

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 : Sciences Biologiques
Spécialité/Option : Microbiologie appliquée
Département : Ecologie et Génie d'Environnement

Thème

Effets des métaux lourds et des herbicides sur la croissance des bactéries d'origine aquatique

Présenté par :

- BRAHMIA Sarra
- SOUADKIA Khouloud
- SOUCHA Imane

Devant le jury :

Dr.AISSAOUI R.
Dr. BENHALIMA L.
Dr.AMRI S.

Président
Promotrice
Examinatrice

Université de Guelma
Université de Guelma
Université de Guelma

Juillet 2019

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH, le Tout puissant, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nos sincères remerciements vont à Monsieur AISSAOUI R., Docteur à l'Université de Guelma, pour avoir accepté de présider le jury de soutenance

Nous remercions également Madame AMRI S., Docteur à l'Université de Guelma, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Beaucoup de reconnaissance et de gratitude à notre enseignante et promotrice Madame BENHALIMA L., sans sa précieuse orientation nous n'aurons jamais pu accomplir ce travail. Nous la remercions pour sa disponibilité à tout moment, sa gentillesse, son soutien, son esprit communicatif performant ainsi que pour les fructueuses discussions scientifiques que nous avons eues tout au long de ce travail et surtout pour ses qualités humaines. Merci pour tout, avec notre plus profond respect.

Nos vifs remerciements s'adressent particulièrement à Madame Hassiba, technicienne du laboratoire de microbiologie à l'université de Guelma, merci pour ta sympathie, ton aide et tes services.

Nos sincères remerciements vont également à l'ensemble de l'équipe des laboratoires pédagogiques, de la bibliothèque et de l'administration; à tous les étudiants de Master II, en particulier nos amies qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail « L'union fait la force ; La foi fait l'union ».

Enfin nous tenons à remercier très chaleureusement nos familles en particulier nos parents pour leur amour et leur soutien constant qui ont contribué à la réussite de ce travail, aussi bien dans les bons moments que dans ceux de doutes et d'impatience. C'est à eux que nous dédions ce modeste travail.

Dédicace

*Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions, je dédie ce
mémoire :*

*A L'âme de mon cher père source de mon inspiration j'espère qu'habite le
paradis.*

*A Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite de par son amour, son soutien,
ses principaux conseils, son assistance et sa présence dans ma vie, elle reçoit
à travers ce travail aussi modeste l'expression de mes sentiments et de mon
éternelle gratitude.*

*A Mes très chers frangins et mes chères petites sœurs qui n'ont cessé d'être
pour moi des exemples de persévérance et de courage.*

A Ma famille sans oubliée personne

A Mes professeurs dans mon parcours scientifique

A Mes chères binômes Imen et Khouloud

*A Mes amies avec lesquelles j'ai partagé cinq ans de ma vie universitaire
sans précisée personne*

Sarra

Dédicace

*Arrivé au terme de mes études, j'ai le grand plaisir de dédier ce modeste travail: **A**
ma très chère mère Samira Bahri*

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

***A** mon très cher père Hamid soucha*

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

***A** l'âme de mon cher grand père source de mon inspiration j'espère que le paradis soit sa dernière destination .*

***A** mes sœurs (Sana, Kawther, Batoul) , **A** mon frère (Maurad)*

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

***A** toute ma grande famille SOUCHA et BAHRI , ma grande mère, mes tantes, mes oncles ainsi que mes cousins et cousines ...*

***A** toutes mes amis , Tous ceux que j'aime et je respecte.*

Imane

Dédicace

Je dédie ce travail avec vif plaisir à ceux qui sont les plus proches à mon cœur, qui m'ont toujours aimé et qui ont fait de toutes leurs forces pour que je sois toujours heureuse :

A L'âme de mon cher père source de mon inspiration j'espère qu'il habite le paradis.

A Ma très chère maman qui m'a entouré d'amour, d'affection et qui fait tout pour ma réussite, que dieu la garde

A Mon frère Walid les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. .

A Ma sœur Wedjdan l'ange de ma vie.

A Ma grande mère chérie qui m'a accompagné par ses prières et sa douceur.

A Mon grand père, vos soins et soutien durable.

A toute ma grande famille : Souadkia et Haddam .

J'aimerais aussi dédier ce travail :

A Mes très chères amies Ahlem , Houda , Fayza , Imen , Sarra , Nhem...

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.

A toute la promotion du Département de l'Ecologie et Génie d'Environnement.

Khouloud

Résumé en Français	
Résumé en Anglais	
Résumé en Arabe	
Liste des figures	
Liste des tableaux et des schémas	
Symboles et abréviations	
Introduction	01
Chapitre I: Synthèse bibliographique	
I. Généralité sur les eaux de surface	04
II. Pollution des eaux de surface par les métaux lourds	04
II.1. Définition des métaux lourds	04
II.2. Origine des métaux lourds dans le milieu aquatique	06
II.3. Impact des métaux lourds	07
II.3.1. Sur l'environnement	07
II.3.2. Sur la santé	07
II.3.3. Sur le compartiment bactérien	08
II.4. Mode d'action des métaux lourds	10
II.5. Mécanismes de résistance bactérienne aux métaux lourds	11
III. Pollution des eaux de surface par les herbicides	12
III.1. Définition et classification des herbicides	12
III.2. Origine des herbicides dans le milieu aquatique	14
III.3. Impact des herbicides	15
III.3.1. Sur l'environnement	15
III.3.2. Sur la santé	15
III.3.3. Sur le compartiment bactérien	16
III.4. Mode d'action d'un herbicide	16
III.5. Mécanisme de résistance bactérienne aux herbicides	17

Chapitre II : Matériel et Méthodes

I. Matériel biologique	18
I.1. Choix et origine des bactéries étudiées	
I.2. Vérification de la pureté des bactéries	18
I.2.1. Revivification des bactéries	18
I.2.2. Isolement des bactéries	20
I.2.3. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes	20
II. Étude de l'effet des métaux lourds et des herbicides sur la croissance des bactéries	21
II.1. Métaux lourds et herbicides testés	21
II.2. Préparation des solutions mères et des solutions filles	21
II.2.1. Métaux lourds	22
II.2.2. Herbicides	22
II.3. Préparation de l'inoculum	22
II.4. Effets des métaux lourds et des herbicides	22
III. Dosage de la Métallothionéine chez les bactéries exposées aux métaux lourds	24

Chapitre III : Résultats et Discussion

I. Vérification de la pureté des bactéries	27
I.1 Revivification	27
I.2. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes	28
II. Effet des métaux lourds sur la croissance des bactéries	28
II.1. Effet du cuivre	28
II.2. Effet du cadmium	34
III. Effet des herbicides sur la croissance des bactéries	39
IV. Dosage de la métallothionéine	46
Conclusion et perspectives	49
Annexes	51

Références bibliographiques 57

Figure	Titre	Page
Figure 1	Classification périodique des éléments traces métalliques (Benedetto, 1997).	05
Figure 2	Description schématique de l'origine des éléments traces dans le milieu aquatique (Lumsdonet al., 2001).	06
Figure 3	Interactions entre les métaux et les bactéries (Ledin, 2000).	09
Figure 4	Classification des herbicides (Schmidt, 2003).	13
Figure 5	Origine des herbicides dans le milieu aquatique (Barriusoetal., 2015).	14
Figure 6	Résultats de la revivification des souches bactériennes collectées.	27
Figure 7	Effet du cuivre sur la croissance d' <i>Escherichia coli</i> K12.	29
Figure 8	Effet du cuivre sur la croissance d' <i>Escherichia coli</i> (E1).	29
Figure 9	Effet du cuivre sur la croissance de <i>Klebsiella oxytoca</i> (E2).	29
Figure 10	Effet du cuivre sur la croissance de <i>Proteus vulgaris</i> (E3).	30
Figure 11	Effet du cuivre sur la croissance de <i>Shigella</i> spp. (E4).	30
Figure 12	Effet du cuivre sur la croissance de <i>Salmonella typhimurium</i> (E5).	31
Figure 13	Effet du cuivre sur la croissance d' <i>Edwardsiella tarda</i> (E6).	31
Figure 14	Effet du cuivre sur la croissance de <i>Citrobacter freundii</i> (E7).	32
Figure 15	Effet du cuivre sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P1).	32
Figure 16	Effet du cuivre sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> (S1).	32
Figure 17	Effet du cadmium sur la croissance d' <i>Escherichia coli</i> K12.	35
Figure 18	Effet du cadmium sur la croissance d' <i>Escherichia coli</i> (E1).	35
Figure 19	Effet du cadmium sur la croissance de <i>Klebsiella oxytoca</i> (E2).	35
Figure 20	Effet du cadmium sur la croissance de <i>Proteus vulgaris</i> (E3).	35
Figure 21	Effet du cadmium sur la croissance de <i>Shigella</i> spp. (E4).	36
Figure 22	Effet du cadmium sur la croissance de <i>Salmonella typhimurium</i> (E5).	36
Figure 23	Effet du cadmium sur la croissance d' <i>Edwardsiella tarda</i> (E6).	36

Figure 24	Effet du cadmium sur la croissance de <i>Citrobacter freundii</i> (E7).	37
Figure 25	Effet du cadmium sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P1).	37
Figure 26	Effet du cadmium sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> (S1).	37
Figure 27	Croissance de certaines bactéries dans les différentes concentrations des agents chimiques testés.	40
Figure 28	Variation de la concentration en métallothionéine chez les bactéries exposées aux métaux lourds.	40
Figure 29	Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de <i>Klebsiella oxytoca</i> (E2).	41
Figure 30	Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de <i>Proteus vulgaris</i> (E3).	41
Figure 31	Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de <i>Shigella</i> spp. (E4).	41
Figure 32	Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de <i>Salmonella typhimurium</i> (E5).	42
Figure 33	Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance d' <i>Edwardsiella tarda</i> (E6).	42
Figure 34	Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de <i>Citrobacter freundii</i> (E7).	42
Figure 35	Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (P1).	43
Figure 36	Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> (S1).	43

- Figure 37** la croissance de certaines bactéries dans les différentes concentrations des agents chimiques testés. 45
- Figure 38** Variation de la concentration en métallothionéine chez les bactéries exposées aux métaux lourds. 47

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Origine des souches bactériennes étudiées	19
Tableau 2	Identification des souches bactériennes étudiées.	28
Tableau 3	Caractéristiques de Brumby 80 EC	55
Tableau 4	Caractéristiques de Desormone Lourd D	56

Liste des schémas

Schéma	Titre	Page
Schéma 1	Protocole de l'étude de l'effet des métaux lourds et des herbicides sur la croissance des souches bactériennes.	23
Schéma 2	Protocole représentatif des principales étapes de dosage de la métallothionéine.	26

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

API : Analytical Profile Index.

ARN : Acide Ribonucléique.

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine Triphosphate.

ATPase : Enzyme qui hydrolyse ou Synthétise ATP.

°C : Celsius.

Cd : Cadmium.

CdCl₂ : Cadmium chloride.

Cu : Cuivre.

Cys : Cystéines.

D : Acide D-ester-butylglycol.

Da : Dalton.

DNTB : Acide 5, 5'-Dithiobis-2-NitroBenzoïque.

DO : Densité Optique.

EC : Concentré Emulsionnable.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique.

ETM : Eléments Traces Métalliques.

EPS : Substance Polymérique Extracellulaire.

GN : Gélose Nutritive.

GSH : Glutathion réduit.

g/mol : Gramme par mole.

g/l : gramme par litre.

HCL : Chlorure d'hydrogène.

K₂HPO₄ : Dipotassium Phosphate.

KH₂PO₄ : Potassium dihydrogen Phosphate.

LB : Milieu Luria Bertani.

M : Molarité.

MIT : Metallinorganic Transport.

mm : Millimètre.

mM : Millimole.

MTs : Métallothionéines.

N : Normalité.

nmol/ml : Nano-mole par millilitre.

PICT : Pollution-Induced Community Tolerance.

PM : Masse Moléculaire.

PMF : Force Matrice Protonique.

pH : Potentiel Hydrogène.

SS : *Salmonella Shigella*.

Résumé

Ce travail a été réalisé dans le but de déterminer l'effet de deux métaux lourds (cuivre et cadmium) et deux herbicides commerciaux (Desormone lourd D et Brumby 80 EC) sur la croissance des bactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma. Neuf souches bactériennes ont été choisies : 7 entérobactéries, une *Pseudomonas* et une staphylocoque. Une souche de référence a été également utilisée *Escherichia coli* K12 ATCC 1079. La métallothionéine a été dosée chez les bactéries exposées aux métaux lourds après 24H d'incubation. Cette étude a été réalisée après une caractérisation phénotypique. Toutes les bactéries sont développées dans toutes les concentrations du cuivre et du cadmium testées. *Staphylococcus aureus* a pu croître avec une densité très importante (DO = 0,962) à 1600 µg/ml de cuivre après 48H d'incubation. Des pics de croissance sont observés pour *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii* et *Staphylococcus aureus* à 800, 1600 et 400 µg/ml de cadmium. L'impact des herbicides sur les bactéries, au niveau qualitatif, est majoritairement faible. La plupart des densités de croissances sont importantes vis-à-vis du Desormone lourd D. En revanche, les densités optiques les plus faibles sont enregistrées vis-à-vis de 1000 µg/ml de Brumby 80EC. Toutes les souches bactériennes expriment des concentrations de métallothionéine après exposition au cuivre ainsi qu'au cadmium. La sur-expression de la métallothionéine est observée chez *Klebsiella oxytoca* suivi par *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Proteus vulgaris* après une exposition à 1600 µg/ml du cadmium.

Mots-clés : métaux lourds, herbicides, bactéries aquatiques, impact, métallothionéine.

This work was conducted to determine the effect of two heavy metals (copper and cadmium) and two commercial herbicides (Heavy Desormone D and Brumby 80 EC) on the growth of bacteria isolated from surface waters in the region of Guelma. Nine bacterial strains were chosen: 7 *Enterobacteriaceae*, one *Pseudomonas* and one *Staphylococcus*. A reference strain was also used *Escherichia coli* K12 ATCC 1079. Metallothionein was dosed in bacteria exposed to heavy metals after 24 hours of incubation. This study was performed after phenotypic characterization. All bacteria are grown in all concentrations of copper and cadmium tested. *Staphylococcus aureus* was able to grow with a very high density (OD = 0.962) at 1600 µg / ml of copper after 48 hours of incubation. Growth peaks were observed for *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii* and *Staphylococcus aureus* at 800,1600 and 400 µg / ml cadmium. The impact of herbicides on bacteria, at the qualitative level, is mainly low. Most growth densities are significant with respect to the heavy Desormone D. On the other hand, the lowest optical densities are recorded against 1000 µg / ml of Brumby 80EC. All bacterial strains express concentrations of metallothionein after exposure to copper and cadmium. Over-expression of metallothionein is observed in *Klebsiella oxytoca* followed by *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus vulgaris* after exposure to 1600 µg / ml of cadmium.

Key words: heavy metals, herbicides, aquatic bacteria, impact, metallothionein.

أجري هذا العمل لتحديد تأثير اثنين من المعادن الثقيلة (النحاس والكادميوم) واثنين من مبيدات الأعشاب التجارية (Desormone lour d , Brumby 80 EC) على نمو البكتيريا المعزولة من المياه السطحية في منطقة قالمة. تم اختيار تسع سلالات بكتيرية: 7 بكتيريا معوية ، وواحدة قزائفة وواحدة من المكورات العنقودية. تم استخدام سلالة مرجعية أيضاً الاشريكية القولونية ك12 (ATCC 1079) (*Escherichia coli*) وقد تم إضافة جرعات من الميتالوثيونينفي البكتيريا المعرضة للمعادن الثقيلة بعد 24 ساعة من الحضانة. أجريت هذه الدراسة بعد تحديد الوصف المظهري. تطورت جميع البكتيريا في جميع تركيزات النحاس والكادميوم المختبرة. وتمكنت المكورات العنقودية الذهبية من النمو بكثافة عالية للغاية (ك ص = 0.962) عند 1600 ميكروغرام / مل من النحاس بعد 48 ساعة من الحضانة. وقد لوحظت ذروة النمو ف *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii* et *Staphylococcus aureus* عند 800400, و 1600 ميكروغرام / مل من الكادميوم. تأثير مبيدات الأعشاب على البكتيريا ، على المستويات النوعي ، منخفض بشكل أساسي. تكون معظم كثافات النمو مهمة فيما يتعلق ب Desormone lour d ومن ناحية أخرى، يتم تسجيل أقل الكثافة البصرية فيما يتعلق ب 1000 ميكروغرام / مل من و Brumby 80EC . جميع السلالات البكتيرية تعبر عن تركيز ميتالوثيونين بعد التعرض للنحاس والكادميوم. لوحظ فرط التعبير عن ميتالوثيونين في *Proteus vulgaris* و *Klebsiella oxytoca* suivi par *Edwardsiella tarda*, *Pseudomonas aeruginosa* بعد التعرض إلى 1600 ميكروغرام / مل من الكادميوم.

الكلمات المفتاحية: المعادن الثقيلة، مبيدات الأعشاب، البكتيريا المائية، التأثير، ميتالوثيونين.

Introduction

Les substances chimiques utilisées dans les différents domaines pour les diverses activités et pour la recherche scientifique sont le plus souvent retrouvées dans l'environnement. Le rejet des eaux usées dans le réseau d'assainissement communal ou bien dans le milieu naturel directement sans aucun traitement préalable, génère un risque pour la santé humaine et présente une contribution significative à la contamination générale des différents écosystèmes et plus particulièrement des milieux aquatiques (Verlicchiet *al.*, 2012).

En tant qu'écosystèmes récepteurs, suite au transfert des molécules, les milieux aquatiques, et notamment les systèmes lotiques situés dans des zones d'utilisation intensive de ces substances, sont particulièrement vulnérables. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence la forte contamination des cours d'eau par les métaux et les pesticides au cours de ces dernières années (Belyaeva *et al.*, 2005 ; Comoretto et Chiron, 2005). Ces études soulignent la nette prédominance des herbicides et des métaux lourds dans le panorama général de contamination (IFEN, 2004).

L'Algérie a connu ces dernières décennies une forte croissance démographique, une urbanisation massive et un développement des activités industrielles qui ont généré une pollution importante des ressources en eau. Les polluants les plus fréquemment rencontrés sont : des microorganismes multi-résistants et des micropolluants tels que les produits pharmaceutiques, les métaux lourds, les détergents, les pesticides, les solvants et autres (Bouziyani, 2000).

L'accumulation de ces polluants, en particulier les éléments traces métalliques et les herbicides, dans les écosystèmes aquatiques peut se répercuter sur la santé des êtres humains et des animaux (Wang *et al.*, 2003).

A l'échelle microscopique, il est envisageable que certains polluants puissent affecter directement quelques espèces bactériennes et modifier ainsi la diversité au sein de la population (Johnsen *et al.*, 2001).

Ces effets directs et/ou indirects peuvent avoir des répercussions importantes sur le fonctionnement de l'écosystème, les bactéries hétérotrophes jouant un rôle primordial au niveau des flux nutritifs, en assurant la majorité du recyclage de la matière organique (Amblard, 2012). La perturbation par les éléments traces métalliques et les herbicides des communautés bactériennes peut donc engendrer un dysfonctionnement de la boucle

microbienne et se répercuter ainsi par une cascade trophique sur les communautés biologiques des maillons supérieurs (Brock *et al.*, 2000).

Les métaux lourds et les herbicides provoquent divers effets nuisibles tels que l'allongement de la phase de latence, l'inhibition des activités enzymatiques, l'altération de la structure de l'ADN, la modification de la composition et de la structure des populations microbiennes, et la réduction de la diversité microbienne (Riether, 2007).

Pour faire face à la profusion de ces polluants dans l'environnement, les bactéries ont élaboré plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et/ou de croître, ces mécanismes étant dans plusieurs cas véhiculés par des plasmides (Karbasizaedet *al.*, 2003).

La dissémination de la résistance aux agents chimiques représente un avantage écologique pour les bactéries, spécialement dans les environnements pollués. Par contre, le transfert des gènes de résistance entre des bactéries allochtones et autochtones dans l'environnement peut présenter un risque potentiel pour la santé publique.

Dans cette optique, nous avons entrepris une étude sur l'impact de certains agents chimiques sur des bactéries d'origine aquatiques. Ceci permettra la sélection des bactéries caractérisées par un potentiel de résistance nécessaire pour tout projet de bioremédiation.

Nos objectifs spécifiques sont :

- D'étudier l'effet de deux métaux lourds (cuivre et cadmium) et deux herbicides commerciaux (Desormone lourd D et Brumby 80EC) sur la croissance des bactéries isolées à partir des eaux de surface de la région de Guelma ;
- Doser la Métallothionéine, protéine de régulation de l'homéostasie des métaux, afin de déterminer un mécanisme de résistance évoqué ;

Ce mémoire s'organise en trois chapitres principaux :

- Le premier décrit le cadre scientifique dans lequel s'inscrit ce travail, faisant une synthèse bibliographique concernant la contamination des cours d'eau par les métaux lourds et les herbicides, et relatant précisément l'effet de ces polluants sur l'environnement et les organismes vivants ;
- Le deuxième chapitre relate notre travail expérimental ainsi que les protocoles analytiques utilisés ;

- Le troisième chapitre présente les résultats obtenus et les discussions engendrées par ces résultats.

Enfin, une conclusion fait l'objet d'une synthèse des principaux résultats acquis et quelques perspectives de recherche découlant de ce travail achèveront ce mémoire.

Chapitre I :

Synthèse

bibliographique

Sont tous les eaux qui circulent ou qui sont stockées à la surface des continents. Ces eaux sont naturellement alimentées par les précipitations et perdues par l'évaporation et l'infiltration souterraine dans le sol. Elles peuvent se trouver stocker en réserves naturelles (lacs) ou artificielles (retenus de barrages) (Lundberg, 1995).

Le fonctionnement physique et biologique des eaux de surface est contrôlé par des contraintes environnementales variées, conduisant à une grande variabilité spatiale et temporelle (Lamy et Dubreuil, 2011). Ils présentent une hydrologie particulière marquée par une forte inertie, caractérisée par une sensibilité plus accrue aux variations naturelles (variation saisonnière, événements climatiques intenses...). Cette inertie a de fortes conséquences sur les paramètres physico-chimiques, microbiologiques et biologiques (Lundberg, 1995).

Actuellement, les eaux de surface sont confrontées à plusieurs sources de pollutions : retombées atmosphériques, produits toxiques, métaux lourds, engrais, pesticides, effluents domestiques et industriels ; Ces différents polluants conduisent à une dégradation physique, chimique ou biologique de la qualité de l'eau, et par conséquent une perturbation des conditions de vie et un déséquilibre du milieu aquatique (Voegborioet al., 2011).

Dans la présente étude nous nous intéressant par la pollution des eaux de surface par les métaux lourds et les herbicides.

II. Pollution des eaux de surface par les métaux lourds

II.1. Définition des métaux lourds

Les métaux lourds sont les éléments métalliques naturels dont la masse volumique dépasse 5 g/cm^3 . Ceux-ci sont présents le plus souvent dans l'environnement sous forme de traces : mercure, plomb, cadmium, cuivre, arsenic, nickel, zinc, cobalt, manganèse etc (Arris, 2008).

Les métaux lourds montrés dans la figure 1, sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantités très faibles sous forme de traces.

Il s'agit de tous les éléments de transition possédant une orbital d'insaturée, y compris les lanthanides et les actinides (bloc d et f de la classification de Mendeleïev), à

l'exception du scandium, du titane et de l'yttrium. De même, parmi les métaux lourds, les éléments intermédiaires les moins électronégatifs du bloc p, parmi lesquels figurent le plomb et l'étain (Benedetto, 1997).

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

Figure 1 : Classification périodique des éléments traces métalliques (Benedetto, 1997).

D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds » désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g/cm³(Adriano, 2001).

Du point de vue biologique, nous distinguons deux types de métaux, selon leurs effets physiologiques et toxiques :

- ✓ Les métaux essentiels ou oligoéléments sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques. Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), et du fer (Fe)(Loué, 1993).
- ✓ Les métaux non essentiels ou toxiques ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants, même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg), et du cadmium (Cd) (Chiffolleau, 2004).

II.2. Origine des métaux lourds dans le milieu aquatique

Les éléments métalliques sont, sous différentes formes, toujours présents au sein du milieu aquatique (Mohan *et al.*, 2006). Leur présence résulte de causes naturelles et des activités humaines (Figure 2) (Benedetto, 1997).

- **Origines naturelles** : comme d'autres substances, les métaux sont présents dans notre environnement en quantité plus ou moins importantes, pouvant aller des traces jusqu'au métal pratiquement pur dans certains gisements miniers (source naturelle des métaux). Les réserves les plus importantes se trouvent dans les roches et/ou les sédiments océaniques (Chiffoleau *et al.*, 2001).
- **Origines anthropiques** : en dehors des concentrations de fond il existe trois sources principales de métaux lourds (Duchaufour, 1997) :
 - ✓ Apports d'origine agricole (amendements organiques, engrais minéraux, pesticides).
 - ✓ Résidus industriels et urbain.
 - ✓ Retombés atmosphériques.

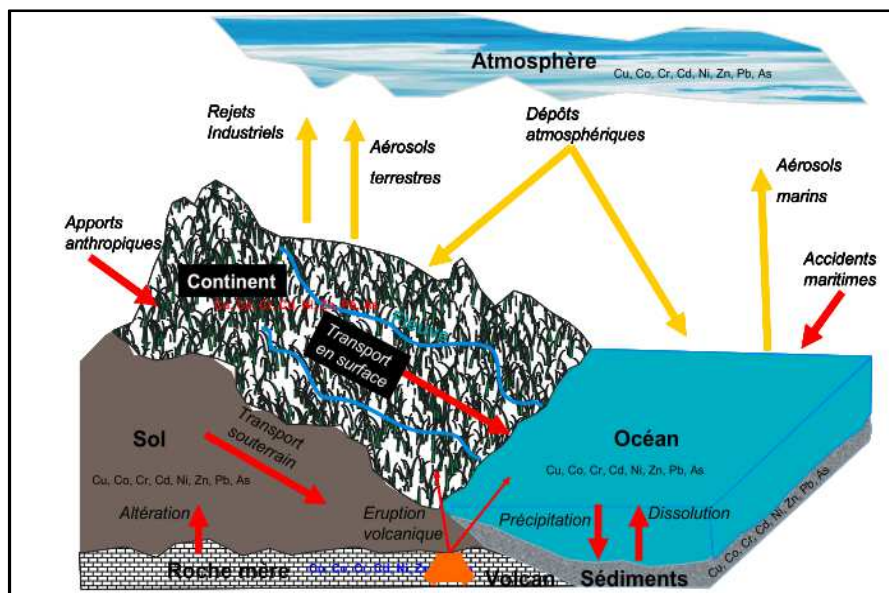


Figure 2: Description schématique de l'origine des éléments traces dans le milieu aquatique (Lumsdon *et al.*, 2001).

II.3. Impact des métaux lourds

L'existence des éléments traces sous des formes solubles, échangeables, incluses dans les minéraux, précipitées ou complexées définit le potentiel polluant et son impact sur la qualité des sols et des eaux ainsi que la toxicité pour les êtres vivants (Yao, 2008).

II.3.1. Sur l'environnement

Les quantités disponibles des métaux dans l'environnement sont infimes et ils n'ont aucune signification. Mais lorsque les conditions changent de telle manière que les métaux redeviennent solubles, l'augmentation de la concentration devient alors une menace directe pour l'environnement du fait de l'augmentation de leur disponibilité pour les plantes (Koumolouet *al.*, 2010).

La contamination de l'environnement aquatique par les éléments traces métalliques (ETM) est un des problèmes majeurs auxquels est confrontée la société actuelle. Ces métaux transitent dans la colonne d'eau avant de s'accumuler dans les sédiments où ils sont impliqués dans de nombreuses réactions biogéochimiques susceptibles de modifier plus ou moins fortement leur spéciation et donc leur bio-disponibilité pour l'ensemble du réseau trophique (Lesven, 2008).

En outre, depuis quelques années, les pluies acides augmentent la mobilité des métaux dans le sol et causent donc une augmentation de leur concentration dans les produits agricoles (Hachfi, 2013).

Les effets observés à des niveaux trophiques supérieurs se manifestent notamment par un retard du développement des embryons, des malformations et une moins bonne croissance des adultes chez les poissons, les mollusques et les crustacés ; par ailleurs, selon certaines études, les métaux lourds auraient aussi un impact négatif sur les communautés bactériennes telluriques (Barnabas, 2009).

II.3.2. Sur la santé

Certains éléments métalliques n'ont aucun rôle dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme et sont directement toxiques, comme le mercure, le plomb ou le cadmium, d'autres sont indispensables (appelés oligo-éléments) comme le sélénium ou le fer.

Les espèces aquatiques, les algues et les poissons, accumulent les métaux lourds par le processus de bioaccumulation, en rentrant dans la chaîne alimentaire de l'homme tels que le mercure et le plomb, ils peuvent causer des problèmes sanitaires (**Bonnard, 2003**).

Des effets indésirables ont été observés chez les poissons, les mollusques et les crustacés qui se manifestent par retard du développement embryonnaire, des malformations, une croissance tardive des adultes (**Zhao et al., 2000**), des perturbations de la reproduction et l'augmentation ou la baisse du taux des biomarqueurs de défenses (**Huynh, 2009**).

Chez les plantes sensibles aux métaux, la toxicité peut être reliée à plusieurs causes: l'inhibition de l'activité ou la déformation structurale d'une protéine, la formation de radicaux libres ou d'espèces réactives de l'oxygène et la substitution du métal par un analogue toxique dans la protéine cible (**Vanassche et Clijsters, 1990 ; Clemens, 2001 ; Hall, 2002**).

En général, les humains sont exposés aux métaux lourds par voie orale (l'ingestion, boisson ou nourriture), par voie respiratoire (inhalation) ou par voie cutanée, une exposition permanente à de petites doses de métaux peut déclencher de nombreuses réactions chez l'être humain telles qu'une atteinte rénale, une atteinte visuelle, trouble de la reproduction et des troubles de la fonction thyroïdienne (**Martin et Griswold, 2009**). Les métaux lourds ont aussi un caractère potentiellement cancérigène (**Aubin, 2016**).

II.3.3. Sur le compartiment bactérien

En effet, les métaux lourds sont réputés toxiques pour la plupart des microorganismes, car ils affectent leurs croissances, leurs morphologies, et leurs métabolismes. Ces altérations conduisent à des réductions de la biomasse bactérienne ce qui peut affecter la pérennité de l'écosystème (**Hébrard-Labit, 1998**).

Vue de la grande variété des ETM et de leurs effets opposés, les microorganismes doivent contrôler de façon stricte la concentration intracellulaire en ETM. Les interactions bactéries-métaux lourds observées dans les environnements extrêmes sont représentées dans la figure 3.

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 capables de fixer les métaux (Badot et Crini, 2007 ;Urien, 2015). Ce mode est connu sous le terme de biosorption ou « passive uptake ». Le second consiste en l'absorption et la séquestration des ETM à l'intérieur des cellules bactériennes (Aurélien, 2011).

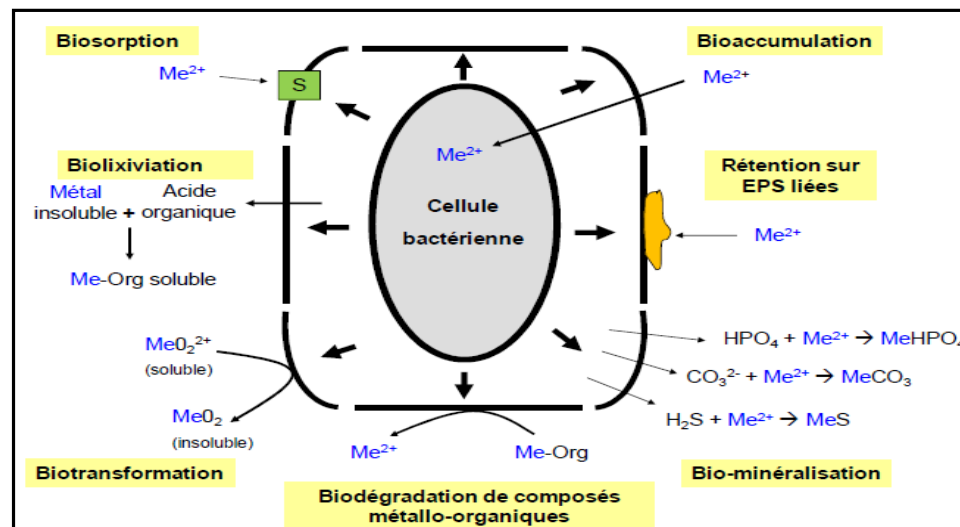


Figure 3 : Interactions entre les métaux et les bactéries (Ledin, 2000).

S : groupements réactifs présents sur la paroi bactérienne. Me^{2+} : un cation métallique.

Org : un composé organique.

- ❖ Vu l'hétérogénéité des effets des polluants métalliques, nous nous intéressons à décrire ceux liés au cuivre et au cadmium.

• Cuivre :

C'est un élément chimique de symbole Cu et de numéro atomique 29. Métal de couleur rougeâtre, il possède une haute conductivité thermique et électrique à température ambiante (Baize, 1997).

Il est présent naturellement dans la croûte terrestre et dans les océans, les lacs, les rivières sous différentes formes et concentrations.

Les sources anthropiques de cuivre dans l'environnement sont liées à la production, à l'utilisation ou à l'élimination du cuivre métal (plus ou moins pur, affiné ou raffiné) et/ou des composés du cuivre et/ou des alliages du cuivre (Dameron et Howe, 1998).

Le cuivre est un métal essentiel, toxique à faible et à forte dose. Sa toxicité pour les microorganismes a été démontrée par Joachim *et al.* (2009), qui a constaté qu'une

concentration de 25 µg/l a conduit à une diminution en abondance de plusieurs taxons de diatomées (*Cocconespp.Gomphonemaspp.*), de macrophytes (*Lemna minor*, *Nasturtium officinale*), de champignons aquatiques (*Clavariopsis aquatica*), de zooplancton (*Mytiliniasp.*, *Trichocercasp.*) et de macro invertébrés (*Lymnaeasp.*, *Gammaruspulex*).

Les effets à court terme sur les mollusques, insectes, poissons, oiseaux d'eau et divers animaux venant s'abreuver seraient également désastreux (Mc Ardle, 1995).

- **Cadmium :**

C'est un élément chimique de symbole Cd et de numéro atomique 48. C'est un métal blanc argent, légèrement bleuté, appartenant à la famille des métaux de transition, possède 8 isotopes naturels stables de masse atomique 106 (Andujar *et al.*, 2010).

Le cadmium est un élément relativement rare présent dans l'écorce terrestre à des concentrations faibles. Sa dispersion dans l'environnement (en particulier les systèmes aquatiques) est liée aussi aux nombreuses activités industrielles et à l'épandage d'engrais phosphatés faisant intervenir cet élément atmosphérique.

Au sein des milieux aquatiques, le cadmium est considéré comme un des métaux les plus toxiques et représente un risque pour les organismes aquatiques (Garin et Simon, 2004).

Les effets de ce métal sont multiples et complexes et les dommages intracellulaires générés concernent tous les types de biomolécules : dénaturation de certaines protéines, peroxydation lipidique, cassures de l'ADN, répression ou au contraire surexpression de nombreux gènes (Liao *et al.*, 2002).

II.4. Mode d'action des métaux lourds

Chez les plantes, les métaux lourds peuvent précipiter avec des ligands anioniques ou entrer en compétition avec d'autres cations pour des sites de liaison de la paroi pectocellulosique des cellules racinaires.

Dû au fait que la paroi présente une considérable capacité d'échange des cations, la première action des métaux lourds sera l'inhibition ou la stimulation de l'absorption des cations, causant des changements significatifs du métabolisme (par exemple un stress dû à la déficience en fer) (Michel, 2009). Les métaux induisent également un abaissement de la photosynthèse et une altération de processus vitaux tels que le transport (Cseh, 2002).

Chez les animaux, les métaux lourds perturbent les équilibres et les mécanismes biologiques, provoquant des effets toxiques. Ils peuvent affecter le système nerveux, les fonctions rénales, hépatiques, respiratoires...

Chez les microorganismes, la toxicité intracellulaire des ions métalliques lourds relève de divers mécanismes (Monchy, 2007) :

- L'inhibition des activités enzymatiques par fixation des cations métalliques sur des résidus cystéine, acide glutamique ou acide aspartique qui font partie du site actif de plusieurs enzymes ;
- L'altération de la structure des acides nucléiques par fixation des cations métalliques sur les groupements phosphates entraînant ainsi des modifications de structure empêchant la transcription ou la traduction des gènes ;
- L'interaction avec des molécules oxygénées réactives issues des processus cellulaires respiratoires, ce qui entraîne la formation de radicaux libres qui peuvent endommager l'ADN (mutation), les protéines (par pontages entre ou intra moléculaires) ou encore les acides gras insaturés de la membrane cellulaire.

II.5. Mécanismes de résistance bactérienne aux métaux lourds

Il existe plusieurs mécanismes de résistance aux métaux chez les bactéries. Ces mécanismes comprennent (Claire, 2012 ; Maynaud, 2012):

- **Exclusion par perméabilité de la membrane** : les bactéries forment naturellement un « revêtement » de polysaccharides extracellulaires, absorbant les ions métalliques et les empêchant d'interagir avec les composés cellulaires vitaux ;
- **Efflux actif** : il s'agit du mécanisme de résistance le plus utilisé par les microorganismes. Ils utilisent les mécanismes de transport actif pour exporter les métaux toxiques depuis leur cytoplasme jusqu'au milieu extracellulaire. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, l'ion Cu^{2+} est exporté par un mécanisme impliquant des protéines séquestrant le cuivre dans le périplasme ;
- **Séquestration intracellulaire des métaux lourds par la production de diverses protéines chélatantes** : Les Méthallothionéine sont des protéines intracellulaires riches en cystéine, elles ont été identifiées comme capable de séquestrer des cations de Cd^{2+} , Cu^{2+} et Zn^{2+} ;

- **La détoxification enzymatique** : Elle fait appel à des gènes impliqués dans la réduction des composés métalliques ;
- **La réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des métaux** : Cette protection se déroule par mutation, diminuant ainsi la sensibilité sans altérer les fonctions de base de la cellule ;
- **La production de sidérophores** : En liant le métal dans le milieu extracellulaire, le sidérophore diminue la concentration en métaux libres, affectant sa diffusion dans la bactérie et ainsi sa toxicité.

III. Pollution des eaux de surface par les herbicides

III.1. Définition et classification des herbicides

Un herbicide est un produit phytopharmaceutique à usage agricole qui cible plus précisément les mauvaises herbes. Il s'agit de molécule, de synthèse ou d'une substance naturelle, qui possède une activité sur le métabolisme des plantes entraînant ainsi la mort de ces dernières, il sert à éliminer les plantes indésirables qui ne peuvent que nuire aux rendements, en raison de la compétition sur les nutriments ou sur l'espace, qu'elles exercent sur les cultures en émergence (**Giroux, 2004**).

Les herbicides sont classés selon différents critères, que ce soit le but, le moment d'application (ou de traitement), mode de pénétration dans la plante ou bien la famille chimique ou la sélectivité. La figure (4) résume la classification des herbicides selon ces critères.

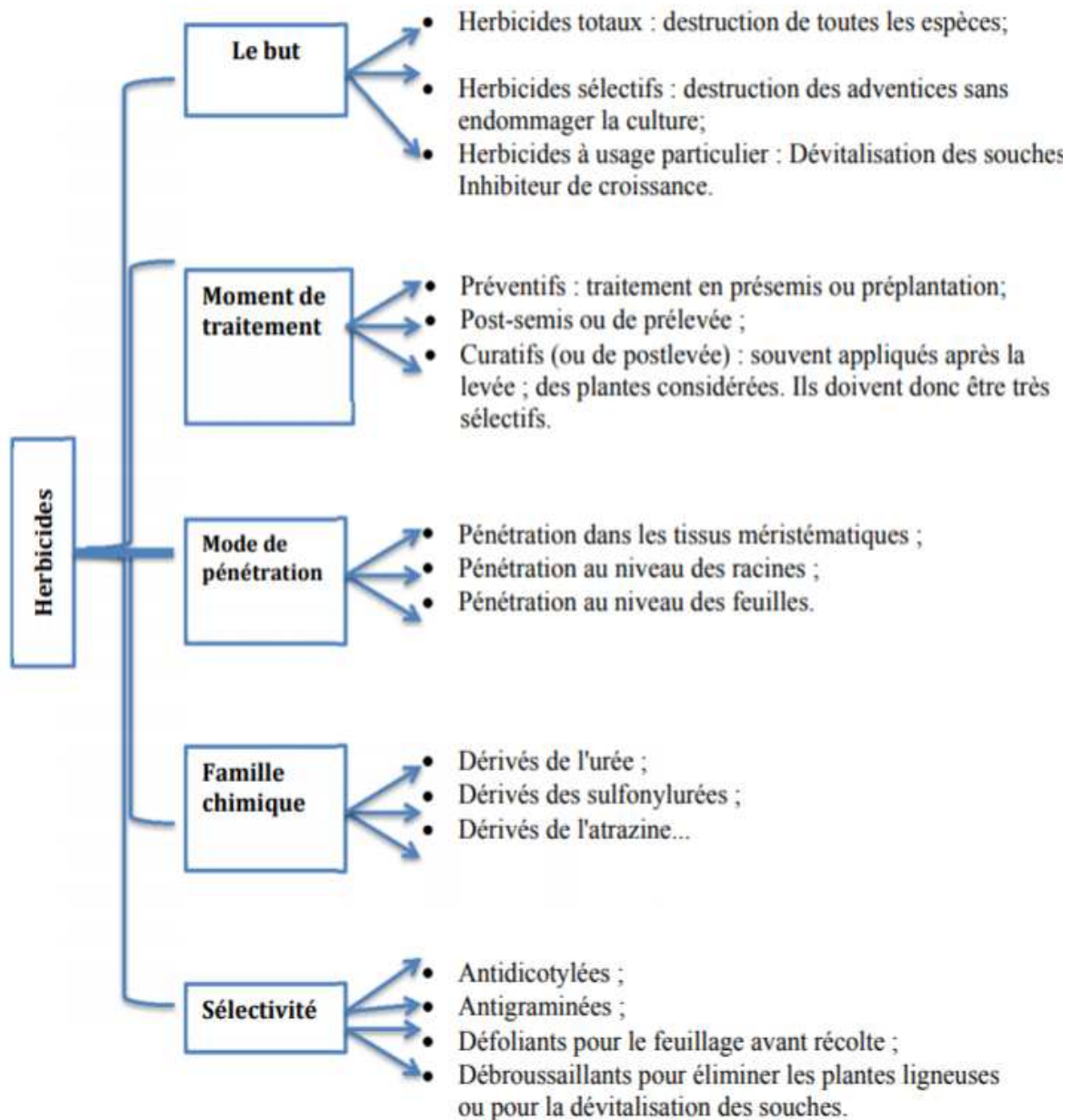


Figure 4 : Classification des herbicides (Grunewaldet al., 2001).

III.2. Origine des herbicides dans le milieu aquatique

Lors de l'application qui s'effectue généralement par pulvérisation, une fraction importante des herbicides déposés sur les plantes ou le sol ruisselle puis s'infiltre pour atteindre et contaminer respectivement les eaux de surface, puis les eaux souterraines (Moreau, 2006).

Il existe deux cas de transfert des herbicides dans le milieu aquatique (Fig.3) (Regnault-Roger et al., 2005) :

- Transfert vers les eaux de profondeur : C'est le lessivage qui est le processus de transfert des solutés en profondeur jusqu'aux nappes d'eaux souterraines (Les herbicides peuvent se retrouver dans les puits, dans les nappes d'eau de surface ou souterraines). Elle concerne les molécules qui sont en solution du sol ou qui sont adsorbées. Ce transfert varie en fonction des caractéristiques de l'herbicide, des propriétés du sol, de la vitesse d'infiltration et de la fréquence et de l'intensité des précipitations (Bernier, 2002).
- Transfert vers les eaux de surface : c'est le ruissellement qui est l'entraînement des pesticides par solubilisation dans l'eau (de la pluie ou de l'irrigation). Il se produit lorsque la quantité d'eau tombée est supérieure à la capacité d'infiltration du sol, ou à partir du moment où le sol a atteint son état de saturation (Regnault-Roger et al., 2005).

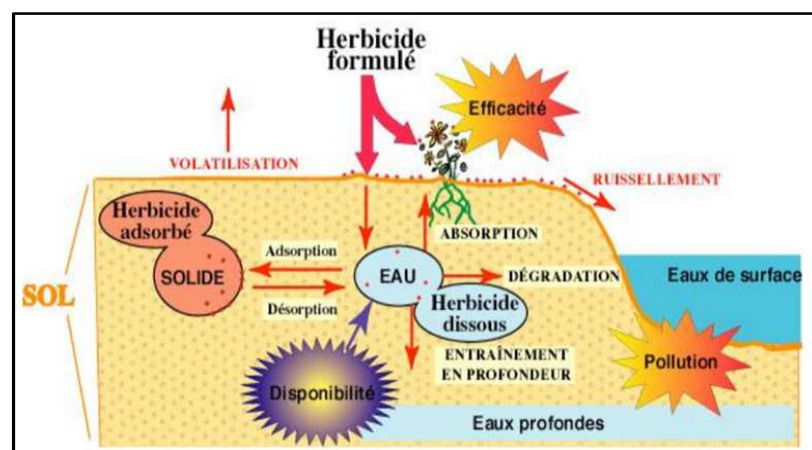


Figure 5 : Origine des herbicides dans le milieu aquatique (Barriuso et al., 2015).

III.3. Impact des herbicides

III.3.1. Sur les l'environnement

La pollution des écosystèmes aquatiques par les herbicides peut avoir des effets négatif sur les espèces aquatiques, elle a également un impact direct sur la qualité des sources d'approvisionnement en eau potable(Darmency, 2010).

L'utilisation massive d'herbicides dans les zones agricoles est l'un des facteurs impliqués dans le fait que ces zones ne sont plus utiles pour l'hivernage des oiseaux migrateurs. Ils peuvent devenir aussi contre-productifs pour le sol, car ils ont tendance à changer la situation fertile et donc arrêter ou diminuer la production dans les cultures (Calvet *et al.*, 2005).

III.3.2 Sur la santé

Plusieurs études de santé ont démontré les risques d'effets aigus et chroniques pour les agriculteurs exposés aux pesticides. Des problèmes d'ordre respiratoire, cutané et neurologique ont été observés (Gatignolet Etienne, 2010).

Plusieurs herbicides ont été identifiés comme étant cancérigènes ; les types de cancer sont les lymphomes, la leucémie ainsi que le cancer des tissus conjonctifs, du cerveau et de la prostate (Multigner, 2005).

Les herbicides ont généralement un effet négatif sur les populations d'oiseaux, bien que leur impact soit très variable. Chez les organismes aquatiques, plusieurs études ont montré un lien important entre l'exposition aux pesticides et certains troubles de la reproduction et du développement. En effet, les résidus des herbicides s'accumulent dans l'organisme des poissons provoquant des troubles endocriniens et un déséquilibre hormonal (Gibbons *et al.*, 2014).

III.3.3. Sur le compartiment bactérien

La partie des herbicides qui n'est pas interceptée par les plantes atteint le sol et peut en altérer les propriétés chimiques et biologiques, notamment en impactant les microorganismes qui sont connus pour assurer des fonctions écosystémiques majeures dans l'environnement, telles que le recyclage de la matière organique, la production primaire, ou encore la fixation de l'azote. La très grande diversité des bactéries (structurale et fonctionnelle) leur confère un avantage adaptatif en cas d'exposition à des mélanges de molécules potentiellement toxiques comme les herbicides. Malgré tout, ces communautés bactériennes sont sujettes à des modifications (de structure, de biomasse, de fonctions) pouvant entraîner une perturbation du fonctionnement global de l'écosystème (Cléroux, 2013).

Les interactions bactéries-herbicides dépendent de propriétés des molécules (mode d'action, cibles potentielles, niveau de toxicité...) et correspondent aux manifestations de la toxicité d'une substance pour des organismes sensibles (Lambert *et al.*, 2006).

L'étude génétique de certaines bactéries capables de dégrader des herbicides a révélé la remarquable plasticité de son génome dans la mise en place de la voie de dégradation (Changey, 2011).

III.4. Mode d'action des herbicides

Les herbicides tuent les herbacées mais aussi d'autres végétaux par un principe d'empoisonnement. Appliqués sur le sol ou sur le feuillage, ils ont une action sur la photosynthèse, la synthèse des caroténoïdes et sur la division cellulaire (Leroux, 2003).

Différents actions de ces produits chimiques sur les autres organismes vivants (animaux, microorganismes), ont été observées (Kılınc, 2010) :

- Action sur la division cellulaire ;
- Action sur les membranes cellulaires ;
- Action sur la biosynthèse.

III.5. Mécanismes de résistance bactérienne aux herbicides

- **Résistance acquise chromosomique**

Il s'agit d'une mutation stable et héréditaire d'un gène du chromosome et le produit du gène muté est ainsi lui-même modifié. Ainsi, le mécanisme biochimique de base de la résistance chromosomique bactérienne peut être lié à une modification de la membrane cellulaire empêchant ainsi la fixation et la pénétration du produit (Joly, 1995).

De nombreuses études ont montré que la croissance d'une souche sensible avec des concentrations sublétales d'un herbicide pouvait entraîner l'acquisition d'une résistance à ce produit (Thomas *et al.*, 2000 ; Lundén*et al.*, 2003). Cette diminution de sensibilité s'accompagne généralement d'une évolution de l'enveloppe bactérienne et plus particulièrement de la composition lipidique membranaire des bactéries à Gram négatif (Langsrund*et al.*, 2003 ; Tabata *et al.*, 2003) et des bactéries à Gram positif (To *et al.*, 2002).

- **Résistance acquise plasmidique (ou extrachromosomique)**

Les micro-organismes ayant acquis une résistance extrachromosomique hébergent des plasmides R (facteurs de résistance) véhiculant des gènes dont le produit confère la résistance à un ou plusieurs antimicrobiens. Ce phénomène, fréquent et varié, a été largement étudié dans le cas des pesticides (Russell, 1997).

D'autres mécanismes biochimiques de résistance bactérienne tels que l'inactivation de l'agent chimique, la séquestration et l'altération de la surface cellulaire (modification de la synthèse des protéines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif), peuvent également être liés à ces plasmides (Russell, 1997).

Chapitre II :

Matériel

et méthodes

Les travaux expérimentaux de la présente étude ont été réalisés au niveau du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université 8 Mai 1945 Guelma.

I. Matériel biologique

I.1. Choix et origine des bactéries étudiées

Neuf souches bactériennes ont été choisies pour la présente étude : 7 entérobactéries (E1-E7), une *Pseudomonas* (P1) et une staphylocoque (S1) (Tableau 1). Les souches bactériennes ont été isolées des eaux de surface de la région de Guelma.

Une souche de référence a été également utilisée : *Escherichia coli* K12 ATCC 10798 (K12). Cette dernière est un excellent modèle de contrôle de l'effet antibactérien des agents chimiques en particulier les métaux lourds et les pesticides (Akinbowale *et al.*, 2007).

Le choix de ces bactéries est basé sur :

- ✓ Leur caractère ubiquitaire dans l'environnement ;
- ✓ Leur sensibilité différente vis-à-vis aux agents chimiques.

I.2. Vérification de la pureté des bactéries

La purification est une étape très importante, elle conduira à la souche pure ce qui facilitera l'étude de la sensibilité aux agents antibactériens (Joffinet *et al.*, 2003).

Afin de vérifier la pureté des souches bactériennes étudiées, nous avons suivi les étapes suivantes :

I.2.1. Revivification des bactéries

Pour chaque bactérie, des colonies ont été introduites dans un tube contenant 5 ml de Luria Bertani (LB) à l'aide d'une anse de platine stérile. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures (Guiraud, 2003).

Cette étape permet la croissance des bactéries, ce qui facilitera leurs cultures dans les milieux d'isolement (Guiraud, 2003).

Tableau 1 : Origine des souches bactériennes étudiées.

Souches bactériennes		Code	Date de prélèvement	Lieu de prélèvement	Méthode de conservation
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	E1	03/03/2017	Oued Bradaa	GN inclinée en tube
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	E2	16/04/2016	Oued Maïz	GN inclinée en tube
	<i>Proteus vulgaris</i>	E3	03/03/2017	Oued Seybouse – plaine de Boumahra	GN inclinée en tube
	<i>Shigella</i> spp.	E4	16/04/2016	Oued Seybouse – plaine de Boumahra	GN inclinée en tube
	<i>Salmonella typhimurium</i>	E5	17/04/2017	Oued Bradaa	GN inclinée en tube
	<i>Edwardsiella tarda</i>	E6	17/04/2017	Oued Maïz	GN inclinée en tube
	<i>Citrobacter freundii</i>	E7	16/04/2016	Oued Bradaa	GN inclinée en tube
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	P1	17/04/2017	Oued Bradaa	GN inclinée en tube
<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	S1	03/06/2017	Oued Maïz	Chapman incliné en tube

GN : gélose nutritive.

I.2.2. Isolement des bactéries

A partir des milieux d'enrichissements présentant une croissance bactérienne, nous avonsensemencé 4 milieux de culture ([Larpent, 1997](#) ; [Rodier et al., 2005](#)) :

- La gélose Hektoen pour l'isolement des souches E1-E3, E6 et E7. C'est un milieu sélectif pour les entérobactéries pathogènes, il permet une première orientation

quant à l'identification de l'espèce isolée sur la base de l'attaque de trois glucides : lactose, salicine et saccharose. Une différenciation supplémentaire (présence de thiosulfate et de citrate de fer dans le milieu) qui se traduit par des colonies à centre noir dû à la formation de sulfure de fer.

- La gélose *Salmonella-Shigella* (SS) pour la souche E4 et E5. C'est le milieu sélectif des salmonelles et des shigelles. Il contient du vert brillant, sels biliaires et de fortes concentrations en thiosulfates et en citrate inhibent totalement la croissance de la microflore secondaire Gram positive ainsi que celle de nombreux coliformes et *Proteus*.
- La gélose au cétrimide pour la souche P1. C'est un milieu sélectif, qui permet l'isolement des *Pseudomonas* et notamment de *P. aeruginosa*. Sur ce milieu de très nombreuses bactéries sont inhibées de par la présence de l'antiseptique cétrimide (bromure de N-cétyl-N-tri méthylammonium) ainsi que par la présence de l'antibiotique acide nalidixique (inhibiteur de nombreuses bactéries à Gram négatif)
- La gélose Chapman pour la souche S1. C'est un milieu qui contient un inhibiteur de fortes concentrations en chlorure de sodium (75g.L^{-1}), ce qui permet un isolement sélectif de staphylocoques tolérant les fortes concentrations en NaCl.

I.2.3. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes

Les souches bactériennes ont subies une caractérisation phénotypique à savoir la caractérisation morphologie selon les méthodes classiques de microbiologie décrites par [Guiraud \(2003\)](#) et la caractérisation biochimique par utilisation des systèmes miniaturisés API.

II. Etude de l'effet des métaux lourds et des herbicides sur la croissance des bactéries

II.1. Métaux lourds et herbicides testés

Dans la présente étude nous avons étudié l'effet antibactérien de deux métaux lourds : le cuivre et le cadmium, et deux herbicides commerciaux : le Desormone lourd D et le Brumby 80 EC.

Le cuivre testé est sous forme de cuivre sulfate pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), $\text{PM} = 159,6 \text{ g/mol}$; et le cadmium est obtenu à partir de cadmium chloride (CdCl_2). $\text{PM} = 183,31 \text{ g/mol}$.

Le Desormone lourd D (Dow agrosiences, Italie) est un herbicide dont l'ingrédient actif est l'acide 2,3 D-Ester butyglycol. L'herbicide Brumby 80EC (RotamAgrochem International, Chine) contient le clodinafop-propargyl et le cloquintocet-mexyl.

Le choix de ces agents chimiques repose d'une part sur les données de la direction de l'environnement de la wilaya de Guelma et les travaux de [\(Guettaf, 2015\)](#) qui montrent leurs présences en concentrations importantes dans les eaux des sites d'échantillonnage, et d'autre part, sur leur disponibilité.

II.2. Préparation des solutions mères et des solutions filles

II.2.1. Métaux lourds

Des solutions mères de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et de CdCl_2 contenant 5 g/l ont été préparées dans de l'eau distillée, puis stérilisée par filtration sur membrane (0.2 μm).

Six solutions filles sont obtenues par dilution successive au demi de la solution mère dans des tubes d'eau distillée stérile.

Après dilution de la solution mère métallique, les concentrations du cuivre et du cadmium se répartissent dans les solutions filles entre 50 et 1600 $\mu\text{g/ml}$.

II.2.2. Herbicides

Les concentrations des solutions mères des herbicides utilisés sont comme suite :

- Desormone lourd D : 600 g/l ;
- Brumby 80EC : 100 g/l.

Six solutions filles sont obtenues par dilution de la solution mère dans des tubes d'eau distillée stérile : 5, 50, 150, 300, 800, 1000 µg/l.

II.3. Préparation de l'inoculum

Les bactéries issues d'une culture de 18 heures incubée à 37°C ont été suspendues dans le bouillon Luria Bertani modifié et tamponné (LB) à une turbidité correspondante à 1 mesurée à une densité optique DO = 600 nm.

II.4. Effets des métaux lourds et des herbicides

Afin de déterminer quantitativement l'effet du cuivre, cadmium, Desormone lourd D et le Brumby 80EC sur les bactéries choisies, nous avons utilisé la méthode de diffusion en milieu liquide ([Hassen et al., 1998](#)).

- **Technique**

- Mélanger V/V de chaque concentration du métal ou d'herbicide avec l'inoculum bactérien ajusté ;
- Incuber avec agitation à 37° C pendant 48H ;
- Des témoins de croissance pour chaque souche bactérienne sont préparés dans le bouillon LB sans agents chimiques ;
- Des témoins négatifs sont préparés également avec milieu LB additionné des agents chimiques sans culture bactérienne.

- **Lecture**

- Mesurer la croissance bactérienne à une densité optique DO = 600 nm dans le temps : 3, 24, 27 et 48 heures.

Le schéma 1 représente les différentes étapes du protocole expérimental de l'étude de l'effet des métaux lourds et des herbicides sur la croissance des bactéries.

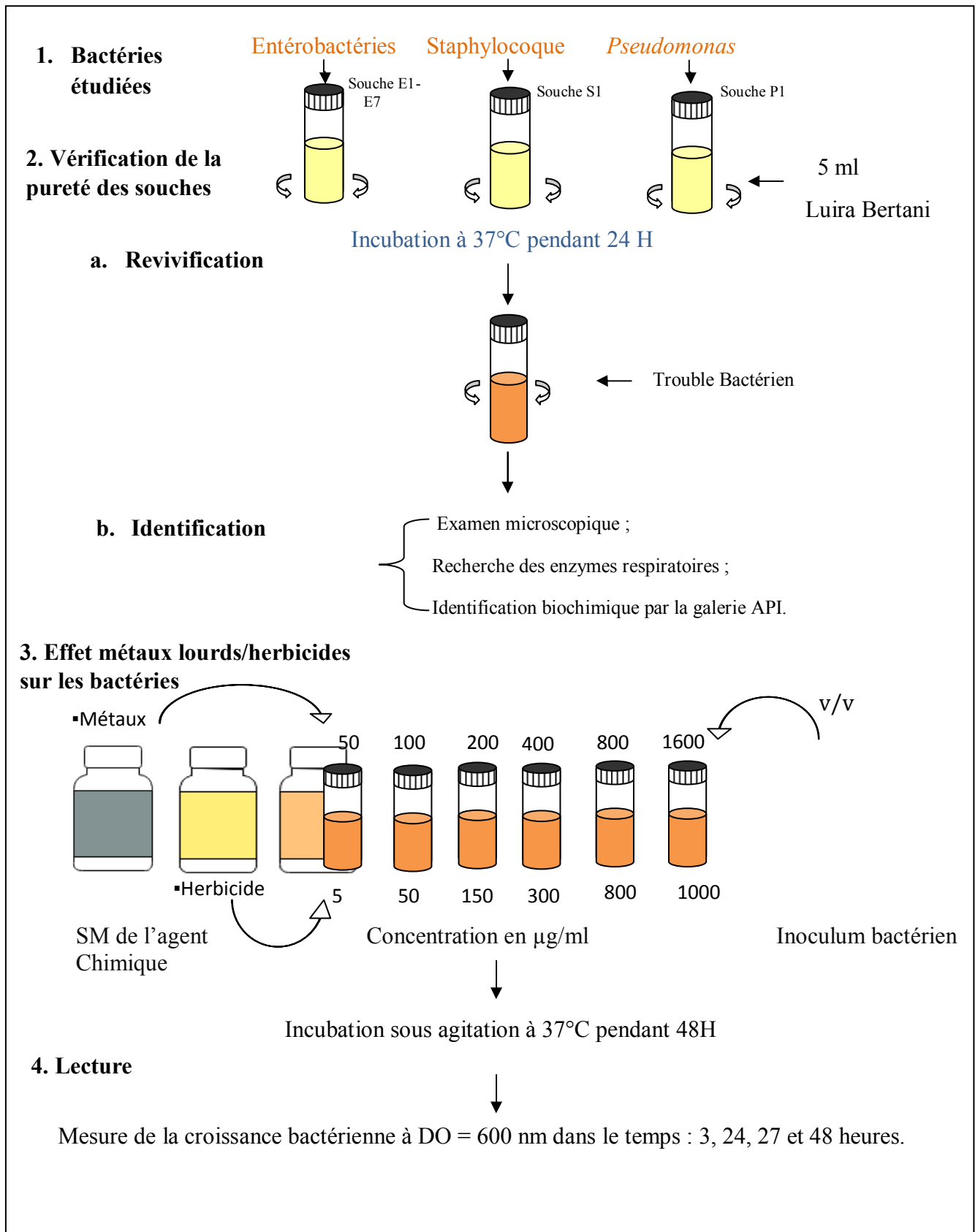


Schéma 1 : Protocole de l'étude de l'effet des métaux lourds et des herbicides sur la croissance des souches bactériennes.

III. Dosage de la métallothionéine chez les bactéries exposées aux métaux lourds

La capacité de croissance des souches bactériennes aux différentes concentrations testées du cuivre et de cadmium, nous a conduits à déterminer un des mécanismes de résistance aux métaux lourds, qui est l'expression de la Métallothionéine.

Les métallothionéines (MTs) appartiennent à la famille des protéines intracellulaires qui sont capables de lier les métaux et qui régulent en particulier l'homéostasie des métaux essentiels comme le cuivre (Coyle *et al.*, 2002).

Les MTs sont des protéines de faible poids moléculaire (7000 Da) qui ne contiennent pas d'acides aminés aromatiques ni d'histidine. Elles sont par contre très riches en cystéines (Cys). Grâce au groupement thiol de ces cystéines, elles peuvent séquestrer des métaux comme le zinc, le cuivre, le cadmium ou le mercure (Coyle *et al.*, 2002).

Le dosage de la MT a été réalisé selon la méthode spectrophotométrie de Viarengo *et al.* (1997) (Schéma 2).

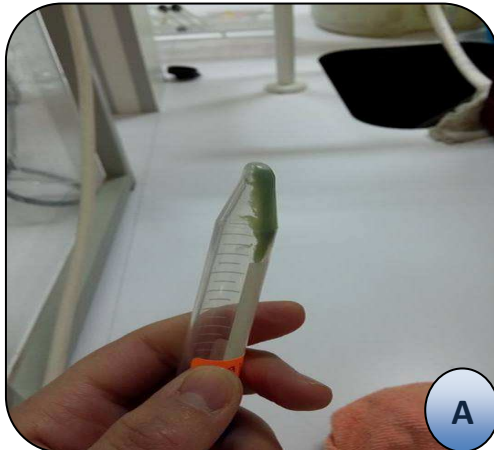
- **Technique**

- Récupérer les biomasses bactériennes de chaque concentration du métal par une centrifugation à 10000 g pendant 20 min ;
- Peser la biomasse récupérée ; Mélanger la biomasse récupérée avec le Tampon d'homogénéisation ;
- Après sonication, l'homogénat est centrifugé à 30000 g pendant 20 min à 4 °C ; Les surnageants obtenus sont utilisés pour le dosage de la MT ;
- Prélever 1 ml de l'échantillon à doser ;
- Ajouter 1,05 ml d'éthanol absolu froid (- 20 °C) et 80 µl de chloroforme ;
- Mélanger au vortex pendant quelques secondes ;
- Centrifuger à 6000 g pendant 10 min à 4 °C ;
- Récupérer le surnageant et lui ajouter 3 volumes d'éthanol absolu froid (- 20 °C) ;
- Ajouter 1 mg d'ARN et 40 µl d'HCl à 37 % ;
- Mélanger au vortex pendant quelques secondes ;
- Conserver le mélange à - 20 °C pendant une heure ;
- Centrifuger à 6000 g pendant 10 min à 4 °C ;
- Éliminer le surnageant ;

- Laver le culot avec 3 ml de la solution de lavage;
 - Centrifuger à 6000 g pendant 10 min à 4 °C ;
 - Éliminer le surnageant et faire sécher le culot ;
 - Ajouter au culot 150 µl de la solution de NaCl et 150 µl de la solution d'HCl qui contient de l'EDTA ;
 - Agiter au vortex pendant quelques secondes jusqu'à la remise en suspension complète du culot ;
 - Ajouter 4,2 ml du réactif d'Ellman ;
 - Centrifuger à 3000 g pendant 5 min ;
 - Prélever le surnageant ;
 - Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 412$ nm.
-
- **Lecture**
 - La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon d'homogénéisation remplaçant le surnageant ;
 - Elaborer une gamme étalon de standards sous forme de GSH, cette gamme comprend 6 concentrations (0; 14,4; 28,8; 43,2; 57,6 et 72 nmol/ml) ;
 - Tracer le droit étalon : Absorbance = f (concentration en GSH) ;
 - À partir des résultats obtenus sur la gamme étalon, chacun des échantillons est alors déduit ;
 - La quantité en MT est exprimée en fonction de la quantité de la biomasse (nmol/g de biomasse bactérienne).

Remarque :

La composition et la préparation des milieux de cultures, des tampons et des réactifs sont représentés en annexe.



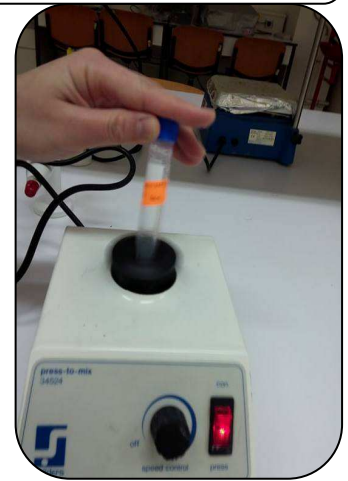
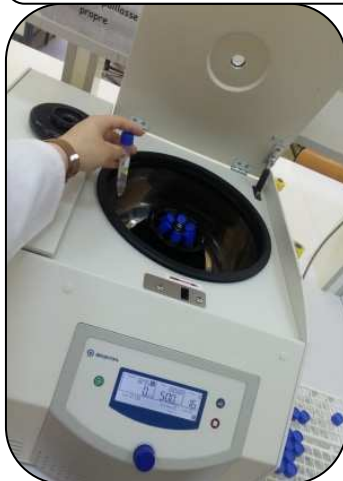
A

Récupération de la biomasse de différentes concentrations.



B

Sonication pour la lyse cellulaire.



C

Centrifugation des suspensions préparés/ Addition des réactifs/ Agitation par le vortex.



D

Mesure de l'absorbance.

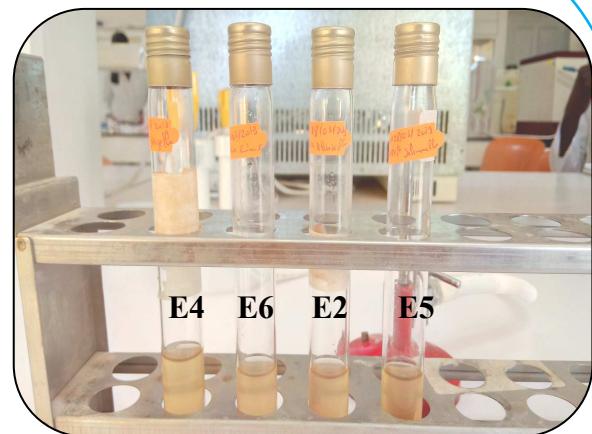
Schéma 2 : Protocole présentatif des principales étapes de dosage de la métallothionéine.

Chapitre III : Résultats et discussion

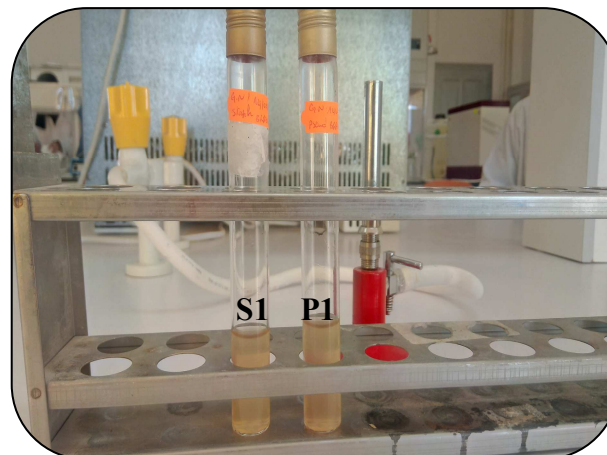
I. Vérification de la pureté des bactéries

I.1 Revivification

Après une durée d'incubation de 24 heures à une température de 37 °C, nous avons remarqué l'apparition de trouble au niveau de tous les tubes du Luria Bertani ensemencés par les différentes souches collectées, ce changement signifie la présence d'une croissance bactérienne (Figure 6).



Entérobactéries (E1-E7) et (K12)



Staphylococcus aureus (S1) et Pseudomonas aeruginosa (P1)

Figure 6 : Résultats de la revivification des souches bactériennes collectées.

I.2. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes

La caractérisation phénotypique des souches bactériennes étudiées a confirmé la pureté de tous les isolats (Tableau 2).

Tableau 2: Identification des souches bactériennes étudiées.

Souche bactérienne	Aspect microscopique	Enzymes respiratoire	Type de l'API	Code de l'API	Degré de similitude (%)
E1	Bacilles à Gram (-)	Cat (+) OX (-) NR (+)	API 20E	7044102	99,8
E2				7045773	96,9
E3				0676031	100
E4				0044140	98,6
E5				6504510	98,7
E6				4544002	100
E7				3646772	99,4
P1	Bacille à Gram (-)	Cat (-) OX (+) NR (+)	API 20NE	4754575	99,9
S1	Cocci à Gram (+)	Cat (+) OX (+) NR (+)	API <i>Staph</i>	6734157	98,9

Cat : catalase, OX : oxydase, NR : nitrate réductase, (+) : positif, (-) : négatif.

II. Effet des métaux lourds sur la croissance des bactéries

II.1. Effet du cuivre

Les résultats représentés par les figures 7 – 16 montrent que toutes les souches bactériennes se développent en présence de cuivre. Leur croissance diffère en fonction de la concentration du métal et de la durée d'incubation.

Escherichia coli K12 (Fig. 7) croît dans toutes les concentrations testées du cuivre ; la faible densité optique de la culture (0,181) est enregistrée avec la plus forte concentration (1600 µg/ml) après une durée d'incubation de 24 heures.

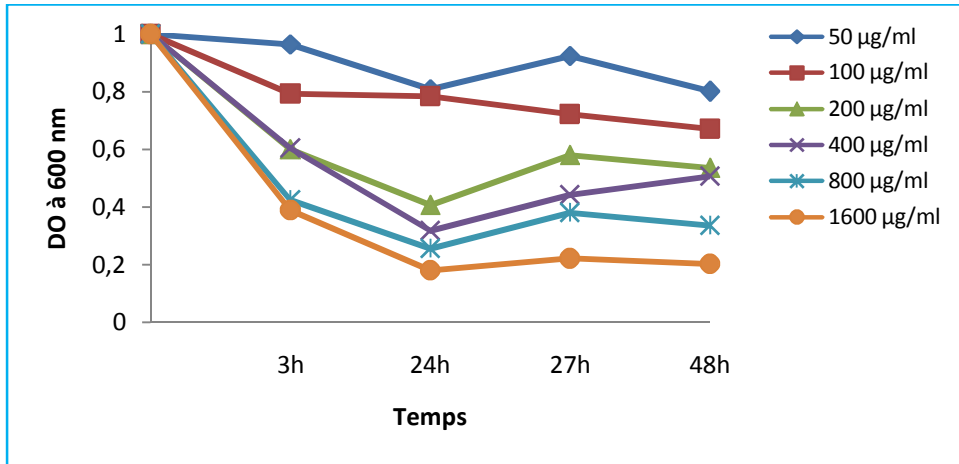


Figure 7: Effet du cuivre sur la croissance d'*Escherichia coli* K12.

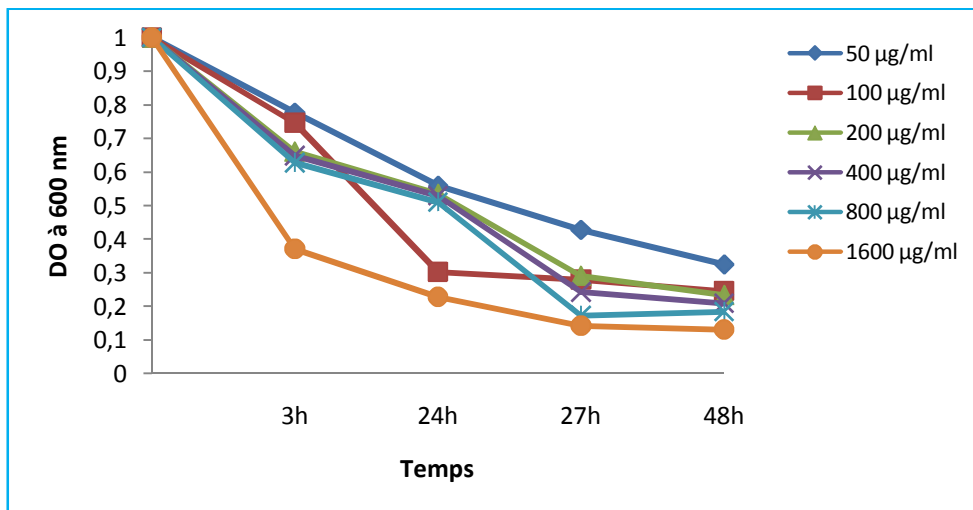


Figure 8: Effet du cuivre sur la croissance d'*Escherichia coli* (E1).

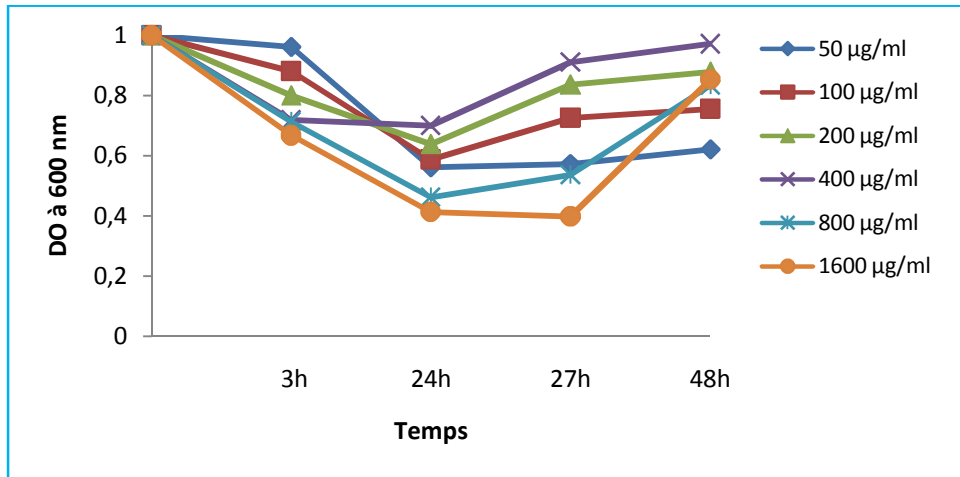


Figure 9: Effet du cuivre sur la croissance de *Klebsiella oxytoca*(E2).

Généralement la croissance d'*Escherichia coli* (Fig. 8) diminue avec l'augmentation de la concentration du cuivre ainsi qu'avec la prolongation de la durée d'incubation.

Une importante croissance est observée dans le cas de *Klebsiella oxytoca* (Fig. 9) dans le temps de 27H et 48H. Après une faible sensibilité au cuivre après 3 et 24 heures d'incubation, la souche E2 montre une adaptation surtout à la concentration de 400 µg/ml de cuivre qui se traduit par des densités optiques comprises entre 0,911 et 0, 971.

Les figures 10 et 11 montrent une variabilité de comportement des souches E3 et E4 en présence de différentes concentrations du cuivre utilisées. Globalement, deux phases sont observées, une de diminution de croissance après 24H et l'autre de re-multiplication après 48H.

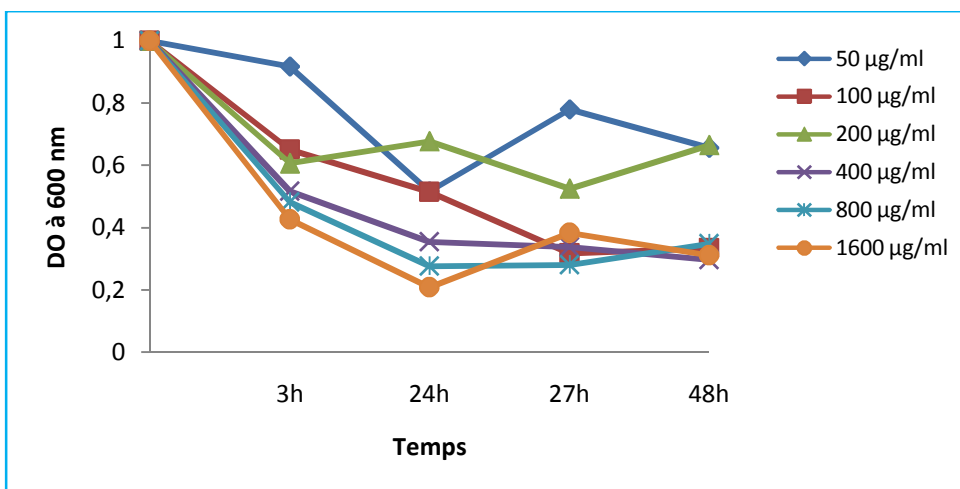


Figure 10: Effet du cuivre sur la croissance de *Proteus vulgaris* (E3).

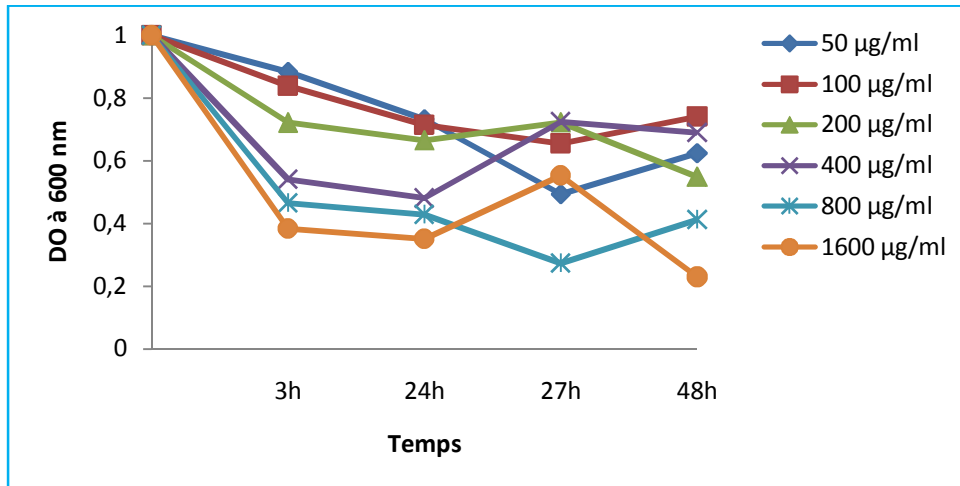


Figure 11: Effet du cuivre sur la croissance de *Shigella* spp. (E4).

Salmonella typhimurium (Fig. 12) montre une croissance importante à la concentration 1600 µg/ml de cuivre, en particulier après 48H d'incubation (DO = 0,939).

La concentration la plus élevée de cuivre (1600 µg/ml) montre un effet significatif vis-à-vis de la souche E6 (Fig. 13). En effet, la densité optique diminue de 1 à 0,354, 0,234, 0,219 et 0,204 après 3H, 24H, 27H et 48H respectivement.

La figure 14 nous informe que la souche *Citrobacter freundii* semble multiplier à toutes les concentrations du cuivre testées. La densité de la culture bactérienne à la concentration 400 µg/ml de cuivre est la plus importante après une durée d'incubation de 24H, 27H et 48H.

Concernant *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 15), sa croissance est importante à toutes les concentrations du cuivre testées, la densité optique de sa culture oscille entre 0,477 et 0,999.

Le cuivre a diminué la croissance de *Staphylococcus aureus* après 3H d'incubation (Fig.16), au delà, la souche semble adapter aux différentes concentrations.

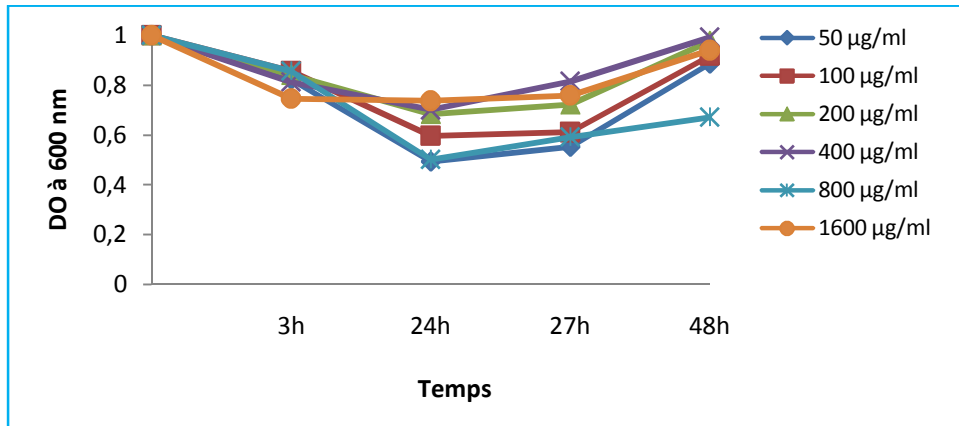


Figure 12: Effet du cuivre sur la croissance de *Salmonella typhimurium*(E5).

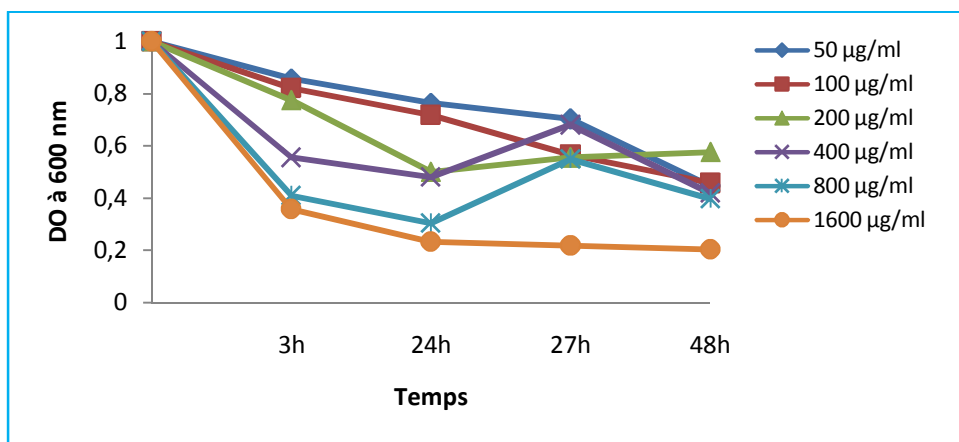


Figure 13: Effet du cuivre sur la croissance d'*Edwardsiella tarda* (E6).

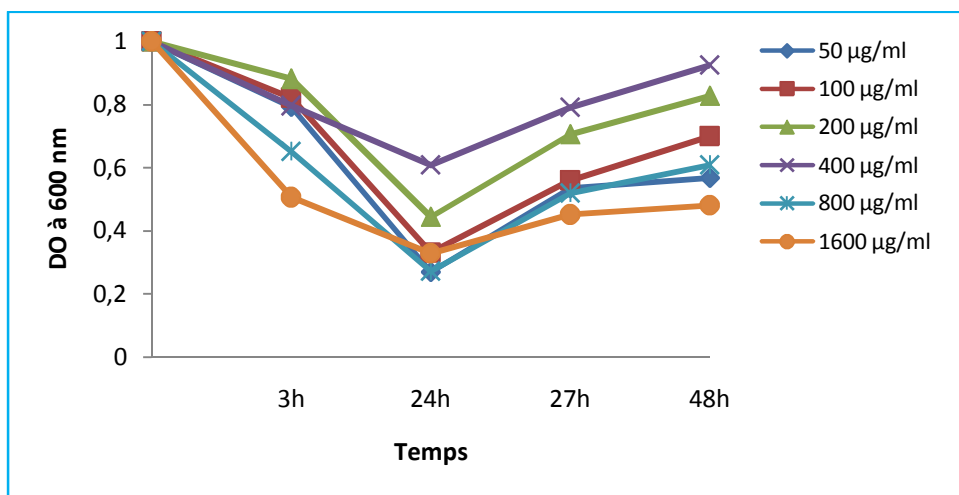


Figure 14: Effet du cuivre sur la croissance de *Citrobacter freundii*(E7).

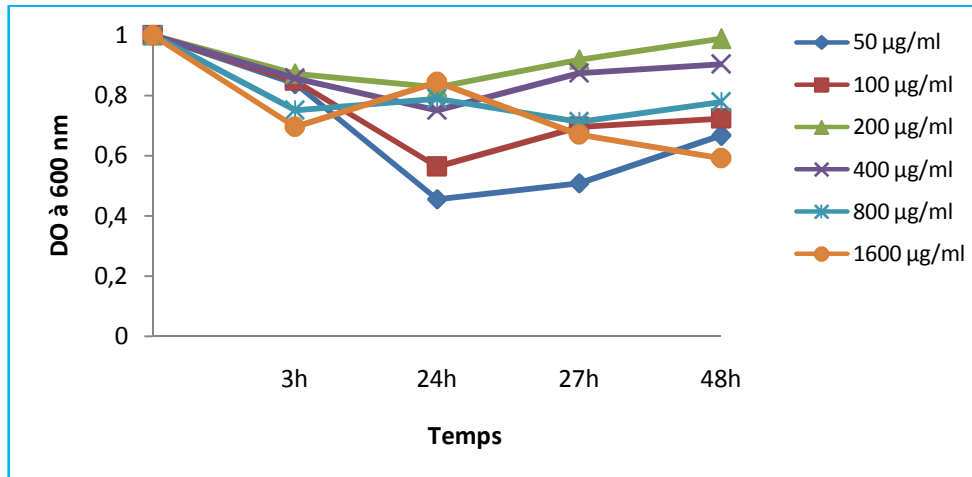


Figure 15: Effet du cuivre sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (P1).

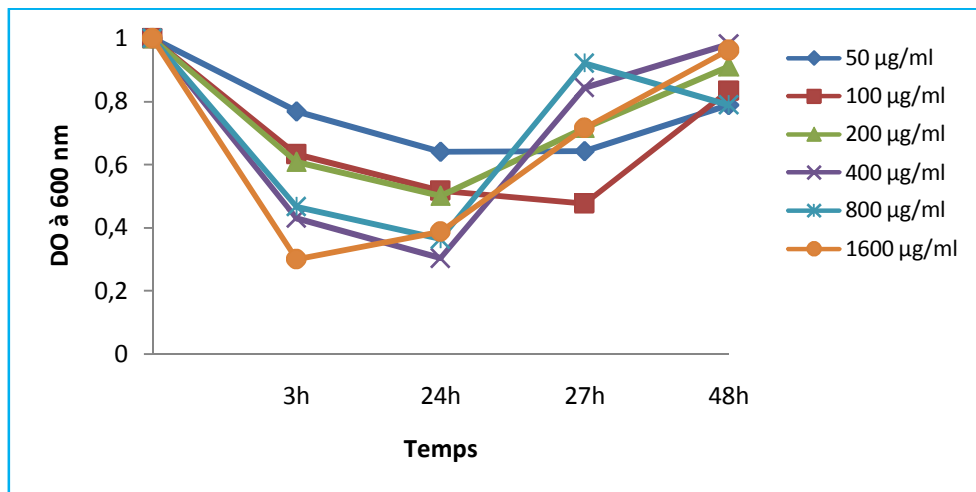


Figure 16: Effet du cuivre sur la croissance de *Staphylococcus aureus* (S1).

L'effet du cuivre sur les bactéries après 3 heures d'incubation pourrait s'expliquer par un effet temporaire initial toxique ou bactériostatique du cuivre. La présence de cuivre dans la culture bactérienne durant une période initiale gêne la multiplication des bactéries, alors que cet effet disparaît après des périodes d'incubation plus longues. Le mécanisme exact, par lequel le cuivre tue les bactéries, est aujourd'hui encore inconnues, cependant, plusieurs théories sont développées et étudiées (Hobmanet al., 2007) :

- ✓ La fuite de potassium ou de glutamate à travers la membrane cellulaire ;
- ✓ La perturbation de la balance osmotique ;
- ✓ La désintégration de l'ADN ;
- ✓ Le stress oxydant par génération de peroxyde d'hydrogène.

Selon les résultats obtenus, les bactéries présentent un comportement différent vis-à-vis des différentes concentrations qui se caractérise généralement par une densité importante après une durée d'incubation de 24H. Cette hétérogénéité pourrait s'expliquer par l'adaptation des cellules bactériennes, leurs mécanismes de résistance et leurs capacités de générer des clones résistants au facteur de stress cuivrique. **Zhang et al. (2006)** ont évalué l'impact du cuivre sur la croissance bactérienne en examinant différents paramètres, incluant le pH, l'oxygène dissous, les concentrations en substrat, la sécrétion de substances polymériques extracellulaires (EPS) et la fixation du cuivre dans la biomasse. Les résultats ont montré que le cuivre inhibe la production d'EPS à tous les niveaux de concentration de cuivre étudiés, par contre, la multiplication des bactéries a augmenté avec le piégeage du cuivre par les biomasses qui augmente avec la dose de cuivre ajoutée. De plus, les communautés bactériennes qui ont résisté à des fortes concentrations du cuivre après des longues durées d'incubation, représente un polymorphisme de la longueur entre deux gènes ce qui sélectionne des populations bactériennes spécifiques qui sont capables de tolérer ce stress.

Mogilnaya et al. (2005) ont suivi la croissance de certaines bactéries à Gram positif et à Gram négatif vis-à-vis des ions cuivriques, les résultats ont montré qu'une seule bactérie appartenant au genre *Acinetobacter* a pu proliférer après 21 jours à 22°C.

La croissance de toutes les bactéries dans toutes les concentrations du cuivre testées pourrait s'expliquer par une résistance de ces souches vis-à-vis du cuivre. Parmi les bactéries étudiées, c'est *Staphylococcus aureus* qui a pu croître avec une densité très importante (DO = 0,962) à 1600 µg/ml après 48H d'incubation, suivi par *Salmonella typhimurium* (DO = 0,939).

Selon **Borkow et Gabbay. (2004)** les bactéries ont développé des systèmes complexes pour maintenir des taux précis d'ions cuivre au niveau intracellulaire. En plus de pompes ioniques à flux entrant/sortant spécifiques, d'autres mécanismes de tolérance existent comme :

- Une barrière perméable ;
- La séquestration intra-extracellulaire ;
- La détoxification enzymatique ;
- La réduction de sensibilité aux ions cuivre de ses cibles (**O'Gorman et Humphreys, 2012**).

En revanche, nous pouvons constater que la souche *Escherichia coli* semble être la plus sensible vu la diminution de la densité de sa culture avec l'augmentation de la concentration

du cuivre et la durée d'incubation. *Assantaet al. (2002)* indiquent que le cuivre peut contribuer au processus d'altération cellulaire et réduit significativement les dénombrements de coliformes.

II.2. Effet du cadmium

Les résultats obtenus sur le milieu LB en présence du cadmium (Fig. 17- 26) révèlent que toutes les souches se développent dans les concentrations allant de 50 à 1600 µg/ml.

Les souches *E.coli* K12, *Shigellaspp*, et *Edwardsiella tarda* (Fig. 17, 21 et 23) présentent une croissance inversement proportionnel à l'augmentation de la concentration du métal.

La concentration 1600 µg/ml de cadmium semble être la concentration qui a un effet important sur la croissance des souches citées ci-dessus. La densité la plus faible (0,133) est enregistrée avec la souche *E.coli* K12 après une durée d'incubation de 48H. En revanche, des densités optiques oscillent entre 0,833 et 0,936 sont notées après 3H d'incubation vis-à-vis de la concentration la plus faible de cadmium (50 µg/ml).

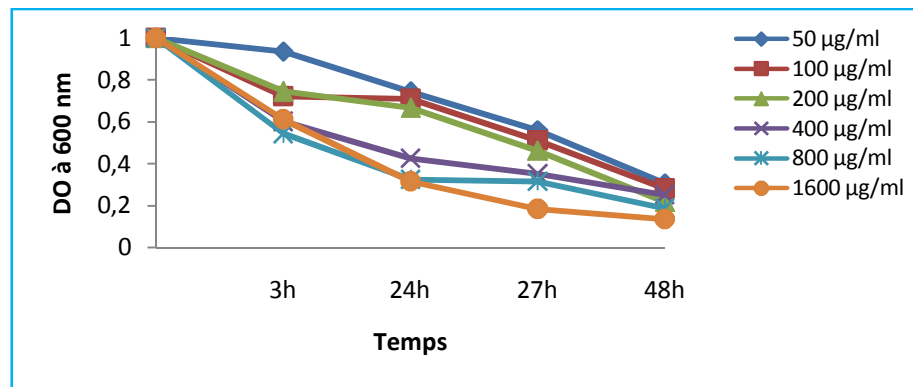


Figure 17: Effet du cadmium sur la croissance d'*Escherichia coli* K12.

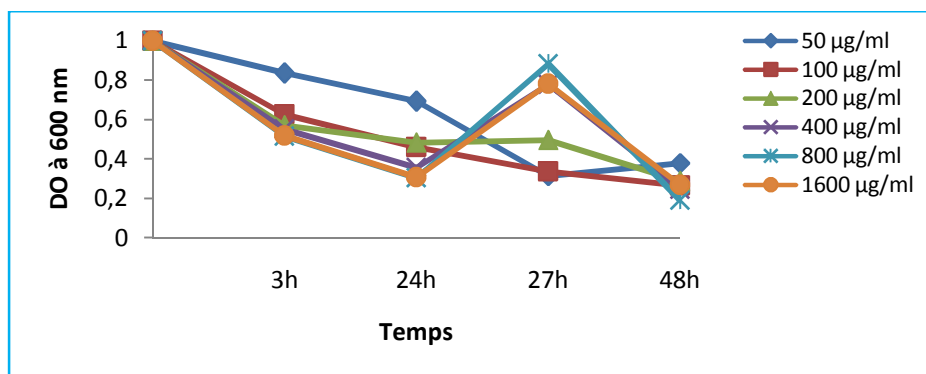


Figure 18: Effet du cadmium sur la croissance d'*Escherichia coli* (E1).

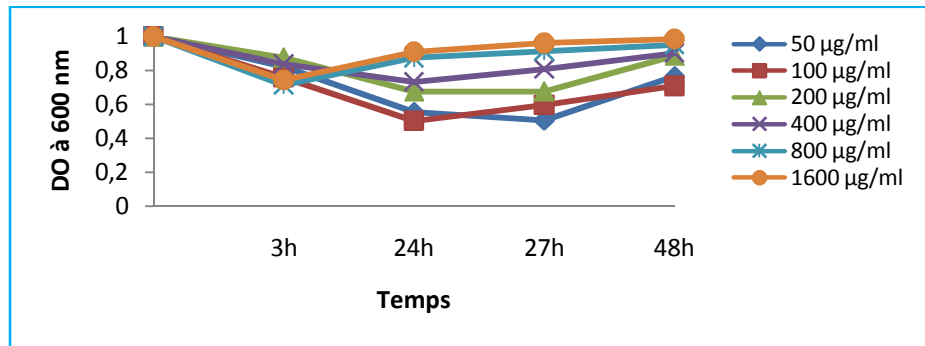


Figure 19: Effet du cadmium sur la croissance de *Klebsiella oxytoca*(E2).

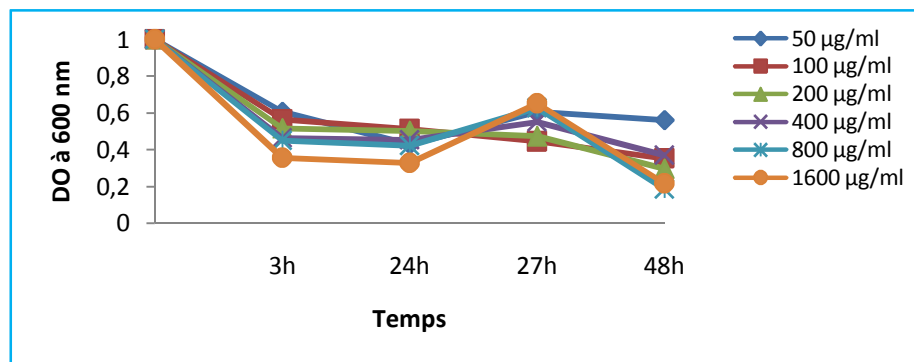


Figure 20: Effet du cadmium sur la croissance de *Proteus vulgaris* (E3).

Les souches *Klebsiella oxytoca* (Fig. 19), *Salmonella typhimurium* (Fig. 22) et *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 25) représentent une bonne croissance à des concentrations élevées du cadmium (800 et 1600 µg/ml).

Par contre, les souches *E.coli* (Fig. 18), *Proteus vulgaris* (Fig. 20), *Citrobacter freundii* et *Staphylococcus aureus* (Fig. 24,26) révèlent la présence d'une variabilité de croissance entre les concentrations du cadmium. Des pics de croissance sont observés pour E1, E3, E7 et S1 à 800,1600, et 400 µg/mlde cadmium.

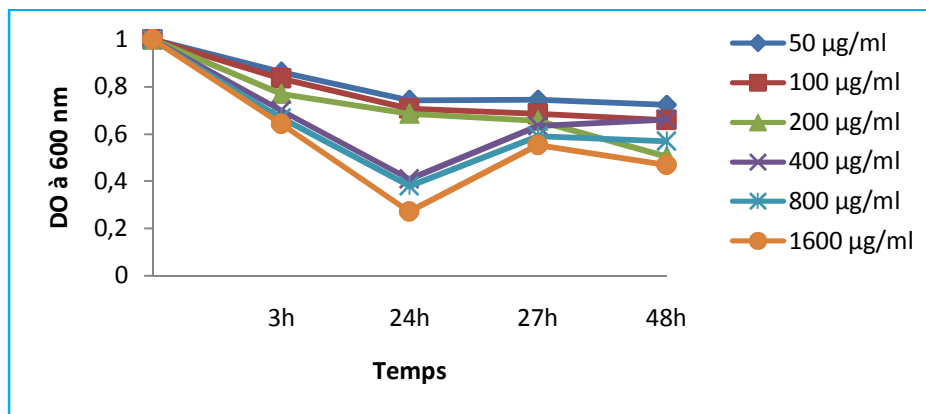


Figure 21 : Effet du cadmium sur la croissance de *Shigella* spp. (E4).

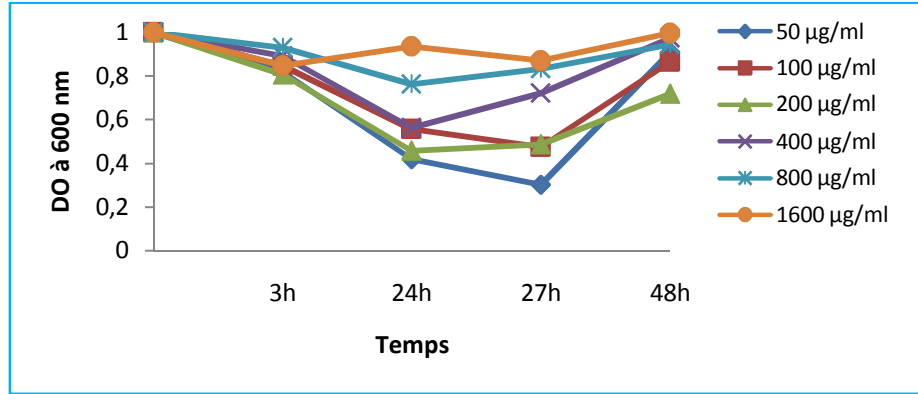


Figure 22: Effet du cadmium sur la croissance de *Salmonella typhimurium*(E5).

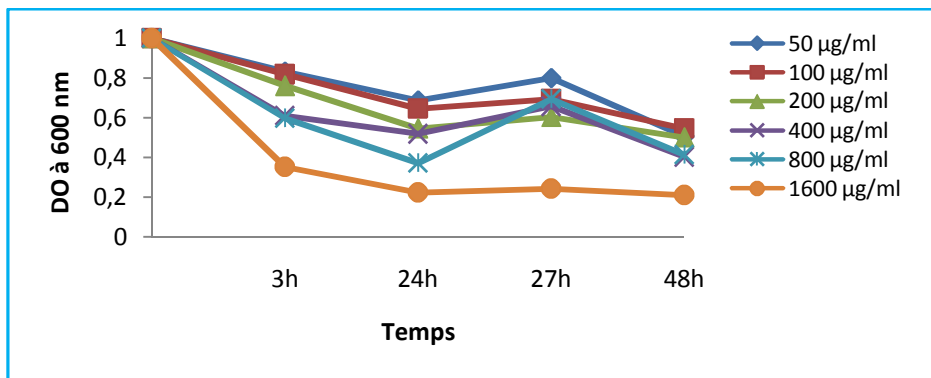


Figure 23 : Effet du cadmium sur la croissance d'*Edwardsiella tarda* (E6).

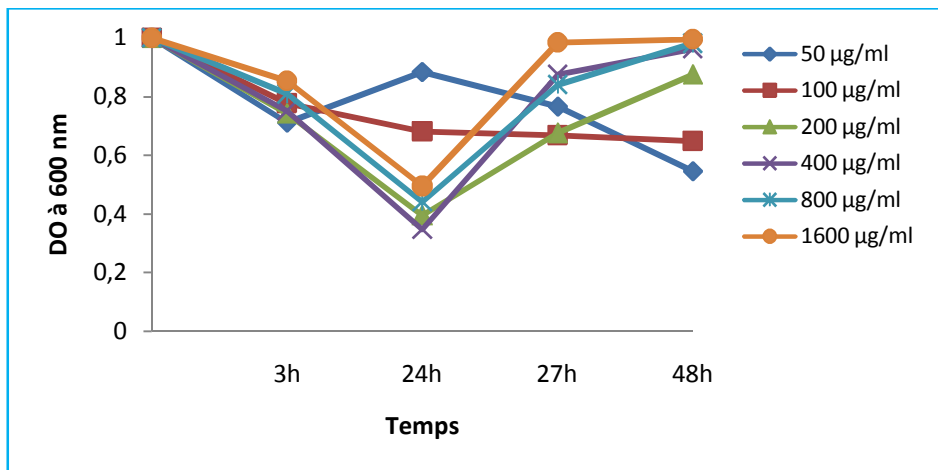


Figure 24 : Effet du cadmium sur la croissance de *Citrobacter freundii*(E7).

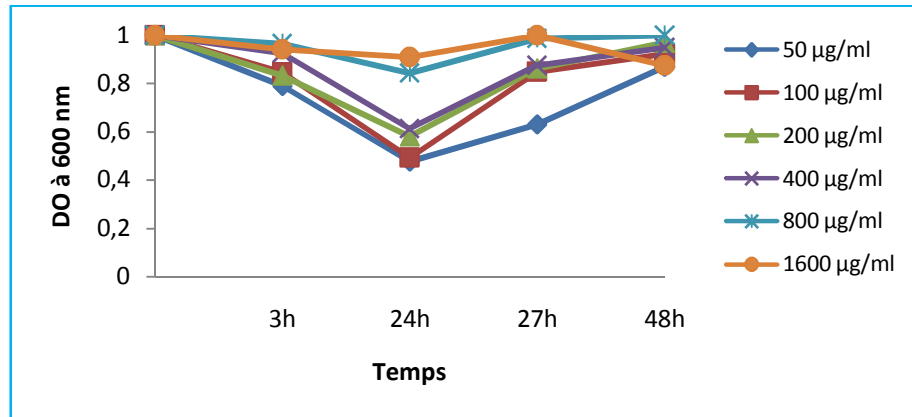


Figure 25 : Effet du cadmium sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (P1).

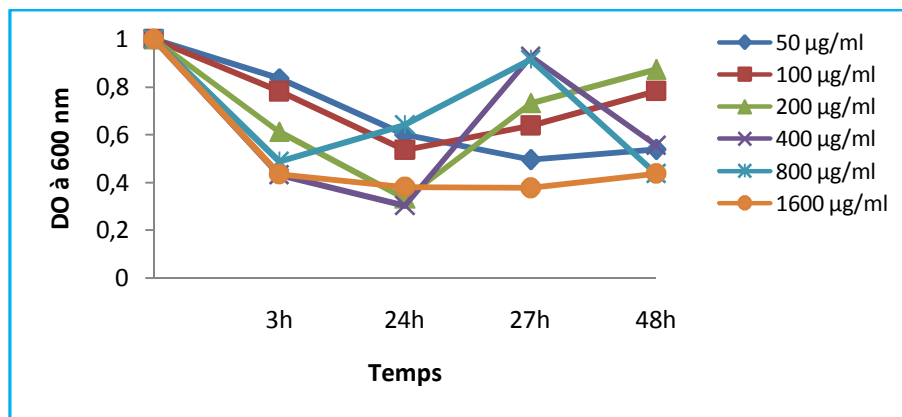


Figure 26 : Effet du cadmium sur la croissance de *Staphylococcus aureus* (S1).

Les résultats obtenus montrent que le cadmium a un effet variable sur la croissance des différentes bactéries testées.

La diminution de croissance de certaines bactéries avec l'augmentation des concentrations du cadmium pourrait s'expliquer par la sensibilité de ces souches à ce métal toxique.

La toxicité du cadmium a été mesurée essentiellement sur la croissance bactérienne, la respiration et certaines activités enzymatiques. D'une manière générale, l'effet toxique du cadmium s'exprime au niveau de la croissance bactérienne le plus souvent en terme d'augmentation du temps de latence et parfois d'inhibition du taux de croissance. Les travaux de [Crovbset al. \(1974\)](#) ont montré également que le cadmium provoque des lésions au niveau de l'ADN ([Liao et al., 2002](#)).

Nos résultats révèlent la présence des bactéries qui se développent mieux à des concentrations élevées du cadmium. L'homéostasie des métaux dans les cellules étant contrôlée par des processus actifs. Il n'est pas surprenant d'observer une forte croissance bactérienne dans des concentrations métalliques élevées. Certaines bactéries à Gram négatif possèdent des systèmes d'efflux important lui permettant de contrôler l'homéostasie des métaux, surtout en présence de fortes concentrations puisqu'elle est capable de les rejeter efficacement vers l'extérieur via une forte consommation d'énergie (plus forte consommation de sucres du milieu extérieur) (Rozycki et Nies, 2008).

Pardo *et al.* (2003) ont montré que des cellules bactériennes inactivées étaient capables de biosorber jusqu'à 80% de cadmium confirmant ainsi la capacité des cellules bactériennes à biosorber de grandes quantités de métaux lourds en conditions passives d'exposition. Toutefois, une augmentation de la concentration en métal ajouté dans un milieu donné entraîne une augmentation du métal accumulé par les bactéries présentes dans ce milieu. Un effet protecteur a pu être mis en évidence lorsque le métal est complexé par d'autres composants. De même, la toxicité du cadmium vis-à-vis des bactéries est diminuée en présence de cystéine, de glutamate et d'aspartate.

Les résultats obtenus montrent également que certaines bactéries présentent des pics de croissance à certaines concentrations du cadmium varient aussi avec la durée d'incubation. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette variabilité : la taille du microorganisme, sa composition chimique, son activité physiologique à laquelle s'ajoutent les conditions de culture. Par ailleurs, Guinéet *al.* (2006) ont suggéré que la croissance des bactéries exposées aux métaux lourds peut être variable à cause de l'adsorption aux groupements fonctionnels qui est limitée par la surface des cellules. Johnson *et al.* (2007) ont montré que par rapport à des cellules inactives, l'activité métabolique des cellules crée un potentiel électrique à travers la membrane plasmique, appelé « force motrice protonique » (PMF) pour se protéger des métaux. La PMF est une composante essentielle du métabolisme bactérien permet de pomper les protons à l'extérieur de la cellule via des pompes ATPases ou pompes à protons et les agents chimiques se concentrent dans la cellule (Kemperet *al.*, 1993).

III. Effet des herbicides sur la croissance des bactéries

L'évolution de croissance de différentes bactéries vis-à-vis des deux herbicides testés est illustrée sur les figures 27- 36.

Nous notons qu'après une durée de 3 heures d'incubation, toutes les charges de biomasses bactériennes diminuent ; cette diminution est généralement suivie par une augmentation de croissance après 24 H d'incubation.

Globalement, le temps d'incubation a un effet positif sur les charges bactériennes. Nous remarquons que les durées d'incubation les plus longues (27 H et/ou 48 H) se caractérisent par des charges importantes d'*E.coli* K12, *Proteus vulgaris* (Fig. 30), *Shigellaspp.* (Fig. 31), *Edwardsiella tarda* (Fig. 33), *Citrobacter freundii*(Fig. 34), *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 35) et *Staphylococcus aureus* (Fig. 36).

Par opposition, l'évolution de la croissance des souches *E.coli*(Fig. 28), *Klebsiella oxytoca* (Fig. 29) et *Salmonella typhimurium* (Fig. 32), fait apparaître, en fin de suivi, des différences importantes entre le temps 0 et 48 H ; Les densités les plus faibles sont 0,282, 0,386 et 0,404, respectivement.

Les résultats obtenus montrent que l'augmentation des concentrations des deux herbicides testés n'a pas un effet visible sur la croissance des bactéries. Certaines concentrations élevées ont un effet évolutif sur la croissance bactérienne, par contre d'autres concentrations faibles ont un effet décroissant et vice versa.

Généralement, les densités optiques les plus faibles sont enregistrées vis-à-vis de 1000 µg/ml de Brumby 80EC. En revanche, la majorité des densités de croissances sont importantes vis-à-vis du Desormone lourd D.

Les souches *E.coli* K12 (Fig. 27) et *Shigellaspp.* (Fig. 31) présentent des croissances importantes à une concentration de 1000 µg/ml de Desormone lourd D. Par contre, cette dernière concentration a pu diminuer la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (Fig. 35), *Salmonella typhimurium* (Fig. 32) et de *Proteus vulgaris* (Fig. 30) à une densité optique de 0,332 après 24 H, 0,308 après 24 H et 0,229 après 27 H, respectivement.

Toutefois, la présence de Brumby 80EC engendre des densités de croissance maximales de 1 pour *E.coli* K12 (Fig. 27), de 0,98 pour *Shigellaspp.* (Fig. 31) et de 0,963 pour *Salmonella typhimuriun* vis-à-vis de 150 µg/ml (Fig. 32).

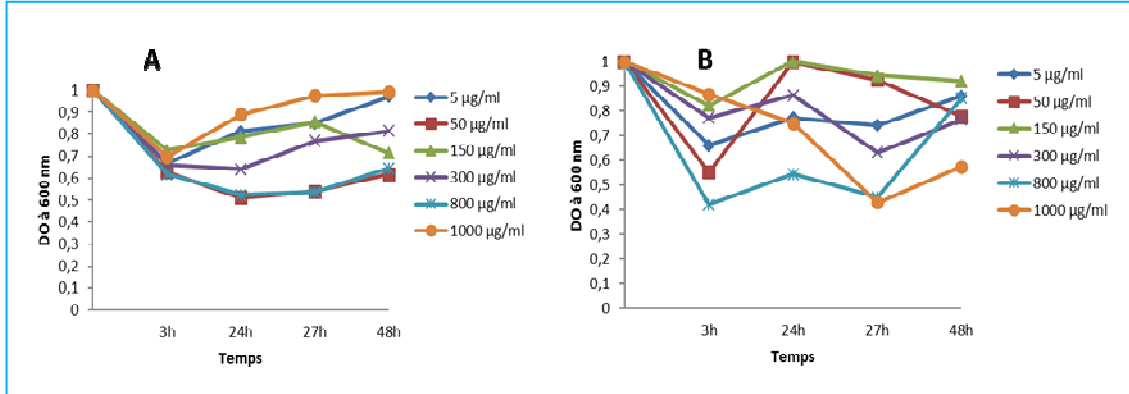


Figure 27 : Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance d'*Escherichia coli* K12.

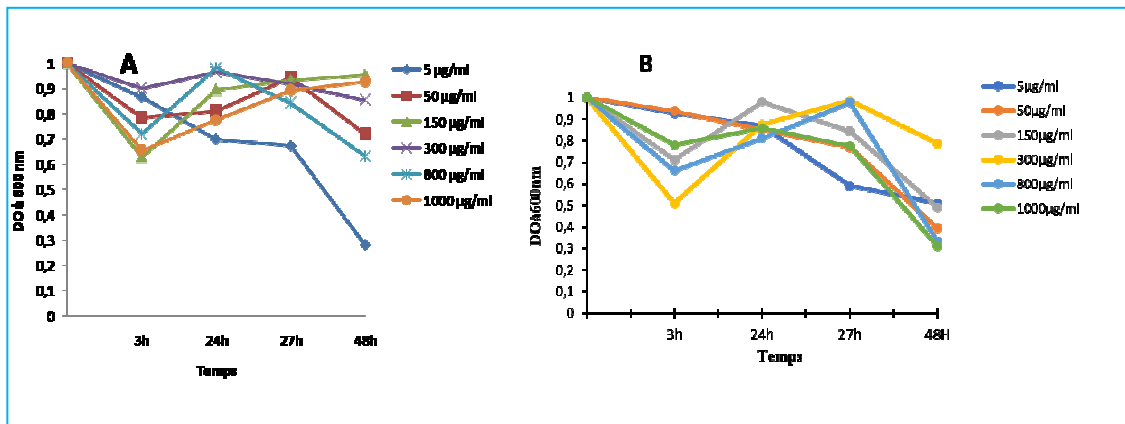


Figure 28: Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance d'*Escherichia coli* (E1).

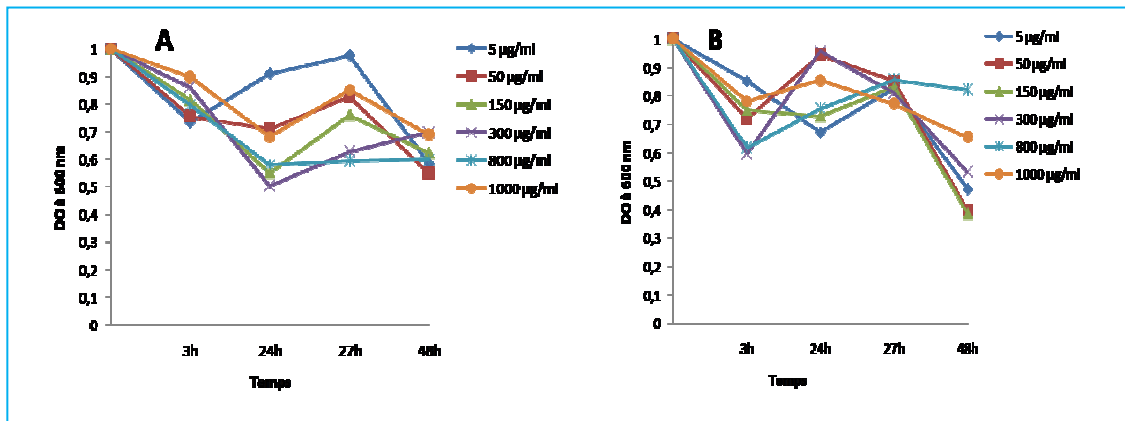


Figure 29: Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de *Klebsiella oxytoca*(E2).

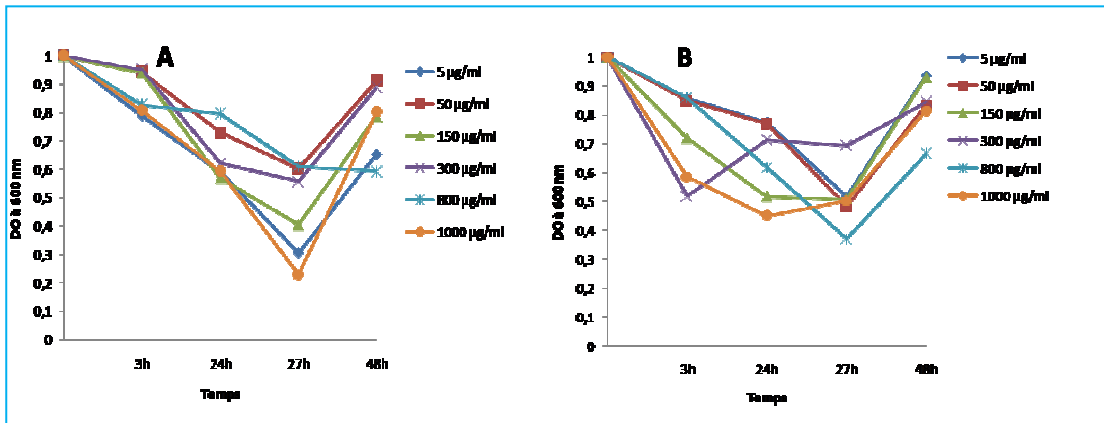


Figure 30: Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de *Proteus vulgaris* (E3).

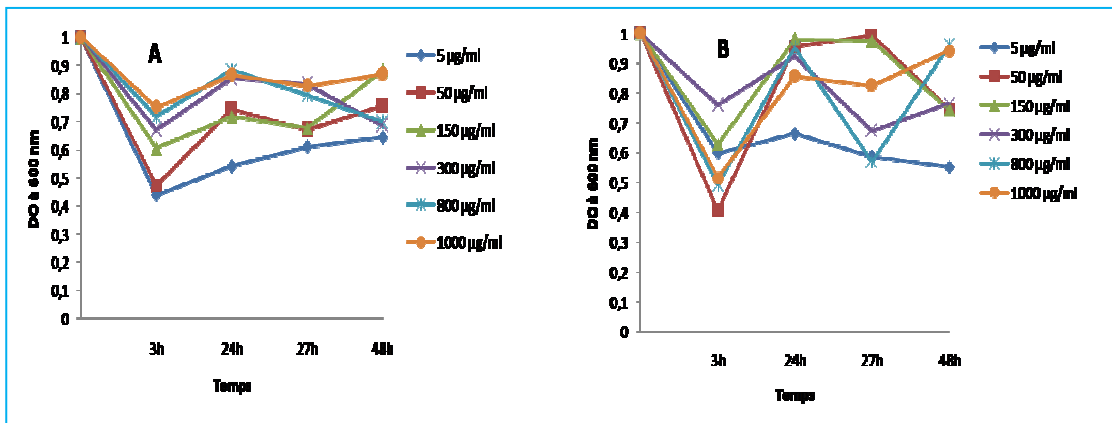


Figure 31 : Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de *Shigella* spp.(E4).

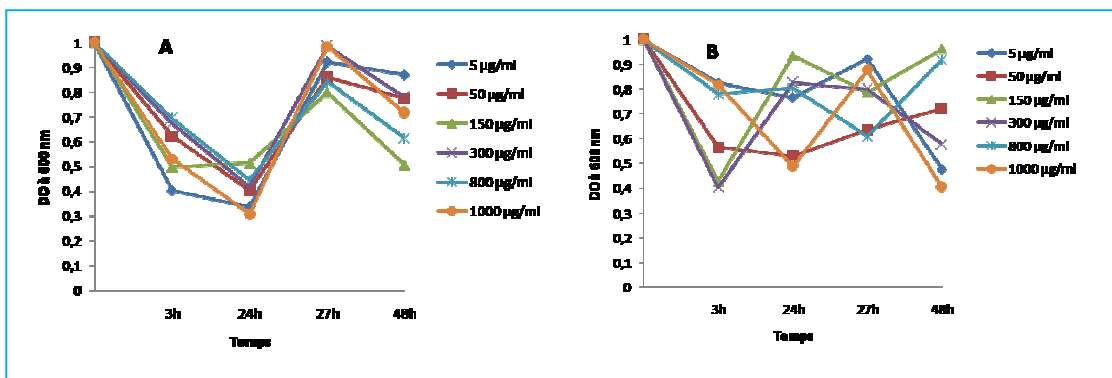


Figure 32 : Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de *Salmonella typhimurium*(E5).

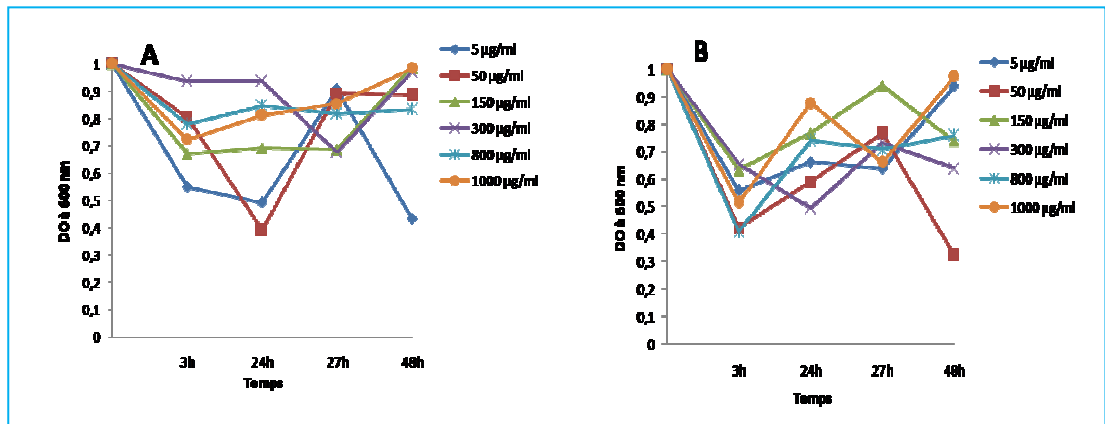


Figure 33 : Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance d'*Edwardsiella tarda* (E6).

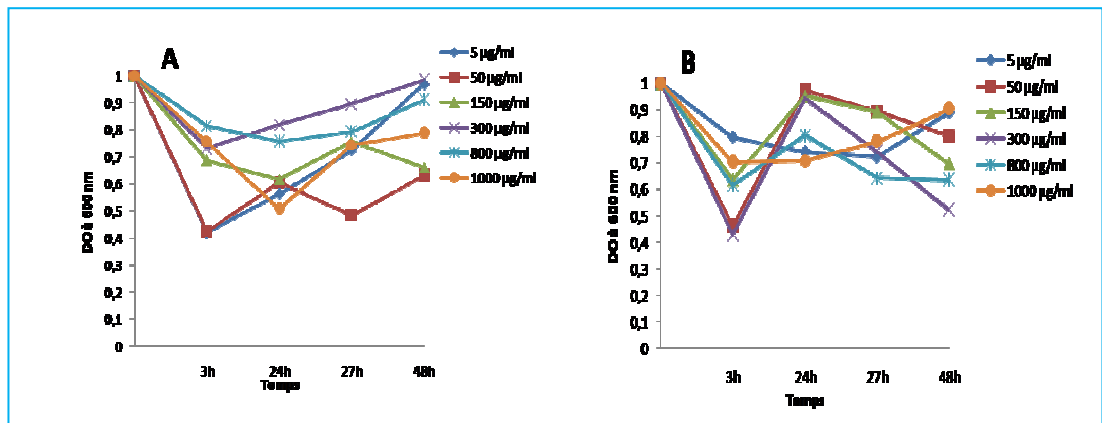


Figure 34: Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de *Citrobacter freundii* (E7).

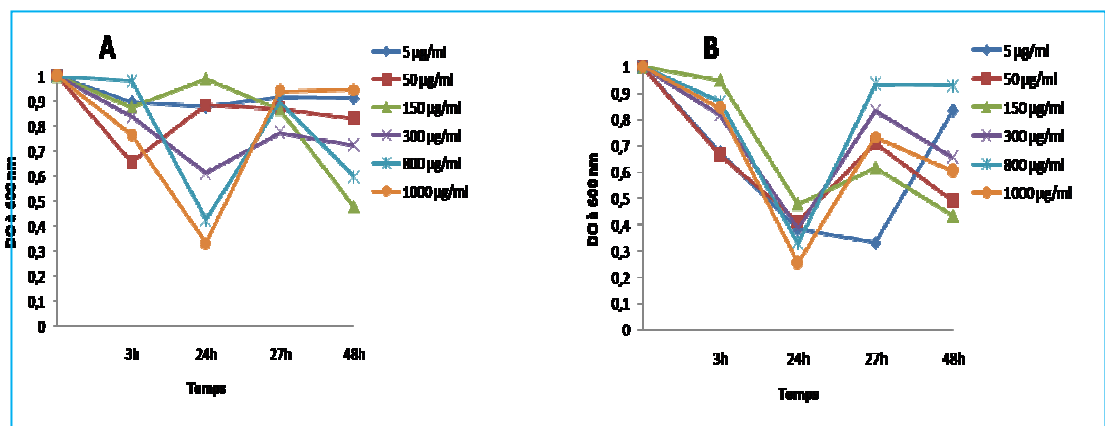


Figure 35: Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* (P1).

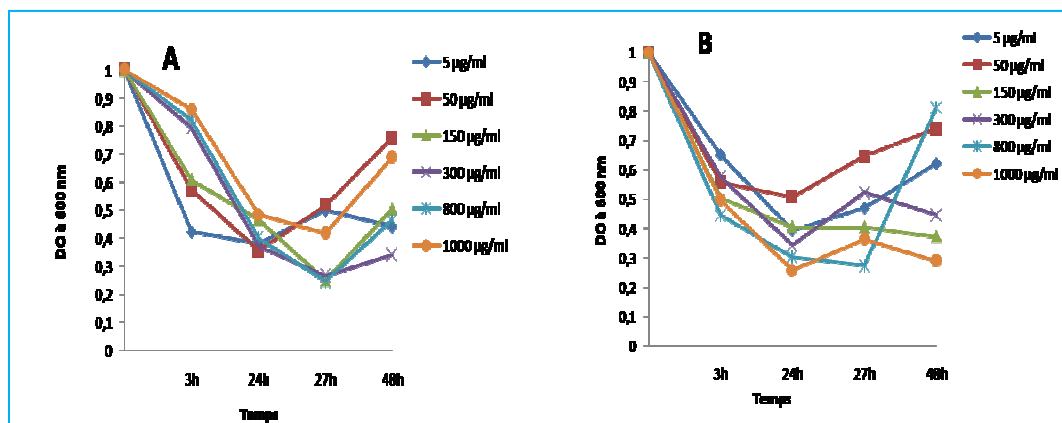


Figure 36: Effet du Desormone lourd D (A) et du Brumby 80EC (B) sur la croissance de *Staphylococcus aureus* (S1).

Les bactéries d'origine aquatiques sont particulièrement exposées à la toxicité des herbicides (Gao *et al.*, 2004). Dans une moindre mesure, il est également envisageable que certains polluants puissent affecter directement quelques espèces bactériennes et modifier ainsi la diversité au sein de la population comme cela est parfois observé dans des écosystèmes terrestres (Johnsen *et al.*, 2001). Ces effets directs et/ou indirects peuvent avoir des répercussions importantes sur le fonctionnement de l'écosystème. Les bactéries hétérotrophes jouant un rôle primordial au niveau des flux nutritifs, en assurant la majorité du recyclage de la matière organique (Brock *et al.*, 2000).

La présente étude montre que les deux herbicides commerciaux Desormone lourd D et Brumby 80 EC n'ont pas vraiment un effet important sur la croissance des bactéries isolées des eaux de surface de la région de Guelma. Toutes les souches bactériennes ont pu croître à toutes les concentrations testées même aux plus élevées.

D'après Bérard *et al.* (2002) les herbicides peuvent entraîner, dans certains cas, le développement de capacités de tolérance au polluant au sein des communautés sensibles. Ce phénomène de PICT (Pollution-Induced Community Tolerance), régulièrement observé en conditions expérimentales et en milieu naturel, particulièrement sur les communautés microbiennes, souligne la capacité d'adaptation potentielle de certaines populations microbiennes face à ces molécules.

Les premières heures d'exposition des bactéries aux herbicides se caractérisent par une diminution de la charge bactérienne, ceci pourrait s'expliquer par le fait que les herbicides ont un premier effet direct se traduisent généralement par une fragilisation de la population touchée ou par une baisse d'abondance (Lambert *et al.*, 2006). De plus, les herbicides peuvent entraîner des modifications des conditions physico-chimiques du milieu, telles qu'une baisse du pH ou de la teneur en oxygène (Hartgerset *al.*, 1998). En effet, nous pouvons constater que les premières heures correspondent probablement à une phase d'adaptation des communautés aux conditions expérimentales.

Brock *et al.* (2000) montre également que les communautés microbiennes constituent des cibles potentielles importantes pour les herbicides. Ces polluants peuvent en effet affecter directement les microorganismes et/ou indirectement les microorganismes hétérotrophes.

Nous avons remarqué, qu'il n'existe pas un effet clair de l'augmentation des concentrations des herbicides sur la croissance des bactéries. L'augmentation proportionnelle de la charge bactérienne avec les concentrations des herbicides pourrait s'expliquer par le fait que les bactéries peuvent interagir directement avec les polluants en les utilisant comme substrat métabolique (Downing *et al.*, 2004).

DeLorenzo *et al.* (1999) et Downing *et al.* (2004) ont ainsi observé une augmentation de la production bactérienne hétérotrophe dans des communautés aquatiques exposées à 50 à 250 µg/l d'herbicide. Cette stimulation fut attribuée au déclin de d'autres organismes autotrophes directement affectés par le même herbicide.

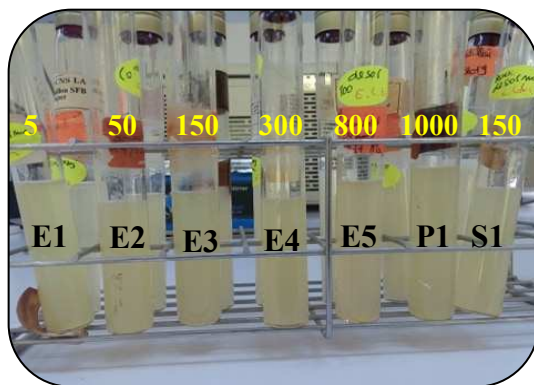
En effet, plusieurs auteurs ont montré que l'état physiologique des organismes peut influencer fortement la réponse des communautés face à une pollution par des herbicides en conditionnant leur niveau de sensibilité et leurs capacités de récupération post-contamination (Wendt-Raschet *et al.*, 2004). Aussi, la réponse des microorganismes face à l'exposition à un polluant dépend de nombreux facteurs abiotiques tels que les ressources nutritives (DeLorenzo *et al.*, 2001), la température (Bérard *et al.*, 1999) ou la luminosité (Guash and Sabater, 1998).

- ❖ La figure 37 illustre la croissance de certaines bactéries dans les différentes concentrations des agents chimiques testés.



❖ Cadmium

❖ Cuivre



❖ Désormone lourd D

❖ Brumby EC

Figure 37 : Croissance de certaines bactéries dans les différentes concentrations des agents chimiques testés.

IV. Dosage de la métallothionéine

La métallothionéine (MT) a été dosée chez les bactéries exposées aux métaux lourds après 24 H d'incubation. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure (28).

Nous remarquons que toutes les souches bactériennes expriment des concentrations de MT après exposition au cuivre ainsi qu'au cadmium. De nombreux travaux montrent l'induction de MTs après une contamination par les métaux lourds (cadmium, cuivre, zinc...) ([Chowdhury et al., 2005](#) ; [Silvestre et al., 2005](#)). L'expression des gènes de MTs induite par la contamination métallique suggère un effet de protection de ces protéines vis-à-vis des métaux lourds. Les thionéines (formes T) représentant environ 50% de la concentration en MT totales dans de nombreux tissus, de ce fait, quand des tissus sont contaminés par des

métaux, les T représentent un pouvoir tampon, évitant ainsi l'augmentation de la concentration en métaux libres dans les cellules (Yang *et al.*, 2001).

La quantité de MT déterminée après une contamination par le cadmium est dans tous les cas supérieure à la détermination faite après contamination par le cuivre. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le cadmium est plus toxique par rapport au cuivre, donc il a le plus fort pouvoir d'induction de formation des MTs (Butler et Roesijadi, 2001). En effet, une augmentation de la concentration en MTs dans des bactéries contaminées au cadmium a déjà été décrite et expliquée par une stabilisation des MTs par liaison du cadmium (des complexes MT-Cd qui seraient non toxiques) (Killeet *al.*, 1990).

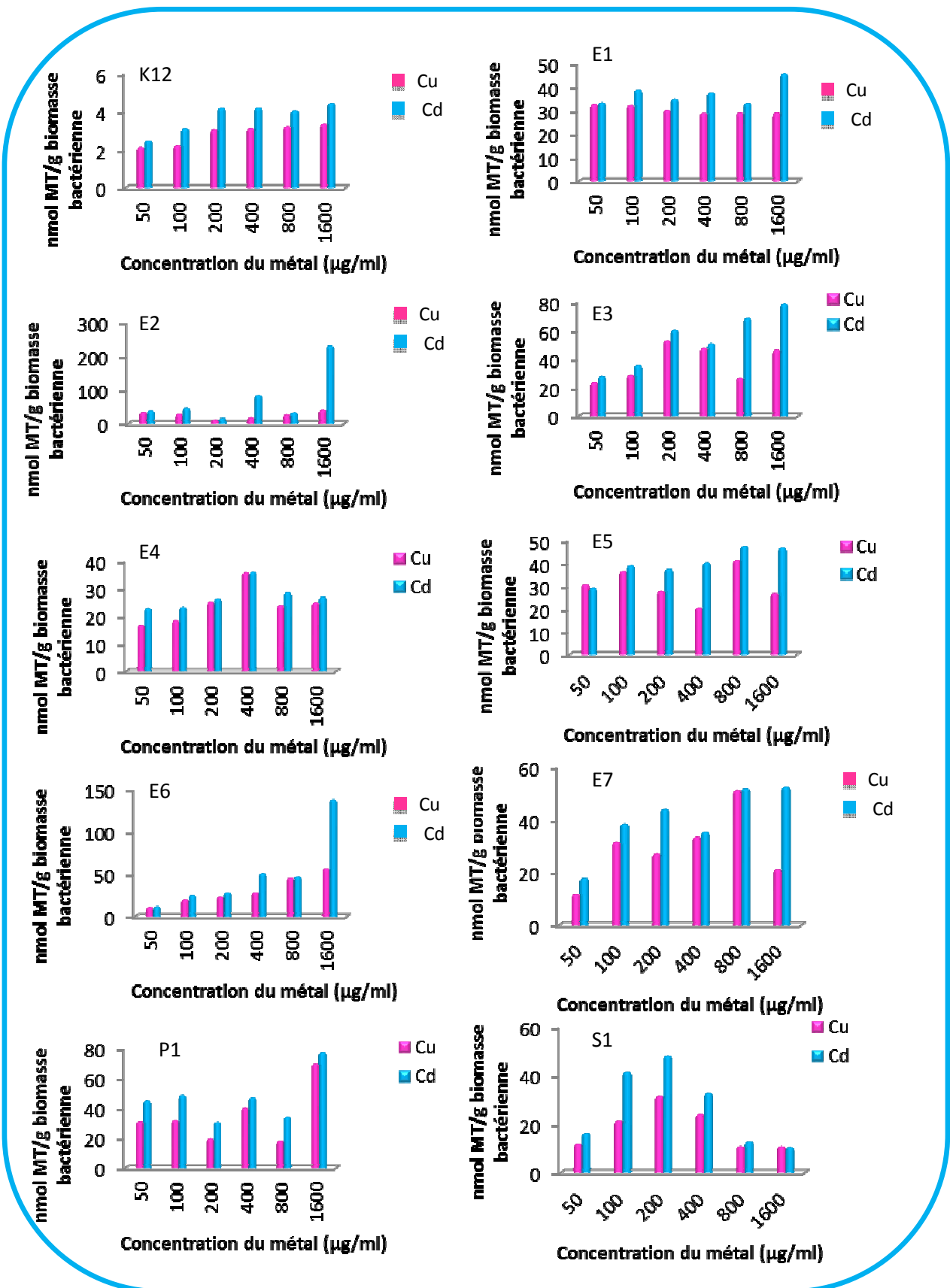


Figure 38: Variation de la concentration en métallothionéine chez les bactéries exposées aux métaux lourds.

En analysant les graphes des souches *E.coli* K12 et *Edwardsiella tarda* (E6), nous notons un gradient croissant des taux en MT. Ces résultats laissent supposer l'existence d'une corrélation positive entre le taux des MT sécrétées et la concentration des métaux lourds à lesquels les bactéries sont exposées. Dans ce sens plusieurs études ont montré une corrélation positive entre l'accumulation de la MT et la concentration des ETM (**Géret et Cosson, 2000 ; Geffardet al., 2002 ; Santovitoet al., 2015**).

En revanche, l'examen des graphes des autres souches bactériennes montre l'existence d'une hétérogénéité dans les concentrations en MT. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'induction de la synthèse des MT peut être induite par d'autres facteurs tels que les facteurs physico-chimiques (température, salinité, pH, oxygène dissous, etc.) et l'état physiologique de l'organisme (**Boulajfeneet al., 2017**). **Odawara et al. (1995)** ont montré que chez *E. coli*, la MT fixe bien le cadmium mais pas le zinc ni le cuivre.

La sur-expression de la MT est observée chez *Klebsiella oxytoca* (E2) suivi par *Edwardsiella tarda* (E6), *Pseudomonas aeruginosa* (P1) et *Proteus vulgaris* (E3) après une exposition à 1600 µg/ml du cadmium. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le niveau d'induction de la MT est influencé d'une part par la dose et la cytotoxicité du métal et de la sensibilité du micro-organisme d'autre part (**Butler et Roesijadi, 2001**).

Conclusion et Perspectives

Conclusion

Les résultats de l'étude de l'effet du cuivre, cadmium et des herbicides commerciaux (Desormone lourd D et Brumby 80 EC) sur la croissance de certaines souches bactériennes provenant des eaux de surface de la région de Guelma, permettent de tirer les conclusions suivantes :

- Toutes les souches bactériennes se développent dans les concentrations allant de 50 à 1600 µg/ml de métal ;
- La croissance des bactéries diffère en fonction de la concentration du métal et de la durée d'incubation ;
- Le cuivre ralentit la cinétique de la multiplication bactérienne après une courte durée d'incubation (3 heures) ;
- Certaines bactéries se développent mieux à des concentrations élevées du cadmium ;
- La majorité des bactéries présentes des densités importantes vis-à-vis des métaux testés après des durées d'incubation longues et des concentrations élevées ;
- L'impact des herbicides sur les bactéries se répercute de manière moins systématique et/ou moins prononcée ;
- Il semble que les forts apports en herbicides génèrent dans la plupart des cas une augmentation des biomasses bactériennes ;
- Tous les agents chimiques testés ne présentent pas une toxicité suffisante sur les espèces bactériennes étudiées pour entraîner leur disparition ;
- Toutes les souches bactériennes expriment des concentrations de métallothéionine après exposition aux deux métaux testés ;
- L'expression de métallothéionine est plus élevée après une contamination par le cadmium que par le cuivre.

Perspectives :

Il serait important de :

- Utiliser des méthodes génétiques pour déterminer des gènes de régulation de l'homéostasie et les gènes de résistances contre des agents chimiques testés ;
- Réaliser des tests de bioremédiation afin de déterminer les souches qui peuvent être impliquées dans la dégradation de ces polluants ;
- Evaluer *in situ* le risque écotoxicologique des polluants testés sur les communautés bactériennes.

Références Bibliographiques

A

Adriano D.C. (2001). Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, Bioavailability and risks of metals, 2^{ème} édition -Springer-Verlag, New York. 10: 6-10.

Akinbowale O.L., Peng H., Grant P., et Barton M.D. (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile *aeromonads* and *pseudomonads* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 30 : 77-82.

Amblard C. (2012). Ecologie microbienne en milieu aquatique Les Sciences de l'Eau : Bilan et perspectives. P : 145-162.

Andujar P., Bensera C., et Descatha A. (2010). Intoxication aiguë et chronique au cadmium. *La Revue de médecine interne*. 31 (2) : 107 - 115.

Arris S. (2008). Etude expérimentale de l'élimination des polluants organiques et inorganiques par adsorption sous-produits de céréales. Thèse de doctorat, Université de Constantine- Algérie.

Assanta M.A., Roy D., Lemay M.J., et Montpetit D. (2002). Evidence for *Escherichia coli* O157:H7 attachment to water distribution pipe materials by scanning electron microscopy. *Journal Food Protection* December. 65(12) : 1970-1975.

Aubin M. (2016). Révéler la chimie des préparations antiques, à usage cosmétique ou médical, impliquant des sels de métaux lourds. Thèse doctorat, L'université Pierre et Marie Curie spécialité Chimie Analytique Ecole doctorale : Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre – ED, 388p.

Aurélien D. (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 doctorat. Université de Grenoble, la France.

B

Badot P., Crini G. (2007). Traitement et épuration des eaux industrielles polluées : Procédés membranaires, bioadsorption et oxydation chimique, Presses Univ. Franche Comté, 356p.

- Baize D. (1997).** Teneurs totales en métaux lourds dans les sols français. *Courrier de l'environnement de l'INRA*. 22 : 37- 46.
- Barnabas K., Mbofung C. (2009).** Contribution à l'évaluation de la contamination par les métaux lourds de trois espèces de poissons, des sédiments et des eaux du lac Tchad, Alimentation et Nutrition. Etudes Approfondies (DEA). Cameroun.
- Barriuso E., Calvet R., Schiavon M., et Soulas G. (1996).** Les pesticides et les polluants organiques des sols – Transformations et dissipation. *Etude et gestion des sols*. 3(4) : 279-296.
- Belyaeva O.N., Haynes R.J., et Birukova O.A. (2005).** Barley yield and soil microbial and enzyme activities as affected by contamination of two soils with lead, zinc or copper. *Biology and Fertility of Soils*. 41 :85-94.
- Benedetto M. (1997).** Méthodes spectrométriques d'analyse et de caractérisation, métaux lourds, Axe " Génie des Procédés", centre SPIN, Ecole des Mines de Saint-Etienne.
- Berard A., Leboulanger C., et Pelte T. (1999).** Tolerance of *Oscillatoria limnetica* Lemmermann to atrazine in natural phytoplankton populations and in pure culture: influence of season and temperature. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 37: 472-479.
- Berard A., Dorigo U., et Humbert J.F. (2002).** Pollution-Induced Community Tolerance concept applied to algal communities: a tool for real risk- assessment in aquatic sciences. *International Journal of Limnology*. 38(3) : 247-261.
- Bernier D. (2002).** Impact des herbicides dans l'eau et le terreau. Direction de l'innovation scientifique et technologique, Agriculture, Pêcheries et Alimentation, Québec. 3 p
- Bonnard R. (2003).** Evaluation de l'impact des rejets atmosphériques des tranches charbon d'une grande installation de combustion sur la santé. Unité Evaluation des Risques Sanitaires Direction des Risques Chroniques. France.
- Borkow G., Gabbay J. (2004).** Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. *FASEB Journal*. 18(14):1728-1730.
- Bouziati M. (2000).** L'eau de la pénurie l'eau de la pénurie aux maladies. Edition Ibn - Khaldoun, Oran. Algérie, 247p.

Boulajfene W., Stroglyoudi E., Catsiki V.A., El Mlayah A., et Tlig-Zouari S. (2017). Bio-monitoring of metal impact on metallothioneins levels in the gastropod *Phorcus turbinatus* (Born, 1778) in the northeastern and the eastern coasts of Tunisia.

Brock T.C.M., Lahr J., et Van Den Brink P.J. (2000). Ecological risk assessment of pesticides in freshwater ecosystems. Part 1: Herbicides. *Alterra-Report 088*, Wageningen, The Netherlands.

Butler R., Roesijadi G. (2001). Disruption of metallothionein expression with antisense oligonucleotides abolishes protection against cadmium cytotoxicity in molluscan hemocytes. *Journal of Toxicological Sciences*. 59 :101-107.

C

Calvet R., Barriuso E., Benoit P., Bedos C., Charnay M.P., et Coquet Y. (2005). Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricole. Paris, 637p.

Changey F. (2011). Etude de l'évolution du potentiel génétique de populations bactériennes dégradant l'atrazine. Sciences agricoles. Thèse de doctorat, Université de Bourgogne.

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

Chiffolleau J.F., Claisse D., Cossa D., Ficht A., Gonzalez J.L., Guyot T., Michel P., Miramand P., Oger C., et Petit F. (2001). La contamination métallique. Programme Seine Aval, fascicule n°8, Editions Ifremer, Plouzané (France). ISBN 2-84433-028-2.

Chowdhury M., Baldisserotto B., et Wood C. (2005). Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 48 : 381-390.

Claire F. (2012). Rôle des *Pseudomonas* fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg.

Clemens S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 2(2) : 475-486.

Cléroux J. (2013). Plantes exotiques envahissantes au Québec : la renouée du japon au parc de la chute-montmorency. Thèse Essai Présenté au centre universitaire de formation en environnement en vue de l'obtention du grade de maître en environnement, Université de Sherbrooke, Canada.

Comoretto I., Chiron S. (2005). Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river. *Science Total Environment*. 349 : 201-210.

Coyle P., Philcox J.C., et Carey L.C. (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59(4): 627-47.

Cseh E. (2002). Metal permeability, transport and efflux in plants. Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants. Prasad M.N.V et Strzalka K. (eds). 1-36.

D

Dameron C., Howe P.D. (1998). Copper Environmental Health criteria. n°200, World Health Organization. Geneva. ISBN 9241572000.

Darmency H. (2010). Conséquences de l'utilisation des OGM sur l'usage des pesticides. *Oléagineux. Corps gras. Lipides*. 17 : 1-5.

Delorenzo M.E., Scott G.I., et Ross P.E. (1999). Effects of the agricultural pesticide's atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 18: 2824-2835.

Delorenzo M.E., Scott G.I., et Ross P.E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 20: 84-98.

Downing H.F., Delorenzo M.E., Fulton M.H., Scott G.I., Madden C.J., et Kucklick J.R. (2004). Effects of the agricultural pesticide's atrazine, chlorothanil, and endosulfan on South Florida microbial assemblages. *Ecotoxicology*. 13 : 245-260.

Duchaufour P. (1997). Pédologie : sol, végétation et environnement. Abrégés de Pédologie. Masson 5^{ème} édition, 291p.

J

Joachim S., Morin A., et Thybaud E. (2009). Effet du cuivre sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. *L'actualité chimique*. 334 : 55-58.

Joffin J., Leyral. (2006). Microbiologie technique, Tome1 dictionnaire des techniques 4ème Edition : ScérénCrdpAquitaine. P : 22-23.

Johnson K.J., Ams D.A., Wedel A.N., Szymanowski J.E.S., Weber D.L., Schneegurt M.A., et Fein J.B. (2007). The impact of metabolic state on Cd adsorption onto bacterial cells. *Geobiology*. 5:211-218.

Johnsen K., Jacobsen C.S., Torsvik V., et Sorensen J. (2001). Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils - a review. *Biology and Fertility of Soils*. 33 : 443-453.

Joly B. (1995). La résistance microbienne à l'action des antiseptiques et désinfectants. Antisepsie et désinfection. *Editions Eska*. P : 52-65.

H

Hachfi L. (2013). Effets de stress physico-chimiques sur l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie et la fonction de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonado-hépatique chez le loup (*Dicentrarchus labrax* L.). Biologie animale. Thèse doctorat. Université de Toulon.

Hall J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of the Society of Experimental Botany*. 366: 1-11.

Hartgers E.M., Aalderink G.H., Van Den Brink P.J., Gylstra R, Wiegmanj W.F., et Brock T.C.M. (1998). Ecotoxicological threshold levels of a mixture of herbicides (atrazine, diuron and metolachlor) in freshwater microcosms. *Aquatic Ecology*. 32(2):135-152.

Hassen A., Saidi N., Cherif M., et Boudabous A. (1998). Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresource Technology*. 64(1) : 7-15.

Hebrard L. (1998). Thèse Influence du compartiment bactérien sur le transfert du zinc en milieu poreux non saturé : expériences et modalisation ; sous la direction de Céline Delolme-Lyon (Sciences et techniques du déchet). INSA.

Hobman J., Yamamoto K., et Oshima T. (2007). Transcriptomic responses of bacterial cells to sublethal metal ion stress. *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. D.H. Nies, S. Silver: Editors. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Huynh T. (2009). Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ ver de terre/microflore tellurique. Thèse de doctorat en écologie microbienne. Université Paris Est.France.

I

IFEN (Institut Français de l'Environnement). (2004). Les pesticides dans les eaux : sixième bilan annuel, données 2002. (www.ifen.fr, consulter le: 3/4/2019).

G

Gao X., Olapade O.A., Kershner M.W., et Leff L.G. (2004). Algal-bacterial covariation in streams: A cross-stream comparison. *Archivfür Hydrobiologie*. 159 : 253-261.

Garin M.A., Simon O. (2004). Cadmium 109 environnement. Edition IRSN, 14p.

Gatignol M.C., Etienne J.C. (2010). L'ordonnance n° 58-1100 du 17 novembre 1958 relative au fonctionnement des assemblées parlementaires, sur la question de l'effet des pesticides sur la santé humaine.

Geffard A., Amiard J.C., et Amiard T.C. (2002). Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: Seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers*. 7(2) : 123-137.

Géret F., Cosson R.P. (2000). Utilisation des métallothionéines comme biomarqueur de la contamination métallique : variabilité entre sites et organes chez l'huître *Crassostrea gigas*. *Oceanologica Acta*. 23(3) : 261-271.

Gibbons D., Morrissey C., et Mineau P. (2014). A Review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research (Epubahead of print)*. 16 p.

Giroux I. (2004). La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec. Québec: ministère de l'Environnement. Direction du suivi de l'état de l'environnement. n° ENV/2004/0309, collection n° QEI151. 40 p.

Grunewald k., Schmidt W. et Unger C. (2001). Behavior of glyphosate and aminomethylphosphonic acid AMPA in soils and water of reservoir Radeborg II catchment (Saxony/Germany). *Journal of Plant Nutrition and Soils Science*. P: 65-70.

Guasch H. Sabater S. (1998). Light history influences the sensitivity to atrazine in periphytic algae. *Journal of Phycology*. 34 : 233-241.

Guettaf A.Y. (2015). Caractérisation hydro chimique et évaluation des indicateurs de pollution dans l'environnement : cas de l'oued Seybouse et ses effluents dans le sous bassin de Guelma (Nord-est Algérien). Thèse de doctorat, Faculté des sciences de la nature et de la vie ; science biologique. Guelma. 149p.

Guiné V., Spadini L., Sarret G., Muris M., Delolme C., Gaudet J.P., et Martins J.M.F. (2006). Zinc Sorption to Three Gram-Negative Bacteria: Combined Titration, Modeling, and EXAFS Study. *Environmental Science and Technology*. 40 : 1806-1813.

Guiraud J. (2003). Microbiologie alimentaire. Édition RIA Dunod. 359-722.

Ƙ

Karbasizaed.V., Badami.N., et Emtiazi.G. (2003). Antimicrobial, heavy metal resistance and plasmid profile of coliforms isolated from nosocomial infections in a hospital in Isfahan, Iran. *African Journal of Biotechnology*. 2: 379-383.

Kemper M.A., Urrutia M.M., Beveridge T.J., Koch A.L., et Doyle R.J. (1993). Proton motive force may regulate cell wall-associated enzymes of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 175: 5690-5696.

Kille P., Stephens P., Cryer A., et Kay J. (1990). The expression of a synthetic rainbow trout metallothionein gene in *E. coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1048 : 178-186.

Kilinç O. (2010). Etude du mode d'action et du devenir d'un herbicide : l'acéclonifène Thèse de doctorat - Grenoble 1.

Koumolou L., Aikpo F., Chabi C., Ayi V., Houssou C., et Edorh P. (2010). Evaluation de la contamination des eaux du fleuve Couffo dans la zone cotonnière de Djidja (Bénin) par les pesticides. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 9(3): 1725.

£

Lamy C., Dubreuil V. (2011). Modélisation du bilan hydrique en Bretagne dans le contexte du changement climatique : cas du scénario A1B. Actes du 24e colloque de l'AIC. 357-362.

Lambert S.J., Thomas K.V. et Davy A.J. (2006). Assessment of the risk posed by the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron to freshwater macrophytes. *Chemosphere*. 63: 734-743.

Langsrund S., Sundheim G., et Borgmann-Strahsen R. (2003). Intrinsic and acquired resistance to Quaternary Ammonium compound. In food-related *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology*. 95 : 874-882.

Larpent J. (1997). Microbiologie des eaux d'alimentaire: Technique de labo. Edition Tec et Doc. 294-300.

Ledin M. (2000). Accumulation of metals by microorganisms, processes and importance for soil systems. *Earth Science Reviews*. 51(1) : 1-31.

Leroux P. (2003). Modes d'action des produits phytosanitaires sur les organismes pathogènes des plantes. *Comptes Rendus Biologies*. 326 : 9-21

Lesven L. (2008). Devenir des éléments traces métalliques au sein du sédiment, un compartiment clé de l'environnement aquatique. L'Université des Sciences et Technologies de Lille. France.

Liao V.H., Dong J., et Freedman J.H. (2002). Molecular characterization of a novel, cadmium in du cible gene from the nematode *Caenorhabditiselegans*. A new gene that contributes to the resistance to cadmium toxicity. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 42049-42059.

Loué A., (1993). Oligo-éléments en agriculture- Ed. Nathan (Ed). 45-177.

Lundén J., Autio T., Markkula A., Helström S., et Korkeala H. (2003). Adaptive and cross-adaptive response of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*. 68 : 4194-4200.

Lundberg I. (1995). Pesticides et eaux de surface : Etude sur la situation concernant la pollution des eaux de surface par des résidus de pesticides dans les pays nordiques, en Allemagne et aux Pays-Bas, et les problèmes associés à la contamination par des pesticides. *Council of Europe*. 61: 11-20.

Lumsdon D.G., Meeussen J.C.L., Paterson E., Garden L.M., et Anderson P. (2001). Use of solid phase characterization and chemical modelling for assessing the behaviour of arsenic in contaminated soils. *Applied geochemistry*. 16: 571-581.

M

Martin S., Griswold W. (2009). Human Health Effects of Heavy Metals. *Environmental Science and Technology Briefs from Citizens*. 15 : 1-6.

Maynaud G. (2012). Adaptation aux métaux lourds de populations de *Rhizobia* impliquées dans la phytostabilisation de déblais miniers Identification des mécanismes d'adaptation au Zn et au Cd, et structuration des populations de *Rhizobia* adaptées aux sites miniers. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II.

McArdle H.J. (1995). The metabolism of copper during pregnancy. *A review of Food Chemistry*. 54 : 79-84.

Michel A. (2009). Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [*Brassicajuncea* (L.) Czern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bretagne occidentale - Brest.

Mohan J.E.L.H., Ziska W.H., Schlesinger R.B., Thomas R.C., Sicher K., George J., et SClark. (2006). Biomass and toxicity responses of poison ivy (Toxic dendron radicans) to elevated atmospheric CO₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 103: 9086-9089.

Mogilnaya O.A., Lobova T.I., Kargatova T.V., et Popova L.Y. (2005). Biofilm formation by bacterial associations under various salinities and copper ion stress. *Biofouling formation*. 21(5-6) : 247-255.

Monchy S. (2007). Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH₃₄. Thèse de doctorat en science, *ULB*. Bruxelles. 98p.

Moreau G. (2006). Transferts des pesticides vers les eaux superficielles et l'atmosphère : caractérisation et modélisation sur le bassin versant de la Vesle. Thèse de doctorat. Université Paris VI - Pierre et Marie Curie - UFR Sciences de la Terre.

Multigner L. (2005). Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), U 625, Campus de Beaulieu, Université Rennes 1, Avenue Général Leclerc, 35042 Rennes cedex.

N

Nzengue Y. (2008). Thèse doctorat, Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier – Grenoble I.

O

O'Gorman J., Humphreys H. (2012). Application of copper to prevent and control infection. *Journal of Hospital Infection*. 217-223.

Odawara F., Kurasaki M., et Suzuki-Kurasaki M. (1995). Expression of human metallothionein-2 in *Escherichia coli*: cadmium tolerance of transformed cells. *Journal of Biochemical Technology*. Tokyo. 118:1131-1137.

P

Pardo R., Herguedas M., Barrado E., et Vega M. (2003). Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas Putida*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 376 : 26-32.

R

Regnault R., Fabres G., Philogène B.J.R. (2005). Enjeux phytosanitaires pour l'agriculture et l'environnement. *Dunod*. 8ème édition Paris. Lavoisier, 53 p + 1013 p.

Riether K.B. (2007). Développement D'un Biocapteur Bactérien Pour La Détection De métaux Lourds. Thèse Doctorat. Université De Metz Laboratoire *Ecotoxicité, Biodiversité, Santé Environnementale*.

Rodier J., Bazin C., Broutin J.P., Chambon P., Champsaur H., et Rodi L. (2005). L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. DUNOD, 8eme édition, Paris. 1135p.

Rodier J. (2009). L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. 7 éditions, DUNOD (éditeur), Paris, 1350 p.

Rozycki T., Nies D.H. (2008). *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 96: 115-139.

Russell A.D. (1997). Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of Applied Microbiology*. 82: 155-165.

S

Santovito G., Boldrin F., et Irato P. (2015). Metal and metallothionein distribution in different tissues of the Mediterranean clam *Venerupis philippinarum* during copper treatment and detoxification. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*. 46-53;174-175.

Schneider R. (2016). Comportement et mobilité des éléments traces métalliques dans des sols environnant une usine de seconde fusion du plomb. Approches expérimentales et modélisation. Thèse de doctorat. Université de Reims Champagne-Ardenne ; Ecole Doctorale Sciences Technologie Santé (547).

T

Tabata A., Nagamune H., Maeda T., Murakami K., Miyake Y., et Kourai H. (2003). Correlation between Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Quaternary

Ammonium Compounds and Expression of Outer Membran Protein OprR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47: 2093- 2099.

Thomas L., Maillard J.Y., Lambert R.J.W., et Russel A.D. (2000).Development of resistance to Chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a «residual» concentration. *Journal of hospital infection*. 46: 297-303.

To M.S., Favrin S., Romanova N., et Griffiths M. (2002).Posdaptational Resistance to Benzalkonium Chloride and Subsequent Physicochemical Modification of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental Microbiology*. 68 : 5258-5264.

u

Urien N. (2015). Modélisation de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le genre *Gammarus* : influence des facteurs environnementaux et de l'histoire de vie des organismes. Thèse Doctorat. Université Claude Bernard. Lyon I. France.

v

Vanassche F., Clijsters H. (1990).Effects of metals on enzyme-activity in plants. *Plant, Cell and Environment*. 13:195-206.

Verlicchi P., Al Aukidy M., Zambello E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment. *Science of The Total Environment*. 429:123-55.

Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., et Fabbri R. (1997).A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application in Mediterranean and Atlantic molluscs. *Marine Environmental Research*. 44: 69 - 84.

Voegborio R.B., Matsuyama A., Adimado A.A., et Akagi H. (2011). Determination of methylmercury in marine and freshwater fish in Ghana using a combined technique of dithizone extraction and gas-liquid chromatography with electron capture detection. *Food Chemistry*. Germany.124: 1244- 1248.

W

Wang Q.R., Cui Y.S., Liu X.M., Dong Y.T., et Christie P. (2003). Soil contamination and plant uptake of heavy metals at polluted sites in China. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*. 38: 823-83.

Wendt-Rasch L., Van Den Brink P.J., Crum S.J.H., et Woin P., (2004). The effects of a pesticide mixture on aquatic ecosystems differing in trophic status: responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 57: 383-398.

Y

Yang Y., Maret W., et Vallee L. (2001). Differential fluorescence labeling of cysteinyl clusters uncovers high tissue levels of thionein. *Proceeding of the National Academy of Science. U.S.A.* 98 : 5556-5559.

Yao M. (2008). Dynamique des éléments traces dans les eaux de surface des bassins versants agricoles de Gascogne. Thèse de doctorat. Université de Toulouse Délivré par l'Institut National Polytechnique de Toulouse. France.

Z

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

Zhang X., Brussee K., Coutinho C.T., et Rooney Varga J.N. (2006). Chemical stress induced by copper: examination of a biofilm system. *Water Science and Technology*. 54(9) : 191-9.

Annexes

Annexe 1

• Composition des milieux de culture (Guiraud, 2003 ; Rodier *et al.*, 2005)

Hektoen(g/ litre d'eau distillée)

Protéase peptone	12g
Extrait de levure	3.0g
Chlorure de sodium	5.0g
Thiosulfate de sodium	5.0g
Sels biliaires	9.0g
Citrate de ferrique ammoniacale salicine	1.5g
Salicine	2.0g
Saccharose	12g
Lactose	2.0g
Fuchsine acide	0.04g
Bleu de brothynol	0.06g
Agar agar	1.4g
pH=7.5	

Gélose SS, *Salmonella-Shigella* (g/ litre d'eau distillée)

Peptone	5.0g
Extrait de viande	5.0g
Lactose	10g
Citrate de sodium	10g
Citrate de fer (III)	1.0g
Désoxycholate	8.5g
Vert brillant	3.3 mg
Rouge neuter	25 mg
Na ₂ S ₂ O ₃	8.5g

Agar-agar 15g

pH = 7.2 / autoclavage à 120°C pendant 15 minutes.

Gélose au cétrimide (g/ litre d'eau distillée)

Peptone 20g

Chlorure de sodium 3.0g

Sulfate de potassium 10g

Monohydrogénophosphate de potassium 0.3g

Cétrimide (bromure de tétradonium) 0.2g

Acidenalidixique 0.015g

Agar 12 g

pH = 7.1 / autoclavage 20 min à 121°C. 4.

Chapman (g/ litre d'eau distillée)

Peptone trypsique de caséine 10 g

Extrait de viande 1.0g

Chlorure de sodium 75g

Mannitol 10g

Rouge de phenol 0.025 g

Agar agar 15g

pH = 7.6 / autoclavage 20 min à 121°C.

Milieu Luria Bertani tamponné (g/ litre d'eau distillée)

Peptone 10g

Glucose 5g

NaCl 5g

Tampon citrate PH=5.6

Annexe 2

Réactifs et Tampons de dosage de la Méthallothionéine (Viarengo *et al.*, 1997).

1. Tampon d'homogénéisation

Composants

- Saccharose.....0,5M
- β -mercaptoéthanol.....0,01 %
- Tampon Tris-HCl (pH = 8,6)20 mM :

- Dissoudre 1,21 g du Tris dans 500 ml d'eau distillée

- Mélanger puis ajuster le pH à 8,6 avec quelques gouttes d'HCl.

- Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Préparation

- Pour la préparation de 150 ml de tampon d'homogénéisation, dissoudre dans 150 ml du tampon Tris : 25,67 g de saccharose, 15 μ l de β -mercaptoéthanol
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

2. Solution de lavage

Composants :

- Éthanol.....87 %
- Chloroforme.
- Tampon d'homogénéisation.

Préparation :

- Pour la préparation de 100 ml de tampon de lavage, ajouter à 87 ml d'éthanol, 1 ml de chloroforme et 12 ml tampon d'homogénéisation.

- Conserver le flacon à -20 °C.
- Solution stable pendant plusieurs mois.

3. Solution de chlorure de sodium à 0,25 M

Composants :

- Chlorure de sodium (NaCl).

Préparation :

- Dissoudre 1,46 g de NaCl dans 80 ml d'eau distillée.
- Mélanger, puis compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Solution stable durant plusieurs mois à 4 °C.

4. Solution d'acide chlorhydrique (1 N) contenant 4 mM d'EDTA :

Composant :

- Acide chlorhydrique (HCl).....37 %
- Acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA).....4 mM

Préparation :

- Pour la préparation d'une solution d'HCl (1N), diluer 7,66 ml d'HCl dans 250 ml d'eau distillée.
- Dissoudre 0,292 g d'EDTA dans la solution HCl (1N), puis agiter au vortex pendant quelques secondes jusqu'à la dissolution complète de l'EDTA.
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

5. Réactif d'Ellman à 0,43 mM

Composants :

- Dissoudre 27,21 g de KH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution A).
- Dissoudre 34,82 g de K_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution B).
- Ajuster le pH de la solution (B) à l'aide de la solution (A).
- Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.

Préparation

- Pour la préparation de 100 ml du réactif d'Ellman, dissoudre dans 80 ml du tampon phosphate à 0,2 M (pH = 8) ; 11,65 g de NaCl et 17,04 mg de DTNB
- Mélanger, puis compléter à 100 ml avec du tampon phosphate.
- Agiter au vortex pendant quelques secondes jusqu'à la dissolution complète du DTNB.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

6-Tampon citrate

Composants

- Hydrogynophosphate de sodium7.10g
- Acide citrique11.5g
- Eau distillé..... 1 l

Préparation


- Pour la préparation de tampon citrate, dissoudre 7,1g d'Hydrogyno phosphate de sodium et acide citrique dans 1 ml d'eau distillée.

Annexe 3

Caractéristiques des herbicides utilisés dans la présente étude

- **Brumby 80 EC**

Tableau 3 : Caractéristiques de Brumby 80 EC.

BRUMBY 80 EC	
Composition	Contient 80 g/l de Clodinafop-Propargyl et 20 g/l de Cloquintocet-Mexyl.
Formulation	Concentré émulsionnable.
Famille Chimique	Aryloxyphénoxy-Propionates.
Mode d'action	S'utilise en poste-levée des adventices, du stade 2-3 feuilles Jusqu'au stade mi-tallage de la céréale.
Compatibilité	Brumby 80 EC peut être mélangé avec de nombreux herbicides anti-dicotylédones ou anti herbes résiduelles.

- **Desormone Lourd D**

Tableau 4 : Caractéristiques de Desormone Lourd D.

Desormone Lourd D	
Composition	Contenant 600 g/l de 2,4 D-ester du butylglycol (ester lourd) sous forme de concentré émulsionnable.
Formulation	Concentré émulsionnable.
Famille Chimique	Aryloxyacides.
Mode d'action	Contact.
Usages homologués	Céréales : Adventices dicotylédones.