

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 bactériennes vis-à-vis du cadmium et du cobalt

Présenté par : Mme Harkat Choufa Rabiaa

Melle Harkat Zayneb

Melle Zoghلامي Somia

Devant les jurys :

Présidente : Mme Bedioui Souraya

(M.A.A) Université de Guelma

Examinatrice : Mme Benhalima Lamia

(M.A.A) Université de Guelma

Encadreur : Mme Amri Sandra

(M.A.A) Université de Guelma

Juin 2015

Remerciement

Remerciant tout d'abord le bon dieu le tout compatissant, le tout miséricordieux de nous avoir donné la force pour réaliser ce travail.

Nous tenons tout particulièrement à remercier vivement Mme Souraya Bedioui, (M.A.A à l'université de Guelma) d'avoir accepté de présider le jury.

Nous s'exprimons nos sincères remerciements à Mme 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

A mes chers parents source de tendresse, de volonté et de patience. Mes

Peux à travers lesquels j'ai vu et je vois ce monde : Ammar et Mamia.

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

et pour tous ce que vous avez fait pour moi.

A mon petit frères : Mouhamed.

A mes sœurs : Zineb, Souhayla, Intissar.

À Mon cher mari Adel et ma belle-mère : Nasira.

À la famille Phoufa, Maaziz et Harkat.

A celles que j'ai passé avec elles de bonnes heures et je porte avec

Elles que de bons souvenirs, à mes amies intimes :

Zineb, Amina, Bouchra, Soumia, Ahlam, Amira, Navel,

Amina...etc

A toute la section Santé Eau Environnement (promotion 2015).

Rabiiā

♥ Dédicace ♥

Je dédie ce modeste travail à mes chers parents « Houria et Mebarek » qui sont tout à fait comme une bougie qui s'allume pour éclaircir ma vie et je ne peux que les souhaiter le bonheur et que Allah les garde à moi.

A mes chers frères Abd Errazak et Abada.

A mes chères sœurs Ghania , Assil, et Aya.

A ma très chère grande mère « Fadjra » que Allah nous la garde.

A mes oncles Abd Errahmen, Salem, Saleh, Slimen et Abd Elhamid et leurs épouses.

A mon fiancé Houcin et à ma belle-mère Yakouta.

A mes petits neveux : Kossay et Reḳaya.

A mes amies Meriem, Safa, Karima et Mira.

A la famille Zoghlami et Messouafi.

Je le dédie aussi à tous mes collègues de section Santé Eau Environnement (promotion 2015)

Sans oublier tous les enseignants de toutes les étapes de mes études dès le primaire et surtout Mr Sraydi Abd Elhak, Miss Mahboubi Wassila.

♥ Somia ♥

♥ Dédicace ♥

Je dédie ce modeste travail à la fontaine d'amour qui ne s'arrête pas de donner, ma chère mère « Nassira ».

Pour mon très cher père « Rachid » qui m'a suivi le long de ce chemin, qui n'a jamais cessé de contribuer à ma réussite et mon bonheur et j'espère qu'il sera fier.

*A mes chers frères : Farid, Adel, kimou et Sabri ainsi que son épouse
Hana*

A mes neveux : Abd El mouhayman, Abd El rahman, Ritedj, Adem, Asma, Nour, Haytham, Chihab, Chayma, Mohamed, Assil qui m'ont donné le sourire et la joie de vivre.

A mes proches : wided et Amina

A mes amies : Amina, Rabiaa, Soumia, Bouchra, Meryem, Safa, Nawel, Amira, Karima, Sara, Najia et Hanin.

Je remercie tous ceux et celle qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail et en particulière mon oncle « Abd el Ghani et Mr Hasen »

A mes tantes : « Nadia, Houria, Samia, Souad, Arbia, ».

A la famille « Harkat et Guerziz »

Mes sincères remerciements vont également à toutes les équipes du Laboratoire et de la bibliothèque.

En fin, mes remerciements vont à toutes nos amies, et en particulièrement celle de notre promotion de SEE (2014 -2015).

♥ *Zayneb* ♥

Sommaire

Titre des matières	pages
Remerciement	
Dédicace	
Glossaire	
Sommaire	
Liste de figures	
Liste de tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	
Chapitre I : Recherche bibliographique	
1. Pollution métallique.....	01
1.1. Définition de la pollution.....	01
1.2. Classification de la pollution	01
1.2.1. Pollution physique	01
1.2.2. Pollution microbiologique	01
1.2.3. Pollution chimique	01
1.3. Sources de la pollution	02
1.4. Métaux lourds	02
1.5. Classification des métaux lourds	02
1.5.1. Métaux essentiels	02
1.5.2. Métaux non essentiels	03
1.6. Origine des métaux lourds.....	04
1.6.1. Origine naturelle	04
1.6.2. Origine anthropique	04
1.7. Propriétés des métaux lourds	04
1.7.1. Cadmium	04
1.7.2. Cobalt	05
1.8. Effets toxiques des métaux lourds.....	05
1.8.1. Effets toxiques sur la santé humaine	05
1.8.2. Effets toxiques sur les organismes aquatiques	06

2. Microorganismes	06
2.1. <i>Escherichia coli</i>	06
2.1.1. Classification	06
2.1.2. Habitat	07
2.1.3. Caractéristiques.....	07
2.1.4. Pouvoir pathogène	07
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	07
2.2.1. Classification	08
2.2.2. Habitat	08
2.2.3. Caractéristiques	08
2.2.4. Pouvoir pathogène	09
2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	09
2.3.1. Classification	09
2.3.2. Habitat	09
2.3.3. Caractéristiques	09
2.3.4. Pouvoir pathogène	10
3. Métabolisme bactériennes.....	10
3.1. Notion de résistance et tolérance	10
3.2. Voie d'entrée des métaux lourds dans la cellule bactérienne.....	10
3.3. Résistance bactériennes aux métaux lourds	11

Chapitre II : Matériel et méthodes

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

Résultats et discussion

1. Détermination des taux de croissance.....	16
--	----

1.1. <i>Escherichia coli</i>	16
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.3. <i>Pseudomonasaeruginosa</i>	18
2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	19
3. Tolérance bactérienne.....	27

Conclusion

Références bibliographiques

Résumés

Liste des figures

Figures	Pages
Figure 1 : Tableau périodique des éléments	03
Figure 2 : Origine des métaux lourds.....	04
Figure 3 : Distribution du taux de croissance d' <i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798 vis-à-vis du cobalt et du cadmium.....	14
Figure 4 : Distribution du taux de croissance d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 vis-à-vis du cobalt et du cadmium.....	14
Figure 5 : Distribution du taux de croissance d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis du cobalt et du cadmium.....	15
Figure 6 : Distribution du taux de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 vis-à-vis du cobalt et du cadmium.....	16
Figure 7 : Distribution du taux de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis du cobalt et du cadmium.....	16
Figure 8 : Distribution du taux de croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 vis-à-vis du cobalt et du cadmium.....	17
Figure 9 : Distribution du taux de croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis du cobalt et du cadmium.....	17

Liste des tableaux

Tableaux	Pages
Tableau 1 : Principaux caractères d' <i>Escherichia coli</i>	07
Tableau 2 : Principaux caractères de <i>Staphylococcus aureus</i>	08
Tableau 3 : Principaux caractères de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	09
Tableau 4 : Compositions des milieux de culture	12
Tableau 5 : Concentrations minimales inhibitrices du Cobalt et du Cadmium sur les souches bactériennes.....	18
Tableau 6 : Concentrations minimales inhibitrices d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis du Cobalt	19
Tableau 7 : Concentrations minimales inhibitrices d' <i>Escherichia coli</i> vis-à-vis du cadmium.....	20
Tableau 8 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis du cobalt..	21
Tableau 9 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Staphylococcus aureus</i> vis-à-vis du cadmium.....	22
Tableau 10 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis du cobalt	23
Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vis-à-vis du cadmium.....	24
Tableau 12 : Capacité de tolérance bactérienne aux différentes concentrations du cobalt.....	25
Tableau 13 : Capacité de tolérance bactérienne aux différentes concentrations du cadmium	25

Liste des abréviations

µg : Microgramme.

µl : Microlitre.

ATCC: American Type Culture Collection.

ATP: Adénosine-Tri-Phosphate.

Cd: Cadmium.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

Da : Daltons.

ETM : Eléments Trace Métalliques.

GN: Gélose Nutritive.

Hg: mercure.

mg: Milligramme.

MH : Mueller Hinton.

MIT: Metal Inorganic Transport.

ml : Millilitre.

MT : Méthallothioneine.

ORL : Oto-Rhino-Laryngologie.

Pb : Plomb.

PM: Poids Moléculaire.

UFC : Unité Formant Colonie.

Z : Nombre de protons du noyau d'un atome.

Introduction

Introduction

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 chaînes 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 provoquent divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence (**Morozzi et al., 1982**), inhibition des activités enzymatiques (**Nweke et al., 2007**), altération de la structure de l'ADN (**Bruins et al., 2000; Rathnayake et al., 2009**), 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, 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.

Synthèse
Bibliographique

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 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'élevage 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 leur concentration 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 connu pour la cellule, c'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg) et du cadmium (Cd) (Chiffolleau *et al.*, 2004).

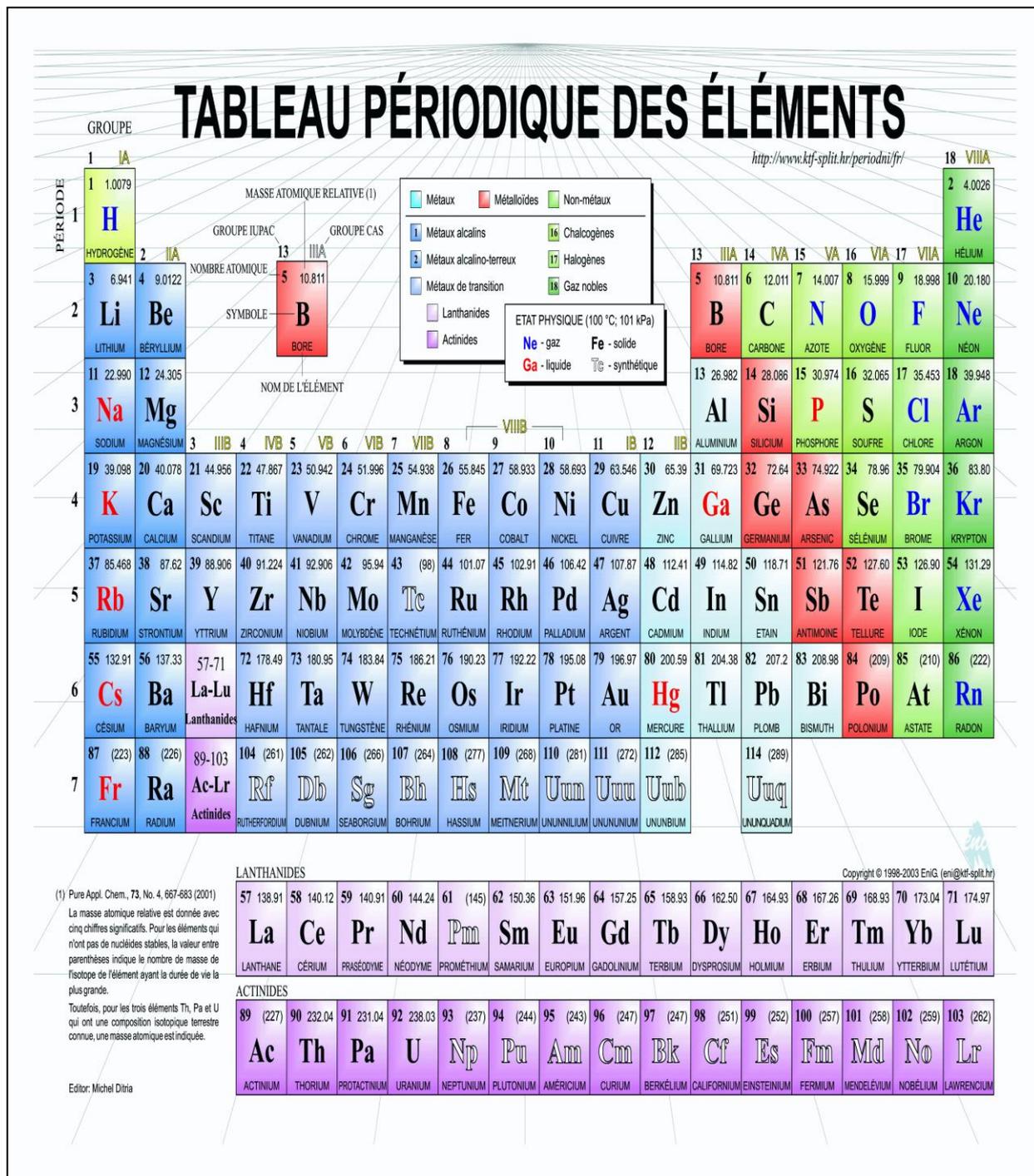


Figure 1 : Tableau périodique des éléments [03].

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**).

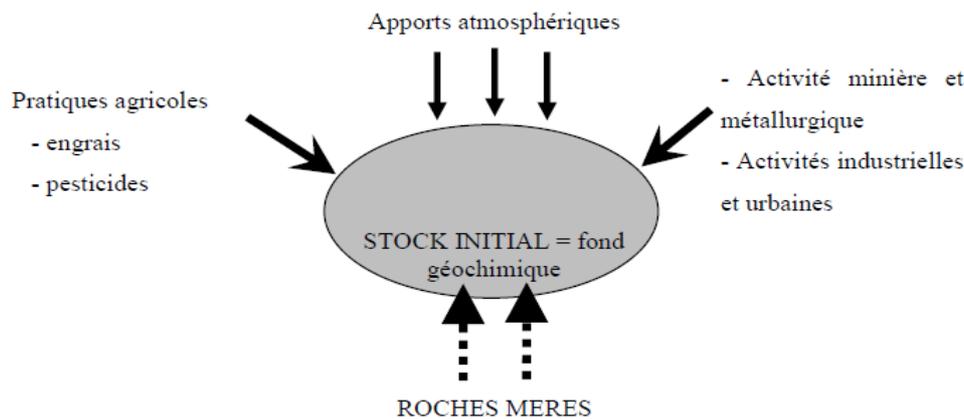


Figure 2: Origine des métaux lourds (**Robert et Juste, 1999**).

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 limitons à décrire seulement 2 métaux : le cobalt et le cadmium.

1.7.1. Cadmium

Le cadmium (Cd) est un métal de transition purement toxique pour la cellule, de solubilité élevée ce qui fait de lui l'un des métaux lourds les plus dangereux après le mercure (**Nies, 1999**). Il est naturellement présent à l'état de traces dans les roches superficielles de l'écorce terrestre

(Bendjama, 2007). Les usages du cadmium se situent principalement en électricité, électronique, en métallurgie et dans l'industrie des matières plastiques «stabilisateur des polymères» **(Ramade, 1992)**. Il présente des caractéristiques chimiques proches de celles du calcium ce qui facilite ainsi sa pénétration dans les organismes **(Borchardt, 1985)**.

Le cadmium est rencontré en milieu aquatique sous diverses formes physiques (dissoute ou colloïdale) et chimiques (minérale ou organique), la variation des caractères physico-chimiques du milieu peuvent gérer sa transformation dans l'environnement **(Gonzalez et al., 1999)**. Contrairement à de nombreux métaux, le cadmium n'a aucun rôle métabolique connu et ne semble pas être biologiquement essentiel ou bénéfique au métabolisme des êtres vivants **(Chiffolleau et al., 2001)**.

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 insaturées **(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, qui 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 à la formation de 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 perturbations de la reproduction et l'augmentation ou la baisse du taux des 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 utiliserons 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 d'*Escherichia coli* sont responsable d'infections urinaires, intestinales, génitales, hépatobiliaires, de septicémies et de méningites néonatales [4].

2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est connue sous le nom de Staphylocoque doré, c'est la souche 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 : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Staphylococcaceae*

Genre : *Staphylococcus*

Espèces : *Staphylococcus aureus*

2.2.2. Habitat

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 amas
Coloration de Gram	Bactérie à Gram +
Mobilité	Immobile
Type respiratoire	Aérobie facultatif
Oxydase	+
Catalase	+
Coagulase	+
Température de croissance	Comprise entre 10-45°C

2.2.4. Pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus peut être responsable d'infections cutanées (impétigo, furoncles...), d'infection de la sphère ORL (sinusites, otite...), de septicémies redoutables et d'infection nosocomiales (**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	Mobiles, à ciliature polaire monotriche
Type respiratoire	Aérobies stricts
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. Métallo résistance bactériennes

3.1. Notion de résistance et 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 à l'entrée des métaux lourds à l'intérieur des cellules. Le premier est un système passif constitutif de la cellule, il est 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 bactériennes aux métaux lourds

La résistance bactérienne aux ions métalliques 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 :

- **Modifications 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 (**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 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 un analogue du 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 des 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**).

Matériel
et
Méthodes

1. Métaux lourds

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

- ☒ Cobalt chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), $\text{PM}=129.83\text{g/mol}$.
- ☒ Cadmium chloride (CdCl_2), $\text{PM} = 183.31\text{g/mol}$.

2. Souches bactériennes

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

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

Les souches bactériennes choisies 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 : gélose nutritive (GN), gélose Chapman, gélose Muller Hinton (MH), et le bouillon nutritif. La composition des milieux de culture est indiquée dans le tableau 4.

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 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 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 bactérienne 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.

Résultats
et
Discussion

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 de l'espèce *Escherichia coli* en absence de métaux. Cependant elle diminue progressivement avec la concentration jusqu'à 0%. Il apparait que le cobalt soit moins toxique pour le genre *Escherichia* comparé au cadmium, où une croissance importante a été retrouvée jusqu'à la concentration 200µg/ml. Cependant pour le cadmium au-delà de 50µg/ml aucune croissance n'a pu être retrouvée après 24h d'incubation.

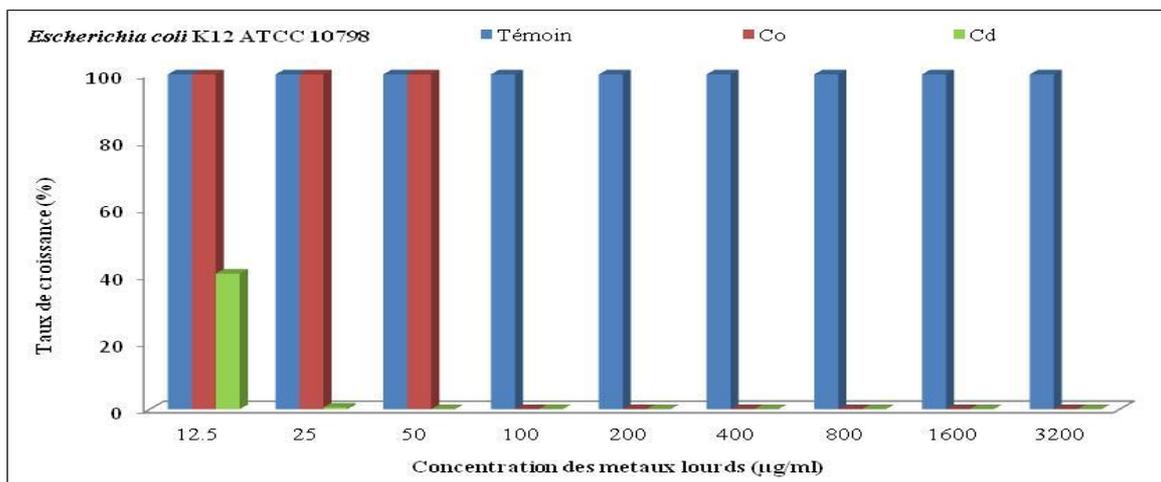


Figure 3 : Distribution du taux de croissance d'*Escherichia coli* K12 ATCC 10798 vis-à-vis du cobalt et du cadmium.

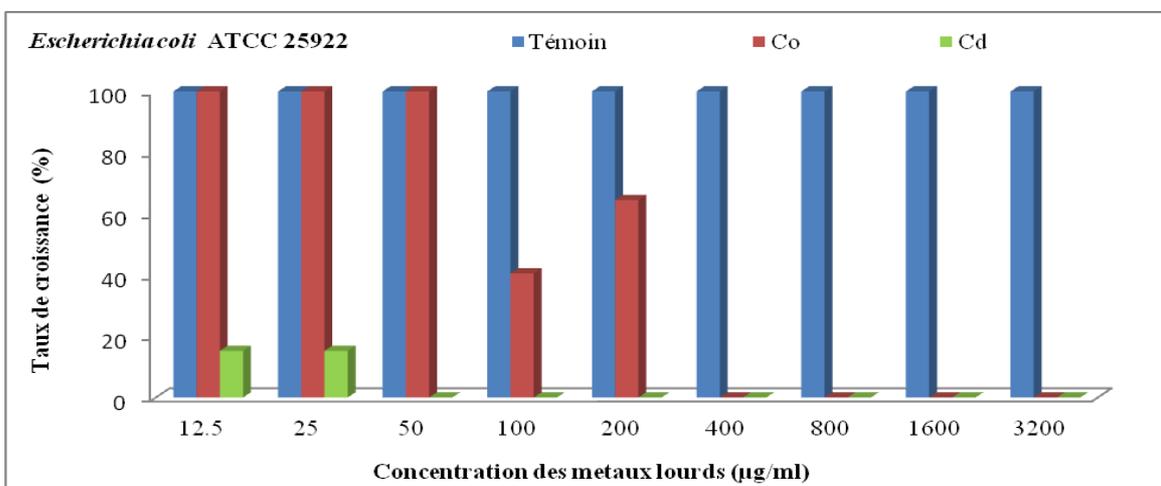


Figure 4 : Distribution du taux de croissance d'*Escherichia coli* ATCC 25922 vis-à-vis du cobalt et du cadmium.

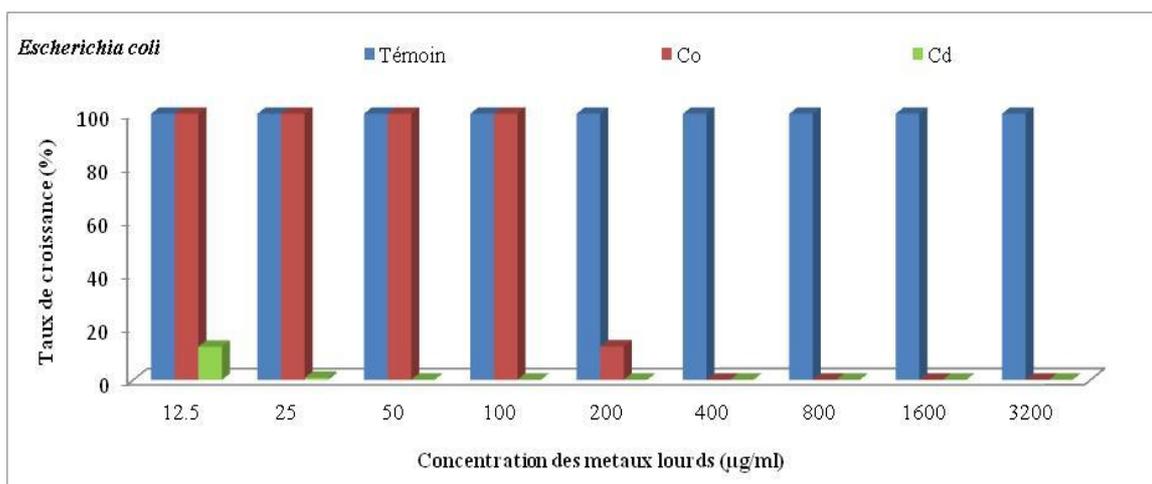


Figure 5 : Distribution du taux de croissance d'*Escherichia coli* vis-à-vis du cobalt et du cadmium.

1.2. *Staphylococcus aureus*

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

La réponse des espèces bactériennes face aux métaux lourds apparaît très hétérogène, les résultats obtenus ont indiqué que la croissance est de 100% en absence de métaux. Cependant elle diminue progressivement par apport à la concentration jusqu'à 0%.

Il apparaît que la souche prélevée à partir de l'oued Messida supporte mieux le cobalt et le cadmium comparé à la souche de référence *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et la souche témoin *Escherichia coli* K12 ATCC 10798. Cela peut être expliqué par la composition de la paroi (bactérie à Gram positive), selon **Mahler et al., (1986)** les bactéries à Gram positif tolère mieux métaux lourds.

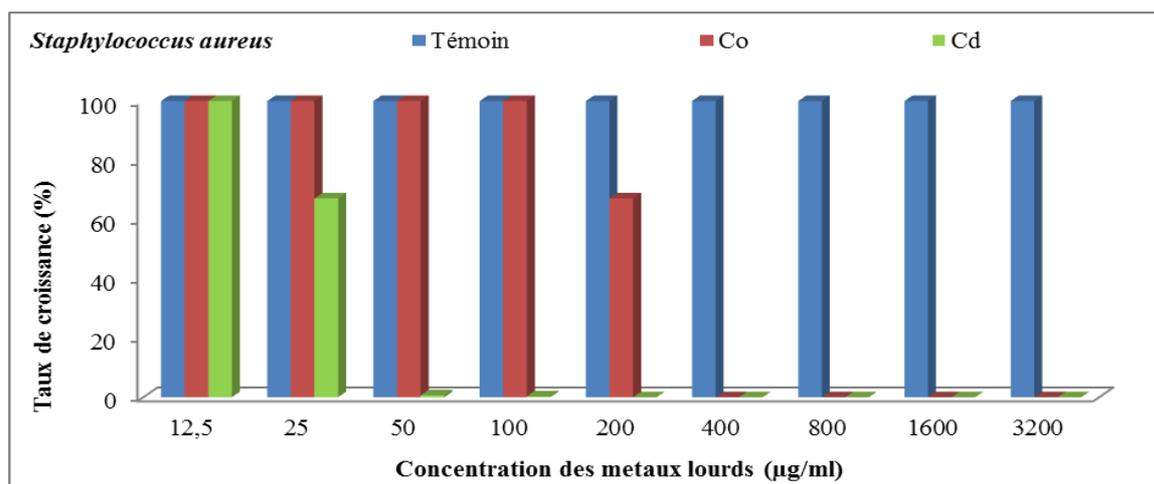


Figure 6 : Distribution du taux de croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 vis-à-vis du cobalt et du cadmium.

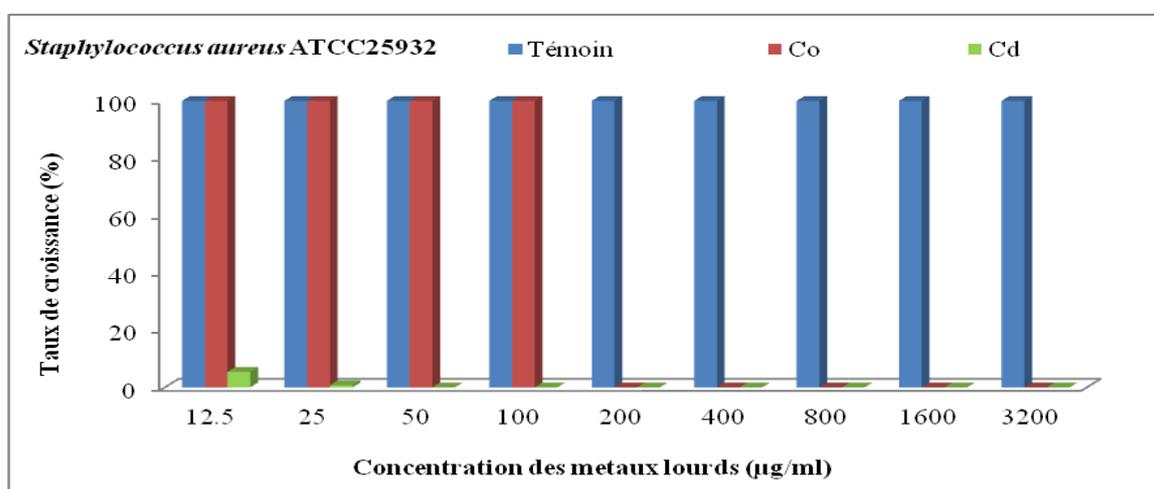


Figure 7 : Distribution du taux de croissance de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis du cobalt et du cadmium.

1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats obtenus du taux de croissance de la souche *Pseudomonas aeruginosa* et la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 sont représentés dans la figure 8 pour la souche de référence et la figure 9 pour la souche isolé à partir de l'oued Messida.

Les résultats obtenus ont indiqué que la croissance est de 100% en absence de métaux pour les 2 bactéries, cependant elle diminue progressivement avec la concentration jusqu'à 0%. Le genre *Pseudomonas* apparaît mieux tolérant vis-à-vis du cobalt que la souche témoin *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

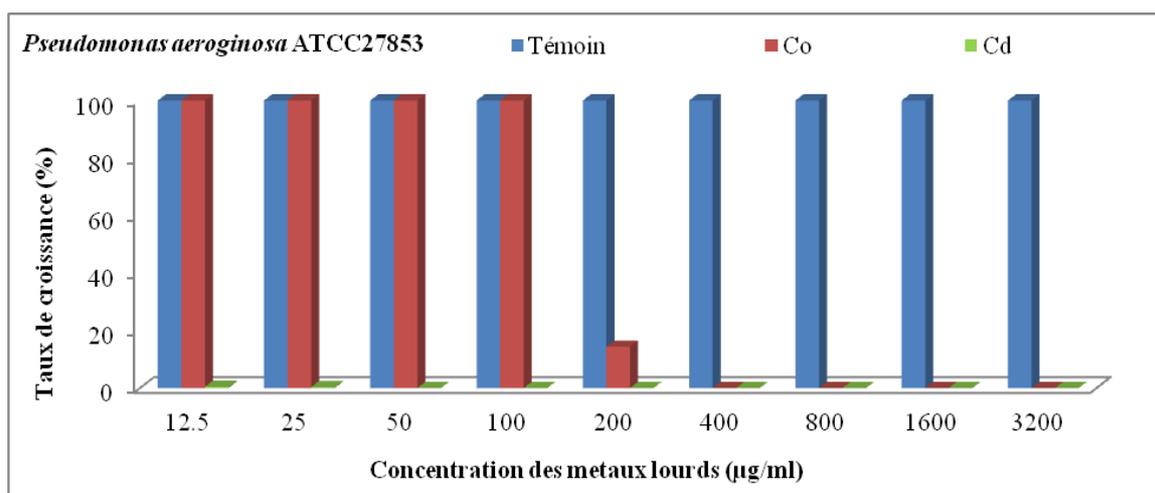


Figure 8 : Distribution du taux de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 vis-à-vis du cobalt et du cadmium.

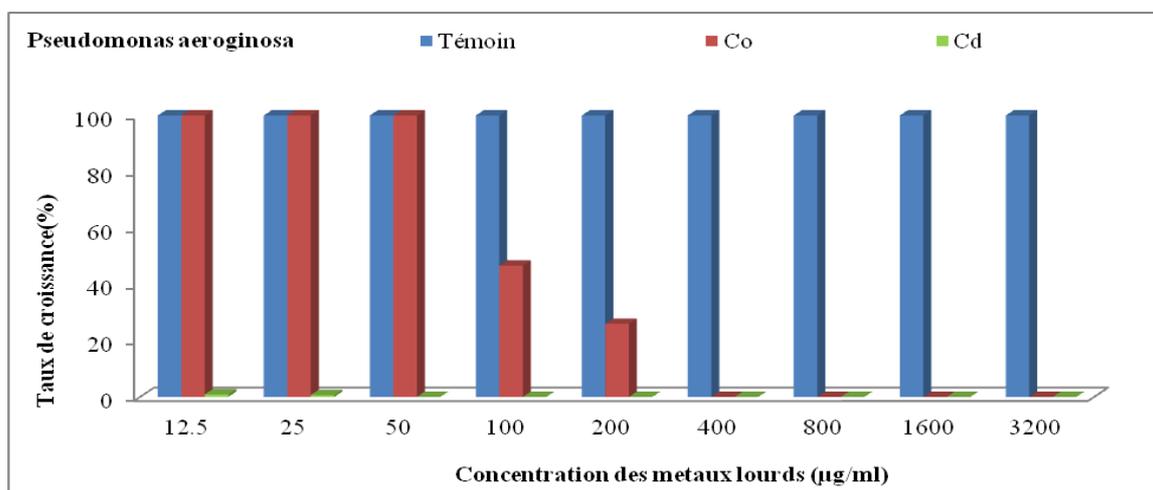


Figure 9 : Distribution du taux de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis du cobalt et du cadmium.

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 05, ainsi que les photos présent dans les tableaux 06 et 07 pour les 3 souches d'*Escherichia coli*, le tableau 08 et 09 pour les deux souches de *Staphylococcus aureus* et le tableau 10 et 11 pour les deux souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 05 : Concentrations minimales inhibitrices du Cobalt et du Cadmium sur les souches bactériennes.

Souches bactériennes	CMI (µg/ml)	
	Co	Cd
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798	50 < CMI < 100	25 < CMI < 50
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	200 < CMI < 400	25 < CMI < 50
<i>Escherichia coli</i>	200 < CMI < 400	25 < CMI < 50
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	200 < CMI < 400	25 < CMI < 50
<i>Staphylococcus aureus</i>	200 < CMI < 400	25 < CMI < 50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	200 < CMI < 400	25 < CMI < 50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200 < CMI < 400	25 < CMI < 50

Selon les résultats obtenus, la CMI de la souche de référence *Escherichia coli* K12 était situées entre 50-100 µg/ml et 25-50 µg/ml pour le cobalt et le cadmium respectivement. Cependant pour le reste des souches : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Pseudomonas aeruginosa*, la CMI était identique avec une valeur comprise entre 200 - 400 µg/ml pour le cobalt et 25 - 50 µg/ml pour le cadmium.

L'utilisation de la souche *E.coli* K12 a permis de distinguer entre les souches résistantes et sensibles (Sabri *et al.*, 2006). La CMI de la souche témoin *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 est inférieure à celle des autres souches pour le cobalt. Pour le cadmium la CMI a été comprise entre 25-50µg/ml pour toutes les souches, cependant cela ne veut pas dire qu'elles sont égaux.

En se basant sur les travaux de fin d'études de master II réalisé par Mme Benhalima dans les années précédentes sur la résistance bactérienne aux antibiotiques des souches isolées à partir de l'oued Messida, nous pouvons penser que ces souches sont aussi résistantes aux métaux lourds.

Tableau 06 : Concentrations minimales inhibitrices d'*Escherichia coli* vis-à-vis du Cobalt.

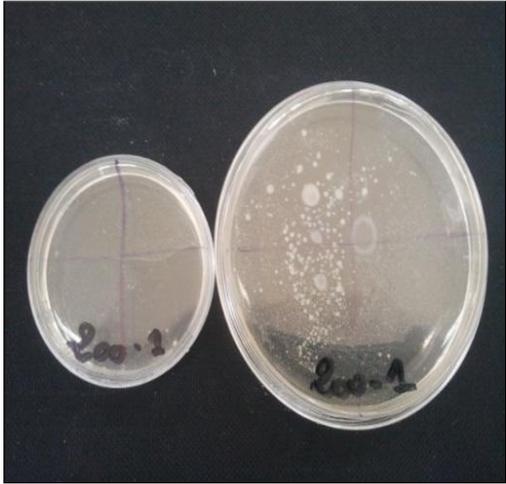
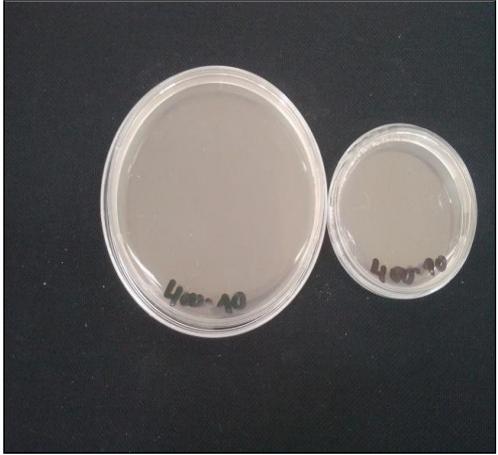
Cobalt		
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798	50µg/ml	100µg/ml
		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	200µg/ml	400µg/ml
		
<i>Escherichia coli</i>	200µg/ml	400µg/ml
		

Tableau 07 : Concentrations minimales inhibitrices d'*Escherichia coli* vis-à-vis du cadmium.

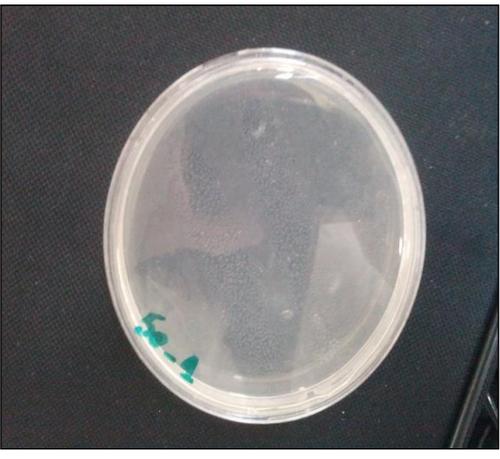
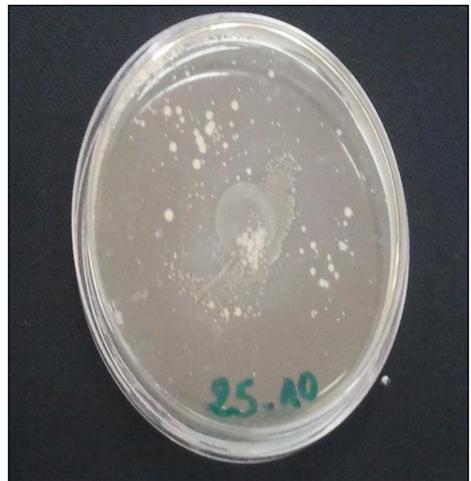
Cadmium		
	25µg/ml	50µg/ml
<i>Escherichia coli</i> K12 ATCC 10798		
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		
<i>Escherichia coli</i>		

Tableau 08: Concentrations minimales inhibitrices de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis du cobalt.

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

Tableau 09: Concentrations minimales inhibitrices de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis du cadmium.

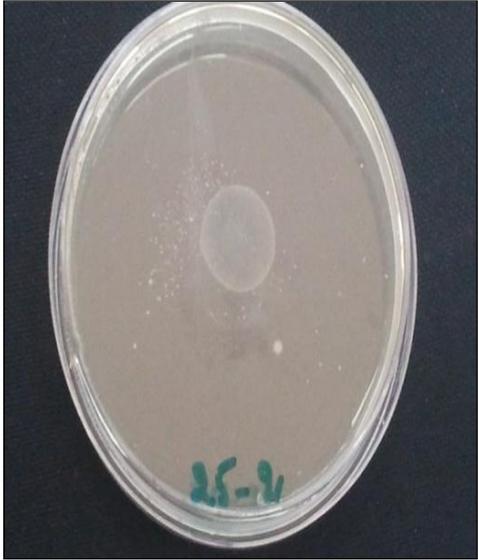
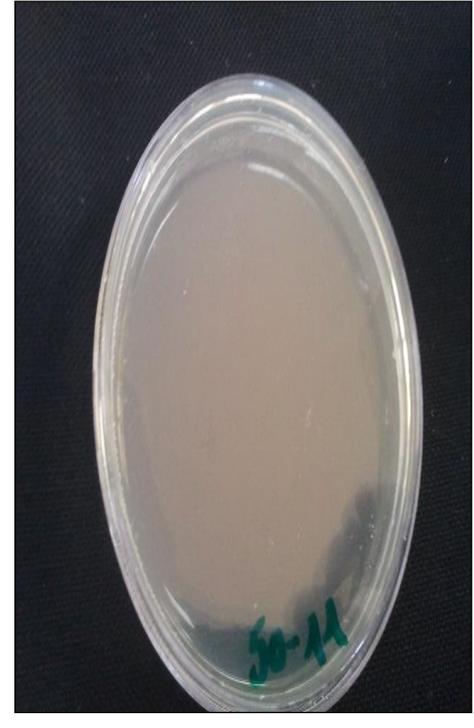
	Cadmium	
	25 µg/ml	50µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		
<i>Staphylococcus aureus</i>		

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

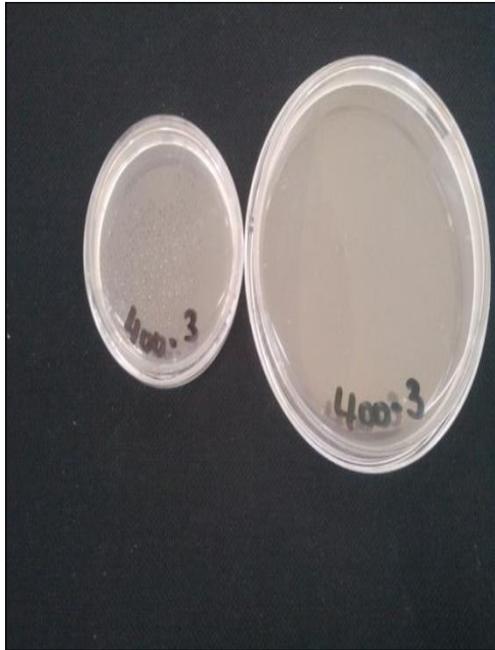
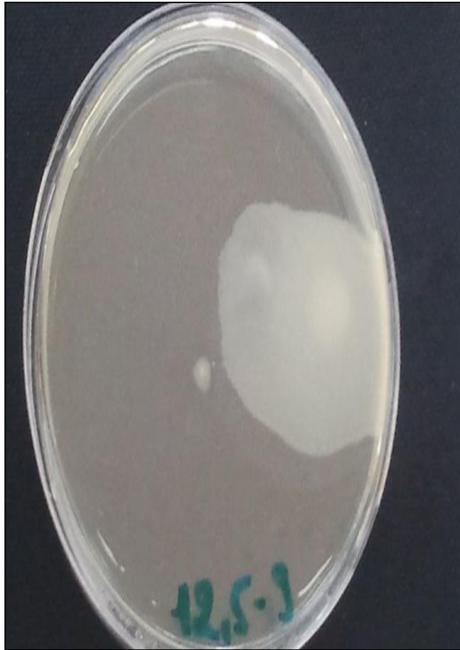
Cobalt		
	200µg/ml	400µg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices de *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis du cadmium.

Cadmium		
	25µg/ml	50µg/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		

3. Tolérance bactérienne

Les résultats obtenus après une série d'incubation (tous les 2 jours durant une semaine) sont représentés dans le tableau 12 pour le cobalt et le tableau 13 pour le cadmium.

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

Cadmium	12.5µg/ml			25µg/ml			50µg/ml			< 100µg/ml		
	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h	24h	72h	120h
<i>E.coli K12</i>	165	**	**	2	6	36	0	38	62	0	0	13
<i>E.coli ATCC 25922</i>	75	**	**	3	202	234	0	45	50	0	0	12
<i>E.coli</i>	98	*	**	5	280	164	0	2	2	0	0	0
<i>S. aureus ATCC 25923</i>	16	**	**	2	148	140	0	39	45	0	0	0
<i>S.aureus</i>	1	1	*	60	256	308	0	40	50	0	0	12
<i>P. aeruginosa ATCC 27853</i>	3	*	*	2	40	64	0	1	8	0	0	0
<i>P.aeruginosa</i>	7	*	*	4	*	*	0	48	73	0	0	0

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 cadmium après 24h d'incubation, des colonies bactériennes apparaissent. Ces dernières peuvent être qualifiées de mutant ou de bactérie résistante, c'est un mode d'adaptation des cellules

bactérienne pour éviter les stress métalliques. Cela a été déjà observé par divers travaux réalisés par **Patel *et al.*, (2006)** ; **Oves *et al.*, (2013)** ; **Chien *et al.*, (2013)**.

Conclusion

Conclusion

Au cours de ce travail, nous avons essayé de comprendre comment les microorganismes réagissent à un environnement pollué par le cadmium et le cobalt en étudiant certaines de leurs réponses face à la toxicité métallique, d'après les résultats obtenues on peut conclure que :

- Les souches isolées à partir de l'oued Messida sont plus résistantes, ces bactéries tolèrent l'effet du cadmium et du cobalt mieux que les souches de référence.
- L'action du métal varié d'une souche à l'autre, il apparaît que la souche de référence *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 est plus sensible à l'action du cobalt.
- Toutes les souches bactériennes ont présenté la même CMI vis-à-vis du cadmium (25-50µg/ml) toute fois cela ne veut pas dire qu'elles sont égales.
- Certaines souches bactériennes ont toléré des concentrations élevées en métaux afin d'assurer la survie cellulaire.

On pense qu'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*

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.

Avril. J.L., François .D., Henry. M. et Henry .D. (2000). Bactériologie clinique. 3^{ème} édition. Edition Ellipses-Marketing. 602 p.

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

Baker .A. J. M. et Walker .P.L. (1990). Ecophysiology of meta-uptake by tolerant plants. *In: Heavy Metal Tolerance in Plant: Evolutionary Aspect.* A.J. Shaw Edition. CRC Press. Boca Rotan. Florida. 155-177.

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. 54 p.

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. 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.

Borchardt .T. (1985). Relationship between carbon and cadmium uptake in *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 85: 233-244.

Bourrelrier .P.H. et Berthelin .J. (1998). Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion. Académie des Sciences. Rapport n°42. Edition Lavoisier. Paris. 440 p.

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). Rapport d'étude : Eléments traces métalliques : Guide méthodologique : Recommandations pour la modélisation des transferts d'éléments trace métalliques dans les sols et les eaux souterraines. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. 138p.

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

Chien .C.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.

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

Chiffolleau. J.F., Auger .D., Chartier. E., Michel. P., Truquet . I., Ficht .A., Gonzalez .J.N. et Romana .L.A. (2001). Spatiotemporel changes in cadmium in the Sein estuary (France). *Estuaries*. 24(6B):1029-1040.

Clave .D. (2012). « Fiche technique Bactériologie 123 : *Escherichia coli* ». CTCB « Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique ». 3 p.

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.

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

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. Éditions Tec et Doc. Lavoisier. 542 p.

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. (1984). Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 12^{ème} édition. Edition Crouan et Roques. Paris. 401 p.

Frank .R.K., Shida .I. et Suda .P. (1976). Metals in agricultural soils of Ontario. Revue canadienne de la science du sol. 56 : 181-196.

Gatti .D., Mitra .B. et Rosen .B.P. (2000). Mini review: *Escherichia coli* soft metal ion translocating ATPases. J. Bio. Chem. 275(44): 34009-34012.

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.

Gonzalez. J.L., Chiffolleau .J.F., Miramand .P., et Thouvenin .B. (1999). Le cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire. Programme scientifique Seine Aval. Editions Ifremer. France. 31 p.

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. 248 p.

Kabata-Pendias .A. et Pendias .H. (2001). Trace elements in soils and plants. 3^{ème} édition. CRC Press, Boca Raton. London. 413p.

Kozdrój .J. et van Elsas .J.D. (2001). Structural diversity of microorganisms 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 : Phase III. p 9.

Letendre .J. (2009). Effets combinés de l'intertidalité le et de la contamination chimique chez *Mytilus edulis* : Mécanismes enzymatiques antioxydants et approche protéinique. Thèse de doctorat. Université du Havre. 343 p.

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 Natl Acad Sci USA. 94(1): 42-7.

Loué .A. (1993). Oligo-éléments en agriculture. 2^{ème} édition. Editions Nathan. Paris. 577p.

Mahler .C.E., Vincent .C.A. et Parmar .D.G. (1986). Learning from errors in nursing practice. Journal of advanced Nursing. 26: 111-119.

Mercer .D.K., Scott .K.P., Melville .C.M., Glover .L.A. et Flint .H.J. (2001). Transformation of an oral bacterium via chromosomal integration of free DNA in the presence of human saliva. FEMS Microbiologie. 25: 163-167.

Mergeay .M., Nies .D., Schlegel .H.G., Gerits .J., Charles .P. et Van Gijsegem .F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. J. Bacteriol. 3: 691–698.

Morozzi .G., Cienci .G. et Caldini .G. (1982). The tolerance of an Environmental Strain of *Escherichia coli* to Some Heavy Metals. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 176:189: 55-62.

Nelson .N. (1999). Metal ion transporters and homeostasis . The EMBO Journal. 18(16): 4361-71.

Nezengue .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.

Nies .D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol .51(6):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.

Odermatt .A., Suter .H.K., Rapf .R. et Solioz .M. (1993). Primary structure of two type P-ATPases involved in copper homeostasis in *Enterococcus*. J. Biol. chem. 268:12775-12779.

Oves .M., Saghir-Khan .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., Tremblay .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. 26 p.

Ramade .F.(1992). Précis d'écotoxicologie. Collection d'écologie 22. Edition Masson.Paris.300p.

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). Enjeux environnementaux et industriels : Dynamique des éléments traces dans l'écosystème sol, in :Spéciation des métaux dans le sol. Les Cahiers des Clubs CRIN. Paris. France. 15–37.

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. 249 p.

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^{eme} edition, Paris. 904p.

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

Siddiqui .R.A., Benthin .K. et Schlegel .H.G. (1989). Cloning of pMOL28- encoded nickel resistance genes and expression of the genes in *Alcaligenes eutrophus* and *Pseudomonas spp.* J. Bacteriol.171: 5071– 5078.

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

Taghavi .S., Mergeay .M. et van der Lelie .D. (1997). Genetics and physical map of the *Alcaligenes eutrophus* CH34 megaplasmid pMOL28 and its derivative pMOL50 obtained after temperature induced mutagenesis and mortality. Plasmid. 37: 22–34.

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. 1^{ère} édition . Edition Elsevier. Amsterdam. 481p.

Wright .D.A. et Welbourn .P. (2002). Environmental Toxicology. 1^{er} édition Cambridge environmental Chemistry Series (Livre 11).Cambridge University Press. 658p.

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).

[03] <http://bonasavoir.perso.sfr.fr/tableau%20periodique.htm>. Consulter le: (10/05/2015).

[04] <http://www.globepharma.org/article-escherichia-coli-en-cause-76899581.html>. Consulter le (26/05/2015).

Résumés

Résumé

Dans le cadre d'une étude comparative entre l'effet de métaux lourds sur deux types de souches bactériennes (souches de références et des souches prélevées à partir de l'oued Messida) nous pouvons estimer que :

Les souches bactériennes ont été plus sensibles aux concentrations excessives du cadmium par rapport au cobalt, cette sensibilité se manifeste par la diminution de nombre des colonies sur milieu de culture.

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

Mots clés : Pollution métalliques - tolérance bactérienne -cadmium – cobalt- Oued Messida.

Abstract

In the context of a comparative study between the effect of heavy metals on two types of bacterial strains (reference strains and of strains collected from the oued Messida) we can estimate that:

The strains were more sensitive to excessive concentrations of cadmium intake cobalt, this sensitivity is manifested by the decrease in number of colonies on the culture medium.

Also, the strains collected from the oued Messida have presented a slight resistance to metals compared to the strains witness *Escherichia coli* K12 ATCC 10798.

Keywords: Metallic contamination - tolerance bacterial-cadmium - cobalt- Oued Messida.

المخلص

في اطار دراسة مقارنة لتاثير المعادن الثقيلة على نوعين من السلالات البكتيرية (سلالات استخدمت كمرجع و اخرى تم جمعها من واد مسيدة) وجدنا ان :

كل السلالات كانت حساسة جدا لتاثير التراكيز المتزايدة لمعدن الكاديوم اكثر منها بالنسبة لمعدن تمثلت ظهرت هذه الحساسية في تناقص عدد المستعمرات البكتيرية في وسط الزرع.

كما وجدنا ايضا ان البكتيريا المعزولة من واد مسيدة اظهرت مقاومة طفيفة لتاثير المعادن مقارنة بالفصيلة المرجع

ايشيريشيا القولون K12 ATCC 10798.

الكلمات المفتاحية : التلوث المعدني- الكاديوم-التسامح البكتيري- الكوبالت- واد مسيدة