l'on compare le nombre de molécules d'origine microbienne avec la moyenne observée sur près de 40 ans (1965-2005), soit une valeur supérieure à 600 % ! (Monaco, 2014).

Autre donnée importante démontrant la prise en compte de la composante microbienne du milieu marin : plus de 250 métabolites bactériens bioactifs trouvés au cours des cinq dernières années comparés aux 150 métabolites isolés de bactéries terrestres. Tous ces chiffres, certes assommants, illustrent simplement le potentiel de la composante microbienne, trop ignorée à ce jour, et l'intérêt croissant soulevé par les microorganismes, tant pour la recherche académique que pour les industriels et les industries de la santé particulièrement ( Guézennec , 2014).

les bactéries marines sont au carrefour de toutes les préoccupations actuelles des spécialistes de la mer tel la biodiversité, recyclage des déchets et polluants, biorémédiation des sites pollués, matériaux durables et même énergies renouvelables, ajoutées aux secteurs plus classiques du médical et de la biotechnologie (Fig 10), tel la production des pigments, des enzymes, des biopolymères (Exopolysaccharides, Polyesters biodégradables) et ce que l'on appelle les métabolites secondaires (ou médicaments de la mer)et des principes actives ( Proksch et al.,2006).

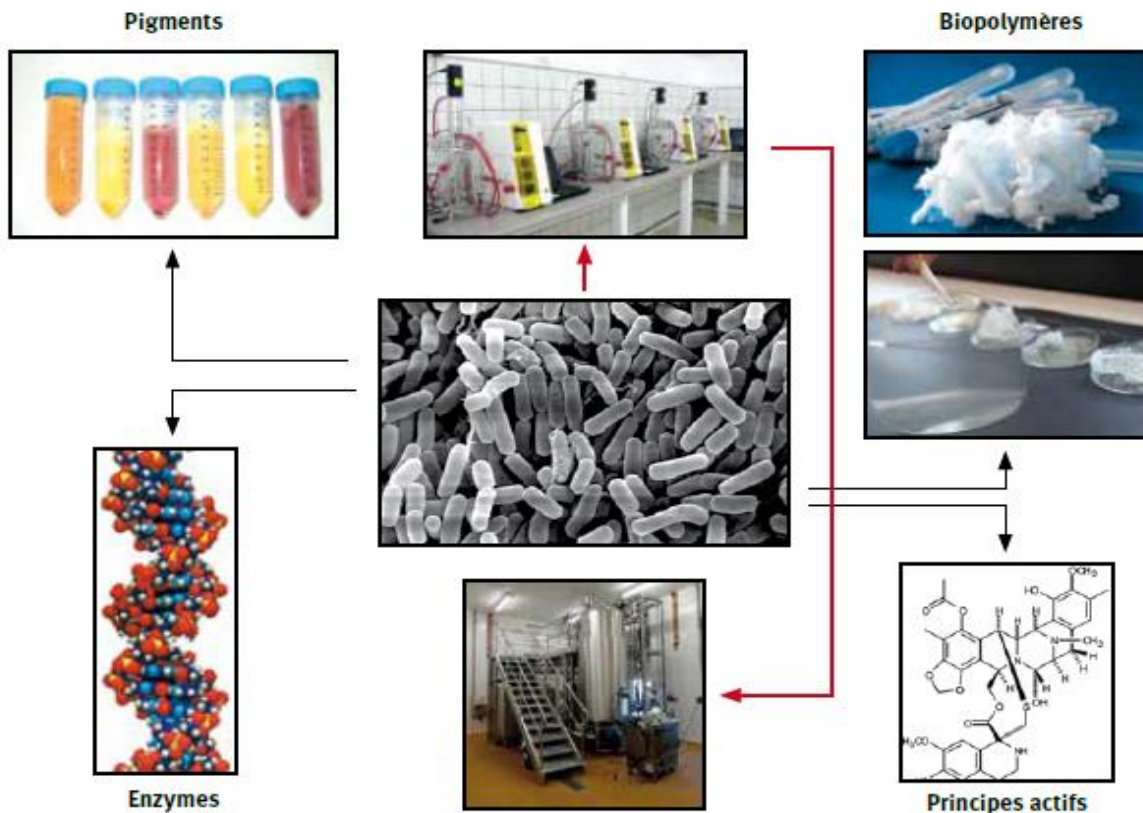


Figure 10: Quelques pistes de développement pour les bactéries marines ( Proksch et al., 2006).

## D. La bioremédiation des métaux lourds par des bactéries marines

### 1. La bioremédiation

Le terme de bioremédiation est composé de "Bios " qui signifie la vie et se réfère aux organismes vivants et "remédier " qui signifie résoudre un problème (Babak, 2013). C'est un ensemble de techniques qui utilisent les capacités enzymatiques des microorganismes (bactéries, algues, champignons) pour dégrader les polluants organiques. Ces organismes peuvent être déjà présents dans la zone polluée (indigènes) ou ajoutés au milieu (exogène), ou encore être prélevés sur le site contaminé, cultivées au laboratoire puis réintroduits dans le sol. La bioremédiation se déroule généralement en condition d'aérobie, cependant l'application des systèmes de bioremédiation en condition d'anaérobie permet de dégrader un certain nombre de molécules récalcitrantes (Abdelly, 2006 ; Fokou Mbogne, 2017).

## **2. Les principales méthodes de la bioremédiation**

### **a) La bioremédiation in-situ**

Il s'agit de traitements biologiques directement appliqués sur le site à dépolluer. Ils ont l'avantage de ne pas nécessiter d'excavation et de permettre, éventuellement, la poursuite des activités (Hanna, 2004).

#### **(1) Atténuation naturelle**

C'est simplement la biodégradation naturelle des polluants par les microorganismes présents dans le sol ou la nappe. Cette méthode consiste uniquement à vérifier la présence et la capacité des micro-organismes utilisés pour dégrader les polluants (Hanna, 2004).

#### **(2) Bioventing**

Le bioventing est un procédé consistant à faire circuler de l'air dans la zone contaminée de manière à en extraire les polluants, tout en assurant un apport en oxygène propice à une dégradation biologique additionnelle. Cette technique implique soit la mise en dépression de la zone insaturée, soit à injecter l'air (ou oxygène pur) dans les zones polluée (Nathalie, 2007).

#### **(3) Bioaugmentation**

C'est une méthode de traitement in-situ, qui consiste à ensemencer des souches spécifiques de microorganismes exogènes dans le sol afin d'optimiser l'activité microbienne indigène responsable de la biodégradation des polluants organiques. Les microorganismes peuvent être naturels ou génétiquement modifiés. Cette méthode, bien que souvent efficace, peut toutefois conduire au déclin de la population introduite par des réactions de compétitivité avec la microflore indigène ou par défaut d'acclimatation avec le milieu récepteur. Alors, l'autre solution consiste donc à prélever des microorganismes indigènes aptes à dégrader le polluant organique, d'en faire une culture de souche microbienne afin de les réinjecter dans ce sol même (Fokou Mbogne, 2017 ; Odokuma et Dickson, 2003).

#### **(4) Biostimulation**

La biostimulation consiste à stimuler l'activité et la croissance des microorganismes indigènes du sol par l'ajout de certains composés afin d'améliorer la biodégradation des polluants. Parmi ces composés, des nutriments principalement l'azote, le phosphore, le potassium et des conditions de milieu (potentiel d'oxydoréduction, humidité ...) (Mazziotti, 2017 ; Miyasaka et al, 2006).

## **b) La bioremédiation ex-situ**

Les traitements hors site peuvent être utilisés dans le cas où les contaminants n'ont pas pénétré trop profondément, les sols peuvent alors être excavés puis traités. L'utilisation de ces procédés hors site permet la plupart du temps une réduction des durées de traitement (Ballerini et al, 1998).

# Matériel et méthodes

### **VI. Matériel et méthodes**

Notre étude consiste à isoler , identifier et caractériser les bactéries marines résistantes au métaux lourds. Et d'étudier leurs capacité de dégradation et dépollution dans un sol contaminé par des métaux lourds ( naturellement ou artificielement ).

Comme nous avons pas pu atteindre notre objectif en raison des mesures préventives imposées par le tutelle du pays, a cause de la pandémie du COVID19

nous avons essayé de réaliser une étude théorique basée sur les résultats des traveaux déjà réaliser

### **VII. Isolement et caractérisation des bactéries**

#### **A. Milieux utilisés pour l'isolement des bactéries**

Nous devons suspendu 1 ml d'échantillon (échantillon homogène à partir d'eau de mer d'une région contaminé par les métaux lourds exemple port d'Alger ) dans 10 mL de chlorure de sodium NaCl (0.9%). A partir de cette suspension mise sous agitation pendant quelques minutes, Nous allons effectué une série de dilution allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ . Un volume de 100  $\mu$ L de chaque dilution est ensuite étalé sur milieu SWNA : ( 5,0 g de peptone, 1,5 g d'extrait de bœuf, 1,5 g d'extrait de levure, 500 ml d'eau de mer vieillie, 500 ml eau déionisée et 15 g de gélose) modifié avec 10 ppm (50 mM Hg) HgCl<sub>2</sub> (Merck, Allemagne).

#### **B. Purification des souches bactériennes**

Après En énumérant le MRB, plusieurs colonies isolées seront choisies et striées sur des plaques de SWNA contenant 25 ppm le mercure pour une purification plus poussée. Ces isolats doivent être jugés comme ayant une obligation de sodium pour leur suggérant et origine marine (Baumann et *al*, 1972).

Les boîtes seront incubées à 30°C pendant 4 à 5 jours et suivies quotidiennement afin de repiquer les colonies d'intérêt (colonies pigmentées) qui apparaissent sur la boîte. La purification des souches sera réalisée par plusieurs repiquages successifs. Le repiquage se poursuit jusqu'à



l'obtention d'une culture homogène où toutes les colonies sont identiques entre elles et identique au type de bactéries initialement ciblées.

### **C. Identification des bactéries étudiées**

#### **1. Identification morphologique**

Après l'obtention des souches bactériennes pures à étudier, un procédé d'identification va être mener selon leurs aspects macroscopique et microscopique on utilisant un guide d'identification .

##### **a) Aspect macroscopique**

Plusieurs caractères sont décrits à partir de l'observation macroscopique des colonies bactériennes sur gélose.

D'après Singleton (1999), Les éléments d'identification macroscopique des différents aspects bactériens sont :

- la forme des colonies : rondes, irrégulière, etc.
- la taille des colonies : par la mesure de diamètre.
- la chromogénèse : couleur de la colonie.
- l'élévation : convexe, concave, plate.
- l'opacité : opaque, translucide ou transparente.
- la surface : lisse, rugueuse, sèche, dentelée, etc.

##### **b) Aspect microscopique**

Pour réaliser une observation photonique , nous devons effectuée une coloration de Gram.. Une fois les bactéries fixées, nous avons commencé par déposer quelques gouttes de violet phéniqué. On Laisse agir 4 à 6 secondes et on égoutte sans rincer. Par la suite, quelques gouttes de lugol sont déposées. Puis, nous avons lavé la lame avec l'alcool quelques secondes. Enfin, nous avons ajouté une goutte de la solution de Fuchsine. Une fois la lame séchée nous avons observé au microscope photonique.

### 2. Identification moléculaire

#### Séquençage de l'ADNr 16S

Des cultures cultivées pendant la nuit ont doivent être utilisées pour l'extraction de l'ADN génomique et l'extraction a été faite en utilisant l'extrait de nécleospine (Macherey Nagel, Allemagne) et la qualité du produit doit être contrôlée sur un gel d'agarose à 0,8 % de TAE. Le séquençage a été effectué en utilisant l'amorce avant (27f : 50-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-30 ; Weisberg et al., 1991) et l'amorce inversée (1492r : 50 GGTTACCTTACGACTT- 30 ; Reysenbach et al., 1992).

La PCR doit être réalisée dans un thermocycleur (PE, Applied Biosystem) utilisant un programme de 94 8C (1 min) suivi de 35 cycles de 94 8C (0,10 min), 54 8C (0,20 min), 68 8C (1,30 min) avec une température finale d'extension de 68 8C (4,30 min).

Les produits PCR doivent être électrophorés sur un TAE de 0,8 gel d'agarose coloré dans une solution de bromure d'éthidium (1 mg ml<sup>-1</sup>) et doivent être photographiés à l'aide d'un transilluminateur. Les produits PCR doivent être nettoyés à l'aide du Kit de purification QIAquick (Qiagen, États-Unis). Le kit de purification Les produits PCR doivent être étendus davantage en utilisant le grand colorant kit de séquençage (version 1.1) dans un thermocycleur utilisant un programme de 95 8C suivi de 25 cycles de 55 8C (0,20 min) et 60 8C (3,30 min).

Les produits de la dernière extension ont été nettoyés davantage à l'aide d'éthanol-sodium acétate (EtOH-NaAc) et le système speedvac. Le site le séquençage va être effectué à l'aide de l'instrument de séquençage ABI (modèle ABI PRISOM n° 3700). La séquence doit être comparée en ligne, vérifiée pour la correspondance à l'aide de Programme FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/>) pour l'identification et doivent être soumis à la banque de gènes.

### 3. Caractérisation biochimique

Plusieurs tests biochimiques doivent être effectués pour caractériser les souches de BHRM. La présence de diverses des enzymes telles que la lipase, la gélatinase, l'amylase, l'oxydase, catalase, uréase, décarboxylases (arginine et ornithine), l'utilisation de différentes sources de carbone telles comme gluconate, pyruvate, citrate, cellobiose, glucose, sucrose, mannitol, arabinose, rhamnose, réduction des nitrates, Rouge de méthyle (MR), Voges-Proskauer (VP) réaction, production de H<sub>2</sub>S et oxydation-fermentation ont été vérifiées comme le décrit MacFaddin (1980).

## VIII. Détoxification des métaux lourds par des bactéries résistantes au mercure (inspiré des travaux déjà réalisés)

### 1. Détoxification du mercure

Les cellules bactériennes provenant de 12 isolats cultivés en milieu M9 (Sambrook et al. 1989) ont été centrifugés à 10 000 tr/min, lavé avec un tampon de phosphate (70 mM ; pH = 7) et les granulés (en triple exemplaire) ont été placés dans des plaques à microtitres.

Le stock de HgCl<sub>2</sub> (1000 ppm) a été dilué avec un tampon de phosphate à une concentration finale de 10 ppm Hg, puis a été ajouté aux cellules.

La plaque a été recouverte de Kodak XAR et a été incubé dans le noir pendant 4 h. Le film a été développé après la période d'incubation.

Le CH07 (*Pseudomonas aeruginosa*) a été cultivé pendant la nuit à 30°C sur un agitateur rotatif (200 tr/min) en milieu minimal (M9) avec 1 ppm Hg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

La pré-culture a été réalisée par en ajoutant du milieu M9 frais à cette culture de nuit.

La culture de volume connu (0,6 ml) de la culture exponentielle tardive a été ajouté au volume connu du support modifié avec différentes concentrations de mercure (volume final de 5,4 ml y compris la solution mère de Hg) en trois exemplaires pour mesurer la cinétique de la transformation du mercure.

Un échantillon d'un ml de la culture a été prise simultanément pour les protéines estimation à l'aide des kits de BIORAD suivant le protocole de Bradford (Bradford 1976).

Le taux d'enlèvement (m) a été calculé en utilisant la formule :

$$v = \frac{\text{Hg}^{2+} [\text{ ng}]}{0.6 \text{ ml culture} * \text{Protein (mg/ml)} * 3.2 \text{ min}}$$

$$= \frac{\text{Hg}^{2+} [\text{ ng}]}{\text{min} * \text{mg Protein}}$$

### 2. Désintoxication du Cadmium

Deux isolats (CH07, GP06) ont été utilisés dans l'expérience avec Cd. Un isolat de *Proteus* sp. sensible au Cd, CH05, et les cellules bactériennes tuées par la chaleur ont été incluses comme négatives contrôles.

Les bactéries ont été testées dans le SWNB modifié avec différentes concentrations de Cd (sous forme de CdCl<sub>2</sub>) à température ambiante (28±2°C).

Des sous échantillons (1 ml) ont été prélevés toutes les 24 heures, centrifugés à 10 000×g pendant 15 min à 24°C, et les surnageants filtré par un pré-pesage stérilisé 0,22-µm des filtres à membrane.

Les filtres ont été dilués au centuple avec 10 % de HNO<sub>3</sub> pour l'estimation des métaux lourds à partir de l'essai les médias.

Les pastilles ont été digérées pendant la nuit dans du HCl 1 M, et centrifugés à 8 000×g à 4°C pendant 5 min.

Les surnageants ont été recueillis et dilués avec 10 % de HNO<sub>3</sub> pour l'estimation des métaux lourds accumulés par les cellules.

Les boulettes de cellules ont été séchées pendant au moins 48 heures à 70°C et pesé pour déterminer la biomasse bactérienne.

Le Cd ont été déterminées par couplage inductif la spectrométrie d'émission atomique par plasma (Varian, Liberty Série II AX, ICP-AES séquentiel) sous les rubriques suivantes conditions

(taux de pompage : 15 tr/min, gaz plasma : 15 L min<sup>-1</sup>, rapide pompe : en marche, tension PMT : 650V, gaz auxiliaire : 1,5 L min<sup>-1</sup>, temps de rinçage : 10 s, absorption de l'échantillon : 30 s, longueur d'onde : 226,502 nm, numéro de réplique 3).

Les concentrations de métaux ont été calculées à l'aide de blancs appropriés (milieu de croissance dilué avec 10 % de HNO<sub>3</sub>) .

### 3. Désintoxication du Plomb

Trois isolats de BHRM (CH07, GP13 et S3) ont été testés dans SWNB modifié avec différentes concentrations de Pb [en  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$ ] à température ambiante ( $28\pm 2^\circ\text{C}$ ). Sensible au mercure isoler le CH05 et les cellules bactériennes tuées par la chaleur ont été inclus dans les contrôles négatifs. La procédure expérimentale était similaire à celle du Cd.

La spectrophotométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer, analyte 200 pour l'analyse des flammes) dans les conditions suivantes (largeur de la fente : 1,0 nm, lampe courant 8,0 mA, expansion d'échelle : 1.000, longueur d'onde : 217 nm, atomisation : air-acétylène, temps d'intégration : 3 s, répliquer non. 3) a été effectué pour la détermination du Pb en utilisant des des normes appropriés pour les l'étalonnage.

Microscopie électronique à balayage dispersive Spectroscopie à rayons X Des échantillons (10 ml) de cultures de bouillon provenant de flacons d'essai avec Cd et Pb ont été centrifugés à  $8\,000\times g$  à  $4^\circ\text{C}$  pendant 5 min.

Les cellules ont été lavées deux fois avec du phosphate 0,1 M solution saline tamponnée (PBS ; 15 mM tampon phosphate, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4 à  $25^\circ\text{C}$ ) et fixé pendant la nuit dans 2 % de glutaraldéhyde (préparé dans 0,1 M PBS).

Les cellules ont été lavés avec du PBS et de l'eau distillée avant la déshydratation par une série d'éthanol (10 % à l'absolu), à chaque concentration pendant 30 minutes.

Les échantillons étaient placé sur un talon en laiton, recouvert d'or par pulvérisation cathodique, et examiné au microscope électronique à balayage (MEB) (SEMJEOL- JSM5800LV). Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (EDS) (OXFORD ISIS 300 EDS) a été effectuée pour détecter le Cd et le Pb et leurs composés qui ont été adsorbés à la surface des cellules ou piégé dans l'exopolymère(EPS)

# Résultats et Discussion

## IX. Résultats et discussion

### Isolement et caractérisation de bactéries

#### A. Identification morphologique

##### 1. Macroscopique

Les éléments d'identification macroscopique des différents aspects bactériens sont déjà cités dans la partie matériel et méthodes.

##### 2. Microscopique

Après avoir purifié les souches isolées, on a procédé à une observation au microscope optique entre lame et lamelle on a observé la forme soit cocci ou bacille .

Après la coloration de Gram, on a observé soit :

une coloration rose pour les souches Gram -. Et une coloration violette pour les souches Gram +.

##### 3. Exemple des quelques bactéries marines résistantes aux métaux lourds (les résultats attendus)

###### a) *Bacillus pumilus*

C'est une bactérie à Gram positif en forme de bâtonnet (fig 11).

La colonie est irrégulière, dentelée opaque de couleur beige (fig12).

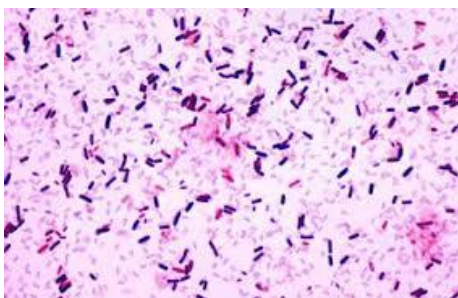


Figure 11 : aspect microscopique de *Bacillus pumilus* G × 100 (<http://microbe-canvas.com/Bacteria.php?p=1184> )

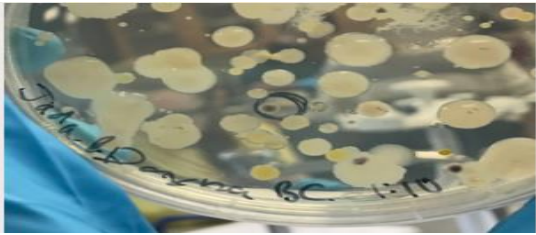


Figure 12 : aspect macroscopique de bacillus pumilus ( Hill,2016 )

**b) *Brevibacterium iodinum***

C'est une bactérie à Gram positif en forme de bâtonnet (Fig 13).

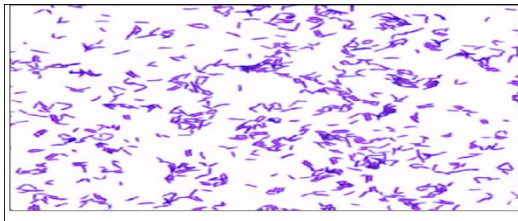


Figure 13 : aspect microscopique de *brevibacterium iodinum* (G × 100) (Y., Jung Juet al. ,2014)

**c) *Pseudomonas aeruginosa***

C'est une bactérie Bacille à Gram négatif (Fig14)

Les colonies sont grandes et isolées, bombées à contour irrégulier, à aspect métallique. (Fig 15)



Figure 14 : aspect microscopique de *pseudomonas aeruginosa* (G × 100) (Australas. 2016)



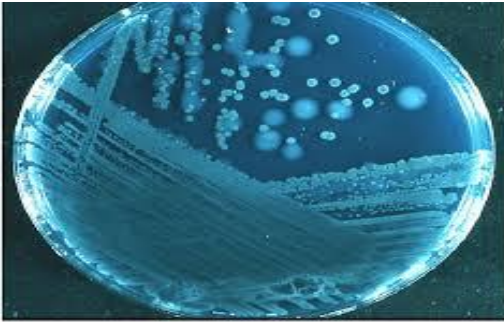


Figure 15 : aspect macroscopique de *pseudomonas aeruginosa* (Hoiby, 2017)

*d) Alcaligenes faecalis*

C'est une espèce de bactéries Gram-négatives en forme de bâtonnet (Fig 16)

Les colonies sont de petits taille de couleur beige (Fig 17)

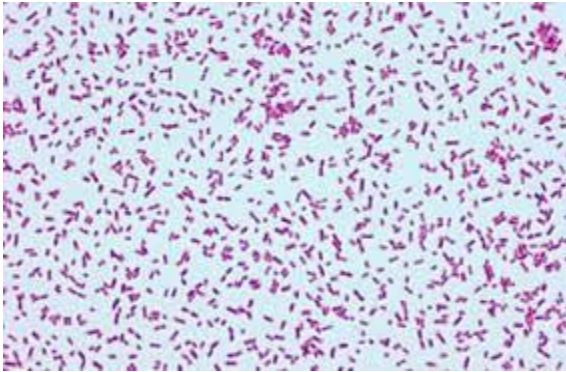


Figure 16: aspect microscopique de *Alcaligenes faecalis* (G × 100) (microbe-canvas.com)

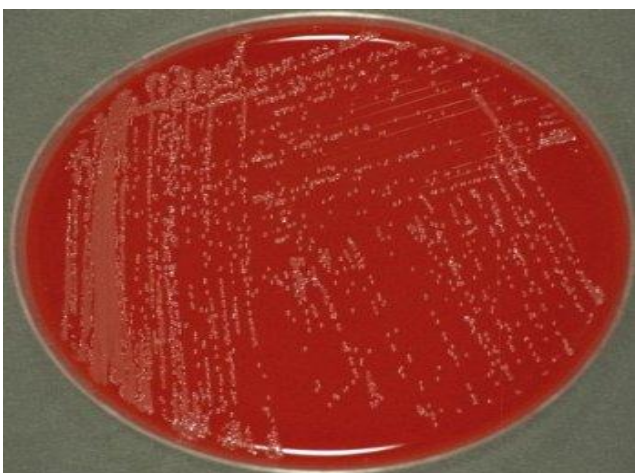


Figure 17: aspect macroscopique de *Alcaligenes faecalis*

([https://atlas.sund.ku.dk/microatlas/food/bacteria/Alcaligenes\\_faecalis/](https://atlas.sund.ku.dk/microatlas/food/bacteria/Alcaligenes_faecalis/))

**B. Identification moléculaire :**

d'après le séquençage de l'ADNr 16S et la comparaison des résultats par rapport a fasta on vas arrivé a identifier les souches isolées comme titre d'exemple (Tableau 5 ). ( De et Ramaiah, 2007)

**Tableau 5: L'identification des souches isolés par 16S rDNA (par rapport à FASTA) (De et Ramaiah , 2007).**

Code	Sequence watch (%), formard strand	Sequence match (%), reserve strand	Identity on the basis of 16S rDNA sequences
G002	99,59	100	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Gp06	99,58	99,78	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Gp08	100	99,74	<i>Bacillus pamilus</i>
Gp13	98,54	99,02	<i>Brevibacterium iodinium</i>
Gp14	98,94	100	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Gp15	99,56	99,79	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Gp16	99,65	100	<i>Alcaligenes faecalis</i>
Gp17	99,56	100	<i>Alcaligenes faecalis</i>
CH07	100	100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CH13	100	99,75	<i>Bacillus pamilus</i>
CM10	96,08	99,48	<i>Bacillus Sp</i>
S3	99,77	99,77	<i>Bacillus pamilus</i>
<b>GO01</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b><i>Alcaligenes</i></b>

### C. Caractérisation biochimique

Les tests biochimiques doivent être effectués pour caractériser les souches de BHRM. La présence de diverses des enzymes telles que la lipase, la gélatinase, l'amylase, l'oxydase, catalase, uréase, décarboxylases (arginine et ornithine), l'utilisation de différentes sources de carbone telles comme gluconate, pyruvate, citrate, cellobiose, glucose, sucrose, mannitol, arabinose, rhamnose, réduction des nitrates, Rouge de méthyle (MR), Voges-Proskauer (VP) réaction, production de H<sub>2</sub>S et oxydation-fermentation ( De et Ramaiah, 2007) .

Après une incubation à 37°C pendant 24 h, Les résultats obtenus suite à l'identification à l'aide du catalogue analytique sont présentés dans le Tableau 6.

**Tableau 6: Caractéristiques biochimiques des BHRM ( De et Ramaiah, 2007).**

	GO01	GO02	GP06	GP14	GP15	GP16	GP17	CH07	GP13	GP08	CH13	S3	CM10
<b>Gelatinase</b>	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
<b>Lipase</b>	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<b>Amylase</b>	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
<b>Arginine</b>	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>Ornithin</b>	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
<b>Oxidase</b>	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
<b>NO<sub>3</sub>À2 reduction</b>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
<b>Catalase</b>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	++	++	-	+++
<b>Urease</b>	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
<b>VP</b>	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
<b>MR</b>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	NR	-
<b>Indole</b>	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
<b>Citrate</b>	-	+	+	+	-	-	+	-	-	NR	+	ND	-
<b>Gluconate</b>	-	-	-	-	+	-	ND	+	+	+	ND	ND	ND
<b>Pyruvate</b>	-	-	-	-	+	-	ND	-	++	ND	ND	ND	ND
<b>Cellobiose</b>	-	+	-	-	-	A	AL	-	-	ND	NR	A	NR
<b>Mannitol</b>	NR	AL	A	AL	AL	AL	A	A	A	NR	NR	A	A+
<b>Rhamnose</b>	AL	AL	AL	AL	AL	AL	AL+	AL	A	NR	NR	A	A
<b>Arabinose</b>	AL	A	A	AL	AL	AL	A	AL	A	AL	AL	AL	NR

Identité des isolats issus du séquençage de l'ADNr 16S.

AL, réaction alcaline; MR, rouge de méthyle ; NR, pas de réaction ; ND, pas fait ; +, croissance ; -pas de croissance.

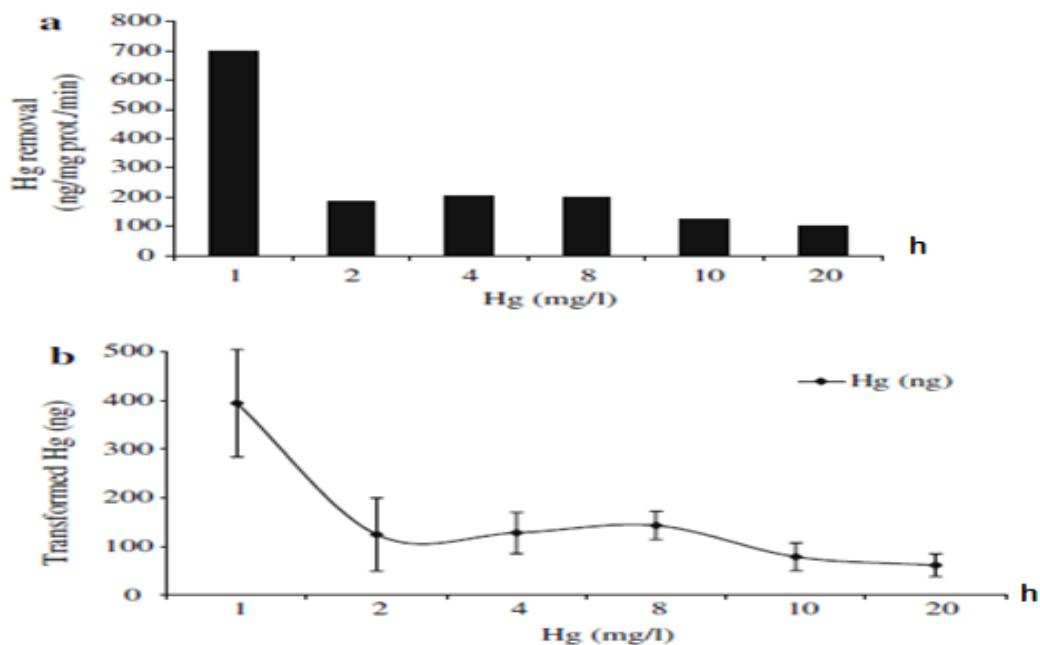
## Détoxification des métaux lourds par des bactéries résistantes au mercure (inspiré des travaux déjà réalisés)

De et al. (2007, 2008) ont signalé que les bactéries marines résistantes au mercure exposées à des environnements pollués tels que les zones côtières peuvent tolérer, détoxifier ou biotransformer une variété d'autres substances toxiques. Plusieurs bactéries marines résistantes au mercure (*Bacillus pumilus*, *Alcaligenes faecalis*, *Brevibacterium iodinum* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont la capacité de biotransformer des métaux lourds, à savoir le cadmium, le plomb et le mercure

### 1. L'élimination du Mercure

Les bactéries marines résistantes au mercure ont une capacité très forte de dégradation du mercure. Le taux de dégradation est présenté dans (Fig 18).

Le Panneau (a) indique le taux d'élimination de mercure par *pseudomonas aeruginosa* en termes d'unités de protéines par unité de temps (non barres d'erreur sur le taux indiqué). Le panneau (b) montre la transformation de Hg par *pseudomonas aeruginosa* par unité de temps (moyenne-SD, n=3) (Jaysankar et al., 2006).



**Figure 18:** la Cinétique du taux d'élimination du mercure par *pseudomonas aeruginosa* (Jaysankar et al., 2006).

## 2. Désintoxication du Cadmium

*Pseudomonas aeruginosa* (CH07) a la capacité de retirer le Cadmium du milieu à un rythme plus rapide que *Alcaligenes faecalis* (GP06) pendant les 48 premières heures (Fig. 19 a et b). Le Cd a été réduite par rapport à une concentration initiale de 100 ppm à 17,4 ppm pour le CH07 et à 19,2 ppm pour le GP06 dans environ 72 h. Cela correspond à une augmentation en concentration de Cd dans les boulettes de cellules (Fig. 20 a et b).

Les deux bactérie ont éliminé plus de 75 % et 70 de Cadmium, respectivement, du milieu de croissance. Dans les contrôles contenant des cellules tuées, l'élimination des métaux était <5%. Le site l'isolat témoin sensible aux métaux CH05 ne présentait aucun signe de la croissance ou l'accumulation de Cd (Fig. 19c).

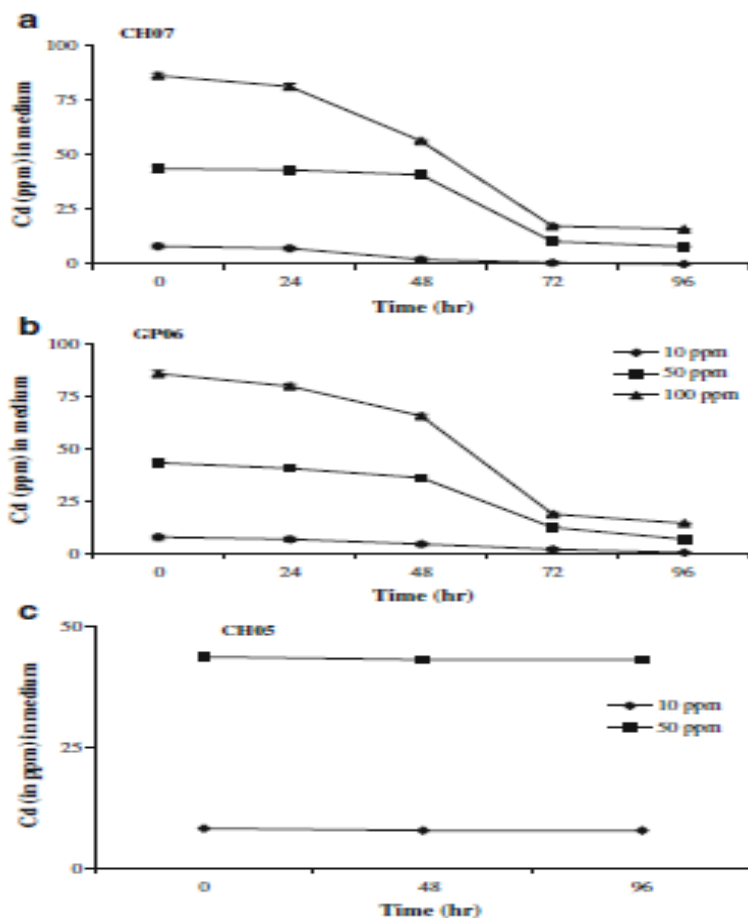
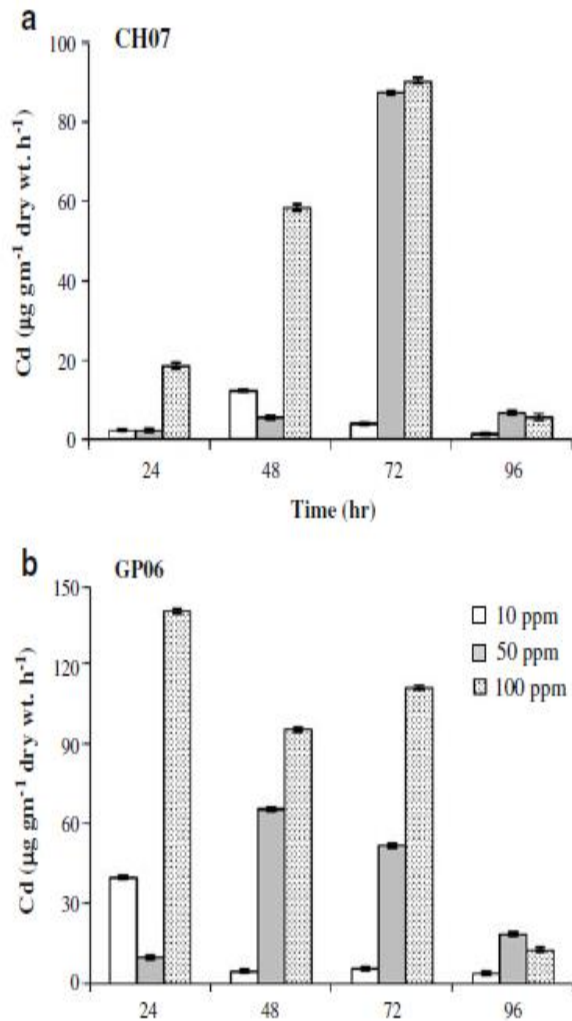


Figure 19 : L'élimination de cadmium par *pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis* et le contrôle négative, (De et al., 2008).

isolats CH07 (a) et GP06 (b) les bactéries du surnageant du SWNB moyen modifié avec différentes concentrations de Cd par rapport au contrôle sensible aux métaux isoler le CH05 (c)

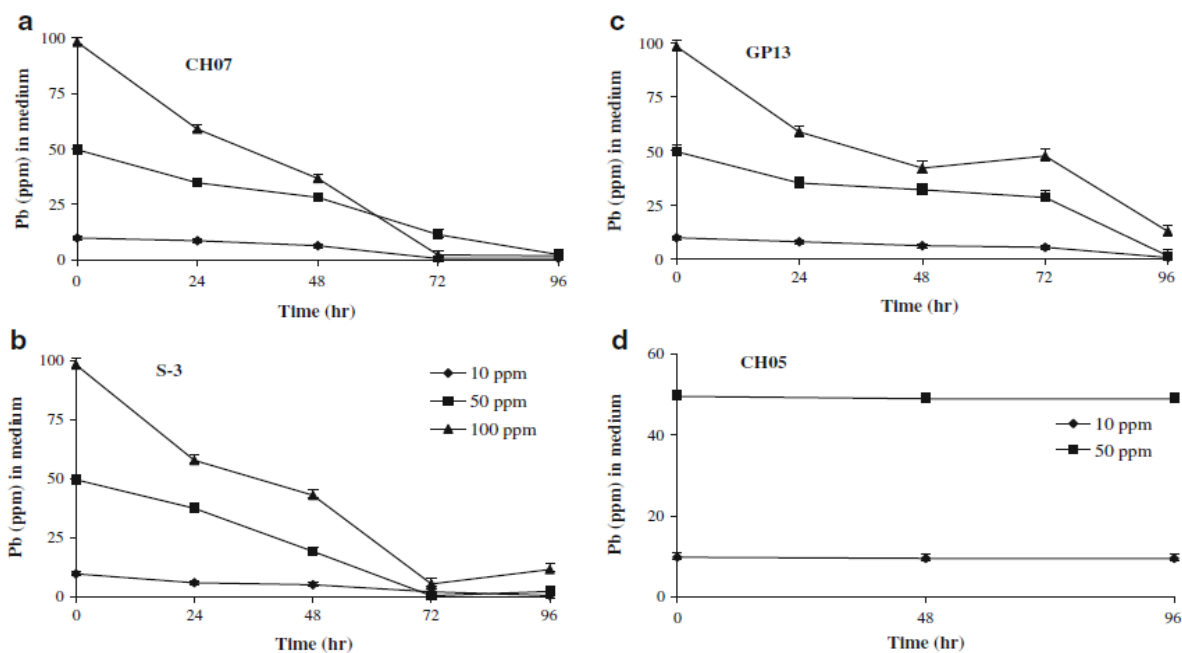


**Figure 20: Les concentrations de Cadmium ( $\mu\text{g g}^{-1}$  dry wt. h<sup>-1</sup>) dans les boulettes de cellules**

Isolats de BHRM CH07 (a) et GP06 (b) cultivés dans le SWNB modifié avec différentes concentrations de Cadmium (De et al., 2008).

### 3. Désintoxication du Plomb

Les trois isolats testés ont été capables d'éliminer le Pb du milieu de croissance (Fig. 21 a-c). Dans le cas de CH07 (*Pseudomonas aeruginosa*), la La concentration de Pb a été réduite à 1,8 ppm (>98%) à partir d'une concentration initiale de 100 ppm dans 96 h. Les isolats GP13 (*Brevibacterium iodinium*) et S3 (*Bacillus pamilus*) retirent plus de 87% et 88% de Pb respectivement du milieu de croissance. l'isolat témoin négatif CH05 ne présentait aucun signe de croissance (Fig. 21 d) ( De et al., 2008).



**Figure 21 : Élimination du plomb du milieu par les 3 isolats lorsqu'ils sont cultivés dans un bouillon nutritif d'eau de mer modifié avec différentes concentrations de Pb ( De et al., 2008).**

CH07 (a) ; S3 (b) ; GP13 (c) ; et contrôle négatif CH05 (d).

# Conclusion et perspectives



### Conclusion et perspectives

Le but de notre travail a porté sur l'isolement et l'identification des bactéries marines résistantes aux métaux lourds. Et d'étudier leur capacité de dégradation et dépollution dans un sol contaminé par des métaux lourds (naturellement ou artificiellement).

Comme nous n'avons pas pu atteindre notre objectif en raison des mesures préventives imposées par le gouvernement du pays, à cause de la pandémie du COVID19

nous avons essayé de réaliser une étude théorique basée sur les résultats des travaux réalisés par :

- Jaysankar De , A. Sarkar , N. Ramaiah et Vardanyan L. entre 2006 et 2008
- Xu Deng et Pengting Wang en 2012.

Les résultats obtenus montrent que les bactéries marines résistantes aux métaux lourds ont la capacité de désintoxication du Hg , Cd , Pb et d'autres métaux tels que le nickel .

Donc l'utilisation des microbes marins est une solution biotechnologique efficace, économique et écologique pour dépolluer les environnements contaminés par les métaux lourds, mais les législations et les normes de biosécurité doivent être strictement respectées à cet égard avant d'employer ces bactéries dans les conditions du terrain.

En perspectives, ce travail gagnerait à être approfondi par :

- La détection et la caractérisation des mécanismes impliqués dans la résistance aux métaux lourds par l'utilisation des techniques de biologie moléculaire.
- Une application de ces souches dans des sites pollués afin d'évaluer leur potentiel en bioremédiation.
- Une étude du pouvoir phytostimulant de ces bactéries isolées vis-à-vis des plantes qui peuvent être utilisées en phytoremédiation.

### Références bibliographiques

#### -A-

- Adriano, D. C., 2001 - *Trace elements in the Terrestrial Environment*. Springer Verlag, New York, 866p.
- Akujobi CO., Odu NN., Okorundu SI., 2012 - *Bioaccumulation of lead by Bacillus species isolated from pig waste*, Journal of Research in Biology 2 : 83-9.
- Alzieu C., Abarnou A., Bassoullet P., Boutier B., 2000 - *Dragage et environnement marin : état des connaissances. Plouzane : Edition Ifremer, 1999, ents et applications de l'étude, en laboratoire, de la toxicité de sédiments dulçaquicoles contaminés*. Thèse de doctorat. Metz : Université de Metz, 326 p.
- Asso, A., 1982,- *Contribution à l'étude de la pollution métallique chez la moule Perna perna (L) dans la région d'Alger*, Thèse de Doctorat de 3ème cycle d'Océanographie Biologique. Université d'Aix-Marseille II. 135p.
- ASTDR. 2005 - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of Health and Human Services Public Health Service U.S. Toxicological Profile for Zinc*.disponible sur « <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.pdf>. »
- Augier, H., 2008,-*Le livre noir de l'environnement: Etat des lieux planétaire sur les pollutions*. Monaco, Editions Alphée, Jean-Paul Bertrand. 601p.
- Azam, F., Malfatti F., 2007 - *Microbial structuring of marine ecosystems*. Nature Reviews.

#### -B-

- Babak, P., EBRAHIM, M., AJIT, V., 2013- *An Introduction to Bioremediation*. Ramin Agriculture and Natural Resources University. P 5.
- Baize D, 1997 - *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France)*,Références et stratégies d'interprétation, Paris : Inra éditions.
- Ballerini, D., GATELLIER, C., VOGEL, T. ,1998 -*Techniques de traitement par voie biologique*, Ademe Editions, Angers, P. 247.
- Barkay, T., Miller, S.M., Summers, A.O., 2003 - *Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems*, FEMS Microbiol. Rev. 27, 355–384.

## Références bibliographiques

---

- Bazzaz, F.A., Rolfe, G.L., & Carlson, R.W., 1974 -*Effect of cadmium on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower*. *Physiologia Plantarum.*, 32, 373-377.
  - Belhoucine, F., 2012,- *Etude de la biologie de la croissance et de la reproduction d'un poisson téléostéen le merlu (Merlucciuc merluccius L., 1785) et son utilisation comme bioindicateur biologique de la pollution par les métaux lourds (Zn, Pb et Cd) dans la baie d'Oran*. Thèse de Doctorat. Science de l'environnement. Université d'Oran. 275p.
  - Benfardia, H ., Chenine, A.2014 - *Effets de la nature du sol sur l'efficacité d'un dispositif de biodépollution à l'aide des bactéries hydrocarboruclastes*. Mémoires de mastère académique en Microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah Ouargla Ouargla, P 15.
  - Beveridge T. J., Koval S. F., 1981 - *Binding of metals to cell envelopes of Escherichia coli K12*, *Appt, Environ. Microbiol.*, 42, 325-335.
  - Bicocchi S., 1998 - *Les polluants et les techniques d'épuration des fumées*. Paris : Tec & Doc- Lavoisier, 188p.
  - Bisson, M., Diderich, R., Hulot, C., Houeix, N., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H.,
  - Bisson, M., Houeix, N., Gay, G., Lacroix, G., Lefevre, J.P., Magaud, H.,
  - Bisson, M., Hulot, C., Lacroix, Lefevre, J.P., Magaud, H., Oberson, D.,Geneste, Morin, A., Pepin, G.,2003,-*Plomb et ses dérivés. Fiches technique de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques*, INERIS, 90p.
  - Borremans, B., Hobman, J.L., Provoost, A., Brown, N.L. and van Der Lelie, D. 2001- *Cloning and functional analysis of the pbr lead resistance determinant of Ralstonia metallidurans CH34*. *J. Bacteriol.* 183, 551-568.
  - Brim, H., Heyndrickx, M., de Vos, P., Wilmotte, A., Springael, D., Schlegel, H.G. and Mergeay, M.,1999- *Amplified rDNA restriction analysis and further genotypic characterisation of metal-resistant soil bacteria and related facultative hydrogenotrophs*. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 258-268.
- C-
- Canstein, V.H., Li, Y., Timmis, K.N., Deckwer, W.D., Wagner- Do`bler, I., 1999 - *Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury-resistant Pseudomonas putida strain*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5279–5284.

## Références bibliographiques

---

- Cassas, S., 2005,- *Modélisation de la bioaccumulation des métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, Mytilus galloprovincialis, en milieu méditerranéen*. Thèse de Doctorat Océanographie biologique Environnement Marin. Université Sud Toulon. 314p.
- Chassard-Bouchaud C., 1995 - *L'écotoxicologie, Que sais-je?*, Presses Universitaires de France, Paris.
- Chiffolleau, J. F., 2001,- *La contamination métallique, Programme scientifiques Seine- Aval*, Editions Ifremer, 39p.

### -D-

- De rore H., Top E., Houwen F., Mergeay M., Verstraete W., 1994- *Evolution of heavy metal resistant conjugants in soil environments with a concomitant selective pressure*. FEMS Microbiol Ecol 14: 163–174.
- Desaunay A.,2011 - *Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange, par Escherichia coli et Cupriavidus metallidurans en colonnes de sable d'Hostun*. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble.
- Diels L., Springael D., van der Lelie N., Top E., Mergeay M. 1993- *Use of DNA probes and plasmid capture in a search for new interesting environmental genes*. Sci Total Environ 139–140: 471–478.
- Diels, L., Dong, Q., van der Lelie, D., Baeyens, W. and Mergeay, M,1995 - *The czc operon of Alcaligenes eutrophus CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals*. J. Ind. Microbiol. 14, 142-153.
- Diels, L., Faelen, M., Mergeay, M. and Nies, D.,1985 - *Mercury transposons from plasmids governing multiple resistance to heavy metals in Alcaligenes eutrophus CH34*. Arch. Int. Physiol. Biochem. 93, 27-28.
- Diels, L., Sadouk, A. and Mergeay, M. ,1989- *Large plasmids governing multiple resistance to heavy metals: a genetic approach*. Toxicol. Environ. Chem. 23, 79-89.
- Diels, L., Van roy, S., Taghavi, S.,2009,- *Des sites industriels aux applications environnementales avec Cupriavidus metallidurans* . Antonie van Leeuwenhoek 96, 247–258. disponible sur « <https://doi.org/10.1007/s10482> ».

## Références bibliographiques

---

- Dong, Q., Mergeay, M., 1994 - *Czc/cnr efflux: a three-component chemiosmotic antiport pathway with a 12-transmembrane-helix protein*, Molecular Microbiology 14, 185-187.

### -F-

- Fokou Mbogne, P., 2017 - *Bioremédiation augmentée de sols contaminés aux hydrocarbures lourds par ajout de substrats organiques*. Mémoire de licence. Université du Québec, P 18.
- Fukuda, Y., Ushijima, K., Sakamoto, M., Futatsuka, M., 1999 - *An analysis of subjective complaints in a population living in a methylmercury-polluted area*, Environ, Res. 81, 100–107.

### -G-

- Galdiero F., Lembo M., Tufano M. A., 1968 - *Affinity of various cations for Staphylococcus aureus cell wall*, Experimentia (Base!), 24, 34-36.
- Gaujous, D., 1993 - *La pollution des milieux aquatiques : aide mémoire*. Paris : Tec et Doc Lavoisier.. 212 p.
- Gauthier M. J., Flatau G. N., Breittmayer J. P., Mathieu A., Clément R. L., 1984- *Influence de bactéries aérobies ou anaérobies sur la fixation du cadmium et du vanadium par un sédiment artificiel en eau de mer*, Environ. Technol. Lett., 5, 441-452.
- Gerlach, A.S., 1981 - *Marine Pollution. Diagnosis and Therapy*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, p. 218.
- Ghai, R., T. Hain, and T. Chakraborty. 2004- *GenomeViz: visualizing microbial genomes*. BMC Bioinformatics 5:198.
- Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K. and Vandamme, P., 2001- *Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as Ralstonia campinensis sp. nov., Ralstonia metallidurans sp. nov. and Ralstonia basilensis Steinle et al., 1998 emend*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1773-1782.
- Grant Ca., Buckley Wt., Bailey Ld et Selles F., 1998 - *Cadmium accumulation in crops*, Can. J. Plant Sci. 78: 1–17.

### -H-

- Hanna, K., 2004 - *Étude 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.
- Hill, J. E., Baiano, J.C. F., Barnes, A.C., 2009,-*Isolation of a novel strain of "B. pumilus" from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens*, Journal of Fish Diseases.
- Holt, J.G., et al. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* , 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Hynninen A., Touze T., Pitkanen L., Mengin-Lecreulx D., Virta M. 2009 - *An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria*. Mol Microbiol 74: 384–394.

### -J-

- Jacobs JA., Foreman C., 2005 - *Groundwater and Cadmium: Chemical Behavior and Treatment*. *Water Encyclopedia*. 613–619.
- Janssen, P. J., Van Houdt, R., Moors, H., Monsieurs, P., Morin, N., Michaux, A., Benotmane, M. A., Leys, N., Vallaeys, T., Lapidus, A., Monchy, S., Médigue, C., Taghavi, S., Mccorkle, S., Dunn, J., van der Lelie, D., & Mergeay, M.,2010,- *The complete genome sequence of Cupriavidus metallidurans strain CH34, a master survivalist in harsh and anthropogenic environments*,*PloS one*, 5(5), e10433. disponible sur « <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010433> ».

### -K-

- Kaur, A. et al.- *Survival strategies of an archaeal organism to withstand stress from transition metals*. *Genome Res*. 841– 854 (2006).
- Kim B., McBride MB. , 2009 - *Phytotoxic effects of Cu and Zn on soybeans grown in field-aged soils: their additive and interactive actions*, *J Environ Qual*. 38:2253-2259.
- Kirchman, D. L., 2008 - *Introduction and overview*. *Microbial Ecology of the Oceans*. D. L. Kirchman. Hoboken, New Jersey, Wiley & sons: 1-26.

## Références bibliographiques

---

- -Kopittke PM. Asher CJ. Blamey FPC et Menzies NW. ,2007,b.- *Toxic effects of Pb<sup>2+</sup> on the growth and mineral nutrition of signal grass (Brachiaria decumbens) and Rhodes grass (Chloris gayana)*. Plant and soil. 300: 127-136.
- -Kopittke PM. Asher CJ. Kopittke RA et Menzies NW,2007,a.- *Toxic effects of Pb<sup>2+</sup> on growth of cowpea (Vigna unguiculata)*, Environ Pollut. 150: 280-287.

### -L-

- Ledin, M., 2000 -*Accumulation of metals by microorganisms processes and importance for soil systems*. Earth-Science Reviews 51, 1-31.
- Lejeune P., Mergeay M., Van Gijsegem F., Faelen M., Gerits J., 1983- *Chromosome transfer and R-prime plasmid formation mediated by plasmid pULB113 (RP4::mini-Mu) in Alcaligenes eutrophus CH34 and Pseudomonas fluorescens 6.2*. J Bacteriol 155: 1015–1026.
- Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R.A. and Schlegel, H.G.,1993- *Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant cnr from pMOL28 of Alcaligenes eutrophus CH34*. J. Bacteriol. 175, 767-778.
- Long XX., Yang XE., Ni WZ. Ye ZQ. He ZL. Calvert DV & Stoffella JP. 2003 - *Assessing Zinc Thresholds for Phytotoxicity and Potential Dietary Toxicity in Selected Vegetable Crops*. Comm. Soil Sci. Plant Anal. 34: 1421-1434.

### -M-

- Macalady, J.L., Mack, E.E., Nelson, D.C., Scow, K.M., 2000 - *Sediment microbial community structure and mercury methylation in mercury-polluted Clear Lake, California*, Appl. Environ, Microbiol. 66, 1479–1488.
- Manivasagaperuma R., Vijayarangan P.,Balamurugan S. et Thiyagarajan G.,2012 - *Effect of zinc on growth, dry matter yield and nutrient content of Vigna Radiata (L.) Wilczek*, International Journal of Recent Scientific Research. 3: 687 -692.
- Marchand, M. et Kantin, R., 1997,- *Contaminants chimiques en milieu aquatiques*, Oceanis, N°4, Vol 23. 677-694 p.

## Références bibliographiques

---

- Margesin, R. and Schinner, F.,1997-*Heavy metal resistant Arthrobacter sp. a tool for studying conjugational plasmid transfer between gram-negative and gram-positive bacteria.* J. Basic Microbiol. 37, 217-227.
- Mazziotti, M., 2017 - *Impact des exsudats racinaires de Miscanthus x giganteus sur les microorganismes impliqués dans la bioremédiation d'un sol contaminé au benzo (a) anthracène.* Thèse de doctorat. Université de Lorraine, Collegium Sciences et Technologies Ecole Doctorale RP2E «Ressources, Procédés, Produits, Environnement».P 89.
- Mergeay M., Monchy S., Janssen P., Van Houdt R., Leys N. 2009 - *Megaplasmiids in Cupriavidus Genus and Metal Resistance.* In: Schwartz E, ed. *Microbial Megaplasmiids.* Berlin: Springer Berlin/Heidelberg. pp 209–238.
- Mergeay M.,2000-*Bacteria adapted to industrial biotopes: the metal resistant Ralstonia.* In: Hengge-Aronis R, Storz G, eds. *Bacterial Stress Responses.* Washington, DC: ASM Press. pp 403–414.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaëys, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D., Wattiez, R.,2003,- *Ralstonia metallidurans, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes.* FEMS microbiology reviews, 27(2-3), 385–410. disponible sur « [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00045-7) ».
- Migne, V., Morin, A., Tissot, S., 2005,(b).,- *Cuivre et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques,* INERIS, 56p.
- Misra, T.K., 1992 - *Bacteria resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. Plasmid* 27, 4–16.
- Miyasaka, T., Asami, H., Watanabe, K. , 2006 - *Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments,* Biodegradation P227-235.
- Morin, A., 2005 -*Zinc et ses dérivés,Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques,No.DRC-01-25590, 00DF259.doc).*
- Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., Phung, L. T., Silver, S.,2002,- *Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes,*FEMS Microbiol Rev 26, 311-325.



## Références bibliographiques

---

- Nascimento, A.M.A., Chartone-Souza, E., 2003 - *Operon mer: bacterial resistance to mercury and potential for bioremediation of contaminated environments*, Genet. Mol. Res. 2, 92– 101.
- Nathalie ,S . 2007 - *Décontamination de sols pollués par les HAP par biodégradation en présence de substrats organiques*. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.). Université du Québec.
- Nelson A., Donkin P., 1985 -*Processes of bioaccumulation: the importance of chemical speciation*, Mar. Pol/ut. Bull., 16, 164-169.
- Nies DH., 1999- *Microbial heavy-metal resistance*. Appl Microbiol Biotechnol 51: 730–750.
- Nies, D. H., Rehbein, G., Hoffmann, T., Baumann, C., Grosse, C.,2006- *Paralogs of genes encoding metal resistance proteins in Cupriavidus metallidurans strain CH34*. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 11(1-2), 82–93. disponible sur « <https://doi.org/10.1159/000092820> ».
- Nies, D., Mergeay, M., Friedrich, B. and Schlegel, H.G.,1987-*Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in Alcaligenes eutrophus CH34*. J. Bacteriol. 169, 4865-4868.
- Nies, D.H., Nies, A., Chu, L. and Silver, S. ,1989- *Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from Alcaligenes eutrophus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 7351-7355.
- Nies. 1999 - *Microbiologie heavy métal resistance*, Appl microbial boitechnol 51:730-750.
- Novick RP, Roth C.,1968- *Plasmid-linked resistance to inorganic salts in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 95: 1335–1342.
- Nriagu, J.O. et Pacyna, J.M. 1988 - *Quantitative assessment of worjwide contamination in air, water and sails by trace metals*, Nature, Lond., 333 : 134-139.

-O-

- O'Halloran, T. V., Culotta, V. C.,2000 -*Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions*. J. Biol. Chem. 275, 25057–25060.
- Odokuma, L., Dickson, A. (2003). *Bioremediation of a crude oil polluted tropicall rain forest soil* .Global Journal of Environnement, P 2,29-40.

## Références bibliographiques

---

- Osborn, A.M., Bruce, K.D., Strike, P., Ritchie, D.A., 1995 - *Sequence conservation between regulatory mercury resistance genes in bacteria from mercury polluted and pristine environments*. *Syst, Appl., Microbiol.*, 18, 1–6.

### -P-

- Palumaa, P., 2013 - *Copper chaperones The concept of conformational control in the metabolism of copper*. *FEBS Lett.* 587, 1902–1910.
- Pardo, R., Herguedas, M., Barrado, E., Vega, M., 2003 - *Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of Pseudomonas Putida*, *Anal Bioanal Chem* 376, 26-32.
- Paulsen, I. T. & Saier, M. H., Jr., 1997 - *A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins*. *J. Membr Biol.*, 156, 99-103.
- Podlesek, Z., Comino, A., Herzog-Velikonja, B., Zgur-Bertok, D., Komel, R. and Grabnar, M., 1995 - *Bacillus licheniformis bacitracin resistance ABC transporter: relationship to mammalian multidrug resistance*. *Mol. Microbiol.* 16, 969-976.
- Proksch P. and W. E.G Muller W.E.G. Eds ,2006,- *Frontiers in Marine Biotechnology*, Horizon BioScience (UK) 368 p.

### -R-

- Roane, T.M., 1999 - *Lead resistance in two bacterial isolates from heavy metal-contaminated soils*. *Microb. Ecol.* 37, 218-224.

### -S-

- Sagardoy R. Morales F. López-Millán AF. Abadía A et Abadía J. ,2009 - *Effects of zinc toxicity on sugar beet (Beta vulgaris L.) plants grown in hydroponics*, *Plant Biol (Stuttg)*.11(3): 339-350.
- Saier, M. H., Jr., Tam, R., Reizer, A., Reizer, J., 1994 - *Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport*, *Mol Microbiol* 11, 841- 847.
- Schalk, I. J., Hannauer, M. & Braud, A., 2011 - *New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance*. *Environ. Microbiol.* 13, 2844–2854.

## Références bibliographiques

---

- Schmidt, T., Schlegel, H.G., 1994- *Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of Alcaligenes xylosoxidans 31A*. J. Bacteriol. 176, 7045-7054.
- Sies, H., 1999 - *Glutathione and its role in cellular functions*, Free Radic Biol Med 27, 916–921.
- Silver S., Phung L.T., 1996-*Bacterial heavy metal resistance: new surprises*. Annu Rev Microbiol 50: 753–789.
- Silver, S., Phung, LT., 1996 - *Bacterial heavy metal resistances, new surprises*, Ann. Rev. Microbiol. 50: 753-789.
- Srivastava, P., Kowshik, M., 2013 - *Mechanisms of metal resistance and homeostasis in Haloarchaea*, Archaea .
- Stoppel, R.D. and Schlegel, H.G., 1995- *Nickel-resistant bacteria from anthropogenically nickel-polluted and naturally nickel-percolated ecosystems*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 2276-2285.

### -T-

- Taghavi, S., Mergeay, M. and van der Lelie, D., 1997 - *Genetic and physical maps of the Alcaligenes eutrophus CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature-induced mutagenesis and mortality*. Plasmid 37, 22-34.
- Tang, S. N., Fakhru'l-Razi, A., Hassan, M. A., Karim, M. I. , 1999 - *Feasibility study on the utilization of rubber latex effluent for producing bacterial biopolymers*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 27, 411-416.
- Tauch A., Schneiker S., Selbitschka W., Puhler A., van Overbeek L.S., 2002- *The complete nucleotide sequence and environmental distribution of the cryptic, conjugative, broad-host-range plasmid pIPO2 isolated from bacteria of the wheat rhizosphere*. Microbiology 148: 1637–1653.
- Top E., Mergeay M., Springael D., Verstraete W., 1990- *Gene escape model: transfer of heavy metal resistance genes from Escherichia coli to Alcaligenes eutrophus on agar plates and in soil samples*. Appl Environ Microbiol 56: 2471–2479.
- Trajanovska, S., Britz, M.L. and Bhave, M., 1997 - *Detection of heavy metal ion resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria isolated from a lead-contaminated site*. Biodegradation 8, 113-124.

### -V-

- van Elsas J.D., Gardener B.B., Wolters A.C., Smit E. 1998- *Isolation, characterization, and transfer of cryptic gene-mobilizing plasmids in the wheat rhizosphere*. Appl Environ Microbiol 64: 880–889.
- Van Houdt, R., Monchy, S., Leys, N.,2009,- *Nouveaux éléments génétiques mobiles dans Cupriavidus metallidurans CH34, leurs rôles possibles et leur présence dans d'autres bactéries*, Antonie van Leeuwenhoek 96, 205-226 . disponible sur « <https://doi.org/10.1007/s10482-009-9345-4>».

### -W-

- Whitman, W. B., D. C. Coleman and W. J. Wiebe ,1998,- *Prokaryotes: the unseen majority*, PNAS 95(12): 6578-83.

### -Y-

- Yepiskoposyan, H. et al. Transcriptome response to heavy metal stress in Drosophila reveals a new zinc transporter that confers resistance to zinc. Nucleic Acids Res. 34, 4866–4877 (2006).