

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: science de la nature et de la vie

Spécialité/Option: biologie moléculaire et cellulaire : biologie moléculaire des procaryotes

Département: de biologie

Thème

Isolement des bactéries du sol résistantes aux métaux lourds

Présenté par :

-Berkani Nihad.

-Khelaifia Massouda.

-Mebarki F. Zahra.

Devant la commission composée de :

-Torche A (MCB)

-Benbelkacem S (MAA)

-Djamaa F (MAB)

-Ayed H (MAA)

-Drif F (MCB)

-AthammiaM (MAB)

Président

Encadreur

Examineur

Membre

Membre

Membre

Université de Guelma

Juin 2017

Remerciement :

*Nous tenons à remercier vivement notre encadreur **Benbelkacem Sofia** enseignante à l'université **8mai1945 de Guelma** pour les précieux conseils qu'elle nous a apportés durant la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions également **Mme Torche A. MCB** à l'université **8mai 1945de Guelma** d'avoir accepté de présider le jury de ce travail.*

*Et **Mme djamaa F.MBA** à l'université **8mai 1945de Guelma** pour avoir examiné et évalué ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent également au membre de la commission du jury composé des enseignants : **Mme Drif F. MCB, Mr Athmnia M. MAB, et Mme Ayed H. MAA** pour l'évaluation de ce travail.*

Nous exprimons également notre gratitude à tous les enseignants qui ont corroboré à notre formation du primaire jusqu'à l'université.

*Nous remercions vont enfin à l'intention de tous ceux qui de près ou de loin n'ont ménagé aucun effort pour la réalisation de ce travail, dont notre camarade **Boudjahem Wail**.*

Un grand merci à nos parents, pour tout l'Amour et le soutien qu'ils nous ont apporté à tous les moments de notre vie. Ils ont toujours été une source de tendresse et un modèle de travail, de sagesse et humilité.

Dédicace



A ma mère, en témoignage d'un grand respect et ses immenses sacrifices qu'elle a consentis pour mon éducation et mon bien être. Elle a cru en moi et m'a donné tous les moyens pour arriver jusqu'ici. Elle m'a appris à ne pas me contenter du minimum mais à viser l'Excellence. Que Dieu vous garde et vous procure longévité et santé.



A mon père que Dieu aie son âme et l'accueille en sa sainte miséricorde.



A mon mari et ses parents, ses sœurs et son frère. Et pour mon petit-fils.



A mon deuxième père et mon plus beau médecin au monde dr faci Jhon .



A mes sœurs dr Mahdia et son mari dr Ali et ces Enfants Hussien et Zienb et Hasssan a la plus belle sœur dr Sameh et pour ma sœurs dr Kamila et son mari Salim et sa petite fille et en fin pour mon frère Walid et sa femme et ces enfants Akrem et Dikra qui étaient et qui restent pour moi une source de reconnaissance et d'espoir. Qu'ils trouvent ici l'expression de mon amour fraternel.



A ma famille.



A mes amies et amis.



A tous ceux qui me sont chers.



F. Zahra.

Dédicace

Avec l'aide d'Allah le tout puissant, j'ai pu achever ce modeste travail que je dédie :

A mes très chers parents pour toutes les privations et sacrifices consentis, pour faire de moi une femme modèle.

A mes chères sœurs Lamia, Roubila, et leur filles Marawa, Loubna, Zaineb, et leur fils Oussama.

A mes chères frères Ghani, Zoubir. Et n'oublie pas leur princesses Randa et Manel.

A mon mari Fayçal pour ses encouragements.

A mes chères amies Majda, Bouchra, Amina, Latifa, Ilhem et Yassamine.

A ma chérie Nihad qui m'a accompagnée tout au long de ces cinq dernières années et pour Tous les moments que nous avons partagés.

A toute personne qui m'aime

A toute personne que j'aime

A tous ceux qui cherchent le savoir

Massouda

Dédicace

Premièrement je remercie beaucoup au dieu qui m'offre cette réussite.

A ceux qui m'ont indiqué la bonne voie, À ceux qui attendent patiemment le fruit de leur éducation....

A la plus belle perle au monde...ma tendre mère pour vos encouragements vos conseils et vos sacrifices : je dédie à vos pleurs à vos sourires mes plus belles pensées.....

Que Dieu tout puissant vous garde et vous procure santé bonheur et longue vie.

A mon cher père

Tes conseils m'ont suivi et m'ont permis d'atteindre le bout du chemin .Sois fier de moi aujourd'hui et vois à travers ce travail mon amour s'insère et ma gratitude profonde

Au plus cher au monde, mon frère AYMEN.

En lui souhaitant de réussir et tout le bonheur.

A vous grande mère et grand-père pour vos prières et vos amours.

A mes tantes : Fahima Fadila Souad Meriam Chahra Radia Lamia et Alima.

A mes ancêtres: Mahdi et Fouaz.

A mes amies : Madjda Bouchra Latifa Amina Lilia Khawla et Yassamine

A ma chérie Wafa qui m'a accompagnée tout au long de ces cinq dernières années et pour tous les moments que nous avons partagés

A mes professeurs pour leurs efforts afin de nous assurer une formation solide.

A toute personne qui m'a aidé à franchir un horizon dans ma vie.

A toute personne qui m'a aidé de près ou de loin pour réaliser ce modeste travail.

NIHAD

Table des matières

Résumé	I
Abstract	II
Liste des tableaux	III
Liste des figures	IV
Listes d'abréviations	V
Glossaire	VI
Introduction	1

Chapitre I : le sol et les bactéries

1-Diversité microbienne du sol.....	3
2-Structuration et stabilité du sol.....	3
3-Rhizosphère	4
4-Rhizodépôts.....	5
4.1 Exsudats.....	5
4.2 Substances sécrétées	5
4.3 Lysats	5
4.4 Gaz.....	5
5-Les rhizobactéries	7
5.1 Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes.....	7
5.1.1 Effets directs	7
5.1.2 Effets indirects	9

Chapitre II : les légumineuses

1- Généralités	11
2-La nodulation chez les légumineuses	13
3- Intérêt agronomique des légumineuses	13
4- Intérêts scientifiques des légumineuses	13
5-Intérêt alimentaire des légumineuses	14

6-le petit pois (<i>Pisumsativum L</i>).....	14
6.1 Historique de la plante	14
6.2 Morphologie de la plante.....	15
6.2.1 Racines.....	15
6.2.2 Tige, feuilles et ramifications.....	15
6.2.3 Inflorescences et fructifications.....	15

Chapitre III : les métaux lourds

1-Généralités sur les métaux lourds.....	16
1.1 L'origine des ETM (Elément Trace Métallique)	17
1.1.1 Les sources naturelles	17
1.1.2 Les sources anthropiques	18
1.2 Mobilité et disponibilité des métaux lourds dans le sol.....	20
1.2.1 La teneur en argile.....	21
1.2.2 Le Ph	21
1.2.3 Le potentiel redox (Eh)	21
1.2.4 L'activité biologique.....	22
1.3 Principaux ETM.....	22
1.3.1 L'arsenic	22
1.3.2 Le cadmium	23
1.3.3 Le cuivre.....	23
1.3.4 Le plomb.....	24
1.3.5 Le zinc	25
2-Les métaux lourds dans la plante	25
2.1 la stratégie d'évitement.....	26
2.2 la stratégie de tolérance	26
3- Les métaux lourds et les bactéries	26
3.1 Effets des métaux lourds sur microorganisme du sol	26
3.1.1 Biomasse.....	26
3.1.2 Structure de la communauté microbienne	27

3.1.3	Activité enzymatique	27
3.2	Interaction entre les microorganismes et les métaux lourds	28
3.3	Mécanismes de résistance des bactéries aux ETM.....	28
3.3.1	La bioaccumulation	29
3.3.2	La complexation	30
3.3.3	La précipitation	30
3.3.4	La Conversion enzymatique.....	30
3.3.5	Les systèmes d'efflux.....	31
3.3.6	Les systèmes intégrés	31
3.4	Bactérie résistantes aux métaux lourds.....	33
3.4.1	<i>Cupriavidusmetallidurans</i> CH34:Un modèle de tolérance aux métaux lourds	33
3.4.2	<i>Staphylococcus Xylosu</i>	33
3.4.3	<i>Serratiamarcescens</i>	34
3.4.4	<i>Micrococcusluteus</i>	34

Chapitre IV : Test et technique d'isolement des rhizobacteries résistantes aux métaux lourds

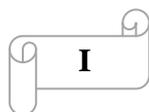
1-	Différentes approche méthodologique	36
2-	Identification des colonies bactériennes	36
3-	Production d'Acide Indole Acétique (AIA)	36
4-	Solubilisation des phosphates.....	38
5-	Production de sidérophores	39
	Conclusion générale	40

Références bibliographiques

Résumé :

Cette étude bibliographique consiste à mettre en évidence l'effet des métaux lourds sur l'émergence de populations bactériennes multi-résistantes dans le sol de la rhizosphère de plante légumineuse .De voir l'intérêts des rhizobactéries dans la lutte contre la pollution aux métaux lourds dans le sol et quelques les techniques employés pour l'isolement et l'étude de ses souches.

Mots clés : rhizosphère, sol, rhizobactéries, Métaux lourds, interaction, résistante.



Abstract:

This bibliographic study consists of highlighting the effect of heavy metals on the emergence of multi-resistant bacterial populations in the soil of the rhizosphere of leguminous plant. To see the interests of rhizobacteria in the fight against pollution with heavy metals In the soil and some techniques used for the isolation and study of its strains.

Key words: rhizosphere, soil, rhizobacteria, Heavy metals, interaction, resistant.

Liste des tableaux

Tableau 1 : les sources anthropogéniques de certains métaux lourds spécifiques dans l'environnement.....**19**

Tableau 2 : les taux annuels des émissions.....**20**

Liste des figures

Figure 1 : la structure du sol.....	4
Figure 2 : Diagramme simplifié d'une racine et des rhizodépôts.....	6
Figure 3 : Classification phylogénique des Légumineuses.....	12
Figure 4 : Nodules dus à <i>Rhizobium</i> sur les racines de <i>Serianthes calycina</i>	13
Figure 5 : Le petit pois (<i>Pisum sativum L.</i>).....	14
Figure 6 : Origine des ETM dans le sol.....	18
Figure 7 : schématisation des interactions entre les ETM et les bactéries.....	29
Figure 8 : la structure de l'opéron ars chez <i>Escherichia coli</i> R773.....	32

Liste des abréviations

AIA : l'acide indole acétique.

AND: Acide Désoxyribonucléique.

ASTDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

CAS : Chrome Azurol S.

CEC :capacité d'échange de cations.

Eh : Le potentiel redox.

EPS : Exopolysaccharides.

ETM: Element trace métallique.

ISR: Induced Systemic Resistance.

Lb agar: luria-burtani agar.

LPS: lipopolysaccharides.

PGPR: Plant Growth-Promoting Rhizobacteria.

PVK : milieu phosphate de Pikovskaya

PH: potentiel d'Hydrogène.

1,2 DCB: 1,2 dichlorobenzène.

2,4-DCP: 2,4-dichlorophénol.

Glossaire

Aérobic : Capacité d'un organisme ou microorganisme de se développer dans l'air ambiant et plus particulièrement dans un milieu saturé en oxygène.

Bioremédiation : Ensemble de techniques consistant à augmenter la biodégradation ou la biotransformation de polluants dans l'environnement grâce à des processus biologiques.

Bacille : Bactérie en forme de bâtonnet, par opposition aux coques qui sont sphériques.

Bactérie hétérotrophe : Bactérie capable d'utiliser des molécules organiques comme source de carbone, en opposition aux bactéries autotrophes qui utilisent le dioxyde carbone (CO₂). *E. coli* constitue le seul membre de ce groupe.

Chimolithotrophes : sont des bactéries, qui utilisent soit des molécules organiques, soit des composés minéraux comme source d'énergie et des composés minéraux oxydants (NO₃, O₂...) comme donneurs d'électrons.

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

Métaux lourds : Eléments métalliques ayant une masse volumique supérieure à une certaine valeur (4000- 5000 µg/m³) selon les auteurs.

Les PGPR ou «Plant Growth-Promoting Rhizobacteria » : sont des bactéries qui se développent dans la rhizosphère, et qui ont un effet positif sur la plante, pour ces effet on les considère comme rhizobactéries promotrice de la croissance végétale.

Introduction

Introduction :

Le sol est un compartiment de l'écosystème possédant de multiples fonctions comme : support pour les organismes et microorganismes vivants, réservoir de matière organique et minérale, lieu de transformations, système épurateur, régulateur des flux et des échanges dans les cycles biogéochimiques (cycle de l'azote, du carbone...) (Gobat et *al.*, 1998). De nombreux organismes participent à la réalisation de ces fonctions. Le sol est un remarquable réservoir de microorganismes.

Le nombre total de cellules procaryotes vivant dans les sols est estimé à $2,6 \times 10^{29}$ Whitman et al. (1998). Différents types de microorganismes sont représentés dans le sol où ils jouent un rôle crucial dans les cycles biogéochimiques des éléments. En moyenne, on compte 107 bactéries, 105 champignons, 105 protozoaires et 104 algues par gramme de sol sec (Robert et Chenu, 1992). L'importance écologique des bactéries du sol ne se limite pas à leur nombre ou à leur biomasse, même si ces paramètres y contribuent grandement. En effet, leur atout principal réside dans leur grande diversité génétique et fonctionnelle. La diversité bactérienne dans le sol est en effet plus importante que celle des environnements aquatiques (Torsvik et Ovreås, 2002).

Cette diversité est à l'origine d'un très large éventail de propriétés physiologiques mais aussi d'activités métaboliques et de fonctions que les bactéries peuvent accomplir dans le sol. La diversité métabolique couplée à leur imposante biomasse font que les bactéries du sol sont capables de métaboliser tous les composés naturels disponibles mais aussi la majorité des composés d'origine anthropique présents dans le sol, après un délai nécessaire à la mise en place des voies métaboliques.

Les bactéries sont en effet les acteurs principaux des grands processus de transformation de la matière et des flux d'énergie dans le sol. Certaines étapes clé du cycle des éléments ne peuvent d'ailleurs être réalisées que par les bactéries. Leur disparition ne permet donc plus de garantir à long terme la fertilité du sol. C'est pourquoi, l'impact écologique des métaux lourds sur les communautés bactériennes telluriques a fait l'objet de très nombreuses études dans ces dernières années. Il est généralement admis que les microorganismes sont plus sensibles aux métaux lourds que les plantes ou les animaux vivant dans les sols pollués (Giller et al., 1998). Les impacts des métaux lourds sur les communautés microbiennes peuvent être abordés de diverses façons : la densité (colonie

forming units: CFU), la taille, la structure des communautés (génétique et fonctionnelle) et également l'activité enzymatique.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet des métaux lourds à la présence du végétal, sur l'émergence de populations bactériennes multi-résistantes dans le sol.

Le présent travail consisté au début à isoler des bactéries résistantes au plomb qui est un métal lourd des plus toxiques à partir de la rhizosphère d'une plante légumineuse qui est le petit pois a fin de faire ressortir les plus résistantes et de voir l'impacte de ce métal sur leur croissance et le métabolisme des auxines chez ces dernières. Certaines contraintes au laboratoire ont fait que ce travail n'a pas pus être mener à bout, et donc voir sa nature modifiée en une thématique théorique en élargissant l'éventail sur les métaux lourds de façon générale.

Ce projet présente donc l'originalité d'aborder la question des interactions plantes/microorganismes telluriques du sol sous l'action des métaux lourds, et de cet objectif se dégagent deux questions scientifiques majeures:

- (1) Les métaux lourds, ont-t-ils une influence sur la plante?
- (2) La réponse des communautés microbiennes (bactéries) dans un contexte complexe plante /métaux lourds, jouent-t-elles un rôle sur la croissance de la plante ?

On a essayé de répondre à ces interrogations dans ce mémoire qui est articulé autour de 4 chapitres.

Après une introduction :

- Le chapitre I où l'on parle du sol et de la diversité microbienne –la rhizosphère – rhizobactéries et leurs effets sur les plantes et les métaux lourds
- Le deuxième chapitre parle des légumineuses de façon générale et une petite présentation de la plante qui été au début la source d'isolement des bactéries.
- Le troisième chapitre traite l'origine et l'impact des métaux lourds sur l'environnement et les bactéries
- Le quatrième chapitre s'intitules testes et technique d'isolement des rhizobactéries résistantes aux métaux lourds qui résume les techniques employés pour l'isolement des souches de façon générale

En fin une conclusion générale est émise pour traiter des principaux points de ce travail.

Chapitre I:

Le Sol et les Bactéries

1-Diversité microbienne du sol :

Le sol supporte une large proportion de la biodiversité terrestre. Il héberge en effet une grande diversité d'organismes (microorganismes, animaux et végétaux) dont la plupart sont responsables de processus de biotransformation et de transfert des éléments ou des composés. Cette diversité biologique est associée à une importante diversité fonctionnelle et à une grande complexité des interactions écologiques. Ainsi de nombreux processus se déroulant dans le sol sont assurés par des organismes très variés (bactéries, champignons, protozoaires, racines, faune).

Les organismes du sol affectent aussi la productivité végétale, que ce soit de manière directe ou indirecte (modifications des cycles du carbone et des nutriments, de la structure du sol, interactions trophiques et contrôle des parasites et pathogènes). La distribution dans le temps et dans l'espace des processus biologiques n'est ni aléatoire, ni homogène. Les activités des organismes du sol sont concentrées dans des sites généralement associés à la disponibilité en substrats carbonés. C'est ainsi que les habitats microbiens sont associés aux fractions organiques, aux agrégats, à la litière en décomposition, au sol influencé par les vers de terre et au contact étroit des racines (rhizosphère) (Lynch, 1990).

2-Structuration et stabilité du sol :

Le sol est constitué d'agrégats (combinaisons de composés organiques et minéraux) classés selon leur taille, en macro (diamètre $> 250\mu\text{m}$) et micro agrégats (diamètre $< 250\mu\text{m}$). Les racines et les filaments mycéliens entrent dans les macro agrégats ; les résidus organiques, les bactéries et les polysaccharides entrent dans les micro agrégats (Ranjard et Richaum, 2001). L'ensemble des interactions entre les microorganismes, les racines, le sol et l'eau provoque des modifications physicochimiques sur la structure et la stabilité (agrégation) du sol (Haynes et Swift 1990). Les racines secrètent au niveau de l'apex un mucilage constitué de polymères glucidiques dont la fonction première est d'assurer une protection contre la dessiccation (Baiset *al.*, 2006).

La principale contribution des microorganismes rhizosphériques à la stabilité du sol est associée à la production de sécrétions, dont les exopolysaccharides (EPS). Ces derniers se présentent sous forme de gels hydratés autour des cellules. Ils constituent l'interface entre les microorganismes et leur environnement immédiat. Les EPS participent à la formation des agrégats bactériens et par conséquent ils aboutissent à l'amélioration de l'aération du sol, à l'infiltration de l'eau et à la progression de la racine (Sandhyaet *al.*, 2009).

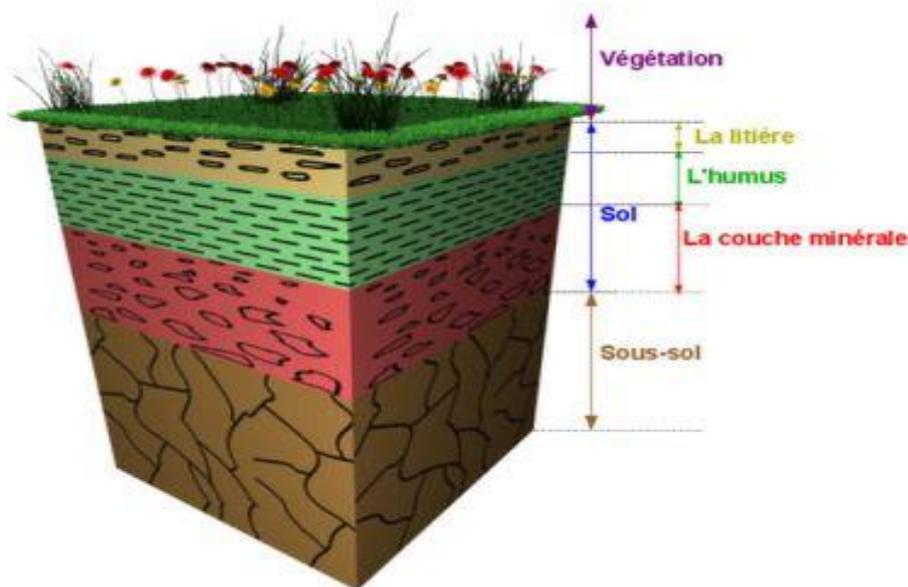


Fig.1 : La structure du sol (Arango, 2002).

3-Rhizosphère :

Le terme rhizosphère (étymologiquement rhiza : racine, sphair : ce qui entoure) a été proposé la première fois en 1904 par un chercheur allemand (Hiltner) pour décrire la zone de sol qui entoure la racine et qui est directement ou indirectement influencée par la racine.

La rhizosphère peut être qualifiée de moitié cachée du système racinaire qui lui-même est cryptique au sein de la rhizosphère, on distingue le rhizoplan, qui correspond à l'interface sol/racine, et le sol adhérent au système racinaire qui est le sol restant attaché aux racines après agitation vigoureuse, la racine modifie les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du sol rhizosphérique. Cet effet résulte du prélèvement racinaire d'eau et d'éléments minéraux mais surtout de la libération de composés organiques. Le volume de sol soumis à l'effet rhizosphérique est déterminé par la zone de diffusion des molécules organiques solubles et des composés volatils libérés par la racine..

La rhizosphère est un environnement créé par des interactions entre les exsudats racinaires et les microorganismes (Bell-Perkins et Lynch, 2002). Cette zone d'interaction s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire (Kennedy et de Luna, 2004). De même, la densité des bactéries est plus élevée dans la rhizosphère que dans le sol distant des racines, il s'agit de «l'effet rhizosphère» (Lemanceau, 1992 ; Whipps, 2001 ; Lugtenberg et Kamilova, 2009). Dans la rhizosphère *sensu stricto* il faut distinguer : l'endorhizosphère (intérieur de la racine), le rhizoplan

(surface racinaire) et l'exorhizosphère ou le sol rhizosphérique (sol lié à la racine par opposition au sol distant) (Gray et Smith, 2005 ; Brimecombe *et al.*, 2008).

4-Rhizodépôts :

Une grande variété de composés organiques libérés par les plantes est trouvée dans la rhizosphère. Elle peut être divisée en :

4-1 Exsudats :

Les exsudats sont des composés hydrosolubles de faible poids moléculaire tels que les sucres, les acides aminés, les acides organiques, les phytosidérophores, les flavonoïdes, les hormones et les vitamines. Ils sortent de la racine en suivant le gradient de concentration entre le cytosol de la racine et la solution du sol. La part des exsudats est la plus importante dans la rhizodépôt (Uren, 2007).

4-2 Substances sécrétées :

Les substances sécrétées sont des composés de poids moléculaire le plus souvent élevé. Elles sont représentées par les mucilages, les polymères de carbohydrates et les enzymes. Leur libération dans le sol est dépendante du métabolisme énergétique. Elles jouent un rôle très important dans le maintien de la stabilité du sol (Kennedy et de Luna, 2004).

4-3 Lysats :

Les lysats sont libérés quand les cellules des tissus corticaux des racines s'autolysent, ils incluent aussi les cellules de squamées de la coiffe et les membranes cellulaires (Bell-Perkins et Lynch, 2002) .

4-4 Gaz :

Les gaz comme l'éthylène, le CO₂ et d'autres composés volatiles sont exportés vers le sol par respiration. Les rhizodépôts impliquent un effet qualitatif et quantitatif sur la microflore de la rhizosphère (Walker *et al.*, 2003). Celle-ci peut soit utiliser les biomatériaux libérés comme source d'éléments nutritifs soit être inhibée par eux (Walker *et al.*, 2003 ; Brimecombe *et al.*, 2008). Du fait de leur solubilité dans l'eau, leur mobilité, ainsi que leur incorporation rapide dans les cellules microbiennes, les rhizodépôts peuvent changer le taux de décomposition de la matière organique du sol dans l'environnement de la racine (Brimecombe *et al.*, 2008).

On peut voir la figure suivante :

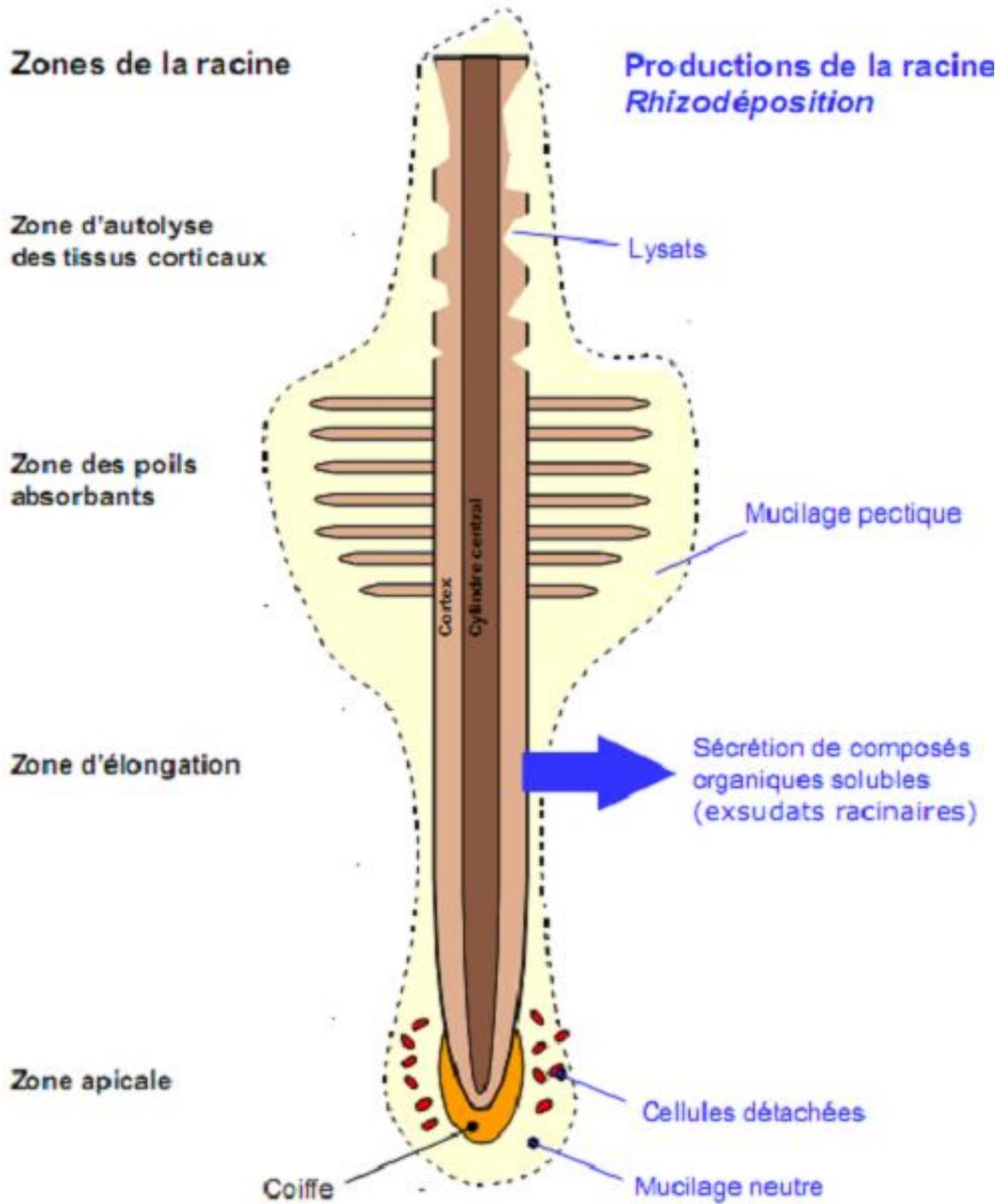


Fig. 2: Diagramme simplifié d'une racine et des rhizodépôts (Arango et Tarnawski, 2002).

5-Les rhizobactéries :

On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries. Celles ci sont généralement des souches très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993). Sont des hétérotrophes typiques, elles nécessitent donc des composés organiques comme source d'énergie. Leurs besoins sont entièrement comblés à l'intérieur même de la rhizosphère.

Les rhizobactéries utilisent en effet de nombreux substrats provenant de la plante: les cellules corticales et épidermales des racines qui se détachent, les polysaccharides du mucilage racinaire, les sucres et les acides aminés et organiques des exsudats racinaires, etc. (Campbell et Greaves, 1990). L'abondance des bactéries dans le sol s'explique par leur multiplication rapide et leur capacité à utiliser une grande variété de substrats comme sources d'énergie et d'éléments nutritifs (Glick, 1995).

5.1 Les rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes :

Les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes connues sous le terme PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), stimulent directement la croissance de plantes en augmentant le prélèvement des éléments nutritifs du sol, en induisant et produisant des régulateurs de croissance végétale et en activant les mécanismes de résistance induite chez les végétaux. Elles stimulent indirectement la croissance des végétaux par leur effet antagoniste sur la microflore néfaste, en transformant les métabolites toxiques et en stimulant la nodulation des légumineuses par les *Rhizobia*. L'établissement de l'association PGPR-plante est primordiale pour l'expression des effets bénéfiques.

Les rhizobactéries sont les bactéries ayant la capacité de coloniser les racines de façon intense. Les bactéries non symbiotiques répondant à cette définition appartiennent à différents genres et espèces dont les plus étudiés sont : *Agrobacteriumradiobacter*, *Azospirillum*spp, *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp. fluorescents (Hallmannet *al.*, 1997). Plusieurs études sur la relation PGPR/amélioration de l'absorption des nutriments ont conclu que l'application des inoculations bactériennes améliorent considérablement l'absorption du N, P, et K. En outre, le processus d'inoculation avec *Azospirillum*et *Bacillus* spp. a montré une nette accumulation de ces minéraux dans les tissus de la plante (Amir *et al.*, 2005).

5.1.1 Effets directs :

- **Fixation d'azote :**

L'azote est parmi les éléments nutritifs nécessaires, le plus souvent limitant pour la

Croissance des plantes. La majeure partie de cet élément se trouve sous forme d'azote gazeux (N_2) inaccessible aux animaux et aux plantes (Pujic et Normand, 2009). La fixation biologique de l'azote relève uniquement du domaine des procaryotes grâce à la nitrogénase, une enzyme catalysant la réduction de l'azote atmosphérique en ammoniac (Weyenset *al.*, 2010). Quelques bactéries fixatrices d'azote sont libres dans la rhizosphère (e.g. *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Herba spirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonaset* *Xanthobacter*) (Tilak *et al.*, 2005). En revanche d'autres sont en relation symbiotiques et fixent l'azote seulement en association avec certaines plantes. Il s'agit des *Rhizobia* (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*) (Tilak *et al.*, 2005 ; Gray et Smith, 2005) qui s'associent aux légumineuses et des souches de *Frankia*, bactéries filamenteuses sporulantes associées à des plantes dites actinorhiziennes (Gray et Smith, 2005).

- **Solubilisation des phosphates :**

Après l'azote, le phosphore est l'élément le plus limitant pour les plantes qui sont capables seulement d'absorber ses formes solubles mono- et dibasiques ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}) (Ramos Solano *et al.*, 2008b ; Keneniet *al.*, 2010). *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus* spp. *Bradyrhizobium* spp. *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas putida* et *Rhizobium* spp. sont des exemples de bactéries rhizosphériques solubilisant le phosphate inorganique en produisant de l'acide gluconique et l'acide 2- céto gluconique (Khan *et al.*, 2009). Elles sont aussi capables de minéraliser le phosphate organique par l'excrétion des enzymes extracellulaires telles les phosphatases, les phytases et C-P lyases (Kim *et al.*, 1998 in Weyenset *al.*, 2010)

- **Production des régulateurs de la croissance végétale :**

Il existe cinq catégories des régulateurs de la croissance végétale : les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahiret *al.*, 2004). L'acide indole-3-acétique est la phytohormone la plus répandue, il joue un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al.*, 2007). Il est produit par un grand nombre de bactéries tels *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae* (Karnwal, 2009) *Aeromonas veronii*, *Alcaligenes piechaudii*, *Rhizobium leguminosarum.*, *Bradyrhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., et *Comamonas acidovorans* spp. (Weyenset *al.*, 2010). Les cytokinines

et les gibbérellines sont impliquées dans la modification de la morphologie des plantes et dans la stimulation de développement de la partie aérienne (van Loon, 2007).

5.1.2 Effets indirects :

- **Compétition pour l'espace et les nutriments :**

Dans certains cas, les rhizobactéries à croissance rapide peuvent éliminer les pathogènes fongiques par une compétition pour le carbone et les sources d'énergie (Kamilova *et al.*, 2005). Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d'instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago, 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant la colonisation racinaire sont la mobilité (présence d'un flagelle), le chimiotactisme, les lipopolysaccharides (LPS), la capacité de synthétiser des vitamines et des macromolécules et la faculté d'utilisation des composés excrétés par les racines (Lugtenberg et Kamilova, 2009).

- **Antibiose :**

L'antibiose consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de *Pseudomonas* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliqués dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamide, la pyrolutérine, le 2,4- diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (Defago, 1993 ; de Souza *et al.*, 2003 ; Haas et Defago 2005). D'autre part l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine et la xanthobacine sont produites par *Bacillus* spp. , *Streptomyces* spp. et *Stenotrophomonas* spp. (Milner *et al.*, 1996 ; Nakayama *et al.*, 1999). Certaines souches de PGPR ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels β -1,3-gluconase, exo- et endo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001).

- **Résistance systémique induite ou ISR (Induced Systemic Resistance) :**

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (van Loon, 2007). Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (van Loon *et al.*, 2005 ; Jourdan *et al.*, 2008). Ce phénomène d'induction de résistance systémique par les rhizobactéries est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos Solano *et al.*, 2008a). L'ISR peut être induite par des microorganismes variés

incluent des bactéries à Gram positif comme *Bacillus pumilus*, ou des bactéries à Gram négatif appartenant au genre *Pseudomonas* (*fluorescens*, *putida*, *aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*marcesens*, *plymuthica*) ou *Pantoea agglomerans* (Jourdan *et al.*, 2008).

Chapitre II :

Les légumineuses

1- Généralités :

Les légumineuses (ou Fabacées) constituent une immense famille de plantes dont le seul caractère commun est de produire des ayant un ovaire libre, constitué par une seul carpelle qui donne un fruit appelé gousse ou légume. On compte 475 genres et environ 16400 espèces se répartissant en trois sous famille : *Mimosoideae*, *Caesalpinoideae* et *Papilionoideae* (Come *et al.*, 2006). Les Fabacées avec 10000 espèces représentent d'ailleurs la plus grande partie des légumineuses (Figure 3). On y trouve des arbres, la plupart exotiques, voire des lianes, mais surtout de nombreuses espèces herbacées vivaces ou annuelles. (Guignard *et al.*, 2004). Souvent volubiles et grimpantes, soit par enroulement (*Phaseolus*, *Physostigma*), soit grâce à des vrilles foliaires (*Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia*).

Beaucoup d'espèces sont cultivées pour leurs graines qui sont riches en amidon et en protéine exemples: Fève, Haricot, Lentille, Pois, Pois chiche, Fenugrec, Lupin, et Soja, ou en huile tel l'Arachide, les trèfles, les luzernes, le sainfoin et le lotie servent à l'alimentation du bétail (Come *et al.*, 2006). Les légumineuses entretiennent une relation très privilégiée avec la rhizosphère qui entoure leurs racines.

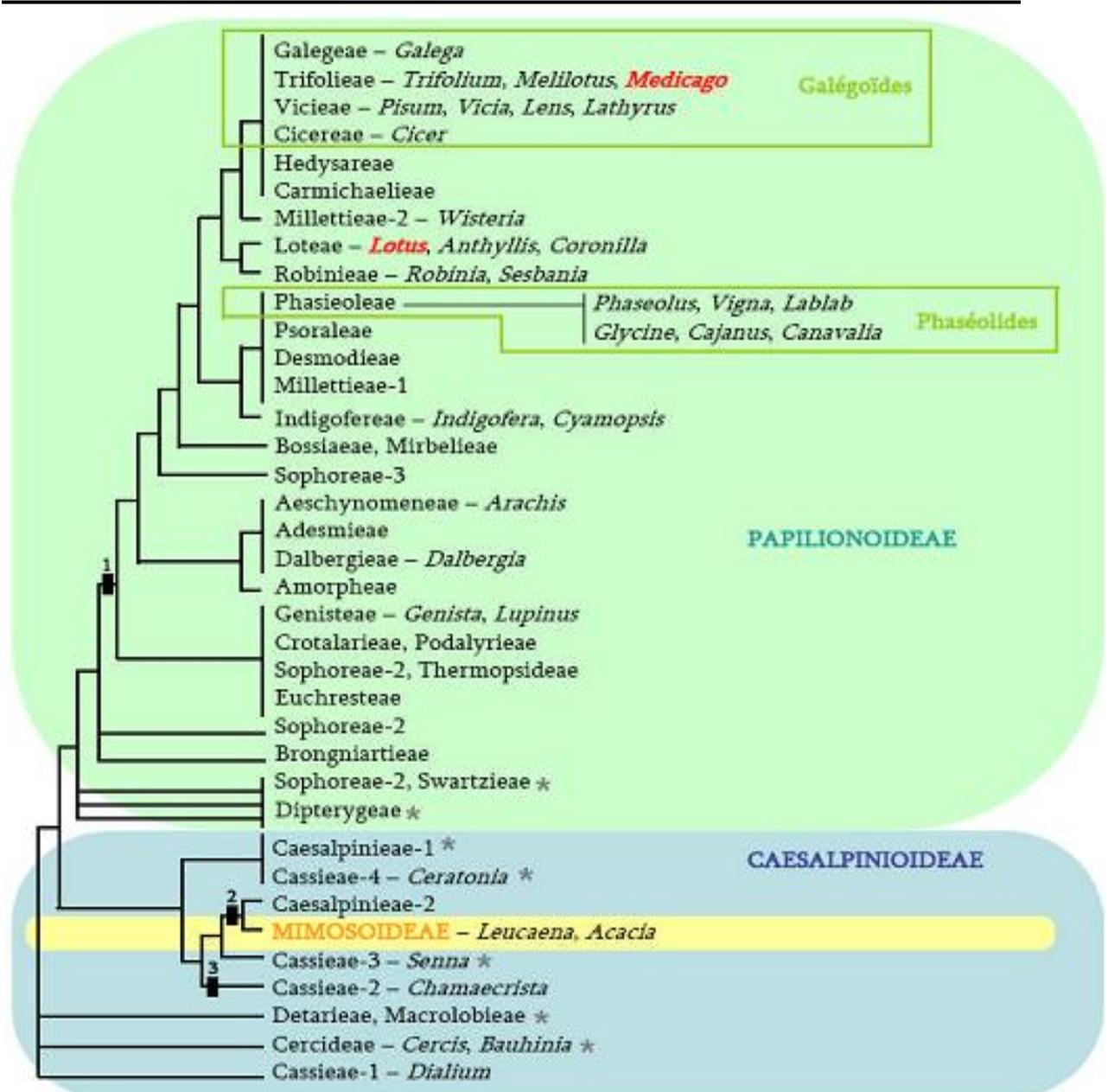


Fig. 3: Classification phylogénique des Légumineuses (Guignard 2004).

La superfamille des Légumineuses (ou Fabacées) se subdivise en trois familles, les *Papilionoideae*, et les *Mimosoideae* qui sont des familles phylogénétiquement très regroupées et les *Caesalpinioideae*, qui sont plus dispersées.

Les groupes connus pour présenter des plantes non-nodulantes sont notés par un astérisque gris. Les deux groupes comprenant les principales légumineuses d'intérêt agronomique, les Galégoïdes et les Phaséolides, sont représentés par des encadrés. 1,2,3: Possibles origines indépendantes pour la nodulation (Doyle *et al.*, 1998)

2-La nodulation chez les légumineuses :

Toutes les espèces appartenant aux Légumineuses ne sont pas nodulées . Environ 20% des *Papilionoideae* (soit 3400 espèces) ont été testées pour leur aptitude à noduler. Le pourcentage des familles examinées capable de noduler se répartit de la façon suivante : *Papilionoideae* (97%), *Mimosoideae* (90%) et *Caesalpinoideae* (23%) (Duhouxet *al.*, 2004).

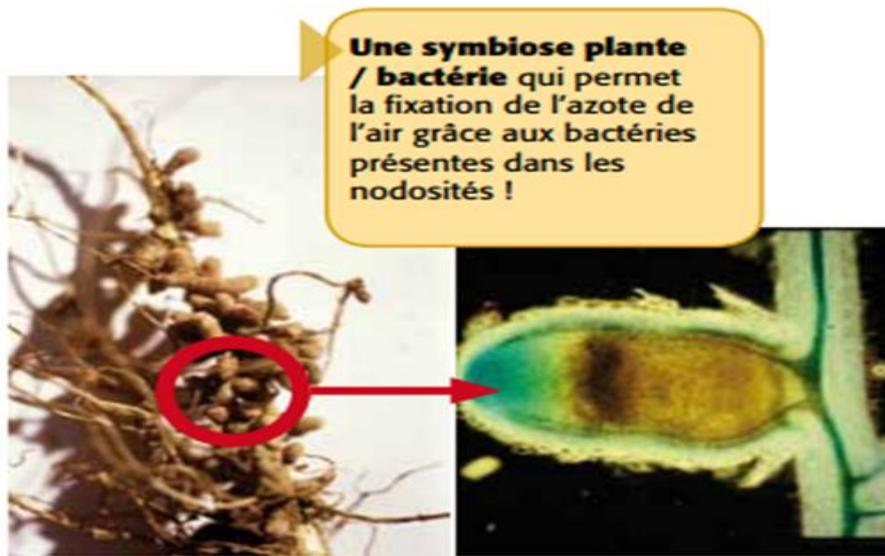


Fig.4: Nodules dus à *Rhizobium* sur les racines de *Serianthes calycina* (Come *et al.*,2006)

3- Intérêt agronomique des légumineuses :

Leur intérêt agronomique provient en premier lieu de leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote, qui leur permet de produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée, d'où leur intérêt également dans le cadre d'une agriculture "durable" (réduction des intrants, préservation et enrichissement des sols en azote) (Journetet *al.*, 2001). Elles exercent une influence très favorable sur la fertilité des sols grâce à la symbiose fixatrice d'azote avec les souches de *Rhizobium*. Elles jouent par conséquent un rôle primordial dans la rotation des cultures (Baudoin *et al.*, 2001).

4- Intérêts scientifiques des légumineuses :

Les légumineuses alimentaires tiennent une part très importante des travaux accomplis dans des domaines aussi divers que l'agronomie, la génétique, l'entomologie, la phytopathologie et la physiologie (Baudoin *et al.*, 2001). Les principaux objectifs de recherche, sur légumineuses à graines, cherchent à la fois à sécuriser la nodulation, à assurer la complémentarité entre les voies d'assimilation et de fixation de l'azote, et à

assurer une meilleure remobilisation de l'azote des feuilles et des tiges vers les graines. Le point fort des légumineuses est leur coût énergétique faible et leur faible contribution aux gaz à effets de serre, directement liés à l'absence de fertilisation azotée (Pinochet *et al.*, 2006). La réduction de la fertilisation azotée et l'amélioration des coûts et bilans énergétiques sont aujourd'hui un objectif commun à plusieurs filières dans la perspective, non seulement d'améliorer une compétitivité économique, ou de réduire des impacts environnementaux, mais surtout de développer des biocarburants (Pinochet *et al.*, 2006).

5-Intérêt alimentaire des légumineuses :

De nombreuses espèces cultivées appartiennent à la famille des Légumineuses. Elles constituent une source très importante de protéines et de lipides dans l'alimentation humaine et animale (Journet *et al.*, 2001). Elles constituent un apport de protéines peu coûteux mais néanmoins important (18% à 30% de la graine sèche) (Baudoin *et al.*, 2001).

6-Le petit pois (*Pisum sativum L.*) :



Fig.5 : Le petit pois (*Pisum sativum L.*) (Baudoin *et al.*, 2001).

6.1 Historique de la plante :

Le petit pois (*Pisum sativum L.*) est une plante herbacée annuelle qui appartient à la Sous-famille des *Papilionoideae* et à la famille des *Fabaceae*. On distingue plusieurs types de petit pois dont les plus importants appartiennent à deux groupes : *Pisum sativum cv abyssinium* dont le plant est très grimpant et *P. sativum cv sativum* qui a une tige peu grimpante. Le petit pois a son origine dans la région méditerranéenne et au moyen orient (jusqu' au Tibet).

Le petit pois, aussi appelé pois potager, est l'un des plus vieux légumes cultivés en Europe et en Asie. En Iran, en Palestine, en Grèce ou encore en Suisse, le petit pois était déjà présent il y a 10 000 ans. au XVI^e siècle quelques dizaines de variétés étaient recensées et plus de 360 appellations en 1925. Ce chiffre n'a pas cessé de croître.

Le petit pois a servi même au moine autrichien Mendel pour établir les premières lois de la génétique. Pendant 18 années, il a réalisé des croisements dans son potager et a constaté les variations de dimension, de forme et de couleur (Journet *et al.*, 2001).

6.2 Morphologie de la plante :

6.2.1 Racines :

Le petit pois forme une racine principale pivotante développée et des racines secondaires latérales. Des nodules globulaires peuvent se développer sur la racine principale des jeunes plants (Pinochet *et al.*, 2006).

6.2.2 Tige, feuilles et ramifications :

Le petit pois forme une tige herbacée angulaire ou cylindrique avec peu ou pas de ramifications. Le plant est plus au moins grimpant suivant les types. La tige est constituée de plusieurs entre-nœuds creux, souvent pourpres à la base et avec des stipules larges. Il forme des feuilles alternantes avec 1-3 paire de folioles et un long pétiole creux. Les folioles opposées ou non sont rhomboïdes, asymétriques et pourvues de courts pétioles (Journet *et al.*, 2001)

6.2.3 Inflorescences et fructifications :

Les inflorescences du petit pois sont des racèmes axillaires pourvus de 1-2 fleurs blanches ou pourpres avec un pédoncule cylindrique et creux, plus ou moins long suivant les types (1,5-12cm de long). La fleur de type papilionacé comprend 5 pétales, 5 sépales et 10 étamines. La fécondation se fait par autopolinisation.

Le fruit est une gousse à deux valves et d'une longueur de 4,5-8cm. Les gousses contiennent en moyenne 2 à 5 graines. Les graines sont de couleur verte ou crème, brune, orange brune ou violette. Les graines de couleur verte, jaune ou brune, sont souvent tachetées de couleur violette. Elles sont globulaires, lisses ou ridées et pourvues d'un petit hile elliptique qui contient des cotylédons jaunes (Pinochet *et al.*, 2006).

Chapitre III:

Les métaux lourds

1-Généralités sur les métaux lourds :

Appelé aussi, éléments toxiques, métaux en traces ou encore éléments traces métalliques (ETM), les définitions des métaux lourds sont multiples et dépendent du contexte dans lequel on se situe.

Du point de vue chimique, les métaux sont les éléments de la classification périodique formant des cations en solution.

Du point de vue physique, les métaux lourds sont définis comme étant des éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (arsenic) provenant le plus souvent d'un minerai ou d'un autre métal, ayant une masse volumique élevée, supérieure à 5g/cm³ (Minear et Keith, 1982). Cependant, certains métaux lourds, tel que le Zinc, présentent une masse volumique relativement faible, inférieure à 5g/cm³ (Miquel, 2001).

Du point de vue science de la terre, les métaux lourds sont les éléments traces qui se présentent dans tous les compartiments de l'environnement mais en très faibles concentrations (inférieure à 0,1%). On connaît soixante-huit éléments métalliques parmi quatre – vingt composants qui présentent une concentration dans la croûte terrestre qui ne dépasse pas 0,1% pour chacun d'eux (Cambier et Mench, 1998). Ils sont présents en traces d'où l'appellation éléments traces. Et se trouvent dans le sol sous forme d'ions libres ou de complexes solubles ou insolubles. L'ensemble de ces métaux constitue les métaux totaux du sol. Généralement, les métaux sont peu mobiles, mais ils se transportent, changent de forme chimique et ne se biodégradent pas. En conséquence, ils persistent longtemps dans les sols et s'y accumulent parfois jusqu'à représenter un important pourcentage du sol (Friendl, 1990).

Du point de vue science de la vie, les métaux lourds se trouvent par définition en concentration inférieure à 100 mg/Kg de matière sèche dans les organismes vivants, végétaux ou animaux, non affectés par des carences ou des toxicités (Nieboer et Richardson, 1980 ; Coïc et Coppenet, 1989 ; Loué, 1993). Ainsi, on distingue deux catégories de métaux en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : Les métaux essentiels tels que le calcium, le cobalt, le cuivre, le fer, le potassium, le magnésium, le manganèse, le nickel et le zinc. Ils jouent un rôle biologique important et servent comme des micronutriments, des cofacteurs d'enzymes, des biocatalyseurs ou encore des constituants de molécules comme l'hémoglobine. Ce sont des oligo-éléments essentiels et nécessaires à de faibles doses. En quantité insuffisante, ils peuvent entraîner des carences qui provoquent des maladies (Nies, 1999 ; Bruins et *al.*, 2000). Le deuxième type sont les

métaux toxiques qui par contre n'ont aucun rôle biologique et sont non essentiels et éventuellement toxiques (plomb, cadmium, mercure, ...) d'où l'appellation éléments toxiques. En effet, souvent la notion de métaux lourds est associée aux notions de pollution et de toxicité. Ainsi, les métaux lourds sont des éléments métalliques potentiellement toxiques à des teneurs élevées pour les systèmes biologiques (Dudka et Miller, 1999 ; Wilkinson et *al.*, 2001). Cependant, même les métaux essentiels peuvent s'avérer toxiques pour diverses formes de vie, à des teneurs plus élevées. Ils ont la propriété de s'intégrer et de s'accumuler dans la chaîne alimentaire, et ainsi de devenir toxique pour l'homme, consommateur final (Hu, 2000 ; Ibrahim et *al.*, 2006).

1.1 L'origine des ETM (Elément Trace Métallique) :

Les ETM sont des éléments naturellement présents dans les roches et les sols. Leur présence dans les milieux tels que l'air ou l'eau, résulte des processus naturels mais aussi des activités humaines qui les utilisent pour leurs propriétés particulières ou les rejettent indirectement dans l'environnement (Figure 6).

1.1.1 Les sources naturelles :

La plupart des ETM sont présents naturellement dans les roches et les sols. Leur altération naturelle, surtout lors de la pédogenèse, sous l'influence des processus physiques, chimiques et biologiques, entraîne la libération des ETM dans les sols, les lacs et les rivières et l'air (Järup, 2003 ; Mohamed et *al.*, 2011 ; Wuana et Okieimen, 2011). Aussi, les apports aériens dont se trouvent des particules très fines d'origine naturelle, c'est le cas des poussières libérées dans l'atmosphère par l'activité des volcans, des embruns maritimes. On pourrait y ajouter les poussières et les fragments de météorites très riches en métaux lourds. Ces apports se déposent soit sur les plantes qui peuvent les absorber soit pénétrer dans les sols à partir de leur surface (Baize, 1997). Parmi les autres sources naturelles, on peut citer la décomposition des végétaux et des détritux animaux, l'érosion par le vent, la fumée des incendies de forêt, les exsudats végétaux, les pulvérisations océaniques et l'activité des sources thermales (Galloway et *al.*, 1982 ; Schulz et Schulz, 2000).

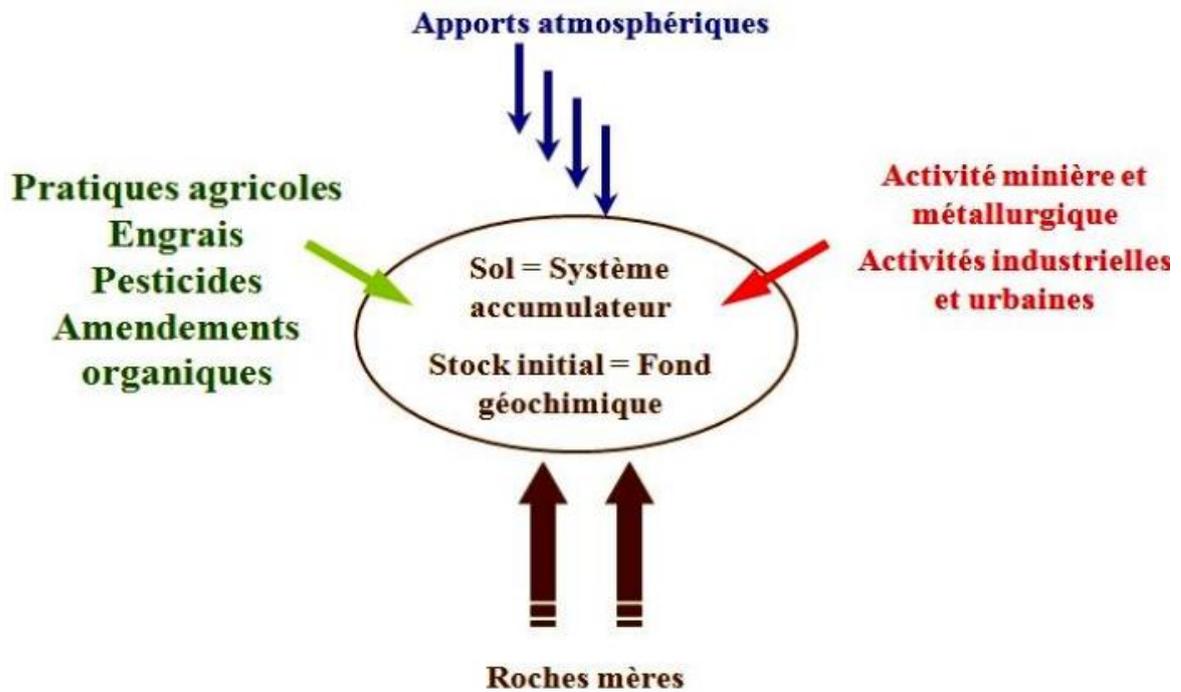


Fig.6 : Origine des ETM dans le sol (Robert et Juste, 1999)

1.1.2 Les sources anthropiques :

Une quantité importante des ETM est introduite dans l'environnement par l'intermédiaire des sources anthropiques (Mohamed et *al.*, 2011 ; Wuana ET Okieimen, 2011).

Par ses diverses activités l'homme modifie les cycles biogéochimiques des métaux en faisant varier leurs flux naturels entre les compartiments et en transformant leur forme physico-chimique (Tableau 1).

Parmi les sources anthropiques, on trouve l'exploitation minière qui est l'un des premiers contributeurs qui a conduit à un accroissement de la pollution par les ETM. En fait, elle génère des résidus de minerais, sous forme de fragments finement moulus ou de particules résiduelles qui se transportent par le vent ou par l'eau. Ils contaminent ainsi les sols environnants et les sols alluviaux en aval. L'altération de ces fragments libère des ions métalliques dans le sol, qui, sous cette forme, deviennent potentiellement biodisponibles (Mansour, 2008).

D'autres sources anthropiques sont les industries, principalement métallurgiques, pétrochimiques et électroniques (Tableau 1). Elles émettent de nombreux types de produits polluants, de poussières et des aérosols, résidus de processus de transformation, notamment des processus de combustion incomplète ou de refonte de matériaux utilisés. Aussi, l'introduction de technologies à haute température dans les processus de fusion et de la

combustion de combustibles fossiles (charbon, fuels...) a augmenté considérablement le taux de libération pour certains métaux qui sont susceptibles de parcourir des centaines, voire des milliers de kilomètres à partir de leur source (Mansor,2008).

Une autre source de pollution par les ETM, les amendements agricoles incluant les engrais organiques, les pesticides et les fertilisants en oligo-éléments (cuivre, zinc, manganèse...), les fumiers, les lisiers, les épandages divers, les boues de stations d'épuration, les composts urbains, les produits de traitement phytosanitaires (sels de cuivre, arséniate de plomb), etc. Ils apportent des métaux dans des sols qui en contiennent déjà. Même si les additions à l'origine ne sont pas à des concentrations suffisamment élevées pour être toxiques, les seuils critiques peuvent être atteints avec les applications répétées (Saidi, 2004). Les processus naturels ne conduisent que rarement à des concentrations élevées des ETM dans l'environnement contrairement aux apports anthropiques qui s'ajoutent aux apports naturels et font augmenter d'autant les concentrations dans les sols, les eaux et l'air (Tableau 2) (Galloway et al., 1982). Leur forme chimique est souvent plus disponible pour les êtres vivants que celle des éléments d'origine naturelle. Ils présentent donc, plus de risque pour les écosystèmes (Tremel-Schaud ET Feix, 2005).

Tableau 1: les sources anthropogéniques de certains métaux lourds spécifiques dans l'environnement (Ali et al., 2013)

ETM	Sources	Références
As	Pesticides, préservation du bois	Thangavel and Subbhuraam (2004)
Cd	Peinture, pigments, stabilisateurs plastiques, incinération de matières plastiques contenant du cadmium, engrais phosphatés...	Salem et al. (2000); Pulford and Watson (2003)
Cr	Tanneries, industries de l'acier, cendres...	Khan et al. (2007)
Cu	Pesticides, engrais...	Khan et al. (2007)
Hg	Libération à partir de l'exploitation minière Au-Ag, la combustion du charbon, les déchets médicaux...	Memon et al. (2001); Wuana and Okieimen (2011); Rodrigues et al. (2012)
Ni	Les effluents industriels, les appareils de cuisine, les instruments chirurgicaux, les alliages d'acier, les automobiles, les batteries...	Tariq et al. (2006)
Pb	Émission aérienne de la combustion des combustibles au plomb, fabrication des batteries, herbicides et insecticides...	Thangavel and Subbhuraam (2004); Wuana and Okieimen (2011)

Tableau 2 : les taux annuels des émissions (Galloway et *al.*, 1982)

Métaux	Emissions (10 ⁸ g/an)	
	Naturels	Anthropiques
Antimoine (Sb)	9,8	380
Arsenic (As)	28	780
Cadmium (Cd)	2,9	55
Chrome (Cr)	580	940
Cobalt (Co)	70	44
Cuivre (Cu)	190	2600
Plomb (Pb)	59	20 000
Manganèse (Mn)	6100	3200
Mercure (Hg)	0,40	110
Molybdène (Mo)	11	510
Nickel (Ni)	280	980
Sélénium (Se)	4,1	140
Argent (Ag)	0,6	50
Vanadium (V)	650	2100
Zinc (Zn)	360	8400

Note : Emissions naturelles = sol + poussières volcaniques

Emission anthropogéniques = combustibles fossiles (fuels) et flux des particules industrielles

1.2 Mobilité et disponibilité des métaux lourds dans le sol :

Dans le sol, les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules de sol. Cependant, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre ; il est alors biodisponible. Comme tout élément chargé positivement, les cations métalliques peuvent interagir dans le sol avec toute particule organique ou minérale chargée négativement. L'équilibre entre les formes libres et fixées

de l'ion va dépendre de sa biodisponibilité, directement liée à sa toxicité. Enfin, la biodisponibilité des métaux lourds varie en fonction de plusieurs facteurs du sol.

1.2.1 La teneur en argile :

Les argiles, de par leurs propriétés physico-chimiques, jouent un rôle très important dans la disponibilité des métaux lourds. Li et Li (2000) ont montré que les métaux lourds peuvent être absorbés et immobilisés par les minéraux argileux ou également être complexés par la matière organique du sol en formant alors un complexe organométallique (Lamy, 2002). En effet, la charge électro-négative des argiles les rend aptes à contracter des liaisons électrostatiques avec toute entité chargée positivement, comme les cations métalliques. Ces liaisons sont réversibles et les cations fixés sont échangeables : ils peuvent être remplacés par d'autres cations présents dans la phase aqueuse du sol. Cette capacité d'échange de cations (CEC) exprimée en milliéquivalents pour 100 g est une caractéristique importante de chaque argile qui conditionne grandement la biodisponibilité d'un métal dans le sol.

1.2.2 Le pH :

Le pH est un autre facteur important influençant la solubilité et la spéciation du métal et donc sa toxicité (Babich et Stotzky, 1977a et b). Quand le pH diminue d'une unité, la concentration des cations métalliques libres augmente d'environ un facteur 2 dans la solution de sol et par conséquent améliore la phyto-extraction (Christensen, 1984 ; Sanders, 1983 ; Sanders *et al.*, 1986). Les organismes et les microorganismes eux-mêmes peuvent influencer la disponibilité des métaux lourds dans leur environnement proche par acidification locale lors d'une réaction métabolique ou par la production de composés complexant les métaux lourds (Giller *et al.*, 1998).

1.2.3 Le potentiel redox (Eh) :

Le potentiel redox (Eh) permet de caractériser les échanges d'électrons entre les espèces chimiques. Ainsi, les faibles valeurs d'Eh favorisent la dissolution des hydroxydes et entraînent une augmentation de la concentration des métaux associés avec des composants (Chaignon, 2001). De plus, la modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments se liant avec le métal influence indirectement la solubilité des métaux lourds. Par exemple, en conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfure qui piègent volontiers les éléments métalliques tels que Pb, Cd, Zn (Deneux-Mustin *et al.*, 2003).

Bien que l'influence des conditions oxydo-réductrices du sol semble très importante au regard de la mobilité des éléments métalliques, il n'en demeure pas moins que ce facteur

apparaît souvent comme secondaire par rapport au pH. En effet, pour un sol donné l'Eh varie en fonction inverse du pH, il augmente quand le pH diminue (Deneux-Mustin et *al.*, 2003).

1.2.4 L'activité biologique :

La compréhension globale des phénomènes biologiques jouant sur la solubilité des Métaux lourds dans les sols est rendue difficile par la multiplicité des actions et interactions à tous les niveaux. Nous allons développer ici principalement l'action des microorganismes et des végétaux supérieurs.

Parmi les microorganismes on retrouve de nombreuses populations bactériennes et fongiques dont les activités métaboliques influencent la mobilité des métaux lourds. Cependant, beaucoup de ces phénomènes sont également communs aux plantes. Les principaux modes d'action sur la mobilité des polluants métalliques sont la solubilisation, l'insolubilisation et la volatilisation

1.3 Principaux ETM:

Les éléments traces sélectionnés dans ce chapitre sont parmi les polluants métalliques les plus fréquemment rencontrés dans les sols contaminés et étudiés.

1.3.1 L'arsenic :

C'est un élément ubiquiste et quasi universel que l'on trouve dans chacun des réservoirs de l'environnement : roches, sols, atmosphère, hydrosphère et biosphère. C'est le 51ème en termes d'abondance dans la couche terrestre (Dictor et *al.*, 2004) où sa teneur moyenne est de 1,5 à 3 mg/kg (Leonard, 1991). Néanmoins certains charbons peuvent atteindre des taux allant jusqu'à 1500 mg/kg (Piver, 1983).

- **Toxicité :**

L'arsenic est l'un des composés les plus toxiques. Classé en première position dans la liste des éléments toxiques élaborés par l'agence des substances toxiques (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (ASTDR).

Il est d'une toxicité potentielle élevée pour l'homme du fait qu'il est facilement absorbé par la voie digestive. Cette toxicité dépend de sa nature chimique : l'arsenic inorganique (pure ou quand il est lié à l'oxygène, au chlore ou au soufre) est beaucoup plus toxique que l'arsenic organique (quand il est chimiquement lié au carbone ou à l'hydrogène).

L'exposition chronique à l'arsenic entraîne des troubles cutanés à type d'hyperkératose palmaire et plantaire et de pigmentation noirâtre des plantes de pieds

(maladie des pieds noirs). IL est aussi classifié comme une substance cancérigène pour l'homme (TremelSchaud et Feix, 2005).

Chez les plantes, l'arsenic est phytotoxique, l'ion arsénite étant plus phytotoxique que l'ion arséniate (Oremland et Stolz, 2003). Ce dernier est un analogue chimique du phosphate, et il est incorporé dans les cellules racinaires à travers les transporteurs de phosphate (Zhao et *al.*, 2009). Une fois à l'intérieur, l'arséniate peut inhiber la phosphorylation au niveau des membranes mitochondriales (Finnegan et Chen, 2012). A des concentrations élevées, l'As réduit la photosynthèse et le rendement des cultures en influençant la capacité reproductive de la plante et la production du fruit (Garg et Singla, 2011). Aussi, il s'accumule dans les parties racinaires et foliaires (Bergquist et Greger, 2012).

1.3.2Le cadmium :

Le cadmium est un métal relativement rare dans la croûte terrestre (0,2 mg/kg), 67^{ème}élément par ordre d'abondance dans la lithosphère. C'est un élément naturel présent dans certains minerais sous forme d'impuretés. Il ne se trouve pas à l'état élémentaire dans la nature ; il est généralement présent dans des minerais de zinc ou de plomb. Il peut se constituer suite à une altération et une érosion des roches cadmifères et constituer également un produit de raffinage d'autres métaux tel que le Cu, le Pb et le Zn. La concentration normale en cadmium dans l'air et dans l'eau est de 0,001µg/m³ et 1µg/l respectivement (Haguenoer et Furon, 1981). Dans les sols, la concentration en cadmium est de 0,1 à 11ppm selon qu'il dérive des roches éruptives, métamorphiques ou sédimentaires (Weissenhorn, 1994).

- **Toxicité :**

Le cadmium occupe la septième position dans la liste des substances toxiques (ASTRD, 2012). Le cadmium n'est essentiel pour aucune fonction biologique et a une toxicité élevée pour l'homme (Perronnet et *al.*, 2000 ; ASTDR, 2012), l'exposition chronique excessive au cadmium peut entraîner une insuffisance rénale, une pathologie osseuse (ItaiItai, décrit au Japon), voire favoriser une hypertension artérielle. Le cadmium est bioaccumulable et répertorié comme toxique, il est considéré comme cancérigène pour l'homme et il présente des effets génotoxiques (ASTDR, 2012). Il est assez mobile et facilement disponible, il risque soit de passer dans la chaîne alimentaire par l'intermédiaire des végétaux pour lesquelles il présente une forte phytodisponibilité, il peut s'accumuler dans les racines ou les parties aériennes (Grant et *al.*, 1998), comme il peut migrer en profondeur pour aller contaminer les nappes phréatiques (Jacobs et Foreman, 2005).

1.3.3 Le cuivre :

Le cuivre est assez fréquemment retrouvé dans la nature, par exemple sous forme de chalcopryrite. Ses caractéristiques chimiques n'autorisent cependant pas l'existence de fortes concentrations dans les eaux naturelles. La composition moyenne de la croûte terrestre en cuivre serait comprise entre 45 et 70 mg/kg selon les auteurs (Baize, 1997).

- **Toxicité :**

Le cuivre est un élément essentiel aussi bien pour l'homme que pour la plante (Welch 1995). Il semble poser plus de problèmes de carence chez les végétaux, le bétail et l'homme, que de toxicité. L'intoxication n'est atteinte qu'à des doses beaucoup plus importantes. Les manifestations pathologiques chez l'homme sont plutôt liées à une carence en cuivre qui entraîne une anémie résistante au traitement par le fer, des retards de croissance associés à des troubles du métabolisme osseux, des lésions cardiaques, des troubles du système nerveux, etc. (Bourrelier et Berthelin, 1998).

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

1.3.4 Le plomb :

Le plomb est présent dans la croûte terrestre et dans tous les compartiments de la biosphère. On le trouve principalement dans des minerais comme la galène (PbS). La concentration moyenne en plomb de la croûte terrestre serait de l'ordre de 13 à 16 mg/kg. D'après Juste et *al.*, (1995) de nombreux auteurs s'accorderaient pour affirmer que les sols non contaminés contiendraient 10 à 30 mg/kg, tandis que les sols situés loin des centres urbains et industriels mais affectés par des contaminations diffuses présenteraient des concentrations comprises entre 30 et 100 mg/kg. Des concentrations supérieures à 110ppm de plomb traduiraient l'existence d'une source polluante à proximité.

- **Toxicité :**

Le plomb n'est ni essentiel ni bénéfique pour les êtres vivants. Il est très toxique pour l'homme, car il occupe la deuxième position dans la liste des substances toxiques (ASTDR, 2004). Ses effets concernent le système cardio-vasculaire, le système nerveux

central et périphérique et le rein, voire le système auditif et visuel (Fergusson, 1990 ; Plumlee et Ziegler, 2003). Le fœtus et le jeune enfant sont particulièrement sensibles à l'effet toxique neurocomportemental du plomb, caractérisé par une baisse peu ou pas réversible des facultés cognitives (Goyer et Clarkson, 2001). Chez les plantes, le plomb diminue la croissance des racines spécialement les racines principales même en présence de faibles concentrations. Elles deviennent épaisses, courtes et très ramifiées. Aussi, des précipitations de plomb ont été observées dans les zones apicales chez les plantes traitées par le plomb (Kopittke et *al.*, 2007b,c).

1.3.5 Le zinc :

Le zinc fait partie de la nature. La plupart des roches et de nombreux minéraux en contiennent dans des proportions diverses. Le zinc est également présent de façon naturelle dans l'air, l'eau et le sol. La concentration naturelle en zinc dans la croûte terrestre varie entre 10 et 300 mg/kg (Malle, 1992), pour une valeur moyenne de 70 mg/kg (de matière sèche). À certains endroits, le zinc a été concentré à des niveaux beaucoup plus importants sous l'influence de procédés géologiques et géochimiques. De telles concentrations, que l'on retrouve à la surface de la terre et dans le sous-sol, font l'objet d'une exploitation sous forme d'extraction de minerais. Le minéral le plus courant à base de zinc est la sphalérite (ZnS). Le zinc métallique est produit à la fois à partir de minerais et du recyclage des produits contenant du zinc.

- **Toxicité :**

Le Zn est un élément essentiel et peu toxique pour l'homme et ses dangers résultent plutôt d'une déficience (Bourrelier et Berthelin, 1998). Bien que l'homme puisse proportionnellement gérer des quantités importantes de cet élément, trop de zinc peut tout de même provoquer des problèmes de santé importants comme des irritations de la peau, des crampes d'estomac, des vomissements, des nausées et de l'anémie. De très hauts niveaux de zinc peuvent endommager le pancréas et perturber le métabolisme des protéines (ASTDR, 2005).

Le zinc est fortement phytodisponible, et se trouve en quantité plus élevées dans les racines que dans les parties aériennes. Il est peu phytotoxique (Long et *al.*, 2003 ; Kim and McBride, 2009), sauf sur les sols fortement pollués. Le zinc affecte la croissance et la production de la matière sèche, en particulier des racines, il affecte aussi la teneur en chlorophylle et d'autres pigments et l'efficacité photosynthétique. Il influence également la nutrition minérale et peut entraîner une déficience en fer induisant la chlorose (Sagardoyet *al.*, 2009 ; Manivasagaperuma et *al.*, 2012).

2- Les métaux lourds dans la plante :

Parmi l'ensemble des métaux lourds, une vingtaine d'entre eux sont indispensables aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (*e.g.* azote, soufre... ; Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Nombre de ces métaux, Cu, Zn, Ni, Fe, Co, Se et Ba sont aussi impliqués au niveau de processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes ; la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires ; le métabolisme lipidique ou la tolérance au stress (Rengel, 1999). En outre, certains éléments trace peuvent se présenter sous différents états d'oxydation (*e.g.* $\text{Cu}^{2+} + e^- \text{Cu}^+$). Ils jouent ainsi un rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons, très important dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction (Chaignon, 2001). Ceci dit, les métaux lourds n'ont pas tous une fonction connue à ce jour dans le métabolisme de la plante, et malgré la grande diversité des besoins et des niveaux de tolérance aux métaux lourds chez les plantes, certains restent considérés comme des poisons cellulaires pour lesquels les doses admissibles sont très faibles. On retrouve parmi les plus toxiques, Hg, Cr, Ni, Pb et Cd (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). Ils agissent à de fortes concentrations comme un facteur de stress qui entraîne une modification de la réaction physiologique. Le terme « **sensibilité** » décrit les effets du stress, qui peuvent aller jusqu'à la mort de la plante. Par opposition, le terme « **résistance** » fait référence à la réaction de la plante qui lui permet de survivre face au stress métallique et d'assurer sa descendance (Levitt, 1980). Deux stratégies principales sont impliquées dans ce phénomène de résistance :

2.1 la stratégie d'évitement : par laquelle les plantes se protègent du stress métallique en limitant leur absorption ;

2.2 la stratégie de tolérance : (terme synonyme de résistance) qui fait référence aux réactions permettant de limiter les effets néfastes des métaux dans l'organisme.

3- Les métaux lourds et les bactéries :

Les métaux lourds s'introduisent dans la cellule bactérienne à l'aide de transporteurs prévus pour les fonctions physiologiques normales de la bactérie, exemple du cadmium : pour lequel les bactéries ont un transporteur à haute affinité et très efficacité (SILVER.ET LUSK.J , 1987) : Ce transporteur est la principale voie d'entrée du cadmium chez *staphylococcus aureus*

3.1 Effets des métaux lourds sur microorganisme du sol :

3.1.1 Biomasse :

Les métaux lourds sont réputés pour leur toxicité sur la plupart des microorganismes telluriques. Leurs effets de dénaturation des protéines ou de destruction de l'intégrité de la membrane cellulaire affectent la croissance, la morphologie et le métabolisme de ces microorganismes telluriques (Leita et *al.*, 1995).

Ces altérations conduisent à des réductions de biomasse microbienne. De nombreuses études montrent que la biomasse bactérienne d'un sol a tendance à diminuer suite à une contamination par un métal (Kandeler et *al.*, 1996 ; Smit et *al.*, 1997, Bååth et *al.*, 1998 ; Konopka et *al.*, 1999 ; Kuperman et Carreiro, 1997 ; Kelly et *al.*, 1999 ; Ekelund et *al.*, 2003). D'ailleurs même à long terme et pour des faibles teneurs en métaux lourds, les microorganismes ne sont pas capables de maintenir une biomasse équivalente à celle d'un sol non pollué Giller et *al.* (1998). Les expérimentations de Sandaa et *al.* (1999) ont montré qu'il y a une corrélation entre la diminution du nombre des génomes bactériens et les niveaux de concentration en métaux lourds. Dans le sol non contaminé, le génome bactérien est estimé à 16000/g de sol, dans le sol de contamination moyenne à 6400/g de sol et de seulement 2000/g de sol dans un sol fortement contaminé (Sandaa et *al.*, 1999).

3.1.2 Structure de la communauté microbienne :

Le stress par les métaux lourds entraîne des modifications plus ou moins drastiques dans la structure des communautés microbiennes telluriques. Les études de l'impact de métaux lourds sur la diversité de la communauté bactérienne dans le sol ont montré surtout une influence négative (Hirsch et *al.*, 1993 ; Hinojosa et *al.*, 2005 ; Moffett et *al.*, 2003 ; Smit et *al.*, 1997 ; Sandaa et *al.*, 2001).

Les bactéries et les champignons isolés à partir de sols pollués sont plus tolérants à une forte contamination par les métaux lourds que ceux des sols non pollués (Doelman et *al.*, 1994 ; Huysman et *al.*, 1994 ; Mertens et *al.*, 2006). L'ajout de métaux lourds entraîne donc la disparition des populations les plus sensibles et subséquemment l'adaptation des populations les plus résistantes. Ainsi, les équilibres peuvent basculer et les dominances s'inverser (Díaz-Roviña et Bååth, 1996).

3.1.3 Activité enzymatique :

D'autres propriétés biologiques largement étudiées dans les études d'impact concernent les activités enzymatiques, dont les activités respiratoires. L'effet néfaste des

métaux lourds sur les activités enzymatiques du sol a souvent été souligné (Renella et *al.*, 2003 ; Landi et *al.*, 2000 ; Kandeler et *al.*, 1996 ; Kuperman et Carreio, 1997 ; Haanstra et Doelman, 1991 ; Hattori, 1992). La sensibilité des activités vis-à-vis des métaux peut dépendre du type d'enzyme (Renella et *al.*, 2003). Dans une étude portant sur l'impact de différents métaux sur 13 enzymes impliquées dans les cycles du carbone (C), de l'azote (N), du phosphore (P) et du soufre (S), Kandeler et *al.* (1996) ont montré que la réduction de leurs activités était plus ou moins sévère : celles impliquées dans le cycle du carbone étaient moins affectées que celles liées aux cycles du N, P, S.

Les sols contaminés par les métaux lourds peuvent donc perdre certaines de leurs propriétés biochimiques indispensables au bon fonctionnement de l'écosystème. Par exemple, il a été montré que l'activité déshydrogénase était réduite lors d'une contamination par un métal (Doelman et Haanstra, 1979 ; Kelly et *al.*, 1999 ; Kelly et Tate, 1998). Cet effet, parfois sévère, peut aller jusqu'à une réduction de 95% de l'activité (Kelly et *al.*, 1999). L'activité déshydrogénase étant corrélée à l'activité respiratoire du sol, une telle réduction peut avoir des répercussions néfastes significatives sur l'ensemble de l'écosystème du sol, avec une réduction de la décomposition de la matière organique et la perturbation des grands cycles des éléments (Kelly et *al.*, 1999).

3.2 Interaction entre les microorganismes et les métaux lourds :

L'interaction bactéries-métaux lourds a été surtout étudiée dans les environnements extrêmes. La nature des interactions dépend du rôle biologique du métal dans la cellule. Certaines métaux lourds (Ni, CO, Zn, Fe) sont des cofacteurs indispensables de certaines protéines pour leur stabilisation ou leur conformation mais deviennent toxiques à haute concentration (Monchy S.2007), la grande variété de métaux lourds et de leurs effets biologiques nécessite chez la bactérie une régulation fine pour le maintien (homéostasie) et le contrôle de leur concentration intracellulaire (Nies, 1999). Cette régulation évite l'expulsion des métaux essentiels présents aux concentrations homéostatiques, ou l'entrée de métaux en quantité toxique. Les ions métalliques lourds entrent dans la cellule par deux types de voie.

1- Apparentée par une large gamme de substrats ; est rapide, indépendante du métal, fait intervenir des porines exprimées de manière constitutive et dépend uniquement d'un gradient chimiosmotique au travers de la membrane bactérienne.

2- Requiert une consommation d'énergie souvent sous la forme d'hydrolyse et de l'ATP (EX : ABC Transporteurs) (Monchy, S.2007). Ces systèmes sont inductibles en réponse à des besoins particuliers (Nies ET Silver, 1995).

3.3 Mécanismes de résistance des bactéries aux ETM :

A vue de la grande variété des ETM et de leurs effets opposés, les microorganismes doivent contrôler de façon stricte la concentration intracellulaire en ETM, réguler et maintenir l'homéostasie (Nies, 1999) et développer des stratégies de résistance contrebalançant l'effet des hautes concentrations en ETM. En effet, différents mécanismes cellulaires existent et sont mis en œuvre dans la résistance aux ETM. Ils sont résumés ci – après (Figure 7) :

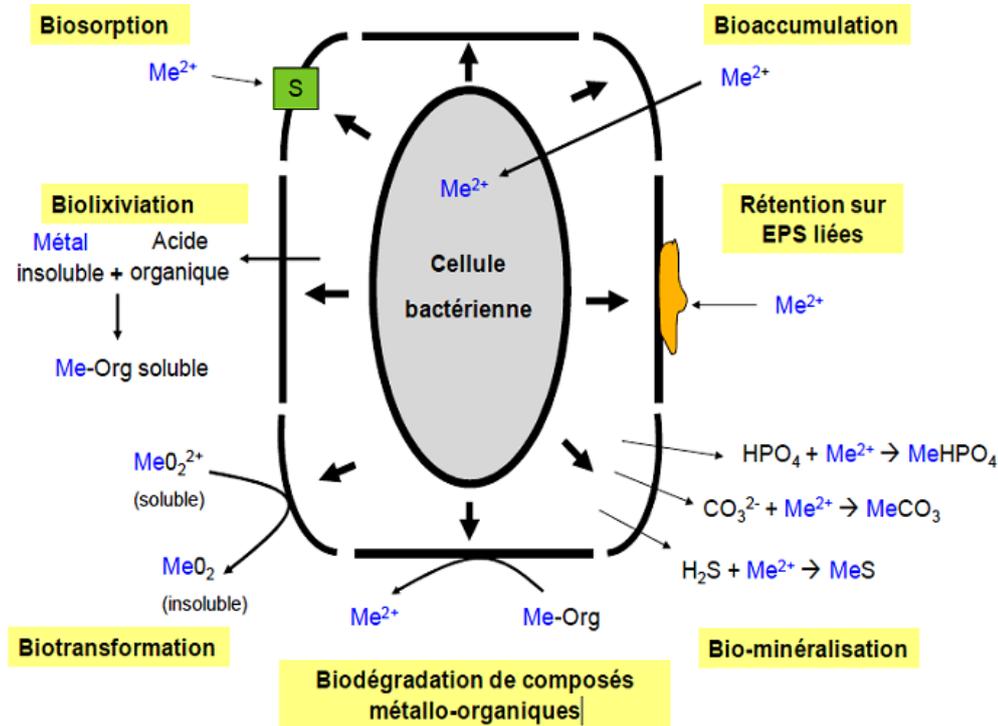


Fig.7 : schématisation des interactions entre les ETM et les bactéries (extrait de la Thèse de Desauay, 2011).

S correspond aux groupements réactifs présent sur la paroi bactérienne. **Me²⁺** correspond à un cation métallique. **.Org** correspond à un composé organique.

3.3.1 La bioaccumulation :

La bioaccumulation regroupe deux modes d'interaction. Le premier consiste en l'adsorption ou la fixation des ETM dans la structure cellulaire sur des sites de liaisons présentant des fonctions anioniques appelés groupements fonctionnels existant au niveau de la surface bactérienne tel que les lipopolysaccharides, les peptidoglycanes et les phospholipides (Badot and Crini, 2007 ; Das, 2008) capables de fixer les métaux. Ce mode est connu sous le terme de biosorption ou « passive uptake » (Malik, 2004).

Le second consiste en l'absorption et la séquestration des ETM à l'intérieur des cellules bactériennes. Elle se fait en deux temps : les ions métalliques sont initialement adsorbés à la surface extracellulaire (mécanisme passif) puis des systèmes de transport spécialisés (protéines de transport tel que ATPases / RND /CDF), qui s'accompagnent en général d'une dépense d'énergie (hydrolyse d'ATP) sont activés pour faire entrer le métal à l'intérieur de la cellule (mécanisme induit) (Nies, 1999). Ce mode d'assimilation est connu sous le terme d'absorption ou assimilation ou « active uptake » (Malik, 2004).

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

3.3.2 La complexation :

Les microorganismes influencent la mobilité et la disponibilité des ETM par leurs activités métaboliques, par la production de composés complexant spécifiquement les ETM (Giller *et al.*, 1998), tel que les sidérophores. Ce sont des composés organiques de faible masse moléculaire, produits par les bactéries et ayant une forte affinité pour le fer ferrique qu'elles chélatent des phases solides là où ils sont piégés et le restituent aux bactéries productrices sous forme de complexe Fe(III) – sidérophore (Neilands, 1993 ; Gadd, 2004).

Cependant, il a été montré que les sidérophores sont également capables de mobiliser d'autres métaux qui peuvent être indésirables pour les bactéries (Birsh et Bachofen, 1990 ; Gázsó, 2001). Les métallothionéines complexent également des métaux. Ce sont de petites protéines, de faibles masses moléculaires riches en cystéine. Elles joueraient plusieurs rôles tels que la détoxification des métaux non essentiels comme le Cd ou le Hg, et la détoxification et le stockage des métaux essentiels, en excès comme le Cu et le Zn (Presta et Stillman, 1997 ; Tapia, 2004).

3.3.3 La précipitation :

La précipitation des métaux sous forme de sulfures insolubles peut se produire grâce aux bactéries sulfato-réductrices. Elles sont capables de réduire en milieu anoxique les sulfates suite à l'oxydation des composés organiques (lactate, acétate, pyruvate) issus de la dégradation de la matière organique. Il se forme alors dans le sédiment de fortes quantités de métaux sous forme de sulfures qui forment avec les ETM des phases solides quasiment insolubles ce qui permet leur précipitation (Gadd, 2010).

3.3.4 La Conversion enzymatique :

La conversion enzymatique consiste à convertir le métal en une forme moins toxique ou en une autre forme qui peut être plus facilement et plus rapidement évacuée de la cellule. Cette transformation peut se faire par voie enzymatique, par oxydation ou par réduction jusqu'à un état d'oxydation moins toxique pour éliminer les ETM comme pour le mercure qui sous l'action d'une enzyme mercurique réductase se réduit en une forme volatile (Silver et Phung, 1996).

Aussi la réduction du sélénium par les produits soufrés tel que le thiosulfate ou les sulfites. Ou par une réduction dissimulatrice qu'est une réaction de réduction couplée à la croissance des bactéries. La réduction dissimulatrice d'une substance par un organisme signifie que cet organisme « respire » la substance. On dit aussi que la substance est utilisée en tant qu'accepteur final d'électrons dans le processus de respiration comme le cas de certaines bactéries comme *Desulfotomaculum reducens* qui réduisent l'U. Ce dernier est utilisé comme accepteur terminal d'électrons (Tebo et Obratsova, 1998 ; Gadd, 2000). Une autre voie de transformation est la biométhylation qui consiste en un transfert enzymatique d'un groupement méthyle sur le métal ou le métalloïde permettant sa volatilisation dans l'atmosphère. C'est le cas de l'arsenic. En effet, certains micro-organismes peuvent méthyler via une méthyl transférase ou déméthyliser l'arsenic, et transformer des espèces inorganiques de l'arsenic considérés comme formes toxiques en formes organiques (méthylarsines) moins réactives, et inversement (Bentley et Chasteen, 2002; Dombrowski et al., 2005). D'autres métalloïdes comme le sélénium, le bismuth, l'antimoine et le tellure peuvent également être detoxifiés par méthylation (Gadd, 1993 ; Bentley et Chasteen, 2002 ; Chasteen et Bentley, 2003).

3.3.5 Les systèmes d'efflux :

La résistance aux ETM peut se faire aussi par un système d'efflux ou extrusion qui réduit ou s'oppose à l'accumulation intracellulaire des ETM. Les mécanismes d'efflux peuvent être des mécanismes actifs permettant de rejeter les métaux à l'extérieur de la cellule par des protéines de membrane spécifiques appelés transporteurs primaires pour lesquels, le transport est directement couplé à l'hydrolyse de l'ATP (transporteur ABC, ATPase). Par exemple, chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 la résistance aux ions Cd(II) est due à leur expulsion active via des transporteurs CAD ATP-dépendant. Ils peuvent également rejeter d'autres cations comme le Pb(II) et le Zn(II) lorsqu'ils sont présents à forte concentration. (Mergeay et al., 2003 ; Monchy, 2007).

Aussi, les mécanismes d'efflux font intervenir des porines secondaires exprimées constitutivement et ils dépendent exclusivement d'un gradient de concentration chimiosmotique entre le milieu intérieur et le milieu extérieur. C'est le cas du système d'extrusion de type antiport cation/proton utilisé pour expulser les ions Ag(I) hors de la cellule chez *Cupriavidus metallidurans* CH34 (Monchy, 2007).

3.3.6 Les systèmes intégrés :

Les mécanismes de résistance à de fortes concentrations en ETM font le plus souvent appel à des opérons qui sont à l'origine d'une défense rapide et efficace de la cellule, et qui sont trouvés sur des plasmides et des chromosomes (Bruins et *al.*, 2000). L'un des exemples connus des systèmes de résistance est l'opéron chromosomique *ars* d'*Escherichia coli* qui code pour la résistance à l'arséniate (As[V]) et l'arsénite (As[III]). Il possède au moins 3 gènes RBC : *arsR* code pour une protéine de régulation ArsR et qui est un répresseur de l'opéron *ars*, contrôlé par la présence de l'As [III]. Le gène *arsB* code une protéine transmembranaire ArsB qui exporte l'As [III] hors de la cellule en utilisant pour énergie, soit le potentiel de membrane, soit le produit de l'ATPase (ArsA) (Ji et Silver, 1992 ; Broer et *al.*, 1993). Et le gène *arsC* qui code l'enzyme arséniate réductase, ou ArsC qui réduit l'As [V] en As [III]. Le système de résistance du plasmide R773 d'*Escherichia coli* quant à lui code pour 5 gènes RDABC (Figure 8) (Chen et *al.*, 1985 ; Chen et *al.*, 1986). Le gène *arsD* est toujours retrouvé sur des opérons encodant le gène *arsA*, suggérant une acquisition commune des deux gènes. La protéine ArsD est un second répresseur de la régulation de l'opéron *ars*. Tandis qu'ArsR régule la transcription de l'opéron *ars*, ArsD fonctionne en tant que répresseur secondaire. Il permet d'éviter une expression trop importante, ou encore d'éviter une surexpression de la protéine ArsB, toxique en forte concentration. L'ArsA, une ATPase couplée à ArsB, c'est la protéine qui permet grâce à l'hydrolyse de l'ATP d'effectuer un efflux énergétique pour exporter l'As [III] hors de la cellule bactérienne.

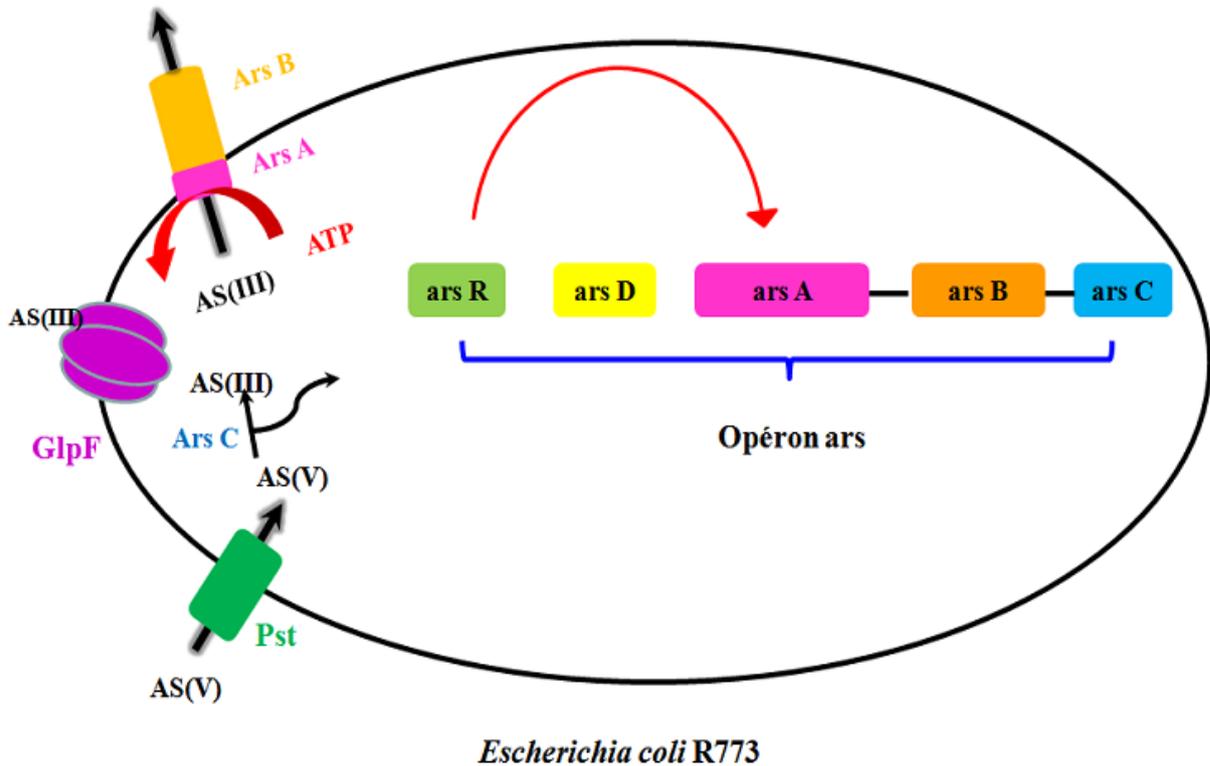


Fig.8 : la structure de l'opéron ars chez *Escherichia coli* R773(Bienert et al.,2008).

3.4 Bactérie résistantes aux métaux lourds :

Il existe des microorganismes qui sont capables de survivre dans des milieux naturels contaminés par les métaux lourds à effet toxique, même à une forte exposition (Mergey et al., 1985). L'une des bactéries les plus résistantes aux métaux lourds est *Cupriavidus metallidurans* CH34, elle a été caractérisée comme résistante au zinc (Zn), cadmium (Cd), cobalt (Co), et nickel (Ni) (Mergey et al., 1985).

3.4.1 *Cupriavidus metallidurans* CH34 : Un modèle de tolérance aux métaux lourds :

Cupriavidus metallidurans CH34, anciennement connue sous les noms de *Wautersia metallidurans*, est une protéobactérie isolée à la fin des années 1970 de sédiments d'un bassin de décantation d'une usine de zinc près de Liège en Belgique (Mergey et al., 1985). Cette bactérie est un bacille non sporulant, Gram négatif, opaque, aérobie-anaérobie facultatif. Elle se développe en condition anaérobie en présence de nitrate. Elle est également capable de se développer sous condition chimiolithotrophe en utilisant le dihydrogène (H₂) comme source d'énergie et le dioxyde de carbone (CO₂) comme source de carbone (Taghavi et al., 1997).

- **Application en bioremédiation:**

C. metallidurans CH34 est tolérante aux métaux lourds ainsi qu'aux composés

aromatiques présents dans l'environnement. Elle a su s'adapter à ce stress d'où son emploi en bioremédiation (Diels et *al.*, 2009). Des travaux ont été réalisés afin de montrer le rôle important de *C. metallidurans* CH34 dans la colonisation et la décontamination de l'environnement pollué par les métaux à des concentrations souvent toxiques pour d'autres microorganismes. La technique la plus récente dans l'emploi des *C. metallidurans* CH34 en bioremédiation, consiste à mettre dans le réacteur à boue Bio Métal, un sol sableux contaminé par les métaux lourds (cadmium (Cd), Zinc (Zn), nickel (Ni), cobalt (Co) et plomb (Pb)) (Diels et *al.*, 2009).. Le concept général du réacteur à boue Bio Métal (BMSR) est qu'une fois le sable inoculé par les bactéries *C. metallidurans* CH34 et mélangé avec l'eau d'effluent contaminée par les métaux lourds, les bactéries précipitent les métaux et le sable est décontaminé. Ces mêmes bactéries seront réutilisées pour d'autres cycles de dépollution.

3.4.2 *Staphylococcus Xylosu* :

C'est une bactérie Gram positive, anaérobies facultatives, coagulase négative à faible pourcentage en bases G et C. Elle appartient au groupe des staphylocoques à coagulase négatives. C'est une bactérie commensale de la peau (Planchon et *al.*, 2006). Cette bactérie est utilisée comme ferment pour la fabrication des produits carnés (saucisson) et laitiers (fromage). Elle joue un rôle important dans le processus de fermentation en participant aux caractéristiques sensorielles des produits (Planchon et *al.*, 2006).

- **Application en bioremediation :**

La *S. xylosus* est utilisé dans plusieurs domaines de la bioremédiation. Elle est résistante à la forte salinité et capable de réduire 15 % de Na Cl et 40% des sels biliaries donc cette bactérie est utilisé pour le traitement biologique des eaux usées salines (Abou-Elela et *al.*, 2010).

La *S. xylosus* a aussi une capacité importante de dégradé le 1,2 dichlorobenzène (1,2 DCB) et le 2,4-dichlorophénol (2,4-DCP) qui sont deux composants aromatiques utilisé dans les produits pharmaceutique et pesticide. Cette capacité est utilisée pour la bioremédiation des sites pollués par ces molécules nocives (Ziagovaa, 2010).

3.4.3 *Serratia marcescens* :

Elle appartient à la famille des Enterobacteriaceae, qui peut produire des pigments. Elle est Gram négatif, ONPG-positives, VP-positive.

D'une manière générale, les espèces du genre *Serratia* sont isolées des plantes (légumes, champignons, mousses), du tube digestif des rongeurs, des insectes, de l'eau et du sol.

Cette bactérie est rarement pathogène, mais elle est fréquemment présente dans l'environnement hospitalier et certaines souches sont responsables d'infections nosocomiales

- **Application en bioremédiation :**

Les pesticides sont des composés organiques synthétiques utilisés pour lutte contre les ravageurs. Toutefois, lorsque des pesticides sont distribués dans l'environnement, ils deviennent des polluants, avec des effets écologiques qui exigent des mesures correctives (Abo-Amer, 2010).

Les pesticides dans le sol et l'eau peuvent être dégradée par des voies biotiques et abiotiques; Cependant, la biodégradation par les micro-organismes est le principal mécanisme de répartition des pesticides et de désintoxication en de nombreux sols. Parmi ces microorganismes on trouve *S. marcescens* qui peut dégrader complètement 50 mg de diazinon / 1L d'un milieu minimum pendant 11 jours avec un taux de dégradation de 0,226 jours⁻¹ (Abo-Amer, 2010).

3.4.4 *Micrococcus luteus* :

Est une bactérie Gram-positive, sphérique, saprophyte faisant partie de la famille des Micrococcaceae². Aérobic obligatoir, *M. luteus* est une bactérie du sol, des poussières, de l'eau Et de l'air et fait partie de la flore naturelle de la peau des mammifères. La bactérie peut aussi coloniser la bouche et des voies respiratoires supérieures humaines (Greenblat, Baum et *al.* 2004). Bien que *M. luteus* n'est pas pathogène et est considéré comme un contaminant naturel, cette bactérie pourrait être un pathogène émergeant engendrant des maladies nosocomiales chez des patients immunodéprimés (Greenblat et *al.*, 2004).

- **Application en bioremédiation :**

M. luteus a un rôle important dans la bioremédiation car elle possède des capacités de tolérer et utiliser les molécules organiques toxiques comme source de carbone et combine ces activités avec la tolérance aux métaux lourds (Sandrin et Maier, 2003). Elle est souvent isolée des sols contaminés, des hydrocarbures et de boues. *M. luteus* peut dégrader les hydrocarbures et les composés oléfiniques (Zhuang et *al.*, 2003).

Chapitre IV :
Test et technique
D'isolement des
rhizobacteries résistantes
aux métaux lourds

1-Différentes approche méthodologique :

Les microorganismes sont donc susceptibles d'être affectés par les métaux lourds au niveau de leurs activités, leur physiologie, leur diversité, autant de perturbations pouvant avoir des conséquences sévères sur l'ensemble de l'écosystème. La réponse des microorganismes telluriques aux métaux lourds peut donc être appréhendée à différents niveaux, et au moyen de techniques variées, mais les interprétations écologiques qui en découlent seront à nuancer. Les études d'impact ont utilisé des approches globales visant à mesurer le nombre de cellules cultivables, la biomasse, les activités enzymatiques, la capacité métabolique, paramètres reflétant un état général des microorganismes du sol suite à une perturbation. En complément de ces approches, des méthodes basées sur l'analyse de molécules bio indicatrices extraites directement du sol (ADN, ARN, phospholipides) se sont avérées efficaces pour contourner les biais et limites habituellement associés aux techniques de culture (White et *al.*, 1998 ; Kozdroj et van Elsas, 2001a).

Ces approches moléculaires se déclinent en une large gamme et permettent d'explorer plus ou moins finement la structure des communautés microbiennes et de mettre en évidence d'éventuelles variations de cette structure en réponse à une pollution par un métal lourd (Kozdroj et van Elsas, 2001a).

Parmi ces test on peut développer les techniques les plus utilisées au laboratoires mais aussi les plus simples et rapides permettant une appréciation rapide de la résistance et des activités des souches bactériennes isolées.

2- Identification des colonies bactériennes :

- Caractérisation morphologique des colonies

Les caractéristiques culturelles des souches sont obtenues après réalisation d'une série de dilutions, puis à partir de chaque dilution 0,1ml sontensemencés dans des boites de Pétri contenant le milieu Luria-Burtani agar (LB). L'incubation se réalisée à 30°C jusqu'à apparition des colonies. après vient la caractérisation des aspects morphologiques.

-Identification biochimique

Certains tests biochimiques peuvent être réalisés pour mieux identifier les souches à savoir : la catalase; la coloration de Gram; l'oxydase, Voges-Proskauer et Rouge de méthyle; la réduction de nitrate ; production de H₂S et production d'indole .

3-Production d'Acide Indole Acétique (AIA) :

En plus du phototropisme, l'AIA est impliqué dans le contrôle de la croissance des fruits, de la dominance apicale, de l'élongation des tiges et de nombreux processus mettant

Chapitre IV : Test et technique d'isolement des rhizobactéries résistantes aux métaux lourds

en jeu la division et la différenciation cellulaires. L'AIA est connu pour déclencher les divisions et de favoriser l'apparition des racines adventives sur les boutures tout en inhibant leur élongation (Karabaghli et *al.*, 1997).

Le tryptophane est le précurseur de biosynthèse d'AIA chez les plantes et les microorganismes (Patil et *al.*, 2011). Au niveau de la rhizosphère, la production de l'AIA par les microorganismes est effectuée à partir des exsudats racinaires. Selon les niveaux de production de l'AIA, on distingue deux groupes microbiens : les microorganismes produisant des quantités modérées et ceux qui produisent des quantités élevées tel que *Pseudomonas sp. As-17* (106 µg/ml) et *Bacillus sp. MiR-4* (92,7 µg/ml) (Ali et *al.*, 2009).

La réponse des plantes à l'AIA exogène peut avoir des effets bénéfiques ou des effets délétères (Lambrecht et *al.*, 2000), sachant que dans plusieurs expériences, l'apport de l'auxine à des concentrations supérieures à celles de la normale, montre que cet apport peut être considéré comme un stress (Hopkins, 2003 ; Liu et *al.*, 1982). Selon ces résultats on distingue des bactéries qui catabolisent l'AIA à partir d'une concentration donnée, c'est le cas de *Dietzia sp.*, et d'autres bactéries tel que *Pseudomonas putida 1290* (Leveau et Lindow, 2005), alors que pour d'autres bactéries, le catabolisme de cette substance peut être absent et la surproduction peut avoir lieu dans la rhizosphère.

L'étude du métabolisme de l'AIA par les microorganismes destinée à la bio-fertilisation présente une démarche importante afin de savoir l'effet des microorganismes sur la disponibilité de l'AIA présent dans le sol et son implication dans la régulation de cette hormone dans le cas d'une surproduction par la microflore rhizosphérique. La sélection d'un bio-fertilisant avec une production modérée en AIA constitue un paramètre important pour assurer un état équilibré de la physiologie végétale.

La production d'AIA est étudiée selon plusieurs protocoles sur différents milieux dont le milieu LB Luria-Bertani agar (LB); (g/l) : tryptone (10); extraits de levure (5); NaCl (5); eau distillée (1000), (pH7,5) puis autoclave. Le milieu est supplémenté avec de L-tryptophane stérilisé par filtration d'une façon à obtenir une concentration finale de 0,1%. Le milieu est réparti dans des tubes stériles (0,3 ml/tube). Après incubation, 1ml est récupéré pour être centrifugé, le surnageant obtenu est mélangé avec le même volume de réactif de Salkowski (1 ml de FeCl₃ à 0,5 mol/L et 49 ml de HClO₄ à 35%). La quantification est effectuée à une longueur d'onde de 530 nm après 30s de l'ajout de réactif de Salkowski (Gumiere et *al.*, 2014). Une courbe d'étalonnage de l'AIA est préparée pour estimer la quantité d'AIA produite.

4- Solubilisation des phosphates :

Par ailleurs, le phosphore est connu comme l'un des minéraux nutritifs, le plus souvent, limitant la croissance des plantes (Vessey, 2003). Dans le sol il existe deux sortes de phosphate, le phosphate organique et inorganique, généralement sous des formes insolubles, ce qui réduit sa disponibilité pour les plantes (Rodriguez et *al.*, 2006). C'est la raison pour laquelle une bactérie qui présente un pouvoir de solubilisation de phosphate est importante. Plusieurs microorganismes solubilisent le phosphate, dont les deux espèces *Penicillium aurantiogriseum* et *Pseudomonas sp.* (PI18/89) qui présentent une capacité de solubilisation très élevée (Illmer et Schinner, 1995).

La méthode décrite par Gaur (1990) permet l'évaluation de la capacité de solubilisation des phosphates sur milieu Pikovskaya (PVK) composé en g/l, de : Glucose (10) ; Extrait de levure (0,5) ; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (5) ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5) ; NaCl (0,2) ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1) ; KCl (0,2) ; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,002); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,002) et agar (15), (pH= 07). tant un milieu de base préconisé à l'isolement des microorganismes solubilisant les phosphates insolubles, il contient du $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ comme seule source de phosphate. Ce test est réalisé par deux méthodes :

- Solubilisation des phosphates sur milieu solide

Un volume de chaque culture bactérienne de 24h est déposé à la surface du milieu PVK puis incubé à 30°C. Un halo de transparence apparaît autour des colonies ayant la capacité de solubiliser les précipités de phosphates. Les résultats sont exprimés par la mesure du diamètre de la zone transparente autour de la colonie (diamètre total moins le diamètre de la colonie) permettant ainsi d'évaluer l'intensité de la solubilisation $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

- Solubilisation des phosphates en milieu liquide

Pour une estimation quantitative du phosphate solubilisé Le milieu PVK liquide est ensemencé de chaque culture bactérienne de 24h. L'incubation est effectuée à 30°C.

Les cultures sont ensuite centrifugées à 3000 rpm/15 min. La quantité de phosphate soluble est mesurée par la méthode colorimétrique de Olsen (Olsen et Sommers, 1982). Pour ceci à 1ml du surnageant sont ajoutés 10ml d'acide chloromolybdique (12mM) et 1ml de chlorure d'étain SnCl_2 (5 mM). Ce volume est ajusté à 50 ml avec de l'eau distillée. La présence d'une couleur bleue indique la production de phosphates solubles. L'intensité de cette couleur bleue mesurée à 620 nm est directement proportionnelle à la concentration de

phosphates dans l'échantillon. Une courbe d'étalonnage standard est effectuée avec une solution de KH_2PO_4 . (Olsen et Sommers, 1995).

5- Production de sidérophores :

La synthèse des sidérophores est induite lors de la croissance en conditions limitantes en fer. La chélation de fer par les bactéries ou champignons est un caractère très recherché et présente un intérêt considérable en agriculture. Cette activité assure d'une part une source de fer assimilable par la plante et d'autre part assure une compétition avec les agents phytopathogènes surtout les champignons, un caractère recherché dans le biocontrôle des agents phytopathogènes . La détection des sidérophores est effectuée par la méthode CAS, ce test est devenu un outil universel pour l'analyse des sidérophores (Raaska et *al.*, 1993). La taille des halos oranges dorés qui apparaît autour des colonies indique l'activité des sidérophores totale (Karuna Gokarn et *al.*, 2010) et la quantité de fer chassée. Ce test est basé sur l'échange compétitive de Fe^{3+} à partir d'un indicateur coloré, chrome azurol-S (CAS) (Raaska et *al.*, 1993). (Miethke et Marahiel, 2007). .

Conclusion générale

Conclusion :

Cette étude à fait ressortir l'intérêt des bactéries du sol dans la rhizosphère , l'interaction avec les plantes et l'intérêt qu'elle leur apporte. Ainsi que le rôle primordiale qu'elles jouent dans le maintient de l'équilibre des écosystèmes.

L'intérêt des bactéries des sols résistants aux métaux lourds réside surtout dans le domaine agricole ou elles peuvent être considérées comme agent fertilisant mais aussi comme élément de bioremédiation dans les conditions extrêmes de pollution.

Plusieurs techniques et testes peuvent nous faire apprécier la résistance de ces dernier et surtout les techniques de dosage des activités enzymatiques de ces bactéries.

En fin la solution biologique bioremédiation reste le meilleur moyen de lutte contre la pollution et ceci a tout les niveaux.

Références bibliographiques

- Abo-Amer et A. E. (2010)**. "Biodegradation of Diazinon by *Serratia marcescens* DI101 and its use in bioremediation of Contaminated Environment." microbiology and biotechnology. 71-80.
- Abou-Elela. S. I. M. M. Kamel. (2010)**."Biological treatment of saline wastewater using a salt-tolerant microorganism." Desalination. 1-5.
- Alexander. D.B. et Zuberer. D.A. (1991)**. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol Fertil Soils. 12:39-45.
- Ali H. Khan E et Sajad MA. (2013)**. Phytoremediation of heavy metals–concepts and applications. *Chemosphere*. 91: 869–881.
- Ali. B. Sabri. A.N. Ljung. K. and Hasnain. S. (2009)**. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. Letters in Applied Microbiology. 48 :542–547.
- Allen V Barker et Pilbeam DJ. (2007)**. Handbook of plant nutrition. CRC Press. Taylor and Francis Group. 632.
- Amir. HG. ZH. Shamsuddin. MS. Halimi. M. Marziah et MF. Ramlan (2005)**. Enhancement in nutrient accumulation and growth of oil palm seedlings.
- ASTDR. (2004)**. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of Health and Human Services Public Health Service U.S. Toxicological Profile for Copper. Doi: <http://w.astdr.gov> (2004).
- ASTDR. (2005)**. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of Health and Human Services Public Health Service U.S. Toxicological Profile for Zinc. Doi: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60.pdf>.
- ASTDR. (2012)**. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Department of Health and Human Services Public Health Service U.S. Toxicological Profile for Cadmium. Doi: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>.
- Bååth E. Diaz-Ravina M. Frostegård A et Campbell CD. (1998)**. Effect of metal-rich sludge amendments on the soil microbial community. Appl. Environ. Microbiol. 64 :238–245.

-
- Badot PM et Crini G. (2007)**. Traitement et épuration des eaux industrielles polluées: Procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique, Presses Univ. Franche-Comté, 356.
- Bais. H.P. T.L. Weir. L.G. Perry. S. Gilroy. et J.M. Vivanco. (2006)**. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 233-266.
- Baize D. (1997)**. Teneurs en éléments traces métalliques dans les sols (France), INRA
- Baudoin J.P. (2001)** . Contribution des ressources phytogénétiques à la sélection variétale de légumineuses alimentaires tropicales. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2001 5 (4) : 221– 230.
- Bell-Perkins, L. J. et J.M. Lynch. (2002)**. Rhizosphere microbiology. 2713-2728. *In* G. Bitton (ed.), *Encyclopedia of environmental microbiology*, A Wiley-Interscience Publication, Canada.
- Bentley R et Chasteen TG. (2002)**. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:250–271.
- Bergqvist C et Greger M. (2012)**. Arsenic accumulation and speciation in plants from different habitats. *Applied Geochemistry.* 27:615–622.
- Birsh L et Bachofen R. (1990)**. Complexing agents from microorganisms. *Experientia* 46 : 827-834.
- Bourrelier PH et Berthelin J. (1998)**. Contamination des sols par les éléments traces: les risques et leur gestion, CR. . Rapport de l'Académie des sciences n°42, 440. Ed. Lavoisier, Paris.
- Brimecombe. M. J. F.A. De Leij. et J.M. Lynch. (2007)**. Rhizodeposition and microbial population, p. 74-98. *In* R. Pinto, Z. Varanini, P. Nannipieri (ed.), *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press. New York.
- Bröer S. Ji G. Bröer A et Silver S. (1993)**. Arsenic efflux governed by the arsenic resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* 175:3480-3485.
- Bruins MR. Kapil S et Oehme FW. (2000)**. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol and environ safety.* 45 : 198-207.
- Cambier P et Mench M. (1998)**. Contamination des sols par les métaux lourds. *Sol interface fragile*, Stengel P, Gelin S, coord. INRA. Eds. 161-172.

-
- Chaignon. V. (2001).** Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse : Ecole doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille.
- Chasteen TG et Bentley R. (2003).** Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants. *Chem Rev.* 103:1–26.
- Chen CM. Mobley HL et Rosen BP. (1985).** Separate resistances to arsenate and arsenite (antimonate) encoded by the arsenical resistance operon of R factor R773, *J Bacteriol.* 161:758-763.
- Chen CM. Misra TK. SilverS et Rosen BP. (1986).** Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. The plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J Biol chem,* 261: 15030 – 15038.
- Chopra. A.K. Pathak. C. et Prasad. G. (2009).** Scenario of heavy metal contamination in agricultural soil and its management. *Journal of Applied and Natural Science* 1, 1: 99-108.
- Coïc Y et Coppenet M. (1989).** Les oligo-éléments en agriculture et en élevage. INRA Editions, Paris.
- Come D. Françoise C. (2006).** Dictionnaire de la biologie des semences et des plantes, Edition Tec et Doc. Lavoisier.
- Das N. Vimala R et Karthika P. (2008).** Biosorption of heavy metals—An overview. *Ind. J. Biotechnol.,* 7 (2)159-169.
- Defago. G. (1993).** 2, 4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathol.* 42: 311–312.
- Desaunay A. (2011).** Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange, par *Escherichia coli* et *Cupriavidus metallidurans* en colonnes de sable d'Hostun. Thèse de Doctorat. Université de Grenoble.
- Dictor MC. Baranger P. Chéry L. Michel K. Barbier J. Clozel B. Touzé S. Le Gall AC et Brosselin P. (2004).** Synthèse des travaux de R&D en France (1999-2004) sur la thématique arsenic. Rapport BRGM/RP-53252-FR. 147.4III. 4Ann.
- Diels L. Dong Q. van der Lelie D. Baeyens W et Mergeay M. (1995).** The *czc* operon of *Alcaligenes eutrophus* CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals. *Journal of Industrial Microbiology* 14:142-153.
- Diels. L.S. Van Roy. et al. (2009).** "From industrial sites to environmental applications with *Cupriavidus metallidurans*." *Antonie Van Leeuwenhoek:* 247-258.

-
- Dombrowski PM. Long W. Parley KJ. Mahony JD. Capitani JF et Di Toro DM, (2005).** Thermodynamic analysis of arsenic methylation. *Environ Sci Technol* 39:2169–2176.
- Doyle. J.J. (1998).** Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science*, 3 (12): 473-478.
- Dudka S et Miller W P. (1999).** Accumulation of potentially toxic elements in plants and their transfer to human food chain. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, vol. 34. no. 4. 681-708.
- Duhoux E. Nicole M. (2004).** Biologie végétale. Associations et interaction chez les plantes. 1-20 Edition DUNOD. Paris. France.
- Dursun. A. M. Ekinici et MF. Donmez (2008).** Effects of inoculation bacteria on chemical content, yield and growth in rocket (*Eruca vesicaria* subsp sativa). *Asian J Chem.* 20:3197–3202 Editions, Paris,- ISSN : 1250-5218 – ISBN : 2-7380-0747-3.408.
- Fergusson JE. (1990).** The heavy elements:chemistry, environmental impact and health effets, 1. Pergamon Press, Oxford, 614.
- Finnegan PM et Chen W. (2012).** Arsenic Toxicity: The Effects on Plant Metabolism. *Front Physiol.*3: 182.
- Friendland AJ. (1990).** Movement of metals through soils in ecosystems, In: Shaw A.J. (Ed) *Metal Tolerance in Plants*. 22-32. CRC Press, Boca Roton, Florida.
- Gadd GM. (1993).** Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. *FEMS Microbiol. Rev* 11:297–316.
- Gadd GM. (2010).** Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology.*156:609–643.
- Gadd, GM. (2004).** Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma.* 122: 109– 119.
- Gadd. GM. (2000).** Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr Opin Biotechnol* 11:271-279.
- Galloway JN. Thornton JD. et Norton SA. (1982).** Trace-metals in atmospheric deposition: A review and assessment. *Atmospheric Environment*, vol. 16. no. 7. 1677-1700.
- Garg N et Singla P. (2011) .** Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms. *Environ. Chem. Lett.* 9: 303–321.
- Gazsó LG. (2001).** The key microbial processes in the removal of toxic metals and radionuclides from the environment, *CEJOEM*, vol. 7. Nos.3-4 : 178-185.

-
- Giller EK. Witter E et Mc Grath SP. (1998).** Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soil : a review. *Soil Biol. Biochem.* 30:1389-1414.
- Glick. B.R. (1995).** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.
- Goyer RA et Clarkson TW. (2001).** Toxic effects of metals. In: D.C. Klassen (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, New York. 811–868.
- Grant CA. Buckley WT. Bailey LD et Selles F. (1998).** Cadmium accumulation in crops. *Can. J. Plant Sci.* 78: 1–17.
- Gray. E. J. et D.L. Smith. (2005).** Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.* 37: 395-412
- Greenblat, C. L. J. Baum. et al. (2004).** "*Micrococcus luteus* – Survival in Amber." *Microbial Ecology.* 120-127.
- Guignard J.L. Dupont F. (2004).** Botanique : systématique moléculaire. 13eme Edition, Masson. Paris. France. 164-179.
- Gumiere. T. Ribeiro. C.M. Vasconcellos. R.L.F. et Cardoso. E.J.B.N. (2014).** Indole-3-acetic acid producing root-associated bacteria on growth of Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*) and Slash Pine (*Pinus elliottii*). *Antonie van Leeuwenhoek.* 105:663–669.
- Haas. D. et G. Defago. (2005).** Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 307-319.
- Haguenoer JM et Furon D. (1981).** Toxicologie et hygiène industrielle, Tome 1: Les dérivés minéraux, Techniques et documentation – Lavoisier, Paris.
- Hallman. J. A. Quadt-Hallman. W.F. Mahaffee et J.W. Kloepper (1997).** Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43: 895-914.
- Haynes, R.J. et R.S. Swift. (1990).** Stability of soil aggregates in relation to organic constituents and soil water content. *J. Soil Sci.* 41: 73–83.
- Hengstler JG. Bolm-Audorff U. Faldum A. Janssen K. Reifenrath M. Gotte W. Jung D. Mayer-Popken O. Fuchs J. Gebhard S. Bienfait HG. Schlink K. Dietrich C. Faust D. Epe B & Oesch F. (2003).** Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis.* 24: 63-73.

-
- Hernández AJ et Pastor J. (2008).** Relationship between plant biodiversity and heavy metal bioavailability in grasslands overlying an abandoned mine. *Environ Geochem Health.* 30: 127-33.
- Hopkins. W.G. (2003).** *Physiologie végétale.* 1 ère édition, De Boeck. 329-330
- Hossain MA. Piyatida P. Teixeira da Silva JA et Fujita M. (2012).** Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: Central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J. Bot.*, Volume 2012, Article ID 872875. 37.
- Hu H. (2000).** Exposure to metals. *Primary Care*, vol. 27. 983–996.2000.
- Hunter P. (2008).** A toxic brew we cannot live without. *Micronutrients give insights into the interplay between geochemistry and evolutionary biology.* *EMBO Rep.* 9: 15–18.
- Ibrahim D. Froberg B. Wolf A et Rusyniak DE. (2006).** Heavy metal poisoning: clinical presentations and pathophysiology,” *Clinics in Laboratory Medicine*, vol. 26, no. 1. 67–97.
- Illmer. P. et Schinner. F. (1995).** Solubilization of inorganic calcium phosphatessolubilization mechanisms. *Soil Bkjl. Biohm*, 27. 3: 257-263.
- Jacobs JA et Foreman C. (2005).** Groundwater and Cadmium: Chemical Behavior and Treatment. *Water Encyclopedia.* 613–619.
- Järup L. (2003).** Hazards of heavy metal contamination. *Brit. Med. Bull.* 68 (1): 167-182.
- Ji G et Silver S. (1992).** Regulation and expression of the arsenic resistance operon from *Staphylococcus aureus* plasmid p1258. *J. Bacteriol.* 174: 3684-3694.
- Ji. G. and Silver. S. (1995).** Bacterial resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *Journal of Industrial Microbiology*, 14:61-75.
- Jourdan. E. M. Ongena. et P. Thonart. (2008).** Caractéristiques moléculaires de l'immunité des plantes induite par les rhizobactéries non pathogènes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 12: 437-449.
- Juste C. Chassin P. Gomez A. Linères M et Mocquot B. (1995).** Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines. *Convention Ademe / I.N.R.A. (contrat INRA n° 22/92.039-contrat Ademe n° 2750007).* 209 .
- K. DAHDAH . A. RAI. LEILA BENSIDHOUM. M.SCHMID. A.HARTMANN ET E.NABTI** CARACTERISATION D'UNE SOUCHE D'ACTIONBACTERIE, DIETZIA SP., PRODUCTRICE DE METABOLITES D'INTERÊT AGRICOLE
- Kabata-Pendias A et Pendias H. (1992).** Trace elements in the soil and plants. 2ème Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida, 365.

-
- Kabata-Pendias. A. Pendias. H. (2001).** Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington D.C.
- Kamilova. F. S. Validov. T. Azarova. I. Mulders. et B. Lugtenberg. (2005).** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ. Microbiol.* 7: 1809–1817.
- Kandeler E. Kampichler C et Horak O. (1996).** Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Boil. Fertil. of Soils* 23:299-309.
- Karabaghli. C. Sotta. B. et Gay G. (1997).** Hormones fongiques, ectomycorhizes et rhizogénèse. *Rev. For. Fr.* XLIX -n° sp.
- Karnwal. A. (2009).** Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-Tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* 91: 61-63.
- Kelly JJ. Häggblom M. Tate III RL. (1999).** Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biol. Biochem.* 31:1445-1465.
- Keneni. A. F. Assefa. et P.C. Prabu. (2010).** Isolation of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of *faba bean* of Ethiopia and their abilities on solubilization insoluble phosphates *J. Agr. Sci. Tech.* 12: 79-89.
- Kennedy. A. C. et L.Z .de Luna. (2004).** Rhizospher. 399-409. *In* D. Hillel, C. Rosenzweig, D. Powlson, K. Scow, M. Singer, D. Sparks (ed.), *Encyclopedia of soil in the environment.* Vol03. Columbia University, USA.
- Keunen E. Remans T. Bohler S. Vangronsveld J et Cuypers A. (2011).** Metal-Induced Oxidative Stress and Plant Mitochondria. *Int J Mol Sci*, 12(10): 6894–6918.
- Khan. A. A. G. Jilani. M.S. Akhtar. S. M. S. Naqvi. et M. Rasheed. (2009).** Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their role in crop production. *J. agric. biol. sci.* 11: 48-58.
- Kim B et McBride MB. (2009).** Phytotoxic effects of Cu and Zn on soybeans grown in field-aged soils: their additive and interactive actions. *J Environ Qual.* 38:2253-2259.
- Kim .K.Y. D. Jordan. et G. A. McDonald. (1998).** Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biol. Fertil Soils.* 26: 79-87.
- Konopka A. Zakharova T. Bischoff M Olivier L. Nakatsu C et Turco RF. (1999).** Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Appl. Envir. Microbiol.* 65: 2256-2259.

-
- Kopittke PM. Asher CJ. Blamey FP et Menzies NW. (2009).** Toxic effects of Cu(2+) on growth, nutrition, root morphology, and distribution of Cu in roots of Sabi grass. *Sci Total Environ.*
- Kopittke PM. Asher CJ. Kopittke RA et Menzies NW. (2007)b.** Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Environ Pollut.* 150: 280-287.
- Kopittke PM. Asher CJ. Blamey FPC et Menzies NW. (2007)c.** Toxic effects of Pb²⁺ on the growth and mineral nutrition of signal grass (*Brachiaria decumbens*) and Rhodes grass (*Chloris gayana*). *Plant and soil.* 300: 127-136.
- Kuperman RG et Carreiro MM. (1997).** Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* 29. 179-190.407(16):4616-421.
- Lambrecht. M. Okon. Y. Broek. A.V. et Vanderleyden. J. (2000).** Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions. *Trends in microbiology.* 8. 7: 298-300.
- Leita L. De Nobili M. Muhlbachova G. Mondini C. Marchiol L et Zerbi G. (1995).** Bioavailability and effects of heavy metals on soil microbial biomass survival during laboratory incubation. *Biol. Fertil. Soils.* 19 : 103-108.
- Lemanceau. P. (1992).** Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp. fluorescents. *Agronomie.* 12: 413-437.
- Leonard A. (1991).** Arsenic. In E. Merian, ed. *Metals and their compounds in the environment.* VCHVerlagsgesellschaft, Weinheim, Germany.
- Leveau. J.H.J. and Lindow. S.E. (2005).** Utilization of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid for Growth by *Pseudomonas putida* Strain 1290. *Applied and environment microbiology.* 71. 5: 2365–2371.
- Levitt. J. (1980).** Responses of plants to environmental stresses. Volume II: Water, radiation, salt, and other stresses. Academic Press, New York.
- Liu. S.T. Perry. K.L. Schardl. C.L. and Kado. C.I. (1982).** Agrobacterium Ti plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 79: 2812-2816.
- Long XX. Yang XE. Ni WZ. Ye ZQ. He ZL. Calvert DV & Stoffella JP. (2003).** Assessing Zinc Thresholds for Phytotoxicity and Potential Dietary Toxicity in Selected Vegetable Crops. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 34: 1421-1434.
- Loué A. (1993).** Les oligoéléments en agriculture, Nathan, Paris, SCPA, Aspach-Le-Bas.

-
- Lugtenberg. B. et F. Kamilova. (2009).** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-56.
- Lynch. J.M. (1990).** The Rhizosphere. Lynch JM, (ed.) John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Malik A. (2004).** Metal bioremediation through growing cells, *Environment International* 30;261-278.
- Malle KG. (1992).** Zink in der Umwelt. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 20. 4: 196-204.
- Manivasagaperuma R. Vijayarengan P. Balamurugan S et Thiyagarajan G. (2012).** Effect of zinc on growth, dry matter yield and nutrient content of *Vigna Radiata* (L.) Wilczek. *International Journal of Recent Scientific Research.* 3: 687 -692.
- Mansor Nurlidia. (2008).** Investigation of lead and zinc dispersion from an abandoned mine site at Tyndrum, Scotland. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences Physiques, Université de Glasgow.
- Mateos-Naranjo E. Redondo-Gómez S. Cambrollé J. Enrique Figueroa M. (2008).** Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. *Mar Environ Res.* 66(4):459-465.
- Mergeay M. Monchy S. Vallaeyts T. Auquier V. Benotmane A. Bertin P. Taghavi S. Dunn J. van der Lelie D et Wattiez R. (2003).** *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 385-410.
- Mergeay. M. D. Nies. et al. (1985).** "*Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals." *J Bacteriol*: 328-334.
- Miethke. M. et Marahiel. M.A. (2007).** Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control. *Microbiology and molecular biology reviews.* 3: 413–451.
- Milner. J.L. L. Silo-Suh. J.C. Lee. H. He. J. Clardy. et J. Handelsman. (1996).** Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3061-3065.
- Minear RA et Keith LH. (1982).** Water analysis, vol1, Inorganic Species, Part1, Academic press, New York.
- Miquel G. (2001).** Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques. <http://www.senat.fr/rap/100261/100261.html>.

-
- Mohammed AS. Kapri A & Goel R. (2011).** Heavy Metal Pollution: Source, Impact, and Remedies. En Biomanagement of Metal-Contaminated Soils, Environmental Pollution, Vol. 20. 1 -28.
- MONCHY. S. (2007).** Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus métollidurans* CH34.thèse de doctorat. 13-33.
- Nakayama. T. Y. Homma. Y. Hashidoko. J. Mizutani. et S. Tahara. (1999).** Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4334-4339.
- Neilands JB. (1993).** Siderophores. Arch Biochem Biophys. 302:1–3.
- Nieboer E and Richardson DHS. (1980).** the replacement of the nondescript term ‘heavy metals’ by abiologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. Pollut. 1(B): 3-26.
- Nies D.H. (1999).** Microbial heavy-metal resistance. Appl Microbiol Biotechnol. 51: 730-750.
- NIES et SILVER. (1995).** Ion efflux système involved in bacterial metal resistance J.Ind Microbiol 14:186-199.
- NIES. (1999).** Microbiologie heavy métal resistance. Appl microbial boitechnol 51:730-750.
- Oremland RS et Stolz JF. (2003).** The ecology of arsenic. Science, 300: 939-944.
- Panda SK. Chaudhury I et Khan MH. (2003).** Heavy metals induce lipid peroxidation and affects antioxidants in wheat leaves. Biol. Plant. 46:289-294.
- Pedersen MB. Kjaer C et Elmegaard N. (2000).** Toxicity and bioaccumulation of copper to black bindweed (*Fallopia convolvulus*) in relation to bioavailability and the age of soil contamination. Arch Environ Contam Toxicol. 39(4):431-439.
- Patil. N.B. Gajbhiye. M. Ahiwale. S.S. Gunjal. A.B. et Kapadnis. B.P. (2011).** Optimization of Indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L 1 isolated from Sugarcane. International journal of environmental sciences. 2. 1: 295-302.
- Peñarrubia L. Andrés-Colás N. Moreno J et Puig S. (2010).** Regulation of copper transport in *Arabidopsisthaliana* : a biochemical oscillator, Journal of Biological Inorganic Chemistry. 15: 29–36.
- Perronnet K. Schwartz C. Gerard E et Morel JL. (2000).** Availability of cadmium and zinc accumulated in the leaves of *Thlaspi caerulescens* incorporated into soil, Plant and soil. 227:257-263.

-
- Piver WT. (1983).** Mobilization of arsenic by natural and industrial processes. In Fowler, B. A. (Ed), Biological and Environmental effects of Arsenic, Topics in Environmental Health, 6: 1 -50, Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Planchon. L.S. S. (2006).** "Physiologie de la croissance en biofilm de *staphylococcus xylosus* par une approche protéomiques".
- Plumlee GS et Ziegler TL. (2003).** The medical geochemistry of dust, soils and other earth materials. In: B.S. Lollar (Ed.), Environmental Geochemistry. Treatise on Geochemistry. Elsevier-Pergamon, Oxford. 264-310.
- Podda F. Zuddas P. Minacci A. Pepi M et Baldi F. (2000).** Heavy metal coprecipitation with hydrozincite [Zn (5)(CO(3))(2)(OH)(6)] from mine waters caused by photosynthetic microorganisms. Appl Environ Microbiol 66:5092-5098.
- Presta A et Stillman MJ. (1997).** Incorporation of copper into the yeast *saccharomyces cerevisiae*. Identification of Cu (I)-metallothionein in intact yeast cells. J Inorg Biochem. 66(4) : 231 –240.
- Pujic. P. et P. Normand. (2009).** La symbiose racinaire entre la bactérie Frankia et les plantes actinorhiziennes. Biofutur. 298: 26-29.
- Raaska. L. Viikari. L. et Mattila-Sandholm. T. (1993).** Detection of siderophores in growing cultures of *Pseudomonas* spp. Journal of Industrial Microbiology. 11. 181-186.
- Ramos Solano. B. J. Barriuso Maicas. et F.J. Gutiérrez Mañero. (2008) a.** Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). 41 - 52. In: I. Ahmad, J. Pichtel et S. Hayat (ed.), Plant-bacteria interactions. Wiley -Vch, Weinheim.
- Ranjard. L. et A. Richaum. (2001).** Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. Res. Microbio. 152: 707-716.
- Rengel. Z. (1999).** Heavy Metals as Essential Nutrients. In: Prasad, M.N.V. & Hagemayer, J. (Eds.). Heavy metal stress in plants: From molecules to ecosystems. Springer-Verlag, Berlin. 231- 251.
- Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 9. N°1. p : 1-19 DAHDAH. (2015) 1**
- Rodriguez. H. Fraga. R. Gonzalez. T. and Bashan. Y. (2006).** Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and Soil. 287:15–21.
- Sagardoy R. Morales F. López-Millán AF. Abadía A et Abadía J. (2009).** Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. Plant Biol (Stuttg).11(3): 339-350.

-
- Saidi N. (2004).** Le bassin versant de la Moulouya : Pollution par les métaux lourds et perspectives de phytoremédiation, thèse de Doctorat d'état Es-Sciences, Université Mohammed V Agdal, Faculté des Sciences, Rabat.
- Sandhya. V. S.K.Z. Ali. M. Grover. G. Reddy. et B. Venkateswarlu. (2009).** Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biol. Fertil. Soils.* 46: 17-26.
- Sandrin. T. R. et R. M. Maier (2003).** "Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants." *Environ Health Perspect:* 1093-1101.
- Schulz H et Schulz U (2000).** Biomonitoring of airborne inorganic and organic pollutants by means of pine tree barks. II. Deposition types and impact levels, *Journal of Applied Botany.* vol. 74. no. 5-6. 248-253.
- Silver S et Phung LT. (1996).** Bacterial heavy metal resistances: new surprises. *Ann. Rev. Microbiol.* 50: 753-789.
- Spaepen. S. J. Vanderleyden. et R. Remans. (2007).** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31: 425-448.
- Stengel P et Gelin S. (1998).** *Sol: Interface fragile.* Edition INRA. 213, Paris, France.
- Taghavi. S. Mergeay. M. et van der Lelie. D. (1997).** "Plasmid": 22–34.
- Tapia L. Gonzalez-Aguero M. Cisternas MF. Suazo M. Cambiazo V. Uauy R et Gonzalez M. (2004).** Metallothionein is crucial for safe intracellular copper storage and cell survival at normal and supraphysiological exposure levels. *Biochem J.* 378: 617 – 624.
- Tebo BM et Obraztsova AY. (1998).** Sulfate-reducing bacterium grows with Cr (VI), U (VI), Mn (IV), and Fe (III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol Lett.* 162:193-198.
- Tilak. K.V.B.R. N. Ranganayaki1. K.K. Pal. R. De. A.K. Saxena. C.S. Nautiyal. ShilpiMittal. A.K. Tripathi. et B.N. Johri. (2005).** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Curr. Sci.* 89: 136-150.
- Tokala. R. K., J.L. Strap. C.M. Jung. D.L. Crawford. H. Salove. L.A. Deobald. F.J. Bailey. et M.J. Morra. (2002).** Novel plant microbe rhizosphere interaction involving *S.lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2161-2171.
- Tremel-Schaud A et Feix I. (2005).** Contamination des sols-transferts des sols vers les plantes, ISBN 2-86883-793-x, EDP Sciences et ADEME éditions, 414 pages, France.
- Uren. N. C. (2007).** Types, amounts, and possible functions of compounds released into the rhizosphere by soil-grown plants, p. 1 -15. *In* R. Pinton, Z. Varanini, et P. Nannipieri

(ed.), *The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, New York.

-Valko M. Morris H et Cronin MTD. (2005). Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Curr Medicinal Chem* 12:1161-1208.

-Van Loon. L.C. (2007). Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.

-Van Loon. L.C. et P.A.H.M. Bakker. (2005). Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria, 39-66. *In* Z.A. Siddiqui (ed.), *PGPR: biocontrol and biofertilization*. Springer Science Dordrecht, The Netherlands.

-Vessey. J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil.* 255: 571–586.

-Walker. T. S. H.P. Bais. E. Grotewold. et J.M. Vivanco. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* 132: 44-5.

-Weissenhorn I. (1994). Les Mycorhizes à arbuscules dans les sols pollués par les métaux lourds: Tolérance aux métaux et rôle dans leur transfert aux plantes. Thèse de Doctorat, Université Nancy I, France.

-Welch RM.1995. Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 14 : 49-82.

-Weyens. N. S. Monchy. J. Vangronsveld. S. Taghavi. et D. Vander Lelie. (2010). Plant Microbe Partnerships, p. 254-2564 .*In* K.N. Timmis (ed.), *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

-Whippes. J. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp Bot.* 52: 487-511.

-Wilkinson JM. Hill J et Livesey CT. (2001). Accumulation of potentially toxic elements in the body tissues of sheep grazed on grassland given repeated applications of sewage sludge. *Animal Science.* 72: 179 – 190.

-Williams LE. Pittman JK et Hall JL. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochim Biophys Acta*, 1465: 104-126.

-Wuana RA et Okieimen FE. (2011). Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation. *ISRN Ecology*, Volume 2011, ID 402647, 20.

-Zahir. Z. A. M. Arshad. et W.T. Frankenberger. Jr. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in agriculture. *Adv. Agro.* 81: 97-198

-
- Zhao FJ. Ma JF. Meharg AA et McGrath SP. (2009).** Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytol.* 181:777-94.
- Zhuang. W. Q. J. H. Tay. et al. (2003).** "Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments." *Lett Appl Microbiol:* 251 -270.
- Ziagovaa. M. G. (2010).** "Comparative studies on the degradation of three aromatic compounds by *Pseudomonas sp.* and *Staphylococcus xylosus.*" *Journal of Environmental Science and Health:* 1017-1025.