

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie-Ecologie

Spécialité/Option : Microbiologie de l'environnement : Santé, Eau, Environnement

Thème

La métallorésistance bactérienne vis-à-vis du cuivre et du cobalt

Présenté par : Melle BERREDJEM Sara

Melle SAAIDIA Randa

Devant les jurys :

Présidente : Mme Boussadia Meriem Imen (M.A.A)

Examinatrice : Mme Benhalima Lamia (M.A.A)

Encadreur : Mme Amri Sandra (M.A.A)

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Juin 2015

الديمقراطية الشعبية
لي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE LA TERRE ET
DE L'UNIVERS
DEPARTEMENT D'ECOLOGIE ET GENIE DE L'ENVIRONNEMENT



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Microbiologie-Ecologie

Spécialité/Option : Microbiologie de l'environnement : Santé, Eau, Environnement

Thème

La métallorésistance bactérienne vis-à-vis du cuivre et du cobalt

Présenté par : Melle BERREDJEM Sara

Melle SAAIDIA Randa

Devant les jurys :

Présidente : Mme Boussadia Meriem Imen (M.A.A)

Examinatrice : Mme Benhalima Lamia (M.A.A)

Encadreur : Mme Amri Sandra (M.A.A)

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Juin 2015

Sommaire

Titre des matières	pages
Remerciements	
Dédicace	
Glossaire	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	
Chapitre I : Synthèse bibliographiques	
1. Pollution métallique	1
1.1. Définition de la pollution	1
1.2. Classification de la pollution.....	1
1.2.1. La pollution physique.....	1
1.2.2. La pollution microbiologique.....	1
1.2.3. La pollution chimique.....	1
1.3. Sources de la pollution	2
1.4. Métaux lourds	2
1.5. Classification des métaux lourds.....	2
1.5.1. Métaux essentiels	2
1.5.2. Métaux non essentiels.....	3
1.6. Origine des métaux lourds	3
1.6.1. Origine naturelle	4
1.6.2. Origine anthropique	4
1.7. Propriétés des métaux lourds	4
1.7.1. Cuivre	4
1.7.2. Cobalt	5
1.8. Effets toxiques des métaux lourds	5
1.8.1. Effets toxiques sur la santé humaine	5
1.8.2. Effets toxiques sur les organismes aquatiques	6
2. Microorganismes	6
2.1. <i>Escherichia coli</i>	6

2.1.1. Classification.....	6
2.1.2. Habitat	6
2.1.3. Caractéristiques.....	7
2.1.4. Pouvoir pathogène	7
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2.1. Classification	7
2.2.2. Habitat	8
2.2.3. Caractéristiques	8
2.2.4. Pouvoir pathogène	8
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.3.1. Classification	9
2.3.2. Habitas	9
2.3.3. Caractéristiques.....	9
2.3.4. Pouvoir pathogène	9
3. Métallorésistance bactériennes	10
3.1. Notion de résistance et de tolérance	10
3.2. Voie d'entrée des métaux lourds dans la cellule bactérienne	10
3.3. Résistance bactérienne aux métaux lourds	10

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Métaux lourds	13
2. Souches bactériennes	13
3. Milieux utilisés	13
4. Préparation des solutions mères.....	13
5.Étude de la résistance bactérienne aux métaux lourds	15
5.1.Repiquage des souches.....	15
5.2.Préparation des cultures jeunes.....	15
5.3. Préparation de l'inoculum bactérien.....	15
5.4. Détermination de la concentration minimal inhibitrice (CMI).....	15
6. Sélection de souches bactériennes tolérantes aux métaux lourds.....	15

Chapitre III : Résultats et discussions

1.Détermination du taux de croissance	16
1.1. <i>Escherichia coli</i>	16
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	17

1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	20
3. Adaptation et tolérance bactériennes	28

Conclusion

Références bibliographiques

Résumés

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A

Tout d'abord je remercie ALLAH

Mon père Salah et ma mère Meriem qui ont tant voulu me voir à ce niveau, et que j'adore et je ne peux jamais leur rendre le bien et l'amour qu'ils m'ont offert, je vous aime.

A

Mes frères Fathi et bolbol (Bellal), Khalil, Ameer et chérif.

Sans oublier mes sœurs :Nadjat, Amel, Chafika 16, Assia, Nadia et leurs enfants :Boumedién, Khalid, Amine, Aya, Sahboba 36, et Nardjessa, Lolol6, Hasna .badi.

A

tout mes amies :binome Randa, Rrasika, Nadjwa

Noor taref, Soumia, Yamina, Toma, Zozo, Nacira, Rabiaa,

Randa, Sihem, Rahma, Barisa, Chouchana, Yousra, Zinab Houda, Sans oublier toutes mes collègues.

A la famille: Berredjem et Safsafa.

Et Pour tous ceux qui me connais de près ou de loin.

[Http://maomao520.yeah.net](http://maomao520.yeah.net)

SARA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A

ALLAH le tout puissant à qui je dois tout.

*Mon cher père **Said** ;*

À celui qui m'a éclairci le chemin de la vie et ne cesse de m'encourager.

*A Ma très chère mère **Fella**,*

Que dieu la protège ; a celle qui m'a été le soutien moral pendant ce travail.

Merci beaucoup Papa et Maman je vous aime beaucoup

*À mon frère **Tayeb** ;*

*À mes sœurs **Zineb, Asma** et leurs enfants **Malek** et **Anes**;*

*À Mon fiancé **Nasser** ;*

Je leur exprime toute mon affection pour leur patience et leur encouragement qui a eu à mon égard au cours de la finalisation de ce travail ;

A ma belle famille ;

Sans oublier toutes mes amies et mes collègues.

Randa

Glossaire

Alliage : c'est la combinaison d'un élément métallique avec un ou plusieurs autres éléments chimiques.

Anomalie : désigne tout phénomène qui s'éloigne de ce qui est considéré comme normal.

Anthropique: relatif à l'activité humaine. Qualifie tout élément provoqué directement ou indirectement par l'action de l'Homme.

Biocénose : ensemble d'être vivants qui occupent un lieu de vie bien défini que l'on appelle le biotope.

Biomarqueurs : un bio marqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire et physiologique, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à une substance chimique à caractère polluant.

Commensalisme : interaction durable entre des individus d'espèces différentes où l'un des partenaires retire un bénéfice de l'association tandis que l'autre n'y trouve ni avantage ni véritable inconvénient.

Diamagnétiques : qualifie un matériau très faiblement influencé par un champ magnétique.

Élément trace : substances chimiques existant en quantités infimes dans l'eau.

Flore : ensemble des bactéries non pathogènes présentes dans le corps nécessaires à la production de certaines vitamines, à la digestion et à la stimulation du système immunitaire.

Fond géochimique : composition chimique d'un sol et des roches du sous-sol.

Furoncles : infection profonde de la base d'un poil et du follicule pilo-sébacé.

Hémochromatose : maladie héréditaire caractérisée par l'absorption de trop grandes quantités de fer.

Homéostasie: est la capacité que peut avoir un système quelconque à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures. Selon Walter Bradford Cannon : « l'homéostasie est l'équilibre dynamique qui nous maintient en vie »

Immunodéprimés : lorsque le système de défense naturel est affaibli, l'organisme est alors moins résistant aux agents infectieux.

Impétigo : infection de la peau d'origine bactérienne due à *Staphylocoque aureus* et aux Streptocoques bêta hémolytique du groupe A).

Infection nosocomiale : maladie infectieuse survenue après l'entrée à l'hôpital.

Stress oxydant : un état de déséquilibre de l'organisme entre la production d'éléments oxydants et de mécanismes de défense anti oxydantes.

Système actif: désigne le passage d'un ion ou d'une molécule à travers une membrane contre son gradient de concentration.

Maladie de Menkes : maladie qui provoque des cheveux décolorés similaires à la laine des moutons.

Maladie de Parkinson : maladie neurologique affectant le système nerveux central. Elle est responsable d'anomalies motrices à évolution progressive se manifestant par des mouvements et tremblements involontaires.

Maladies de Wilson : maladie génétique caractérisée par l'accumulation du cuivre dans l'organisme essentiellement dans le foie et le cerveau.

Malléabilité : Propriété attribuée aux métaux qui s'aplatissent en feuilles soit sous l'action du marteau soit par le passage au laminoir.

Métallurgie : désigne l'industrie de la fabrication des métaux et des alliages.

Otite : inflammation de la peau ou des muqueuses de l'oreille.

Plasmide : Élément génétique extra-chromosomique, capable de se répliquer de manière autonome, et portante des gènes conférant un avantage sélectif.

Potentiel redox : ou potentiel d'oxydo-réduction, est une mesure qui indique le degré auquel une substance peut oxyder ou réduire une autre substance.

Radicaux libres : molécules chimiques instables produites en faible quantité par l'organisme, cette instabilité chimique fait que ces substances sont très réactives.

Radioisotope : atome dont le noyau est instable et rayonneur, cette instabilité peut être due à un excès de protons, de neutrons voire des deux.

Septicémie : infection grave de l'organisme se caractérisant par le développement et la multiplication des microorganismes dans la circulation sanguine.

Sinusite : inflammation des muqueuses qui recouvrent l'intérieur des sinus, ces cavités remplies d'air et situées dans les os du crâne communiquent avec le nez.

Taux de croissance : temps mis par une bactérie à se diviser (temps de génération).

Thalassémie : ou encore appelée maladie de Cooley, c'est une forme d'anémie héréditaire associée à une hémoglobinopathie.

Tolérance : comportement anormal d'une bactérie en présence d'une molécule habituellement bactéricide.

Transposon : élément d'ADN qui peut se déplacer d'un endroit à un autre.

UFC : unité utilisée pour dénombrer les bactéries viables.

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection.

ATP : Adénosine TriPhosphate.

C° : Degré Celsius.

Cd : Cadmium.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

Co : Cobalt.

Cu : Cuivre.

Cys : cystéine.

Da : Dalton.

ETM : éléments traces métalliques.

g : gramme.

g/cm³ : gramme par centimètre cube.

g/mol : gramme par mol.

GN : gélose nutritif.

h : heure.

Hg : Mercure.

IPCS : Organisation International Programme on Chemical Safety.

MH : Muller Hinton.

mg/ml : milligramme par millilitre.

ml : millilitre.

mV : millivolt.

µm : micromètre.

µg/ml :microgramme par millilitre .

MT : Méthallothioneine.

Ni : Nickel.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie.

PM :Poids moléculaire.

% : Pour cent.

Pb : Plomb.

pH :potentiel hydrogène ..

UFC/ ml : unité formant colonie par millilitre.

Z : nombre de proton =Np.

Liste des figures

Figures	Pages
Figure 1. Classification périodique des éléments	3
Figure 2: Origine des métaux lourds.....	4
Figure 3 : Distribution du taux de croissance d' <i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	16
Figure 4: Distribution du taux de croissance d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	17
Figure 5 : Distribution du taux de croissance d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	17
Figure 6 : Distribution du taux de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	18
Figure 7 : Distribution du taux de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	18
Figure 8 : Distribution du taux de croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	19
Figure 9 : Distribution du taux de croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	19

Liste des tableaux

Tableaux	Pages
Tableau 1 : Principaux caractères d' <i>Escherichia coli</i>	7
Tableau 2: Principaux caractères de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Tableau 3: Principaux caractères de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Tableau 4 : Compositions des milieux de culture.....	14
Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices du cobalt et du cuivre sur les souches bactériennes.....	20
Tableau 6: Concentrations minimales inhibitrices d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis du cobalt.....	22
Tableau 7 : Concentrations minimales inhibitrices d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis du cuivre.....	23
Tableau 8 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis du cobalt. ...	24
Tableau 9 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis du cuivre.....	25
Tableau 10 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis du cobalt.....	26
Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis du cuivre.....	27
Tableau 12: Capacité de tolérance bactérienne aux différentes concentrations du cobalt.....	28
Tableau 13: Capacité de tolérance bactérienne aux différentes concentrations du cuivre.....	28

L'impact de la pollution sur les écosystèmes et la santé humaine est une question mondiale d'urgence, parmi les polluants toxiques d'origine naturelle ou anthropique les métaux lourds posent un sérieux problème environnemental (**Benfettoume et Khalla, 2014**).

Les métaux lourds sont des composés stables hautement persistants et essentiels à la vie, ils peuvent participer à de nombreuses réactions métaboliques chez les organismes procaryotes ou eucaryotes (**Williams et Frausto da Silva, 2006**), aussi ils peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques (**De Forest et al., 2007, Croteau et al., 2005**).

La présence des métaux lourds à des concentrations supérieures aux charges naturelles est devenue un problème de plus en plus préoccupant (**Biney et al., 1991**), les microorganismes sont les premiers organismes influencés par cette toxicité (**Giller et al., 1998**) car ces composés peuvent provoquer divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence (**Morozzi et al., 1982**), l'inhibition des activités enzymatiques (**Nweke et al., 2007**), l'altération de la structure de l'ADN (**Bruins et al., 2000; Rathnayake et al., 2009**), la modification de la composition et de la structure de la population microbienne (**Kozdrój et van Elsas, 2001; Satchanska et al., 2005**). Pour faire face à la profusion de métaux lourds dans l'environnement, les bactéries ont élaboré plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et de se développer en présence de métaux lourds (**Silver, 1996**).

En Algérie, de nombreux cas de pollution industrielle et urbaine ont été observés en l'occurrence au niveau des cours d'eau (**Harrat et Achour, 2010**). L'oued Messida situé dans le Parc national d'El Kala, constitue un chenal d'eau très important, il relie le lac Tonga à la mer Méditerranée et constitue un corridor biologique permettant aux espèces de poissons de se déplacer de la mer vers le lac et vice versa. Malheureusement, ce canal reçoit des polluants d'origine divers qui dégradent considérablement la qualité de ces eaux. Donc le contrôle et la surveillance de la qualité des eaux de cet écosystème aquatique devraient susciter un intérêt particulier, ils doivent avoir comme objectif majeur la préservation des habitats écologiques et la santé humaine (**El haite, 1991**).

De ce fait, le notre travail a pour objectif de déterminer le degré de la pollution des eaux de l'oued Messida par une étude comparative de la métallorésistance des souches isolées à partir de l'oued et des souches de références par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une part et de la recherche des bactéries tolérantes d' autre part.

1. Pollution métallique

1.1. Définition de la pollution

Le terme Pollution désigne toute modification de milieu naturelle, qui s'exerce dans un sens défavorable, sous l'effet des activités humaines. Elle est l'effet de divers types de rejets, qui apportent au milieu soit des substances minérales ou organiques c'est le cas de la pollution chimique, soit des microorganismes pathogènes en parle alors de pollution microbienne (Chennouf et Siradj, 2008).

1.2. Classification de la pollution

La pollution d'un milieu est une dégradation physique, chimique ou biologique de ses qualités naturelles provoquées par l'Homme et ses activités, elle peut perturber les conditions de vie et l'équilibre du milieu aquatique. Elle peut être classée comme suite [01] :

1.2.1. Pollution physique

La pollution physique peut être représentée par une pollution radioactive ou thermique provenant des rejets des radio-isotopes ayant servi au refroidissement des centrales électriques et nucléaires. Ces conséquences sont représentées par l'élévation de la température du milieu aquatique ce qui se traduit par la modification du taux d'oxygène, l'augmentation de l'activité cellulaire et respiratoire de la biocénose ainsi que la prolifération d'espèces thermophiles [01].

1.2.2. Pollution microbiologique

La pollution microbiologique est représentée par la présence des microorganismes pathogènes comme les bactéries (*Salmonella*, *Staphylocoques*, *vibrions...*), les virus (virus de l'hépatite, entérovirus....), les champignons (*Candida*, *Torula....*), les protozoaires et les parasites (*Ascaris*, *Tenia....*). Ces microorganismes sont à l'origine de la contamination des milieux aquatiques, ils proviennent des eaux usées improprement traitées ou des eaux de ruissellement provenant des installations d'élevages des animaux [02].

1.2.3. Pollution chimique

La pollution chimique elle est due à des substances indésirables ou dangereuses d'origines diverses tels que les déchets domestiques et industriels chargés de divers matières : les pesticides, les détergents, les métaux lourds,... [02].

1.3. Sources de la pollution

Les différentes sources de la pollution peuvent être résumées comme suite (**Scriban, 1993**) :

- Les eaux usées domestiques.
- Les rejets industriels.
- Les eaux pluviales.
- Les eaux issues des rejets agricoles.
- Les effluents des établissements hospitaliers.

1.4. Métaux lourds

Le terme métaux lourds est un mot ambigu et dont la définition varie d'une source à l'autre, jusqu'à présent il n'existe pas de définition générale mais selon **Nies (1999)**, ils peuvent être définis comme : Tout métal ayant une densité supérieure à 5g/cm^3 , ayant un numéro atomique élevé supérieur à celui du Sodium ($Z=11$) et pouvant être toxique pour les systèmes biologiques (**Bendjama, 2007**).

Le terme élément trace métallique (ETM) est aussi utilisé pour décrire les métaux lourds car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement (**Baker et Walker, 1990**). Parmi les éléments recensés dans la classification périodique de Mendeleïev, 53 sont considérés comme des métaux lourds (Figure 1).

1.5. Classification des métaux lourds

D'un point de vue biologique on peut distinguer deux types métaux lourds en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques.

1.5.1. Métaux essentiels

Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (**Loué, 1993**), ils interviennent dans de nombreuses réactions enzymatiques et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides, cependant ils peuvent devenir toxiques lorsque leurs concentrations dépasse un certain seuil (**Kabata Pendias et Pendias, 2001**).

1.5.2. Métaux non essentiels

Métaux non essentiels ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique pour la cellule, c'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg) et du cadmium (Cd) (Chiffolleau *et al.*, 2004).

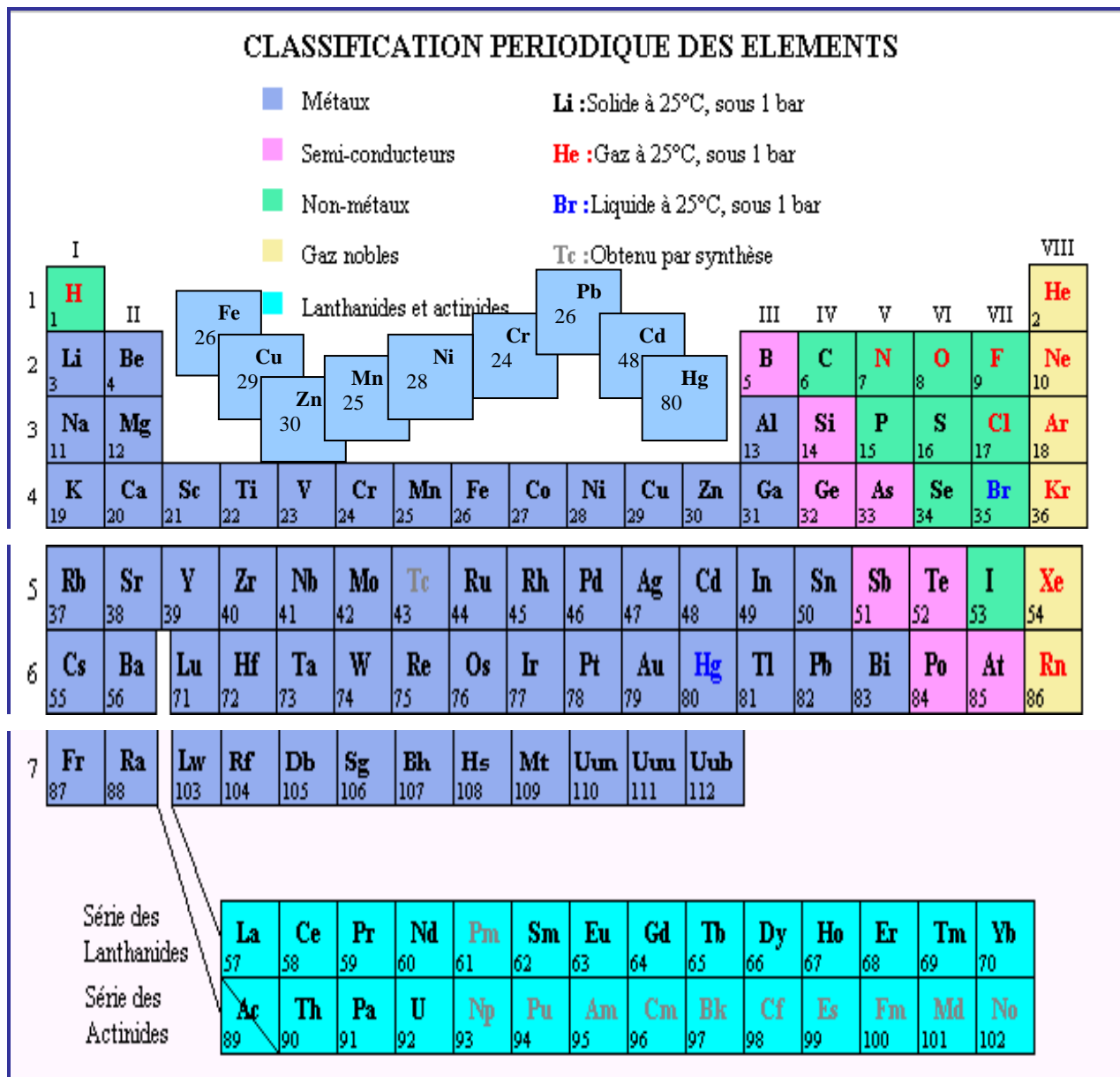


Figure 1 : Classification périodique des éléments (Bendjama, 2007).

1.6. Origine des métaux lourds

L'origine des métaux lourds dans l'environnement peut être naturelle ou anthropique (Figure 2) :

1.6.1. Origine naturelle

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (**Bourrelier et Berthelin, 1998**).

1.6.2. Origine anthropique

La source majeure de la contamination est d'origine anthropique, les principaux types de la pollution anthropique sont : la pollution atmosphérique, la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle (**Baize, 1997 ; Robert et Juste, 1999**).

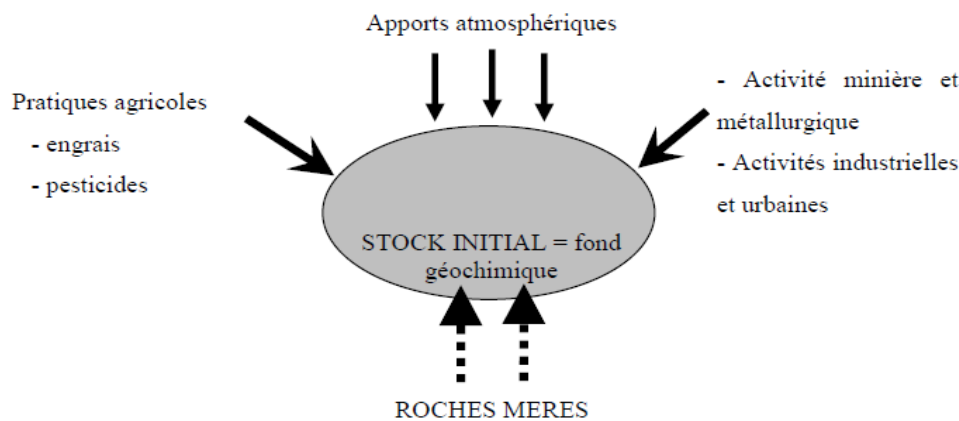


Figure 2: Origine des métaux lourds (**Robert et Juste, 1999**).

1.7. Propriétés des métaux lourds

Un métal lourd est un élément chimique doté d'un éclat particulier, c'est un bon conducteur de la chaleur et de l'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité. Ils peuvent se combiner avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'Homme depuis l'antiquité (**Rouane, 2013**). Nous nous limiterons à décrire seulement 2 métaux : le cobalt et le cuivre.

1.7.1. Cuivre

Le cuivre (Cu) est un oligoélément indispensable au métabolisme des êtres vivants, il forme de nombreux complexes stables avec des ligands minéraux (les chlorures ou l'ammonium) ou avec des ligands organiques (**ATSDR, 1990 ; Dameron et Howe, 1998**). C'est l'un des métaux les plus employés à cause de ses propriétés physiques et de sa conductibilité électrique et thermique. Il est utilisé dans la métallurgie, la fabrication des alliages de bronze, du matériel électrique, la plomberie et les équipements industriels. C'est un élément essentiel chez l'Homme et l'animal, il est impliqué dans de nombreuses voies métaboliques notamment la formation d'hémoglobine et la maturation

des polynucléaires neutrophiles. De plus, c'est un cofacteur spécifique de nombreuses enzymes et métalloprotéines intervenant dans le métabolisme oxydatif et la respiration cellulaire. La toxicité des organismes vivants vis à vis du cuivre dépend de sa forme, de son état d'oxydation et de sa concentration (**Bendjama, 2007 ; OMS-IPCS, 1998**).

1.7.2. Cobalt

Le cobalt (Co) est un élément présent naturellement dans l'environnement, il présente certains bienfaits pour l'Homme cependant, à des concentrations importantes il peut être nocif. Lorsque le cobalt est engagé dans un complexe, il procure une stabilité remarquable, la majorité de ses complexes sont diamagnétiques. Il peut aussi être utilisé comme un agent de séchage ou un catalyseur dans la polymérisation des glycérides insaturés (**Benbelkacem, 2012**).

Le Co est biologiquement essentiel (**Chiffolleau et al., 2001**), il a été identifié comme un constituant dans de nombreuses enzymes, cependant l'exposition à une très forte concentration peut néanmoins nuire à la santé, des infections pulmonaires ont été observées chez des travailleurs qui avaient respiré du cobalt, aussi des anomalies de croissance ont été observées chez les fœtus des animaux de laboratoire exposés à une forte concentration pendant la grossesse (**Frank et al., 1976 ; Benbelkacem, 2012**).

1.8. Effets toxiques des métaux lourds

1.8.1. Effets toxiques sur la santé humaine

La toxicité des métaux lourds n'est plus à démontrer elle a été reconnue depuis l'Antiquité, leur présence est responsable des nombreuses maladies connues chez l'Homme. Ainsi près de 30 % de la population mondiale souffre d'anémie due à une déficience en fer. De même, un défaut d'absorption du cuivre peut être à l'origine de la maladie de Wilson ou de Menkes (**Mercer et al., 2001**). Une surcharge en fer conduit à la thalassémie, cataracte ou l'hémochromatose. Un dérèglement dans l'homéostasie du cuivre peut être à l'origine de troubles neurologiques graves comme la maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Certains métaux peuvent entrer en compétition avec des ions physiologiques ce qui peut inhiber les fonctions propre de ces derniers (**Nies, 1999**). Un autre exemple est celui du nickel, il a la faculté de se solubiliser dans les lipides et les graisses sous-cutanée. Ainsi sous la forme Ni^{2+} , il peut interagir avec les acides aminés de la peau tels que les histidines ou les cystéines (**Savolainen, 1996**). Enfin, leurs propriétés redox peuvent conduire au déclenchement de la formation des radicaux libres créant alors un stress important (**Nelson, 1999 ; Nies, 1999**).

1.8.2. Effets toxiques sur les organismes aquatiques

La contamination par des métaux peut avoir des effets toxiques sur la vie aquatique, à faibles concentrations, beaucoup de métaux lourds peuvent inhiber la photosynthèse et la croissance des microorganismes (Burnol *et al.*, 2006). Aussi des effets indésirables ont été observés chez les poissons, les mollusques et les crustacés qui se manifestent par un retard du développement embryonnaire, des malformations, une croissance tardive des adultes (Zhao *et al.*, 2000), des perturbation de la reproduction et l'augmentation ou la baisse du taux de bio marqueurs de défenses (Huynh, 2009).

2. Microorganismes

De nombreuses enquêtes dans le monde ont dénoncé l'effet de la pollution sur le monde microbien, il est clair que l'effet des rejets intensifs des métaux lourds a conduit à l'apparition de bactéries résistantes (Joffin et Leyral, 2006), avant d'entamer la résistance nous citerons quelques caractéristiques de 3 genres bactériens dont nous utiliseront dans matériel et méthodes.

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire (Avril *et al.*, 2000).

2.1.1. Classification

La classification de l'espèce *Escherichia coli* a été réalisée selon (Delarras *et al.*, 2010).

Domaine : *Eubacteria*

Phylum XII : *Proteobacteria*

Classe : *Gammproteobacteria*

Ordre : *Enterobacteriales*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Escherichia*

Espèce : *Escherichia coli*

2.1.2. Habitat

Escherichia coli est un hôte normal de l'intestin, elle représente près de 80 % de la flore intestinale aérobie de l'adulte, on peut la retrouver également au niveau des diverses muqueuses

chez l'Homme et l'animal, sa présence dans l'environnement ou dans un produit alimentaire est un signe de contamination fécale (Ferron, 1984).

2.1.3. Caractéristiques

Les principaux caractères d'identification de l'espèce *Escherichia coli* sont représentés dans le tableau 1.

Tableau 1: Principaux caractères d'*Escherichia coli* (Clave, 2012).

Morphologie	Bacille fin allongé aux extrémités arrondies de 2 - 4 µm de longueur et 0,4 - 0,6 µm de largeur
Coloration de Gram	Bactérie à Gram -
Mobilité	Mobile à une ciliature péritriche
Type respiratoire	Aérobie anaérobie facultatif
Indole	+ (à 44°C)
Oxydase	-
Catalase	+
Température de croissance	Comprise entre 37-44°C

2.1.4. Pouvoir pathogène

Certaines souche de d'*Escherichia coli* sont responsable d'infections urinaires, intestinales, génitales, hépatobiliaires, de septicémies et de méningites néonatales (Wladimir et David, 2003).

2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est connue sous le nom de Staphylocoque doré, c'est l'espèce la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire (Ferron, 1984).

2.2.1. Classification

La classification de l'espèce *Staphylococcus aureus* a été réalisée selon Delarras *et al.*, (2010).

Domaine : *Eubacteria*

Phylum XIII : Firmicutes

Classe : *Bacillaceae*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Espèces : *Staphylococcus aureus*

2.2.3. Habitat

L'espèce *Staphylococcus aureus* est présente dans l'environnement, c'est une espèce qui peut vivre à l'état commensal sur la peau et les muqueuses de l'Homme et de l'animal dès la naissance (Wertheim *et al.*, 2005).

2.2.3. Caractéristiques

Les principaux caractères d'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus* sont représentés dans le tableau 2.

Tableau 2: Principaux caractères de *Staphylococcus aureus* (Delarras *et al.*, 2010).

Morphologie	Cocci sphérique de 0,5 - 1 µm de diamètre, regroupé en en amas
Coloration de Gram	Bactérie à Gram +
Mobilité	Immobile
Type respiratoire	Aérobie facultatif en générale
Oxydase	+
Catalase	+
Coagulase	+
Température de croissance	Comprise entre 10-45°C

2.2.4. Pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus peut être responsable d'infection cutanée (impétigo, furoncles...), d'infection de la sphère ORL (sinusites, otite...), d'infection nosocomiale et de septicémie redoutable (Delarras *et al.*, 2010).

2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est connue depuis longtemps sous le nom de bacille pyocyanique ou agent du pus bleu des plaies surinfectées (Avril *et al.*, 2000).

2.3.1. Classification

La classification de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* a été réalisée selon **Delarras et al., (2010)**.

Domaine : *Eubacteria*

Phylum XII : *Protobacteria*

Classe : *Gammaprotobacteria*

Ordre : *Pseudomonadales*

Famille : *Pseudomonadaceae*

Genre : *Pseudomonas*

Espèce : *Pseudomonas aeruginosa*

2.3.2. Habitat

P. aeruginosa est une espèce bactérienne ubiquitaire, cette bactérie a des exigences nutritives peu importantes, elle est capable de survivre dans l'environnement (eaux, surface, air et aliment) et particulièrement en milieux humides (**CSHPF, 2000**).

2.3.3. Caractéristiques

Les principaux caractères d'identification sont représentés dans le tableau 3.

Tableau 3: Principaux caractères de *Pseudomonas aeruginosa* (**Delarras et al., 2010**).

Morphologie	Bacille fin droit de 0,5-0,8µm de largeur et 1,5-3µm de longueur
Coloration de Gram	Bactérie à Gram -
Mobilité	Mobile à ciliature polaire monotriche
Type respiratoire	Aérobic strict
Oxydase	+
Catalase	+
Température de croissance	entre 30-43°C

2.3.4. Pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa a toutes les caractéristiques d'un germe opportuniste, il est peu virulent pour les sujets en bonne santé mais très pathogène pour les sujets immunodéprimés. Il provoque de nombreuses infections tels que : les infections cutanées, oculaires, pulmonaires, urinaires, digestives ainsi que des septicémies (**Lamnaouer, 2002**).

3. Métallorésistance bactériennes

3.1. Notion de résistance et de tolérance

Dans la littérature scientifique courante, se rapportant à la croissance ou à la survie des microorganismes en présence de certaines concentrations de métaux lourds, on parle souvent soit de tolérance soit de résistance, il est très difficile de distinguer une différence entre les deux termes. Le Conseil de la Recherche National de Canada définit globalement la résistance et la tolérance comme la capacité d'un organisme à diminuer sa réponse face à un composé chimique relatif auquel il a été exposé précédemment (**Wright et Welbourn, 2002**).

3.2. Voie d'entrée des métaux lourds dans la cellule bactérienne

Les procaryotes utilisent deux types de systèmes servant d'entrée aux métaux lourds à l'intérieur des cellules. Le premier est un système passif constitutif de la cellule, de faible affinité et rapide, emprunté par une grande variété de substrats. Il est constitué principalement par les protéines de la famille MIT (Metal Inorganic Transport). Ce système n'étant pas spécifique d'un ion particulier (**Nies, 1999**). Le second système de transport est un système actif de haute affinité pour le substrat. Il est plus lent, inductible et utilise souvent l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Il est constitué principalement par le regroupe des ATPases de type P (**Odermatt et al., 1993**) et les ATPases de type A (**Nies, 1999 ; Gatti et al., 2000**).

3.3. Résistance bactérienne aux métaux lourds

La résistance bactérienne aux métaux lourds est apparue probablement tôt dans l'évolution, la pression sélective exercée par l'environnement a entraîné le développement des systèmes de résistance pour la plupart des métaux (**Senez, 1968**). Les différents systèmes de résistance utilisés par les bactéries sont comme suite :

- **Modification dans la paroi cellulaire** : la membrane ou l'enveloppe d'un microorganisme sont des barrières de la perméabilité membranaire. Ce mécanisme est une tentative effectuée par l'organisme pour protéger les composants cellulaires essentiels sensibles aux métaux (**Rouch et al., 1995**).

- **Séquestration** : C'est la première ligne de défense pour l'immobilisation rapide des métaux lourds afin d'éviter leurs effets toxiques dans la cellule. On a comme exemple la Méthallothioneine (MT), elle appartient à la famille des protéines intracellulaires, leur poids moléculaire est < 7000 Da. Elle est très riche en cystéine et possède la capacité de se lier à des

métaux en particulier ceux qui régulent l'homéostasie des métaux essentiels comme le cuivre et le zinc (**Latendre, 2009**). Potentiellement présente dans tous les organismes vivants, elle passionne beaucoup de chercheurs en raison de leur structure chimique très particulière (**Picard et al., 2010**). La fonction la plus importante de la MT est de réguler les concentrations intracellulaires de certains métaux tels que le cuivre et le zinc. Elle les séquestre afin d'éviter leur circulation à l'état libre et leur fixation sur d'autres protéines vitales (**Achard, 2005**). La liaison covalente des métaux avec les groupements thiols des MT est dynamique puisque les métaux prisonniers peuvent être libérés à tout moment. Les MT assurent un rôle de protection contre les éléments métalliques en limitant leur accessibilité à d'autres sites cellulaires participant de cette manière à la détoxification cellulaire (**Nezengue, 2008**).

- **Transformation en une forme moins toxique** : Certains métaux toxiques peuvent être transformés en une forme moins toxique comme dans le cas du mercure, le méthyl-mercure et le phényl-mercure qui sont scindés en libérant Hg^{+2} qui sera réduit en mercure métallique volatil.

- **Porter hors cellule** : c'est le système d'efflux qui permet de réduire l'accumulation intracellulaire de métaux lourds. Par exemple chez les procaryotes, il existe une pompe à cadmium codée par le gène YCF1 qui permet d'expulser les métaux or cellule (**Li et al., 1997**).

- **La réduction** : c'est un procédé utilisé par divers micro-organismes pour éliminer les métaux, il se fait par la réduction du métal jusqu'à un état d'oxydation moins toxique. Pour être réduit, le métal doit posséder un potentiel redox compris entre celui des couples hydrogène/proton (-421 mV) et oxygène/hydrogène (+808 mV), ceci représente l'échelle physiologique redox pour la plupart des cellules aérobies. Ainsi la réduction est nécessairement couplée à la séquestration de l'ion réduit (**Nies, 1999**).

- **Les plasmides et les transposons** : ce sont des éléments génétiques qui sont très spécifiques et présents chez toute les cellules procaryotes. La résistance aux métaux lourds peut correspondre à l'acquisition d'un système permettant à la bactérie de rejeter à l'extérieur l'élément indésirable. C'est justement ce qui se passe pour l'arséniate chez *E.coli* et *S.aureus*. L'arséniate fonctionne en générale comme analogue de phosphate et rentre dans la cellule à l'aide des transporteurs de phosphate. La résistance est augmentée par l'acquisition d'une ATPase codée par le plasmide. La sélection spontanée des formes hautement résistantes

à des concentrations élevées en métaux lourds est probablement assez commune dans la nature et au voisinage des régions minières et surtout dans les zones de déchets industrielles **(Chennouf et Siradj, 2008)**.

1. Métaux lourds

Afin d'étudier l'effet de la métallo-résistance des souches bactérienne, le choix des métaux été réalisé selon leur l'accessibilité. Les métaux choisit sont comme suite :

- ☒ Cobalt chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), $\text{PM}=129.83\text{g/mol}$.
- ☒ Cuivre sulfate pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), $\text{PM}= 159.6\text{g/mol}$.

2. Souches bactériennes

Afin de réaliser notre travail, nous avons utilisé deux types de souches :

- ☒ Souches isolées à partir de l'oued Messida, ces dernières ont été fourni par Mme Lamia Benhalima. Maitre assistant à Université de Guelma.
- ☒ Souches de référence ATCC, ces dernières sont utilisées comme témoin, car elles constituent d'excellents modèles pour la recherche de l'effet antibactérien des substances naturelles, synthétiques et minérales.

Les souches choisit sont comme suite :

- ☒ *Escherichia coli* K12 ATCC 10798
- ☒ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ☒ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ☒ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- ☒ *Escherichia coli*
- ☒ *Staphylococcus aureus*
- ☒ *Pseudomonas aeruginosa*

3. Milieux utilisés

Suivant la méthode employée et les souches étudiées, les milieux de culture utilisés sont les suivants : la gélose nutritive (GN), la gélose Chapman, la gélose Muller Hinton (MH), et le bouillon nutritif. La composition des milieux de culture est indiquée dans le tableau 5.

4. Préparation des solutions mères

Chaque métal est solubilisé dans de l'acide nitrique à 1% (**Abou-Shanab et al., 2007**) à raison de 50mg/ml.

Tableau 4 : Compositions des milieux de culture (Joffin et Leyral 2006).

Gélose Mueller Hilton	
Infusion de viande de boeuf (déshydratée)	300 g
Hydrolysate de caséine	017,5 g
Amidon	01,50 g
Eau distillée	1000 ml
Agar Agar	17.00 g
pH final.....	7,5
Bouillon nutritif	
Extrait de viande	1g
Extrait de levure.....	2.5 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH final.....	7
Gélosé nutritive	
Extrait de viande	1g
Extrait de levure.....	2.5g
Peptone	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar Agar	15g
Eau distillée	1000 ml
pH final.....	7
Gélose Chapman	
Peptone	10 g
Extrait de viande de bœuf	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol :.....	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH	7.4

5. Étude de la résistance bactérienne aux métaux lourds

L'étude de la résistance bactérienne aux métaux lourds a été réalisée sur milieu solide selon la méthode décrite par **Abou-Shanab *et al.*, (2007)**. C'est une méthode admise qui a été utilisée dans de nombreuses études rapportées par **Mergeay *et al.*, (1985)**; **Siddiqui *et al.*, (1989)**; **Taghavi *et al.*, (1997)** dont les étapes sont comme suite :

5.1. Repiquage des souches

Avant la préparation de l'inoculum, chaque souche bactérienne est repiquée sur boîte Pétri (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose nutritive, *Staphylococcus aureus* sur gélose Chapman).

5.2. Préparation des cultures jeunes

Afin de récupérer des souches bactériennes jeunes, nous avons réalisé une culture de 18h sur du bouillon nutritif.

5.3. Préparation de l'inoculum bactérien

A partir d'une culture jeune, une suspension bactérienne est réalisée pour chaque souche, la turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 Mc Farland, on obtient alors notre inoculum estimé à 10^6 unités formant colonie par millilitre (UFC/ml).

5.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour chaque métal, on prépare une série de concentrations stériles, allant de 12.5 à 3200 $\mu\text{g/ml}$ dans de la gélose Muller Hinton en surfusion. L'inoculation des boîtes se fait en ajoutant dans chaque boîte Pétri 10 μl de l'inoculum et 5 ml de la gélose MH en surfusion ($\sim 45^\circ\text{C}$). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures, après incubation on examine la croissance bactérienne dans chaque boîte. La CMI d'un composé chimique vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite concentration ne montrant aucune croissance.

Des témoins de croissance sont préparés également avec de la gélose MH sans métaux lourds.

6. Sélection des souches bactériennes tolérantes aux métaux lourds

La tolérance ou la capacité de résistance bactériennes a été réalisée selon **Patel *et al.*, (2006)**, après détermination de la CMI, la croissance a été suivie pendant une semaine (une lecture tous les 2 jours) ceci va permettre de déterminer le nombre de souches tolérantes.

1. Détermination du taux de croissance

1.1. *Escherichia coli*

Les résultats obtenus du taux de croissance des différentes souches de l'espèce *Escherichia coli* sont représentés dans la figure 3 pour *Escherichia coli* K12 ATCC 10798, la figure 4 pour *Escherichia coli* ATCC 25922 et la figure 5 pour *Escherichia coli*.

Les résultats obtenus ont indiqué que la croissance est de 100% pour les 3 souches en absence de métaux. Cependant en présence de métaux la croissance diminue progressivement.

Pour la souche témoin *Escherichia coli* K12 ATCC 10798, il apparaît que le cobalt et le cuivre ont le même effet sur cette souche, où une croissance importante (100%) à été retrouvée jusqu'à la concentration 50µg/ml, toutefois au-delà de 50µg/ml aucune croissance n'a pu être retrouvée.

Pour la souche *Escherichia coli* ATCC 25922, il apparaît que le cuivre a une toxicité élevée comparé au cobalt, une croissance importante a été retrouvée jusqu'à la concentration 200µg/ml pour le cobalt, cependant pour le cuivre au delà de 100µg/ml aucune croissance n'a pu être retrouvée.

Pour la souche *Escherichia coli*, il apparaît que le cuivre a une toxicité élevée par rapport au cobalt où une croissance importante à été retrouvée jusqu'à la concentration 200µg/ml pour le cobalt, cependant pour le cuivre au delà de 25µg/ml aucune croissance n'a pu être retrouvée.

Selon les résultats obtenus, nous pouvons prédire qu'il existe des différences entre l'action du cuivre et du cobalt pour chaque souche. Il semblerait qu'*Escherichia coli* est plus sensible à l'action du cuivre que les autres souches.

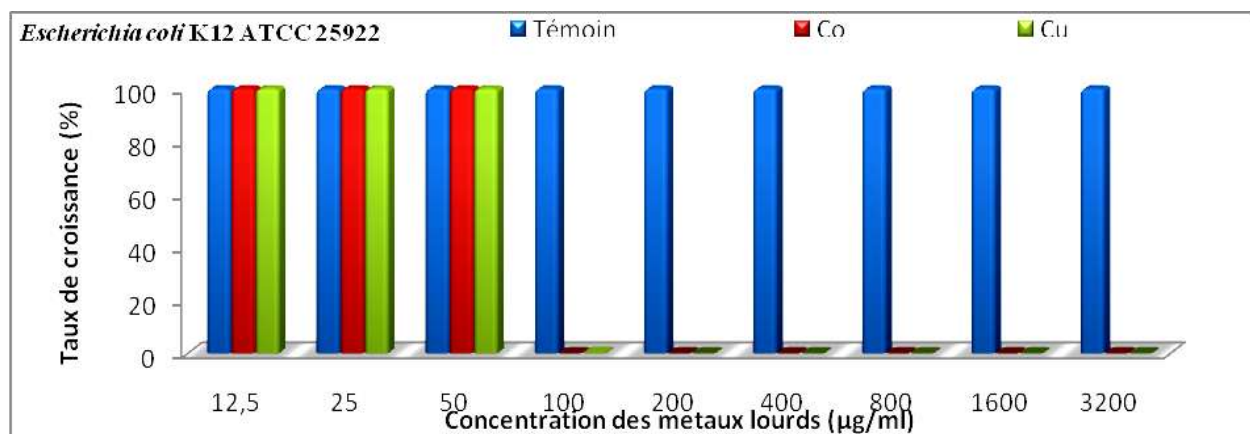


Figure 3 : Distribution du taux de croissance d'*Escherichia coli* K12 ATCC 10798 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

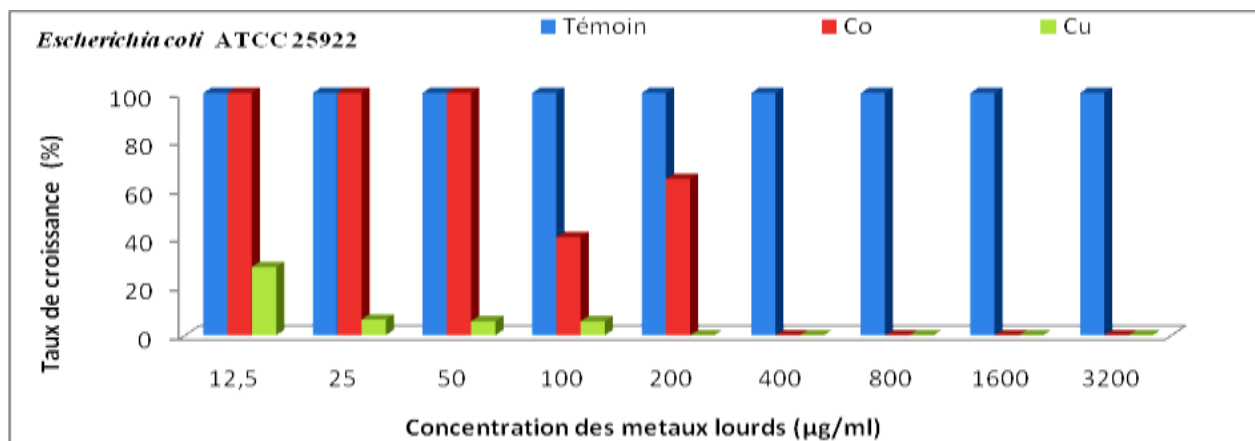


Figure 4: Distribution du taux de croissance d’*Escherichia coli* ATCC 25922 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

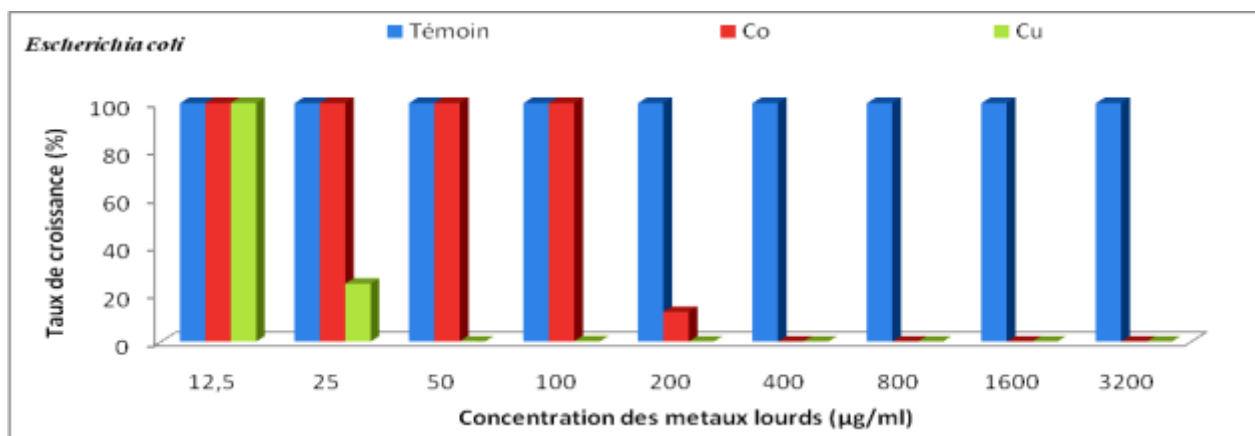


Figure 5 : Distribution du taux de croissance d’*Escherichia coli* vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

1.2. *Staphylococcus aureus*

Les résultats obtenus du taux de croissance des différentes souches sont représentés dans la figure 6 pour *Staphylococcus aureus* et la figure 7 pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Les résultats obtenus ont indiqué que la croissance est de 100% pour les 2 souches de l’espèce *Staphylococcus aureus* en absence de métaux, cependant en présence de métaux la croissance diminue progressivement jusqu’à 0%.

Pour la souche *Staphylococcus aureus*, il apparaît que le cuivre a une toxicité très élevée par rapport au cobalt, au delà de 25µg/ml aucune croissance n’a pu être retrouvée. Pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, il apparaît qu’elle tolère mieux le cobalt par rapport au cuivre.

Selon les résultats obtenus, nous pouvons affirmer que le cuivre est plus toxique que le cobalt d'une part, d'autre part il existe des différences entre l'action du cuivre et cobalt pour chaque souche, il semblerait que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est plus sensible à l'action du cuivre et du cobalt que *Staphylococcus aureus*.

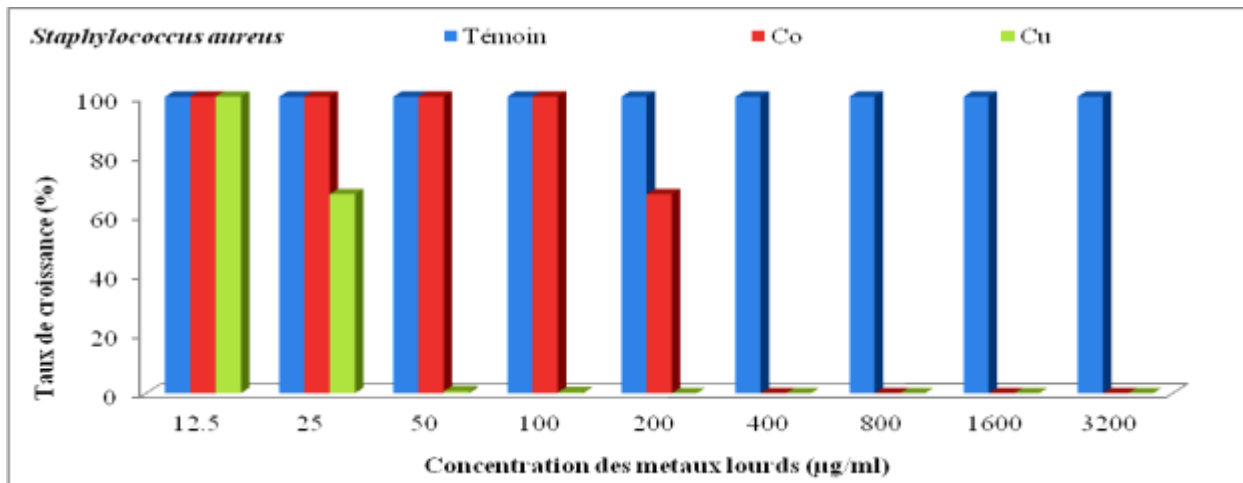


Figure 6 : Distribution du taux de croissance de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

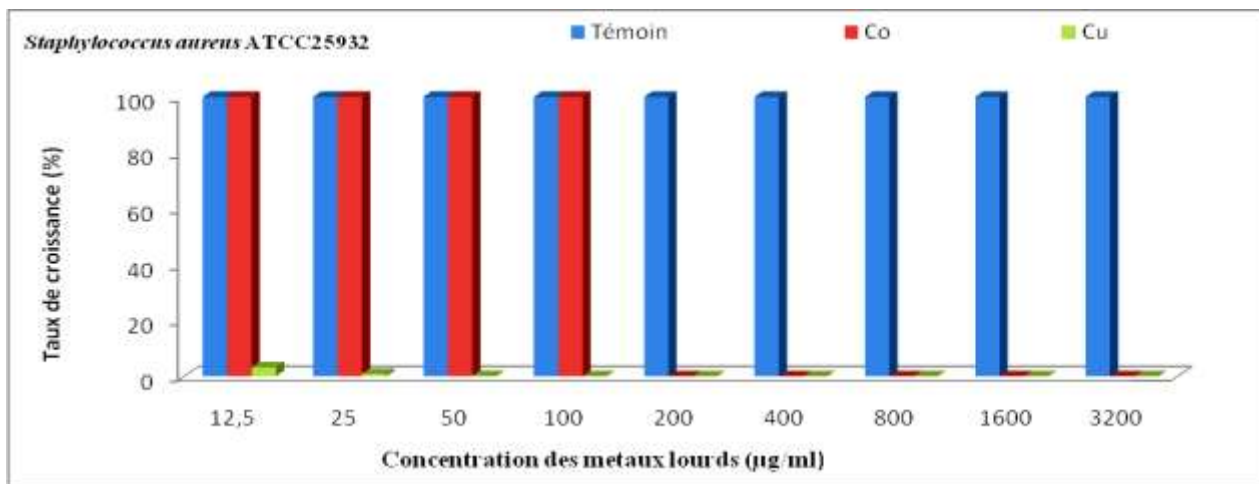


Figure 7 : Distribution du taux de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats obtenus du taux de croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et la souche *Pseudomonas aeruginosa* sont représentés dans la figure 8 et la figure 9 respectivement.

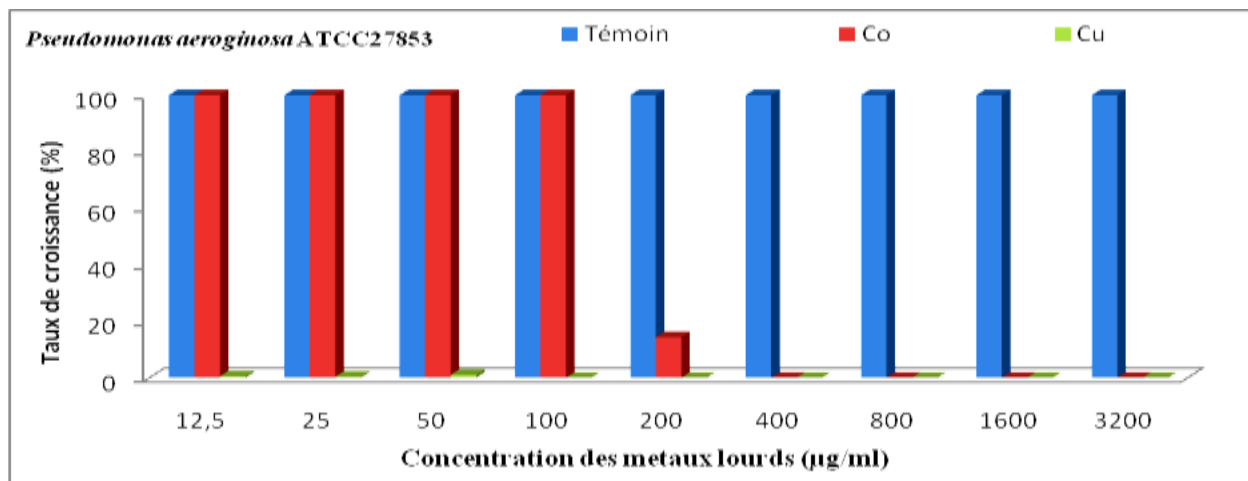


Figure 8 : Distribution du taux de croissance de *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

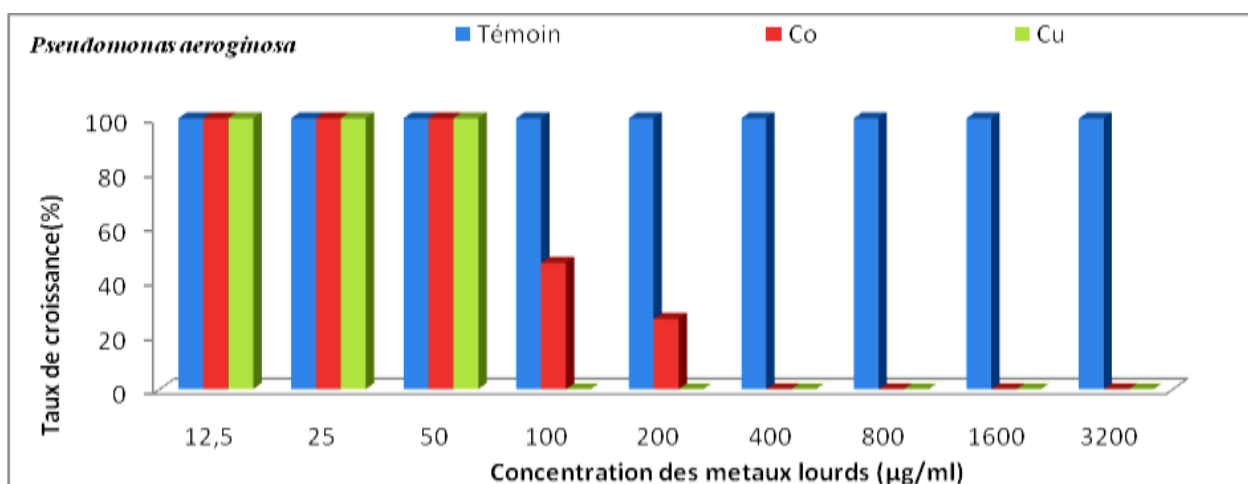


Figure 9 : Distribution du taux de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

Les résultats obtenus ont indiqué que la croissance est de 100% en absence de métaux pour les 2 souches. Cependant en présence de cuivre et de cobalt la croissance diminue progressivement jusqu'à 0%. Pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*, il apparait que le cuivre a une toxicité élevée par rapport au cobalt même à faible concentration.

Selon les résultats obtenus nous pouvons affirmer qu'il existe des différences entre l'action du cuivre et du cobalt pour chaque souche, il semblerait que *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* est plus sensible à l'action du cuivre que *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenue pour les métaux lourds vis-à-vis des souches bactériennes sont mentionnées dans les tableaux 6 ainsi que les photos présent dans le tableau 7 et 8 pour les 3 souches de l'espèce *Escherichia coli*, le tableau 9 et 10 pour les 2 souches de l'espèce *Staphylococcus aureus* et le tableau 11 et 12 pour les 2 souches de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices du cobalt et du cuivre sur les souches bactériennes.

Souches bactériennes	CMI (µg/ml)	
	Co	Cu
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798	50<CMI<100	100<CMI<200
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	200<CMI<400	100<CMI<200
<i>Escherichia coli</i>	200<CMI<400	100<CMI<200
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	200<CMI<400	50<CMI<100
<i>Staphylococcus aureus</i>	200<CMI<400	100<CMI<200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	200<CMI<400	50<CMI<100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200<CMI<400	50<CMI<100

Selon les résultats obtenus, la CMI de la souche de référence *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 était 100µg/ml et 200µg/ml pour le cobalt et le cuivre respectivement.

Cependant pour les souches : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* la CMI été identique avec une valeur de 400 µg/ml pour le cobalt et 200 µg/ml pour le cuivre.

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas aeruginosa* ont présenté une CMI identique avec une valeur 400 µg/ml pour le cobalt et 100µg/ml pour le cuivre.

L'utilisation de la souche témoin *E.coli* K12 ATCC 10798 a permis de distinguer entre les souches résistantes et sensibles (**Sabri *et al.*, 2006**). La CMI de la souche témoin a été inférieure à celle des autres souches pour le cobalt. Néanmoins pour le cuivre la CMI de la souche témoin est inférieure ou égale à celle des autres souches.

En se basant sur les travaux de fin d'étude de master II réalisés par Mme benhalima lamia dans les années précédentes sur la résistance bactériennes aux antibiotiques des bactéries isolées à partir de l'oued Messida, nous pouvons penser que ces souches sont aussi résistantes aux métaux lourds comparés à la souche témoin *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

Tableau 6: Concentrations minimales inhibitrices d'*Escherichia coli* vis-à-vis du Cobalt.







Cobalt		
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798	50µg/ml	100µg/ml
		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	200µg/ml	400µg/ml
		
<i>Escherichia coli</i>	200µg/ml	400µg/ml
		

Tableau 7 : Concentrations minimales inhibitrices d'*Escherichia coli* vis-à-vis du cuivre.


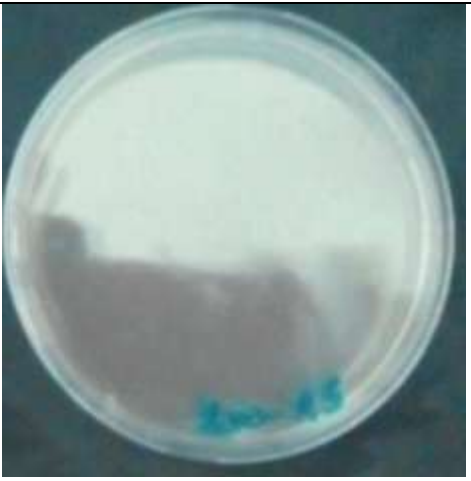




Cuivre		
	100µg/ml	200µg/ml
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
<i>Escherichia coli</i>		

Tableau 8 : Concentrations minimales inhibitrices de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis du cobalt.





	Cobalt	
	200µg/ml	400µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		
<i>Staphylococcus aureus</i>		

Tableau 9 : Concentrations minimales inhibitrices de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis du cuivre.

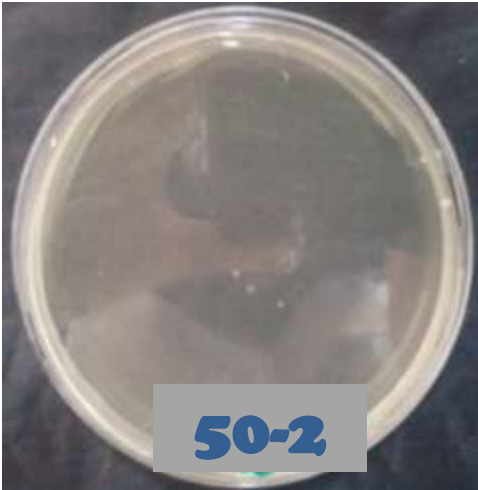



	Cuivre	
	50µg/ml	100µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		
<i>Staphylococcus aureus</i>	100µg/ml	200µg/ml
		

Tableau 10 : Concentrations minimales inhibitrices de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis du cobalt.

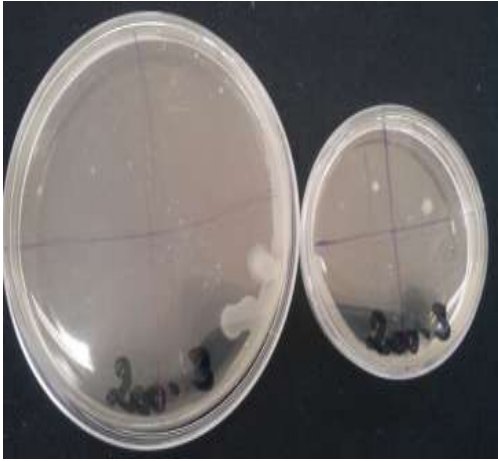







Cobalt		
	200µg/ml	400µg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices de *Pseudomonas aeruginosa* avis à vis du cuivre.

Cuivre		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	50µg/ml	100µg/ml
		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50µg/ml	100µg/ml
		

3. Adaptation et tolérance bactériennes

Les résultats obtenus après une série d'incubation (tous les 2 jours durant une semaine) sont représentés dans le tableau 13 pour le cobalt et le tableau 14 pour le cuivre.

Selon les résultats obtenus, on remarque que le nombre de colonies bactériennes ne cesse d'augmenter pour la totalité des souches utilisées. Pour certaines concentrations de cobalt et de cuivre au delà de 24h d'incubation, des colonies bactériennes apparaissent. Ces dernières peuvent être qualifiées de mutants ou de bactéries tolérantes. C'est un mode d'adaptation des cellules bactériennes pour éviter le stress métalliques, cela a été déjà observer par divers travaux de **Patel et al., (2006)** ; **Oves et al., (2012)** ; **Chien et al., (2013)**.

Tableau 12: Capacité de tolérance bactérienne aux différentes concentrations du cobalt

(* : indique l'intensité du tapis bactérien).

Cobalt	12.5 µg/ml			25µg/ml			50µg/ml			100µg/ml			200µg/ml			< 400µg/ml		
	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h
<i>E.coli K12 ATCC 10798</i>	**	**	**	*	**	**	*	*	*	0	0	0	0	4	20	0	0	0
<i>E.coli ATCC 25922</i>	700	***	**	640	*	**	420	***	***	594	*	**	554	652	*	0	0	0
<i>E.coli</i>	1480	***	***	900	**	***	1160	**	***	668	*	***	77	142	150	0	0	0
<i>S. aureus ATCC 25923</i>	1480	***	**	1200	***	***	1000	*	***	385	*	**	118	*	**	0	0	0
<i>S. aureus</i>	1950	***	***	550	**	***	1348	**	**	1220	***	***	516	*	**	0	0	0
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	***	***	**	750	*	**	790	***	***	600	**	**	86	**	***	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	980	***	***	840	**	***	760	*	***	280	*	***	156	*	*	0	0	0

Tableau 13: Capacité de tolérance bactérienne aux différentes concentrations du cuivre

(* : indique l'intensité du tapis bactérien).

Cuivre	12.5µg/ml			25µg/ml			50µg/ml			100µg/ml			200µg/ml			< 400µg/ml		
	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h
<i>E. coli K12 ATCC 10798</i>	***	161	179	**	268	324	**	**	198	1	20	30	0	0	0	0	0	0
<i>E.coli ATCC 25922</i>	180	97	**	35	35	27	28	53	67	20	15	18	0	0	20	0	0	0
<i>E.coli</i>	***	**	**	180	**	***	1	*	15	2	4	3	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus ATCC 25923</i>	8	33	74	3	3	4	1	1	40	0	0	1	0	0	2	0	0	0
<i>S. aureus</i>	**	*	**	500	*	268	1	12	*	1	1	10	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	2	10	75	1	11	30	5	5	15	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	***	***	***	***	**	**	**	**	**	0	0	10	0	0	0	0	0	0

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons essayé de comprendre comment les bactéries réagissent à un environnement pollué par le cuivre et le cobalt en étudiant certaines de leurs réponses vis-à-vis de la toxicité métallique. D'après les résultats obtenues on peut conclure que :

- Le cuivre a une toxicité plus élevée que celle du cobalt.
- L'action du métal varié d'une souche à l'autre, il semblerait que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas aeruginosa*, sont sensibles à l'action du cuivre par rapport à la souche témoin d'*Escherichia coli* K12 ATCC 10798. Cependant pour le cobalt toutes les souches ont présenté une résistance par rapport à la souche témoin.
- Les souches isolées à partir de l'oued Messida semble être plus résistantes, ces bactéries tolèrent mieux le cuivre comparé à la souche témoin. Néanmoins pour le cobalt, toutes les souches bactériennes ont présenté la même CMI (comprise entre 200-400µg/ml) tout ce qui ne veut pas dire qu'elles sont égales.
- Certaines souches bactériennes ont toléré des concentrations élevées en métaux afin d'assurer leur survie.

En perspective, il serait important de :

- Doser la Méthionine pour mieux comprendre l'effet des métaux sur les bactéries.
- Tester l'effet d'autres métaux lourds.
- Récupérer les souches tolérantes.

Références bibliographiques

Abou Shanab R.A.I., van Berkum P. et Angle. J.S. (2007). Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in Gram positive and Gram negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*. 68 : 360–367.

Achard. J. (2005). Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant. Thèse de doctorat. Université Bordeaux I. 254p.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1990). Toxicological profiles for copper. Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, GA: US department of Health and Human Services, Public Health Services.

Avril. J.L., François .D., Henry. M. et Henry .D. (2000). Bactériologie clinique. Edition I. 585p.

Baize. D. (1997). Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions. Paris. 408p.

Baker. A. J. M . et Walker . P . L . (1989). Ecophysiology of metaluptake by tolerant plants. In : Heavy metal tolerance in plants - Evolutionary aspects. Shaw, A. (Eds). CRC.

Benbelkacem. N. (2012). Synthèse et caractérisation de complexes mixtes de cobalt (III) avec l'éthylènediamine, une série d'acides aminés et des bases azotées. Mémoire de magister. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. 54p.

Bendjama .A. (2007). Niveaux de contamination par les métaux lourds du complexe lacustre «Tonga, Oubeira, El-mellah » du parc national d'El-kala. Mémoire de magister .Université Badji Mokhtar – Annaba. 192p.

Benfettoume .A. et Khalla .N. (2014). Impact toxicologique des métaux lourds sur le système antioxydant enzymatique chez les mollusques (bivalve). Mémoire de master II .Université 08 mai 1945 Guelma. 54p.

Biney .C.A. et Beeko.C.A. (1991). Trace metal concentrations in fish and sediment from the Wiwi, a small urban river in Kumasi, Ghana. *Trop.Ecol.* 32(2):197–206.

Bourrelier. P.H., et Berthelin. J. (1998). Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. CR. AccSci, 42. Edition Lavoisier. Paris. 145p.

Bruins .M.R., Kapil .S. et Oehme .F.W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol and Environ Safety. 45:198-207.

Burnol .A. , Duro.L. et Grive.M. (2006).Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines .48p

Chennouf. F. et Siradj. F. (2008).Isolement des bactéries métallo-résistant partir de Chott Ain El-Baidha et lac Temaçine . Memoire de fin d'étude. Université de Kasdi-Merbah Ouargla .57p.

ChienC.C., Lin.B.C. et Wu.C.H. (2013). Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas sp* .Biochemical Engineering Journal. 78:132-137.

Chiffoleau .J.F. (2004) .La contamination métallique. Ifremer .39p.

Chiffoleau. J. F. D., Auger .E., Chartier. P., Michel. I., Truquet . A., FICHT. J. L. et Romana .L. A. (2001). Spatiotemporel changes in Cadmium contamination in the Seine estuary (France).Estuaries. 24(6B) :1029-1040.

Clave .D. (2012). « Fiche technique Bactériologie 123 ». Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU de Toulouse - Institut Fédératif de Biologie.2p.

Croteau .M.N., Luoma .S.N. et Stewart .A.R. (2005). Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. Limnol. Oceanogr. 50:1511–1519.

CSHPF. (2000). Recommandations relatives à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux. Bulletin officiel. 27p.

Dameron. C. et Howe. P. D. (1998). Copper Environmental Health criteria n°200.Genève. World Health Organization.

Deforest .D.K., Brix .K.V., et Adams .W.J. (2007). Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. Aquatic Toxicology. 84 : 236–246.

Delarras.C., Trébaol.B. et Durand.J. (2010).Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : Réglementation-Micro-organismes-Prélèvements-Analyse.2^{ème} édition. Tec et Doc. Lavoisier. p542.

- El haite H. (1991).** Eléments de réponse pour une meilleure maîtrise des pollutions et gestion des eaux usées à Fés. Thèse de Doctorat. Université Moulay Ismaïl, Meknés. Maroc 158p.
- Ferron. A. (1985).** Bactériologie Médicale : à l'usage des étudiants en médecine. 12^{ème} édition. Paris.374p.
- Frank. R.K., Ishida. A. et Suda. P. (1976).** Metals in agriculturalsoils of Ontario. Revue canadienne de la science du sol.56 : 181-196.
- Giller .K.E., Witter .E. et McGrath .S.P.(1998).** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. Soil Biol. Biochem. 30:1389–1414.
- Harrat. N. et Achour .S. (2010).** Pollution physicochimique des eaux de barrage de la région d'El Tarf. Impact sur la chloration. Larhyss journal. 8 : 47-54.
- Huynh.T.(2009).**Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante / ver de terre/ microflore tellurique. Thèse de doctorat. Université Paris Est. 260p.
- Joffin .J.N. et Leyral. G. (2006).** Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. 1^{ère} Edition. Bordeaux. p248.
- Kabata Pendias. A. et Pendias.H. (2001).** Trace elements in soils and plants. CRC Press, London. 145p.
- Kozdrój .J. et van Elsas .J.D. (2001).** Structural diversity of microorganims in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. Journal of Microbiological Methods.43:197-212.
- Lamnaouer.D. (2002).** Fiche technique Détermination des propriétés biologiques (activités pharmacologiques et toxicologiques) des plantes médicinales et aromatiques du PNT. Programme de l'UICN en Afrique du Nord. 23p.
- Letendre. J., Chouquet. B., Manduzio. H., Marin. M., Bultelle. F., Leboulenger. F. et Durand.F. (2009).** Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defences in *Mytilus edulis*. Marine Environmental Research. 67 : 69-74.
- Li.Z. S., Lu. Y. P., Zhen.R. G., Szczypka. M., Thiele. D. J. et Rea. P.A.(1997).** A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1- catalyzed transport of bis (glutathionato) cadmium. Proc Nat Acad Sci U S A. 94(1): 42-7.

- Loué. A. (1993).** Oligo-éléments en agriculture. 2^{ème} édition. Editions Nathan. Paris. 577 p.
- Mahler. C.E., Vincent.C.A. et Parmer.D.G.(1986).** Learning from errors in nursing practice. Journal of advanced Nursing 26:111-119.
- Morozzi .G., Cienci .G. et Caldini .G. (1982).** The tolerance of an Environmental Strain of *Escherichia coli* to Some Heavy Metals. Hyg. I. Abt. Orig. 176:189: 55-62.
- Nelson. N. (1999).** Metal ion transporters and homeostasis. Embo J. 18(16): 4361-71.
- Nies. (1999).** Microbiologie heavy métal résistance. Appl microbial boite chnol .51 : 730-750.
- Nweke .C.O., Alisi .C.S., Okolo .J.C. et Nwanyanwu .C.E. (2007).** Toxicity of Zinc to Heterotrophic Bacteria from a Tropical River Sediment. Appl. Environ. Res. 5:23-132.
- Nzengue.Y. (2008).** Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines. Thèse de doctorat. : Université Joseph Fourier.Grenoble. 297p.
- Odermatt.A., Suter.H.K., Rapf.R. et Solioz.M. (1993).** Primary structure of twop – type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus*. J. Biol. chem. 268:12775-12779.
- OMS-IPCS. (1998).** Environmental Health Criteria n°200: copper, World Health Organisation International Programme on chemical safety.
- Oves .M., Saghirkhan.M. et Zaidi.A.(2013).** Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. Saudi journal of Biological Sciences.20:121-129.
- Patel. J. S., Patel. P. C. et Kalia .K. (2006).** Isolation and Characterization of Nickel Uptake by Nickel Resistant Bacterial Isolate (NiRBI).Biomedical and Environmental Sciences. 19: 297-301.
- Picard .R., Temblay .B., et Myrand .B. (2010).** Revue de littérature et fiches descriptives des différents indicateurs de stress et de vitalité utilisés pour caractériser les mollusques bivalves. Les Publications de la Direction de l'innovation et des technologies. Rapport de R-D n° 188. 26p.
- Rathnayake .V.N., Megharaj .M., Bolan .N. et Naidu .R. (2009).** Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. W. Acad. Sc., Engin. Techn. 53:1185-1189.
- Robert. M. et Juste .C. (1999).** Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris: Club CRIN.145p.

Rouane .O .(2013). Bio surveillance de la qualité des eaux côtières du littoral occidental Algérien par le suivi des indices biologiques de la biodisponibilité et la bioaccumulation des métaux lourds (Zn, Cu ; P b et Cd) chez la moule *Mytilusgallo provincialis* et l'oursin *Paracentrotus lividus*. Thèse de doctorat. Université d'Oran. 249p.

Rouch D. A., Lee. B. T. D. et Morby. A. P. (1995). Understanding cellular Responses to Toxic Agents:A Model for Mechanism Choice in Bacterial Metal Resistance. *J. Ind. Microbiol.*14:32-141.

Sabri .M., Léveille .S. et Dozois.C.M. (2006). A site ABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide . *Revue Microbiology.* 12: 50-68

Satchanska .G., Pentcheva .E.N., Atanasova .R., Groudeva .V., Trifonova .R., et Golovinsky .E. (2005). Microbial Diversity in Heavy-Metal Polluted Waters. *Biotechnol & Biotechnol.*19:61-67

Savolainen .H. (1996). Biochemical and clinical aspects of nickel toxicity. *Rev. Environ. Health.* 11:167-173.

Scriban. R. (1993). Biotechnologie. Technique et Documentation, Lavoisier, 4^{ème} édition, Paris. 904p.

Senez .J. (1968). Microbiologie générale. Edition : Doin. Paris. 592p.

Silver .S. (1996). Bacterial Resistances to Toxic Metal Ions – a review. *Gene.*179:9-19.

Wertheim .H.F., Melles .D.C., Vos .M.C., Van Leeuwen .W., Van Belkum .A. et Verbrugh .A. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet. Infect Dis.*5:751-62.

Williams .R.J.P. et Frausto Da Silva .J.J.R. (2006). The Chemistry of Evolution. The Development of Our Ecosystem. Elsevier. Amsterdam. 481p.

Wladimir.S. et David.T.(2003). Résistances aux β -lactamines. Service de Bactériologie-Hygiène du CHU Pitié-Salpêtrière. Université ParisVI .78. 31p.

Wright.D.A. et Welbourn.P. (2002). Environmental Toxicology. Cambridge environmental chemistry. Series 11. Cambridge University Press. Cambridge. 480p.

Zhao .F.J., Lombi .E., Breedon .T. et McGrath .S.P. (2000). Zinc hyper accumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environ.* 23: 507-514.

Les sites web

[01] [http:// www.cpiecotentin.com/littoral/pollution/pollution.htm](http://www.cpiecotentin.com/littoral/pollution/pollution.htm)). Consulter le (03/05/2015).

[02]http://www.citesciences.fr/francais/ala_cite/eau_pour_tous/maladies_hydriques.php?rub=maitrise_eau&ss_rub=20. Consulter le: (28/02/2015).

Résumé

Dans le cadre d'une étude comparative entre l'effet du cuivre et du cobalt sur deux types de souches bactériennes (souches de références et souches prélevées à partir de l'oued Messida). Nous pouvons considérer que :

Les souches prélevées à partir de l'oued Messida sont plus sensibles aux concentrations excessives du cuivre par rapport au cobalt, cette sensibilité se manifeste par la diminution du nombre des colonies sur milieu de culture.

Aussi, les souches prélevées à partir de l'oued Messida ont présenté une légère résistance aux métaux lourds comparés à la souche témoin *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

Mots clés : Pollution métalliques - tolérance bactérienne –cuivre – cobalt - oued Messida.

Summary

Through a comparative study of the effect of copper and cobalt on two types of bacterial strains (collected reference strains and strains from the wadi Messida). We can estimate that:

The strains collected from Wadi Messida are more sensitive to excessive levels of copper intake cobalt; this sensitivity is reflected in the decrease in number of colonies on culture media.

Also, strains collected from Wadi Messida showed a slight resistance to metals compared with *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 witness.

Keywords : Metal Pollution - bacterial tolerance -Copper - cobalt - Messida wadi

المخلص

من خلال دراسة مقارنة لتأثير النحاس و الكوبالت على نوعين من السلالات البكتيرية (السلالات المرجعية التي تم

جمعها والسلالات من واد المسيدة). يمكننا تقدير ما يلي:

السلالات التي تم جمعها من واد المسيدة هي أكثر حساسية لتركيزات عالية من النحاس والكوبالت، و تتجلى هذه الحساسية في انخفاض عدد المستعمرات في الوسط الزراعي البكتيري.

كما أظهرت السلالات التي تم جمعها من وادي المسيدة مقاومة للمعادن مقارنة مع السلالة المرجعية *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

الكلمات المفتاحية : التلوث بالمعادن - التسامح البكتيري- النحاس - الكوبالت - وادي المسيدة

Sommaire

Titre des matières	pages
Remerciements	
Dédicace	
Glossaire	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	
Chapitre I : Synthèse bibliographiques	
1. Pollution métallique	1
1.1. Définition de la pollution	1
1.2. Classification de la pollution.....	1
1.2.1. La pollution physique.....	1
1.2.2. La pollution microbiologique.....	1
1.2.3. La pollution chimique.....	1
1.3. Sources de la pollution	2
1.4. Métaux lourds	2
1.5. Classification des métaux lourds.....	2
1.5.1. Métaux essentiels	2
1.5.2. Métaux non essentiels.....	3
1.6. Origine des métaux lourds	3
1.6.1. Origine naturelle	4
1.6.2. Origine anthropique	4
1.7. Propriétés des métaux lourds	4
1.7.1. Cuivre	4
1.7.2. Cobalt	5
1.8. Effets toxiques des métaux lourds	5
1.8.1. Effets toxiques sur la santé humaine	5
1.8.2. Effets toxiques sur les organismes aquatiques	6
2. Microorganismes	6
2.1. <i>Escherichia coli</i>	6

2.1.1. Classification.....	6
2.1.2. Habitat	6
2.1.3. Caractéristiques.....	7
2.1.4. Pouvoir pathogène	7
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2.1. Classification	7
2.2.2. Habitat	8
2.2.3. Caractéristiques	8
2.2.4. Pouvoir pathogène	8
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.3.1. Classification	9
2.3.2. Habitas	9
2.3.3. Caractéristiques.....	9
2.3.4. Pouvoir pathogène	9
3. Métallorésistance bactériennes	10
3.1. Notion de résistance et de tolérance	10
3.2. Voie d'entrée des métaux lourds dans la cellule bactérienne	10
3.3. Résistance bactérienne aux métaux lourds	10

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Métaux lourds	13
2. Souches bactériennes	13
3. Milieux utilisés	13
4. Préparation des solutions mères.....	13
5.Étude de la résistance bactérienne aux métaux lourds	15
5.1.Repiquage des souches.....	15
5.2.Préparation des cultures jeunes.....	15
5.3. Préparation de l'inoculum bactérien.....	15
5.4. Détermination de la concentration minimal inhibitrice (CMI).....	15
6. Sélection de souches bactériennes tolérantes aux métaux lourds.....	15

Chapitre III : Résultats et discussions

1.Détermination du taux de croissance	16
1.1. <i>Escherichia coli</i>	16
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	17

1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice	20
3. Adaptation et tolérance bactériennes	28

Conclusion

Références bibliographiques

Résumés

Remerciements

Nous tenons tout particulièrement à remercier vivement Mme Meriem Imen Boussadia (M.A.A à l'Université de Guelma) d'avoir accepté d'examiner et de présider le jury.

Nous exprimons nos sincères remerciements à Madame Lamia Benhalima (M.A.A à l'Université de Guelma) d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Nous remercions d'une façon toute particulière notre encadreur Mme Sandra Amri (M.A.A à l'Université de Guelma) de nous avoir accordé l'honneur de diriger ce travail.

Nos remerciements s'adressent aussi à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A

Tout d'abord je remercie ALLAH

Mon père Salah et ma mère Meriem qui ont tant voulu me voir à ce niveau, et que j'adore et je ne peux jamais leur rendre le bien et l'amour qu'ils m'ont offert, je vous aime.

A

Mes frères Fathi et bolbol (Bellal), Khalil, Ameer et chérif.

Sans oublier mes sœurs : Nadjat, Amel, Chafika 16, Assia, Nadia et leurs enfants : Boumedién, Khalid, Amine, Aya,

Sahboba 36, et Nardjessa, Lolo16, Hasna, badi.

A

tout mes amies : binome Randa, Rrasika, Nadjwa

Noor taref, Soumia, Yamina, Toma, Zozo, Nacira, Rabiaa,

Randa, Sihem, Rahma, Barisa, Chouchana, Youssra, Zinab, Houda, Sans oublier toutes mes collègues.

A la famille: Berredjem et Safsafa.

Et Pour tous ceux qui me connais de près ou de loin.

[Http://maomao520.yeah.net](http://maomao520.yeah.net)

SARA

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A

ALLAH le tout puissant à qui je dois tout.

*Mon cher père **Saïd** ;*

À celui qui m'a éclaircit le chemin de la vie et ne cesse de m'encourager.

*A Ma très chère mère **Fella**,*

Que dieu la protège ; a celle qui m'a été le soutien moral pendant ce travail.

Merci beaucoup Papa et Maman je vous aime beaucoup

*À mon frère **Tayeb** ;*

*À mes sœurs **Zineb, Asma** et leurs enfants **Malek** et **Anes**;*

*À Mon fiancé **Nasser** ;*

Je leur exprime toute mon affection pour leur patience et leur encouragement qui a eu à mon égard au cours de la finalisation de ce travail ;

A ma belle famille ;

Sans oublier toutes mes amies et mes collègues.

Randa

Glossaire

Alliage : c'est la combinaison d'un élément métallique avec un ou plusieurs autres éléments chimiques.

Anomalie : désigne tout phénomène qui s'éloigne de ce qui est considéré comme normal.

Anthropique: relatif à l'activité humaine. Qualifie tout élément provoqué directement ou indirectement par l'action de l'Homme.

Biocénose : ensemble d'être vivants qui occupent un lieu de vie bien défini que l'on appelle le biotope.

Biomarqueurs : un bio marqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire et physiologique, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à une substance chimique à caractère polluant.

Commensalisme : interaction durable entre des individus d'espèces différentes où l'un des partenaires retire un bénéfice de l'association tandis que l'autre n'y trouve ni avantage ni véritable inconvénient.

Diamagnétiques : qualifie un matériau très faiblement influencé par un champ magnétique.

Élément trace : substances chimiques existant en quantités infimes dans l'eau.

Flore : ensemble des bactéries non pathogènes présentes dans le corps nécessaires à la production de certaines vitamines, à la digestion et à la stimulation du système immunitaire.

Fond géochimique : composition chimique d'un sol et des roches du sous-sol.

Furoncles : infection profonde de la base d'un poil et du follicule pilo-sébacé.

Hémochromatose : maladie héréditaire caractérisée par l'absorption de trop grandes quantités de fer.

Homéostasie: est la capacité que peut avoir un système quelconque à conserver son équilibre de fonctionnement en dépit des contraintes qui lui sont extérieures. Selon Walter Bradford Cannon : « l'homéostasie est l'équilibre dynamique qui nous maintient en vie »

Immunodéprimés : lorsque le système de défense naturel est affaibli, l'organisme est alors moins résistant aux agents infectieux.

Impétigo : infection de la peau d'origine bactérienne due à *Staphylocoque aureus* et aux Streptocoques bêta hémolytique du groupe A).

Infection nosocomiale : maladie infectieuse survenue après l'entrée à l'hôpital.

Stress oxydant : un état de déséquilibre de l'organisme entre la production d'éléments oxydants et de mécanismes de défense anti oxydantes.

Système actif: désigne le passage d'un ion ou d'une molécule à travers une membrane contre son gradient de concentration.

Maladie de Menkes : maladie qui provoque des cheveux décolorés similaires à la laine des moutons.

Maladie de Parkinson : maladie neurologique affectant le système nerveux central. Elle est responsable d'anomalies motrices à évolution progressive se manifestant par des mouvements et tremblements involontaires.

Maladies de Wilson : maladie génétique caractérisée par l'accumulation du cuivre dans l'organisme essentiellement dans le foie et le cerveau.

Malléabilité : Propriété attribuée aux métaux qui s'aplatissent en feuilles soit sous l'action du marteau soit par le passage au laminoir.

Métallurgie : désigne l'industrie de la fabrication des métaux et des alliages.

Otite : inflammation de la peau ou des muqueuses de l'oreille.

Plasmide : Élément génétique extra-chromosomique, capable de se répliquer de manière autonome, et portant des gènes conférant un avantage sélectif.

Potentiel redox : ou potentiel d'oxydo-réduction, est une mesure qui indique le degré auquel une substance peut oxyder ou réduire une autre substance.

Radicaux libres : molécules chimiques instables produites en faible quantité par l'organisme, cette instabilité chimique fait que ces substances sont très réactives.

Radioisotope : atome dont le noyau est instable et rayonneur, cette instabilité peut être due à un excès de protons, de neutrons voire des deux.

Septicémie : infection grave de l'organisme se caractérisant par le développement et la multiplication des microorganismes dans la circulation sanguine.

Sinusite : inflammation des muqueuses qui recouvrent l'intérieur des sinus, ces cavités remplies d'air et situées dans les os du crâne communiquent avec le nez.

Taux de croissance : temps mis par une bactérie à se diviser (temps de génération).

Thalassémie : ou encore appelées ou maladie de Cooley, c'est une forme d'anémie héréditaire associée à une hémoglobinopathie.

Tolérance : comportement anormal d'une bactérie en présence d'une molécule habituellement bactéricide.

Transposon : élément d'ADN qui peut se déplacer d'un endroit à un autre.

UFC : unité utilisée pour dénombrer les bactéries viables.

Liste des figures

Figures	Pages
Figure 1. Classification périodique des éléments	3
Figure 2: Origine des métaux lourds.....	4
Figure 3 : Distribution du taux de croissance d' <i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	16
Figure 4: Distribution du taux de croissance d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	17
Figure 5 : Distribution du taux de croissance d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	17
Figure 6 : Distribution du taux de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	18
Figure 7 : Distribution du taux de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	18
Figure 8 : Distribution du taux de croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	19
Figure 9 : Distribution du taux de croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis du cobalt et du cuivre.....	19

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection.

ATP : Adénosine TriPhosphate.

C° : Degré Celsius.

Cd : Cadmium.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

Co : Cobalt.

Cu : Cuivre.

Cys : cystéine.

Da : Dalton.

ETM : éléments traces métalliques.

g : gramme.

g/cm³ : gramme par centimètre cube.

g/mol : gramme par mol.

GN : gélose nutritif.

h : heure.

Hg : Mercure.

IPCS : Organisation International Programme on Chemical Safety.

MH : Muller Hinton.

mg/ml : milligramme par millilitre.

ml : millilitre.

mV : millivolt.

µm : micromètre.

µg/ml :microgramme par millilitre .

MT : Méthallothioneine.

Ni : Nickel.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie.

PM :Poids moléculaire.

% : Pour cent.

Pb : Plomb.

pH :potentiel hydrogène ..

UFC/ ml : unité formant colonie par millilitre.

Z : nombre de proton =Np.

Liste des tableaux

Tableaux	Pages
Tableau 1 : Principaux caractères d' <i>Escherichia coli</i>	7
Tableau 2: Principaux caractères de <i>Staphylococcus aureus</i>	8
Tableau 3: Principaux caractères de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Tableau 4 : Compositions des milieux de culture.....	14
Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices du cobalt et du cuivre sur les souches bactériennes.....	20
Tableau 6: Concentrations minimales inhibitrices d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis du cobalt.....	22
Tableau 7 : Concentrations minimales inhibitrices d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis du cuivre.....	23
Tableau 8 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis du cobalt. ...	24
Tableau 9 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis du cuivre.....	25
Tableau 10 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis du cobalt.....	26
Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis du cuivre.....	27
Tableau 12: Capacité de tolérance bactérienne aux différentes concentrations du cobalt.....	28
Tableau 13: Capacité de tolérance bactérienne aux différentes concentrations du cuivre.....	28

L'impact de la pollution sur les écosystèmes et la santé humaine est une question mondiale d'urgence, parmi les polluants toxiques d'origine naturelle ou anthropique les métaux lourds posent un sérieux problème environnemental (**Benfettoume et Khalla, 2014**).

Les métaux lourds sont des composés stables hautement persistants et essentiels à la vie, ils peuvent participer à de nombreuses réactions métaboliques chez les organismes procaryotes ou eucaryotes (**Williams et Frausto da Silva, 2006**), aussi ils peuvent être accumulés et transférés aux organismes supérieurs des réseaux trophiques entraînant de sérieux problèmes écologiques (**De Forest et al., 2007, Croteau et al., 2005**).

La présence des métaux lourds à des concentrations supérieures aux charges naturelles est devenue un problème de plus en plus préoccupant (**Biney et al., 1991**), les microorganismes sont les premiers organismes influencés par cette toxicité (**Giller et al., 1998**) car ces composés peuvent provoquer divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence (**Morozzi et al., 1982**), l'inhibition des activités enzymatiques (**Nweke et al., 2007**), l'altération de la structure de l'ADN (**Bruins et al., 2000; Rathnayake et al., 2009**), la modification de la composition et de la structure de la population microbienne (**Kozdrój et van Elsas, 2001; Satchanska et al., 2005**). Pour faire face à la profusion de métaux lourds dans l'environnement, les bactéries ont élaboré plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et de se développer en présence de métaux lourds (**Silver, 1996**).

En Algérie, de nombreux cas de pollution industrielle et urbaine ont été observés en l'occurrence au niveau des cours d'eau (**Harrat et Achour, 2010**). L'oued Messida situé dans le Parc national d'El Kala, constitue un chenal d'eau très important, il relie le lac Tonga à la mer Méditerranée et constitue un corridor biologique permettant aux espèces de poissons de se déplacer de la mer vers le lac et vice versa. Malheureusement, ce canal reçoit des polluants d'origine divers qui dégradent considérablement la qualité de ces eaux. Donc le contrôle et la surveillance de la qualité des eaux de cet écosystème aquatique devraient susciter un intérêt particulier, ils doivent avoir comme objectif majeur la préservation des habitats écologiques et la santé humaine (**El haite, 1991**).

De ce fait, le notre travail a pour objectif de déterminer le degré de la pollution des eaux de l'oued Messida par une étude comparative de la métallorésistance des souches isolées à partir de l'oued et des souches de références par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'une part et de la recherche des bactéries tolérantes d' autre part.

1. Métaux lourds

Afin d'étudier l'effet de la métallo-résistance des souches bactérienne, le choix des métaux été réalisé selon leur l'accessibilité. Les métaux choisit sont comme suite :

- ❑ Cobalt chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), $\text{PM}=129.83\text{g/mol}$.
- ❑ Cuivre sulfate pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), $\text{PM}= 159.6\text{g/mol}$.

2. Souches bactériennes

Afin de réaliser notre travail, nous avons utilisé deux types de souches :

- ❑ Souches isolées à partir de l'oued Messida, ces dernières ont été fourni par Mme Lamia Benhalima. Maitre assistant à Université de Guelma.
- ❑ Souches de référence ATCC, ces dernières sont utilisées comme témoin, car elles constituent d'excellents modèles pour la recherche de l'effet antibactérien des substances naturelles, synthétiques et minérales.

Les souches choisit sont comme suite :

- ❑ *Escherichia coli* K12 ATCC 10798
- ❑ *Escherichia coli* ATCC 25922
- ❑ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- ❑ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- ❑ *Escherichia coli*
- ❑ *Staphylococcus aureus*
- ❑ *Pseudomonas aeruginosa*

3. Milieux utilisés

Suivant la méthode employée et les souches étudiées, les milieux de culture utilisés sont les suivants : la gélose nutritive (GN), la gélose Chapman, la gélose Muller Hinton (MH), et le bouillon nutritif. La composition des milieux de culture est indiquée dans le tableau 5.

4. Préparation des solutions mères

Chaque métal est solubilisé dans de l'acide nitrique à 1% (**Abou-Shanab et al., 2007**) à raison de 50mg/ml.

Tableau 4 : Compositions des milieux de culture (Joffin et Leyral 2006).

Gélose Mueller Hilton	
Infusion de viande de boeuf (déshydratée)	300 g
Hydrolysate de caséine	017,5 g
Amidon	01,50 g
Eau distillée	1000 ml
Agar Agar	17.00 g
pH final.....	7,5
Bouillon nutritif	
Extrait de viande	1g
Extrait de levure.....	2.5 g
Peptone	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Eau distillée	1000 ml
pH final.....	7
Gélosé nutritive	
Extrait de viande	1g
Extrait de levure.....	2.5g
Peptone	5g
Chlorure de sodium.....	5g
Agar Agar	15g
Eau distillée	1000 ml
pH final.....	7
Gélose Chapman	
Peptone	10 g
Extrait de viande de bœuf	1g
Chlorure de sodium	75g
Mannitol :.....	10g
Rouge de phénol	0.025g
Agar Agar	15g
Eau distillée	1000ml
pH	7.4

5. Étude de la résistance bactérienne aux métaux lourds

L'étude de la résistance bactérienne aux métaux lourds a été réalisée sur milieu solide selon la méthode décrite par **Abou-Shanab et al., (2007)**. C'est une méthode admise qui a été utilisée dans de nombreuses études rapportées par **Mergeay et al., (1985)**; **Siddiqui et al., (1989)**; **Taghavi et al., (1997)** dont les étapes sont comme suite :

5.1. Repiquage des souches

Avant la préparation de l'inoculum, chaque souche bactérienne est repiquée sur boîte Pétri (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* sur gélose nutritive, *Staphylococcus aureus* sur gélose Chapman).

5.2. Préparation des cultures jeunes

Afin de récupérer des souches bactériennes jeunes, nous avons réalisé une culture de 18h sur du bouillon nutritif.

5.3. Préparation de l'inoculum bactérien

A partir d'une culture jeune, une suspension bactérienne est réalisée pour chaque souche, la turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 Mc Farland, on obtient alors notre inoculum estimé à 10^6 unités formant colonie par millilitre (UFC/ml).

5.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

Pour chaque métal, on prépare une série de concentrations stériles, allant de 12.5 à 3200 $\mu\text{g/ml}$ dans de la gélose Muller Hinton en surfusion. L'inoculation des boîtes se fait en ajoutant dans chaque boîte Pétri 10 μl de l'inoculum et 5 ml de la gélose MH en surfusion ($\sim 45^\circ\text{C}$). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures, après incubation on examine la croissance bactérienne dans chaque boîte. La CMI d'un composé chimique vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite concentration ne montrant aucune croissance.

Des témoins de croissance sont préparés également avec de la gélose MH sans métaux lourds.

6. Sélection des souches bactériennes tolérantes aux métaux lourds

La tolérance ou la capacité de résistance bactériennes a été réalisée selon **Patel et al., (2006)**, après détermination de la CMI, la croissance a été suivie pendant une semaine (une lecture tous les 2 jours) ceci va permettre de déterminer le nombre de souches tolérantes.

1. Détermination du taux de croissance

1.1. *Escherichia coli*

Les résultats obtenus du taux de croissance des différentes souches de l'espèce *Escherichia coli* sont représentés dans la figure 3 pour *Escherichia coli* K12 ATCC 10798, la figure 4 pour *Escherichia coli* ATCC 25922 et la figure 5 pour *Escherichia coli*.

Les résultats obtenus ont indiqué que la croissance est de 100% pour les 3 souches en absence de métaux. Cependant en présence de métaux la croissance diminue progressivement.

Pour la souche témoin *Escherichia coli* K12 ATCC 10798, il apparaît que le cobalt et le cuivre ont le même effet sur cette souche, où une croissance importante (100%) à été retrouvée jusqu'à la concentration 50µg/ml, toutefois au-delà de 50µg/ml aucune croissance n'a pu être retrouvée.

Pour la souche *Escherichia coli* ATCC 25922, il apparaît que le cuivre a une toxicité élevée comparé au cobalt, une croissance importante a été retrouvée jusqu'à la concentration 200µg/ml pour le cobalt, cependant pour le cuivre au delà de 100µg/ml aucune croissance n'a pu être retrouvée.

Pour la souche *Escherichia coli*, il apparaît que le cuivre a une toxicité élevée par rapport au cobalt où une croissance importante à été retrouvée jusqu'à la concentration 200µg/ml pour le cobalt, cependant pour le cuivre au delà de 25µg/ml aucune croissance n'a pu être retrouvée.

Selon les résultats obtenus, nous pouvons prédire qu'il existe des différences entre l'action du cuivre et du cobalt pour chaque souche. Il semblerait qu'*Escherichia coli* est plus sensible à l'action du cuivre que les autres souches.

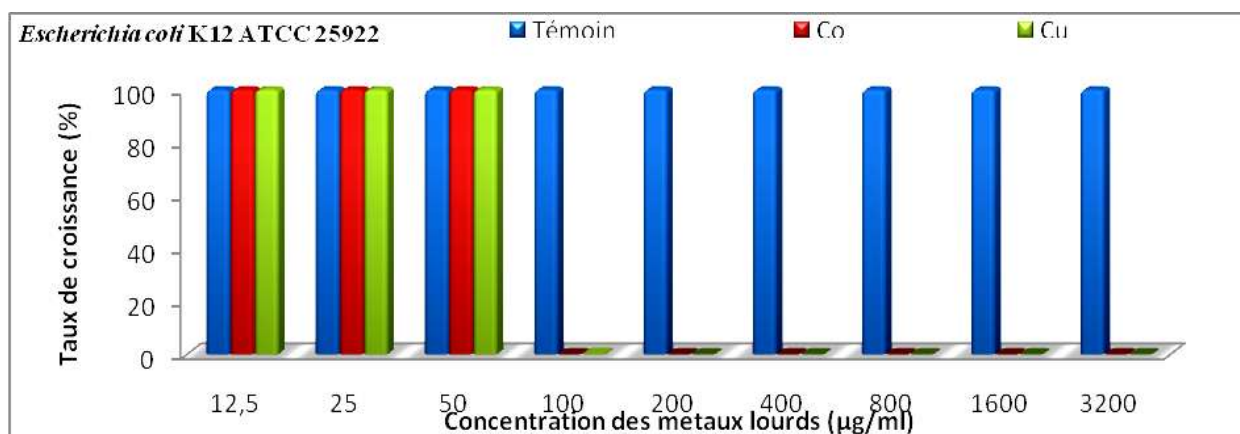


Figure 3 : Distribution du taux de croissance d'*Escherichia coli* K12 ATCC 10798 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

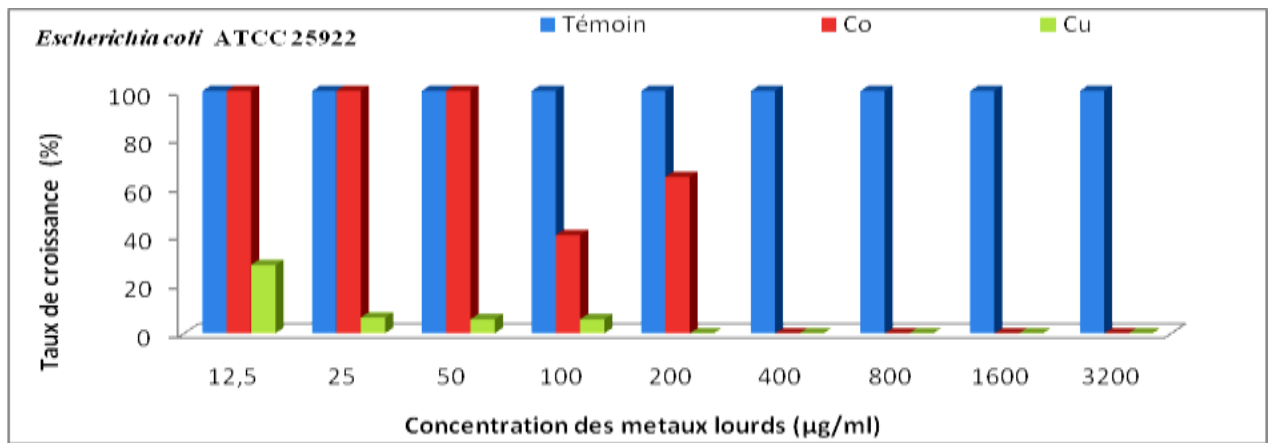


Figure 4: Distribution du taux de croissance d’*Escherichia coli* ATCC 25922 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

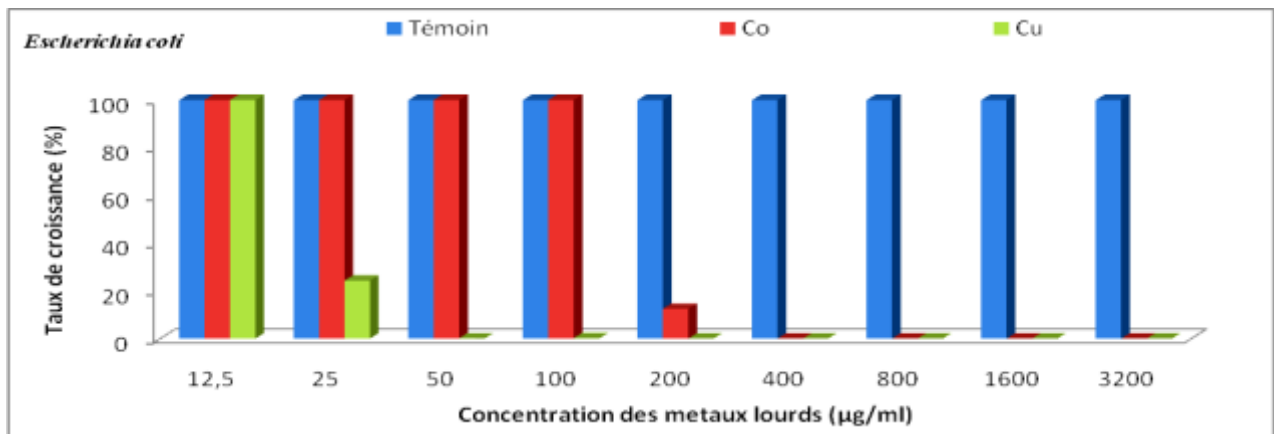


Figure 5 : Distribution du taux de croissance d’*Escherichia coli* vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

1.2. *Staphylococcus aureus*

Les résultats obtenus du taux de croissance des différentes souches sont représentés dans la figure 6 pour *Staphylococcus aureus* et la figure 7 pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Les résultats obtenus ont indiqué que la croissance est de 100% pour les 2 souches de l’espèce *Staphylococcus aureus* en absence de métaux, cependant en présence de métaux la croissance diminue progressivement jusqu’à 0%.

Pour la souche *Staphylococcus aureus*, il apparaît que le cuivre a une toxicité très élevée par rapport au cobalt, au delà de 25µg/ml aucune croissance n’a pu être retrouvée. Pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, il apparaît qu’elle tolère mieux le cobalt par rapport au cuivre.

Selon les résultats obtenus, nous pouvons affirmer que le cuivre est plus toxique que le cobalt d'une part, d'autre part il existe des différences entre l'action du cuivre et cobalt pour chaque souche, il semblerait que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est plus sensible à l'action du cuivre et du cobalt que *Staphylococcus aureus*.

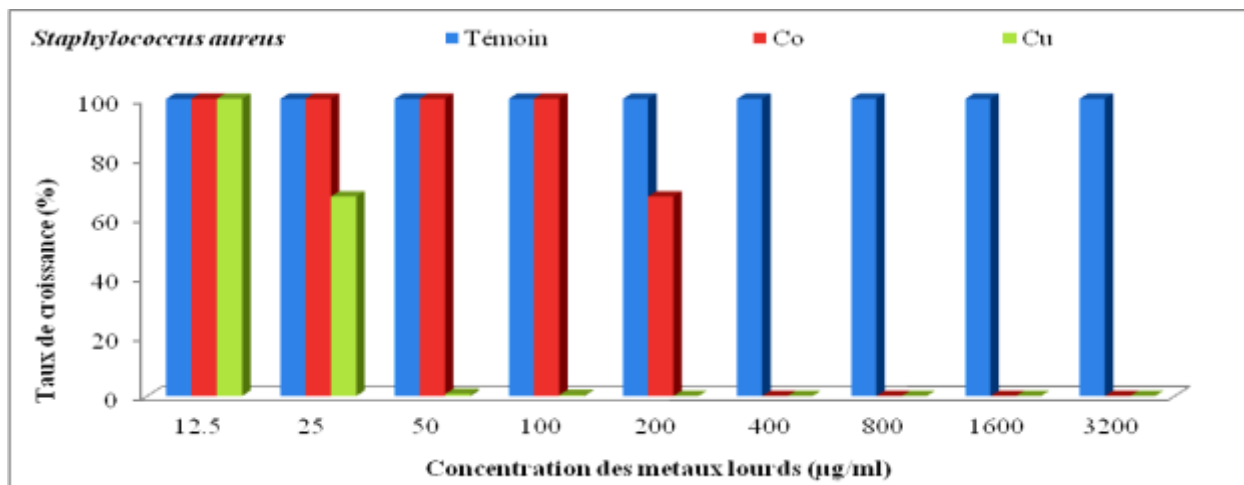


Figure 6 : Distribution du taux de croissance de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

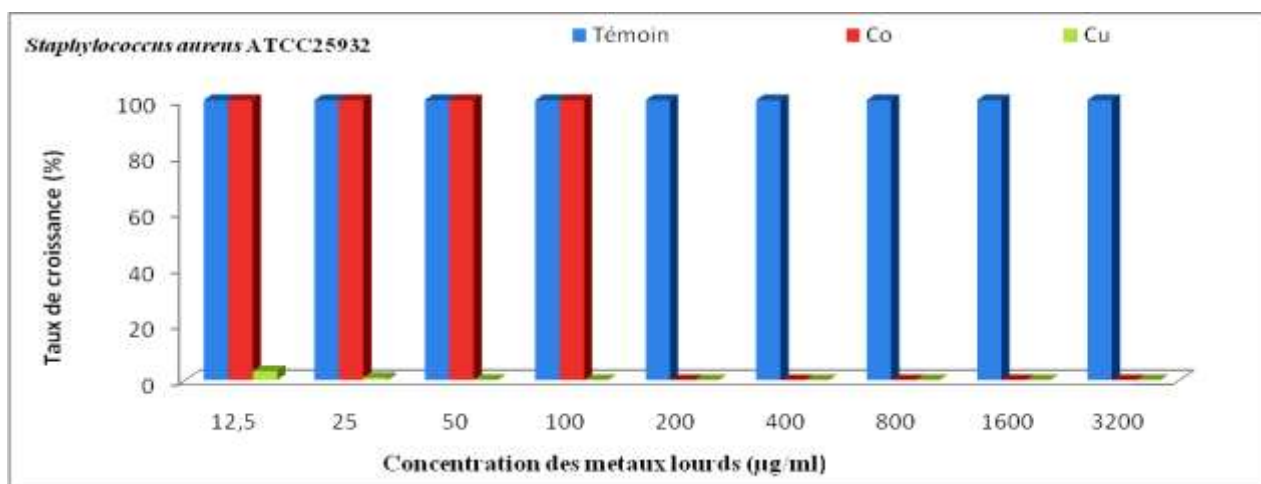


Figure 7 : Distribution du taux de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats obtenus du taux de croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et la souche *Pseudomonas aeruginosa* sont représentés dans la figure 8 et la figure 9 respectivement.

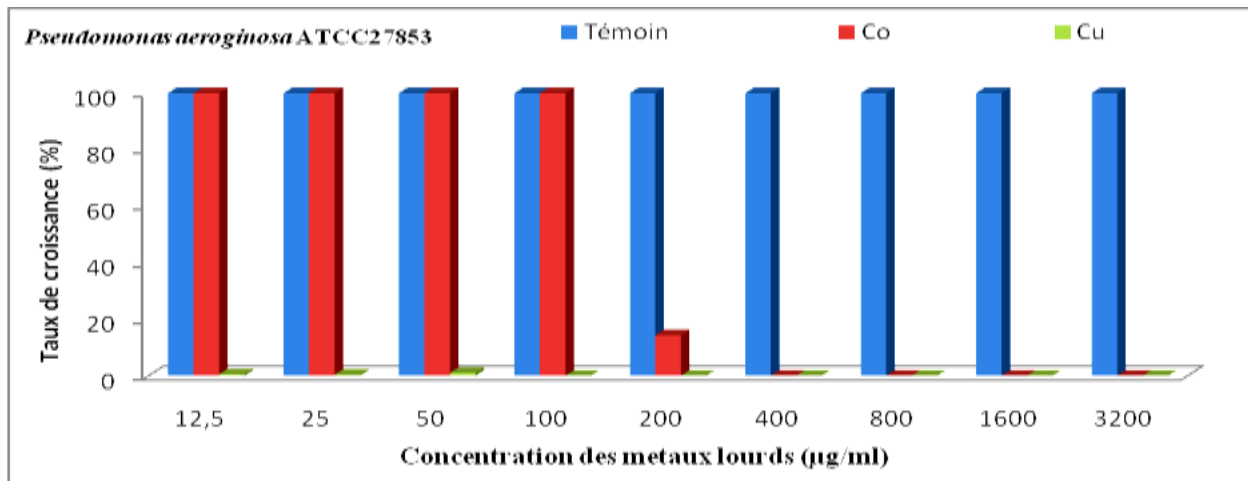


Figure 8 : Distribution du taux de croissance de *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

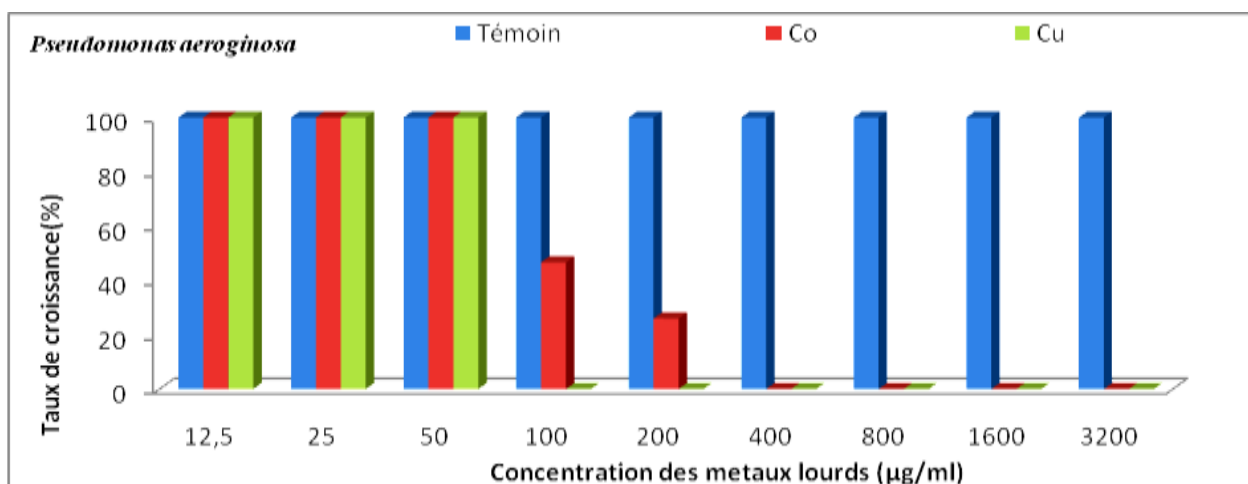


Figure 9 : Distribution du taux de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis du cobalt et du cuivre.

Les résultats obtenus ont indiqué que la croissance est de 100% en absence de métaux pour les 2 souches. Cependant en présence de cuivre et de cobalt la croissance diminue progressivement jusqu'à 0%. Pour l'espèce *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853*, il apparait que le cuivre a une toxicité élevée par rapport au cobalt même à faible concentration.

Selon les résultats obtenus nous pouvons affirmer qu'il existe des différences entre l'action du cuivre et du cobalt pour chaque souche, il semblerait que *Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853* est plus sensible à l'action du cuivre que *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenue pour les métaux lourds vis-à-vis des souches bactériennes sont mentionnées dans les tableaux 6 ainsi que les photos présent dans le tableau 7 et 8 pour les 3 souches de l'espèce *Escherichia coli*, le tableau 9 et 10 pour les 2 souches de l'espèce *Staphylococcus aureus* et le tableau 11 et 12 pour les 2 souches de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices du cobalt et du cuivre sur les souches bactériennes.

Souches bactériennes	CMI (µg/ml)	
	Co	Cu
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798	50<CMI<100	100<CMI<200
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	200<CMI<400	100<CMI<200
<i>Escherichia coli</i>	200<CMI<400	100<CMI<200
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	200<CMI<400	50<CMI<100
<i>Staphylococcus aureus</i>	200<CMI<400	100<CMI<200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	200<CMI<400	50<CMI<100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200<CMI<400	50<CMI<100

Selon les résultats obtenus, la CMI de la souche de référence *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 était 100µg/ml et 200µg/ml pour le cobalt et le cuivre respectivement.

Cependant pour les souches : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* la CMI été identique avec une valeur de 400 µg/ml pour le cobalt et 200 µg/ml pour le cuivre.

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas aeruginosa* ont présenté une CMI identique avec une valeur 400 µg/ml pour le cobalt et 100µg/ml pour le cuivre.

L'utilisation de la souche témoin *E.coli* K12 ATCC 10798 a permis de distinguer entre les souches résistantes et sensibles (**Sabri *et al.*, 2006**). La CMI de la souche témoin a été inférieure à celle des autres souches pour le cobalt. Néanmoins pour le cuivre la CMI de la souche témoin est inférieure ou égale à celle des autres souches.

En se basant sur les travaux de fin d'étude de master II réalisés par Mme benhalima lamia dans les années précédentes sur la résistance bactériennes aux antibiotiques des bactéries isolées à partir de l'oued Messida, nous pouvons penser que ces souches sont aussi résistantes aux métaux lourds comparés à la souche témoin *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

Tableau 6: Concentrations minimales inhibitrices d'*Escherichia coli* vis-à-vis du Cobalt.







Cobalt		
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798	50µg/ml	100µg/ml
		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	200µg/ml	400µg/ml
		
<i>Escherichia coli</i>	200µg/ml	400µg/ml
		

Tableau 7 : Concentrations minimales inhibitrices d'*Escherichia coli* vis-à-vis du cuivre.


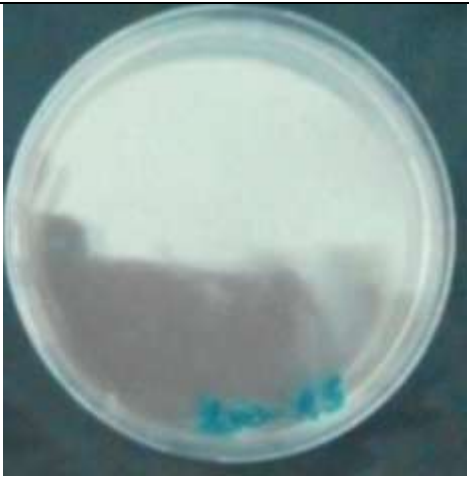




Cuivre		
	100µg/ml	200µg/ml
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
<i>Escherichia coli</i>		

Tableau 8 : Concentrations minimales inhibitrices de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis du cobalt.





	Cobalt	
	200µg/ml	400µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		
<i>Staphylococcus aureus</i>		

Tableau 9 : Concentrations minimales inhibitrices de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis du cuivre.





	Cuivre	
	50µg/ml	100µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		
<i>Staphylococcus aureus</i>	100µg/ml	200µg/ml
		

Tableau 10 : Concentrations minimales inhibitrices de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis du cobalt.









Cobalt		
	200µg/ml	400µg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices de *Pseudomonas aeruginosa* avis à vis du cuivre.

Cuivre		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	50µg/ml	100µg/ml
		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50µg/ml	100µg/ml
		

3. Adaptation et tolérance bactériennes

Les résultats obtenus après une série d'incubation (tous les 2 jours durant une semaine) sont représentés dans le tableau 13 pour le cobalt et le tableau 14 pour le cuivre.

Selon les résultats obtenus, on remarque que le nombre de colonies bactériennes ne cesse d'augmenter pour la totalité des souches utilisées. Pour certaines concentrations de cobalt et de cuivre au delà de 24h d'incubation, des colonies bactériennes apparaissent. Ces dernières peuvent être qualifiées de mutants ou de bactéries tolérantes. C'est un mode d'adaptation des cellules bactériennes pour éviter le stress métalliques, cela a été déjà observer par divers travaux de **Patel et al., (2006)** ; **Oves et al., (2012)** ; **Chien et al., (2013)**.

Tableau 12: Capacité de tolérance bactérienne aux différentes concentrations du cobalt

(* : indique l'intensité du tapis bactérien).

Cobalt	12.5 µg/ml			25µg/ml			50µg/ml			100µg/ml			200µg/ml			< 400µg/ml		
	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h
<i>E.coli K12 ATCC 10798</i>	**	**	**	*	**	**	*	*	*	0	0	0	0	4	20	0	0	0
<i>E.coli ATCC 25922</i>	700	***	**	640	*	**	420	***	***	594	*	**	554	652	*	0	0	0
<i>E.coli</i>	1480	***	***	900	**	***	1160	**	***	668	*	***	77	142	150	0	0	0
<i>S. aureus ATCC 25923</i>	1480	***	**	1200	***	***	1000	*	***	385	*	**	118	*	**	0	0	0
<i>S. aureus</i>	1950	***	***	550	**	***	1348	**	**	1220	***	***	516	*	**	0	0	0
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	***	***	**	750	*	**	790	***	***	600	**	**	86	**	***	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	980	***	***	840	**	***	760	*	***	280	*	***	156	*	*	0	0	0

Tableau 13: Capacité de tolérance bactérienne aux différentes concentrations du cuivre

(* : indique l'intensité du tapis bactérien).

Cuivre	12.5µg/ml			25µg/ml			50µg/ml			100µg/ml			200µg/ml			< 400µg/ml		
	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h
<i>E. coli K12 ATCC 10798</i>	***	161	179	**	268	324	**	**	198	1	20	30	0	0	0	0	0	0
<i>E.coli ATCC 25922</i>	180	97	**	35	35	27	28	53	67	20	15	18	0	0	20	0	0	0
<i>E.coli</i>	***	**	**	180	**	***	1	*	15	2	4	3	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus ATCC 25923</i>	8	33	74	3	3	4	1	1	40	0	0	1	0	0	2	0	0	0
<i>S. aureus</i>	**	*	**	500	*	268	1	12	*	1	1	10	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	2	10	75	1	11	30	5	5	15	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	***	***	***	***	**	**	**	**	**	0	0	10	0	0	0	0	0	0

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons essayé de comprendre comment les bactéries réagissent à un environnement pollué par le cuivre et le cobalt en étudiant certaines de leurs réponses vis-à-vis de la toxicité métallique. D'après les résultats obtenues on peut conclure que :

- Le cuivre a une toxicité plus élevée que celle du cobalt.
- L'action du métal varié d'une souche à l'autre, il semblerait que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas aeruginosa*, sont sensibles à l'action du cuivre par rapport à la souche témoin d'*Escherichia coli* K12 ATCC 10798. Cependant pour le cobalt toutes les souches ont présenté une résistance par rapport à la souche témoin.
- Les souches isolées à partir de l'oued Messida semble être plus résistantes, ces bactéries tolèrent mieux le cuivre comparé à la souche témoin. Néanmoins pour le cobalt, toutes les souches bactériennes ont présenté la même CMI (comprise entre 200-400µg/ml) tout ce qui ne veut pas dire qu'elles sont égales.
- Certaines souches bactériennes ont toléré des concentrations élevées en métaux afin d'assurer leur survie.

En perspective, il serait important de :

- Doser la Méthionine pour mieux comprendre l'effet des métaux sur les bactéries.
- Tester l'effet d'autres métaux lourds.
- Récupérer les souches tolérantes.

Références bibliographiques

Abou Shanab R.A.I., van Berkum P. et Angle. J.S. (2007). Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in Gram positive and Gram negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. *Chemosphere*. 68 : 360–367.

Achard. J. (2005). Etudes biochimiques et génétiques de la réponse adaptative de mollusques face aux contaminations métalliques et au stress oxydant. Thèse de doctorat. Université Bordeaux I. 254p.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). (1990). Toxicological profiles for copper. Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, GA: US department of Health and Human Services, Public Health Services.

Avril. J.L., François .D., Henry. M. et Henry .D. (2000). Bactériologie clinique. Edition I. 585p.

Baize. D. (1997). Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA Editions. Paris. 408p.

Baker. A. J. M . et Walker . P . L . (1989). Ecophysiology of metaluptake by tolerant plants. In : Heavy metal tolerance in plants - Evolutionary aspects. Shaw, A. (Eds). CRC.

Benbelkacem. N. (2012). Synthèse et caractérisation de complexes mixtes de cobalt (III) avec l'éthylènediamine, une série d'acides aminés et des bases azotées. Mémoire de magister. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. 54p.

Bendjama .A. (2007). Niveaux de contamination par les métaux lourds du complexe lacustre «Tonga, Oubeira, El-mellah » du parc national d'El-kala. Mémoire de magister .Université Badji Mokhtar – Annaba. 192p.

Benfettoume .A. et Khalla .N. (2014). Impact toxicologique des métaux lourds sur le système antioxydant enzymatique chez les mollusques (bivalve). Mémoire de master II .Université 08 mai 1945 Guelma. 54p.

Biney .C.A. et Beeko.C.A. (1991). Trace metal concentrations in fish and sediment from the Wiwi, a small urban river in Kumasi, Ghana. *Trop.Ecol.* 32(2):197–206.

- Bourrelier. P.H., et Berthelin. J. (1998).** Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. CR. AccSci, 42. Edition Lavoisier. Paris. 145p.
- Bruins .M.R., Kapil .S. et Oehme .F.W. (2000).** Microbial resistance to metals in the environment. Ecotoxicol and Environ Safety. 45:198-207.
- Burnol .A. , Duro.L. et Grive.M. (2006).**Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines .48p
- Chennouf. F. et Siradj. F. (2008).**Isolement des bactéries métallo-résistant partir de Chott Ain El-Baidha et lac Témaçine . Memoire de fin d'étude. Université de Kasdi-Merbah Ouargla .57p.
- ChienC.C., Lin.B.C. et Wu.C.H. (2013).** Biofilm formation and heavy metal resistance by an environmental *Pseudomonas sp* .Biochemical Engineering Journal. 78:132-137.
- Chiffoleau .J.F. (2004)** .La contamination métallique. Ifremer .39p.
- Chiffoleau. J. F. D., Auger .E., Chartier. P., Michel. I., Truquet . A., FICHT. J. L. et Romana .L. A. (2001).** Spatiotemporel changes in Cadmium contamination in the Seine estuary (France).Estuaries. 24(6B) :1029-1040.
- Clave .D. (2012).** « Fiche technique Bactériologie 123 ». Laboratoire de Bactériologie Hygiène CHU de Toulouse - Institut Fédératif de Biologie.2p.
- Croteau .M.N., Luoma .S.N. et Stewart .A.R. (2005).** Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. Limnol. Oceanogr. 50:1511–1519.
- CSHPF. (2000).** Recommandations relatives à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux. Bulletin officiel. 27p.
- Dameron. C. et Howe. P. D. (1998).** Copper Environmental Health criteria n°200.Genève. World Health Organization.
- Deforest .D.K., Brix .K.V., et Adams .W.J. (2007).** Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. Aquatic Toxicology. 84 : 236–246.
- Delarras.C., Trébaol.B. et Durand.J. (2010).**Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : Réglementation-Micro-organismes-Prélèvements-Analyse.2^{ème} édition. Tec et Doc. Lavoisier. p542.

- El haite H. (1991).** Eléments de réponse pour une meilleure maîtrise des pollutions et gestion des eaux usées à Fés. Thèse de Doctorat. Université Moulay Ismaïl, Meknés. Maroc 158p.
- Ferron. A. (1985).** Bactériologie Médicale : à l'usage des étudiants en médecine. 12^{ème} édition. Paris.374p.
- Frank. R.K., Ishida. A. et Suda. P. (1976).** Metals in agriculturalsoils of Ontario. Revue canadienne de la science du sol.56 : 181-196.
- Giller .K.E., Witter .E. et McGrath .S.P.(1998).** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. Soil Biol. Biochem. 30:1389–1414.
- Harrat. N. et Achour .S. (2010).** Pollution physicochimique des eaux de barrage de la région d'El Tarf. Impact sur la chloration. Larhyss journal. 8 : 47-54.
- Huynh.T.(2009).**Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante / ver de terre/ microflore tellurique. Thèse de doctorat. Université Paris Est. 260p.
- Joffin .J.N. et Leyral. G. (2006).** Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. 1^{ère} Edition. Bordeaux. p248.
- Kabata Pendias. A. et Pendias.H. (2001).** Trace elements in soils and plants. CRC Press, London. 145p.
- Kozdrój .J. et van Elsas .J.D. (2001).** Structural diversity of microorganims in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. Journal of Microbiological Methods.43:197-212.
- Lamnaouer.D. (2002).** Fiche technique Détermination des propriétés biologiques (activités pharmacologiques et toxicologiques) des plantes médicinales et aromatiques du PNT. Programme de l'UICN en Afrique du Nord. 23p.
- Letendre. J., Chouquet. B., Manduzio. H., Marin. M., Bultelle. F., Leboulenger. F. et Durand.F. (2009).** Tidal height influences the levels of enzymatic antioxidant defences in *Mytilus edulis*. Marine Environmental Research. 67 : 69-74.
- Li.Z. S., Lu. Y. P., Zhen.R. G., Szczypka. M., Thiele. D. J. et Rea. P.A.(1997).** A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1- catalyzed transport of bis (glutathionato) cadmium. Proc Nat Acad Sci U S A. 94(1): 42-7.

- Loué. A. (1993).** Oligo-éléments en agriculture. 2^{ème} édition. Editions Nathan. Paris. 577 p.
- Mahler. C.E., Vincent.C.A. et Parmer.D.G.(1986).** Learning from errors in nursing practice. Journal of advanced Nursing 26:111-119.
- Morozzi .G., Cienci .G. et Caldini .G. (1982).** The tolerance of an Environmental Strain of *Escherichia coli* to Some Heavy Metals. Hyg. I. Abt. Orig. 176:189: 55-62.
- Nelson. N. (1999).** Metal ion transporters and homeostasis. Embo J. 18(16): 4361-71.
- Nies. (1999).** Microbiologie heavy métal résistance. Appl microbial boite chnol .51 : 730-750.
- Nweke .C.O., Alisi .C.S., Okolo .J.C. et Nwanyanwu .C.E. (2007).** Toxicity of Zinc to Heterotrophic Bacteria from a Tropical River Sediment. Appl. Environ. Res. 5:23-132.
- Nzengue.Y. (2008).** Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines. Thèse de doctorat. : Université Joseph Fourier.Grenoble. 297p.
- Odermatt.A., Suter.H.K., Rapf.R. et Solioz.M. (1993).** Primary structure of twop – type ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus*. J. Biol. chem. 268:12775-12779.
- OMS-IPCS. (1998).** Environmental Health Criteria n°200: copper, World Health Organisation International Programme on chemical safety.
- Oves .M., Saghirkhan.M. et Zaidi.A.(2013).** Biosorption of heavy metals by *Bacillus thuringiensis* strain OSM29 originating from industrial effluent contaminated north Indian soil. Saudi journal of Biological Sciences.20:121-129.
- Patel. J. S., Patel. P. C. et Kalia .K. (2006).** Isolation and Characterization of Nickel Uptake by Nickel Resistant Bacterial Isolate (NiRBI).Biomedical and Environmental Sciences. 19: 297-301.
- Picard .R., Temblay .B., et Myrand .B. (2010).** Revue de littérature et fiches descriptives des différents indicateurs de stress et de vitalité utilisés pour caractériser les mollusques bivalves. Les Publications de la Direction de l'innovation et des technologies. Rapport de R-D n° 188. 26p.
- Rathnayake .V.N., Megharaj .M., Bolan .N. et Naidu .R. (2009).** Tolerance of Heavy Metals by Gram Positive Soil Bacteria. W. Acad. Sc., Engin. Techn. 53:1185-1189.
- Robert. M. et Juste .C. (1999).** Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris: Club CRIN.145p.

Rouane .O .(2013). Bio surveillance de la qualité des eaux côtières du littoral occidental Algérien par le suivi des indices biologiques de la biodisponibilité et la bioaccumulation des métaux lourds (Zn, Cu ; P b et Cd) chez la moule *Mytilusgallo provincialis* et l'oursin *Paracentrotus lividus*. Thèse de doctorat. Université d'Oran. 249p.

Rouch D. A., Lee. B. T. D. et Morby. A. P. (1995). Understanding cellular Responses to Toxic Agents:A Model for Mechanism Choice in Bacterial Metal Resistance. J. Ind. Microbiol.14:32-141.

Sabri .M., Léveille .S. et Dozois.C.M. (2006). A site ABCD homologue from an avian pathogenic Escherichia coli strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide . Revue Microbiology. 12: 50-68

Satchanska .G., Pentcheva .E.N., Atanasova .R., Groudeva .V., Trifonova .R., et Golovinsky .E. (2005). Microbial Diversity in Heavy-Metal Polluted Waters. Biotechnol & Biotechnol.19:61-67

Savolainen .H. (1996). Biochemical and clinical aspects of nickel toxicity. Rev. Environ. Health. 11:167-173.

Scriban. R. (1993). Biotechnologie. Technique et Documentation, Lavoisier, 4^{ème} édition, Paris. 904p.

Senez .J. (1968). Microbiologie générale. Edition : Doin. Paris. 592p.

Silver .S. (1996). Bacterial Resistances to Toxic Metal Ions – a review. Gene.179:9-19.

Wertheim .H.F., Melles .D.C., Vos .M.C., Van Leeuwen .W., Van Belkum .A. et Verbrugh .A. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. Lancet. Infect Dis.5:751-62.

Williams .R.J.P. et Frausto Da Silva .J.J.R. (2006). The Chemistry of Evolution. The Development of Our Ecosystem. Elsevier. Amsterdam. 481p.

Wladimir.S. et David.T.(2003). Résistances aux β -lactamines. Service de Bactériologie-Hygiène du CHU Pitié-Salpêtrière. Université ParisVI .78. 31p.

Wright.D.A. et Welbourn.P. (2002). Environmental Toxicology. Cambridge environmental chemistry. Series 11. Cambridge University Press. Cambridge. 480p.

Zhao .F.J., Lombi .E., Breedon .T. et McGrath .S.P. (2000). Zinc hyper accumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. Plant Cell Environ. 23: 507-514.

Les sites web

[01] [http:// www.cpiecotentin.com/littoral/pollution/pollution.htm](http://www.cpiecotentin.com/littoral/pollution/pollution.htm)). Consulter le (03/05/2015).

[02] http://www.citesciences.fr/francais/ala_cite/eau_pour_tous/maladies_hydriques.php?rub=maitrise_eau&ss_rub=20. Consulter le: (28/02/2015).

Résumé

Dans le cadre d'une étude comparative entre l'effet du cuivre et du cobalt sur deux types de souches bactériennes (souches de références et souches prélevées à partir de l'oued Messida). Nous pouvons considérer que :

Les souches prélevées à partir de l'oued Messida sont plus sensibles aux concentrations excessives du cuivre par rapport au cobalt, cette sensibilité se manifeste par la diminution du nombre des colonies sur milieu de culture.

Aussi, les souches prélevées à partir de l'oued Messida ont présenté une légère résistance aux métaux lourds comparés à la souche témoin *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

Mots clés : Pollution métalliques - tolérance bactérienne –cuivre – cobalt - oued Messida.

Summary

Through a comparative study of the effect of copper and cobalt on two types of bacterial strains (collected reference strains and strains from the wadi Messida). We can estimate that:

The strains collected from Wadi Messida are more sensitive to excessive levels of copper intake cobalt; this sensitivity is reflected in the decrease in number of colonies on culture media.

Also, strains collected from Wadi Messida showed a slight resistance to metals compared with *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 witness.

Keywords : Metal Pollution - bacterial tolerance -Copper - cobalt - Messida wadi

المخلص

من خلال دراسة مقارنة لتأثير النحاس و الكوبالت على نوعين من السلالات البكتيرية (السلالات المرجعية التي تم

جمعها والسلالات من واد المسيدة). يمكننا تقدير ما يلي:

السلالات التي تم جمعها من واد المسيدة هي أكثر حساسية لتركيزات عالية من النحاس والكوبالت، و تتجلى هذه الحساسية في انخفاض عدد المستعمرات في الوسط الزراعي البكتيري.

كما أظهرت السلالات التي تم جمعها من وادي المسيدة مقاومة للمعادن مقارنة مع السلالة المرجعية *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

الكلمات المفتاحية : التلوث بالمعادن - التسامح البكتيري- النحاس - الكوبالت - وادي المسيدة