



**HAL**  
open science

# Rôle des *Pseudomonas* fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation

Claire Ferret

## ► To cite this version:

Claire Ferret. Rôle des *Pseudomonas* fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation. Biologie cellulaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ078 . tel-00806705

**HAL Id: tel-00806705**

**<https://theses.hal.science/tel-00806705>**

Submitted on 2 Apr 2013

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Biotechnologies et Signalisation Cellulaire - UMR 7242**

**THESE** présentée par :

**Claire FERRET**

soutenue le : **19 septembre 2012**

pour obtenir le grade de **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

# **Rôle des *Pseudomonas* fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation**

**THESE dirigée par :**

**Mme Valérie GEOFFROY** (Université de Strasbourg) - Maître de conférences

**MEMBRES DU JURY :**

**M. Philippe LEMANCEAU** (INRA - Dijon) - Rapporteur externe

**M. Christian MUSTIN** (Université de Nancy) - Rapporteur externe

**M. Stéphane VUILLEUMIER** (Université de Strasbourg) - Examineur interne

**Mme Emmanuelle GUILLOT-COMBE** (MRIS) - Examinatrice externe



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, le Dr Valérie GEOFFROY, ainsi que le Dr Isabelle SCHALK, directrice de l'équipe « Transport Membranaire Bactérien » pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse. Merci à Valérie pour les « bons conseils » d'enseignante concernant le monitorat et à Isabelle pour son soutien, sa générosité, sa patience et les longues discussions, scientifiques ou non, dans son bureau.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble des membres du jury (Dr Emmanuelle GUILLOT-COMBE, Dr Philippe LEMANCEAU, Christian MUSTIN et Pr Stéphane VUILLEUMIER) pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie aussi tous les collaborateurs du projet Ingénierie Ecologie, projet qui a permis à mon sujet de voir le jour. Merci au Pr Thierry LEBEAU, pour les discussions très enrichissantes lors des réunions. Merci à Thibault STERCKEMAN, pour tous les dosages, souvent effectués dans des laps de temps très courts, les nombreuses discussions par mail et pour la petite phrase « S'il n'y avait pas de variabilité, il n'y aurait pas de recherche scientifique » qui m'a permis de relativiser grand nombre d'expériences. Merci également au Dr Karine JEZEQUEL pour tous les moments passés à Colmar lors des expériences « plantes », aux discussions scientifiques. Un merci tout particulier au Dr Jean-Yves CORNU qui m'a appris à « dompter » le phytotron, les tomates et le minéralisateur, mais aussi pour tous les échanges, téléphoniques et électroniques, que nous avons eus au cours de ces trois années de thèse, et à la phrase de conclusion « ça va sourire » en réponse à mes mails les plus « noirs » ! Merci également pour les derniers résultats « tout chauds ».

Merci également à tous les membres de l'équipe, déjà partis ou encore présents : Karl (bien qu'il m'accuse de cacher des miettes sous ma chaise), Véro (pour les discussions mode, rouge ? carmin ? indigo ? mais également les discussions plus scientifiques : adsorption ? rétention ?), Françoise (pour tous les petits potins matinaux !), Gaëtan (bien que chimiste, il aime les bons desserts !), Bénédicte (arrivée en même temps que moi et avec qui j'ai partagé les premières expériences de la vie de thésarde), Mélissa (et les discussions chats), Emmanuel (et ses purif de pyoverdine !). Merci également à Sabrina pour les moments agréables ainsi qu'à Etienne, Isabelle et Olivier. Je remercie tous les membres de l'équipe pour leur bonne humeur et l'ambiance sympa au labo.

Dans l'équipe, je tiens particulièrement à remercier Laurent. Par où commencer, il y a tellement à dire ?! Tout d'abord, merci d'avoir fait de ce bureau l'un des endroits les plus sympas et les plus gais du bâtiment. Merci pour toutes les discussions scientifiques, les idées de manip à tester, les conseils et les relectures de posters, de présentations, mais surtout de thèse. Merci pour tous les coups de main donnés lors de mes expériences aux mille boîtes, le comptage des colonies qui aurait selon lui des vertus déstressantes et de me laisser appliquer sur ses gels (cela est déstressant !). Merci pour toutes les petites pauses sympas et de m'avoir tant écoutée. Merci pour la vie au labo si agréable mais également en dehors du travail : les cinés, les plans « loose » (choucroute dans un clergé, courts-métrages endormants ...), les Pilates, les trajets à vélo, les vacances et les flamants roses !...

Je remercie aussi l'équipe Wagner, qui m'a hébergée dans ses labos les premiers mois. Un merci particulier à Christel, qui de collègue est devenue amie et à Renaud, bien qu'il quémande toujours des gâteaux. Merci également à Alaa avec qui j'ai partagé mon premier bureau, toujours souriant et de bonne humeur, tout comme Dayana.

Merci aux nombreux « secoueurs de boîtes », qui ont eu pitié de moi, ensevelie sous ces montagnes de plastique et de milieu gélosé : Laurence, Bruno, Dorine, Pierre et beaucoup d'autres.

Je remercie également Olivier (meilleur binôme de tous les temps), pour tous les supers moments passés ensemble depuis déjà quelques années. Merci à Camille qui, du fin fond de sa Bretagne, a toujours eu le mot pour rire dans ses mails.

Passons maintenant à la famille proche, qui a toujours été présente autour de moi. Tout d'abord, le chat, Mohas, omniprésent lors de la rédaction, lové sur les genoux...mais préférant la véritable place de « greffier » vautre sur les papiers, la tête sur le bord du clavier (comme en ce moment même). Un grand merci à l'infographiste de la famille, Bri, pour avoir toujours réalisé de superbes premières pages pour chacun de mes stages et maintenant pour ma thèse. Je ne sais comment remercier mes parents, qui ont toujours cru en moi, qui m'ont toujours épaulée mais surtout qui m'ont permis d'arriver où je suis aujourd'hui. Mille mercis pour tous les moments à me remonter le moral au téléphone ou en webcam, ou à l'inverse, à écouter toutes les petites joies de la science. Merci à mon père qui a découpé tous les bouts de tuyaux nécessaires à la croissance des tomates, sans lui, je ne sais comment les expériences auraient été possibles. Merci à ma mère pour les relectures à la recherche des fautes d'orthographe. Pour finir, merci à Benoît, présent chaque jour à mes côtés, qui m'a suivie chaque fois que

j'allais au labo les week-ends et jours fériés pour le « au cas où », qui a supporté tous les détails de la vie de mes bactéries, puis de mes tomates. Merci d'avoir essuyé les larmes pour les jours où rien n'allait et à l'inverse d'avoir traversé avec moi l'euphorie d'une manip réussie. Merci à vous d'avoir été là.



# Sommaire

<b>Liste des tables et figures.....</b>	<b>1</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>5</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>7</b>
<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>13</b>
<i>Chapitre 1 - Présence d'éléments traces métalliques dans les sols .....</i>	<i>15</i>
I - Pollutions des sols et sous-sols .....	17
1. Les sites pollués .....	17
2. Les sources de pollution des sols et sous-sols.....	18
3. Législation .....	19
4. Les sols pollués en chiffres.....	20
II - Les métaux dans les sols alsaciens .....	21
III - Contamination des sols par le cadmium et le nickel .....	22
1. Cas du cadmium .....	22
2. Cas du nickel.....	25
<i>Chapitre 2 - Mobilité des polluants métalliques dans les sols .....</i>	<i>29</i>
I - Constituants des sols impliqués dans la mobilité des éléments métalliques.....	31
1. Les minéraux primaires.....	31
2. Les minéraux secondaires .....	32
3. La matière organique.....	39
II - Mécanismes de rétention des éléments traces métalliques en phase solide.....	40
1. L'adsorption physique ou physisorption.....	41
2. L'adsorption chimique ou chimisorption .....	41
III - Facteurs modifiant la rétention des éléments métalliques .....	42
1. Le pH.....	42
2. Le potentiel d'oxydo-réduction.....	42
3. L'activité biologique .....	43
4. La température.....	45
<i>Chapitre 3 - Bactéries et métaux.....</i>	<i>47</i>
I - Acquisition des métaux par les bactéries.....	49
1. Acquisition des métaux solubles .....	49
2. Acquisition du fer, un métal peu soluble .....	50
III - Tolérance et résistance bactériennes aux métaux .....	60
1. Généralités.....	60
2. Deux exemples, le cadmium et le nickel.....	62
<i>Chapitre 4 - Interactions entre les micro-organismes et les minéraux.....</i>	<i>63</i>
I - Champignons et lichens dans l'altération des minéraux .....	66
1. Les champignons .....	66
2. Les lichens .....	67
II - Les bactéries .....	68
1. Les réactions d'oxydo-réduction .....	69
2. Libération d'acides organiques et autres ligands .....	69
3. Les biofilms bactériens .....	71
<i>Chapitre 5 Techniques de dépollution des sols.....</i>	<i>75</i>
I - Méthodes physico-chimiques.....	79
II - Méthodes biologiques.....	79
1. La bioremédiation.....	80
2. La phytoremédiation .....	85
III - Phytoremédiation couplée à la rhizosphère.....	96
1. La rhizosphère.....	96



2. Mécanismes impliqués dans les interactions bactéries-plantes .....	100
3. La rhizoremédiation.....	105
<i>Chapitre 6 - Tolérance aux éléments traces métalliques chez les végétaux.....</i>	<i>113</i>
I - Les éléments traces métalliques dans la plante .....	115
1. Absorption.....	115
2. Translocation .....	118
II - Toxicité et tolérance .....	120
1. Mécanismes impliqués.....	121
2. Cas des métaux étudiés.....	124
<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>131</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>137</b>
<i>Chapitre 7 - Rôle des sidérophores et du biofilm dans les interactions.....</i> entre bactéries et minéraux.....	<i>139</i>
<i>Introduction.....</i>	<i>141</i>
<i>Dissolution des smectites par les sidérophores en présence de Pseudomonas fluorescents.....</i>	<i>145</i>
<i>Résultats complémentaires sur les interactions entre les Pseudomonades et les smectites.....</i>	<i>179</i>
I - Matériel et méthodes.....	181
1. Cinétique de fluorescence de la pyoverdine en présence de smectite .....	181
2. Croissance bactérienne en milieu carencé en magnésium supplémenté de concentrations croissantes de smectite .....	181
3. Utilisation des éléments des smectites sur 9 jours par <i>P. aeruginosa</i> .....	182
4. Observations microscopiques du biofilm.....	182
5. Implication du biofilm dans la chélation des métaux constitutifs des smectites.....	183
6. Détermination des concentrations en métaux .....	184
II - Résultats et discussion .....	185
1. Etude du complexe pyoverdine-smectite par fluorimétrie .....	185
2. Utilisation du magnésium constitutif des smectites par les Pseudomonades .....	187
3. Utilisation des éléments constitutifs des smectites par <i>P. aeruginosa</i> sur 9 jours.....	188
4 - Rôle du biofilm dans l'interaction entre bactéries et smectites.....	190
5. Enjeux environnementaux.....	194
<i>Interactions entre P. aeruginosa et des goethites substituées par différents métaux.....</i>	<i>195</i>
I - Matériel et méthodes.....	197
1. Synthèse et caractérisation des goethites .....	197
2. Cinétique de fluorescence de la pyoverdine en présence de goethite.....	198
3. Croissance bactérienne en présence de goethite.....	198
4. Détermination des concentrations en métaux .....	199
5. Microscopie conventionnelle .....	199
II - Résultats et discussion .....	200
1. Caractérisation des goethites.....	200
2. Etude par fluorimétrie de la formation de complexes pyoverdine-métal en présence de goethite .....	201
3. Croissance de <i>P. aeruginosa</i> en présence de goethites substituées ou non.....	202
4. Formation d'un biofilm autour des goethites .....	203
5. Production de pyoverdine par <i>P. aeruginosa</i> en présence de différentes goethites .....	204
6. Implication des bactéries productrices de sidérophores dans la dissolution des goethites .....	206
7. Rôle des sidérophores de <i>P. aeruginosa</i> dans la dissolution des goethites alumineuse.....	208
<i>Conclusions du chapitre 7.....</i>	<i>211</i>
<i>Chapitre 8 - Rôle de Pseudomonas aeruginosa et de la pyoverdine dans le prélèvement par la plante de métaux contaminants.....</i>	<i>217</i>
<i>Introduction.....</i>	<i>219</i>
<i>Prélèvement de contaminants métalliques par L. esculentum en présence de P. aeruginosa ou de pyoverdine, en hydroponie .....</i>	<i>223</i>
I - Matériel et méthodes.....	225
1. Purification de la pyoverdine.....	225
2. Stabilité de la pyoverdine au cours du temps.....	225

3. Prélèvement des métaux en présence de pyoverdine ou <i>P. aeruginosa</i> , en culture hydroponique, par <i>L. esculentum</i> .....	226
4. Mobilisation par la pyoverdine des contaminants adsorbés sur les smectites ou présents dans la structure cristalline des goethites .....	230
<b>II - Résultats et discussion</b> .....	<b>232</b>
1. Etude de la stabilité de la pyoverdine au cours du temps.....	232
2. Suivi de la quantité de pyoverdine au cours des expériences de prélèvement de cadmium et de nickel.....	234
3. Croissance bactérienne et production de pyoverdine lors des expériences de prélèvement du nickel en présence de <i>P. aeruginosa</i> .....	235
4. Formation d'un biofilm bactérien autour des racines de <i>L. esculentum</i> .....	236
5. Influence de la pyoverdine et de <i>P. aeruginosa</i> sur la croissance végétale .....	237
6. Influence de la pyoverdine sur les longueurs et les surfaces racinaires .....	239
7. Influence de la pyoverdine et de <i>P. aeruginosa</i> sur les prélèvements en nickel, en cadmium et en fer par les plants de tomate, en hydroponie .....	241
8. Complexation in-vitro des contaminants présents dans les minéraux par la pyoverdine .....	244
<i>Prélèvement de contaminants métalliques par L. esculentum en présence de pyoverdine en galettes de sol</i> .....	<i>249</i>
<b>I - Matériel et méthodes</b> .....	<b>251</b>
1. Echantillon de sol .....	251
2. Cinétique de mise en solution du cadmium et du cuivre associés à la phase solide en présence de pyoverdine .....	251
3. Influence de la pyoverdine sur les prélèvements en cadmium, en cuivre et en fer par les plants de tomate, en sol contaminé.....	252
<b>II - Résultats et discussion</b> .....	<b>254</b>
1. Cinétique de mise en solution du cadmium et du cuivre associés à la phase solide en présence de pyoverdine .....	254
2. Influence de la pyoverdine sur les prélèvements en cadmium, en cuivre et en fer par les plants de tomate, en sol contaminé.....	256
<i>Conclusions du chapitre 8</i> .....	<i>259</i>
<b>Conclusions et perspectives</b> .....	<b>265</b>
<b>Monitorat</b> .....	<b>273</b>
<b>Communications scientifiques</b> .....	<b>277</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>281</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>291</b>

# Liste des tables et figures

Tableau 1 : Principaux polluants constatés dans les sols français, seuls ou en mélange	20
Tableau 2 : Nombre de sites contaminés en Alsace par les principaux polluants	21
Tableau 3 : Concentrations ubiquitaires en cadmium dans différents milieux	22
Tableau 4 : Concentrations ubiquitaires en nickel dans différents milieux	25
Tableau 5 : Exemples de quelques bactéries et de leurs mécanismes associés dans la capacité à solubiliser des minéraux	70
Tableau 6 : Comparaison des différentes méthodes de bioremédiation de sites contaminés	84
Tableau 7 : Comparaison des différentes méthodes de phytoremédiation de sites contaminés	88
Tableau 8 : Comparatifs des coûts de traitement des déchets issus de la phytoremédiation	95
Tableau 9 : Répartition de la population microbienne (UFC / g de sol) dans la rhizosphère du blé	98
Tableau 10 : Exemples de rhizoremédiation de sites contaminés en métaux	112
Tableau 11 : Principales fonctions des éléments traces métalliques essentiels aux végétaux	116
Tableau 12 : Concentrations en éléments traces dans les parties aériennes de végétaux (ppm / MS) et les symptômes qui leur sont associés	120
Tableau 13 : Caractéristiques des différentes goethites utilisées dans notre étude	200
Tableau 14 : Influence de la pyoverdine ou de <i>P. aeruginosa</i> sur la masse sèche en mg des racines et des parties aériennes de <i>L. esculentum</i> cv. Saint-Pierre en présence de différentes conditions	238
Tableau 15 : Analyse du sol utilisé dans cette étude	251
Figure 1 : Répartitions géographique et sectorielle de la pollution en cadmium en Alsace, en 2006	24
Figure 2 : Répartitions géographique et sectorielle de la pollution en nickel en Alsace en 2006	27
Figure 3 : Structure schématique des smectites	35
Figure 4 : Structure schématique de la goethite	38
Figure 5 : Groupements fonctionnels utilisés par les sidérophores pour chélater le fer	51
Figure 6 : <i>P. aeruginosa</i> observée au microscope électronique à balayage	53
Figure 7 : Structure de la pyoverdine synthétisée par <i>P. aeruginosa</i> PAO1	54
Figure 8 : La voie pyoverdine chez <i>P. aeruginosa</i>	56
Figure 9 : Structure de la pyochéline synthétisée par <i>P. aeruginosa</i> PAO1	57
Figure 10 : La voie pyochéline chez <i>P. aeruginosa</i> PAO1	58
Figure 11 : Exemples de quelques mécanismes bactériens de résistances aux métaux	61
Figure 12 : Observations en microscopie électronique à balayage des processus d'altération physique de minéraux en présence de champignons	67
Figure 13 : Observations d'altération chimique et physique de minéraux par des lichens	68
Figure 14 : Métabolites microbiens et mécanismes impliqués dans la dissolution des minéraux	71
Figure 15 : Modèle de formation d'un biofilm bactérien sur une surface minérale	72

## 2 | LISTE DES TABLES ET FIGURES

Figure 16 : Formation d'un biofilm bactérien sur des grains d'argile en présence de <i>Pseudomonas oryzae</i>	73
Figure 17 : Différentes techniques de phytoremédiation	87
Figure 18 : Système de rhizofiltration	90
Figure 19 : Schématisation de la rhizosphère, montrant les différents exsudats racinaires et leurs influences sur les facteurs abiotiques et les mécanismes à l'interface sol-solution	100
Figure 20 : Interactions plante/micro-organismes	106
Figure 21 : Diagramme schématique des interactions plantes/micro-organismes et leurs applications	110
Figure 22 : Voies de prélèvements des métaux par la plante et mécanismes moléculaires impliqués dans l'absorption et le transport de ces métaux	119
Figure 23 : Schéma hypothétique des différentes interactions étudiées durant cette thèse	135
Figure 24 : Propriétés de fluorescence de la pyoverdine lors de la chélation des métaux	185
Figure 25 : Etude par fluorimétrie de la formation de complexe pyoverdine-métaux en présence de smectite	186
Figure 26 : Croissance de <i>P. aeruginosa</i> et production de pyoverdine en milieu carencé en magnésium	188
Figure 27 : Utilisation des éléments constitutifs des smectites par les bactéries sur 9 jours	189
Figure 28 : Observation du biofilm formé par <i>P. aeruginosa</i> en présence de smectites	191
Figure 29 : Croissance de <i>P. aeruginosa</i> et production de pyoverdine en présence de smectites confinées	192
Figure 30 : Détection par ICP-AES de l'aluminium et du fer solubilisés par les bactéries	193
Figure 31 : Croissance de <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. putida</i> et production de pyoverdine	194
Figure 32 : Spectres de fluorescence de la pyoverdine après incubation en présence de goethite	201
Figure 33 : Croissance de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 à 30°C en milieu carencé en fer, supplémenté ou non par des goethites	203
Figure 34 : Observation du biofilm formé par <i>P. aeruginosa</i> en présence de goethite	204
Figure 35 : Production de pyoverdine par <i>P. aeruginosa</i> PAO1	205
Figure 36 : Détection par ICP-AES des métaux dans les surnageants de culture supplémentés en goethites	207
Figure 37 : Croissance de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 et les mutants dans la biosynthèse de sidérophores	209
Figure 38 : Dosage du fer et de l'aluminium présents dans les surnageants des cultures bactériennes	210
Figure 39 : Dispositif utilisé lors de la phase de germination et de pré-culture de <i>L. esculentum</i> cv. Saint-Pierre	226
Figure 40 : Conditions de culture testées	228
Figure 41 : Séparation des racines et des parties aériennes qui seront ensuite pesées	228
Figure 42 : Analyses des racines	229
Figure 43 : Etude de la stabilité de la pyoverdine produite par <i>P. aeruginosa</i> PAO1 au cours du temps	233
Figure 44 : Croissance de <i>P. aeruginosa</i> et production de pyoverdine	235
Figure 45 : Formation d'un biofilm autour des racines des plants de tomate	236
Figure 46 : Influence de la pyoverdine sur la longueur totale et la surface des racines	240

Figure 47 : Effet de la pyoverdine et de <i>P. aeruginosa</i> sur l'incorporation du cadmium et du nickel par <i>L. esculentum</i>	242
Figure 48 : Désorption du fer structural des smectites et des métaux adsorbés sur ce minéral	245
Figure 49 : Solubilisation des métaux présents dans les goethites par la pyoverdine	247
Figure 50 : Dispositifs utilisés lors de la cinétique de mise en solution du cadmium et du cuivre associés à la phase solide	252
Figure 51 : Cinétique de mise en solution du cadmium et du cuivre associés à la phase solide	255
Figure 52 : Biomasse et prélèvement en métaux par les tomates en sol contaminé	257
Figure 53 : Représentation schématique de l'interaction entre les sidérophores pyoverdine et pyochéline et les minéraux de type smectite ou goethite	269
Figure 54 : Schéma récapitulatif des différentes interactions étudiées lors de ce travail de thèse	272





# Liste des abréviations

**ACC** : 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylate

**AIA** : Acide Indole-3-Acétique (Auxine)

**ADEME** : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie

**AMF** : Arbuscular Mycorrhizal Fungi (champignons mycorrhiziens arbusculaires)

**BASIAS** : Base des Anciens Sites Industriels et Activités de Service

**BASOL** : Base de données des sites et sols pollués

**BTEX** : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène

**CAA** : milieu Casamino-Acide

**CEC** : Capacité d'Echange Cationique

**CET** : Centre d'Enfouissement Technique

**Da** : Daltons

**DFOB** : Desferrioxamine B

**DGT** : Diffusive Gradient in Thin film

**DO** : Densité Optique

**DTPA** : Acide Diéthylène Triamine Pentaacétique

**DRE** : Direction Régionale de l'Environnement

**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique

**EDDS** : Acide Ethylène Diamine Disuccinique

**EGTA** : Acide Ethylène Glycol Tétracétique

**Eh** : Potentiel d'oxydo-réduction

**ETM** : Elément Trace Métallique

**GFP** : Green Fluorescent Protein

**HAP** : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

**ICP-AES** : Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectra

**meq** : Milli-équivalent

**MGDA** : acide methyl glycine diacétique

**MIT** : Metal Inorganic Transport

**MS** : Matière Sèche

**MT** : Méthallothionéine

**MTBE** : Méthyl-Tert-Butyl-Ether

**NRPS** : Non Ribosomal Peptide Synthetase



**NTA** : Acide Nitrilotriacétique

**PC** : Phytochélatine

**Pch** : Pyochéline

**PCB** : PolyChloroBiphényles

**PCT** : PolyChloroTerhényles

**PGPR** : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

**Pvd** : Pyoverdine

**ROS** : Reactive Oxygen Species

**TCE** : TriChloroEthylène

**TNT** : Trinitrotoluène

**UFC** : Unité Formant Colonie

**WinRhizo** : logiciel d'analyse des racines

# Introduction générale



L'Homme, par une forte industrialisation et une agriculture intensive utilisatrice d'engrais et de pesticides, contribue à la dissémination des éléments traces métalliques et à leur accumulation dans les sols. Si les principaux constituants des sols impliqués dans la rétention de ces polluants inorganiques sont majoritairement des oxydes et hydroxydes de fer (Apak, 2002) ainsi que des carbonates, des phosphates, des sulfates et de la matière organique (Kabata-Pendias & Pendias, 2001), les minéraux argileux jouent également un rôle primordial dans la mobilité de ces éléments. En effet, les argiles, principaux constituants de la croûte terrestre (Rotenberg, 2007), possèdent une capacité importante à lier les cations métalliques (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Pour tous ces constituants, l'adsorption est le principal mécanisme impliqué dans la rétention et l'accumulation des contaminants métalliques dans les sols (Alloway, 1995 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001 ; McBride, 1989). Les métaux contaminants peuvent également être piégés dans la structure cristalline des minéraux au cours de leur formation.

Les organismes vivants, tels que les végétaux, les champignons, les lichens et les bactéries, en altérant les minéraux par divers mécanismes, présentent une activité modificatrice de la rétention des éléments traces métalliques dans les sols (Kabata-Pendias & Pendias, 2001 ; Warscheid & Braams, 2000). En effet, ces organismes vivants peuvent intervenir dans la dissolution des minéraux à travers des mécanismes physiques, tels que la pénétration des hyphes ou des racines des végétaux dans les minéraux ou encore par la formation d'un biofilm bactérien, ainsi qu'à travers des mécanismes chimiques, comme par exemple, la synthèse et la sécrétion d'acides organiques ou de sidérophores. Produits par les champignons (Winkelmann, 2007), les plantes (Marschner et al, 1986) et les bactéries (Neilands, 1981b), les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire possédant une très forte affinité pour le fer. En condition de carence sévère en fer ( $[Fe]_{\text{soluble}} < 0,1 \mu\text{M}$ ), leur rôle est de solubiliser cet élément afin de le rendre accessible aux cellules. Si l'affinité des sidérophores pour les autres cations métalliques est inférieure à celle déterminée pour le fer, ces molécules chélatrices sont également capables de les complexer efficacement (Braud et al, 2009a ; Kim et al, 2001 ; Liermann et al, 2005).

Bien que les éléments traces métalliques soient mobilisés par divers organismes, ils ne peuvent être dégradés en produits moins toxiques, persistent indéfiniment dans l'environnement et posent un problème majeur en écologie mais également pour la santé publique par leurs propriétés cancérigènes et mutagènes. Leur toxicité et leur persistance dans l'environnement nécessitent le développement de différentes méthodes afin de diminuer le

nombre de sites contaminés. Si des méthodes physico-chimiques telles que l'excavation et le stockage ou encore la stabilisation et le confinement sont utilisées dans la décontamination des sols, la phytoremédiation apparaît comme un outil de choix. Parmi ces techniques, certaines consistent en l'immobilisation du polluant inorganique dite phytostabilisation, d'autres, telles que la phytoextraction a pour objectif d'extraire *in-situ* les éléments métalliques. Bien que peu onéreuses, ces techniques ont un inconvénient majeur : le temps de décontamination, pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années en fonction de l'espèce végétale utilisée, de la nature de la pollution et des propriétés des sols (McGrath et al, 2002). Afin de faciliter le transport des métaux dans les végétaux et de réduire la durée de traitement, l'utilisation de chélatants chimiques s'est développée (Jorgensen, 1993). Néanmoins, certains de ces composés, tels que l'EDTA par exemple, apparaissent comme difficilement dégradables, pouvant engendrer des risques de lixiviation et d'effets néfastes sur les micro-organismes du sol (Nowack et al, 2006).

Une autre solution consiste en l'ajout de micro-organismes d'intérêt associés à la phytoextraction, pouvant améliorer les prélèvements par la plante et diminuer la durée de traitement. En effet, les travaux de l'équipe « Dépollution Biologique des Sols » de Colmar ont montré que l'addition de bactéries productrices de sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Pseudomonas fluorescens*, augmentait l'extraction de chrome par des plants de maïs (Braud et al, 2009c), les sidérophores étant des métabolites sécrétés par les micro-organismes lors de carence en fer. Si jusque là, aucun mécanisme n'avait pu être appréhendé, mon sujet de thèse, inscrit au sein d'un projet « Ingénierie Ecologique », a eu pour objectif la compréhension des processus intervenant dans la phytoremédiation couplée à l'ajout de sidérophores ou de leurs bactéries productrices.

Durant ces trois années de thèse, j'ai travaillé sur un système de complexité croissante, allant de la capacité des sidérophores à interagir avec des métaux à l'état libre ou piégé dans des minéraux, de l'interaction entre les bactéries productrices de sidérophores et les minéraux du sol, jusqu'au modèle complet couplant les principaux facteurs (argile/micro-organismes/éléments traces métalliques/plantes). Le micro-organisme modèle de ce travail est *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif, qui en cas de carence en fer, synthétise et sécrète deux sidérophores majeurs, la pyoverdine et la pyochéline. Ce travail s'est tout d'abord focalisé sur les interactions possibles entre *P. aeruginosa* et deux minéraux de structures différentes, les smectites qui sont des phyllosilicates et les goethites appartenant aux oxy-hydroxydes de fer. Ces minéraux, fréquemment rencontrés dans les sols, contiennent

tous deux du fer. Après avoir observé une interaction entre *P. aeruginosa* et les minéraux, une approche de biologie moléculaire utilisant des souches mutantes au niveau de la synthèse de sidérophores nous a permis des avancées dans le mécanisme d'altération par *P. aeruginosa* des minéraux et en particulier le rôle des sidérophores et du biofilm bactérien. Dans un second temps, nous avons étudié la capacité de la pyoverdine à désorber les polluants inorganiques, tels le nickel et le cadmium, adsorbés sur les argiles ou emprisonnés dans la structure cristalline des goethites, formant un complexe sidérophore-métal soluble, qui sera, peut-être, plus facilement assimilable par les plantes. Enfin, des expériences de prélèvement de métaux contaminant par des plantes ont été menées en conditions hydroponiques. A partir d'un système contenant les plantes et des argiles contaminées par le nickel ou le cadmium, des ajouts de pyoverdine ou de bactéries productrices de sidérophores ont été réalisés afin de déterminer l'impact respectif de ces paramètres biologiques sur la phytoextraction. En parallèle, avec l'équipe Dépollution Biologique des Sols de Colmar, j'ai suivi des expériences de phytoremédiation similaires mais réalisées en galettes de sol.

Ce manuscrit est divisé en deux grandes parties. La première consiste en une synthèse bibliographique décrivant l'origine et la présence des principaux polluants dans les sols français et plus particulièrement dans les sols alsaciens (chapitre 1), la mobilité de ces polluants dans les sols (chapitre 2), les interactions entre métaux et bactéries (chapitre 3) puis celles entre bactéries et minéraux (chapitre 4). Le chapitre 5 présente, quant à lui, les techniques de dépollution des sols tandis que le chapitre 6 est dédié à la tolérance des éléments traces métalliques chez les végétaux. La seconde partie de ce manuscrit est consacrée aux résultats obtenus durant cette thèse. Les données concernant les interactions entre bactéries et minéraux sont rassemblées dans le chapitre 7 tandis que les résultats faisant intervenir le végétal sont présentés dans le chapitre 8.



# **Synthèse bibliographique**





# *Chapitre 1*

Présence d'éléments traces  
métalliques dans les sols



Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, le secteur industriel s'est développé de part le monde sans égard pour l'environnement. Le rôle de l'Homme est alors devenu tellement important dans la biosphère que certains auteurs distinguent maintenant une nouvelle sphère, l'anthroposphère, lieu de l'activité humaine sur la planète (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Comme la majorité des pays industrialisés, la France a, elle aussi, hérité d'un long passé industriel durant lequel les contraintes et les préoccupations environnementales n'ont pas été une priorité. Si, de nos jours, le sol est caractérisé par un équilibre fragile et une vulnérabilité, il a longtemps été considéré comme une ressource renouvelable, voire inépuisable à l'échelle des générations humaines. De plus, les conséquences du déversement de produits et leur mauvais stockage, sans précaution particulière, n'étaient alors que pas ou peu connus. Ainsi, les substances ne se dégradant pas naturellement ou ne se volatilisant pas au contact de l'air ont pu s'accumuler dans les sols, les eaux souterraines et les sédiments de rivières.

## **I - Pollutions des sols et sous-sols**

Les termes « pollution » et « contamination » sont souvent employés confusément l'un pour l'autre. De même, selon les auteurs, ces termes sont définis différemment. Ainsi, Knox *et al.* font référence à « sol contaminé » pour décrire un sol dont l'état chimique varie de sa composition normale mais sans effet préjudiciable pour les organismes. Le terme de pollution sera quant à lui utilisé quand un élément ou une substance est présente en concentration plus importante qu'à l'état naturel, comme résultat de l'activité anthropique et ayant un effet négatif sur l'environnement et ses composés (Knox et al, 1999).

### **1. Les sites pollués**

En 1996, le Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement définit un site pollué comme « un site qui, du fait d'anciens dépôts de déchets ou d'infiltrations de substances polluantes, présente une pollution susceptible de provoquer une nuisance ou un risque pérenne pour les personnes et l'environnement ».

Selon l'ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie), trois grandes catégories de sites pollués peuvent être rencontrées :

- les anciennes décharges, qui ne répondent pas aux critères et règles actuels, notamment les décharges situées sur des sous-sols fragiles et pour lesquels une pollution des eaux souterraines a été constatée ;
- les dépôts de déchets ou de produits chimiques abandonnés à la suite de faillites d'entreprises ou résultant de pratiques frauduleuses d'importation ou d'élimination des déchets ;
- les sols pollués par des retombées, des infiltrations ou des déversements de substances polluantes liés à l'exploitation passée ou présente d'une installation industrielle ou à un accident de transport.

Certains sites industriels, abandonnés ou encore en activité peuvent compter plusieurs sources de pollution.

## **2. Les sources de pollution des sols et sous-sols**

L'ADEME distingue les sources de pollution des sols et sous-sols en 4 catégories :

- les pollutions accidentelles qui proviennent souvent d'un déversement ponctuel et momentané de substances polluantes. En général, elles vont engendrer une dégradation du milieu sur une surface limitée mais si aucune intervention n'est réalisée dans un délai relativement court, la pollution peut alors migrer vers les sous-sols ;
- les pollutions chroniques qui surviennent sur de longues durées. Leurs origines sont souvent des fuites sur des conduites ou autres réseaux enterrés, des cuvettes de stockage non parfaitement étanches, ou encore des lixiviats issus de dépôts de déchets ou de produits ;
- les pollutions diffuses qui se développent sur de grandes surfaces de sols. Généralement, elles proviennent d'épandages de produits solides ou liquides (emploi d'engrais ou de pesticides en agriculture) ou de retombées atmosphériques. La dispersion puis l'accumulation de substances dangereuses sur ces sols donnent alors des sites uniformément contaminés ;
- les pollutions localisées qui, à l'inverse des pollutions diffuses, se distinguent par la présence ponctuelle de substances dangereuses, dans les sols et les sous-sols,

provenant généralement de déversements, de fuites ou de dépôts de déchets. Ces substances, non confinées et en fortes concentrations, donnent naissance à des sites localement contaminés.

### 3. Législation

Dès le début des années 90, la France, consciente de cette problématique, s'est intéressée à cerner l'ampleur des enjeux par une succession d'inventaires de sites, ce qui a donné naissance à deux bases de données :

- BASOL, récoltant et conservant la mémoire de plusieurs milliers de « sites pollués ou potentiellement pollués, appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif ».
- BASIAS, inventoriant les anciens sites industriels et de services.

Ces deux outils, mis à jour régulièrement, constituent ainsi des outils précieux de gestion des sols pollués et d'aménagement du territoire.

De plus, les dangers potentiels des pollutions pour l'équilibre écologique mais également la santé publique sont depuis considérés avec une inquiétude croissante par les pouvoirs publics. La circulaire du 31 décembre 1993, relative à la politique de gestion des sites pollués, marque véritablement la conscience nationale vis-à-vis des problèmes posés par la contamination des sols et sous-sols français. Ainsi, depuis, les enjeux consistent à prévenir les pollutions futures, à connaître et maîtriser leurs impacts, à sécuriser les sites, mais également à traiter et réhabiliter.

L'année 2007 a été marquée par l'écologie. En effet, la circulaire du 08 mars 2007, relative à la prévention de la pollution des sols et à la gestion des sols pollués, repose sur la prévention et la maîtrise des sources de pollution. Le gouvernement a également initié le Grenelle de l'Environnement dès le 21 mai 2007. Il réunit, pour la première fois, l'Etat et les représentants de la société civile afin de définir une feuille de route en faveur de l'écologie, du développement et de l'aménagement durables.

Ces mesures ont également pris une dimension européenne. Depuis 1998, l'Agence Européenne de l'Environnement (AEE) travaille à l'élaboration d'indicateurs communs aux pays de l'Union Européenne, en matière de qualité des sols.

#### 4. Les sols pollués en chiffres

En 2012, 4 337 sites contaminés ont été recensés en France sur la base de données BASOL (BASOL, 2012). Parmi les principaux polluants, sont retrouvés, seuls ou en mélange, les hydrocarbures (43,79 % des polluants), le plomb (20,08 %) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (18,63 %) (Tableau 1).

**Tableau 1 : Principaux polluants constatés dans les sols français, seuls ou en mélange.** Ces derniers sont exprimés en terme d'occurrence (d'après BASOL, 2012).

Polluants	%
hydrocarbures	43,79
plomb	20,08
HAP	18,63
solvants halogénés	17,73
chrome	16,92
cuiivre	16,35
arsenic	14,46
nickel	11,83
zinc	11,21
cadmium	7,10
cyanures	6,73
PCB-PCT	6,73
solvants non halogénés	5,19
mercure	5,14
baryum	3,25
BTEX	1,98
pesticides	1,5
cobalt	0,85
molybdène	0,67
sélénium	0,48
ammonium	0,46
TCE	0,37
sulfates	0,25
chlorures	0,09

Bien que deuxième région industrielle de France, Rhône-Alpes recense, avec 614 sites pollués (14,16 %), le plus grand nombre de sites pollués de France (BASOL, 2012). En effet, marquée par une tradition industrielle forte, la chimie et la pétrochimie, deux secteurs très polluants, sont des composantes majeures de cette région, la pollution principale de cette région étant les hydrocarbures (présence sur 287 sites) et les solvants halogénés (présence sur 120 sites).

De même, par un lourd passé industriel et minier, la région Nord-Pas-de-Calais dénombre 570 sites pollués (13,13 %) (BASOL, 2012), la classant au deuxième rang, avec des

pollutions importantes en plomb (présence sur 145 sites), en HAP (présence sur 121 sites) et en zinc (présence sur 97 sites). En effet, cette région a vu le développement de sites industriels importants ; la pollution en plomb et zinc provenant essentiellement des activités hydro- et pyro-métallurgiques sur le site de Noyelles-Godault, usine de valorisation de la société Penarroya, puis Imetal et enfin Métaleurop, cette dernière comptant parmi les plus grandes usines d'Europe spécialisées dans le recyclage du plomb des batteries. La région a également abrité d'autres sites, tels que l'Union minière à Auby, une des plus importantes usines de zinc au monde, traitant les minerais importés pour en extraire, outre le zinc, du plomb et autres métaux, ou encore un grand nombre de cokeries qui présentent des taux importants notamment d'HAP.

## II - Les métaux dans les sols alsaciens

Si certains sols tels que ceux de la vallée de la Liepvrette (DRE, 2004) contiennent naturellement des teneurs en éléments traces métalliques plus importantes que la moyenne, les sites et les sols pollués sont, ici aussi, les vestiges d'une activité industrielle intense.

Avec 262 sites recensés (soit 6,04 %), l'Alsace est la 6<sup>ème</sup> région polluée de France (BASOL, 2012). La répartition géographique de ces sites est le reflet de l'activité industrielle, ancienne ou actuelle, telle que les mines de potasses d'Alsace, le bassin de la Thur, la concession pétrolière de Pechelbronn, l'ancienne raffinerie d'Herrlisheim et le port pétrolier de Strasbourg. Les rejets de sel résiduaire des mines de potasses, exploitées de 1904 à 2004, s'élevaient à 6 millions de tonnes par an, dont une partie était déversée dans le Rhin. Cependant, du fait de l'arrêt des sites de fabrication, seuls les effluents provenant de la dissolution accélérée des terrils ont été rejetés depuis. Ainsi, depuis 2008, une diminution de 22 % du nickel a été observée.

**Tableau 2 : Nombre de sites contaminés en Alsace par les principaux polluants (d'après BASOL, 2012).**

<b>Polluants</b>	<b>Nombre de sites contaminés</b>
hydrocarbures	100
solvants halogénés	64
chrome	32
HAP	28
arsenic	24
cuivre	23
plomb	20
nickel	16



Outre les chlorures issus des mines de potasses d'Alsace, les principaux polluants en cause sont généralement les hydrocarbures et dans une moindre mesure, les solvants chlorés issus notamment de l'industrie des métaux (Tableau 2) (BASOL, 2012).

### III - Contamination des sols par le cadmium et le nickel

Durant ma thèse, je me suis particulièrement intéressée au cadmium et au nickel. En France, sur 4 337 sites contaminés recensés en 2012, 12 % contiennent du nickel, 7,4 % du cadmium et 3,8 % une double contamination (BASOL, 2012).

#### 1. Cas du cadmium

##### 1.1. Généralités

Élément relativement rare et inexistant naturellement à l'état natif, le cadmium est présent dans la croûte terrestre à des concentrations de l'ordre de un à deux ppm où il est souvent associé au plomb et au zinc.

Le cadmium rejeté dans l'atmosphère provient de sources naturelles et anthropiques. Depuis la croûte terrestre, il peut être dispersé dans l'air par entraînement des particules provenant du sol et par les éruptions volcaniques. Cependant, utilisé notamment dans la fabrication des accumulateurs électriques, dans l'industrie électronique et chimique et dans la métallisation des surfaces, le cadmium provient principalement des activités industrielles. Avec 65 % de la production mondiale réalisée lors de ces quelques dernières années, le cadmium est considéré comme le métal du XX<sup>ème</sup> siècle (Sammut, 2007).

**Tableau 3 : Concentrations ubiquitaires en cadmium dans différents milieux** (d'après Bisson et al., 2011).

Milieu	Concentration
air	< 1 ng/m <sup>3</sup> à 5 ng/ m <sup>3</sup>
océans	< 1 ng/L
sols :	
- limoneux	< 0,1 mg/kg
- argileux	< 0,2 mg/kg

## 1.2. Toxicologie

Chez l'Homme, les deux principales voies d'exposition sont l'inhalation et l'ingestion. Ce métal est transporté dans le sang *via* l'hémoglobine ou les métallothionéines et se concentre surtout dans le foie, les os et les reins. Les principaux risques après exposition sont des cancers des poumons et de la prostate (Bisson et al, 2011).

## 1.3. Spéciation dans l'environnement

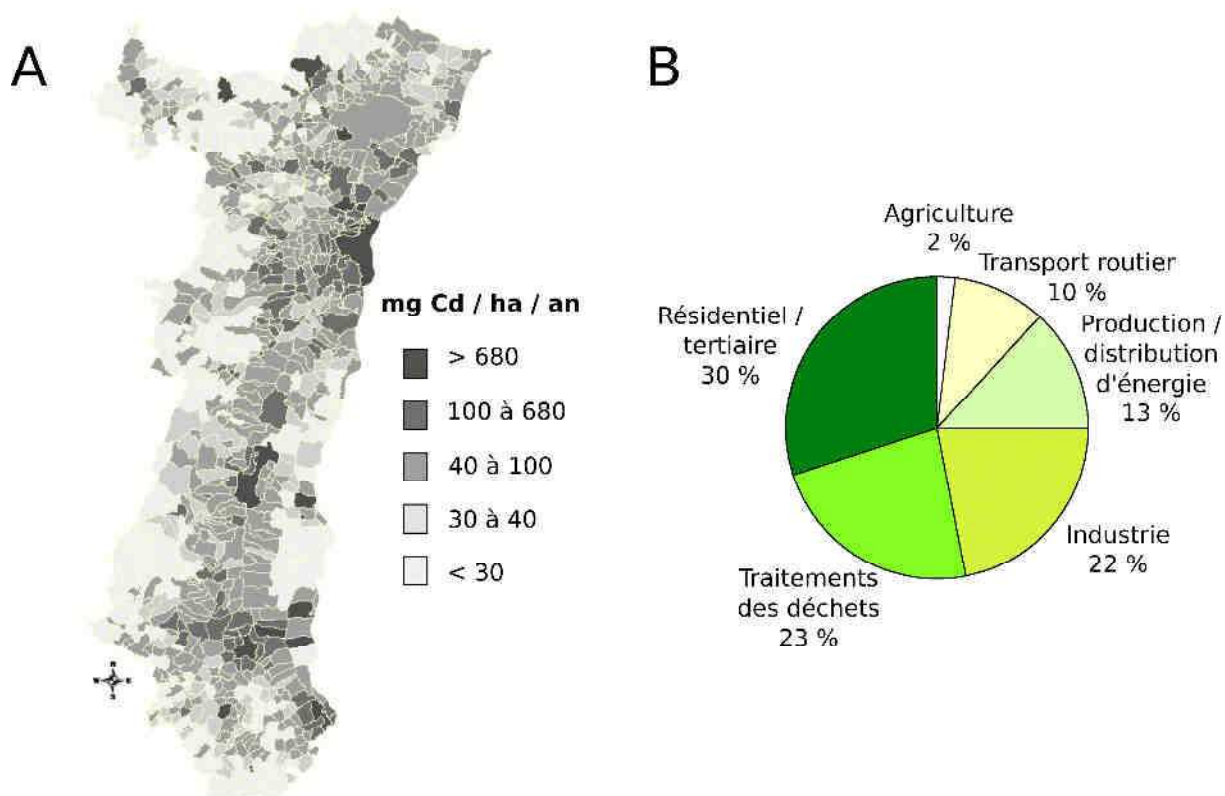
Dans l'environnement, le cadmium n'est presque jamais retrouvé à l'état métallique mais dans son état d'oxydation unique, c'est-à-dire 2+. Les principaux composés du cadmium sont les oxydes de cadmium (CdO), les chlorures de cadmium (CdCl<sub>2</sub>) et les sulfures de cadmium (CdS). Ce métal se combine très facilement avec le soufre minéral et organique. Peu volatiles, le cadmium et ses composés peuvent être détectés dans l'air sous forme particulaire (Bisson et al, 2011).

A l'état métallique, le cadmium n'est pas soluble dans l'eau tandis que la solubilité de ses sels est variable, dépendant du contre-ion et du pH. En milieu aquatique, ce métal est relativement mobile et peut être transporté sous forme de cations hydratés ou de complexes organiques ou inorganiques (Bisson et al, 2011).

Dans les sols, le cadmium est relativement mobile et a tendance à s'accumuler dans les horizons supérieurs du sol, riches en matière organique. Sa mobilité est essentiellement fonction du pH, son adsorption par la phase solide pouvant être multipliée par trois quand le pH augmente d'une unité dans la plage de pH 4-8 (Adriano, 1986). Retrouvé sous forme soluble dans l'eau du sol (CdCl<sub>2</sub>, CdSO<sub>4</sub>), le cadmium peut également être retrouvé sous forme de complexes insolubles inorganiques ou organiques avec les constituants du sol. Les principaux minerais contenant du cadmium sont le greenockite et l'hawleyite (avec comme contre-ion l'ion sulfure), l'octavite (associé aux carbonates) et le monteponite (associé à l'oxygène).

### 1.4. Le cadmium en Alsace

En Alsace, si les émissions de cadmium proviennent principalement de la combustion de l'énergie fossile (Figure 1B), ce métal est également retrouvé sur les sites d'incinération des ordures ménagères, des sociétés de traitement chimique des métaux, les sites industriels aux activités d'émaillerie...(ASPA, 2012 ; BASOL, 2012). Majoritairement, il apparaît que les zones présentant les plus fortes teneurs en cadmium sont situées au niveau des grandes villes, comme Strasbourg, Colmar et Mulhouse (Figure 1A). Actuellement, trois sites contaminés en cadmium sont actuellement recensés en Alsace (BASOL, 2012).



**Figure 1 : Répartitions géographique et sectorielle de la pollution en cadmium en Alsace, en 2006. A.** Densité d'émission du polluant ; **B.** Répartition sectorielle des émissions du cadmium (d'après ASPA, 2012)

## 2. Cas du nickel

### 2.1. Généralités

Le nickel est un composé qui n'est présent dans l'environnement qu'à très faibles concentrations, représentant entre 0,8 et 0,9 % de la croûte terrestre.

Cet élément est principalement obtenu à partir de minerais de nickel sulfurés (pyrrhotite, pentlandite, chalcopirite) dans lesquels sont également présents le fer et le cuivre.

Bien que sa présence dans les sols puisse être naturelle, les activités industrielles sont les principales sources d'émission du nickel. En effet, par sa grande utilisation (production d'aciers inoxydables et aciers spéciaux, production d'alliages non ferreux, batteries alcalines Ni-Cd, ...), son origine est majoritairement anthropique. Sa présence est également due à la combustion de charbon ou de fuel, l'incinération de déchets, l'épandage de boues d'épuration (Bisson et al, 2006).

**Tableau 4 : Concentrations ubiquitaires en nickel dans différents milieux** (d'après Bisson et al., 2006).

Milieu	Concentration
air	< 3 ng/m <sup>3</sup>
eau :	
- douce de surface	< 10 µg/L
- de mer	< 0,5 µg/L
- de pluie	< 1 µg/L
sol	20 mg/kg
sédiment	< 20 mg/kg

### 2.2. Toxicologie

Chez l'Homme, le nickel peut être absorbé par voies respiratoires et dans une moindre mesure par le tube digestif. Si des cas d'intoxication par inhalation, des décès par syndrome de détresse respiratoire ou ingestion sont survenus, la dermite de contact reste le risque le plus fréquent (Bisson et al, 2006). Néanmoins, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) le classe dans les substances potentiellement cancérigènes pour l'Homme. Une exposition chronique à ce métal est, en effet, un facteur de risque du cancer du poumon.

### 2.3. Spéciation dans l'environnement

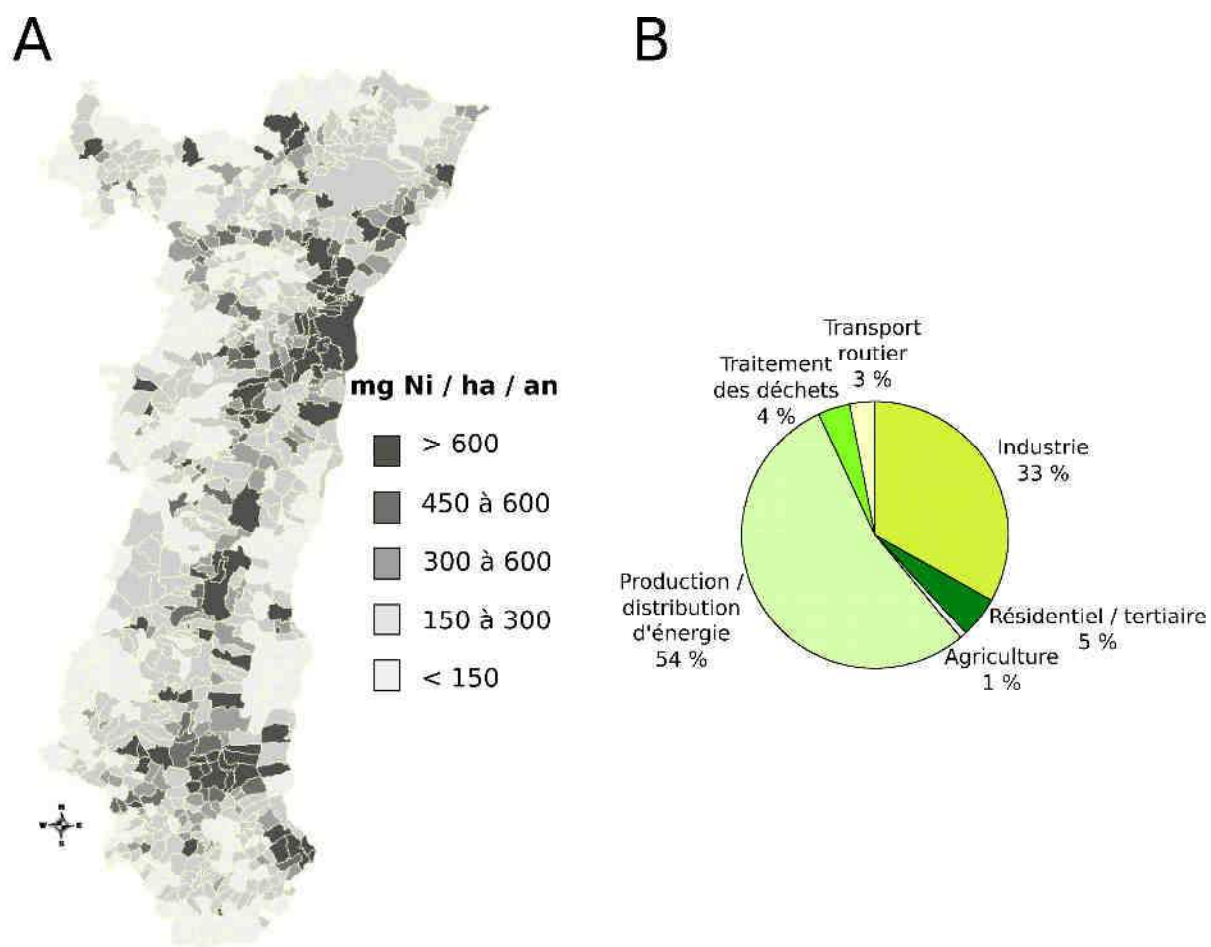
La plupart des complexes formés par le nickel le sont avec un nombre de coordination de 6. Il présente deux principaux états d'oxydation correspondant aux espèces ioniques  $\text{Ni}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{3+}$ . Le nickel reste très facilement absorbé par la plupart des organismes vivants mais est associé en grande partie à la matière particulaire (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). En milieu aqueux, le nickel est présent comme ion hexahydraté,  $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ . Par l'anthropisation, il émis dans l'atmosphère est principalement sous forme d'aérosols.

Dans le sol, bien plus que la teneur totale, la spéciation et l'état physico-chimique du nickel sont des paramètres essentiels à considérer afin d'évaluer son comportement dans l'environnement et en particulier sa biodisponibilité. Les principales formes du nickel, en particulier  $\text{NiOH}^+$ , sont adsorbées à la surface d'oxydes amorphes de fer, d'aluminium ou de manganèse (Kabata-Pendias & Pendias, 2001) et, dans une moindre mesure, à la surface de minéraux argileux. Si la mobilité du nickel augmente aux pH faibles, son adsorption sur certains composés adsorbants du sol peut devenir irréversible en milieu alcalin. De plus, la mobilisation du nickel dans les sols est fortement influencée par le pH. La concentration en sulfates, qui diminuent l'adsorption du nickel par complexation, et la surface spécifique des minéraux présents dans le sol, sont également des éléments à prendre en compte (McGrath, 1995). En outre, la présence de cations tels que  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Mg}^{2+}$  entraîne également une diminution de l'adsorption du nickel sur les composants du sol, résultat de phénomènes de compétition.

### 2.4. Le nickel en Alsace

En Alsace, les pollutions au nickel concernent 16 sites dans la région alsacienne (BASOL, 2012). Les secteurs de la production d'énergie et de l'industrie sont les principales sources de pollution de nickel en Alsace (Figure 2B). Tout comme le cadmium, les principales zones de contamination au nickel sont des zones citadines, fortement industrialisées (Figure 2A).

Néanmoins, un seul site recensé présente une double pollution au cadmium et au nickel et ceci à Wittisheim (Bas-Rhin). Une fabrication d'ustensiles ménagers métalliques est à l'origine de cette pollution par des rejets directement dans le milieu naturel (BASOL, 2012).



**Figure 2 : Répartitions géographique et sectorielle de la pollution en nickel en Alsace en 2006. A. Densité d'émission du polluant ; B. Répartition sectorielle des émissions de nickel (d'après ASPA, 2012).**



## *Chapitre 2*

Mobilité des polluants  
métalliques dans les sols





Comme il vient d'être vu dans le chapitre précédent, la présence des éléments traces métalliques dans les sols est un problème majeur. Néanmoins, les risques ne résultent pas seulement des concentrations totales mesurées dans les sols pollués mais principalement de leur fraction biodisponible (Adriano, 1986 ; McLaughlin et al, 2000). La mobilité de ces éléments métalliques peut être définie par leur aptitude à être transférés vers des compartiments du sol où ils sont retenus avec une énergie moindre. Une espèce chimique métallique peut ainsi passer successivement dans des compartiments d'énergies de rétention décroissantes, le compartiment ultime étant la phase liquide représentée par la solution du sol. Les racines des plantes puisent principalement leur nutriment dans cette solution (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

La mobilité des métaux dans les sols est régie par différents processus, d'origine biologique ou non, tels que, par exemple, l'adsorption, la solubilisation et l'insolubilisation (McBride, 1989). Enfin, des paramètres comme le pH, les conditions d'oxydo-réduction, la présence et la nature des colloïdes minéraux et organiques ainsi que la présence et l'activité des micro-organismes, influencent cette mobilité (Kabata-Pendias & Pendias, 2001; McLaughlin et al, 2000).

## **I - Constituants des sols impliqués dans la mobilité des éléments métalliques**

Les minéraux des sols proviennent de la roche mère sous-jacente. Les minéraux primaires sont hérités, sans modification, de la roche mère tandis que les minéraux secondaires sont issus de la pédogenèse par des phénomènes d'altération physico-chimique, ainsi que biologique. A ces différents constituants, vient s'ajouter une fraction organique résultant des organismes vivants et de leurs produits de décomposition (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). L'ensemble de ces éléments forme la phase de rétention des métaux, en équilibre dynamique avec l'eau du sol.

### **1. Les minéraux primaires**

Par des processus de désagrégation mécanique, souvent d'origine climatique, tels que la succession de phases de gel et dégel, la roche mère est à l'origine des minéraux primaires des sols (Remon, 2006). La structure de la plupart de ces minéraux et leur taille importante

ne leur confèrent que de très faibles propriétés réactives vis-à-vis des éléments traces métalliques (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). A la suite des processus d'altération, les minéraux primaires peuvent être à la source des minéraux secondaires (Seddoh & Pedro, 1975).

## **2. Les minéraux secondaires**

Les minéraux créés durant la pédogenèse sont essentiellement des argiles, des oxyhydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse mais également des carbonates, des sulfates et des phosphates (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Issus directement ou indirectement des minéraux primaires de la roche mère, les minéraux secondaires sont de très petite taille, de l'ordre du micromètre. Ils sont considérés comme les principaux constituants minéralogiques des sols ayant un rôle dans la rétention des éléments métalliques par des mécanismes tels que l'adsorption, la co-précipitation, la substitution ionique et les transformations redox (Bradl, 2004 ; Huang & Gong, 2005 ; Macheimer & Wildeman, 1992).

### **2.1. Les argiles**

#### **2.1.1. Définition des argiles**

Il n'existe pas de définition unique du terme « argile ». Le mot « argile » englobe deux connotations, dépendantes de la discipline concernée, l'une liée à la taille des grains et l'autre à la minéralogie. Les géologues ou pédologues considèrent comme « argile » tout minéral de faible granulométrie, la limite de taille étant fixée à 2 ou 4 microns selon les cas. L'industrie s'attachera, quant à elle, plus aux propriétés de plasticité des matériaux argileux, quelle que soit leur taille.

La première définition scientifique de l'argile a été établie par Agricola en 1546 (Agricola, 1546). Par la suite, se sont succédées des définitions qui avaient toutes en commun des critères de plasticité, de taille de particules et qui présentaient les argiles comme des matériaux réfractaires (Guggenheim & Martin, 1995). L'Association Internationale Pour l'Etude des Argiles (A.I.P.E.A.) a tenté d'harmoniser les différents termes employés à travers le monde (Bailey, 1980).

Les minéraux argileux sont l'un des principaux constituants de la croûte terrestre

(Rotenberg, 2007). De manière globale, le terme « argile » se réfère à des composés naturels sous forme de minéraux en grains de l'ordre du micromètre, des poudres essentiellement, possédant des propriétés plastiques quand ils contiennent suffisamment d'eau, ou au contraire devenant durs lorsqu'ils sont séchés. Les feuillets constituent l'unité structurale de base des minéraux argileux, qui, empilés, formeront une particule, premier niveau d'organisation des argiles. L'assemblage de particules constitue alors un agrégat dont l'arrangement est gouverné par le type de forces résultant des interactions entre particules. Les argiles sont principalement des phyllosilicates, c'est-à-dire constituées de feuillets de silicates (Bailey, 1980). Les argiles sont généralement cristallisées, même si des argiles amorphes existent également (Bailey, 1980).

### 2.1.2. Propriétés

Les minéraux argileux se caractérisent principalement par trois propriétés :

- leur surface spécifique ;
- leur capacité d'adsorption d'eau et de gonflement ;
- leurs multiples possibilités d'échanges ioniques.

Les argiles ont une surface formée par une superposition de feuillets qui leur confère une surface spécifique interne très variable, correspondant à l'espace entre les feuillets, dit espace interfoliaire, comprise entre  $0 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  pour la kaolinite et  $750 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  pour les smectites (Eslinger & Peaver, 1988). Cette surface interne va de pair avec une surface externe importante variant de  $1 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  pour les vermiculites à  $50 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  pour les smectites (Eslinger & Peaver, 1988).

De plus, les argiles présentent une faible perméabilité, ainsi de grandes quantités d'eau peuvent être retenues dans l'espace interfoliaire, ainsi que dans toutes les porosités accessibles. La modification des forces électriques provoque alors l'éloignement des feuillets et donc le gonflement de ces argiles dites gonflantes. Les smectites, les vermiculites et les minéraux interstratifiés offrent des capacités d'expansion beaucoup plus importantes que celles des autres espèces argileuses. Dans certains cas, cette hydratation peut conduire à une augmentation de volume atteignant jusqu'à 95%.

Les argiles sont également caractérisées par une surface électrique non neutre, ce qui détermine leurs capacités d'échanges ioniques. Ces minéraux portent deux types de charges :

- une charge permanente ou structurale, de signe négatif, liée aux substitutions ioniques  $\text{Al}^{3+}$  pour  $\text{Si}^{4+}$  ou encore  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  pour  $\text{Al}^{3+}$ .
- une charge de surface variable, en fonction du pH du milieu, liée aux réactions chimiques qui se produisent à la surface des minéraux. A faible pH, l'argile se caractérise par une capacité d'échange anionique, les ions  $\text{H}^+$  se lient d'avantage par rapport à  $\text{OH}^-$ , ainsi une charge positive s'instaure. A pH élevé, les ions  $\text{OH}^-$ , dominants, conduisent au phénomène inverse, l'argile développe alors une capacité d'échange cationique. A l'équilibre, ou au point de charge zéro, la capacité d'échange de l'argile devient nulle.

La capacité d'échange cationique (CEC) mesure la capacité d'une argile à échanger des cations. Elle mesure la concentration en cations non fixés dans la couche diffuse et dépend de la charge totale. Ainsi, la capacité des argiles à lier les ions métalliques est corrélée avec leur CEC et, habituellement, plus cette capacité est grande, plus la quantité de cations sorbés est importante (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). La CEC varie en fonction du pH mais est généralement donnée pour un pH neutre. Elle varie de 10 meq/100g pour les chlorites à 200 meq/100g pour les vermiculites (Eslinger & Peaver, 1988 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Dans la grande majorité des cas, la charge, globalement négative, associée à une surface de contact importante, confère aux argiles une forte réactivité vis-à-vis des métaux. Si le mécanisme impliqué est souvent décrit comme un simple processus d'échange d'ions, certains cations semblent néanmoins sorbés préférentiellement (Sawhney, 1972).

### 2.1.3. Cas des smectites

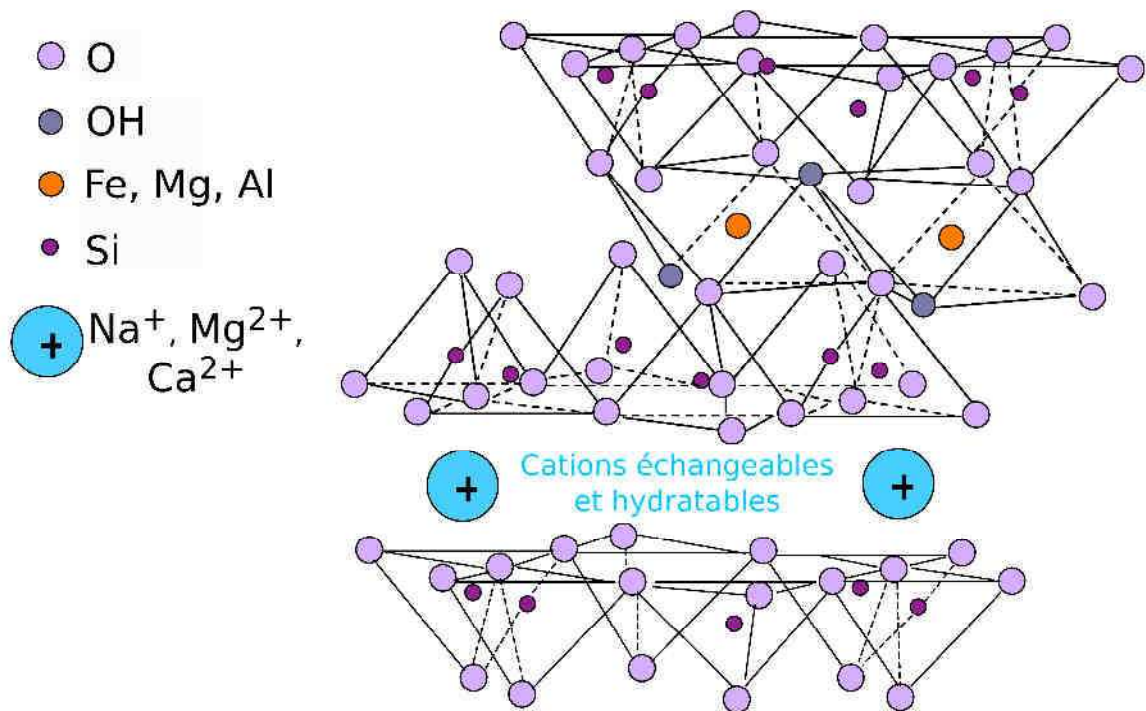
Ce travail de thèse s'est intéressé à une argile particulière, la smectite. Cette dernière provient d'un gisement de bentonite sur roches ignées<sup>1</sup> (Grim & Güven, 1978). Elle est issue d'une altération par voie hydrothermale.

Les smectites appartiennent à la sous-classe des phyllosilicates hydratés. Elles sont uniques dans l'environnement de part leur capacité à adsorber de grandes quantités d'eau et d'autres substances polaires (Brigatti et al, 2006). Les smectites constituent le groupe le plus diversifié des minéraux 2:1, seul groupe à être uniquement présent dans la fraction fine des

---

<sup>1</sup> La roche ignée se forme lorsque le magma ou la lave se refroidit et durcit immédiatement.

roches. En effet, ces phyllosilicates sont construits par une succession de couches tétraédriques-octaédriques-tétraédriques (TOT). Les smectites ont une structure de base à 10 Å. Deux combinaisons TOT sont séparées par un espace interfoliaire. Les tétraèdres sont composés d'un atome central  $\text{Si}^{4+}$  (substitutions avec  $\text{Al}^{3+}$  et/ou  $\text{Fe}^{3+}$ ) entouré par quatre atomes d'oxygène (Bailey, 1980; Brigatti et al, 2006). Dans le cas des octaèdres, le cation central est habituellement  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$ , entouré par six atomes d'oxygène (Figure 3).



**Figure 3 : Structure schématique des smectites** (d'après Shiragami et al, 2005).

Les smectites se caractérisent par la présence d'eau interfoliaire mais avec une charge cationique faible, variant de 0,2 à 0,6  $e^-$  par maille. La présence de différents cations échangeables, faiblement retenus étant donné la faible charge cationique, peut varier. La capacité d'échange cationique est, quant à elle, élevée, comprise entre 80 et 150 meq / 100 g d'argile (Eslinger & Peaver, 1988) selon la taille des particules, la nature des cations et le taux d'hydratation. Cette valeur signifie que les cations ne sont pas irréversiblement liés aux feuillets et que l'hydratation influence les liaisons cations-feuillets.

Les smectites, argiles gonflantes, possèdent un grand pouvoir absorbant d'eau. L'influence de l'état d'hydratation de l'argile sur le gonflement de la structure peut être comprise qualitativement en considérant les forces électrostatiques existantes entre le cation

interfoliaire et la surface. Les smectites, comprenant des cations divalents ( $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$ ), contiennent deux couches d'eau dans l'espace interfoliaire (espace basal = 14-15 Å). A l'inverse, les smectites, avec des cations monovalents comme le sodium, ne contiennent qu'une seule couche d'eau ( $d = 12$  Å).

Il existe deux sous-groupes de smectites (Bailey, 1980 ; Brigatti et al, 2006) :

- les smectites trioctaédriques : les saponites portant le déficit de charges uniquement dans les tétraèdres et les hectonites, uniquement dans les octaèdres ;
- les smectites dioctaédriques : les équivalents des saponites étant les beidellites ou nontronites, et à l'inverse, les montmorillonites portant le déficit de charges uniquement dans leurs couches octaédriques.

## 2.2. Les oxydes et hydroxydes de fer

### 2.2.1. Définition des oxydes et hydroxydes de fer

Le fer est un élément extrêmement répandu dans le milieu naturel (Taylor, 1964). Il constitue ainsi l'une des impuretés les plus fréquemment associées aux minéraux argileux. Les oxy-hydroxydes de fer, sous forme amorphe ou cristalline, sont ainsi des constituants communs dans les sols naturels, concentrés dans les zones supérieures de l'écorce terrestre. Ces composés peuvent également être synthétisés au laboratoire.

Ces minéraux sont classés selon le nombre d'oxydation du fer (fer divalent, trivalent ou mixte), selon la formule chimique (oxyde, hydroxyde ou oxy-hydroxyde) et enfin selon la nature bidimensionnelle ou tridimensionnelle de la structure cristalline.

### 2.2.2. Propriétés

La majorité de ces composés ont une structure cristalline dans laquelle les liaisons dominantes sont à caractère ionique. Le rayon ionique des anions  $O_2^-$  et  $OH^-$  étant relativement similaire (0,132 nm), ils forment un assemblage cubique, à faces centrées ou hexagonales compactes, les sites tétraédriques et octaédriques étant occupés par les cations.

Comme les argiles, l'importante surface spécifique des oxy-hydroxydes de fer et leur charge de surface, variable avec le pH du milieu, sont responsables de leur réactivité (Kabata-

Pendias & Pendias, 2001). En effet, suivant les conditions physico-chimiques, les oxy-hydroxydes présentent des charges de surface variables permettant d'adsorber les anions et les cations par des liaisons de haut niveau d'énergie. Le point isoélectrique des oxy-hydroxydes de fer se situe entre pH 7 et 9 selon les espèces.

De plus, les oxy-hydroxydes peuvent précipiter en piégeant les métaux à l'intérieur des mailles cristallines, permettant ainsi l'incorporation de métaux en quantité supérieure à leur CEC. Cette cristallisation peut avoir lieu sous l'influence de micro-organismes de différents genres, tels que *Thiobacillus* ou *Metallogenium* (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

### 2.2.3. Cas de la goethite

Outre les smectites, ce travail de thèse s'est également intéressé à des oxy-hydroxydes de fer particulier, les goethites.

Dédiée au poète et philosophe allemand Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832), passionné de minéralogie, la goethite est un oxy-hydroxyde de fer très répandu, rencontré en abondance dans les gisements de fer, dans les alios<sup>2</sup>, dans certaines latérites ou encore en petites quantités dans de très nombreux sols. Sa formule la plus couramment admise est FeOOH (Cudennec & Lecerf, 2003).

La goethite cristallise dans une maille orthorhombique. La structure tridimensionnelle est construite à partir d'octaèdres FeO<sub>3</sub>(OH)<sub>3</sub> formant des tunnels. Chaque octaèdre de fer est relié à huit octaèdres voisins par 4 arêtes et 4 sommets ; les atomes d'oxygène se trouvant dans un environnement tétraédrique OFe<sub>3</sub>H ou OFe<sub>3</sub>-H (liaison H forte). Les atomes d'oxygène définissent des couches de type hexagonal compact (Figure 4).

En agrégats massifs, la goethite est marron foncé ou noire, tandis que sous forme de poudre, elle est jaune et est responsable de la couleur de beaucoup de roches, de sols et de dépôts d'ocre. Industriellement, la goethite est ainsi un pigment important.

A température ambiante, la goethite est l'un des oxy-hydroxydes de fer les plus stables du point de vue thermodynamique. Néanmoins, par thermolyse à 540 K, la goethite se transforme aisément en hématite Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Cudennec & Lecerf, 2005).

---

<sup>2</sup> Les alios sont formés par concrétion dans les dépôts sédimentaires ou les sables amenés par les vents. Cette roche résulte de la cimentation des grains de sable et graviers par des hydroxydes de fer, d'aluminium et de manganèse ainsi que de la matière organique.



La goéthite est de loin le cas le plus étudié des oxydes de fer substitués de façon isomorphe par une grande variété de substituants naturels ou synthétiques, avec comme exemple le plus répandu, l'aluminium. Trois phases interviennent dans la cinétique de sorption des métaux traces par la goéthite (Brummer et al, 1988). Tout d'abord, l'adsorption des métaux se fait sur la surface externe, suivie de la diffusion des métaux depuis les sites de liaisons externes aux sites de liaisons internes. Enfin, la liaison et fixation du métal au sein des particules de goéthite sont réalisées.

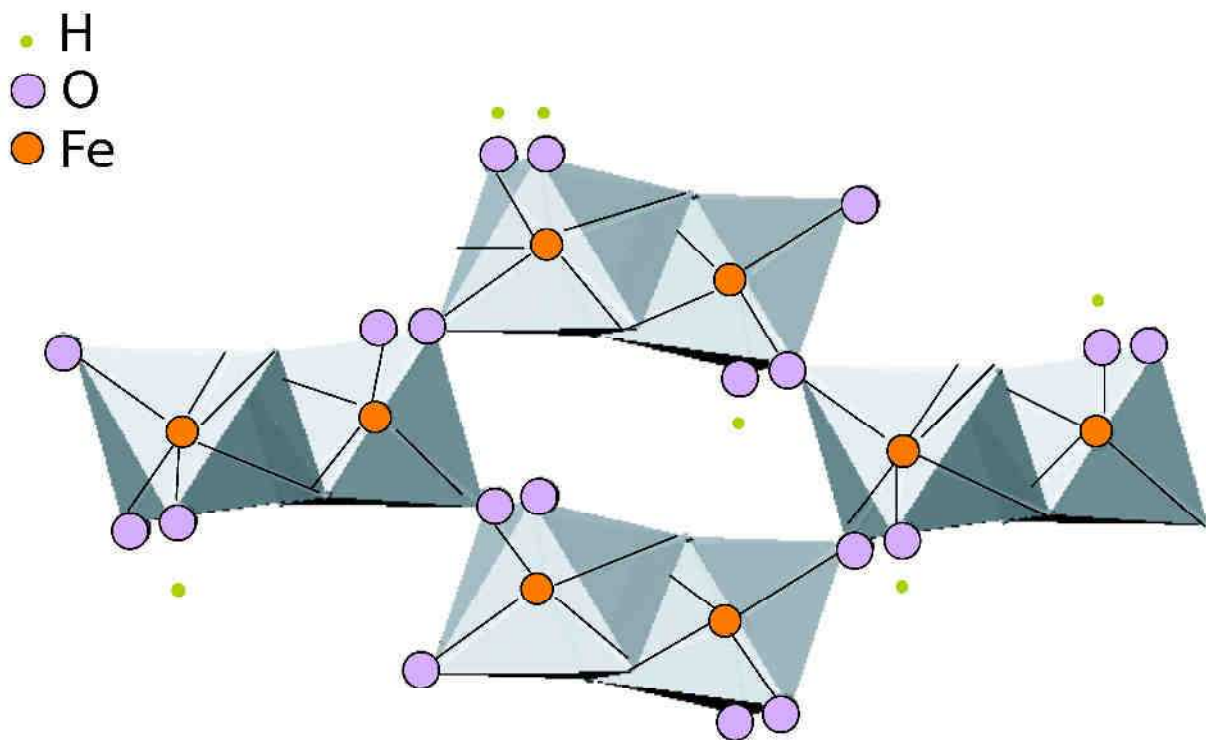


Figure 4 : Structure schématique de la goéthite (adaptée de Cudennec et Lecerf, 2003).

### 2.3. Les carbonates, phosphates, sulfates, sulfures et chlorures

Les carbonates, sensibles aux conditions de drainage, sont des constituants communs des sols où le potentiel d'évapotranspiration excède les précipitations. Dans la majorité des sols, la forme prédominante des carbonates ( $R^{2+}CO_3^{2-}$  ;  $R = Ca, Mg, Fe, Pb, Zn, Cu$  retrouvés dans les sols contaminés) est la calcite ( $CaCO_3$ ). Assez soluble, cette phase minérale joue un rôle majeur dans le contrôle du pH des sols et ainsi, de manière indirecte, sur la sorption des

espèces métalliques (Blanchard, 2000). La sorption des éléments traces par les carbonates mettraient en jeu des phénomènes de co-précipitation (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Les phosphates (groupement  $\text{PO}_4^{3-}$ ) sont des minéraux peu abondants dans les sols. Néanmoins, comme pour les carbonates, des substitutions du calcium par des éléments traces métalliques divalents sont susceptibles de se produire (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Les sulfates (principalement de la forme  $\text{R}_2+\text{SO}_4^{2-}$ ), sulfures (souvent  $\text{R}_2+\text{S}^{2-}$ ) et chlorures (généralement  $\text{R}_2+\text{Cl}^-$ ) sont des composés relativement négligeables dans la majorité des sols, mais qui peuvent être abondants dans des environnements miniers ou industriels (Remon, 2006). Le couple sulfate-sulfure est sensible aux conditions d'oxydo-réduction du milieu. En condition anoxique, la réduction des sulfates en sulfures est fréquente. A l'inverse, l'oxydation de certains sulfures est rapide lorsque la saturation en oxygène est atteinte.

### 3. La matière organique

La matière organique du sol est un mélange complexe de constituants en voie de décomposition, provenant principalement des plantes mais aussi des animaux et des micro-organismes. Son origine peut également être anthropique : composts, boues, pesticides, hydrocarbures (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Elle est principalement composée de carbone et d'oxygène. La matière organique est largement distribuée dans les sols, les sédiments et les eaux.

Dans le sol, la matière organique est subdivisée en deux fractions :

- la fraction vivante (microflore du sol, faune épilithique, animaux fousseurs, rhizosphère des végétaux supérieurs). Dans les biotopes, un grand nombre d'espèces est couramment utilisé comme indicateurs de pollution des sols. Cependant, la croissance, la reproduction et les activités métaboliques des biotopes sont sensibles aux diverses variables du sol, telles que les concentrations en polluants trace. L'influence de la fraction vivante sur la fixation des éléments trace est importante. Cette fraction participe largement aux modifications de certains facteurs pédologiques comme le pH et le potentiel d'oxydo-réduction (Kabata-Pendias & Pendias, 2001) ;
- la fraction morte (débris de végétaux et d'animaux à divers stades de

décomposition d'humus). La majeure partie de la matière organique du sol résulte de décomposition biologique. Les produits finaux de cette dégradation correspondent à diverses molécules de masses moléculaires très différentes, telles que les substances humiques, les acides organiques, les acides aminés, les protéines, les peptides, les lipides ou encore les cires (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Comme les argiles, la matière organique du sol est caractérisée par une surface spécifique importante ainsi qu'un fort pouvoir gonflant qui permet la pénétration de l'eau et la diffusion de petites molécules pouvant alors se lier aux substances humiques (Choudhry, 1984).

Les minéraux primaires et secondaires ainsi que la matière organique jouent donc un rôle clé dans le transport et l'accumulation des ions métalliques.

## **II - Mécanismes de rétention des éléments traces métalliques en phase solide**

Un sol, par sa dynamique, est capable soit de prélever des ions en solution soit, à l'inverse, d'en fournir. L'ensemble des constituants du sol forme ainsi le « complexe absorbant », fortement chargé négativement, qui recouvre l'ensemble des colloïdes (Blanchard, 2000 ; Bonneau & Souchier, 1994). Différents processus physico-chimiques à l'interface solide/liquide sont impliqués dans la rétention des éléments traces métalliques.

L'un de ces principaux mécanismes est l'adsorption. En effet, l'adsorption des métaux sur la fraction solide du sol est un des premiers processus qui contrôle les concentrations de métaux présents dans la solution du sol. Ce mécanisme consiste en un phénomène de surface par lequel des molécules sont accumulées à l'interface sol/eau ou à l'interface sol/air (Blanchard, 2000). Les minéraux argileux, les oxy-hydroxydes et les matières organiques sont les principaux constituants du sol qui contribuent à l'adsorption des éléments traces (Alloway, 1995 ; Chaignon, 2001 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Ce mécanisme est généralement réversible (Manceau et al, 2002).

Selon les énergies de liaisons impliquées, l'adsorption peut être de deux types : l'adsorption physique ou l'adsorption chimique (Alloway, 1995 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001 ; McBride, 1989).

## 1. L'adsorption physique ou physisorption

L'adsorption physique, également appelée physisorption, résulte de l'attraction électrostatique d'un soluté par une surface polarisée afin de maintenir l'électroneutralité. Il s'agit d'une adsorption non spécifique. Les énergies de liaison mises en jeu sont relativement faibles, ainsi responsables d'une mobilisation facile des éléments métalliques adsorbés en cas de changements physico-chimiques du milieu.

Par une charge globalement négative, la matrice du sol attire les cations en solution (Chaignon, 2001). En effet, la surface de la plupart des colloïdes est chargée négativement, impliquant une CEC supérieure à la capacité d'échange anionique (Alloway, 1995 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Ces charges négatives peuvent provenir soit de substitutions isomorphiques, en particulier dans les minéraux argileux, qui impliquent le remplacement d'un cation trivalent par un divalent, ou encore de réactions chimiques de surfaces, dépendantes du pH (Chaignon, 2001 ; Remon, 2006).

## 2. L'adsorption chimique ou chimisorption

Contrairement à la physisorption, l'adsorption chimique, ou chimisorption, fait référence à une adsorption spécifique de haute affinité (Blanchard, 2000). Cette adsorption fait intervenir des liaisons chimiques fortes, sans qu'aucune molécule d'eau soit interposée entre le groupe fonctionnel et la surface de l'ion adsorbé. Les trois principales liaisons chimiques impliquées sont de type ionique, covalente ou de coordination (Blanchard, 2000). Ces différentes liaisons peuvent se réaliser entre un ion métallique et un ligand organique ou non, correspondant à la complexation ou à la chélation (Blanchard, 2000). Le terme de ligand définit tout groupe fonctionnel, atome ou ion, lié à un groupe central d'atomes ou d'ions. McLaren (McLaren & Crawford, 1973) ainsi que McBride (McBride, 1989) ont montré que les oxydes de fer et de manganèse correspondaient aux principaux constituants du sol impliqués dans les réactions d'adsorption spécifiques des métaux.

La chimisorption constitue notamment l'un des mécanismes majeurs impliqués dans la biosorption. Cette dernière, définie comme la capacité de certains sorbants d'origine biologique à fixer des éléments traces métalliques, peut être à l'origine de fractions organiques colloïdales. La formation de biofilms, impliquant la modification des propriétés de surface, la libération d'exopolysaccharides et la modification des propriétés physico-

chimiques au sein du biofilm et dans son environnement proche, peut accroître la biosorption (Flemming, 1995).

La chimisorption est réversible et dépend notamment du pH et des conditions physico-chimiques du sol.

### **III - Facteurs modifiant la rétention des éléments métalliques**

#### **1. Le pH**

Par son influence sur le nombre de charges négatives pouvant être mises en solution, la sorption des métaux dans la plupart des sols est très dépendante du pH (McBride, 1989 ; McLaughlin et al, 2000 ; Schindler & Sposito, 1991). Si l'hydrolyse des minéraux altérables conduit à une hausse du pH par consommation des protons, la respiration des végétaux et de la microflore ainsi que l'oxydation des sulfures conduisent à une diminution du pH (Blanchard, 2000). Kabata-Pendias et Pendias (Kabata-Pendias & Pendias, 2001) et Alloway (Alloway, 1995) ont également montré qu'une augmentation de pH entraîne l'accroissement de la CEC permettant une adsorption de cations plus importante. De plus, elle entraîne également la dissolution de matières organiques et ainsi la formation de complexes organo-métalliques plus solubles (Chaignon, 2001).

Les variations de pH ont d'importantes conséquences, parfois contraires, sur la mobilité des éléments traces métalliques, en particulier en présence de ligands organiques et inorganiques (Chaignon, 2001 ; Remon, 2006).

#### **2. Le potentiel d'oxydo-réduction**

Le potentiel d'oxydo-réduction (Eh), couramment abrégé en potentiel redox, permet de caractériser les échanges d'électrons entre les espèces chimiques. Ainsi, lorsque le potentiel redox est élevé, les formes oxydées prédominent tandis que l'apparition des espèces réduites est favorisée par des valeurs faibles.

Les sols sont aussi sujets à des variations de potentiels redox qui déterminent les équilibres de dissolution/précipitation d'oxydes de fer et de manganèse (Alloway, 1995 ; Lindsay, 1979). En effet, si le pH semble être le principal facteur impliqué dans la mobilisation des éléments traces métalliques (Calmano et al, 1993 ; Chuan et al, 1996), les

conditions redox affectent significativement la solubilité de ces éléments (Calmano et al, 1993; Chuan et al, 1996). En effet, pour un sol donné, le potentiel d'oxydo-réduction varie inversement au pH, c'est-à-dire qu'il augmente lorsque le pH diminue (Deneux-Mustin et al, 2003). Néanmoins, les changements de potentiel redox affectent le pH du sol (Chaignon, 2001). En effet, la modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments se liant avec le métal influence directement la solubilité des éléments traces métalliques. En conditions réductrices, la réduction des sulfates en sulfures facilite le piégeage des éléments chalcophiles<sup>3</sup> tels que le fer, le zinc, le plomb et le cadmium (Deneux-Mustin et al, 2003). Dans des conditions similaires, la dissolution des oxy-hydroxydes est favorisée, provoquant de manière opposée la solubilisation des métaux associés (Chaignon, 2001).

Cependant, en raison du nombre important des couples d'oxydo-réduction et de la cinétique des réactions, l'influence de ce paramètre reste difficile à appréhender.

### **3. L'activité biologique**

Les organismes vivants, composés par une faune et une flore de dimensions variées (macro-, mezo-, microbiotes), sont très abondants dans les sols (Kabata-Pendias, 2004). La multiplicité des actions et interactions de ces organismes rend difficile la compréhension globale des phénomènes biologiques jouant sur la solubilité des éléments traces métalliques dans les sols. Notre étude s'intéressant principalement aux micro-organismes ainsi qu'aux végétaux supérieurs, nous soulignerons principalement leurs actions.

Par la production, la consommation et le transport de nombres d'éléments des écosystèmes du sol ainsi que leur implication dans les flux d'énergie et dans les cycles géochimiques, les micro-organismes ont une grande importance écologique. De la mobilisation à l'accumulation des éléments chimiques dans les sols, leurs activités métaboliques influencent de nombreux processus (Kabata-Pendias, 2004).

Cependant, beaucoup de ces phénomènes sont également communs aux végétaux. La mobilité des polluants métalliques est causée principalement par trois phénomènes, la solubilisation, l'insolubilisation et la volatilisation.

---

<sup>3</sup> Se dit d'un élément possédant une forte affinité pour le soufre.

### 3.1. La solubilisation

Ce phénomène provient de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitriques et sulfuriques ainsi que de composés complexant tels que les sidérophores.

L'oxydation par certaines bactéries chimiolithotrophes<sup>4</sup> (*Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Galionella*) des formes réduites du fer et du soufre contenues dans les sulfures permet la production d'acide sulfurique, susceptible de dissoudre les silicates, les phosphates, les oxydes et les sulfures, libérant ainsi les éléments traces métalliques contenus (Ghiorse, 1984 ; Sand & Gehrke, 2006). Les racines des végétaux, mais également les champignons, libèrent dans la rhizosphère des exsudats ayant la capacité de complexer des métaux et d'augmenter la mobilité du fer, du manganèse, du cuivre, de plomb et de zinc (Chaignon, 2001 ; Jones, 1998 ; Marschner, 1995).

Parmi les composés sécrétés, les sidérophores, vont, quant à eux, être capables de complexer spécifiquement certains éléments en solution. Produits par les bactéries, les plantes et les champignons, les sidérophores favorisent ainsi le déplacement d'éléments métalliques (Chaignon, 2001).

### 3.2. L'insolubilisation

Si dans la solubilisation, la réduction du fer et du manganèse est observée, l'insolubilisation constitue le phénomène inverse. La sécrétion dans la rhizosphère de certains acides organiques de faible poids moléculaire, tels que les acides oxalique, citrique ou fumarique, limiteraient les transferts par des processus de complexation et diminueraient l'adsorption de certains métaux par la plante (Chen et al, 2003).

### 3.3. La volatilisation

Ce phénomène qui repose sur l'action directe de certains micro-organismes sur le degré d'oxydation de l'espèce métallique concerne le mercure, l'arsenic et le sélénium. Sous l'action de la biométhylation, qui permet le transfert de groupements méthyl directement aux atomes, ces éléments peuvent alors se volatiliser dans l'atmosphère.

---

<sup>4</sup> Bactéries puisant leur énergie à partir de l'oxydation de composés minéraux servant de donneurs d'électrons.

#### 4. La température

La température a un impact direct sur la mobilité des contaminants métalliques en déplaçant les équilibres des réactions de précipitation et de co-précipitation vers la dissolution (précipitation et co-précipitation) et un impact indirect, en modifiant la teneur en eau du sol, le pH et le potentiel d'oxydo-réduction. En effet, la température influence principalement la solubilité de l'O<sub>2</sub> (effet sur le Eh) et le CO<sub>2</sub> (effet sur le pH) ainsi que la dissolution des carbonates solides (Stumm & Morgan, 1981).

Par ailleurs, ce paramètre influe directement sur la croissance et les activités bactériennes. Ainsi, une élévation de la température pourrait accélérer certains phénomènes tels que les processus d'oxydo-réduction, la production de composés acides et de complexants biologiques.





## *Chapitre 3*

### Bactéries et métaux



Nous avons pu voir dans le premier chapitre, que des secteurs tels que l'agriculture ou l'industrie contribuent, de façon importante, à l'accumulation et à la dissémination des éléments traces métalliques dans les eaux, les sols et les sédiments. De par leur fonction dans le recyclage des éléments, leur ubiquité et leur abondance, les micro-organismes constituent le principal groupe d'organismes du sol affecté par la présence de ces éléments métalliques (Doelman et al, 1994).

Si certains métaux apparaissent essentiels à la vie (Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni et Zn), servant de micronutriments ou utilisés comme co-facteurs de différents processus enzymatiques, dans des processus redox, la stabilisation de molécules, la régulation et la pression osmotique, d'autres, à l'inverse, ne sont pas indispensables (Bruins et al, 2000). Au contraire, des métaux tels que l'argent, l'aluminium, le cadmium, le mercure et le plomb, non essentiels, sont potentiellement toxiques pour les êtres vivants et, en particulier pour les micro-organismes. Néanmoins, à fortes concentrations, tous ces métaux, essentiels ou non, entraînent des stress oxydatifs et peuvent endommager notamment, les membranes et l'ADN cellulaires (Bruins et al, 2000). A plus grande échelle, dans l'environnement, leur présence peut provoquer des modifications considérables au sein des communautés microbiennes et de leurs activités (Doelman et al, 1994). Outre les stratégies mises en place pour prélever spécifiquement les éléments essentiels dans leur environnement, les bactéries ont également dû développer des mécanismes de résistance aux métaux toxiques.

## **I - Acquisition des métaux par les bactéries**

### **1. Acquisition des métaux solubles**

Les métaux solubles pénètrent dans la bactérie par diffusion passive à travers les porines de la membrane externe. Ce mécanisme de transport est non spécifique, rapide et ne nécessite pas d'énergie. Les métaux sont ensuite transportés activement dans la cellule par des transporteurs ATP-dépendants ou encore par des MIT (Metal Inorganic Transport) (Nies, 1999 ; Paulsen et al, 1998). Des éléments essentiels, tels que  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  peuvent être importés par un transporteur de la famille des MIT, mais également par des transporteurs ABC (Nies, 1999).

## 2. Acquisition du fer, un métal peu soluble

### 2.1. Problématique du fer

Le fer est le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre (4,7 % en masse) après l'oxygène (49,5 %), le silicium (25,8 %) et l'aluminium (7,8 %) (Neilands, 1981a ; Taylor, 1964). Dans l'environnement, il est essentiellement retrouvé sous forme d'hydroxydes de fer ou d'oxy-hydroxydes, peu biodisponibles.

A l'exception de quelques micro-organismes, tels certains *Lactobacilli* (Imbert & Blondeau, 1998 ; Neilands, 1972), les agents de la syphilis, *Treponema pallidum* (Posey et al, 1999) et de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi* (Posey & Gherardini, 2000), tous les organismes vivants nécessitent du fer pour leur croissance. En effet, cet élément intervient en tant que co-facteur dans de nombreux processus métaboliques tels que la synthèse des acides nucléiques (Dougherty & Downs, 2006), la photosynthèse (Okamura et al, 1975), la phosphorylation oxydative (Schafer et al, 1996), le transport et le stockage de l'oxygène, la régulation génétique ou encore le transfert d'électrons (Andrews et al, 2003 ; Wandersman & Delepelaire, 2004).

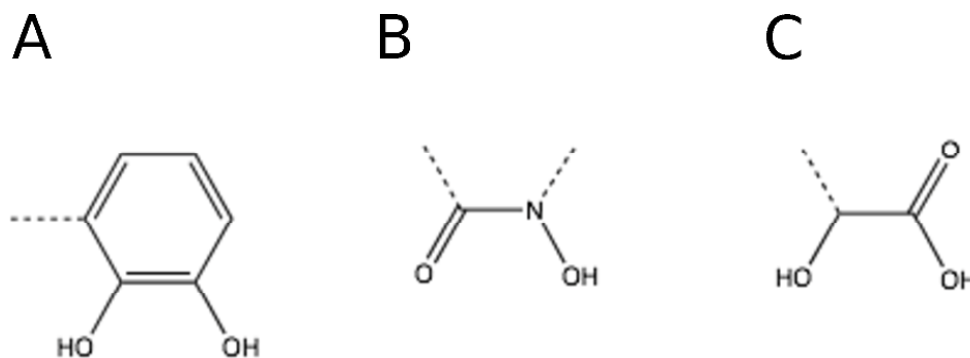
Comme il a été vu précédemment, le fer, bien qu'essentiel, est paradoxalement très peu biodisponible en raison de sa très faible solubilité à pH physiologique. Il existe principalement sous deux formes, une ferreuse,  $\text{Fe}^{2+}$ , et une plus stable, la forme ferrique,  $\text{Fe}^{3+}$ . Sous cette dernière forme, le fer est oxydé et précipite en hydroxydes de fer hautement insolubles (Braun & Killmann, 1999). Ainsi, à pH 7 et dans un environnement aérobie, les concentrations en fer libre varieront de  $10^{-9}$  à  $10^{-18}$  M (Griffiths et al, 1999). Néanmoins, pour une croissance optimale, les micro-organismes nécessitent une concentration en fer de l'ordre du  $10^{-6}$  M. Ainsi, afin de surmonter cette faible biodisponibilité, les micro-organismes aérobies ont mis en place différents mécanismes d'acquisition. La stratégie la plus répandue consiste en la production et la sécrétion de molécules de faible poids moléculaire (< 2 500 Da), appelées sidérophores.

## 2.2. Les sidérophores

### 2.2.1. Définition

Les sidérophores sont définis comme des chélateurs organiques ayant une très forte affinité pour le fer, synthétisés par les bactéries, les champignons et les plantes (Hider & Kong, 2010). Ces synthèses se déroulent en conditions aérobies et de carence en fer. Leur capacité à solubiliser le fer assure la biodisponibilité de l'élément pour la cellule. Actuellement, plus de 500 sidérophores de structures différentes, dont la taille varie entre 200 et 2000 Da, ont été décrits (Boukhalfa & Crumbliss, 2002). Tous ces sidérophores sont caractérisés par une très forte affinité pour le fer, de l'ordre de  $10^{23}$  à  $10^{52} \text{ M}^{-1}$  (Hider & Kong, 2010). Cette affinité est bien plus importante que celle déterminée pour l'EDTA ( $10^{20} \text{ M}^{-1}$ ) (Nowack et al, 2001) ou les acides organiques de faible poids moléculaire tels que l'acide oxalique ( $10^{7.5} \text{ M}^{-1}$ ) (Perrin, 1979).

Malgré leur très grande diversité de structures, les sidérophores sont classés en trois grandes familles selon les groupements fonctionnels utilisés pour complexer le fer : les hydroxamates, les  $\alpha$ -hydroxycarboxyliques et les phénols/catéchols (Faraldo-Gomez & Sansom, 2003) (Figure 5).



**Figure 5 : Groupements fonctionnels utilisés par les sidérophores pour chélater le fer.**

A. Phénol/catéchol ; B. Hydroxamate et C.  $\alpha$ -hydroxycarboxylique

Les sidérophores peuvent être libérés par les bactéries dans l'environnement tel que la rhizosphère où les concentrations peuvent atteindre  $10^{-7}$  à  $10^{-8} \text{ M}$  (Powell et al, 1980). De même, dans les solutions de sol, les concentrations sont non négligeables, variant de  $10^{-6} \text{ M}$  à  $10^{-3} \text{ M}$  par litre (Hersman et al, 1995a). Néanmoins, dans l'environnement, la production de sidérophores par les bactéries, notamment les *Pseudomonas* fluorescents, très présents dans

les sols (O'Sullivan & Ogara, 1992), est fortement influencée par une grande variété de facteurs, tels que la concentration et la spéciation du fer, la nature et la concentration en source de carbone et d'azote, les teneurs en phosphate, le taux d'aération, la température, le pH, la lumière ainsi que la présence d'éléments traces comme le magnésium, le zinc ou le molybdate (O'Sullivan & Ogara, 1992).

Si les bactéries utilisent leur propre sidérophore, dit sidérophore endogène, elles sont également capables d'utiliser ceux présents dans l'environnement et qui ont été synthétisés par d'autres organismes (sidérophores exogènes) (Poole & McKay, 2003).

### 2.2.2. Les *Pseudomonas* fluorescents et leurs sidérophores

Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont ubiquitaires et ont été isolées de nombreux habitats tels que les sols, les sédiments, les végétaux ainsi que les eaux douces et marines (O'Sullivan & Ogara, 1992). Il apparaît comme l'un des taxons bactériens les plus importants du sol (Garbeva et al, 2004), où les populations indigènes de *Pseudomonas* fluorescents sont très fréquentes (Latour et al, 1999). Ce genre joue des rôles clés dans les sols en tant qu'agent de biocontrôle (O'Sullivan & Ogara, 1992) mais aussi dans la stimulation de la croissance végétale ainsi que dans la bioremédiation (Garbeva et al, 2004).

Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts. Ces bactéries, mobiles grâce à un flagelle polaire, peuvent être retrouvées sous forme planctonique ou sessile. Les *Pseudomonas* des sols produisent généralement un pigment jaune-vert, fluorescent, appelé pyoverdine et correspondant à une famille importante de sidérophores (O'Sullivan & Ogara, 1992). Ainsi, le genre *Pseudomonas* peut être divisé en deux groupes, les *Pseudomonas* non fluorescents et ceux fluorescents, produisant la pyoverdine. Parmi ces derniers sont retrouvés *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas syringae* (Meyer, 2000). Des analyses génomiques de différents *Pseudomonas* indiquent que le transport du fer serait très similaire chez tous les *Pseudomonas* fluorescents (Ravel & Cornelis, 2003). Dans notre étude, l'organisme modèle est *P. aeruginosa*, pathogène opportuniste (Figure 6) pour lequel le transport du fer a été le plus étudié et est ainsi le mieux connu et pour lequel nous disposons d'outils moléculaires.



**Figure 6 :** *P. aeruginosa* observée au microscope électronique à balayage (Image Sci MAT/Pr Science), les bactéries mesurant de 0,5 x 2 à 3  $\mu\text{m}$ .

#### 2.2.2.1. Les sidérophores utilisés par *P. aeruginosa*

Pour satisfaire ses besoins en fer, *P. aeruginosa* synthétise et sécrète deux sidérophores, la pyoverdine (Pvd) et la pyochéline (Pch). La pyoverdine est définie comme le sidérophore majeur produit par cette bactérie (Meyer & Abdallah, 1978) et présente une très forte affinité pour le fer ( $10^{32} \text{ M}^{-1}$ ) (Albrecht-Gary et al, 1994). La pyochéline, identifiée par Cox et Graham (Cox & Graham, 1979), est, quant à elle, synthétisée en plus faible quantité et son affinité pour le fer est moindre ( $10^{18} \text{ M}^{-1}$ ) (Brandel et al, 2012).

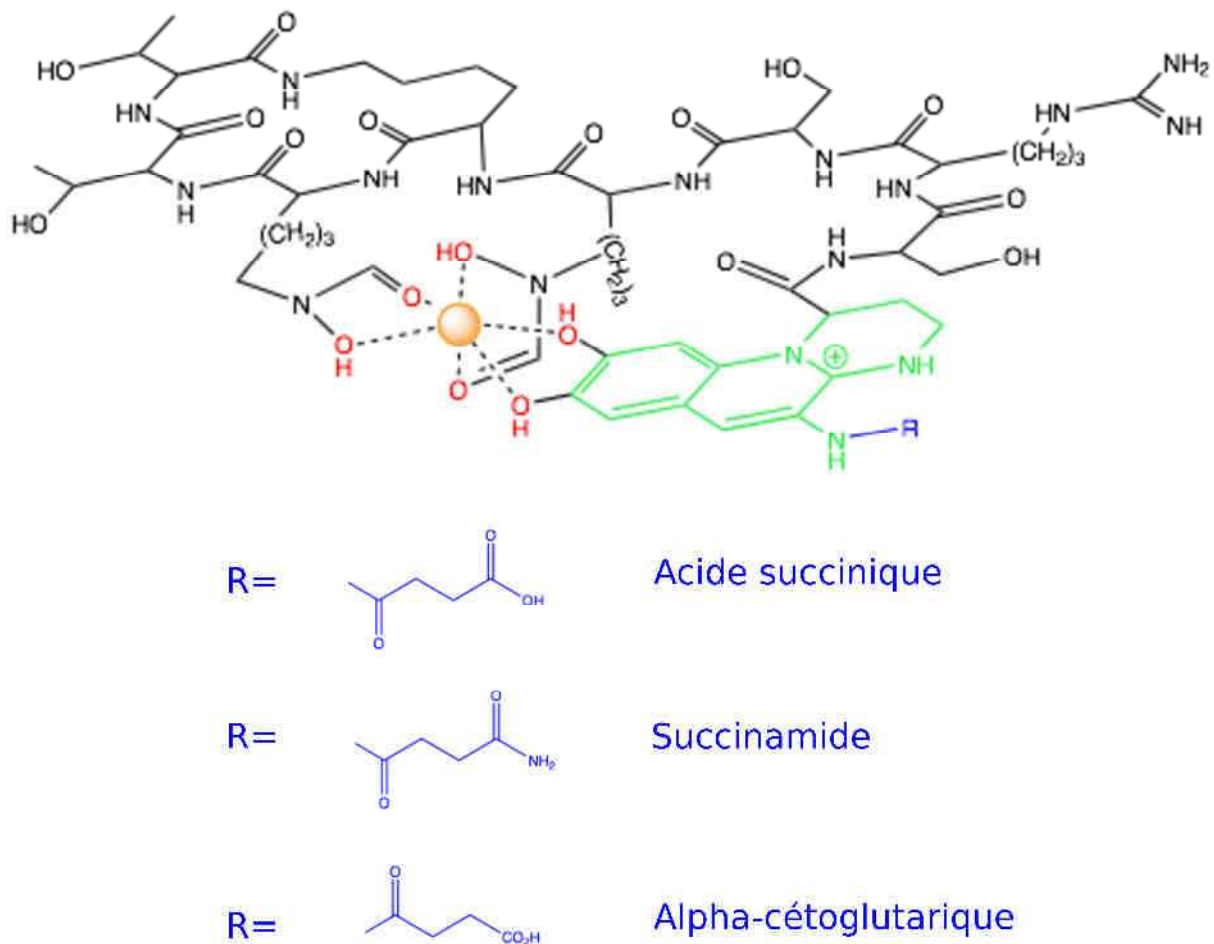
##### A) Les pyoverdines

A ce jour, plus de 60 pyoverdines différentes, toutes produites par les Pseudomonades fluorescents, ont été identifiées (Meyer et al, 2008). Toutes ces pyoverdines sont caractérisées par un chromophore quinoléique, dérivé de la 2,3-diamino-6,7-dihydroxyquinoline, leur conférant ses propriétés de couleur et de fluorescence (Budzikiewicz et al, 1997 ; Demange et al, 1990). En position C3 du chromophore, une chaîne latérale (acide dicarboxylique, amide ou  $\alpha$ -cétoglutarique) est fixée, tandis qu'en position C1, sur la fonction carboxyle est fixée une chaîne peptidique (Budzikiewicz, 1997). La longueur et la composition de cette dernière varieront selon la souche étudiée. Cette chaîne peptidique peut être linéaire ou partiellement cyclisée.



B) La pyoverdine produite par *P. aeruginosa* PAO1

La pyoverdine synthétisée par *P. aeruginosa* est constituée du chromophore quinoléique lié à un octa-peptide, partiellement cyclisé [Ser-Arg-Ser-FoOHOrn-c(Lys-FoOHOrn-Thr-Thr)] (Demange et al, 1990) et, en position C3, à une chaîne variable (acide succinique, succinamide ou  $\alpha$ -cétoglutarique). Ainsi, trois isoformes de la pyoverdine peuvent être produites par *P. aeruginosa*. La forme majoritaire, de 1 333 Da, comporte une chaîne latérale dérivant de l'acide succinique (Briskot et al, 1989). Les deux groupements hydroxamates des hydroxyornitines et le cathéchol du chromophore sont impliqués dans la chélation du fer ferrique (Figure 7). La chélation du fer se fait ainsi avec une stoechiométrie Pvd:Fe de 1:1 et une constante d'association de  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  (Albrecht-Gary et al, 1994).



**Figure 7 : Structure de la pyoverdine synthétisée par *P. aeruginosa* PAO1.** La Pvd de PAO1 est composée d'un chromophore, représenté ici en vert, d'une chaîne peptidique de 8 acides aminés, en noir. Les atomes impliqués dans la liaison du fer (sphère orange) sont représentés en rouge. En bleu, sont représentées les différentes chaînes latérales possibles.

*a) Biosynthèse, maturation et sécrétion de la pyoverdine*

La pyoverdine est synthétisée par un système impliquant des peptides synthétases non ribosomiques, dits NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthetase). Sa biosynthèse est initiée dans le cytoplasme par l'assemblage grâce aux NRPS d'un précurseur peptidique non fluorescent, doté d'une chaîne grasse de type acide myristique ou myristoléique (Hannauer et al, 2012b) qui permet, probablement, l'ancrage du précurseur dans la membrane interne durant la biosynthèse. Ce précurseur cytoplasmique est transporté au travers de la membrane interne vers le périplasma *via* un transporteur ABC (Yeterian et al, 2009). Dans ce compartiment cellulaire, la chaîne grasse est excisée par une enzyme périplasmique, PvdQ. Cette excision est suivie de la cyclisation complète du chromophore par différentes enzymes périplasmiques, conférant ses propriétés de fluorescence à la molécule (Figure 8).

Récemment, il a été montré que la pompe à efflux ATP-dépendante, PvdRT-OpmQ, était impliquée dans la sécrétion de la pyoverdine nouvellement synthétisée (Hannauer et al, 2010). Ainsi, la pyoverdine, prise en charge par cette pompe au niveau du périplasma, est transportée à travers la membrane externe vers le milieu extracellulaire (Visca et al, 2007) (Figure 8).

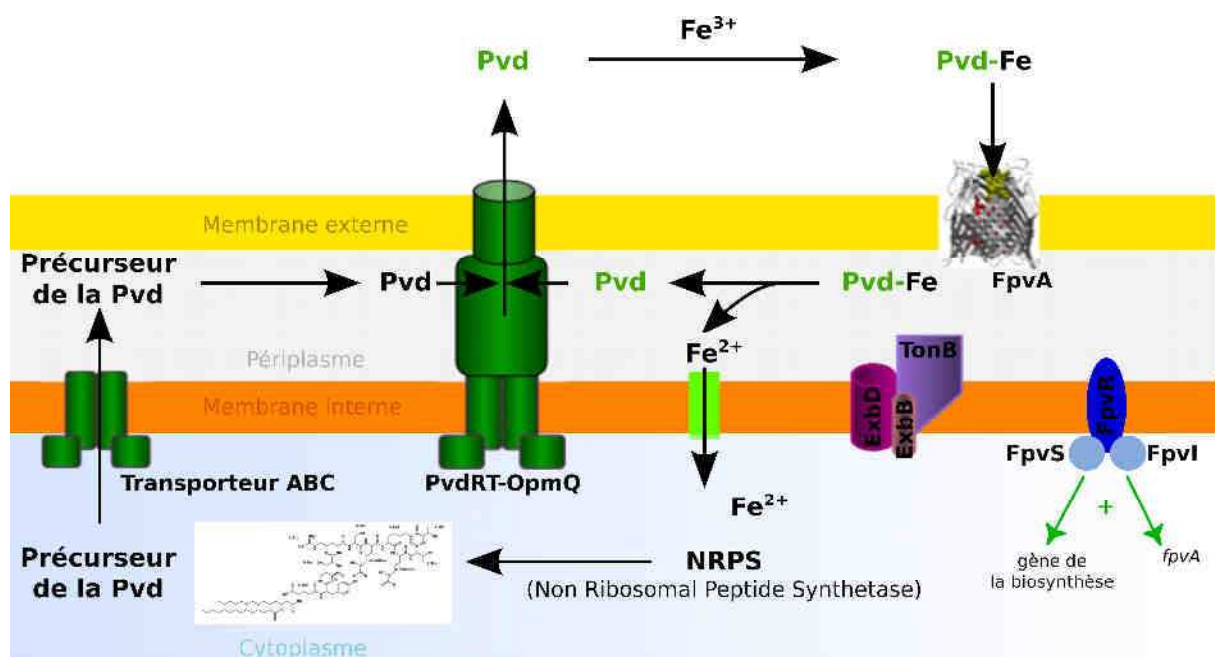
*b) Transport du fer via la voie pyoverdine*

La pyoverdine chélate le fer dans l'environnement de la bactérie et le complexe pyoverdine-fer formé est transporté du milieu extracellulaire vers le périplasma bactérien par un transporteur TonB dépendant, ancré dans la membrane externe, appelé FpvA. L'énergie nécessaire à ce transport au travers de la membrane externe est fournie par la force proton motrice de la membrane interne *via* le complexe protéique TonB-ExbB-ExbD, ancré dans la membrane cytoplasmique.

L'équipe a montré que le complexe pyoverdine-fer, après son transport à travers la membrane externe, se dissocie dans le périplasma par un mécanisme impliquant une réduction du fer ferrique en fer ferreux et ceci sans aucune modification chimique du sidérophore (Greenwald et al, 2007 ; Schalk et al, 2002 ; Yeterian et al, 2010). La pyoverdine est ensuite recyclée dans le milieu extracellulaire par la pompe à efflux PvdRT-OpmQ (Imperi et al, 2009; Yeterian et al, 2010). Le fer est, quant à lui, probablement transporté vers le cytoplasme par un transporteur non identifié à ce jour (Figure 8).

## c) Régulation du système pyoverdine

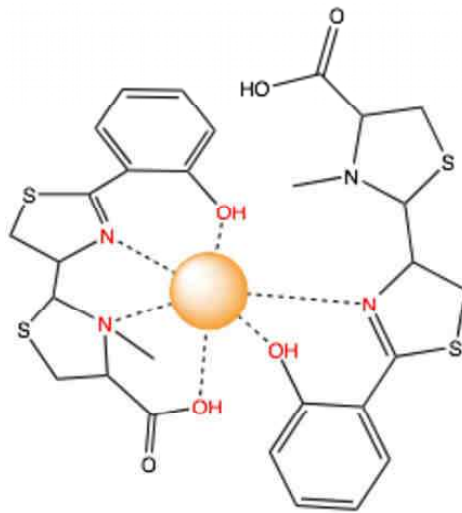
L'expression de l'ensemble des protéines impliquées dans la biosynthèse de la pyoverdine, son export et l'acquisition du fer par ce sidérophore est régulée par un couple de facteurs sigma, anti-sigma (Visca et al, 2002). Le complexe pyoverdine-fer, présent à faible concentration, joue le rôle d'activateur de cette cascade de signalisation en se liant au transporteur FpvA, à la surface de la membrane externe. Celle-ci active ensuite le couple de facteurs sigma (FpvI et FpvS) / anti-sigma (FpvR) qui stimule la transcription des gènes impliqués dans la biosynthèse de la pyoverdine et dans l'acquisition du fer par le sidérophore (Figure 8). En présence de fer, l'expression de ce couple de facteurs est, quant à elle, réprimée par la présence d'un régulateur cytoplasmique Fur (Ferric Uptake Repressor). En effet, lorsque le fer ferreux atteint une certaine concentration dans le cytoplasme bactérien, il se lie à Fur qui inhibe alors la transcription des gènes de la voie pyoverdine (Hantke, 2001).



**Figure 8 : La voie pyoverdine chez *P. aeruginosa*.** La synthèse de la Pvd est initiée dans le cytoplasme par la synthèse d'un précurseur grâce aux NRPS. Ce précurseur est ensuite sécrété à travers la membrane interne par un transporteur ABC. Il y a maturation du précurseur dans le périplasma, conduisant à la sécrétion de la pyoverdine. Cette dernière est ensuite sécrétée à travers la membrane externe par une pompe à efflux. Libérée dans le milieu extracellulaire, la Pvd chélate le fer ferrique, formant un complexe Pvd-Fe. Ce complexe est alors reconnu par un transporteur de membrane externe spécifique, FpvA. Le passage du complexe à travers ce transporteur vers le périplasma nécessite de l'énergie qui est fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD. Dans le périplasma, le complexe Pvd-Fe est dissocié par réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ . Le fer est ensuite transporté vers le cytoplasme, tandis que la Pvd est recyclée dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de la pompe à efflux PvdRT-OpmQ. Le complexe pyoverdine-fer, présent à faibles concentrations, joue le rôle d'activateur de cette cascade de signalisation en se liant au transporteur FpvA. Celle-ci active ensuite le couple de facteurs sigma (FpvI et FpvS) / anti-sigma (FpvR).

## C ) La pyochéline

Dérivée de la thiazolidine [2(2-o-hydroxyphenyl-2-thiazolin-4yl)-3-methylthiazolidine-4-carboxylic acid] (Cox et al, 1981), la pyochéline chélate le fer selon une stoechiométrie 2 : 1 ( $\text{Pch}_2 : \text{Fe}^{3+}$ ) (Figure 9) (Cox & Graham, 1979 ; Tseng et al, 2006), avec une constante d'association de  $10^{18} \text{ M}^{-1}$  (Brandel et al, 2012).



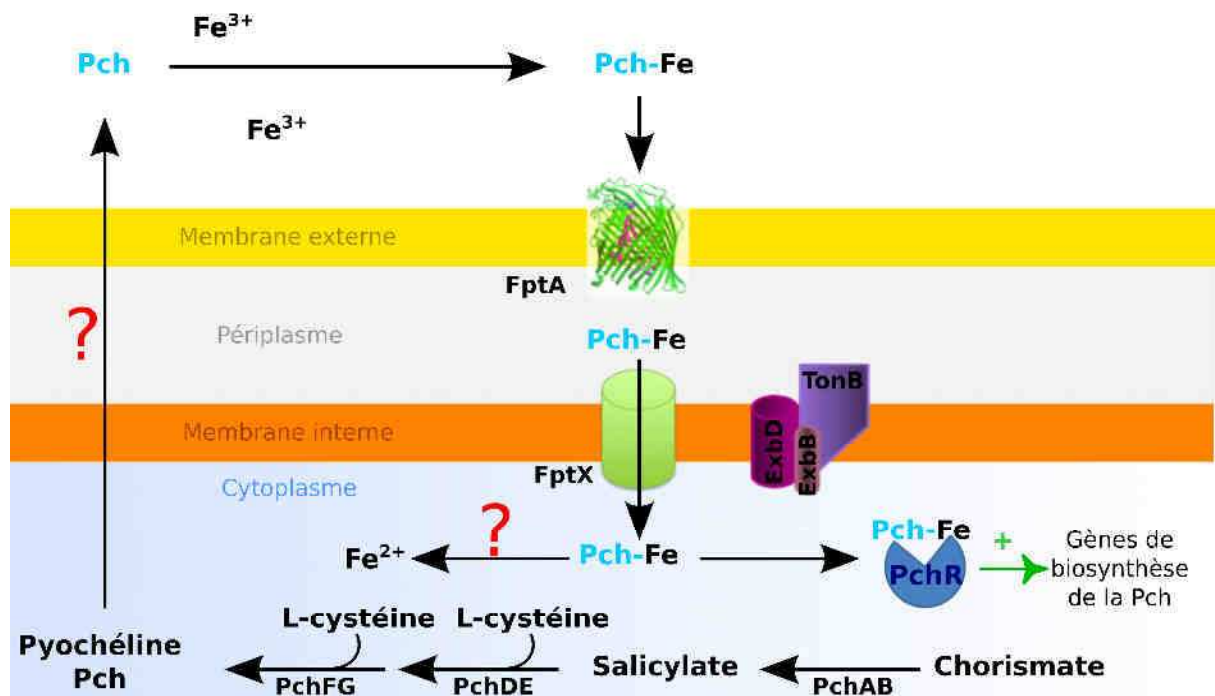
**Figure 9 : Structure de la pyochéline synthétisée par *P. aeruginosa* PAO1.** Les atomes impliqués dans la chélation du fer sont représentés en rouge.

## a) Biosynthèse de la pyochéline

L'assemblage d'une molécule d'acide salicylique, de deux cystéines et d'un groupement méthyle permet la formation de la pyochéline (Reimann et al, 2001). Les enzymes PchA et PchB sont responsables de la synthèse de l'acide salicylique à partir du chorismate (Figure 10) (Gaille et al, 2002 ; Gaille et al, 2003). L'activation de l'acide salicylique par PchD permet ensuite son interaction avec PchE, enzyme responsable de la condensation de l'acide salicylique avec la cystéine (Quadri et al, 1999). L'ajout de la seconde cystéine est réalisé par PchF (Quadri et al, 1999). Après réduction d'une double liaison par PchF, il y a formation de la pyochéline (Reimann et al, 2001). La synthèse de la pyochéline se déroule entièrement dans le cytoplasme. Actuellement, le mécanisme impliqué dans la sécrétion de la pyochéline n'a pas encore été identifié (Figure 10).

## b) Transport du fer via la pyochéline

Le complexe pyochéline-fer est reconnu par un transporteur spécifique de la membrane externe, appelé FptA. L'énergie de la force proton motrice de la membrane interne transmise au complexe TonB, localisé dans la membrane interne, permet l'activation de ce transporteur (Hoegy et al, 2005). Une perméase, FptX, serait impliquée dans le transport du complexe pyochéline-fer du périplasma vers le cytoplasme (Cuiv et al, 2004) (Figure 10). Les mécanismes de dissociation du complexe pyochéline-fer restent à élucider.



**Figure 10 : La voie pyochéline chez *P. aeruginosa* PAO1.** L'assemblage d'une molécule d'acide salicylique, de deux cystéines et d'un groupement méthyle permet la formation de la pyochéline. Elle est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire par un mécanisme encore inconnu. Dans le milieu extracellulaire, la Pch chélate le fer ferrique. Le complexe Pch-Fe formé est alors reconnu au niveau de la membrane externe et est transporté par un transporteur de membrane externe spécifique FptA. Le passage à travers la membrane interne serait effectué par une perméase. Dans le cytoplasme, les mécanismes de dissociation restent à élucider. Le complexe pyochéline-fer se lie à l'activateur de transcription PchR afin d'activer l'expression des gènes de la voie pyochéline.

### c) Régulation du système pyochéline

Comme pour la voie pyoverdine, la régulation négative de l'expression des gènes de la voie pyochéline est effectuée par la protéine Fur (Ochsner et al, 1995). L'activation de l'expression de *fptA* et des gènes impliqués dans la biosynthèse de la pyochéline est effectuée par PchR (Heinrichs & Poole, 1993 ; Heinrichs & Poole, 1996 ; Reimann et al, 1998). Cette protéine cytoplasmique est activée suite à une interaction avec le complexe pyochéline-fer après le transport de ce dernier à travers les membranes de la bactérie. Cette interaction va induire l'activation de la transcription des gènes de la voie pyochéline (Michel et al, 2005).

### D) Utilisation de sidérophores exogènes par *P. aeruginosa* PAO1

Bien que ne produisant que deux sidérophores, *P. aeruginosa* est capable d'utiliser de nombreux sidérophores exogènes produits par d'autres bactéries ou champignons (Poole & McKay, 2003). Parmi eux, sont retrouvés l'entérobactine produite par *Escherichia coli*, le desferrichrome produite par *Ustilago sphaerogena*, la desferrioxamine B produite par *Streptomyces pilosus*, la cépabactine de *Burkholderia cepacia* ou encore le citrate, une molécule issue de la voie métabolique du cycle de Krebs.

## 2.3. Les sidérophores et les autres métaux

Bien que les sidérophores soient définis comme des chélateurs spécifiques du fer, la formation de complexes stables entre ces molécules et des cations métalliques autres que le fer est connue pour quelques sidérophores (Hernlem et al, 1996). Récemment, au laboratoire, il a été montré que la pyochéline et la pyoverdine produites par *P. aeruginosa* étaient capables de chélater 16 métaux testés ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Tl}^+$  et  $\text{Zn}^{2+}$ ) mais avec une affinité inférieure à celle pour le fer (Braud et al, 2009a ; Braud et al, 2009b). En effet, les constantes d'affinité de la pyoverdine pour  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  sont comprises entre  $10^{17}$  et  $10^{22} \text{ M}^{-1}$  (Chen et al, 1994) tandis que celle pour le fer est de  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  (Albrecht-Gary et al, 1994). La complexation de certains métaux, autres que le fer, avec des sidérophores peut être plus importante que celle observée avec, par exemple, l'EDTA (exemple de la pyoverdine d'une souche de *P. fluorescens* et le curium III, (Moll et al, 2008). La sécrétion des sidérophores par les micro-organismes est ainsi un

paramètre important à prendre en compte dans les processus de migration des métaux toxiques dans l'environnement.

### III - Tolérance et résistance bactériennes aux métaux

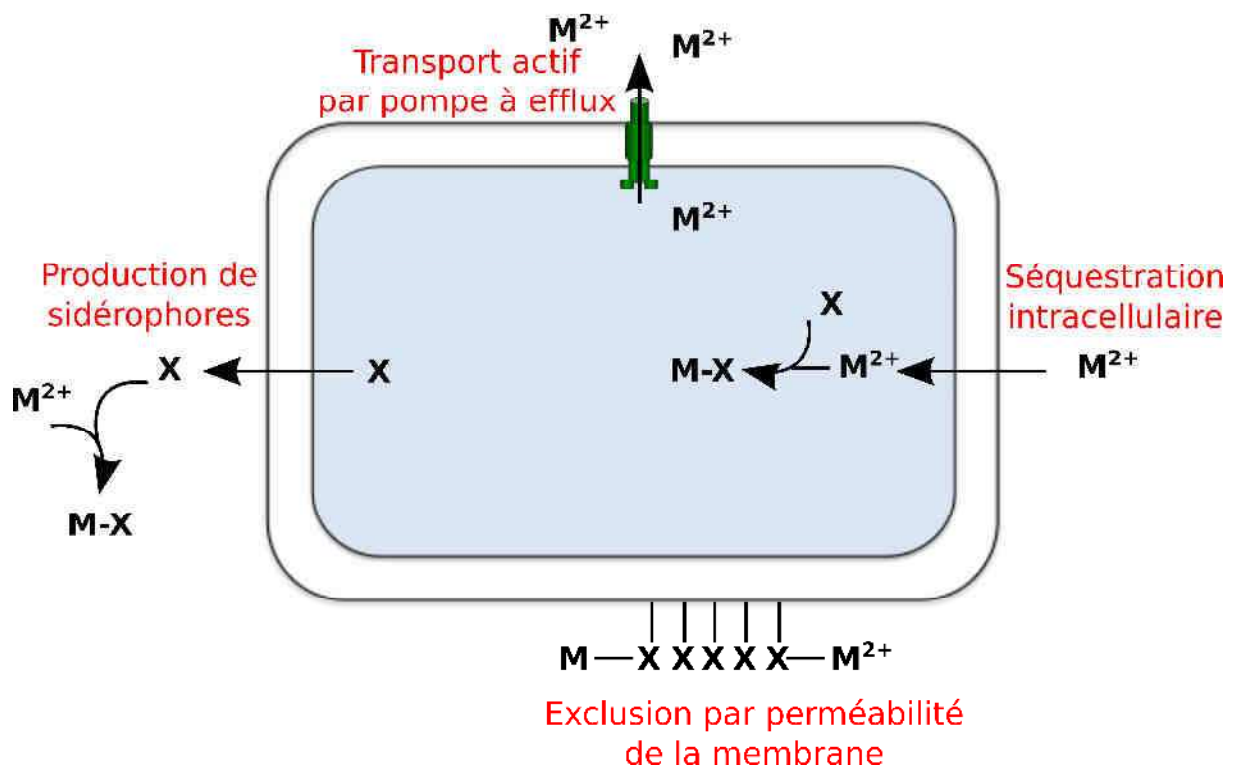
Comme il a été vu en début de chapitre, des métaux toxiques, plus solubles que le fer, pénètrent dans les bactéries (Nies, 1999). Pour éviter les différents dommages provoqués à la cellule, décrits précédemment, les concentrations intracellulaires en métaux doivent être finement régulées grâce à des systèmes de régulation de l'homéostasie ou de résistance des métaux.

#### 1. Généralités

Pour se protéger, les bactéries ont développé différentes stratégies de résistances face à des concentrations toxiques de métaux (Bruins et al, 2000) (Figure 11) :

- l'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 (Scott & Palmer, 1990). Scott *et al.* ont montré que *P. putida* peut ainsi lier 100 % du  $\text{Cd}^{2+}$  ajouté dans le milieu de culture, à une concentration de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  (Scott et al, 1990) ;
- l'efflux actif : il s'agit du mécanisme de résistance le plus utilisé par les micro-organismes. Ils utilisent les mécanismes de transport actif pour exporter les métaux toxiques depuis leur cytoplasme jusqu'au milieu extracellulaire (Bruins et al, 2000). Chez *P. aeruginosa*, l'ion  $\text{Cu}^{2+}$  est exporté par un mécanisme impliquant 4 protéines séquestrant le cuivre dans le périplasme (Cooksey, 1994) ;
- la séquestration intracellulaire : elle permet la séquestration des métaux au sein du cytoplasme afin d'éviter l'exposition des composants cellulaires essentiels aux métaux.  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$  sont les métaux les plus fréquemment séquestrés (Bruins et al, 2000; Haferburg & Kothe, 2007). Cette stratégie a été mise en évidence chez *P. putida* pour le  $\text{Cd}^{2+}$  par la synthèse de trois protéines de faible poids moléculaire, riches en cystéines (Trevors et al, 1986) ;

- 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 (Hannauer et al, 2012b). Une souche de *P. aeruginosa* produisant la pyoverdine et la pyochéline apparaît plus résistante aux métaux qu'une souche ne synthétisant pas de sidérophore (Braud et al, 2010).



**Figure 11 : Exemples de quelques mécanismes bactériens de résistances aux métaux** (adapté de Heferburg, 2007). X correspond aux constituants cellulaires interagissant avec les cations métalliques et M aux cations métalliques.



## 2. Deux exemples, le cadmium et le nickel

Comme il a été vu dans le premier chapitre, 12 % des sols français présentent une contamination au nickel et 7 % au cadmium. Ma thèse s'étant centrée sur ces deux métaux, nous décrirons la résistance des bactéries vis-à-vis de ceux-ci uniquement.

### 2.1. Cas du cadmium

Le cadmium est un métal non-essentiel pouvant être toxique, et ceci même à faibles concentrations. Dans la biosphère, les concentrations en cadmium sont de l'ordre de 0,01 à 1,8 ppm (Bruins et al, 2000). Ce métal entre dans la bactérie à travers des systèmes de transport d'ions divalents, tels que les transporteurs du  $Mn^{2+}$  et du  $Mg^{2+}$  (Nies, 1999). L'efflux du  $Cd^{2+}$  est effectué par des ATPases chez les bactéries à Gram positif et par une pompe à efflux ou un transporteur CDF (Cation Diffusion Facilitator) chez les bactéries à Gram négatif, telles que *Pseudomonas*.

### 2.2. Cas du nickel

Bien qu'essentiel à la vie, le nickel peut entraîner des dommages à fortes concentrations. Le nickel libre est retrouvé principalement sous la forme  $Ni^{2+}$ . Il peut être importé dans la bactérie par un transporteur MIT ou encore par un transporteur ABC. Dans des environnements riches en nickel, les micro-organismes ont su développer des mécanismes de résistance au nickel. L'efflux du nickel se fait par une pompe à efflux (Nies, 1999). Outre les transporteurs ATP-dépendant qui maintiennent les concentrations intracellulaires faibles, les mécanismes de sorption du cation aux charges négatives présentes au niveau des constituants des enveloppes membranaires (Jiang et al, 2004) ou la séquestration intracellulaire (Gonzalez & Jensen, 1998) sont aussi mis en place dans la résistance au nickel.

## *Chapitre 4*

Interactions entre  
les micro-organismes et les minéraux



Comme il a été vu dans le chapitre 2, par l'implication de divers mécanismes, les éléments traces métalliques peuvent être retenus dans les sols et les sédiments. L'adsorption est le principal mécanisme impliqué dans la rétention et l'accumulation des contaminants métalliques dans les sols (Alloway, 1995 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001 ; McBride, 1989). Les principaux constituants impliqués dans la rétention de ces polluants inorganiques, décrits dans le chapitre 2, sont majoritairement des colloïdes inorganiques, tels les argiles (Bradl, 2004), les oxydes et hydroxydes de fer (Apak, 2002) ainsi que les carbonates, les phosphates et les sulfates (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). La matière organique joue également un rôle clé dans le transport et l'accumulation des ions métalliques (Fein et al, 1999 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

La rétention des éléments traces métalliques par les minéraux secondaires ainsi que par la matière organique peut aboutir à leur accumulation, de façon non négligeable, dans des zones localisées du sol, appelées « barrières géochimiques » (Huang & Gong, 2005). Les processus géochimiques conduisant à la formation ou à la dissolution de ces barrières peuvent être améliorés par les activités microbiennes (Benner et al, 1999). En effet, concernant la dissolution, Hersman *et al.* suggèrent que les micro-organismes participeraient activement à celle des minéraux (Hersman et al, 1995b). Par exemple, durant la dissolution des oxydes de fer ou de manganèse par des micro-organismes anaérobies, les éléments traces métalliques absorbés sur ces minéraux peuvent être libérés (Charlatchka & Cambier, 2000 ; Francis & Dodge, 1990).

Si les effets des micro-organismes sur la disponibilité des contaminants métalliques dans les sols sont relativement bien documentés, la majorité de ces études repose majoritairement sur une approche géochimique et non biologique (Leyval et al, 1997). Il est à noter que les champignons, les lichens et les bactéries constituent les micro-organismes aux rôles prépondérants dans les phénomènes d'altération des minéraux (Warscheid & Braams, 2000).

## I - Champignons et lichens dans l'altération des minéraux

### 1. Les champignons

Ubiquitaires dans les sols, les champignons sont des organismes chimio-hétérotrophes<sup>5</sup>. De part leur forme filamenteuse et leur production fréquente d'exopolymères, ils possèdent un rôle important dans le maintien de la structure et de l'organisation des sols (Gadd, 2007).

Chez les champignons, deux mécanismes intervenant dans les processus d'altération des minéraux sont décrits dans la littérature (Gadd, 2007 ; Sterflinger, 2000). Ainsi, une altération chimique peut se produire par la production d'acides organiques et de sidérophores (Rosling et al, 2009).

Parmi les acides organiques, sont retrouvés, entre autre, les acides fumarique, citrique, oxalique et acétique (Sterflinger, 2000). En général, les acides oxalique, citrique et gluconique, excrétés par de nombreux ascomycètes, correspondent à de puissants agents de solubilisation des phyllosilicates, des feldspaths et de la biotite (Sterflinger, 2000). De même, les silicates ainsi que les silicates d'aluminium sont facilement altérés par les champignons, dont l'espèce la plus commune est *Aspergillus niger* (Sterflinger, 2000). Néanmoins, l'excrétion de ces acides est fortement influencée, positivement ou négativement, par la présence de métaux toxiques retenus dans les minéraux (Sayer & Gadd, 2001 ; Sayer et al, 1995).

Dans les processus d'altération chimique, les sidérophores sont également des agents de dissolution efficaces, notamment dans le cas des oxydes de fer (Kraemer, 2004). Actuellement, 100 à 150 structures différentes de sidérophores fongiques sont connues (Winkelmann, 2007). Les ferrichromes, les coprogènes, les fusarinines et les polycarboxylates en sont les principales familles (Winkelmann, 2007).

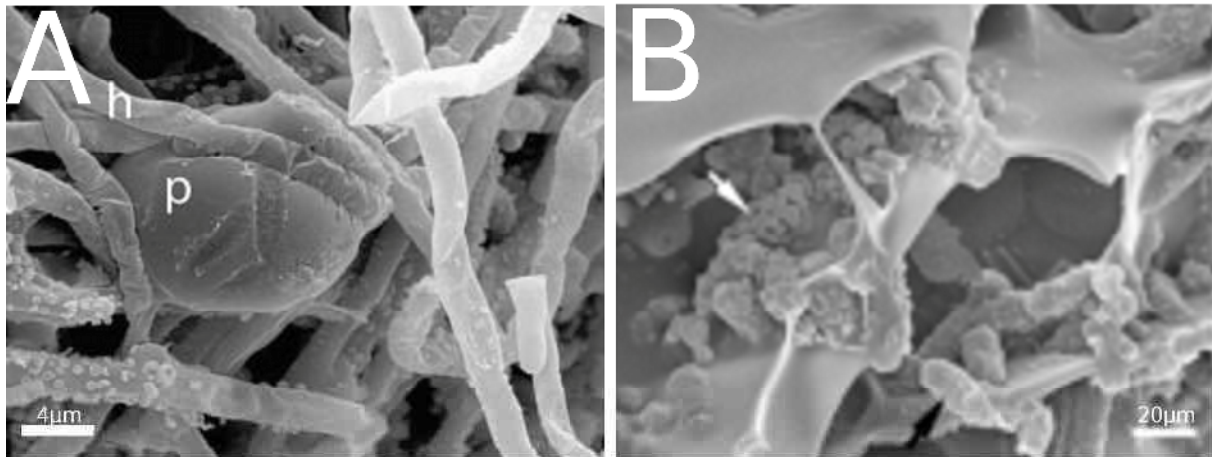
L'altération chimique est fréquemment liée à un second processus, l'altération mécanique (Gadd, 2007). Cette dernière peut être directe lors de la pénétration des hyphes<sup>6</sup> dans les minéraux (Gadd, 2007) (Figure 12A), notamment les minéraux calcaires. Elle peut également se faire indirectement, en étant associée à l'action de substances mucilagènes

---

<sup>5</sup> Organisme qui doit obtenir à la fois le carbone et l'énergie à partir des substances organiques

<sup>6</sup> Les hyphes constituent l'appareil végétatif des champignons. Ce sont des filaments plus ou moins ramifiés constitués de cellules pouvant contenir plusieurs noyaux et étant parfois cloisonnée. L'ensemble des hyphes forme le mycélium.

extracellulaires fongiques, favorisant la formation d'un biofilm et une fixation solide sur les surfaces des minéraux (Figure 12B). Le gonflement et le rétrécissement de ce biofilm fragilisent les minéraux, conduisant à leur altération (Gadd, 2010 ; Warscheid & Krumbein, 1994).



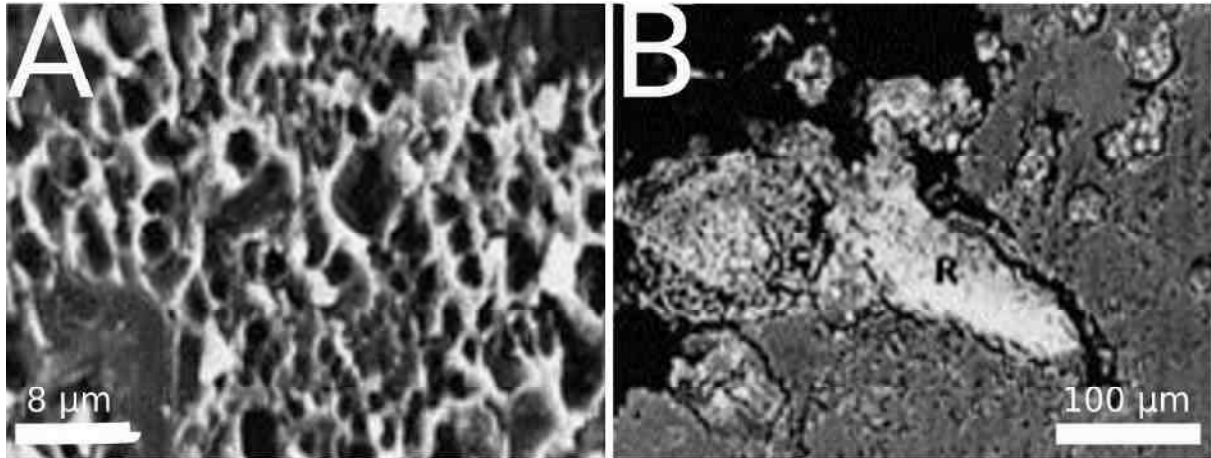
**Figure 12 : Observations en microscopie électronique à balayage des processus d'altération physique de minéraux en présence de champignons. A.** Altération de la surface d'un minéral (p) après colonisation par des hyphes fongiques d'*Heboloma velutipes* (h) (Rosling et al., 2009). **B.** Oxalate de cuivre (flèche blanche) au sein d'un biofilm fongique composé d'agrégats d'hyphes et d'une matrice d'exopolymères (Gadd, 2010).

## 2. Les lichens

Les lichens résultent de la symbiose entre un champignon, le mycobionte, et une algue ou une cyanobactérie, le photobionte. La majorité des mycobiontes sont des ascomycètes absents à l'état non lichénisé (Adamo & Violante, 2000). La structure hétérogène formée par ces deux organismes est appelée un thalle.

Comme chez les champignons, l'altération des minéraux par les lichens met en œuvre à la fois des processus chimiques et des processus mécaniques (Syers & Iskandar, 1973). L'excrétion par le mycobionte d'acides organiques tels que les acides oxalique, citrique, gluconique et lactique ainsi que la production de composés phénoliques appelés acides lichéniques sont impliqués dans les processus d'altération chimique (Figure 13A) (Adamo & Violante, 2000). L'exploration et l'adhésion des rhizines<sup>7</sup> et des rhizoïdes, ou plus généralement la pénétration de l'hyphes fongique dans les minéraux, sont les mécanismes les plus importants impliqués dans l'altération mécanique (Figure 13B) (Adamo & Violante, 2000).

<sup>7</sup> Eléments du thalle adhérant au substrat chez les lichens.



**Figure 13 : Observations d'altération chimique et physique de minéraux par des lichens** (Adamo et Violante, 2000). **A.** Observation en microscopie électronique à balayage de l'altération chimique de la surface d'un minéral de type leucite après colonisation par *Stereocaulon vesuvianum*. **B.** Observation en microscopie électronique à transmission de l'altération mécanique d'une roche calcaire après colonisation par *Squamarina cartilaginea* (R).

## II - Les bactéries

Si le rôle des champignons et des lichens dans l'altération des minéraux a été bien étudié, l'impact des bactéries dans ce processus et les mécanismes moléculaires impliqués restent peu compris (Uroz et al, 2009).

Par leur importante diversité phylogénétique et métabolique, leur capacité à s'adapter et à coloniser des environnements extrêmes, ainsi qu'à développer des biofilms, les bactéries apparaissent comme des organismes remarquables dans le règne du vivant (Gorbushina, 2007). La fixation des bactéries sur les surfaces minérales crée des micro-environnements les protégeant des stress environnementaux. Dans ces environnements, les bactéries vont extraire des nutriments inorganiques et de l'énergie directement de la matrice minérale et/ou des micro-organismes les entourant (Uroz et al, 2009). Les mécanismes d'altération connus comprennent notamment des réactions d'oxydo-réduction ainsi que la production de composés altérants tels que les acides organiques et les molécules chélatrices de type sidérophores (Uroz et al, 2009). Les biofilms bactériens auraient également un rôle dans la dissolution des roches et minéraux (Gorbushina, 2007).

## 1. Les réactions d'oxydo-réduction

Si les eucaryotes n'utilisent que l'oxygène lors des processus de respiration, certains taxons bactériens sont capables de se servir d'accepteurs d'électrons terminaux alternatifs pour leurs besoins énergétiques et métaboliques. La majorité de ces accepteurs, tels que les nitrates et les sulfates, est soluble. Cependant, d'autres, comme par exemple le fer contenu dans des minéraux tels les goethites et les hématites, sont insolubles et un contact direct avec la surface minérale est alors nécessaire (Newman, 2001). En théorie, la réduction ou l'oxydation d'un composé chimique piégé dans une structure minérale complexe résulterait de l'instabilité du minéral cristallisé et de sa dissolution (Uroz et al, 2009).

## 2. Libération d'acides organiques et autres ligands

Un second mécanisme majeur impliqué dans l'altération des minéraux repose sur la libération de molécules plus ou moins complexes (Dong, 2010). En effet, les minéraux sont connus pour être sensibles aux sous-produits biologiques résultant du métabolisme bactérien, comprenant les acides organiques ainsi que des molécules plus complexes (Tableau 5) (Figure 14A). Ainsi, par exemple, l'acide gluconique a la capacité d'induire la solubilisation des phosphates (Uroz et al, 2009). La dissolution minérale peut également être occasionnée par l'acide carbonique résultant du CO<sub>2</sub> produit lors de la respiration bactérienne ou par les acides nitrique et nitreux produits par les bactéries nitrifiantes (Barker et al, 1997).

Certains genres, retrouvés fréquemment dans les sols, dont *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* et *Burkholderia* constituent les producteurs majoritaires d'antibiotiques (Mazzola et al, 1992). Parmi ces molécules synthétisées par les bactéries, comme par exemple les phénazines, certaines possèdent une activité d'oxydo-réduction qui interviendrait dans des processus de dissolution de minéraux (Hernandez et al, 2004). En effet, la phénazine-1-carboxamide produite par *Pseudomonas chlororaphis* est impliquée dans la dissolution par réduction des oxydes de fer et de manganèse peu cristallisés, pour des pH entre 5 et 9. (Hernandez et al, 2004).

Ces différentes molécules ont une action triple sur l'altération (Uroz et al, 2009). Pour commencer, elles adhèrent à la surface des minéraux et extraient les nutriments des particules minérales par transferts d'électrons. De plus, elles cassent les liaisons oxygènes et complexent



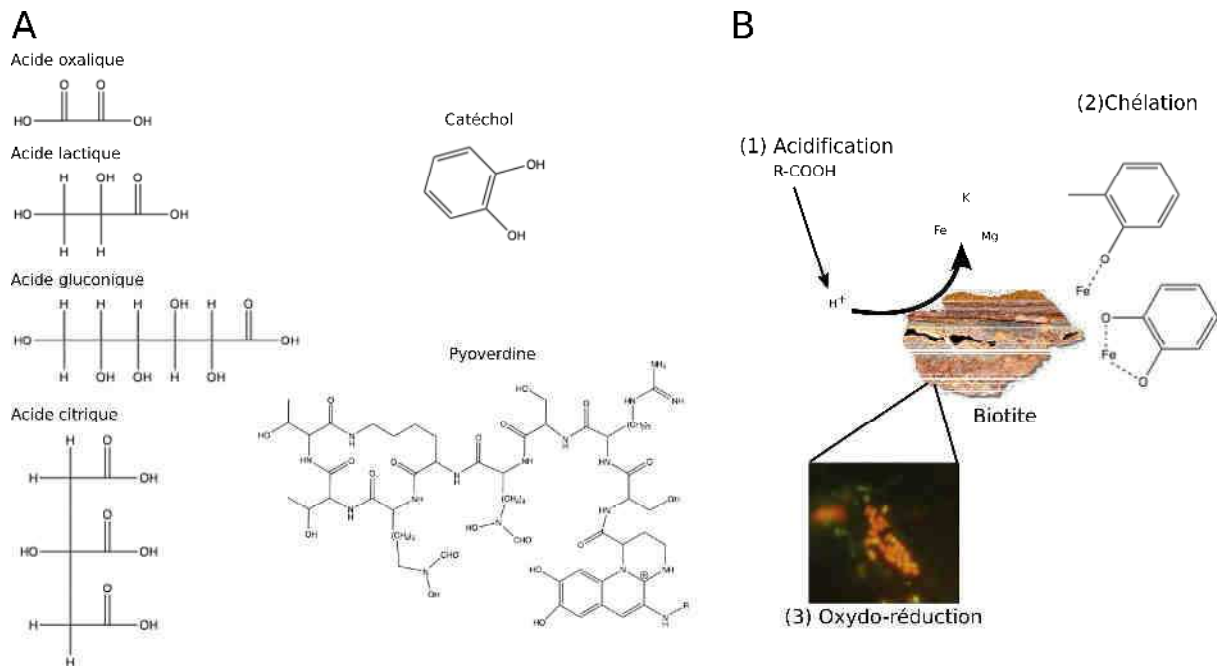
les ions présents en solution grâce à leurs groupements carboxyle et hydroxyle (Welch et al, 2002).

A ces molécules s'ajoutent les sidérophores (Tableau 5) (Kraemer, 2004). En effet, comme il a été vu dans le chapitre 3, le fer est un élément indispensable à la vie de presque tous les organismes. Cependant, bien qu'essentiel, cet élément est très peu disponible. Ainsi, par la présence des sidérophores, les bactéries accélèrent la libération du fer, notamment des silicates tels que l'hornblende (Kalinowski et al, 2000b) ou le feldspath (Mauck & Roberts, 2007). Récemment, le rôle des sidérophores dans la dissolution des minéraux a ainsi fait le sujet de nombreux articles, notamment dans la dissolution des hydroxydes de fer, des silicates d'aluminium riches en fer et des oxydes de manganèse (Duckworth et al, 2009b ; Maurice et al, 2009). Par exemple, des dérivés catéchols synthétisés par *Azotobacter* ou *Streptomyces* augmenteraient, respectivement, la dissolution de l'olivine ou de l'hornblende (Liermann et al, 2000 ; Page & Huyer, 1984). De même, *Pseudomonas mendocina*, par la sécrétion de sidérophores, est capable d'extraire le fer de la goethite, de l'hématite, de la ferrihydrite et de la kaolinite (Hersman et al, 2001 ; Hersman et al, 2000 ; Maurice et al, 2000 ; Maurice et al, 2001b).

**Tableau 5 : Exemples de quelques bactéries et de leurs mécanismes associés dans la capacité à solubiliser des minéraux** (d'après Uroz *et al.*, 2009).

Genre bactérien	Minéral solubilisé	Mécanismes impliqués	Références
<i>Arthrobacter</i>	hornblende	synthèse de sidérophores	Kalinowski et al, 2000a
<i>Azospirillum</i>	phosphate	production d'acide gluconique	Rodriguez et al, 2004
<i>Azotobacter</i>	pyrite, glauconite, olivine, limonite, hématite	production d'acide dihydroxybenzoïque et synthèse de sidérophores	Hameeda et al, 2006
<i>Geobacter</i>	oxyde de fer	réduction du fer ferrique	Childers et al, 2002
<i>Rhanelia</i>	hydroxyapatite	production d'acide gluconique	Kim et al, 1998
<i>Streptomyces</i>	hornblende	synthèse de sidérophore	Liermann et al, 2000

Comme il a été vu dans le chapitre précédent, les sidérophores peuvent former des complexes stables avec d'autres métaux que le fer, et qui sont présents dans les minéraux, dont le molybdène (Liermann et al, 2005), le cuivre (Kim et al, 2001), le cobalt (Duckworth et al, 2009a), le manganèse (Duckworth & Sposito, 2005) et l'aluminium (Desroches et al, 1999).

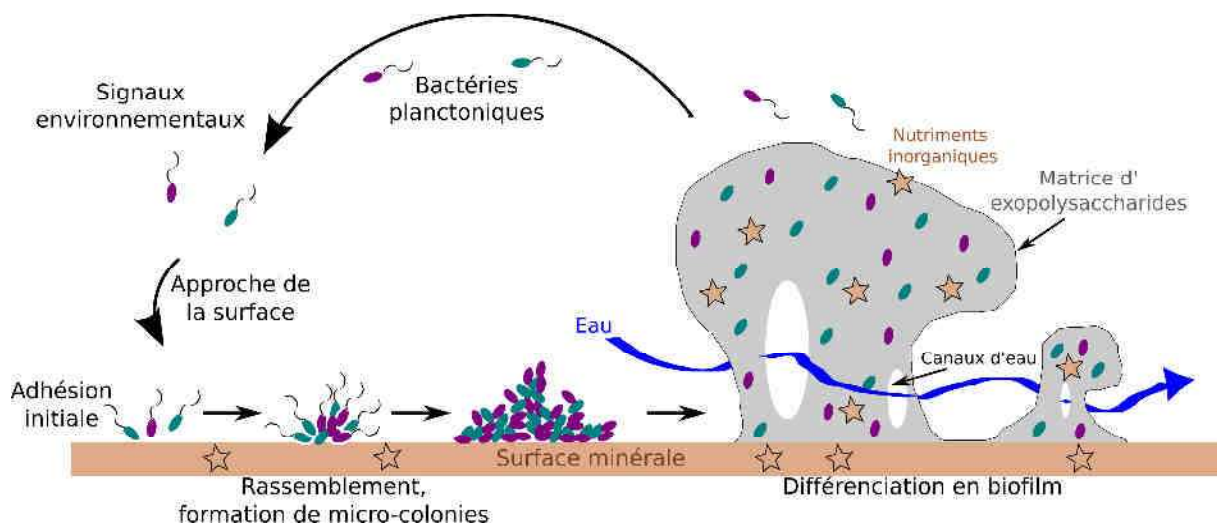


**Figure 14 : Métabolites microbiens et mécanismes impliqués dans la dissolution des minéraux. A.** Structure des molécules organiques bactériennes les plus fréquentes qui ont un rôle dans la solubilisation des minéraux. **B.** Mécanismes présumés faisant intervenir ces molécules sur la biotite. (1) Acidification, (2) chélation et (3) oxydo-réduction. (1) Les protons associés aux acides organiques diminuent le pH de la solution puis provoquent la libération de cations, tels que le fer, le potassium et le magnésium. (2) Les molécules chélatrices favorisent la dissolution des minéraux par un changement de spéciation des métaux (complexes solubles) et évitent la passivation des zones réactives. L'hydrolyse est ainsi améliorée et la précipitation réduite. (3) Les réactions d'oxydo-réduction peuvent se réaliser à la surface des minéraux mais également sur des distances plus importantes grâce à des navettes électroniques extracellulaires (Hernandez et Newman, 2001). L'image en épifluorescence montre des bactéries colonisant des particules de biotite (adapté d'Uroz *et al.*, 2009).

### 3. Les biofilms bactériens

Si des micro-organismes sont retrouvés à l'état libre et isolé dans l'environnement, dit état planctonique, la majorité des micro-organismes favorise un mode de vie fixé sur un support, appelé état sessile (Filloux & Vallet, 2003). L'attachement à une surface va permettre aux bactéries de se multiplier en résistant aux stress environnementaux, et ainsi de coloniser le milieu. En effet, après fixation sur un support, les bactéries vont mettre en place et développer une communauté organisée appelée « biofilm » (Figure 15) (Hall-Stoodley et al, 2004). Le

biofilm se définit comme une population bactérienne fixée sur un support et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharides hydratés (Flemming & Wingender, 2010). Dans la majorité des biofilms, les bactéries représentent moins de 10 % de la masse sèche du biofilm alors que la matrice constitue plus de 90 % (Flemming & Wingender, 2010). Chez *Pseudomonas aeruginosa*, cette dernière est composée d'un mélange de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques (Filloux & Vallet, 2003). Au sein de ces structures, des gradients physico-chimiques se créent (pH, teneurs en oxygène, etc.) (Flemming & Wingender, 2010). Cependant, l'architecture du biofilm est influencée par divers facteurs comme les conditions hydrodynamiques, les concentrations en nutriments, la mobilité des bactéries, la communication intracellulaire ainsi que les teneurs en exopolysaccharides et en protéines (Flemming & Wingender, 2010).



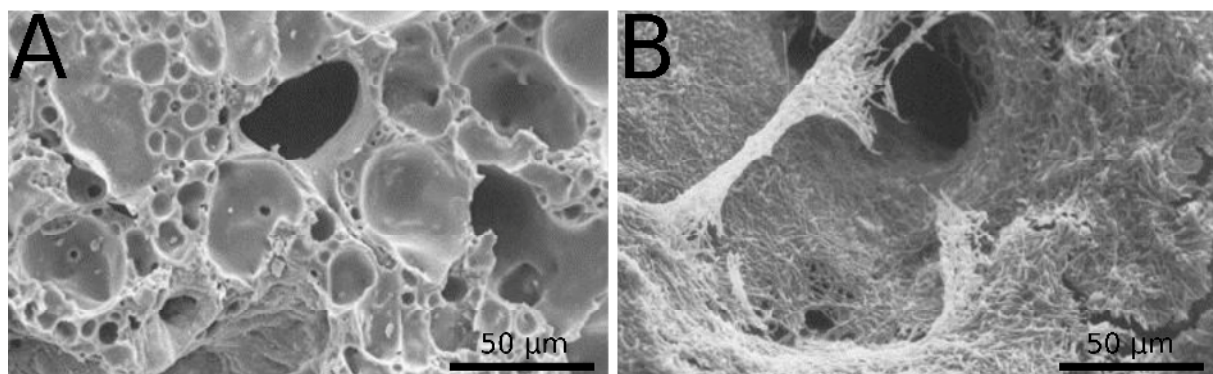
**Figure 15 : Modèle de formation d'un biofilm bactérien sur une surface minérale.** Les bactéries planctoniques vont s'attacher sur une surface en réponse à un certain nombre de stimuli environnementaux et nutritionnels (présence de nutriments inorganiques, par exemple). Il y a colonisation de la surface et rassemblement en micro-colonies, suivie de la structuration de ces colonies en biofilm ainsi que la production d'exopolysaccharides qui englobent les bactéries et les éléments environnementaux (matières minérales). Le biofilm est structuré et traversé par des canaux d'eau (adapté de Filloux et Vallet, 2003).

Dans l'environnement, les roches et minéraux constituent des surfaces appropriées au développement de biofilms (Gorbushina, 2007 ; Uroz et al, 2009). Sur les surfaces minérales, les micro-organismes se développent généralement en biofilm composé d'un consortium de bactéries (Figures 15 et 16) (Gorbushina, 2007).

Bien que l'altération consiste en un processus complexe multifactoriel, ces biofilms et leur matrice d'exopolysaccharides peuvent modifier lentement les substrats, en faisant varier

le pH au sein de ces micro-environnements ou la cohésion des minéraux (Warscheid & Krumbein, 1994). Les composants spécifiques présents dans le mucilage extracellulaire, tels que les protéines et les polysaccharides acides, ont également une influence chimique dans l'altération des minéraux (Barker et al, 1997 ; Welch & Ullman, 1993). De plus, l'augmentation locale au sein du biofilm de la concentration en  $\text{CO}_2$ , due à la respiration bactérienne, provoque la formation d' $\text{H}_2\text{CO}_3$  qui diminue le pH (Gorbushina, 2007). Par exemple, la présence d' $\text{H}_2\text{CO}_3$  au sein du biofilm peut provoquer la dissolution des carbonates, des phosphates et des silicates (Gorbushina, 2007). Néanmoins, contrairement à la majorité des études, des auteurs ont montré que la présence d'un biofilm produit par *P. aeruginosa* autour de silicates diminuerait leur vitesse d'altération (Aouad, 2006). En effet, certaines molécules peuvent inhiber la dissolution des minéraux en bloquant les sites de surface qui permettent la libération des cations (Aouad, 2006 ; Lee & Fein, 2000). De nombreux composés organiques peuvent s'adsorber irréversiblement sur la surface des minéraux, conduisant à des précipités de surface formant une couche minérale d'altération (Davis, 1984 ; Kirchman et al, 1989). L'adsorption ou la précipitation peuvent ainsi limiter les échanges entre la surface minérale et le milieu environnant, réduisant alors le taux d'altération. Par exemple, des polymères tels que l'amidon ou la cellulose n'ont pas d'impact sur la dissolution de feldspath ou de quartz, tandis que les alginates (acide mannuronique et glucuronique) inhibent leur dissolution. En effet, les alginates possèdent des groupements acides qui jouent un rôle dans la capacité d'adhésion des polymères à la surface de minéraux (Pokrovsky et al, 2009).

Le rôle du biofilm dans l'altération des minéraux reste néanmoins à définir avec plus de précisions.



**Figure 16 : Formation d'un biofilm bactérien sur des grains d'argile en présence de *Pseudomonas oryzae*** (observation en microscopie électronique à balayage). **A.** Grains d'argile stériles. **B.** Biofilm formé sur les grains d'argile après 2 jours d'incubation en présence de *P. oryzae* (Dussart et al, 2003).



# *Chapitre 5*

Techniques de  
dépollution des sols



Bien que les métaux soient naturellement présents dans la croûte terrestre, la forte industrialisation, l'agriculture intensive ou l'exploitation des gisements miniers, favorisent la dissémination des contaminants inorganiques dans les écosystèmes (Pilon-Smits & Pilon, 2002). Ne pouvant être dégradés, ces derniers ont alors de graves conséquences sur l'environnement ainsi que sur la santé humaine. Ainsi, la remédiation des sols contaminés par des polluants inorganiques a été considérablement étudiée au cours des deux dernières décennies. Si les techniques de remédiation conventionnelles impliquent des traitements physiques ex-situ, l'émergence des techniques de remédiation et de phytoremédiation permet des traitements in-situ, efficaces et peu onéreux (Salt et al, 1995).

## **I - Méthodes physico-chimiques**

Jusqu'à présent, la majorité des sites contaminés par des métaux était traitée par plusieurs approches physico-chimiques telles que l'excavation et le stockage, la fixation ou encore le lessivage du sol (Salt et al, 1995a). Ces différentes méthodes altèrent significativement la qualité agronomique des sols contrairement aux méthodes biologiques (Alkorta & Garbisu, 2001 ; Lear et al, 2007). Bien que les coûts de dépollution varient selon les traitements réalisés (in-situ, excavation et transport...), les méthodes physico-chimiques restent onéreuses. En effet, Salt *et al.* (Salt et al, 1995a) ont estimé à plus de 400 000 \$ le coût pour une dépollution sur 50 cm de profondeur d'un demi-hectare par excavation et stockage, tandis que 60 000 à 100 000 \$ seraient suffisants pour la phytoextraction.

## **II - Méthodes biologiques**

Les méthodes biologiques sont des techniques qui exploitent les propriétés d'un organisme vivant dans le but de dépolluer un environnement donné. Ce sont des techniques de décontamination (extraction ou dégradation du contaminant) ou d'assainissement (réduction des risques).

L'organisme vivant utilisé peut être un micro-organisme (bactéries, champignons), un végétal (algues, plantes, arbustes, arbres), un végétal complexe (association symbiotique d'un champignon et d'une algue), voire un animal (lombric, par exemple). Cet organisme agit sur le composé polluant par différents mécanismes tels que l'absorption, l'accumulation, la digestion, la transformation, la dégradation, l'évapotranspiration. A terme, ces traitements



doivent permettre de rendre le contaminant moins toxique, de l'extraire, de l'immobiliser ou encore de le diluer considérablement.

Selon la nature de la pollution à traiter, les diverses techniques biologiques de dépollution des sols peuvent être mises en œuvre seules ou combinées à d'autres procédés physiques, chimiques, thermiques ou biologiques.

Bien que l'avantage principal des techniques biologiques réside dans leur mise en place sur le site même (*in situ*), certaines nécessitent l'excavation des terres et sont réalisées *sur site* (excavation des terres qui sont traitées sur le site même) ou *hors site* (excavation et transport des terres vers un centre de dépollution) (Pilon-Smits, 2005).

L'identification des techniques biologiques existantes ou émergentes et l'analyse des procédés impliqués mettent en évidence deux catégories principales : les techniques de bioremédiation qui utilisent essentiellement des bactéries et les techniques de phytoremédiation qui exploitent les propriétés des végétaux (plantes, arbustes, arbres).

## **1. La bioremédiation**

Les techniques de bioremédiation utilisent les propriétés dépolluantes de micro-organismes (essentiellement des bactéries, mais aussi des champignons) endogènes ou exogènes au site contaminé (Boopathy, 2000 ; Vidali, 2001). La biodégradation d'un composé est souvent le résultat de l'action de multiples organismes (Vidali, 2001). Majoritairement, la bioremédiation peut être appliquée *in-situ*. Ces techniques, relativement peu coûteuses, sont appréciées du grand public (McGrath et al, 2002). Elles peuvent être subdivisées en plusieurs catégories selon le principe biologique ou mode de dépollution mis en œuvre.

### **1.1. Illustration de quelques stratégies**

#### **1.1.1. L'atténuation naturelle**

Il s'agit de la forme la plus simple de la bioremédiation puisqu'elle consiste uniquement en un suivi analytique de l'abattement de la pollution. Cette technique part du principe que la microflore indigène d'un site pollué a su s'adapter à la pollution considérée et peut utiliser les polluants comme nutriments. La microflore bactérienne native, capable d'utiliser ces polluants, prolifère alors et peut devenir dominante (Mulligan & Yong, 2004). Cette méthode

est néanmoins appliquée à un nombre réduit de sites en raison de la durée de dépollution qui peut parfois atteindre plusieurs dizaines d'années et de la surveillance permanente qui s'impose (Heitzer & Sayler, 1993). Elle peut cependant être utilisée en pré- ou post-traitement d'un site contaminé (Mulligan & Yong, 2004).

#### 1.1.2. La biodégradation

Cette méthode est basée sur la capacité de certains micro-organismes à transformer le polluant en substrat (source de carbone, d'énergie) (Smith, 1990 ; Vidali, 2001). En effet, cette propriété est mise en évidence dès 1946 par Zobell (Zobell, 1946), qui observe l'utilisation d'hydrocarbures par des micro-organismes. Les polluants sont généralement des hydrocarbures pétroliers ou des solvants industriels (Liss et al, 1997 ; Smith, 1990).

#### 1.1.3. La bio-immobilisation

Elle utilise la capacité de certains micro-organismes à immobiliser un ou plusieurs composants, présents à l'état soluble. Cette technique serait peut-être un des moyens les plus faciles à mettre en œuvre pour protéger la santé publique d'une éventuelle pollution des nappes phréatiques (Barkay & Schaefer, 2001). La recherche en bio-immobilisation, à l'interface de la microbiologie, la géochimie, la géologie et la biologie moléculaire, bénéficie des avancées dans la caractérisation des communautés microbiennes dans leurs habitats (Bond et al, 2000). Dans le cadre de contamination par des métaux ou des produits pétroliers, les bactéries sont les micro-organismes les plus couramment utilisés.

#### 1.1.4. La biolixiviation

La biolixiviation consiste en la solubilisation et l'entraînement dans la phase aqueuse par les micro-organismes de polluants inorganiques (principalement des métaux) fixés ou piégés dans le sol ou dans certains minerais (lixiviation de minerais sulfurés). Les micro-organismes utilisés sont très majoritairement des bactéries chimiolithotrophes (Bosecker, 1997). Cette méthode a connu un développement rapide au cours des années 1990 (Rohwerder et al, 2003).

### 1.1.5. La bioslurry

Il s'agit d'un traitement en bioréacteur, et donc hors site, permettant la création d'une boue épaisse composée de la partie fine du sol dans l'eau à laquelle des nutriments sont ajoutés afin de stimuler la croissance de la population microbienne. Un système d'aération est employé pour les procédés aérobies. En fin de traitement, les phases solides et liquides sont séparées et le sol est remis en place (Zappi et al, 1996). Ces traitements sont appliqués pour les hydrocarbures, les phénols, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le pétrole, les polychlorobiphényles (PCB), les composés organiques halogénés volatils ou semi-volatils. Les résultats sont cependant étroitement liés à l'accessibilité du polluant et à sa sensibilité à la dégradation biologique, avec un taux de dégradation variable selon le type de sol et la nature du polluant.

### 1.1.6. La biorestauration

Cette méthode consiste en l'ajout de nutriments (azote/phosphore) pour stimuler la croissance des micro-organismes indigènes et favoriser la dégradation des polluants organiques (hydrocarbures pétroliers, HAP) ou inorganiques (Hutchins et al, 1991).

### 1.1.7. La bioaugmentation

Caractérisée par l'ajout de micro-organismes d'intérêt dans le sol, elle a pour but de stimuler la dégradation des polluants organiques et d'agir sur la spéciation des polluants inorganiques. Les micro-organismes employés peuvent être issus de sélections réalisées à partir d'échantillons environnementaux (sols, sédiments, boues...) (Vogel, 1996). Ils sont ensuite cultivés en masse et inoculés dans leur environnement d'origine ou dans un autre environnement. Des micro-organismes génétiquement modifiés peuvent être utilisés à ce titre mais leur introduction dans l'environnement doit faire l'objet de contrôles poussés (Sayler & Ripp, 2000).

### 1.1.8. La biostimulation

Cette dernière a pour objectif d'accroître l'activité de la microflore indigène notamment en terme de croissance et de dégradation, par apport de nutriments (carbonés comme source

d'énergie, minéraux) et/ou d'accepteurs finaux d'électrons (oxygène, nitrate, sulfate) afin de pallier la pauvreté en nutriments disponibles pour les micro-organismes. Pour cela, la croissance de la population prélevée sur le site contaminé est stimulée en laboratoire ou en bioréacteurs installés sur le site. Les micro-organismes sont par la suite réensemencés. La gestion « à l'aveugle » de la microflore caractérise cette technique puisque les micro-organismes bénéficiant de la stimulation ne sont pas forcément impliqués dans le traitement du ou des contaminants (Cunningham & Philip, 2000).

## 1.2. Quelques inconvénients

Bien que peu coûteuses, les techniques de bioremédiation nécessitent des temps d'action relativement longs, pouvant atteindre plusieurs dizaines d'années. Pour que la bioremédiation soit efficace, les micro-organismes doivent attaquer de façon enzymatique les polluants, les convertissant en polluants moins dangereux. Cependant, elle ne peut être efficace que dans des conditions environnementales particulières, permettant la croissance et l'activité microbiennes. Son application implique souvent la manipulation des paramètres environnementaux.

De plus, jusqu'à présent, peu d'études se sont intéressées à l'écologie des sols inoculés lors de processus de bioremédiation (Troxler et al, 2012). Bien que la population inoculée décline ensuite graduellement, Troxler *et al.* (Troxler et al, 2012) ont montré que certaines souches inoculées pouvaient persister ensuite dans l'environnement. Enfin, quelques contaminants, tels que les solvants chlorés ou certains hydrocarbures aromatiques persistent, insensibles aux attaques microbiennes (Vidali, 2001).

Le taux de dépollution devient alors un paramètre difficilement prévisible.

**Tableau 6 : Comparaison des différentes méthodes de bioremédiation de sites contaminés**

	<b>Mécanismes</b>	<b>Contaminants</b>	<b>Lieu</b>	<b>Micro-organismes</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>	<b>Références</b>
<b>Atténuation naturelle</b>	processus naturels (dilution, volatilisation, adsorption, dégradation)	organiques (hydrocarbures benzéniques, chlorés, ...)	<i>in-situ</i>	flore indigène	destruction complète possible aucun déchet en pré- ou post-traitement	surveillance sur du long terme peu efficace pour des concentrations élevées	Mulligan & Yang, 2004
<b>Biodégradation</b>	transformation du polluant en substrat	organiques (hydrocarbures pétroliers, solvants, ...) et inorganiques	<i>in-situ</i>	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., ...	dégradation complète aucun déchet	processus lent	Smith, 1990
<b>Bio-immobilisation</b>	adsorption	organiques (PCB, HAP, ...) et inorganiques	<i>in-situ</i>	bactéries (biofilm) champignons	pas de traitement des déchets facile à mettre en œuvre	processus lent surveillance fréquente	Barkay & Schaefer, 2001 ; Hutchinson et al., 2003; Olson et al., 2003
<b>Biolixiviation</b>	solubilisation	inorganiques (Cu, U, Cr, Pb, ...)	<i>in-situ</i>	bactéries chimiolithotropes ( <i>A. ferrooxidans</i> , <i>A. thiooxidans</i> )	peu onéreux processus naturel	processus lent peu efficace pour des concentrations élevées	Bosecker, 1997
<b>Bioslurry</b>	dégradation	organiques (HAP, hydrocarbures, phénols, ...) et inorganiques	hors site	micro-organismes indigènes, préadaptés ou mélange de souches	métabolisation rapide facilité du contrôle et du maintien en conditions favorables	teneurs résiduelles plus ou moins élevées coût élevé	Zappi <i>et al.</i> , 1996
<b>Biorestauration</b>	dégradation	organiques (hydrocarbures, HAP, ...) et inorganiques	<i>in-situ</i> hors site	flore indigène	peu onéreuse	succès souvent limité par les concentrations en O <sub>2</sub>	Hutchins <i>et al.</i> , 1991
<b>Bioaugmentation</b>	dégradation	organiques lourds, HAP, PCB	<i>in-situ</i> hors site	micro-organismes d'intérêt sélectionnés	peu onéreuse associée à la phytoextraction	taux de réussite variables	Vogel <i>et al.</i> , 1996
<b>Biostimulation</b>	dégradation	organiques (hydrocarbures pétroliers, HAP, ...)	<i>in-situ</i> hors site	flore indigène, stimulée en laboratoires ou réacteurs	peu onéreuse relativement efficace	gestion à l'aveugle	Cunningham & Philip, 2000

## 2. La phytoremédiation

Si pendant longtemps la capacité des végétaux à accumuler des métaux a été considérée comme une caractéristique préjudiciable, les techniques de dépollution par les plantes ont créé un revirement de situation. En effet, la phytoremédiation exploite les propriétés de certaines espèces végétales (strates herbacées, plantes, arbustes, arbres, algues) à interagir avec des composés chimiques, organiques ou inorganiques, pour dépolluer *in situ* un terrain contaminé. Ainsi, les plantes absorbent, accumulent et détoxifient les contaminants du sol à travers des processus physiques, chimiques et biologiques (Prasad et al, 2010). Ces plantes présentent des mécanismes constitutifs et adaptatifs pour accumuler et tolérer des concentrations élevées en contaminants au niveau de leur rhizosphère (Yang et al, 2005). Le plus souvent, ce sont les micro-organismes de cette dernière qui dégradent les composés organiques. Néanmoins, il arrive que les produits issus de la dégradation, pouvant ou non être accumulés par le végétal, soient plus dangereux que le polluant d'origine.

A terme, la biomasse produite, contenant le polluant (tiges, feuilles), doit être traitée d'une façon adéquate consistant souvent à récolter les végétaux pour les incinérer (se référer paragraphe 2.5). Les différentes études réalisées à ce jour permettent d'envisager six types de stratégies de phytoremédiation particulièrement prometteuses.

### 2.1. Les stratégies

#### 2.1.1. La phytoextraction

La découverte d'espèces végétales sauvages, souvent endémiques à des sols naturellement riches en métaux, capables de concentrer de grandes quantités d'éléments métalliques, essentiels ou non, a inspiré le développement de la phytextraction (Baker & Brooks, 1989 ; Brooks et al, 1979). En effet, il s'agit d'une technique basée sur le prélèvement des polluants métalliques par des végétaux dotés non seulement d'une capacité de résistance aux métaux, mais aussi d'une croissance rapide, d'un système racinaire développé, d'une aptitude à produire beaucoup de biomasse et d'une capacité à transloquer les éléments vers les parties récoltables (Figure 17) (Chaney et al, 1997 ; McGrath et al, 2002 ; Salt et al, 1995a). L'utilisation de plantes possédant une capacité naturelle et exceptionnelle à accumuler les métaux, plantes dites hyperaccumulatrices, en tant qu'outil de remédiation a été

suggérée dans les années 80 (Baker et al, 1988). Néanmoins, leur faible biomasse et le manque de connaissance pour leur culture à grande échelle a limité le développement de la phytoextraction pendant plusieurs années (Raskin et al, 1997). La phytoextraction se révèle efficace pour une grande variété de contaminants inorganiques (Pb, Cd, Ni, Zn...). Les processus d'extraction dépendent néanmoins de la capacité de la plante sélectionnée à se développer et à accumuler les contaminants.

### 2.1.2. La phytodégradation

La dégradation de composés organiques peut avoir lieu au sein de la plante (Cunningham & Ow, 1996 ; Newman & Reynolds, 2004). En effet, certains végétaux produisent des enzymes, telles que les déhalogénases, les oxygénases et réductases (Black, 1995) qui catalysent la dégradation des substances absorbées en substances moins toxiques ou non toxiques pour la plante. Ces molécules pourront alors être incorporées au sein des tissus de la plante et pourront ensuite être libérées par évapotranspiration (Figure 17). Les contaminants impliqués sont des composés organiques, tels que les solvants chlorés (trichloéthylène) et autres pesticides.

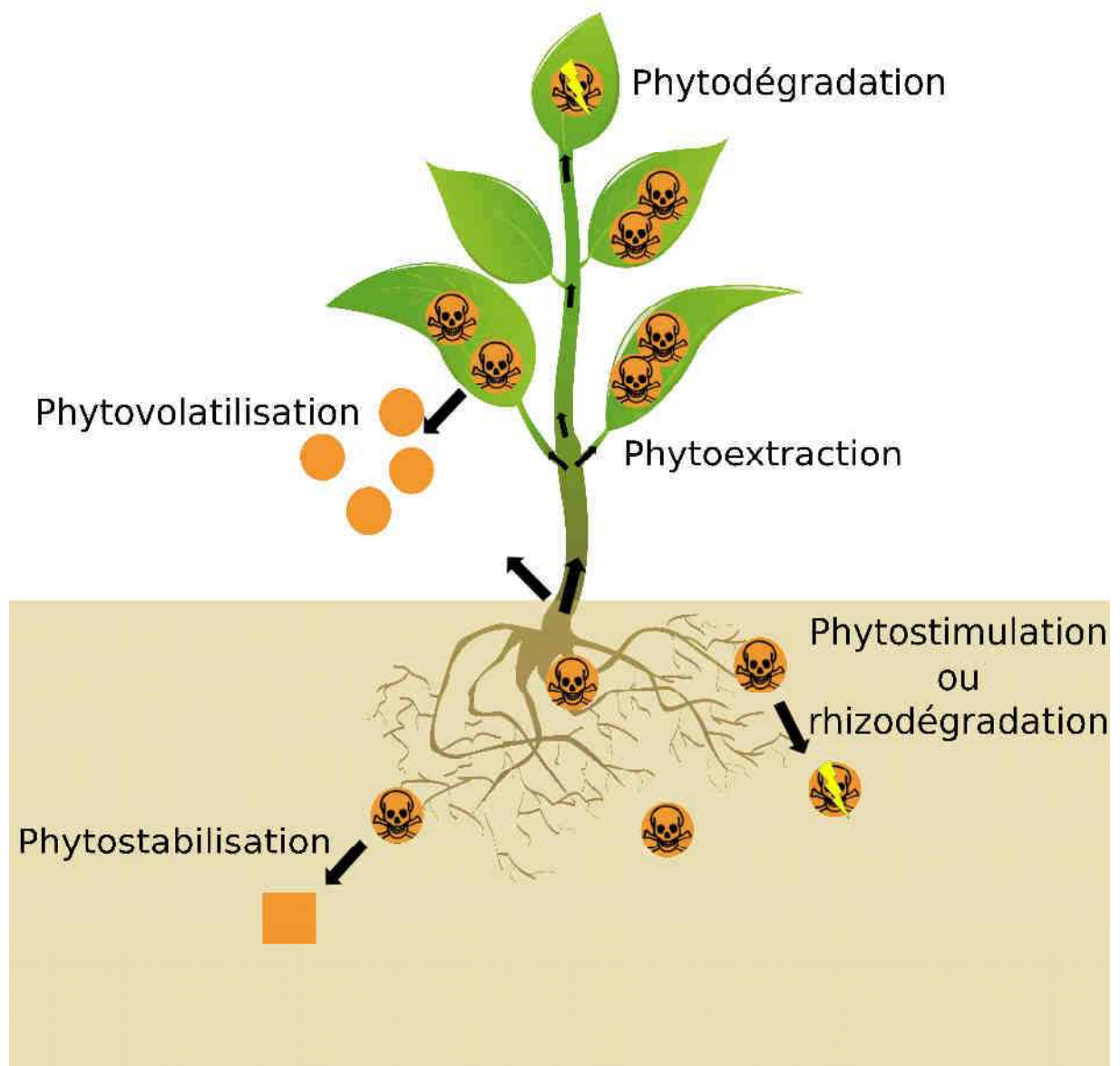
### 2.1.3. La phytostimulation

Egalement appelée rhizo-biodégradation (Anderson et al, 1993), elle exploite l'effet stimulant de la rhizosphère sur la dégradation microbienne des polluants (Figure 17) (McCutcheon & Schnoor, 2004 ; Nwoko et al, 2007). Cette démarche est notamment utilisée pour les composés organiques (PCB, HAP...) qui ne peuvent être prélevés par les plantes mais seront dégradés par les micro-organismes de la rhizosphère (Hutchinson et al, 2003 ; Olson et al, 2003).

### 2.1.4. La phytostabilisation

La phytostabilisation n'est pas une méthode de dépollution au sens strict mais elle permet néanmoins de diminuer la mobilité des contaminants en séquestrant les métaux au niveau de la rhizosphère des plantes (Figure 17) (Panfili et al, 2005 ; Vervaeke et al, 2003) ce qui limite l'érosion et le lessivage des polluants (Santibanez et al, 2008) et évite ainsi la

contamination des nappes phréatiques. Cette méthode nécessite l'ajout d'amendement pour établir une végétation se développant sur des sites hautement contaminés et phytotoxiques (Cunningham et al, 1995 ; Berti & Cunningham, 2000). Les végétaux choisis doivent développer un large système racinaire et une forte biomasse en présence de concentrations élevées de contaminants inorganiques. De plus, la translocation des métaux depuis les racines jusqu'aux parties aériennes doit être aussi faible que possible (Rizzi et al, 2004 ; Salt et al, 1995a) et ceci afin de limiter la propagation des métaux dans la chaîne alimentaire (Ribet et al, 1995).



**Figure 17 : Différentes techniques de phytoremédiation.** Les polluants (représentés par la tête de mort) peuvent être stabilisés ou dégradés dans la rhizosphère, séquestrés ou dégradés dans les tissus de la plante ou volatilisés (d'après Pilon-Smits, 2005).



Tableau 7 : Comparaison des différentes méthodes de phytoremédiation de sites contaminés.

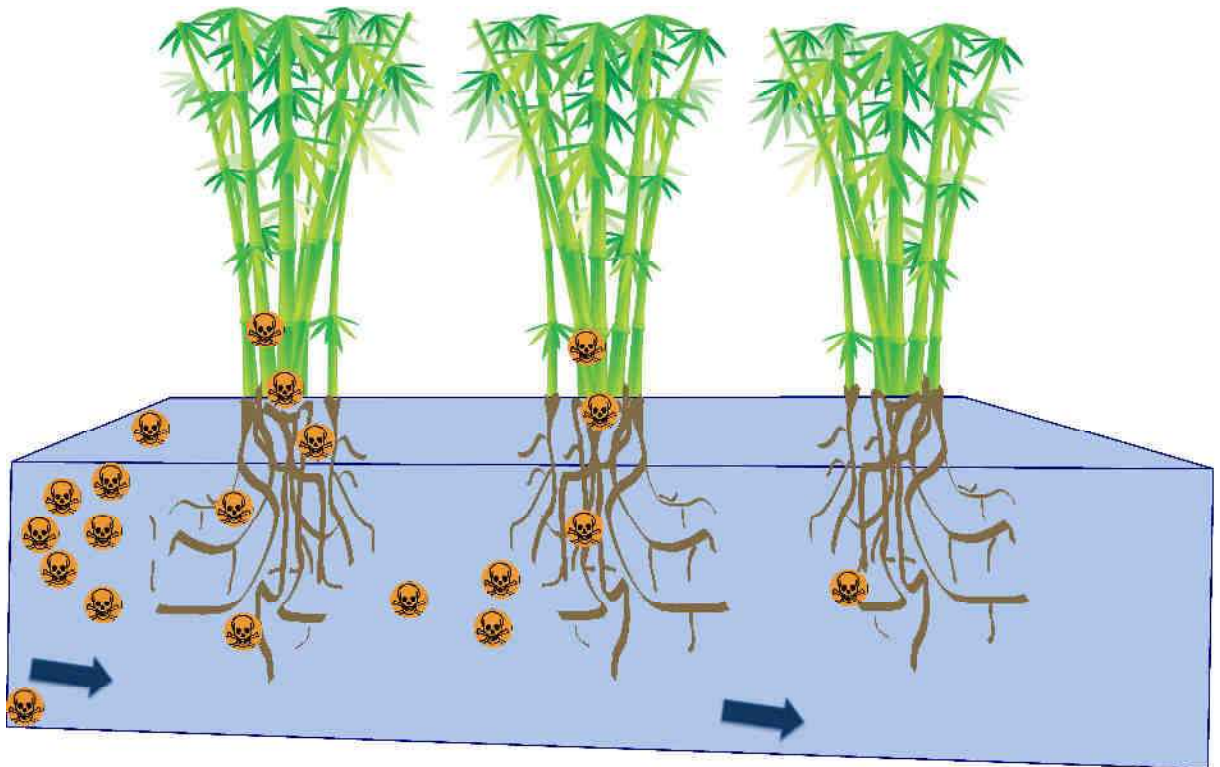
	Mécanismes	Contaminants	Substrats traités	Plantes utilisées	Avantages	Inconvénients	Références
<b>Phytoextraction</b>	accumulation / hyperaccumulation	inorganiques (Pb, Cd, Ni, Zn, ...)	sols sédiments boues	forte biomasse et développement rapide ( <i>Helianthus annuus</i> , <i>Alyssum</i> sp.)  hyperaccumulatrice ( <i>Thlaspi</i> sp., <i>Brassica juncea</i> )	In-situ  adaptée aux pollutions diffuses	système racinaire dépendante  traitement des déchets	Salt <i>et al.</i> , 1995  Raskin <i>et al.</i> , 1997
<b>Phytodégradation</b>	dégradation enzymatique végétale	organiques (solvants chlorés, TNT, MTBE, TCE, ...)	sols sédiments nappes phréatiques	à activité enzymatique et à évapotranspiration importante ( <i>Populus</i> , <i>Salix</i> )	pas de traitement des déchets	activité enzymatique dépendante  processus relativement lent	Newman & Reynolds, 2004
<b>Phytostimulation</b>	dégradation rhizosphérique	organiques hydrophobiques (PCB, PAH, ...) hydrocarbures	sols sédiments boues	à activité microbienne au niveau de la rhizosphère  système racinaire dense et relativement profond ( <i>Festuca</i> sp, <i>Lolium</i> sp.)	pas de traitement des déchets	action des racines et microflore associée dépendante  limitée à des polluants facilement biodégradables	Hutchinson <i>et al.</i> , 2003  Olson <i>et al.</i> , 2003
<b>Phytostabilisation</b>	complexation / adsorption / précipitation	inorganiques	sols sédiments boues	à large système racinaire ( <i>Lolium italicum</i> )  arbres à évapotranspiration importante ( <i>Populus</i> )	limite l'érosion et le lessivage du sol  immobilisation rapide	système racinaire dépendante  surveillance fréquente car maintien des polluants dans le sols	Rizzi <i>et al.</i> , 2004  Salt <i>et al.</i> , 1995
<b>Rhizofiltration</b>	accumulation dans la rhizosphère / adsorption / précipitation	inorganiques (Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn...) organiques	solutions aqueuses	graminées ( <i>Festuca</i> sp.)  <i>H. annuus</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Spinacia</i> sp.	peu onéreuse  efficace  in-situ et ex-situ	système racinaire dépendante	Dushenkov <i>et al.</i> , 1995  Raskin <i>et al.</i> , 1997
<b>Phytovolatilisation</b>	volatilisation par les feuilles	organiques (TCE, MTBE...) et inorganiques (Se, As, Hg, ...)	sols sédiments boues	plantes génétiquement modifiées ( <i>Arabidopsis</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> ) arbres ( <i>Populus</i> )	pas de déchet à traiter	dispersion et non dépollution	Kramer, 2005

### 2.1.5. La phytovolatilisation

Elle ne consiste pas en une technique de dépollution mais de dispersion des contaminants (Kramer, 2005). Elle peut être appréciée comme une variante de la phytoextraction. Dans ce cas, le contaminant n'est pas accumulé dans les parties aériennes, mais, est transformé en produit volatil puis est ensuite relargué dans l'atmosphère par évapotranspiration (Figure 17) (Kramer, 2005). Les techniques de phytovolatilisation sont variées comme l'utilisation d'espèces phréatophytes présentant des taux d'évapotranspiration importants (cas du sélénium, Van Huysen et al, 2003) ou encore le couplage avec des bactéries (bactéries mercure réductase, Rugh et al, 1996).

### 2.1.6. La rhizofiltration

Egalement rencontrée sous le nom de phytofiltration, elle utilise les capacités élevées du système racinaire de certains végétaux à fixer les polluants d'un milieu liquide (Figure 18). En effet, les racines de beaucoup de plantes terrestres, cultivées en systèmes hydroponiques (*B. juncea*, *H. annuus*) et de nombreuses graminées ôtent des solutions aqueuses les métaux toxiques tels que le cuivre, le cadmium, le chrome, le nickel, le plomb et le zinc (Dushenkov et al, 1995 ; Raskin et al, 1997). Cette technique est particulièrement efficace et très peu onéreuse notamment quand les concentrations en polluants sont faibles et les volumes d'eau importants (Salt et al, 1995a). Elle peut être appliquée aux traitements des eaux de surface, aux nappes phréatiques, aux effluents industriels et résidentiels ainsi qu'aux eaux de drainage.



**Figure 18 : Système de rhizofiltration.** Les plantes peuvent être utilisées en conditions hydroponiques pour filtrer les eaux polluées (polluants représentés par la tête de mort) (d'après Pilon-Smits, 2005).

## 2.2. Inconvénients de la phytoremédiation

Bien que comportant de nombreux avantages, les techniques de phytoremédiation peuvent néanmoins présenter quelques inconvénients. En effet, les plantes, organismes vivants, nécessitent de l'oxygène, de l'eau et des nutriments pour leur croissance et leur maintien. Les propriétés du sol, le pH, les niveaux de toxicité mais également le climat constituent des paramètres limitant pour le développement des végétaux (Chaudhry et al, 2002 ; Cunningham et al, 1995). Ainsi, ces techniques sont restreintes à des sites de faible contamination. Bien que certains phréatophytes, satisfaisant leur besoin en eau directement à partir de la nappe phréatique, possèdent des racines allant jusqu'à 15 m (Negri et al, 2003), la phytoremédiation reste restreinte à des sites pollués peu profonds (Cunningham et al, 1995 ; Pilon-Smits, 2005). Si les coûts sont peu onéreux, les durées de traitement en remédiation restent néanmoins relativement longues pouvant atteindre plus d'une dizaine d'années (Prasad et al, 2010).

### 2.3. Phytoextraction assistée chimiquement

Un inconvénient majeur de la phytoremédiation est le temps de dépollution très long. Ainsi, afin de réduire ces durées, des adjuvants peuvent être ajoutés de façon à augmenter la mobilité des métaux dans les sols et donc, la concentration en métaux dans la plante. Ces adjuvants peuvent être des composés chimiques, tels que l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) et ses dérivés, ou encore des composés synthétiques plus dégradables que de l'EDTA.

#### 2.3.1. L'EDTA et ses dérivés

Malgré la présence de concentrations importantes en éléments traces métalliques dans les sols, leur mobilité vers la plante peut néanmoins s'avérer faible (Alkorta et al, 2004). Dès les années 1950, des études sur les interactions plantes-chélatants chimiques ont été menées en vue de réduire les carences en éléments essentiels tels que le fer, le manganèse, le cuivre et le zinc (Nowack et al, 2006). Ces premiers résultats ont également montré une augmentation du prélèvement en plomb et en mercure, lors de l'ajout de ces adjuvants (Hale & Wallace, 1970). En 1993, Jorgensen (Jorgensen, 1993) a montré que l'emploi d'agents chélatants dans les sols, tels que l'EDTA, augmente l'accumulation de plomb dans des plantes cultivées, laissant ainsi présager une application dans des sols contaminés par du plomb.

L'utilisation des chélatants chimiques s'est alors développée, avec pour objectif la désorption des contaminants inorganiques de la matrice sol, facilitant ainsi leur transport des métaux dans le xylème et augmentant leur translocation dans les racines et parties aériennes. En effet, les chélatants agissent en stimulant la solubilité des métaux dans le sol, en facilitant leur diffusion dans la rhizosphère et en augmentant la translocation vers les feuilles.

A titre d'exemple, Blaylock *et al.* (Blaylock et al, 1997) ont obtenu une accumulation rapide de plomb dans la moutarde indienne (*Brassica juncea*). Une projection sur trois cultures de 6 semaines par saison, pour une biomasse totale produite de 6 t / ha, permettrait le prélèvement de 180 kg de plomb / ha, lors d'une contamination à 600 mg de plomb /kg de sol.

L'accumulation accrue de métaux dans les plantes par ajout d'EDTA est également applicable à d'autres métaux tels que le cadmium, le cuivre, le nickel et le zinc (Blaylock et al, 1997). Néanmoins, l'efficacité de cette accumulation est directement liée à l'affinité du

chélatant pour le métal, ainsi, par exemple, alors que l'EDTA sera préféré pour le plomb, l'acide éthylène glycol tétraacétique (EGTA) sera utilisé pour le cadmium (Blaylock et al, 1997).

Si l'utilisation de tels agents a reçu une attention considérable par son faible coût et son importante efficacité dans la solubilisation des métaux, elle reste cependant controversée. Bien que la dégradation de l'EDTA ait été reportée en conditions de culture contrôlées, celle-ci reste négligeable dans les sols et eaux, en conditions naturelles (Bucheli-Witschel & Egli, 2001). Par ailleurs, exacerbée par les processus de flux préférentiel, la lixiviation des sols est accentuée, tout comme la biodisponibilité des métaux (Nowack et al, 2006). Ces deux paramètres peuvent se traduire par des effets négatifs sur les micro-organismes ainsi qu'une proportion importante de métaux et de chélatants sous la rhizosphère pouvant s'étendre jusqu'aux eaux souterraines.

Pour conclure, l'utilisation d'agents chimiques assistant la phytoextraction reste controversée d'autant plus que les résultats dépendent de l'espèce végétale impliquée, du métal et de la concentration en adjuvant (Nowack et al, 2006 ; Wu et al, 1999).

### 2.3.2. Autres composés synthétiques

De nombreuses études ont également été menées sur des agents chélatants facilement biodégradables (EDDS, MGDA, DTPA). L'EDDS, une alternative à l'EDTA, apparaît alors comme un chélatant prometteur (Kos & Lestan, 2004 ; Luo et al, 2006 ; Nowack et al, 2006). Néanmoins, leur meilleure dégradabilité, notamment celle du DTPA, peut limiter leur efficacité (Means et al, 1980).

L'EDTA pourrait également se voir remplacer par des chélatants naturels, tels que le NTA ou les acides organiques. do Nascimento (do Nascimento et al, 2006) ont montré que les acides citriques et galliques pouvaient se montrer aussi efficaces que l'EDTA, notamment grâce à l'augmentation de la biomasse produite en présence de ces composés. L'acide citrique diminue en effet la toxicité du chrome et du plomb pour les végétaux et accroît le facteur de translocation (Chen et al, 2003).

Cependant, un des inconvénients majeurs de ces composés reste leur dégradation rapide par la microflore du sol, diminuant ainsi leur action sur l'adsorption des métaux par les plantes (Romkens et al, 2002).

La solubilité des métaux peut également être améliorée par une baisse du pH du sol au niveau de la rhizosphère (Brown et al, 1994). Ainsi une des alternatives consiste à réduire ce paramètre, par exemple à l'aide de soufre ou de certains fertilisants. Cependant, une acidification entraîne généralement une baisse de l'activité microbienne (Wang et al, 2006).

En outre, l'application de fertilisants, en augmentant la biomasse des végétaux, et parfois le prélèvement des métaux, peut ainsi améliorer l'extraction des métaux (Kumar et al, 1995 ; Wei et al, 2010).

#### **2.4. Les plantes transgéniques et la phytoremédiation**

Comme outil de phytoremédiation, la plante idéale aurait une forte biomasse, combinée à une capacité de tolérance aux métaux importante, tout comme l'accumulation et/ou la dégradation des contaminants (Pilon-Smits & Pilon, 2002). Ainsi, plusieurs stratégies ont été pensées pour améliorer génétiquement les plantes utilisées en phytoremédiation, comme, par exemple, l'amélioration de la production de biomasse, l'altération de la spécificité des systèmes de prélèvements des métaux et l'augmentation de la production des substances chélatantes pour améliorer le taux de translocation et la séquestration des métaux (Krämer & Chardonnens, 2001 ; Pilon-Smits & Pilon, 2002).

Les plantes transgéniques surexprimant les enzymes impliquées dans la biosynthèse du glutathion (précurseur des phytochélatines) présentent une meilleure tolérance aux métaux (plomb et cadmium pour du tabac modifié) ainsi que des racines plus longues et une plus forte accumulation dans leurs feuilles (Gisbert et al, 2003). De plus, l'introduction de métallothionéine de plants de pois (*Pisum sativum*) dans *Arabidopsis* a pour effet d'améliorer le prélèvement du cuivre, et ceci de 8 fois (Evans et al, 1992). De même, l'introduction de protéines similaires, d'origine humaine, dans des plants de tabac, a permis d'accroître la tolérance au cadmium, bien que les prélèvements n'aient, quant à eux, pas été améliorés (Misra & Gedamu, 1989 ; Pan et al, 1994).

Une autre stratégie repose sur l'amélioration de la capacité d'évapotranspiration de la plante. Ainsi, l'introduction de sélénocystéine d'*Astragalus bisulcatus* dans la moutarde indienne améliore l'accumulation du sélénium et de 2,5 fois sa volatilisation (LeDuc et al, 2004).

Enfin, quelques approches s'intéressent à une modification génétique d'espèces d'arbres (Cherian & Oliveira, 2005). En effet, par leur biomasse et leur durée de vie importante, les arbres sont des candidats appropriés pour la phytoremédiation. Dans ce contexte, la surexpression d'une réductase mercurique bactérienne dans le peuplier jaune permet une volatilisation du mercure 10 fois supérieure à celle des arbres non modifiés (Rugh et al, 1998).

L'utilisation de telles plantes n'est cependant pas sans risque. En effet, une propagation incontrôlée des plantes transgéniques, due à leur meilleure valeur sélective (tolérance aux métaux par exemple), pourrait être problématique, tout comme une propagation des gènes par croisement avec les populations sauvages (Pilon-Smits & Pilon, 2002). L'utilisation de ces plantes transgéniques en vue d'améliorer la phytoremédiation nécessite donc un contrôle important.

## 2.5. Traitement et élimination des déchets

Si la phytoremédiation est une méthode peu coûteuse et prometteuse pour dépolluer les sols contaminés, l'élimination des cultures reste, cependant, un des obstacles à l'implantation de la phytoextraction (Tableau 8). Peu d'études ont été menées jusqu'à présent sur les implications environnementales des contaminants inorganiques accumulés dans les biomasses récoltées (Abhilash & Yunus, 2011). En effet, avec des espèces à forte biomasse, telles que la moutarde indienne (*B. juncea*), la phytoremédiation peut conduire à une production importante de déchets à traiter, avec 6 t.ha<sup>-1</sup> contenant des concentrations de 10 000 à 15 000 mg de plomb par kg de matière sèche (Blaylock et al, 1997).

Une des premières étapes est la réduction du volume des végétaux contaminés par compostage, compaction ou encore pyrolyse (Raskin et al, 1997 ; Salt et al, 1995a) (Bridgwater et al, 1999). Il est toutefois nécessaire de récupérer les lixiviats produits au cours de ces opérations. A l'issue de ces pré-traitements, la biomasse est ensuite traitée par différentes techniques, principalement par voies thermochimiques (Sas-Nowosielska et al, 2004).

Le produit final peut alors être stocké en centre d'enfouissement technique (CET), mais également réutilisé en fonderie plomb/zinc ou bien subir une extraction liquide des métaux

dans les cendres (Blaylock et al, 1997 ; Raskin et al, 1997 ; Salt et al, 1995a ; Sasnowosielska et al, 2004).

**Tableau 8 : Comparatifs des coûts de traitement des déchets issus de la phytoremédiation** (d'après Sasnowosielska *et al.*, 2004)

	Technique	Coûts du procédé (€/t)	Avantages	Inconvénients
Pré-traitement des déchets	Compostage	10 – 25	Réduction du volume et du contenu en eau	Durée du traitement (2 à 3 mois) Nécessité d'un équipement spécial Produit final encore dangereux
	Compaction	non disponible	Réduction du volume Récupération des lixiviats contenant les métaux	Nécessité d'un équipement spécial Produit final encore dangereux (biomasse et lixiviats)
	Pyrolyse	20 – 30	Diminution significative du volume Utilisation du produit final (pyrogaz)	Produit final encore dangereux
Traitement des déchets	Incinération (fonderie)	180 – 220	Possibilité de récupérer les métaux Diminution significative de la biomasse	Aucun
	Stockage (CET*)	135 – 1 136	Temps relativement court	Coûteux Limitation par l'espace Incinération nécessaire Réduction lente de la biomasse contaminée
	Incinération	non disponible	Possibilité de récupérer les métaux Diminution significative de la biomasse	Pas de technologie applicable
	Extraction liquide	non disponible	Récupération des métaux	Pas de technologie applicable



### III - Phytoremédiation couplée à la rhizosphère

#### 1. La rhizosphère

##### 1.1. Généralités

Le concept de « rhizosphère » a été introduit pour la première fois en 1904 par Lorenz Hiltner (Hiltner, 1904), et ceci pour décrire la zone sous l'influence biologiques et biochimiques des racines (Curl & Truelove, 1986). Le terme « rhizo » vient du grec signifiant « racine » tandis que le terme « sphère » dérive du grec ancien « sphaira » décrivant une balle, un globe. En 1986, Curl et Truelove (Curl & Truelove, 1986) décrivent la rhizosphère comme « une étroite zone du sol sujette à l'influence des racines, ce qui se manifeste par la perte ou l'exsudation de substances affectant l'activité microbienne ». Si d'un point de vue morphologique, les racines et le sol, ou les micro-organismes et le sol devraient être clairement séparés, il n'en va de même d'un point de vue fonctionnel (Ulrich, 1987).

Selon Lawton et Jones (Lawton & Jones, 1995), les racines des végétaux peuvent être considérées comme les « ingénieurs biologiques du sol ». En effet, ces dernières créent et maintiennent leur propre milieu, et ceci, non seulement par leur présence physique mais aussi par leur activité. Par des processus tels que l'exsudation d'acides organiques et d'enzyme dans la rhizosphère, les racines vont pouvoir, par exemple, permettre le maintien de communautés microbiennes (Curl & Truelove, 1986) ou l'accroissement de l'érosion des minéraux (Hinsinger et al, 1992; Richards, 1987). Ainsi, en dépit du faible volume de la rhizosphère dans les sols, celle-ci joue un rôle central dans le maintien du système sol-plante (Gobran et al, 1998).

##### 1.2. Micro-organismes de la rhizosphère

Parmi les micro-organismes retrouvés dans le sol, certains vivent en symbiose ou mutualisme avec les végétaux, c'est-à-dire en association à bénéfices réciproques. L'apport d'eau et de nutriments à la plante, en échange de substances carbonées et d'une protection physique aux micro-organismes peuvent définir ces échanges.

Dans ces associations, les micro-organismes peuvent être classés en deux catégories :

- les **ectosymbiontes** qui constituent les micro-organismes colonisant l'extérieur de la racine, c'est-à-dire, la rhizosphère ou le rhizoplan (surface des racines). Parmi ces organismes, sont retrouvés des bactéries telles que *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter* (Gray & Smith, 2005) et des champignons (*Trichoderma*). Les bactéries de ce type sont alors définies comme des rhizobactéries ;
- les **endosymbiontes** qui regroupent les micro-organismes vivant à l'intérieur des cellules de la plante hôte. Cette catégorie est constituée majoritairement de champignons dits endomycorrhiziens, dont les hyphes pénètrent dans les cellules végétales et ceci jusqu'au plasmalemme en formant des arbuscules. Ces champignons sont définis sous le nom de champignons mycorrhiziens arbusculaires (AMF) et regroupent principalement la famille des *Glomales*. Le plasmalemme peut également être transpercé, ceci étant l'œuvre de bactéries dites endophytes. Ces bactéries, appartenant principalement aux genres *Rhizobium* et *Frankia*, peuvent alors former des nodules racinaires, et ceci sur les racines des légumineuses et des ligneuses (Gray & Smith, 2005 ; Lugtenberg & Kamilova, 2009).

### 1.2.1. Les champignons mycorrhiziens arbusculaires (AMF)

Ces champignons se développent dans la mycorrhizosphère qui, de façon semblable à la rhizosphère, correspond à la zone influencée à la fois par les racines des végétaux et par les micro-organismes fongiques. Elle inclut également le terme très particulier d'hydrosphère, faisant référence seulement à la zone entourant les hyphes fongiques (Johansson et al, 2004). Les AMF seraient en association avec environ 80% des plantes terrestres (Bais et al, 2006). L'association racine-AMF améliore la croissance végétale par augmentation de la surface d'échange racinaire, ce qui va alors permettre une meilleure acquisition des nutriments essentiels, notamment le phosphore (Johansson et al, 2004 ; Read & Perez-Moreno, 2003). Outre le fait d'accroître la surface racinaire, les AMF peuvent augmenter la biomasse et la longueur racinaire (*Zea mays* associé à *Glomus*, Clark & Zeto, 1996).

Ces mycorhizes symbiotiques peuvent affecter les communautés bactériennes associées aux racines de manière directe, par un apport en sources carbonées, des variations de pH, une compétition pour les nutriments et des exsudations fongiques de composés

inhibiteurs ou stimulateurs, ou de façon indirecte avec des effets sur la plante hôte, l'exsudation racinaire ou la structure du sol (Johansson et al, 2004).

### 1.2.2. Les bactéries dans la rhizosphère

La croissance végétale peut être affectée par les bactéries de différentes façons. En effet, des bactéries peuvent être à l'origine de maladies, inhiber la croissance des plantes, tandis que d'autres peuvent, activement ou non, favoriser la croissance à travers différents mécanismes (fixation d'azote, solubilisation des phosphates, production de sidérophores, phytohormones, ACC déaminase) (Ma et al, 2011). Dans la rhizosphère, la concentration en bactéries peut être 10 à 1 000 fois supérieure à celle du reste du sol (Tableau 9) (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Néanmoins, pour exercer leurs effets bénéfiques dans l'environnement des racines, les bactéries doivent être compétentes, c'est-à-dire rivaliser avec les autres micro-organismes de la rhizosphère, aussi bien pour bénéficier des nutriments sécrétés par la plante que coloniser les sites disponibles (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

L'ensemble de ces interactions est affecté par la matière organique, le pH, la température, les nutriments ainsi que les niveaux de pollution (Bais et al, 2006 ; Glick, 2003).

**Tableau 9 : Répartition de la population microbienne (UFC.g<sup>-1</sup> de sol) dans la rhizosphère du blé (*Triticum aestivum* L.) et dans le sol, ainsi que leur ratio (modifié d'après Gray & Williams, 1971).**

Micro-organismes	Rhizosphère (R)	Sol (S)	Ratio R / S
<b>Bactéries</b>	1,2.10 <sup>9</sup>	5,3.10 <sup>7</sup>	23
<b>Actinomycètes</b>	4,6.10 <sup>7</sup>	7,0.10 <sup>6</sup>	7
<b>Microflore ammonifiante</b>	5,0.10 <sup>8</sup>	4,0.10 <sup>6</sup>	125
<b>Microflore dénitrifiante</b>	1,26.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>5</sup>	1260
<b>Champignons</b>	1,2.10 <sup>6</sup>	1,0.10 <sup>5</sup>	12

### 1.2.2.1. Les rhizobactéries ou PGPR

Parmi les bactéries de la rhizosphère, certaines peuvent fortement agir sur la nutrition des plantes par des mécanismes variés, et notamment les bactéries dites PGPR (Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria) également appelées rhizobactéries (Lugtenberg & Kamilova, 2009 ; Ma et al, 2011). Parmi les PGPR, de nombreux genres sont recensés tels *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia* (Gray & Smith, 2005). La colonisation bactérienne des racines se réalise progressivement à partir de cellules isolées qui se développent ensuite en biofilm (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Outre la stimulation de croissance et de développement du végétal, les bénéfices apportés par ces bactéries incluent la suppression d'organismes pathogènes ou délétères (Chakraborty et al, 2006 ; Lemanceau & Alabouvette, 1991), l'approvisionnement en éléments inorganiques (Dimkpa et al, 2009a), la fixation d'azote (Dobbelaere et al, 2003), la tolérance aux stress abiotiques (Dimkpa et al, 2009a), la production de phytohormones (Vessey, 2003) et une meilleure résistance aux contaminants (Ma et al, 2011).

### 1.2.2.2. Les bactéries endophytes

Ces bactéries sont définies comme celles capables de coloniser les tissus internes de la plantes, sans provoquer d'infections ou d'effet négatif à leur hôte (Schulz & Boyle, 2006). Ces bactéries résident alors dans l'apoplasme ou le symplasme de la plante. Parmi ces bactéries, de nombreux genres sont retrouvés, tels que *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, capables de coloniser une grande variété d'espèces végétales (riz, maïs, soja, carotte, bananier...) (Rosenblueth & Martinez-Romero, 2006). En général, les bactéries endophytes proviennent de communautés bactériennes de la rhizosphère, de la phyllosphère<sup>1</sup>, ou de graines. Outre leur capacité à pénétrer dans les plantes par des orifices naturels ou par des blessures, les bactéries endophytes utiliseraient activement des enzymes hydrolytiques, telles la cellulase et la pectinase, pour atteindre l'intérieur des plantes (Hallmann et al, 1997).

---

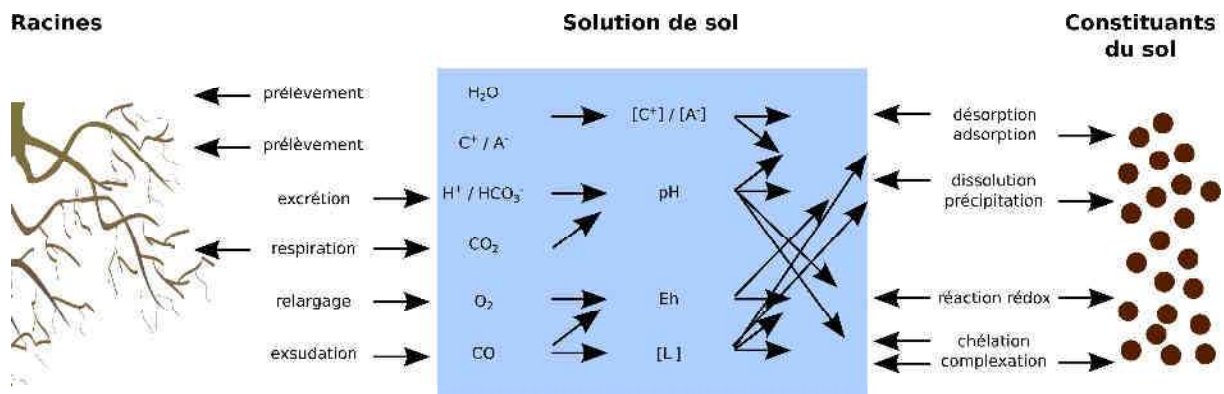
<sup>1</sup> Parties aériennes des végétaux (feuilles et gaines foliaires) où se développe une microflore active

Les bactéries endophytes confèrent une meilleure tolérance aux stress métalliques et peuvent stimuler la croissance de leur plante hôte par plusieurs mécanismes comme la fixation de l'azote, la résistance aux pathogènes, la production de régulateurs de croissance et l'augmentation des prélèvements en éléments nutritifs et eau (Ryan et al, 2008). En général, les effets bénéfiques procurés aux végétaux sont supérieurs à ceux des rhizobactéries (Pillay & Nowak, 1997).

## 2. Mécanismes impliqués dans les interactions bactéries-plantes

### 2.1. Rôles de la plante

Dans la rhizosphère, les racines exsudent une gamme très importante de composés potentiellement importants. En effet, en plus d'accumuler des composés actifs, les racines produisent et secrètent continuellement des composés dans la rhizosphère (Figure 19) (Bais et al, 2006 ; Gleba et al, 1999). L'exsudation racinaire inclut la sécrétion d'ions, d'oxygène libre, d'eau, d'enzymes, de mucilages ainsi qu'un grand nombre de métabolites primaires et secondaires (Bertin et al, 2003). Jusqu'à 21% du carbone fixé par la plante peuvent être sécrétés, et ceci principalement sous forme d'exsudats racinaires (Marschner, 1995).



**Figure 19 : Schématisation de la rhizosphère, montrant les différents exsudats racinaires et leurs influences sur les facteurs abiotiques et les mécanismes à l'interface sol-solution.** CO : carbone organique (réducteur, chélatant, ligand) ; C<sup>+</sup> : cation ; A<sup>-</sup> : anion ; L : ligand ; Eh : potentiel redox (d'après Adriano *et al.*, 2004).

Les exsudats racinaires peuvent être divisés en deux classes de composés (Bais et al, 2006) :

- ceux de faibles poids moléculaires, tels que les acides aminés, les acides organiques, les sucres, les phénols et autres métabolites secondaires. Ils décrivent une grande diversité d'exsudats racinaires ;
- ceux de poids moléculaires plus élevés tels que les mucilages (polysaccharides) et protéines, moins diversifiés mais composant une part importante de la masse des exsudats racinaires.

Au niveau de la rhizosphère, les bactéries trouvent ainsi un grand nombre de nutriments favorables à leur développement (Figure 20). Il est apparu que les bactéries étaient capables de localiser les racines grâce aux exsudats tels que les hydrates de carbone ou les acides aminés, qui stimuleraient leur chimiotaxie (Somers et al, 2004). Une expérience impliquant *P. fluorescens* et des plants de tomate ont mis en évidence que le chimiotaxisme pourrait également être mis en place par la détection d'acides organiques (de Weert et al, 2002). De même, de nombreuses bactéries se multiplient dans la rhizosphère en réponse à la libération de flavonoïdes (Hartwig et al, 1991) et, en retour, stimulent l'exsudation de ces composés dans la rhizosphère (Recourt et al, 1991).

Cependant, les exsudats racinaires peuvent également influencer le comportement de pathogènes. En effet, la germination des spores du pathogène *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici* est influencée par l'exsudation racinaire des plants de tomate et l'ajout d'un biocontrôle, *Pseudomonas fluorescens* retarde ce phénomène (Kamilova et al, 2008).

La structure des communautés microbiennes demeure complexe et dépend de la composition des exsudats racinaires (Shann & Boyle, 1994 ; Yang & Crowley, 2000) mais également de l'âge de la plante, du type de racines et de la composition du sol (Anderson et al, 1993 ; Chiarini et al, 1998).

## 2.2. Rôles des bactéries associées aux plantes

Aussi bien dans les écosystèmes naturels qu'anthropisés, les bactéries associées aux végétaux, en plus de stimuler la croissance, jouent un rôle clé dans l'adaptation de leurs hôtes aux changements d'environnements (Ma et al, 2011). Différents mécanismes, directs (solubilisation du phosphore et du potassium, fixation de l'azote, séquestration du fer par les

sidérophores, production d'hormones, ...) ou indirects (réduction du nombre de pathogènes par la production d'antibiotiques ainsi que du fer disponible dans la rhizosphère pour les phytopathogènes, ...) sont impliqués (Glick, 1995 ; Lucy et al, 2004).

### 2.2.1. Solubilisation de phosphore

Le phosphore est un élément majeur, essentiel pour la croissance et le développement de la plante, constituant généralement le macro-élément limitant la production de biomasse. De plus, les teneurs élevées en éléments traces métalliques dans les sols peuvent interférer avec son prélèvement, provoquant alors des retards dans la croissance (Zaidi et al, 2006). En présence de PGPR, le phosphore insoluble peut être rendu biodisponible à travers des réactions d'acidification, de chélation ou la libération d'acides organiques (Chung et al, 2005) ou encore en les minéralisant et ceci par sécrétion de phosphatases (Gyaneshwar et al, 2002). Une augmentation de la disponibilité du phosphore pour la plante et ainsi une augmentation de la biomasse grâce à l'inoculation de bactéries (*Bacillus*) a été décrite (Pal, 1998).

### 2.2.2. Fixation d'azote

Certaines bactéries, dites fertilisantes, fournissent les nutriments aux plantes. En effet, des bactéries fixatrices d'azote, appelées rhizobia, comme *Rhizobium* et *Bradyrhizobium*, peuvent former des nodules sur les racines de légumineuses (soja, pois, arachide, luzerne, ...) dans lesquels elles convertissent l'azote en ammoniacque qui, à l'inverse de l'azote peut être utilisé par les plantes (Vanrhijn & Vanderleyden, 1995). L'infection racinaire se déroule en plusieurs étapes. Initialement, les bactéries sont attirées par les exsudats racinaires ainsi que par de faibles quantités de flavonoïdes. Le mode d'infection le plus courant est l'infection intracellulaire, les bactéries pénétrant dans la plante à travers les poils absorbants. La pénétration des bactéries s'accompagne alors de divisions cellulaires au niveau du cortex, qui aboutiront par la suite à la formation d'un nodule racinaire, site de la fixation atmosphérique (Pawlowski & Bisseling, 1996).

Si les symbioses légumineuses-rhizobia sont les plus étudiées, du fait de leur importance économique (Vessey, 2003), l'association entre des plantes dites actinorhiziennes et l'actinomycète du sol *Frankia* représente un exemple intéressant. Outre sa capacité à fixer

l'azote atmosphérique, ces bactéries présentent également des facultés d'adaptation aux sols pauvres et carencés (Duhoux & Franche, 2003). Les plantes actinorhiziennes correspondent aux plantes ligneuses (*Casuarina*, *Cerocarpus*, ...) excepté le genre *Datisca*. L'établissement de la symbiose implique le développement d'un nouvel organe, l'actinorhize ou nodule actinorhizien, site de fixation de l'azote par la bactérie (Duhoux & Franche, 2003). Contrairement aux nodules des légumineuses, représentant un organe nouveau, l'actinorhize s'apparente, par son origine et sa structure, à une racine adventive modifiée (Pawlowski & Bisseling, 1996).

### 2.2.3. Production de biofilm

La majorité des bactéries favorise un mode de vie à l'état fixé. Les bactéries adhèrent alors aux surfaces sous forme de communautés structurées, décrites sous le terme de biofilm (Hall-Stoodley et al, 2004). Bien que de nombreux travaux se soient focalisés sur les surfaces abiotiques, le biofilm peut également se développer sur des surfaces biotiques, notamment lors des interactions bactéries-plantes. Il a pu être montré que la majorité des *Pseudomonades* associées aux racines favorisait la croissance de la plante hôte (Lugtenberg et al, 2001), formant majoritairement des biofilms autour des racines (Ramey et al, 2004). Espinosa-Urgel et al. (Espinosa-Urgel et al, 2002) ont montré que *Pseudomonas putida* était capable de répondre très rapidement à la présence d'exsudats racinaires, convergeant alors vers les sites racinaires où la bactérie établit alors un biofilm. D'autres études ont montré que les *Pseudomonades* favorisant la croissance des plantes ne formaient que de fins biofilms discontinus sur la surface des racines (Bloemberg et al, 2000) tandis que celles étant pathogènes constituaient un biofilm dense et ceci sur toute la surface racinaire (Walker et al, 2004).

Néanmoins, le rôle exact du biofilm dans ces interactions est peu documenté. Dans les écosystèmes humides, le biofilm présent sur les racines serait impliqué dans la séquestration des métaux (Morris & Monier, 2003). La formation de « plaques de fer » sur les racines de plantes pourrait représenter environ 10 % du poids sec des racines (Hansel et al, 2001). Ces plaques sont constituées d'oxydes de fer complexés avec du manganèse, du plomb et du zinc. Elles seraient dues à l'activité des bactéries associées aux racines, oxydant le fer, et seraient favorisées par la libération d'oxygène par les racines. Ces oxydes de fer et les autres métaux se retrouvent alors emprisonnés dans le biofilm et seraient alors disponibles pour la plante



hôte (Hansel et al, 2001). De plus, dans le cas des plantes aquatiques, le biofilm jouerait également un rôle dans l'adhésion sur les roches (Morris & Monier, 2003).

#### 2.2.4. Production de phytohormones

La production de phytohormones par des bactéries associées aux plantes, telles que l'auxine (acide indole-3-acétique, AIA), les cytokinines et les gibbérellines, conduit fréquemment à une stimulation de la germination, de la croissance et de la reproduction tout en protégeant la plante des stress à la fois biotiques et abiotiques (Taghavi et al, 2009).

Certaines bactéries de la rhizosphère synthétisent de l'auxine, *via* la voie de biosynthèse de l'indole-3-pyruvate, alors que les bactéries pathogènes utilisent principalement la voie de l'indole-3-acétamine (Hardoim et al, 2008). Ainsi, la quantité d'auxine relarguée aurait un rôle très important dans la modulation des interactions bactéries-plantes (Ma et al, 2011).

Un grand nombre de PGPR produit des cytokinines et des gibbérellines qui peuvent stimuler la croissance de nombreuses plantes et modifier leur morphologie (Arkhipova et al, 2007 ; Gutierrez-Manero et al, 2001).

#### 2.2.5. Production d'ACC désaminase

L'éthylène est une phytohormone au rôle central dans la modulation de la croissance et du métabolisme cellulaire des végétaux (Ping & Boland, 2004). Elle serait impliquée dans la résistance aux maladies et aux stress. Parmi ses rôles clés dans l'induction de changements physiologiques, la surproduction d'éthylène peut être à l'origine de l'inhibition de l'élongation racinaire et de la croissance des racines latérales (Mayak et al, 2004). Cependant, certaines bactéries de la rhizosphère sont capables d'atténuer son impact par la production d'une enzyme, l'ACC désaminase. L'hydrolyse enzymatique de la 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC), précurseur de l'éthylène, produit par la plante en cas de stress, génère de l'ammoniac et de l' $\alpha$ -cétobutyrate (Glick et al, 2007). Les bactéries utilisent l'ammoniaque provenant de cette dégradation comme une source d'azote et ainsi réduisent l'ACC au sein de la plante (Ma et al, 2011).

### 2.2.6. Production de sidérophores

Comme il a été vu dans le chapitre 3, le fer est un co-facteur indispensable pour de nombreuses réactions enzymatiques, mais aussi un élément indispensable pour tout organisme vivant. Pour acquérir du fer en quantité suffisante, certaines plantes, dites de stratégie II (*Poaceae*), tout comme les bactéries, peuvent produire des sidérophores afin d'augmenter leur prélèvement en fer. Néanmoins, les affinités des phytosidérophores pour le métal restent plus faibles que celle des sidérophores bactériens. Les racines peuvent alors incorporer le fer des complexes sidérophores bactériens-fer par des mécanismes de dégradation du chélateur s'accompagnant de la libération du fer ou d'incorporation directe de ces complexes (Rajkumar et al, 2010). Plusieurs exemples d'augmentation du prélèvement en fer par la plante avec une stimulation simultanée de la croissance ont été montrés comme une action directe de l'inoculation par des bactéries PGPR (Barzanti et al, 2007; Carrillo-Castaneda et al, 2003).

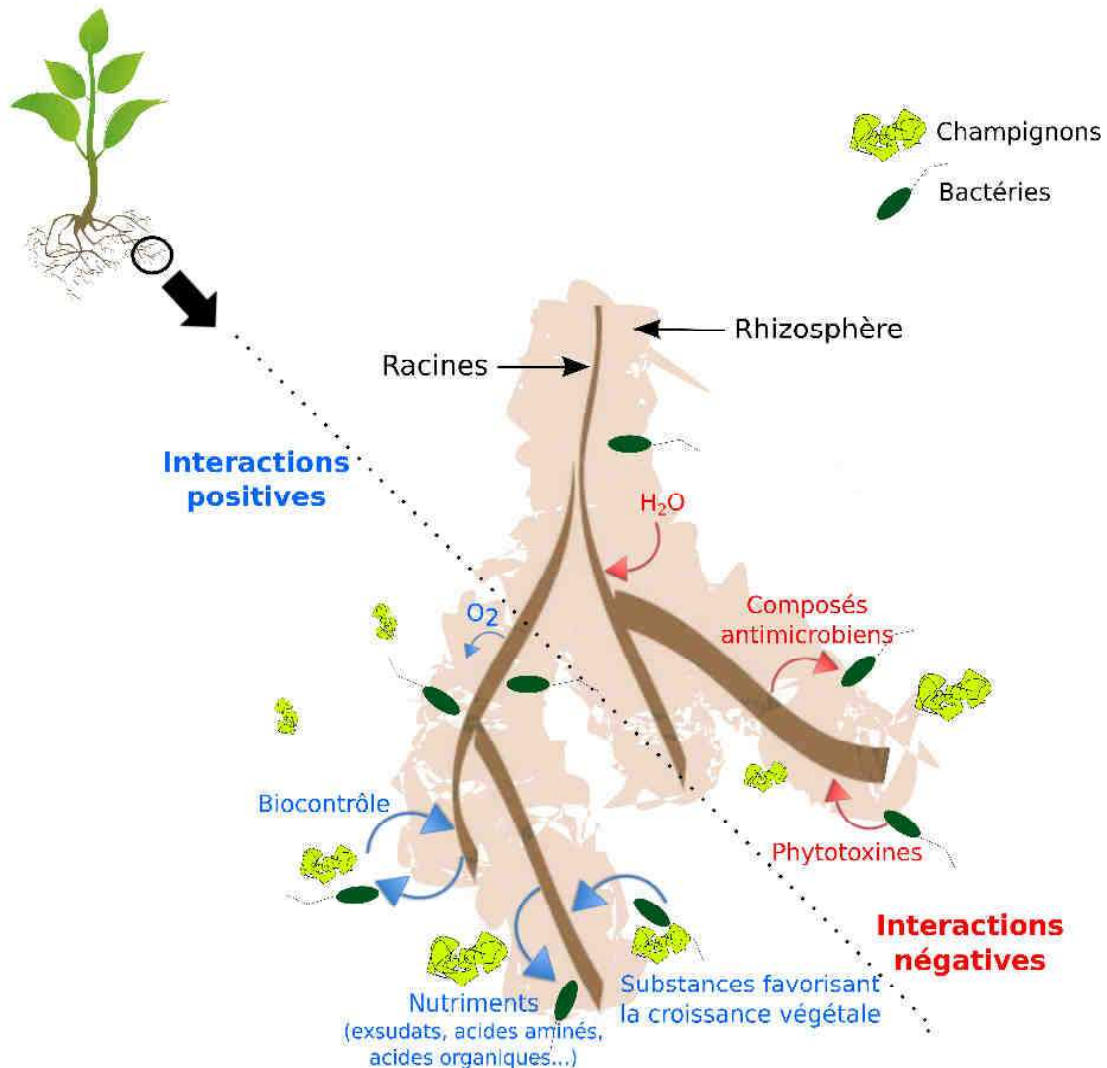
## 3. La rhizoremédiation

Le succès de la phytoremédiation est fortement dépendant de la quantité de biomasse végétale produite et de la concentration en éléments traces métalliques dans les tissus de la plante. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies afin d'améliorer l'efficacité de ces techniques. Caractérisée par une variété d'interactions complexes, la rhizosphère est considérée comme un facteur influençant grandement la croissance et la survie des plantes (Rajkumar et al, 2010). Ainsi, une méthode alternative pour améliorer l'efficacité de la phytoextraction repose sur l'utilisation des micro-organismes de la rhizosphère (Burd et al, 2000).

### 3.1. Phytoextraction assistée par les champignons mycorhiziens arbusculaires

Les AMF, retrouvés dans presque tous les types d'habitats et climats, même dans des sols contaminés en métaux (Khan, 2005), sont considérés comme essentiels à la survie et la croissance des végétaux dans des sols, notamment carencés en phosphore. Cependant, les friches polluées contiennent une diversité réduite mais une population autochtone tolérante

aux éléments traces métalliques (Khan, 2005). Si la majorité des études portant sur les AMF s'est focalisée sur leur capacité à améliorer les prélèvements de nutriments par les plantes, leur rôle dans la phytoremédiation (mycorhizoremédiation) reste relativement ignoré. De plus, leur implication dans ces techniques n'est pas encore déterminé avec précision (Jankong & Visoottiviseth, 2008 ; Khan, 2005). En effet, les résultats, quant à leur effet sur l'amélioration du prélèvement en contaminants, diffèrent.



**Figure 20 : Interactions plante/micro-organismes.** Les interactions entre les plantes et les micro-organismes dans la rhizosphère peuvent être classées en interactions soit positives soit négatives. Les interactions positives : durant la croissance de la plante, les racines peuvent libérer, activement ou non, une large gamme de composés organiques. Parmi eux, sont retrouvés les exsudats, les acides aminés, passivement libérés selon le gradient de concentration et utilisés comme nutriments par les micro-organismes de la rhizosphère. Ces micro-organismes colonisent la rhizosphère de nombreux végétaux et confèrent souvent des effets bénéfiques, telles la stimulation de croissance et la réduction d'éventuelles maladies causées par des pathogènes, comme les champignons, les bactéries, les virus et les nématodes. Les mécanismes favorisant la croissance de la plante incluent la fixation d'azote, la production de sidérophores ou de régulateurs de croissance. Les interactions négatives : les micro-organismes de la rhizosphère peuvent aussi avoir des effets préjudiciables pour la plante et sa survie par l'augmentation de risques d'infections. Les exsudats racinaires contiennent des composés antimicrobiens, tels que les phytotoxines (d'après Rajkumar *et al.*, 2010).

Certains auteurs remarquent une diminution des prélèvements des contaminants par la plante. Zhang *et al.* (Zhang et al, 2009) ont montré que l'accumulation en cuivre chez le riz était réduite en présence de l'AMF, *Glomus mosseae*. De même, Joner *et al.* (Joner & Leyval, 2001) ont observé que les AMF diminuaient l'accumulation des métaux dans les feuilles des plantes non-accumulatrices. Néanmoins, selon Galli *et al.* (Galli et al, 1995), dans le cas du cuivre, les AMF auraient un rôle protecteur sur les racines et augmenteraient le seuil de tolérance de la plante au métal, ceci ayant également été observé par Zhang et al. (Zhang et al, 2009).

Néanmoins, d'autres auteurs ont remarqué que la présence d'AMF faciliterait l'absorption des métaux. En effet, selon les conditions de pH et la nature du sol, le prélèvement en cadmium a été observé chez le trèfle (Joner & Leyval, 1997), le haricot et le maïs (Guo et al, 1996) et le soja (Heggo et al, 1990).

Les divergences de ces résultats peuvent avoir plusieurs origines telles la nature et la concentration en métaux, les propriétés physico-chimiques du sol, la densité racinaire ainsi que les partenaires de l'association (Joner & Leyval, 2001 ; Weissenhorn et al, 1995). En effet, Jankong et Visoottiviseth (Jankong & Visoottiviseth, 2008) ont mis en évidence les effets variables des AMF sur différentes plantes quant à leur efficacité de bioremédiation d'un sol contaminé par de l'arsenic. Si pour *Pityrogramma calomelanos* et *Tagetes erecta*, la présence des AMF a réduit l'accumulation de l'arsenic dans la plante, aucun effet n'a été observé sur la croissance. A l'inverse, les AMF ont provoqué une diminution drastique de la croissance et de l'accumulation d'arsenic chez *Melastoma malabatricum*.

### **3.2. Phytoextraction assistée par les rhizobactéries et les bactéries endophytes**

Bien que plusieurs conditions, notamment la stimulation de croissance végétale, l'accumulation et la tolérance aux métaux, peuvent améliorer efficacement la phytoremédiation assistée par les bactéries de la rhizosphère, la concentration en métaux disponibles dans la rhizosphère influence grandement la quantité de métaux accumulés dans les plantes. En effet, une proportion importante des éléments traces métalliques est généralement liée à des constituants organiques ou inorganiques dans les sols pollués et leur phytodisponibilité est étroitement liée à leur spéciation chimique (McBride, 1989). Néanmoins, les métabolites libérés par les bactéries de la rhizosphère (sidérophores, acides

organiques, régulateurs de croissance végétale, ...) peuvent favoriser ou au contraire, altérer, le prélèvement par la plante.

### 3.2.1. Mobilisation des métaux par les bactéries de la rhizosphère, rôle dans la phytoextraction

Par les différents mécanismes d'interactions plante-bactéries décrits précédemment (solubilisation du phosphate, production de sidérophores, de phytohormones,...), les bactéries de la rhizosphère peuvent potentiellement améliorer la phytoextraction. En effet, la sécrétion d'acides organiques de faibles masses moléculaires (oxalate, citrate, succinate, ...) par certaines bactéries PGPR augmenterait la mobilisation en contaminants inorganiques (Li et al, 2007). En effet, *Burkholderia cepacia* stimule significativement la croissance de *Sedum alfredii*, tout comme l'incorporation de phosphore, de cadmium et de zinc (respectivement de 243 % et de 96,3 %) dans les parties aériennes. De même, la libération d'acide-5-cétogluconique par des bactéries diazotrophes endophytes, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, provoque la dissolution de sources variées de zinc, telles que ZnO, ZnCO<sub>3</sub> ou Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, rendant celui-ci disponible pour la plante (Saravanan et al, 2007).

De même, des souches isolées de la rhizosphère, produisant de l'auxine et capables de solubiliser le phosphore et d'utiliser l'ACC, permettent une augmentation importante de la biomasse de la plante ainsi qu'une accumulation accrue du nickel dans les tissus des racines et des parties aériennes (Ma et al, 2009).

De plus, la production de sidérophores bactériens peut également jouer un rôle important dans la mobilisation et l'accumulation de métaux (Dimkpa et al, 2009b ; Rajkumar et al, 2010). En effet, ces composés synthétisés par certaines bactéries de la rhizosphère solubilisent le fer mais forment aussi des complexes avec des ions métalliques divalents qui peuvent être assimilés par les racines (Braud et al, 2009a ; Carrillo-Castaneda et al, 2003). Récemment, Braud et al. (Braud et al, 2009a) ont étudié la libération de chrome et de plomb dans une solution de sol après inoculation par différentes bactéries PGPR et il est apparu que la souche bactérienne produisant des sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa*, était capable de solubiliser les plus grandes quantités de ces deux métaux. De plus, les auteurs ont montré que l'inoculation de *Zea mays* par cette même souche augmentait l'incorporation du chrome et du plomb dans les parties aériennes de la plante. De façon similaire, le rôle des sidérophores produits par *Streptomyces tendae* F4 dans l'incorporation du cadmium par le tournesol a été

étudié (Dimkpa et al, 2009b). Cette étude a montré que les sidérophores pouvaient réduire la toxicité du métal dans la bactérie et faciliter en parallèle l'incorporation par la plante. L'ajout de bactéries endophytes, *Pseudomonas fluorescens* G10 et *Microbacterium* sp. G16 a permis l'augmentation de la biomasse et du prélèvement en plomb par *Brassica napus*. Ces deux souches produisent de l'auxine, des sidérophores ainsi que de l'ACC désaminase (Sheng et al, 2008).

### 3.2.2. Immobilisation des métaux par les bactéries de la rhizosphère, rôle dans la phytoimmobilisation

L'utilisation de bactéries associées à des plantes dans les stratégies de phytoimmobilisation peut favoriser la croissance de la plante ainsi que sa tolérance aux métaux mais doit surtout réduire le prélèvement et la translocation des métaux dans les parties aériennes de la plante en réduisant la biodisponibilité des métaux au niveau des racines (Ma et al, 2011). Pour survivre dans des conditions de stress métalliques, les bactéries ont développé plusieurs mécanismes par lesquels elles peuvent immobiliser ou transformer les métaux afin de les rendre inactifs. Ces mécanismes sont généralement proposés comme facteurs de résistance des bactéries aux éléments traces métalliques. Ils consistent en l'exclusion du métal par une barrière perméable ou par un transport actif, en la séquestration intracellulaire ou extracellulaire, ou encore en détoxification qui modifie chimiquement le métal (Rouch et al, 1995). Les sidérophores bactériens et les acides organiques peuvent également réduire la biodisponibilité du métal et sa toxicité (Dimkpa et al, 2008 ; Tripathi et al, 2005).

Par exemple, Madhaiyan et al. (Madhaiyan et al, 2007) ont montré que l'inoculation avec des bactéries endophytes, *Magnaporthe oryzae* et *Burkholderia* sp., favorisait la croissance végétale tout en diminuant l'accumulation de nickel et de cadmium dans les racines et parties aériennes du plant de tomate ainsi que leur disponibilité dans le sol. Cet effet est dû à l'augmentation de la biosorption et de la bio-accumulation du métal par les souches bactériennes.

De plus, les bactéries peuvent également interagir directement avec les contaminants inorganiques pour réduire leur toxicité et/ou moduler leur biodisponibilité. Ces mécanismes incluent la dissolution des métaux par la production bactérienne d'acides forts (par exemple, production d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  par *Acidithiobacillus*), la production d'ammoniaque ou encore la fixation

du fer et du manganèse. Si l'utilisation d'une bactérie présentant des mécanismes de détoxification, telle que *Rhodococcus erythropolis*, favorise la croissance de la plante, ses prélèvements en  $\text{Cr}^{3+}$  et  $\text{Cr}^{6+}$  demeurent fortement diminués (Trivedi et al, 2007). L'inoculation de la plante par la bactérie faciliterait la prolifération racinaire et donc le prélèvement en nutriments (fer et phosphore) ce qui minimiserait les effets négatifs de  $\text{Cr}^{6+}$  sur la plante.

Bien que l'établissement d'une couverture végétale sur des sols contaminés reste difficile, les bactéries, en immobilisant les éléments traces métalliques et en augmentant ainsi la tolérance de la plante à des concentrations élevées de métaux et sa croissance, représenteraient un complément très prometteur pour accélérer les processus de phytostabilisation (Ma et al, 2011).

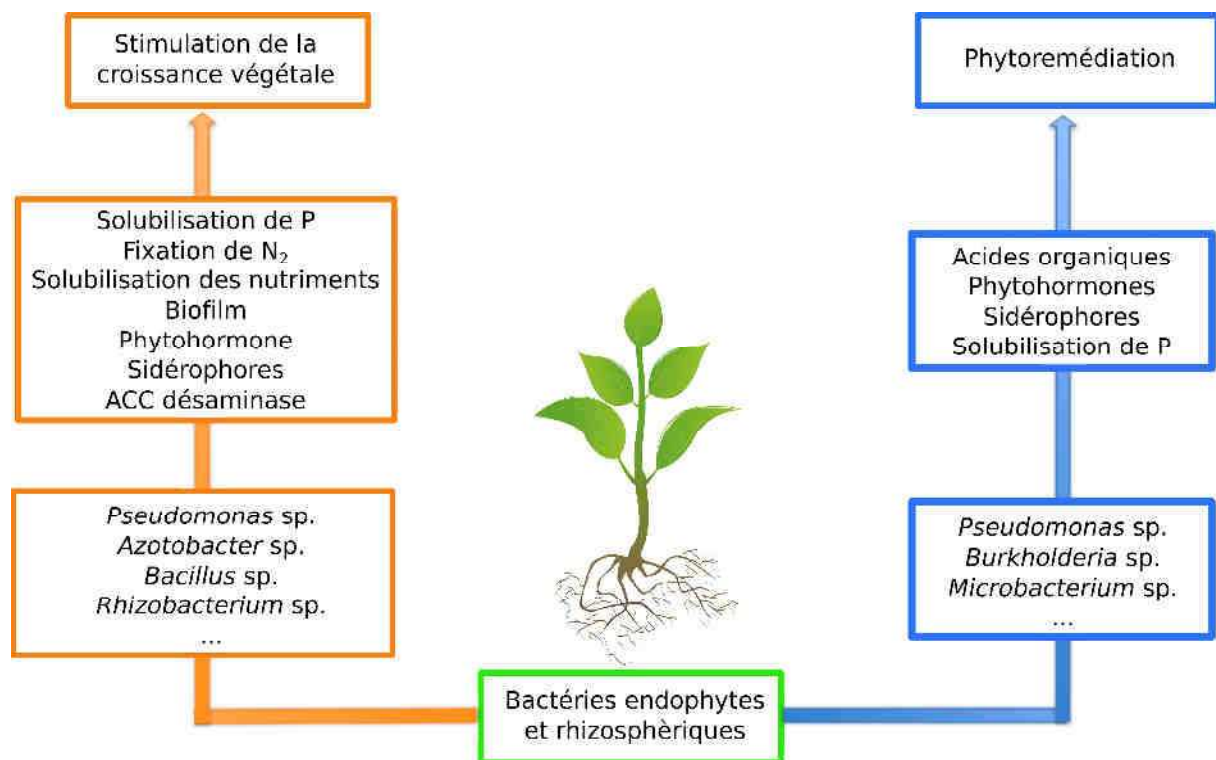


Figure 21 : Diagramme schématique des interactions plantes/micro-organismes et leurs applications





**Tableau 10 :Exemples de rhizoremédiation de sites contaminés en métaux (d'après Ma *et al.*, 2010).**

Plante hôte	Souches bactériennes	Substrats traités	Mécanismes impliqués	Effets sur la plante et la phytoremédiation	Références
<i>Alyssum mural</i>	<i>Microbacterium oxydans</i> AY509223 (rhizobactérie)	rhizosphère d' <i>A. murale</i> dans un sol serpentine riche en Ni	mobilisation du Ni	pas d'effet sur la biomasse augmentation de 39% du prélèvement en Ni (phytoextraction)	Abou-Shanab <i>et al.</i> , 2006
<i>Brassica juncea</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KUCd1 (rhizobactérie)	canal alimenté par des déchets industriels, Inde	sidérophore	augmentation de l'élongation racinaire et de la biomasse totale et de la production de chlorophylle diminution de 37% du prélèvement en Cd dans les parties aériennes (phytostabilisation)	Sinha et Mukherjee, 2008
<i>Brassica napus</i>	<i>Bacillus</i> sp. RJ16 (rhizobactérie)	sol pollué à Nanjing, Chine	IAA, mobilisation du Cd	augmentation de l'élongation racinaire et de la biomasse totale augmentation du prélèvement en Cd (phytoextraction)	Sheng et Xia, 2006 Hutchinson <i>et al.</i> , 2003; Olson <i>et al.</i> , 2003
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Methylobacterium oryzae</i> CBMB20, <i>Burkholderia</i> sp. (endophytes)	tissus d' <i>Oryza sativa</i>	ACCD, production de phytohormone, biosorption de Ni et Cd	augmentation de la biomasse diminution de l'émission d'éthylène diminution du prélèvement et de la translocation de Ni et Cd (phytostabilisation)	Madhaiyan <i>et al.</i> , 2007
<i>Pisum sativum</i>	<i>Rhizobium</i> sp. RP5 (rhizobactérie)	sol contaminés en métaux, Inde	fixation de N <sub>2</sub> , AIA, sidérophore	augmentation de la biomasse, du nombre de nodules et des rendements diminution de la toxicité de Ni et Zn et de leurs prélèvements (phytostabilisation)	Wani <i>et al.</i> , 2007
<i>Zea mays</i>	<i>Burkholderia</i> sp. J62 (rhizobactérie)	rizière polluée en métaux lourds, Chine	ACCD, sidérophore, AIA, solubilisation de P	augmentation de la biomasse augmentation du prélèvement en Pb et Cd par les racines et en Pb par les parties aériennes (phytoextraction)	Jiang <i>et al.</i> , 2008

## *Chapitre 6*

Tolérance aux éléments traces  
métalliques chez les végétaux



Tout comme chez les micro-organismes, certains éléments métalliques sont essentiels à la croissance des végétaux (Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn, ...), pouvant néanmoins être toxiques à fortes concentrations. D'autres métaux, non essentiels, sont toxiques, même à faibles concentrations (Cd, Pb). Ces différents métaux agissent comme facteurs de stress, entraînant une modification de la réaction physiologique de la plante. Si le terme « sensibilité » décrit les effets de ce stress pouvant aller jusqu'à la mort de la plante, le terme « résistance », au contraire, fait référence à la réaction de la plante lui permettant de survivre face à ce stress (Levitt, 1980).

## **I - Les éléments traces métalliques dans la plante**

Parmi l'ensemble des éléments traces métalliques, une vingtaine est indispensable aux plantes (Tableau 11). Ces éléments ne peuvent être substitués par d'autres éléments et ont une influence directe sur l'organisme. Ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques majeurs tels que la respiration, la photosynthèse ainsi que la fixation et l'assimilation de macro-nutriments comme l'azote et le soufre (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Les micro-éléments sont importants dans le contrôle de l'expression des gènes, le métabolisme lipidique, la biosynthèse de protéines, d'acides nucléiques, de substances de croissance, de la chlorophylle et de métabolites secondaires ainsi que la tolérance aux stress (Rengel, 2004). Parmi les éléments traces métalliques, les plus toxiques seraient le cadmium, le chrome, le mercure, le nickel et le plomb (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

### **1. Absorption**

Le sol ainsi que les solutions nutritives sont principalement à l'origine des éléments traces retrouvés chez les végétaux. Ces organismes prélèvent les métaux sous forme de cations ou sous forme soluble, liée à la matière organique (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Néanmoins, outre la spécificité du végétal, l'incorporation de métaux par la plante est affectée par différents paramètres du sol, tels que le pH, l'Eh, la teneur en eau, en argile et en matière organique, la capacité d'échange cationique et la concentration des autres éléments traces (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Les conditions climatiques influencent également le prélèvement en métaux. En général, une température ambiante importante favorise un plus fort prélèvement par la plante (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

**Tableau 11 : Principales fonctions des éléments essentiels aux végétaux** (d'après Kabata et Kabata-Pendias, 2001).

Eléments	Fonctions principales
Al	activation possible de déshydrogénases et d'oxydases
As	métabolisme des hydrates de carbone chez les algues et champignons
B	métabolisme et transport des hydrates de carbone, synthèse des flavonoïdes et des acides nucléiques
Br	?
Co	fixation symbiotique du N <sub>2</sub>
Cu	oxydation, photosynthèse, métabolisme des protéines et des hydrates de carbone, fixation possible du N <sub>2</sub>
F	conversion du citrate
Fe	photosynthèse, fixation du N <sub>2</sub>
I	?
Li	métabolisme chez les halophytes
Mn	photoproduction d'O <sub>2</sub> dans les chloroplastes et indirectement réduction des NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Mo	fixation du N <sub>2</sub> , réduction des NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Ni	translocation de N
Rb	fonctions similaires à K pour certaines plantes
Se	remplacement possible de S
Si	?
Sr	fonctions similaires à Ca pour certaines plantes
Ti	photosynthèse et rôle possible dans la fixation de N <sub>2</sub>
V	métabolisme des lipides, photosynthèse (algues vertes) et rôle possible dans la fixation de N <sub>2</sub>
Zn	métabolisme des hydrates de carbone, des acides nucléiques et des lipides

De même, la présence des micro-organismes de la rhizosphère peut affecter le prélèvement des contaminants (Pilon-Smits, 2005). Par exemple, des champignons mycorhiziens peuvent améliorer l'incorporation des métaux essentiels quand leurs concentrations sont faibles, ou à l'inverse, diminuer le prélèvement quand les métaux sont présents à des concentrations toxiques (Frey et al, 2000 ; Rufyikiri et al, 2000). Il a été mis en évidence que des bactéries de la rhizosphère peuvent accroître l'incorporation de métaux tels que le mercure et le sélénium (de Souza et al, 1999).

L'absorption des éléments traces métalliques se fait principalement par les racines, de façon active ou passive (Figure 22). Lorsque les concentrations en éléments traces métalliques dans les sols sont élevées, la principale voie d'absorption des métaux se fait par simple diffusion au travers de l'apoplasme<sup>1</sup> du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique). Le transport actif se déroule, quant à lui, contre le gradient chimique et demande donc de l'énergie. Plusieurs études ont montré que l'absorption des éléments traces était contrôlée par des processus métaboliques au sein des racines (Loneragan, 1975 ; Tiffin, 1972).

Cependant, les mécanismes exacts de l'absorption demeurent encore mal connus, en particulier pour le cuivre (Chaignon, 2001) et différent selon l'espèce métallique donnée. Ainsi, le plomb et le nickel sont préférentiellement absorbés passivement tandis que le cuivre, le molybdate et le zinc sont absorbés de façon active (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Si le transport actif est en principe spécifique, certains cations toxiques, tels que le cadmium, le chrome, le césium et le plomb, sont des compétiteurs potentiels vis-à-vis de cations essentiels. Il semblerait que le cadmium soit un compétiteur du calcium et ceci en empruntant les canaux calciques membranaires (Greger, 2004). Ainsi, 70 % du cadmium entrerait dans la racine par ce biais (Greger, 2004).

Les végétaux sont capables de mobiliser ou d'immobiliser les métaux en modifiant leurs conditions rhizosphériques. En effet, les racines et les micro-organismes qui leur sont associés sont capables de produire une grande variété de composés organiques, tels les exsudats racinaires avec les phytosidérophores et les acides organiques, très efficaces dans la libération d'éléments traces fixés dans les sols (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Ces composés chimiques, présents dans la rhizosphère, sont impliqués dans l'augmentation du prélèvement des métaux et leur translocation vers les feuilles, bien que les mécanismes mis en jeu ne soient pas encore déterminés avec précision (Mench & Martin, 1991).

Le maintien d'un certain équilibre dans la rhizosphère implique la libération de protons par les racines lorsqu'elles absorbent plus de cations que d'anions (Hinsinger et al, 2003). Ainsi, le pH dans la rhizosphère apparaît plus faible d'une à deux unités comparé à celui d'un sol non rhizosphérique. Ce changement de pH jouerait un rôle important dans le taux de disponibilité de certains éléments traces (Foy et al, 1978).

---

<sup>1</sup> Chez les végétaux, réseau continu formé par les parois cellulaires et les espaces extracellulaires et à travers lequel des substances peuvent circuler sans avoir à traverser de membrane plasmique (voie apoplastique).

Les acides organiques de faible poids moléculaire libérés dans la rhizosphère ont un rôle significatif dans les processus de dissociation et / ou de complexation mobilisant les formes solubles des éléments traces (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Impliqués dans la mobilisation des métaux, les phytosidérophores sont synthétisés par les Poacées en cas de carence en fer (Marschner, 1995). Ils sont excrétés au niveau de l'apex où ils complexent le fer. Ce complexe est reconnu par des transporteurs spécifiques sur la membrane plasmique des cellules racinaires (Marschner & Romheld, 1994). Cependant, en plus du fer, les phytosidérophores complexent d'autres métaux dans le sol, tels le cadmium, le cuivre, le manganèse et le zinc (Shenker et al, 2001).

## 2. Translocation

Une fois absorbés par les racines, les métaux traversent la membrane plasmique par des transporteurs ou des sites de fixation (Hirsch et al, 1998) (Figure 22). Trois processus semblent impliqués dans la régulation du transfert des métaux depuis les racines au xylème<sup>1</sup> : la séquestration des métaux dans les cellules racinaires, le transport symplastique<sup>2</sup> vers la stèle<sup>3</sup> et la libération dans le xylème (Clemens et al, 2002). Si les éléments indispensables aux végétaux atteignent le xylème par la voie symplasmique, les contaminants inorganiques emprunteraient plutôt la voie apoplastique (Tester & Leigh, 2001).

La chélation des métaux par certains ligands, comme par exemple l'histidine, la nicotianamine et le citrate, favorise leur transport dans le xylème. A l'inverse, la chélation par d'autres ligands, telles les phytochélatines ou les métallothionéines, permettrait la séquestration des métaux dans les racines (Clemens et al, 2002).

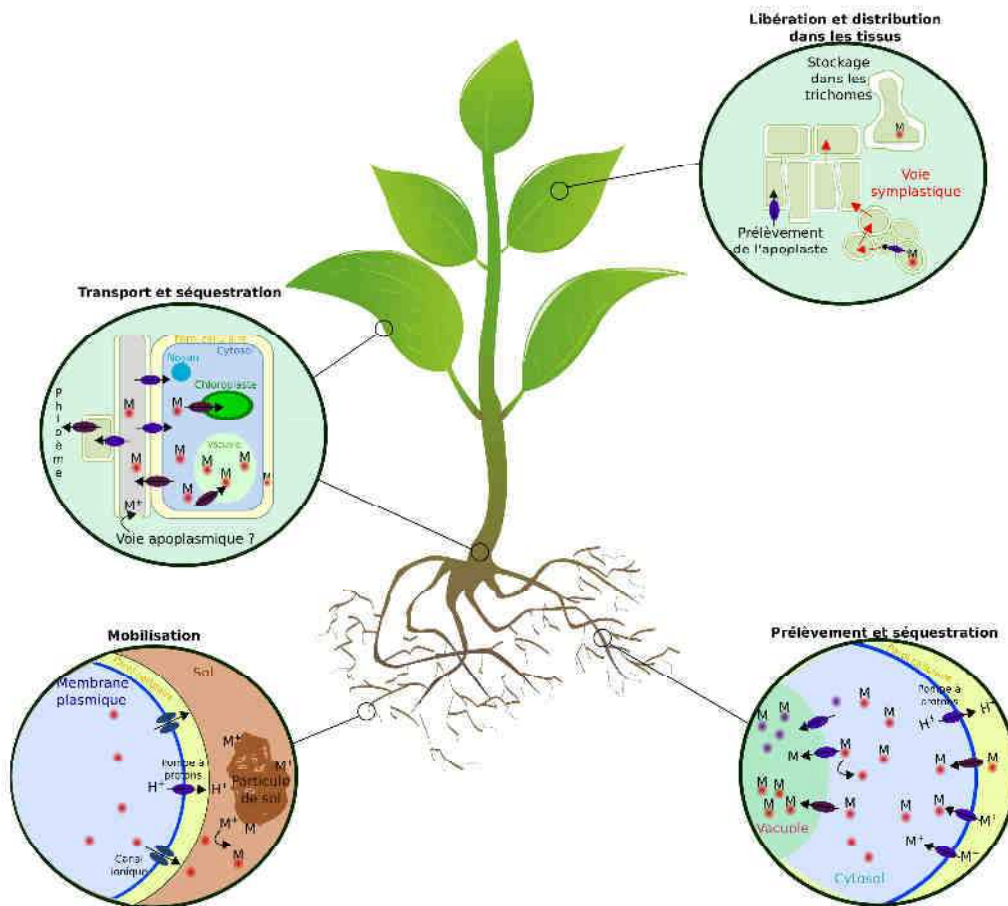
*Via* le xylème, les métaux atteignent ensuite l'apoplasme des feuilles. Pris en charge par diverses molécules, les ions métalliques sont alors stockés sous des formes non toxiques où ils sont séquestrés dans les cellules foliaires (Marschner, 1995).

---

<sup>1</sup> Chez les plantes vasculaires, tissu ligneux qui conduit l'eau et les minéraux.

<sup>2</sup> Voie utilisant le cytoplasme des cellules végétales ainsi que les plasmodesmes, au niveau des ponctuations, pour passer d'un cytoplasme à un autre.

<sup>3</sup> Ensemble des tissus conducteurs primaires occupant la partie centrale d'un organe.



**Figure 22 : Voies de prélèvements des métaux par la plante et mécanismes moléculaires impliqués dans l'absorption et le transport de ces métaux** (adaptée d'après Clemens *et al.*, 2002 ; Peer *et al.*, 2005). Les ions métalliques sont mobilisés par des ligands et acidification de la rhizosphère. Les métaux entrent par les racines par voie symplastique et apoplasmique, complexés ou non à des ligands. À l'intérieur de la cellule, les métaux sont complexés à des ligands et l'excès de métal est transporté dans la vacuole. Depuis les racines, les métaux sont transportés jusqu'aux parties aériennes *via* le xylème. La plus grande proportion atteindrait le xylème par voie symplastique. Au sein du xylème, les métaux sont présents comme ions hydratés ou complexés à des ligands. Après avoir atteint l'apoplasme des feuilles, les métaux se déplacent de cellule en cellule par les plasmodesmes. Le stockage peut se faire, entre autre, dans les trichomes et les vacuoles. Les métaux sont représentés par M ou M<sup>+</sup>, les ligands, par les cercles pleins et les transporteurs par les formes ovales pleines.

Bien que relativement rares (0,2 % des angiospermes, (Miransari, 2011)), certaines plantes, dites hyperaccumulatrices, accumulent des quantités inhabituelles d'éléments métalliques, sans que leur croissance n'en soit affectée. Des taux plus élevés de translocation peuvent s'expliquer par une séquestration des métaux dans les vacuoles racinaires moindre comparée à ce qui est observé chez les plantes non hyperaccumulatrices (Singh *et al.*, 2003). Le système de transport par le xylème pourrait également être plus efficace chez les végétaux hyperaccumulateurs, tout comme leur capacité de compartimentation et de stockage des métaux dans les vacuoles des cellules de la feuille (Miransari, 2011).



## II - Toxicité et tolérance

Le métabolisme des végétaux peut être affecté par des carences en micro-nutriments, ou à l'inverse par un excès, ainsi que par des contaminants. Les premiers effets observables des éléments traces métalliques chez les végétaux sont d'ordre physiologique puis morphologique, comprenant une inhibition de la croissance, s'accompagnant de nombreux autres symptômes, comme par exemple des nécroses et des chloroses (Tableau 12) (Williams et al, 2000). Au niveau cellulaire, la toxicité peut se traduire par une fixation des métaux aux groupements thiols ce qui aura pour effet d'inhiber les activités enzymatiques et les synthèses protéiques (Williams et al, 2000). Ces perturbations résulteraient d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) (Supalkova et al, 2007). Les ROS, en réagissant avec les acides nucléiques, les protéines ou les lipides, engendrent des dégâts cellulaires tels que des mutations, des dysfonctionnements enzymatiques, des perturbations de la photosynthèse ou de la respiration (Briat & Lebrun, 1999; Cheng, 2003). Le résultat peut alors aboutir à une altération des fonctions vitales, conduisant parfois à la mort cellulaire (Briat & Lebrun, 1999).

Les mécanismes de réponses des plantes à la toxicité métallique sont encore relativement mal connus. Néanmoins, 4 mécanismes seraient majoritairement mis en place : la modification de la perméabilité membranaire, le système anti-oxydant, la chélation intracellulaire ainsi que la compartimentation.

**Tableau 12 : Concentrations en éléments traces dans les parties aériennes de végétaux (ppm / MS) et les symptômes qui leur sont associés (d'après Kabata-Pendias et Kabata, 2001).**

Eléments	Teneurs suffisantes	Teneurs en excès ou toxiques	Symptômes
Cd	0,05-0,2	5-30	brunissement des marges foliaires, chloroses, diminution de la croissance racinaire
Cu	5-30	20-100	racines courtes et fines, modification de la teneur en lipides, pertes des polypeptides impliqués dans les activités photochimiques
Ni	0,1-5	10-100	chloroses des nouvelles feuilles, feuillage gris-vert
Pb	5-10	30-300	flétrissement des feuilles âgées, racines courtes et brunes
Zn	27-150	100-400	chloroses et nécroses de l'extrémité des feuilles, chloroses des nervures, croissance de la plante retardée

## 1. Mécanismes impliqués

### 1.1. La membrane plasmique

A travers la double couche de phospholipides, les ions ne peuvent diffuser librement (Lasat, 2002). Le transport actif à travers la membrane plasmique des cellules racinaires est ainsi un processus primordial. En effet, la membrane plasmique peut donc limiter l'accumulation des ions toxiques en modifiant l'ensemble des flux ioniques ou en employant des systèmes très spécifiques, autorisant seulement le flux d'ions non toxiques (Meharg, 1993).

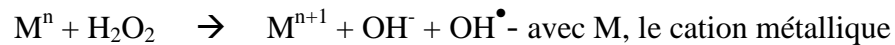
Première barrière physique régulant l'entrée des éléments métalliques dans le cytosol, la membrane plasmique peut également être vue comme la première structure « vivante » et donc une cible non négligeable pour la toxicité des métaux (Hall, 2002). Par exemple, le cuivre provoque un efflux accru de  $K^+$  depuis des racines excisées d'*Agrostis capillaris* (Wainwright & Woolhouse, 1977). La toxicité peut également entraîner un dommage de la membrane par oxydation de protéines membranaires ou inhibition des pompes à protons (Meharg, 1993), facilitant la diffusion des métaux toxiques (Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

Ainsi, la tolérance pourrait être associée à la protection de l'intégrité de la membrane plasmique ou encore à la protection de la fonction des protéines associées, tels les transporteurs, les canaux ioniques ou encore les pompes à protons (Hall, 2002).

### 1.2. Le système anti-oxydant

Le système anti-oxydant jouerait un rôle clé dans la détoxification des éléments traces métalliques ayant pénétré dans la cellule végétale. La notion d'activité anti-oxydante est inévitablement associée aux radicaux libres, c'est-à-dire des molécules instables possédant un électron non apparié.

L'existence des éléments métalliques sous différents états d'oxydation est une des causes de la formation des ROS. En effet, certains cations, tels  $Cr^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ , sont susceptibles de céder un ou plusieurs électrons qui pourront alors réduire l'oxygène et ses dérivés (Briat & Lebrun, 1999). Ces réactions peuvent être décrites par :



Une des réactions les plus connues de ce type est la réaction de Fenton, impliquant le fer ferreux et aboutissant à la réduction du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en radical hydroxyle ( $^\bullet OH$ ) et en anion hydroxyle ( $OH^-$ ).

Bien que l'existence des éléments métalliques sous différents états d'oxydation soit une des origines des ROS, certains éléments n'existant que sous un seul état d'oxydation, comme le nickel et le cadmium, peuvent également induire une accumulation de ROS (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

Pour se protéger contre les effets toxiques des ROS, les végétaux possèdent un grand nombre de molécules anti-oxydantes (acide ascorbique, caroténoïdes, ...) ainsi que des enzymes qui, en agissant en cascade, contrôlent leur production (Gallego et al, 1996) :

- les superoxyde-dismutases (SOD) correspondent aux premières enzymes impliquées dans les processus de détoxification. Elles convertissent les radicaux libres en peroxyde d'hydrogène ;
- les catalases (CAT) et les peroxydases (POX) agissent en synergie avec les SOD. En effet, elles catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

### 1.3. La chélation

La chélation des éléments traces métalliques dans le cytosol par des ligands présentant de fortes affinités pour ces derniers est potentiellement un des mécanismes les plus importants dans les processus de détoxification et de résistance à ces éléments métalliques (Hall, 2002). Ces ligands regroupent les acides aminés, les acides organiques ainsi que deux classes de peptides, les phytochélatines et les métallothionéines (Clemens, 2001 ; Rauser, 1995) :

- les acides aminés libres, comme la proline, l'histidine et la cystéine s'accumulent lors d'un stress métallique et sembleraient être impliqués dans la chélation de divers éléments métalliques (Briat & Lebrun, 1999), conférant ainsi une résistance à la plante. Une concentration accrue en histidine semble responsable de la tolérance au Ni chez *Alyssum lesbiacum* (Kramer et al, 1996) ;
- les acides organiques regroupent des molécules très diverses, comme les acides fumariques, maliques, oxaliques et citriques. Ils sont impliqués dans des processus de tolérance aux métaux, de transport de ces derniers à travers le xylème et de leur

séquestration dans la vacuole (Clemens, 2001). Par exemple, l'acide citrique serait un ligand majeur du  $\text{Cd}^{2+}$  lorsque les concentrations de ce cation sont faibles (Wagner, 1993). Il formerait également des complexes avec  $\text{Ni}^{2+}$  chez les plantes hyperaccumulatrices de ce métal (Sagner et al, 1998) et il contribuerait également à l'accumulation et à la tolérance de zinc (Godbold et al, 1984).

- les phytochélatines (PC) sont de polypeptides de petites tailles, riches en cystéines. Leur biosynthèse, catalysée par des enzymes dites phytochélatines synthases (PC-synthase), est induite très rapidement, quelques minutes seulement après l'exposition aux éléments traces métalliques (Clemens, 2001 ; Rauser, 1995) ;
- les métallothionéines (MT) sont des protéines de faibles poids moléculaire, riches en cystéines et largement distribuées dans le monde vivant. Si les métallothionéines sont impliquées majoritairement dans le transport et la régulation des métaux essentiels tels le cuivre et le zinc (Kohler et al, 2004 ; Roosens et al, 2004 ; Zhang et al, 2004), elles peuvent également se lier aux éléments métalliques non essentiels au développement des végétaux. Ma *et al.* ont en effet montré que des métallothionéines de *Festuca rubra* pouvaient fixer du plomb et du chrome (Ma et al, 2003).

#### 1.4. La compartimentation cellulaire

L'excès de métaux essentiels ou non essentiels pour la plante peuvent être pris en charge pour être stockés sous des formes non toxiques. Ces éléments sont acheminés par différents ligands, tels des acides organiques et des composés riches en cystéines, jusqu'à la vacuole, seuls ou en complexes avec certains ligands. Etant moins sensible aux oxydations que des organites comme les chloroplastes, la vacuole apparaît comme le principal compartiment de stockage (Hall, 2002). Au niveau des tonoplastes, des transporteurs, notamment de type ATP-dépendants, véhiculent ces complexes dans la vacuole où ils sont séquestrés (Kramer et al, 2000). Au niveau des feuilles, les trichomes semblent jouer un rôle important dans le stockage et la détoxification des métaux. Par exemple, chez *Brassica juncea*, l'accumulation de cadmium apparaît 40 fois supérieure dans les trichomes à celle mesurée dans la totalité de la feuille (Salt et al, 1995b).

## 2. Cas des métaux étudiés

Ma thèse s'étant focalisée sur le cadmium et le nickel, nous allons voir précisément le cas de ces deux métaux. De plus, les sidérophores ayant un rôle majoritaire dans la chélation du fer, nous nous intéresserons également à ce dernier.

### 2.1. Le cadmium

#### 2.1.1. Toxicité

Comme il a été vu dans le premier chapitre, libéré par de nombreuses activités industrielles, le cadmium est l'un des principaux polluants métalliques (di Toppi & Gabbrielli, 1999). Bien que non essentiel pour les processus métaboliques des végétaux, le cadmium est prélevé efficacement par les plantes, principalement par leur système racinaire (Kabata-Pendias & Pendias, 2001), l'absorption foliaire du cadmium d'origine atmosphérique étant négligeable dans la majorité des cas (Smolders, 2001). Ainsi, ce contaminant entre facilement dans la chaîne alimentaire. Il apparaît toxique pour tous les organismes vivants, notamment les êtres humains dont la principale source d'exposition est constituée par les fruits et légumes (Adriano, 1986 ; Leblanc et al, 2004).

En augmentant la concentration cellulaire des espèces réactives de l'oxygène et en diminuant le pouvoir anti-oxydant de la cellule, le cadmium peut provoquer, chez les végétaux, des dommages oxydatifs (Corticeiro et al, 2006). De plus, plusieurs métabolismes physiologiques tels que la photosynthèse, l'absorption en eau et en minéraux, l'évapotranspiration ou la respiration, peuvent être perturbés par un excès de cadmium (Wang et al, 2008 ; Yoshihara et al, 2006). Ainsi, des carences minérales, des déshydratations et des oxydations des composants cellulaires provoquant des chloroses, des brunissements des racines et un ralentissement de la croissance peuvent être observés pouvant aboutir rapidement à la mort de la plante (di Toppi & Gabbrielli, 1999 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001).

### 2.1.2. Absorption racinaire

Le prélèvement du cadmium par la plante est dépendant de plusieurs paramètres, comme sa concentration dans le sol et sa biodisponibilité, variable selon la teneur en matière organique, le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, la température ainsi que la concentration des autres éléments métalliques (di Toppi & Gabbrielli, 1999).

Pour pénétrer dans les cellules végétales, le cadmium entre en compétition avec de nombreux cations divalents essentiels ( $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ), mais principalement avec le  $Ca^{2+}$  (di Toppi & Gabbrielli, 1999 ; Rivetta et al, 1997) grâce à un nombre important de transporteurs.

### 2.1.3. Transport et accumulation

Dès son absorption par le système racinaire, le cadmium peut atteindre le xylème par la voie apoplastique et/ou symplastique, complexé par différents ligands comme les acides organiques, les phytochélatines (Cataldo et al, 1988 ; Salt et al, 1995b) et dans une moindre mesure, les métallothionéines (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

De façon similaire à beaucoup de contaminants inorganiques, le cadmium est stocké essentiellement dans la vacuole, son entrée sous forme complexée aux ligands étant réalisée par des transporteurs de type ABC (Verrier et al, 2008).

Au niveau des parois, l'accumulation en grandes quantités du cadmium est observée chez certaines plantes. Ainsi, l'hyperaccumulatrice *Noccaea caerulescens* stocke entre 60 et 70 % de ce contaminant dans les parois (Wojcik et al, 2005). Comme il a été vu dans le paragraphe 1.3.4., une accumulation importante de cadmium peut être observée au niveau des trichomes (Salt et al, 1995b).

### 2.1.4. Phytoremédiation

Au niveau de la plante entière, l'accumulation de cadmium diffère fortement parmi les espèces. Cependant, au sein d'une même espèce, des variations sont également observées selon les tissus et les organes (Ramos et al, 2002). Généralement, les concentrations les plus importantes sont retrouvées au niveau des racines.

Si des espèces hyperaccumulatrices de cadmium sont capables de prélever de grandes quantités de ce contaminant dans leurs parties aériennes (1 000 mg.kg-1 MS) (Miransari, 2011), sans que leur croissance ne soit affectée, les plantes à forte production de biomasse, telle *Brassica juncea*, sont des candidates intéressantes pour des processus de phytoremédiation (Salt et al, 1995b).

## 2.2. Le nickel

### 2.2.1. Toxicité

Bien que naturellement présent dans certains sols (sols ultramafiques), le nickel possède également une origine anthropique très importante (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Si son implication exacte dans le métabolisme végétal reste à élucider, le nickel apparaît comme un élément essentiel à la croissance des végétaux. Néanmoins, à fortes concentrations, cet élément est toxique (Mishra & Kar, 1974). Chez les végétaux, l'apparition de chloroses, le brunissement des racines ainsi que l'inhibition de la photosynthèse, de la respiration et de l'élongation racinaire constituent les symptômes les plus fréquents de cette toxicité (Foy et al, 1978 ; Kramer et al, 1997).

### 2.2.2. Absorption racinaire

Bien que le nickel soit facilement et rapidement prélevé par les plantes, son absorption est cependant affectée par les facteurs environnementaux et pédologiques (Chardot et al, 2007; Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Le pH apparaît comme l'un des paramètres prédominant dans l'influence de l'absorption racinaire (Anderson & Christensen, 1988).

Si l'absorption du cadmium est bien documentée, celle du nickel reste encore mal comprise (Peer et al, 2005). Le métal est habituellement absorbé sous sa forme  $Ni^{2+}$  (Mishra & Kar, 1974) et son prélèvement serait corrélé positivement avec sa concentration dans le sol (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Le nickel serait préférentiellement absorbé par les racines de façon passive (Kabata-Pendias & Pendias, 2001) et sa complexation par l'histidine et des acides organiques tels que le citrate, le malate et le malonate, faciliterait son prélèvement (Kramer et al, 1996 ; Robinson et al, 2003).

### 2.2.3. Transport et accumulation

Dès son absorption par le système racinaire, le Ni peut atteindre le xylème essentiellement par la voie symplastique, complexé par la nicotianamine (Peer et al, 2005).

Bien que le transport et l'accumulation du nickel semblent contrôlés par le métabolisme, ce métal est mobile dans la plante et est principalement accumulé dans les feuilles (Kabata-Pendias & Pendias, 2001) et plus particulièrement dans les vacuoles des cellules de l'épiderme (Kupper et al, 2001). L'accumulation se produit lorsqu'une trop grande quantité de nickel a été prélevée, afin d'éviter tout risque de toxicité pour la plante.

### 2.2.4. Phytoremédiation

Outre les sources anthropiques, le nickel est présent en très grandes quantités dans les sols ultramafiques et, parmi tous les métaux, il est probablement celui provoquant la toxicité la plus importante chez les plantes non adaptées à de telles concentrations (Chardot et al, 2007). La majorité des plantes hyperaccumulatrices de nickel a été collectée sur de tels sols (Peer et al, 2005).

Dans les sols, le nickel est facilement extrait par les plantes. Lorsqu'il est présent à faibles concentrations, les plantes hyperaccumulatrices n'ont pas grand intérêt, des plantes à fortes production de biomasse seront préférées (Peer et al, 2005). A fortes concentrations, l'utilisation de plantes supportant de telles conditions est nécessaire. Parmi les 450 espèces végétales hyperaccumulatrices actuellement recensées, 75 % accumulent le nickel (Miransari, 2011). Parmi ces plantes, celles du genre *Alyssum* sont des candidats efficaces, tout comme *Noccaea caerulea* et *Sebertia acuminata* (Chardot et al, 2007 ; Jaffre et al, 1976 ; Peer et al, 2005). Cette dernière présente un taux d'absorption du Ni supérieure à 25 % (Jaffre et al, 1976).

## 2.3. Le fer

### 2.3.1. Toxicité

Comme il a été vu dans le chapitre 3, le fer, malgré son abondance dans la croûte terrestre, est retrouvé essentiellement sous sa forme oxydée, très peu soluble (Briat &



Lobreaux, 1997). De plus, le fer est souvent associé au phosphore et aux colloïdes, ainsi, les concentrations de cet élément dans les sols cultivés sont souvent faibles (Lindsay, 1979).

Cependant, le fer est un nutriment essentiel au développement des végétaux. Les concentrations nécessaires aux plantes sont de l'ordre du  $10^{-8}$  M ; or dans les sols calcaires, les concentrations retrouvées sont rarement supérieures à  $10^{-10}$  M (Briat & Lobreaux, 1997). Ce déficit peut alors provoquer notamment des nécroses, des ralentissements de la croissance ainsi qu'une inhibition de la photosynthèse et de la respiration (Briat & Vert, 2004 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001). En agriculture, le déficit en fer est un problème majeur, les sols calcaires représentant plus d'un tiers des surfaces cultivables (Briat & Vert, 2004 ; Kabata-Pendias & Pendias, 2001). A l'inverse, dans les sols acides ou humides, les conditions pédologiques favorisent la formation des ions  $Fe^{2+}$ , mais un excès en fer peut également être toxique pour les végétaux. En réagissant avec les formes réduites de l'oxygène, le fer catalyse en effet la production de ROS, entraînant des dommages aux constituants cellulaires.

### 2.3.2. Absorption racinaire

Dans des conditions non limitantes en fer, les végétaux acquièrent ce métal sous sa forme ferreuse, après réduction du fer ferrique à partir du milieu environnant (Briat & Vert, 2004). Cette réduction est réalisée par une réductase présente sur la membrane plasmique des cellules végétales. Dans les sols humides ou acides, le fer, principalement sous sa forme réduite, est directement importé à l'intérieur des cellules de la racine par des transporteurs (Briat & Vert, 2004).

Dans des conditions de carence en fer, les plantes utilisent des systèmes d'acquisition du fer plus performants. Les dicotylédones et les monocotylédones n'appartenant pas aux Poacées développent une réponse nommée « stratégie I » (Marschner et al, 1986). Elle implique l'excrétion de protons au niveau de la racine ainsi que la sécrétion d'acides organiques qui favoriseront la chélation et donc la solubilisation du fer (Bienfait, 1985 ; Marschner et al, 1986). La seconde étape correspond à la réduction du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$  par une activité réductase membranaire. Le fer ferreux est ensuite libéré puis pris en charge par des transporteurs spécifiques (Marschner et al, 1986 ; Robinson et al, 1999). Il est transporté sous forme  $Fe^{2+}$  à travers la membrane plasmique des cellules des racines par des transporteurs.

Les Poacées, quant à elles, ont développé un système très différent, nommé « stratégie II » (Marschner et al, 1986). Dans ce cas, il y a synthèse de phytosidérophores, composés appartenant à la famille des acides muginéiques, possédant une très forte affinité pour le fer ferrique (Marschner et al, 1986). von Wiren *et al.* ont montré que le complexe phytosidérophore-fer est transporté dans la cellule (von Wiren et al, 1995).

### 2.3.3. Transport et accumulation

Dès son absorption par le système racinaire, le fer est complexé dans les cellules par des ligands de type acides organiques (acide citrique et acide malique) ou nicotianamine puis est transporté par voie symplasmique (Briat & Vert, 2004). Le fer est ensuite transporté aux parties aériennes par le xylème.

En cas d'une trop grande accumulation de fer dans les tissus, le métal est stocké afin d'éviter tout risque de toxicité pour la plante. Le lieu privilégié de stockage du fer est l'apoplasme où le fer y est présent sous différentes formes (Briat & Vert, 2004). La vacuole semblerait également être un lieu de stockage de cet élément métallique (Briat & Vert, 2004).

## 2.4. Accumulation multi-métallique

Si un sol est contaminé, il ne l'est rarement que par un seul élément. Aux Etats-Unis, 70 % des sites contaminés le sont par au moins deux éléments (Forstner, 1995). En France, 4 % des sites contaminés le sont à la fois par le nickel et le cadmium (BASOL, 2012).

La biodisponibilité de chacun des métaux peut être altérée par cette présence multi-métallique du fait d'une éventuelle compétition pour les sites de fixation sur les particules du sol, les substances humiques et les agents complexants organiques (Kamnev & van der Lelie, 2000). De plus, les mécanismes de résistance de la plante et le prélèvement d'un métal particulier peuvent être affectés par la combinaison de plusieurs métaux (Krupa & Baszynski, 1995).

Si aucun hyperaccumulateur « universel » n'a encore été découvert, certaines plantes sont capables d'accumuler différents métaux. Les espèces de *Noccaea* sont notamment connues pour hyperaccumuler plus d'un élément trace métallique (Prasad & Freitas, 2003). Par exemple, *Noccaea caerulea* peut co-accumuler le cadmium, le cobalt, le chrome, le

nickel, le plomb et le zinc (Miransari, 2011). De même, les membres de la famille des Brassicaceae sont capables d'accumuler différents métaux, telle *Brassica juncea* avec le cadmium, le chrome, le cuivre, le nickel, le plomb et le zinc (Prasad & Freitas, 2003).

# Objectifs de la thèse



Depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les secteurs de l'industrie et de l'agriculture se sont développés de part le monde sans égard pour l'environnement entraînant des accumulations d'éléments métalliques dans les sols (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Dans ces écosystèmes, la fraction vivante, composée de végétaux, de petits animaux, de champignons, de lichens et de bactéries, possède une activité importante intervenant dans la modification de la rétention des contaminants organiques (Kabata-Pendias & Pendias, 2001 ; Warscheid & Braams, 2000). Ces contaminants inorganiques, ne pouvant être dégradés, persistent indéfiniment dans l'environnement. Ainsi, au cours des deux dernières décennies, des techniques de décontamination ont vu le jour. Parmi ces méthodes, la phytoremédiation, peu coûteuse et respectueuse de l'environnement, apparaît comme un outil de choix. Néanmoins, un inconvénient majeur de la phytoremédiation réside dans les durées de traitement pouvant atteindre plusieurs années. L'ajout de micro-organismes d'intérêt, couplé aux plantes, améliorerait les prélèvements et réduirait les temps de traitement.

Durant ma thèse, j'ai étudié les possibilités de développer des procédés de phytoextraction associés avec des bactéries productrices de sidérophores. Dans ce contexte, j'ai travaillé sur un système de complexité croissante jusqu'à l'obtention du modèle complet comprenant : les constituants du sol, les bactéries, les métaux contaminants et les plantes, avec pour objectif la compréhension des processus intervenant dans ces différentes interactions. Le micro-organisme de ce travail est *Pseudomonas aeruginosa*, bactérie à Gram négatif, modèle dans notre équipe de recherche et pour lequel les mécanismes de production de sidérophores et de transport de complexes sidérophore-métaux sont les mieux connus. En cas de carence en fer, cette bactérie synthétise et sécrète deux sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline. Ainsi, plusieurs grands axes ont été étudiés durant ces trois années.

1. Tout d'abord, j'ai étudié les mécanismes impliqués dans les interactions entre les constituants du sol, les smectites, et un sidérophore purifié, la pyoverdine. Notre hypothèse était que la pyoverdine, puissant chélateur du fer, était capable de complexer le fer constitutif de cette argile. Pour cela, nous avons réalisé des dosages par ICP-AES et utilisé les propriétés de fluorescence de la pyoverdine.
2. Dans la littérature, la dissolution des minéraux par les micro-organismes reste encore mal comprise et la majorité des études est réalisée, comme notre première approche, avec des sidérophores et non des bactéries et ceci, généralement avec une méthodologie géochimique. Ainsi, dans un second temps, j'ai étudié les

interactions entre les smectites ainsi que les goethites et la bactérie productrice de sidérophores, *P. aeruginosa*. Pour comprendre les mécanismes impliqués entre ces partenaires, j'ai utilisé une approche de biologie moléculaire grâce à des souches mutantes dans la production de sidérophores, décrite pour la première fois dans ce type d'étude.

3. Par la suite, en vue des expériences de prélèvement de contaminants métalliques par la plante couplées aux bactéries, je me suis intéressée à la capacité de la pyoverdine à complexer les éléments traces métalliques de l'étude, adsorbés sur les smectites ou présents dans la structure cristalline des goethites. En effet, il a été montré récemment, au laboratoire, que la pyoverdine synthétisée par *P. aeruginosa* était capable de chélater des métaux autres que le fer, tels que le nickel et le cadmium. Ces études ont également été réalisées grâce à la fluorimétrie et des dosages par ICP-AES.
4. Les premières expériences de prélèvements des contaminants métalliques par la plante ont été réalisées en présence de pyoverdine purifiée dans un milieu de culture de plantes contenant des argiles contaminées par du cadmium ou du nickel. Ces expériences ont été réalisées en conditions hydroponiques. La plante choisie est la tomate, *Lycopersicon esculentum* cv Saint-Pierre. Cette expérience avait pour objectif de déterminer le rôle de la pyoverdine dans l'amélioration du prélèvement des contaminants par la plante.
5. Le système dans sa globalité, faisant intervenir tous les partenaires, a pu être réalisé. Pour cela, j'ai dû mettre au point un milieu de culture permettant la survie aussi bien des plantes que des bactéries ainsi que la production de sidérophores. L'objectif était d'étudier l'impact de *P. aeruginosa* sur le prélèvement par la plante de contaminants métalliques.
6. Enfin, la capacité de la pyoverdine à affecter la mise en solution de contaminants métalliques depuis une phase solide mixte de type organo-minérale, telle qu'un sol, a été étudiée. Ces expériences ont été réalisées en galettes de sol polycontaminé, reflétant les conditions rencontrées dans l'environnement.

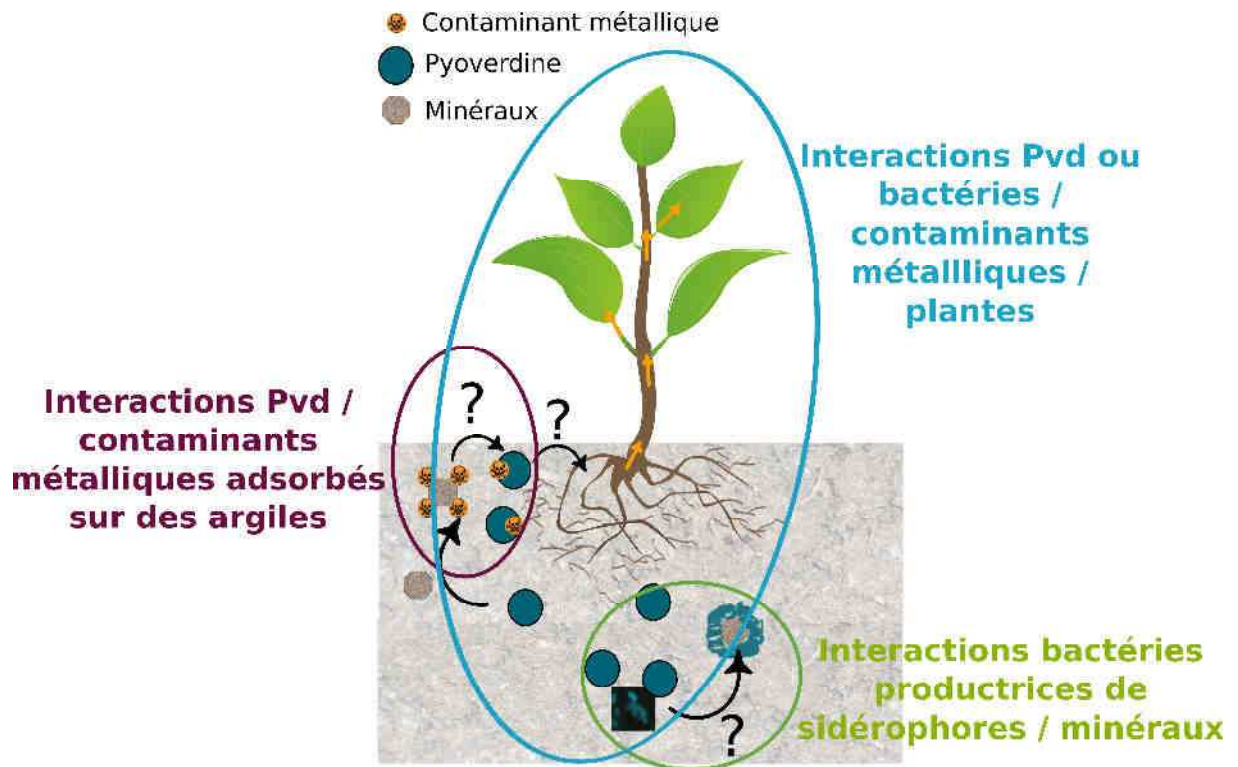


Figure 23 : Schéma hypothétique des différentes interactions étudiées durant cette thèse.





# Résultats



## *Chapitre 7*

Rôle des sidérophores et du biofilm  
dans les interactions  
entre bactéries et minéraux



# **Introduction**



Par l'implication de divers mécanismes, les métaux lourds sont retenus dans les sols et les sédiments. Parmi les constituants impliqués dans la rétention des éléments traces métalliques (carbonates, phosphates, sulfates, matière organique), les argiles et les hydroxydes de fer jouent un rôle clé dans cette mobilisation (Apak, 2002 ; Bradl, 2004; Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Dans les sols, les micro-organismes, très présents, peuvent altérer les minéraux afin d'obtenir des micro-éléments, tels que le fer, essentiels à leur métabolisme. Par conséquence indirecte, les micro-organismes peuvent ainsi contribuer à la mobilité des métaux contaminants piégés dans les phases minérales. Un certain nombre d'études s'est intéressé à l'influence des facteurs biologiques sur l'altération des minéraux, et en particulier par les sidérophores, notamment la desferrioxamine, pouvant être acquise facilement par les laboratoires. Néanmoins, la majorité des études, généralement basée sur une approche géochimique (Kraemer, 2004), est réalisée avec des sidérophores, en l'absence des bactéries qui les synthétisent.

Dans les sols, les populations indigènes de *Pseudomonas* fluorescents sont ubiquitaires (Latour et al, 1999) et représentent un des groupes bactériens important au niveau de la rhizosphère. Cependant, très peu d'études se sont focalisées sur l'influence de ces bactéries sur les minéraux du sol. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux interactions possibles entre les *Pseudomonas* fluorescents et les deux minéraux les plus représentés au niveau du sol, les argiles et les hydroxydes de fer. Les mécanismes de production et d'assimilation du fer ont été majoritairement étudiés chez *P. aeruginosa*, qui est la bactérie d'intérêt de cette étude. Ce micro-organisme est d'autant plus intéressant car il synthétise deux sidérophores, la pyoverdine et la pyochéline. De plus, *P. aeruginosa* est considéré comme un modèle bactérien dans la production de biofilm (Espinosa-Urgel et al, 2002). Une autre espèce de *Pseudomonas* fluorescents, *Pseudomonas putida*, a également été utilisée dans cette étude, notamment dans les expériences en présence de smectite.

Au sein des minéraux argileux, nous nous sommes focalisés sur les smectites. Parmi les hydroxydes de fer, les hématites ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) et les goethites ( $\text{FeOOH}$ ) sont les plus fréquemment retrouvées. De part leur ubiquité dans les sols, nous avons choisi d'étudier le cas des goethites. Outre la goethite pure, nous nous sommes également intéressés, dans cette étude, à des goethites présentant d'autres cations métalliques dans leur structure, comme cela peut être observé dans les sols. Nous avons ainsi étudié des goethites substituées en cadmium et en nickel, les deux éléments traces métalliques de notre étude, ainsi qu'une goethite substituée en aluminium, une substitution fréquemment observée dans les sols (Maurice et al, 2000).



Contrairement aux smectites, les études s'intéressant aux mécanismes de dissolution des oxy-hydroxydes, en particulier des goethites, par les sidérophores sont plus nombreuses (Kraemer, 2004). Cependant, la très grande majorité de ces études porte sur la dissolution de ces minéraux par ajout du sidérophore, souvent commercial. Seules quelques études ont été réalisées sur la dissolution des goethites en présence de bactéries mais avec une approche géochimique et non biologique (Bousserrhine et al, 1999 ; Maurice et al, 2000).

Afin de comprendre l'implication des sidérophores produits par *P. aeruginosa* dans l'altération de ces deux minéraux, des souches mutantes dans la synthèse de la pyoverdine et/ou de la pyochéline ont été utilisées pour la première fois dans ce type d'étude. De plus, en présence des minéraux, *P. aeruginosa* a formé un biofilm enrobant ces derniers dans une matrice d'exopolysaccharides. Une partie des résultats obtenus sur les interactions avec les smectites a été décrite dans un article soumis à *Environmental Microbiology*, intitulé « Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas* ».

Dans une première partie, l'article ainsi que ses résultats complémentaires seront présentés. Ensuite, dans une seconde partie, nous étudierons les interactions entre *P. aeruginosa* et les goethites, en condition de carence en fer.

La préparation et la caractérisation des smectites ont été réalisées au Laboratoire Sol et Environnement (Institut National Polytechnique de Lorraine à Nancy) par Sophie RAOUS, doctorante. La synthèse et la caractérisation des goethites ont été réalisées au sein du Laboratoire Sol et Environnement ainsi qu'au Laboratoire d'Hydrologie et de Géochimie (UMR 7517, Strasbourg) par le Dr. Stéphanie LAWNICZAK. Les dosages par ICP-AES de ces différentes études ont été réalisés par le Dr. Thibault STERCKEMAN du Laboratoire Sol et Environnement, par Sophie GANGLOFF, ingénieure d'étude au Laboratoire d'Hydrologie et de Géochimie de Strasbourg et par le Dr. Jean-Yves CORNU du Laboratoire Vigne Biotechnologies et Environnement (Université de Haute Alsace, Colmar).

**Dissolution des smectites par  
les sidérophores en présence de  
*Pseudomonas* fluorescents**

Siderophore-promoted  
dissolution of smectite by  
fluorescent *Pseudomonas*

Claire FERRET, Thibault STERCKEMAN,  
Jean-Yves CORNU, Sophie GANGLOFF,  
Isabelle SCHALK, Valérie GEOFFROY

Soumis à Environmental Microbiology



**Siderophore-promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas***

Claire Ferret<sup>1</sup>, Thibault Sterckeman<sup>2, 3</sup>, Jean-Yves Cornu<sup>4\*</sup>, Sophie Gangloff<sup>5</sup>, Isabelle J.

Schalk<sup>1</sup>, Valérie A. Geoffroy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR 7242, Université de Strasbourg-CNRS, ESBS, Bd S. Brant, F-67412 Illkirch Cedex, France

<sup>2</sup> INRA, Laboratoire Sols et Environnement, UMR 1120, BP 172, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, F-54505, France

<sup>3</sup> Université de Nancy, Laboratoire Sols et Environnement, UMR 1120, BP 172, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, F-54505, France

<sup>4</sup> Université de Haute-Alsace, EA 3991 LVBE, 68008 Colmar Cedex, France

<sup>5</sup> Laboratoire d'Hydrologie et de Géochimie de Strasbourg, Université de Strasbourg, EOST, UMR 7517 CNRS, 1 rue Blessig, 67084 Strasbourg cedex, France

To whom correspondence should be addressed: V. A. Geoffroy, UMR 7242, Université de Strasbourg-CNRS, ESBS, Transports Membranaires Bactériens, Bd Brant, BP 10413, 67412 Illkirch Cedex France.

Email : [valerie.geoffroy@unistra.fr](mailto:valerie.geoffroy@unistra.fr)

Tel. (+33) 3 68 85 47 51

Fax (+33) 3 68 85 48 29

\* present adress: INRA (Institut National de la Recherche Agronomique), UMR 1220, TCEM (Transfert sol-plante et Cycle des Eléments Minéraux dans les écosystèmes cultivés), Villenave d'Ornon, F-33883, France.

**ABSTRACT**

Siderophores are organic chelators, produced by microorganisms to fulfill their iron requirements. Siderophore-promoted dissolution of iron-bearing minerals has been clearly documented for some siderophores but few studies have addressed metabolizing siderophore-producing bacteria. We investigated iron acquisition from minerals by fluorescent *Pseudomonads*, major plant growth-promoting rhizobacteria that are ubiquitous in the environment.

We focused on the interactions between smectite and *Pseudomonas aeruginosa*, a bacterium producing two structurally different siderophores: pyoverdine and pyochelin. The presence of smectite in iron-limited growth media promoted planktonic growth of *P. aeruginosa* and biofilm surrounding the smectite aggregates. Chemical analysis of the culture media indicated increases in the dissolved silicon, iron and aluminum concentrations following smectite supplementation. We studied *P. aeruginosa* mutants unable to produce either one or both of the two siderophores. These experiments indicate that pyoverdine, the siderophore with the higher affinity for iron, was involved in iron and aluminum solubilization by the wild-type strain. However, in the absence of pyoverdine, pyochelin was also able to solubilize iron, but with a two-fold lower efficiency. This study demonstrates that both pyoverdine and pyochelin, two structurally different siderophores, can solubilize structural iron from smectite and thereby make it available for bacterial growth.

## INTRODUCTION

Siderophores are low-molecular-weight organic chelating agents produced by microorganisms to overcome the low bioavailability of iron. Iron is an essential micronutrient for all forms of life, and is required for key biological processes including nucleotide and amino acid synthesis, DNA repair and cytochrome activity. However, despite its biological importance, iron is poorly bioavailable under aerobic conditions at neutral pH because of its low solubility (Kraemer, 2004). Siderophores are excreted by bacteria into their environment, where their biological function is to solubilize and bind iron; the resulting ferric-siderophore complexes are then transported back into bacterial cells via specific outer-membrane transporters (Schalk, 2008). More than 500 siderophores with different chemical structures have now been described forming a large family of organic chelators (Boukhalfa and Crumbliss, 2002; Hider and Kong, 2011). They are released by bacteria under iron-limiting conditions in various environments, such as in the rhizosphere, where bacterial hydroxamate siderophore concentrations have been estimated to be between  $10^{-7}$  and  $10^{-8}$  M and in soil, where phytosiderophore concentrations may be up to 1mM (Powell et al., 1980; Roemheld, 1991). Siderophore concentrations may be even higher in microenvironments such as biofilms (Liermann et al., 2000), *i.e.* multicellular bacterial aggregates encased in an extracellular polymeric matrix. All siderophores are characterized by a very high affinity for iron, with stability constants in the range of about  $10^{23}$  to  $10^{52}$  M<sup>-1</sup> (Hider and Kong, 2011); many siderophores thus have a much higher affinity for iron than EDTA ( $10^{23.8}$  to  $10^{25.1}$  M<sup>-1</sup>) (Martell et al., 2004) and of low molecular weight organic acids such as oxalic acid ( $10^{7.5}$  M<sup>-1</sup>) (Perrin, 1979). These powerful ligands have therefore a strong capacity to solubilize this metal from diverse environmental sources. In soil, iron is mainly present in mineral phases, such as clays or iron-(hydr)oxides, where iron solubility is very low in usual soil conditions (aerobic and slightly acid to alkaline). The solubility of soil minerals depend

on (i) properties of the solid, such as surface area, crystal sizes and cristallinity and (ii) on the composition of the aqueous phase with a strong influence of the pH, ionic strength and reducing conditions. Fe solubility in soil can also be influenced by organic compounds, as the metal can be complexed with organic acids produced by plants or microorganisms, in particular siderophores.

There has been considerable interest in siderophore-promoted dissolution of iron-bearing (hydr-)oxides to elucidate the role of microorganisms in mineral alteration (Watteau and Berthelin, 1994; Hersman et al., 1995; Holmen and Casey, 1996; Holmen et al., 1999; Kraemer et al., 1999; Hersman et al., 2000; Coccozza et al., 2002). However, dissolution experiments have been mainly performed with a limited number of siderophores, and often with the commercially available hydroxamate siderophore desferrioxamine B (DFO-B) (Kraemer, 2004). A synergistic effect has been observed in abiotic experiments combining DFO-B and organic acids for goethite dissolution, a Fe (III) hydroxide mineral often found in soil (Cheah et al., 2003; Dehner et al., 2010). However, few studies have been investigated clays (Rosenberg and Maurice, 2003; Sibner-Freibach et al., 2004). DFO-B and desferrioxamine D (DFO-D) have been shown to have high affinities for smectite (Neubauer et al., 2000; Haack et al., 2008, Maurice et al., 2009), and the metal-siderophore complexes are adsorbed in the interlamellar region of the clay, indicating smectite dissolution. Although the interactions between microorganisms and minerals are increasingly being studied, the involvement of metabolizing siderophore-producing microorganisms and particularly biofilm producers in mineral alteration is still not completely understood. Experiments involving batch cultures with the dissimilatory iron-reducing bacterium *Shewanella putrefaciens*, using iron as a terminal electron acceptor for oxidative phosphorylation, revealed the ability of this bacterium to live on smectite as an iron source and to form biofilm-smectite aggregates. Moreover, the presence of these bacteria influenced the properties of the mineral by

enhancing the amount of adsorbed interlayer water and the available pore space (Perdrial *et al.*, 2009). Reduction of structural Fe(III) in clay by bacteria is known to decrease the swelling significantly (Stucky *et al.*, 1987; Stucky and Kostka, 2006), and alter structural properties of smectites and the chemical reactivity of soils by mediating redox cycling of iron in the environment (Wu *et al.*, 1988; Lovley, 1991; Ernstsens *et al.*, 1998; Kostka *et al.*, 1999).

In soils, indigenous populations of aerobic bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* are very common (Latour *et al.*, 1999). These bacteria require Fe in the  $\mu\text{M}$  range for metabolic processes. Fluorescent *Pseudomonas* are characterized by the production under iron deficient conditions of a fluorescent yellow green siderophore, called pyoverdine, which has a stability constant for iron of about  $10^{32} \text{ M}^{-1}$  (Albrecht-Gary *et al.*, 1994; Visca *et al.*, 2007). Pyoverdine biosynthesis and iron uptake by these siderophores has been best studied for *Pseudomonas aeruginosa* which will be used as a model in the present study (Schalk, 2008; Visca *et al.*, 2007). *P. aeruginosa* also produces a second siderophore called pyochelin, with a stability constant for iron of  $10^{17} \text{ M}^{-1}$  (Brandel *et al.*, 2012). As for pyoverdine, pyochelin biosynthesis has been most extensively studied in *P. aeruginosa* (Youard *et al.*, 2011) and is modulated by both the amount of iron present in the environment and the amount of iron already acquired by the bacterium (Michel *et al.*, 2007). Pyoverdine and pyochelin both complex a variety of metals in addition to iron, such as  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Ga}^{3+}$ . With the exception of  $\text{Ga}^{3+}$ , these metals are not efficiently internalized by bacteria via siderophore pathways (Braud *et al.*, 2009a; Braud *et al.*, 2009b; Hannauer *et al.*, 2012; Schalk, 2011).

Despite their ubiquity, little is known about the interaction between iron-bearing minerals and fluorescent *Pseudomonas*. Microbially mediated mineral weathering has been mostly studied for *Pseudomonas* species unable to produce pyoverdine, and producing siderophores of the ferrioxamine family or the siderophore PDTC (pyridine-2,6-



bis(thiocarboxylic acid). In particular, *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas mendocina* use siderophores as a means to access mineral-bound Fe and to enhance hematite ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ) or kaolinite ( $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$ ) dissolution (Hersman et al., 1996; Ams et al., 2002; Dehner et al., 2010).

Iron solubilization by a pyoverdine-type siderophore, azotobactin, from glauconite ( $\text{K}_2(\text{Mg,Fe})_2\text{Al}_6(\text{Si}_4\text{O}_{10})_3(\text{OH})_{12}$ ) and olivine ( $\text{(Mg,Fe)}_2\text{SiO}_4$ ) and also by the catechol-type siderophore azotochelin and aminochelin but with a slower rate have been reported (Page and Grant, 1988). Gates and co-workers studied the influence of fluorescent *Pseudomonas* bacteria on clay swelling and texture but without exploring the biological mechanism involving siderophore pathways (Gates et al., 1996; Gates et al., 1998).

Mineral weathering influences the porosities and permeability of soils, the overall cycling of elements, and the mobility and bioavailability of adsorbed nutrients and contaminants (trace metals, organic molecules, radionuclides). Understanding the molecular mechanisms of such alterations is therefore essential. To our knowledge, the interactions between fluorescent *Pseudomonas*, their respective siderophores and clay have not been described. We therefore investigated the alteration of smectite by *Pseudomonas aeruginosa*, and focused on the role of the siderophores pyoverdine and pyochéline in this process.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Clay minerals: smectite.** Smectite was extracted from bentonite (Georgia, Europe) from the mine in Ozurgeti. A suspension of 20 g of bentonite in 700 mL of distilled water, containing 40 mL of Amberlite IR Na resin to facilitate dispersion, was shaken for 16 hrs. The mixture was filtered and poured into 30 cm measuring cylinders, mixed for 1 minute and decanted (between 14 and 16 hrs). After decantation, the supernatant (the upper 20 cm according to Stokes' law) corresponding to the clay fraction (particles of 2  $\mu\text{m}$  in diameter) was recovered, transferred in small bottles and centrifuged (4,000 g, 1 h). The pellets were dried at 75°C for 24 hrs.

X-ray diffractograms of the purified smectite showed loss of the accessory minerals, and particularly quartz and carbonates, present in the bentonite. Removal of carbonates was confirmed by infrared spectroscopy. Iron oxides are not detectable. However, infrared spectroscopy showed the possible presence of residual silica or colloidal crystalline. The CEC of the smectite was 98.4  $\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1}$ . The elemental composition of the smectite preparation is presented in table 1. Neglecting Ti and Ca, its structural composition was estimated as (Devineau *et al.*, 2004):  $\text{K}_{0.102}\text{Na}_{0.389}[\text{Al}_{1.410}\text{Mg}_{0.387}\text{FeII}_{0.058}\text{FeIII}_{0.145}] [\text{Si}_{3.954}\text{Al}_{0.046}] \text{O}_{10}(\text{OH})_2$ . The smectite preparation was sterilized by a combination of heat and chemical treatments chosen to preserve the layer structures: the samples were subjected to tyndallization treatment, with three cycles of heating for 2 hrs per day at 90°C, followed by 15 days of incubation in chloroform (Hasnaoui *et al.*, 2001). The smectite was then rehydrated to a concentration of 20  $\text{g L}^{-1}$  in distilled deionized water.

**Table 1: Characteristics of the smectite preparation used in the experiments.**

Characteristics of smectite										
	Interlayer cation		CEC (cmol+/kg)			Surface area (m <sup>2</sup> /g)				
Smectite	Ca		98.4			72.48				
Elemental composition of smectite (% oxide)										
	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	TiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Smectite	58.35	18.25	4.08	-	3.88	0.04	2.95	1.16	0.42	-

**Bacterial strains and growth conditions.** We used the wild-type *P. aeruginosa* ATCC 15692 strain and three siderophore mutants: PAO6297 (a pyochelin-deficient strain (Serino et al., 1995)), PAO6382 (a pyoverdine-deficient strain (Braun et al., 2009)) and PAO6383 (a pyoverdine- and pyochelin-deficient strain (Michel et al., 2007)). Bacteria were grown at 30°C overnight in LB broth medium at 200 rpm. For iron-depleted culture, cells were harvested from a LB pre-culture (24 hrs incubation), washed twice in an iron-deficient succinate medium (composition in g L<sup>-1</sup>: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.2; sodium succinate, 4.0; pH adjusted to 7.0 by addition of NaOH) (Meyer and Abdallah, 1978) and used to inoculate fresh medium. The cultures were incubated for 48 hrs under shaking (200 rpm) and then centrifuged (10 min at 8,600 g) and washed twice with succinate medium. Bacterial cell density was determined by measuring the optical density (OD) at 600 nm.

Growth in the presence of smectites was performed in polycarbonate Erlenmeyer flasks (125 mL) in 20 mL of succinate medium supplemented with one of a series of concentrations of smectite (0, 0.2, 1 and 10 g L<sup>-1</sup>). Each Erlenmeyer flask was inoculated with bacterial cells to a final OD<sub>600</sub> of 0.05 per mL. Controls without bacteria or without clay were included. Erlenmeyer flasks were incubated at 30°C and shaken at 200 rpm for 28 hrs. One mL aliquots were removed after 4, 8, 24, and 28 hrs of incubation and bacteria enumerated: samples were serially diluted and plated on LB agar plates incubated at 30°C for 24 hrs. Results are

expressed as “colony forming units” (CFU) per mL. For each growth condition, the pH and the redox potential (Eh) were monitored at the beginning and at the end of the experiment.

**Monitoring siderophore production in batch experiments.** For each time point of bacterial growth, 1 mL of culture was centrifuged for 10 min at 8,600 g and the amount of pyoverdine in solution in the supernatant was estimated by monitoring absorbance at 400 nm (Folschweiller et al., 2002). To measure pyoverdine trapped in the biofilm matrix, pyoverdine was extracted using sodo-calcic glass beads in 10 mL of 200 mM Tris-HCl pH 7.0 buffer and the absorbance monitored at 400 nm ( $\epsilon = 19\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  for pyoverdine at pH 7). Fluorescence microscopy was used to check the destruction of the biofilm.

The bacteria produce less pyochelin than pyoverdine and pyochelin cannot be detected directly in culture supernatants without prior extraction. Due to the limited volumes of culture supernatant available, this study focused only on pyoverdine.

**Metal detection in bacterial batch growth experiments.** *P. aeruginosa* cells were incubated in the presence of smectite in succinate media. After 28 hrs of growth, the cultures were centrifuged for 15 min at 4,500 g, and filtered through a 0.2  $\mu\text{m}$  pore-size membrane. The filtrate was acidified to pH 1.0 with 70%  $\text{HNO}_3$ , and Al, Fe and Si were assayed by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES, Liberty II, Varian, Inc, Palo Alto, California). A certified solution (EU-H-2, SCP Science, Courtaboeuf, France) was included in the analyses as a control for the determination step.

**Biofilm quantification.** Biofilm formation in the presence or absence of smectite was tested in 6-well plates (Greiner, TC-plate CELLSTAR), filled with 3 mL of succinate medium supplemented with a series of concentrations of smectite (0, 0.2, 1 and 10  $\text{g L}^{-1}$ ). Each well

was inoculated with bacterial cells to a final OD<sub>600</sub> of 0.05 and incubated at 30 °C for 28 hrs on a shaker (50 rpm). Controls without bacteria were included. For violet crystal treatment, culture supernatants were carefully removed and the biofilm washed twice with sterile distilled water. One mL of 0.5 % crystal violet was added and left in contact for 15 min at room temperature with gentle agitation. The solution was removed, the biofilm was washed twice in sterile distilled water, and then the crystal violet was eluted with 2 mL of ethanol. Biofilm was then quantified by measuring the absorbance at 570 nm of the eluted crystal violet.

**Microscopy.** Smectite incubated for 28 hrs with or without bacteria in the succinate medium was examined under light and epifluorescence microscope (Nikon Eclipse 50i, objective: CFI Achroplan 100 x A ON 1.25 DT 0.18) connected to a numerix 12 bits DS-Fi1 camera. Biofilm, stained naturally by the pyoverdine produced, was detected with a Bv2A Filter set (excitation 400-440 nm, emission 470 nm, dichroic filter 455 long pass). Images were captured using NIS imaging software elements.

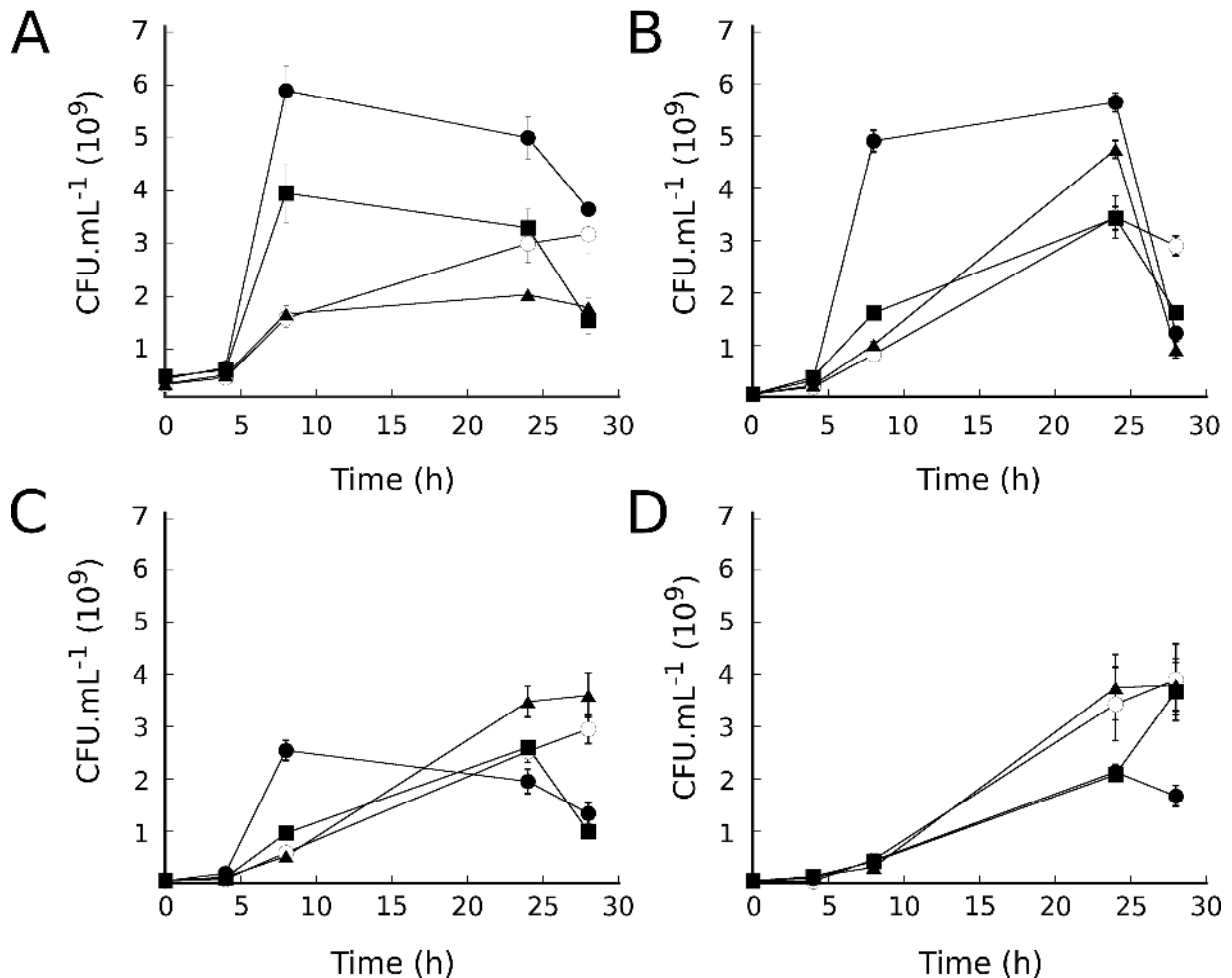
**Pyoverdine sorption on smectite.** One g L<sup>-1</sup> of smectite was incubated in the presence of 250 µM of pyoverdine in 10 mL of 2 mM MES, 725 µM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> buffer in 50 mL Falcon tubes and shaken at 220 rpm. Controls without siderophore or without smectite were run in parallel. At various times (0, 1, 8, 24, 48 hrs), samples were centrifuged (8.000 g, 20 min), and the supernatants were filtered (0.22 µm pore-size filters), acidified (to pH 1.0 with 70% HNO<sub>3</sub>) and assayed for Fe and Al contents by ICP-AES. One mL aliquots of the supernatant collected before acidification were used to measure siderophore concentrations by visible light absorption (OD<sub>400 nm</sub>).

## RESULTS

***Bacterial growth stimulation by smectite in iron-limited media.*** To investigate whether bacteria may use the iron present in smectite as an iron source, wild-type *P. aeruginosa* cells were grown under agitation in succinate medium supplemented with a series of concentrations of smectite (Figure 1A). The total metal composition of succinate medium has been published previously (Hannauer *et al.*, 2012) (Figure 1A). Growth curve shapes for cultures in the presence of smectite were typical of bacterial growth in a batch system, with the four distinct phases characterizing the bacterial growth cycle: lag, exponential, stationary and death phases. Smectite supplementation allowed *P. aeruginosa* to grow a higher population than in non-smectite containing controls. The growth stimulation was smectite dose-dependent from 0.2 to 10 g L<sup>-1</sup>. Thus, in the iron-limited medium used, nutrient associated with smectite seems to be available to bacteria. The pH of the medium increased from 7 to 9 in parallel with the bacterial growth due to the consumption of succinic acid; the pH of uninoculated medium remained constant. Bacterial metabolism tends towards a more reductive medium: the Eh value decreased from + 649 mV to + 449 mV versus NHE during bacterial growth in the presence or absence of smectite; no Eh change was observed in uninoculated control samples.

***Growth of siderophore mutants in response to smectite supplementation in iron-limited media.*** *P. aeruginosa* strains unable to produce either pyoverdine or pyocheline, or both siderophores were grown in succinate media in the presence of a series of smectite concentrations (Figure 1B-D). Significant differences between mutant growth kinetics were observed after 8 hrs of culture: pyoverdine-producing strains grew in the presence of smectite; the mutant producing only pyochelin grew more slowly and only at the highest smectite concentration (10 g L<sup>-1</sup>). In contrast, the double mutant exhibited a longer lag phase than the other strains and its growth was indistinguishable in the presence and absence of smectite.

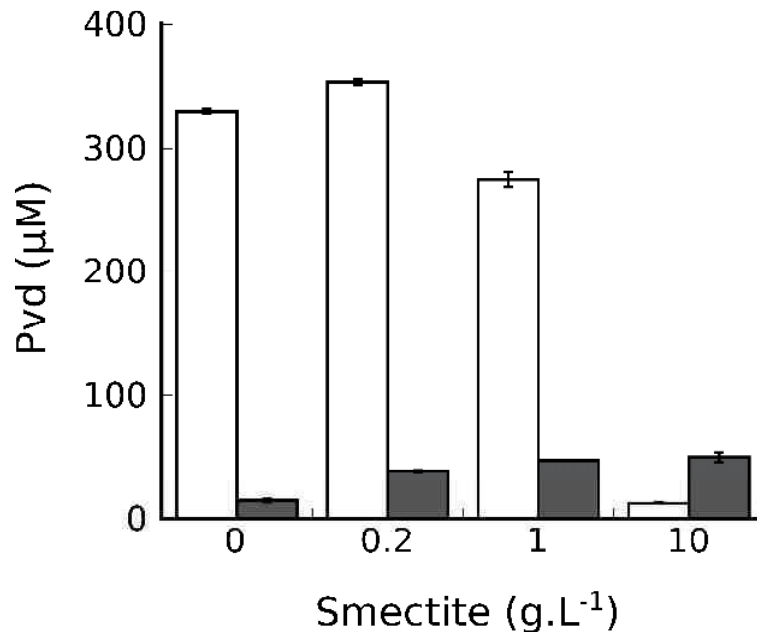
Thus, secreted siderophores seem to be necessary for Fe assimilation from smectite in the early phase of growth (Figure 1). Pyoverdine and to a lesser extent pyochelin are able to provide iron from smectite to the cells.



**Figure 1:** Growth curves of (A) WT *P. aeruginosa*; (B) PAO6297, a pyochelin mutant; (C) PAO6382, a pyoverdine mutant and (D) PAO6383, a pyoverdine and pyochelin mutant in iron-depleted media in the presence of a series of concentrations of smectite. Bacteria were grown in succinate medium in the absence (O) or in the presence of 0.2 g L<sup>-1</sup>, ▲ ; 1 g L<sup>-1</sup>, ■ ; 10 g L<sup>-1</sup>, ● smectite. The values are means of three independent experiments.

**Pyoverdine production.** To determine the amount of pyoverdine present in growth media, smectite and *P. aeruginosa* cells grown in succinate media were pelleted and the absorbance at 400 nm determined in the supernatant. This approach does not detect pyoverdine present in biofilm, but only that in solution. In the absence of smectite, the

concentration of pyoverdine (325  $\mu\text{M}$ ) in an iron-limited medium was high (Figure 2); in the presence of smectite, which contains 2.85 % iron (Table 1), the concentration of pyoverdine in the medium decreased with increasing smectite concentration from 350  $\mu\text{M}$  to 10  $\mu\text{M}$  pyoverdine for 0.2 to 10  $\text{g L}^{-1}$  smectite, respectively (Figure 2).

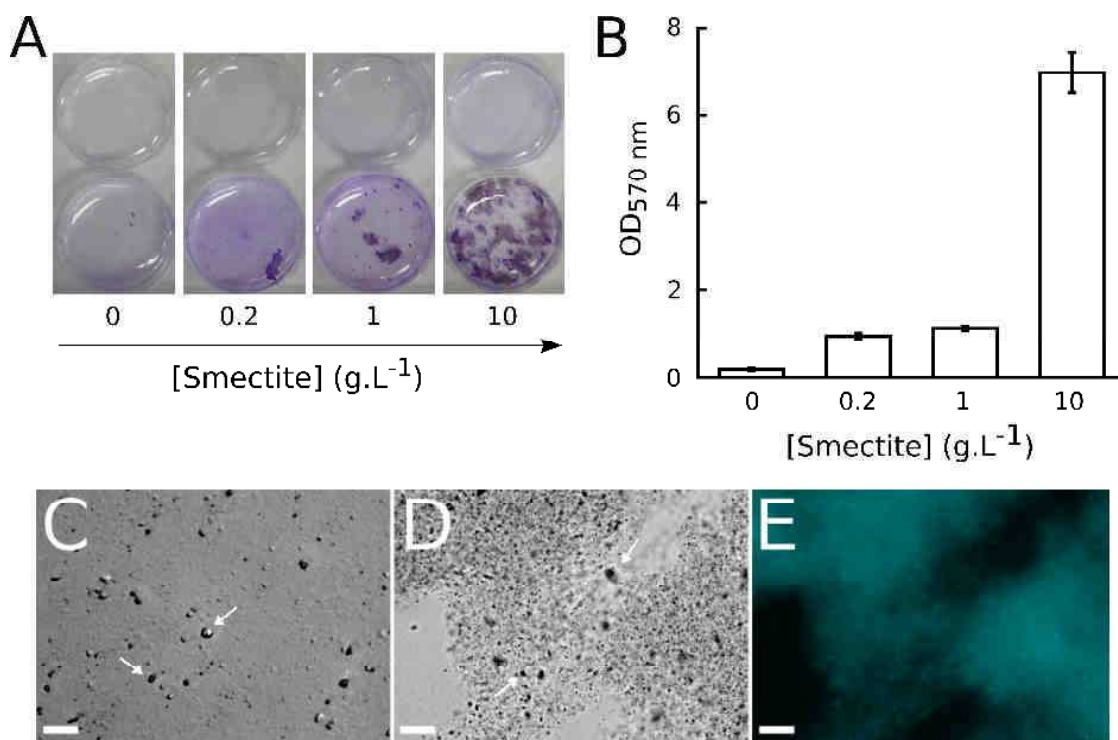


**Figure 2:** Pyoverdine quantification in culture supernatants (white bars) and in biofilm (black bars) of *P. aeruginosa* cultivated in succinate medium for 28 hrs under shaking (200 rpm) at 30°C. Pyoverdine was assayed by monitoring absorbance at 400 nm ( $\epsilon = 19\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at pH 7) in the absence or in the presence of smectite concentrations of 0.2  $\text{g L}^{-1}$ , 1  $\text{g L}^{-1}$ , 10  $\text{g L}^{-1}$ . Pyoverdine was extracted from the biofilm in 10 mL of 200 mM Tris-HCl pH 7.0 for each smectite concentration tested and the concentration of siderophore in the 10 mL extraction solution was determined. The values are means of three independent experiments.

Structures characteristic of biofilm were formed around smectite particles in the cultures (Figure 3A). This structure was examined by staining with crystal violet (Figure 3B) and microscopic observation (Figure 3C-E) of *P. aeruginosa* grown in the presence of smectite (28 hrs growth): a matrix of bacteria and organic material forming a biofilm embedding the smectite was observed. The amount of biofilm clearly increased with the smectite concentration in the medium (Figure 3B). Epifluorescence microscopy revealed a uniform green fluorescent staining of the biofilm surrounding the smectite aggregates in iron-limited



media (Figure 3E), strongly suggesting the presence of pyoverdine. Extraction from the biofilm and spectral characterization confirmed the presence of pyoverdine (Figure 2). For smectite concentrations below  $10 \text{ g L}^{-1}$ , the amount of pyoverdine in solution was always higher than that in biofilm. In contrast, in culture supplemented with  $10 \text{ g L}^{-1}$  of smectite, the pyoverdine concentration in the medium was very low whereas there were substantial amounts of pyoverdine in the biofilm. In the presence of smectite, the amount of pyoverdine trapped in the exopolysaccharide matrix seemed to be constant, whatever the clay concentration (Figure 2). The amount of biofilm produced increased substantially with increasing smectite concentration (Figure 3B), but the amount of pyoverdine extracted was similar for cultures at 1 and  $10 \text{ g L}^{-1}$  of smectite.

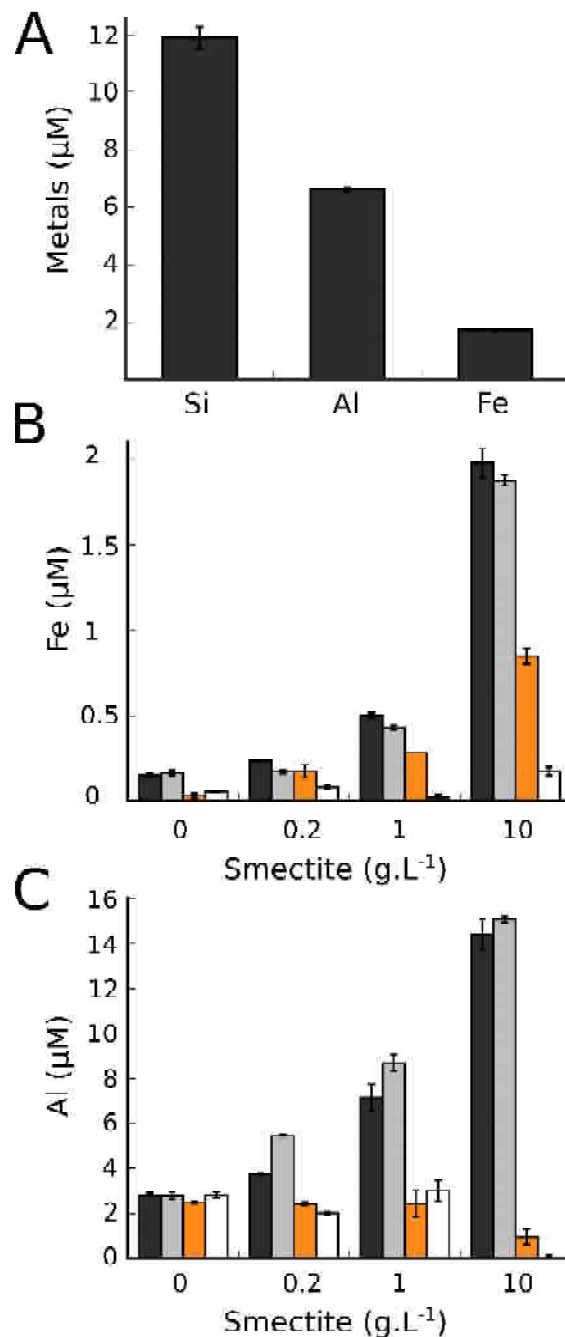


**Figure 3:** Biofilm formation around smectite aggregates in the presence of *P. aeruginosa*. A-B. Smectite (0, 0.2, 1 and  $10 \text{ g L}^{-1}$ ) was incubated in 6-well plates, in succinate medium in the absence (first line) or presence (second line) of *P. aeruginosa* and under 30 r.p.m. shaking. After 28 hours of incubation, biofilms were stained with crystal violet (panel A), and bound crystal violet was eluted with ethanol and assayed by monitoring the OD<sub>570 nm</sub> in the eluate (panel B). The values reported in panel B are means of three independent experiments. C. Light microscopy image of smectite ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) without bacteria. D. Light microscopy image of smectite ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) incubated for 28 h in succinate medium in the presence of *P. aeruginosa* and under high agitation (250 rpm). E. Fluorescence microscopy image (Ex. 400 – Em. 440) of the experiment described in panel D. White arrows show smectite aggregates in panels C and D. Scale bar 20  $\mu\text{m}$

**Siderophore-promoted smectite dissolution in batch experiments.** Cultures of WT *P. aeruginosa* were grown in iron-depleted medium containing 10 g L<sup>-1</sup> of smectite and the release of Al, Fe and Si into the medium was studied (Figure 4A). The organic medium had a small effect on the mineral in sterile medium controls and therefore, values for abiotic controls were subtracted from those measured in assays with bacteria. Three major elements Si, Al and Fe were assayed: in the presence of bacteria their concentrations in the medium were 12.0 μmol L<sup>-1</sup>, 6.5 μmol L<sup>-1</sup> and 1.7 μmol L<sup>-1</sup>, respectively. The amounts of dissolved silicon in solution were used to calculate the smectite alteration rate. Rates were 1.064 and 1.965 μg m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> in the presence of *P. aeruginosa* and 0.172 and 0.972 μg m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> in its absence for 1 and 10 g L<sup>-1</sup> of smectite, respectively. Rates were systematically higher in the presence than absence of *P. aeruginosa*, clearly indicating that *P. aeruginosa* enhances smectite dissolution.

To evaluate the role of pyoverdine and pyochelin in smectite dissolution, the experiment was repeated with the three siderophore mutants: a pyochelin-deficient mutant, a pyoverdine-deficient mutant and the double mutant. With the siderophore-deficient strain, the Fe and Al concentrations in the medium were similar as those in the control medium, confirming the involvement of siderophores in smectite dissolution (Figure 4B). However, when strains able to synthesize pyoverdine were grown in the presence of 1 and 10 g L<sup>-1</sup> of smectite, the amounts of dissolved iron and aluminum in solution increased, implicating pyoverdine in the solubilization of these two metals from the smectite. With the strain producing pyochelin but no pyoverdine, the dissolved iron concentration was intermediate between that for the pyoverdine-producing strain and the control medium, suggesting that pyochelin is also able to solubilize iron; however, no aluminum solubilization was observed with this strain (Figure 4C).

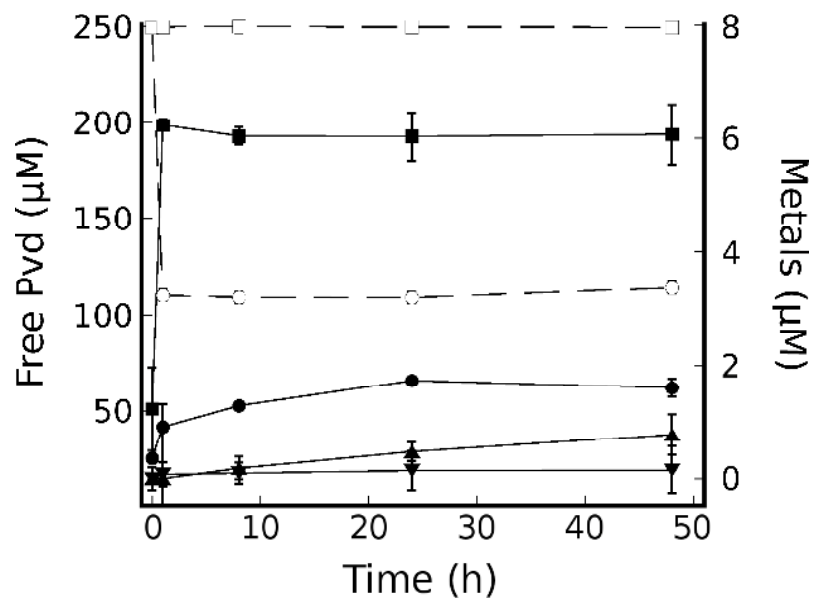
It is possible that in all these experiments, Al and Fe was solubilized from smectite and trapped in the bacterial biofilm of the mutants. Unfortunately, we were unable to separate the biofilm from the smectite aggregates to assay its metal content.



**Figure 4:** Comparison of metal release in the presence of various siderophore-producing *Pseudomonas*. A. Smectite dissolution in the presence of WT *P. aeruginosa* after 48 hrs incubation in succinate medium. The solution contained 10 g L<sup>-1</sup> of smectite. B, C. Metal release from smectite at various concentrations in the presence of strains of *P. aeruginosa* (WT: black; the pyochelin mutant PAO6297: gray; the pyoverdine mutant PAO6382: orange and the pyochelin mutant PAO6383: white) grown in succinate medium for 48 hrs. The values obtained were subtracted from values obtained in abiotic conditions after the same incubation time. The values reported are means of three independent experiments.

***Pyoverdine sorption to smectite.*** To further investigate the role of pyoverdine in iron and aluminum solubilization from smectite, 1 g L<sup>-1</sup> of smectite was incubated in succinate medium in the presence of 250 µM purified pyoverdine. Solubilization of the metals was followed by ICP-AES. After 1 h of incubation, 6 µM Al and 1.7 µM Fe were measured in solution in the assay containing smectite and pyoverdine incubated together (Figure 5). No additional metal solubilization was observed with longer incubation times.

The silicon concentration in the supernatant was determined and used to calculate dissolution rates: the rate was 0.352 µg m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> after 48 hrs in the sample supplemented with pyoverdine, and 0.027 µg m<sup>-2</sup> d<sup>-1</sup> in the control without pyoverdine. These results confirm that pyoverdine can contribute to mineral weathering. However, the rates with or without pyoverdine were lower than those obtained in batch experiments at 1 g L<sup>-1</sup> with or without bacteria. This was probably due to succinate medium being more favorable than MES buffer for weathering. Also, after 1 h of incubation, the pyoverdine concentration in solution was only 110 µM, and only 44 % of the initial value. Presumably, more than half the pyoverdine was adsorbed onto the smectite. As for metal solubilization, the pyoverdine concentration in solution did not significantly change subsequently, suggesting that the pyoverdine-smectite interaction is fast and occurs within the first hour of incubation.



**Figure 5:** Sorption of pyoverdine onto smectite as a function of time. A suspension of  $1 \text{ g L}^{-1}$  of smectite was incubated in the presence of  $250 \text{ }\mu\text{M}$  of pyoverdine in a final volume of  $10 \text{ mL}$   $2 \text{ mM}$  MES,  $725 \text{ }\mu\text{M}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  buffer. Fe (●) and Al (■) contents were determined by ICP-AES and pyoverdine (○) concentrations by visible light absorption ( $\text{OD}_{400 \text{ nm}}$ ). Controls without siderophore were run in parallel at Fe (▲) and Al (▼) concentrations followed by ICP-AES. Controls for pyoverdine detection involved testing samples with no smectite (□). All the data are means of three independent experiments.

## DISCUSSION

Smectite is a group of clays that are known for their large swellability, surface area and cation exchange capacity. These minerals are composed of structures involving two tetrahedral sheets sandwiching a central octahedral sheet and contain variable amounts of iron, an essential metal for bacterial growth. The smectite preparation used in the present work (Table 1) was 4.08 % Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. It significantly stimulated the growth of *P. aeruginosa* in iron-limited medium, suggesting that smectite could be a source of iron for fluorescent Pseudomonads. Similar observations have been reported for the non fluorescent *Pseudomonas mendocina* in the presence of kaolinite in iron-restricted media (Ams et al., 2002 ; Maurice et al., 2001b) and for *Shewanella putrefaciens* in the presence of nontronite clay (Perdrial et al., 2009). Gates and coworkers established that organic compounds of microbial origin (microbial cells, exudates, or cell fragments) influence the physical properties of clay. Indeed, microbial reduction of clay mineral structural Fe(III) mediated by a combined bacterial suspension containing *P. fluorescens*, *P. putida* and *P. aureofaciens* (Gates et al., 1998) resulted in a decrease in clay swelling,

We used molecular biology approaches with siderophore-producing mutants to investigate the molecular mechanisms involved in bacteria-associated clay weathering. The use of *P. aeruginosa* mutants unable to produce either pyoverdine and/or pyochelin clearly indicated that pyoverdine was used by wild-type bacteria to solubilize Fe. If bacteria are able to produce pyoverdine, only this siderophore and not pyochelin seems to be used to assimilate iron from smectite. Thus, the bacteria use the siderophore with the higher affinity for iron: the affinities for iron of pyoverdine and pyochelin are 10<sup>32</sup> M<sup>-1</sup> (Albrecht-Gary et al., 1994) and 10<sup>17</sup> M<sup>-1</sup> (Brandel et al., 2012), respectively. We demonstrate that this iron solubilization from smectite by siderophores promotes the growth of the siderophore producing *P. aeruginosa* strains. We also observed solubilization of aluminum by pyoverdine, a siderophore known to

chelate Al and many other metals (Braud et al., 2009b). The formation constant of pyoverdine with Al is unknown but is between  $10^{17}$  and  $10^{22} \text{ M}^{-1}$  for  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  (Chen et al., 1994). Bacteria unable to produce pyoverdine, used pyochelin to solubilize Fe but with only half the efficiency and no Al solubilization was observed. Pyochelin is also able to chelate Al (Braud et al. 2009b), but its affinity for this metal might be too low for extraction from smectite. Similar Fe and Al release from smectite has been described with the hydroxamate siderophores desferrioxamine B and D, but not with the monohydroxamate ligand acetohydroxamic acid (Haack et al., 2008). Neither Fe nor Al solubilization was observed with the strain producing no pyoverdine and no pyochelin, demonstrating the role of these two siderophores in smectite weathering. Iron in clay may be in the crystal matrix, as structural substitute for Al, or in a more easily available form as surface precipitates. In our preparation, X-ray analysis showed no iron oxides at the surface of clay (data not shown) implying that bacterial siderophores can effectively mobilize structural Fe. Since iron occupies octahedral sites in the smectite, dissolution probably includes both the tetrahedral sites containing Si and Al and the octahedral sites, as previously reported for smectite and *S. putrefaciens* interactions (Perdrial et al., 2009). Various mechanisms of microbial mineral weathering have been described. Some include the production of reducing agents and others the attachment of the bacteria to the mineral surface (Hersman et al., 2000). In our study, no dissolution of Al or Fe was observed in the absence of siderophore, even in the presence of biofilm. Therefore, there are no mechanisms able to compensate for the absence of siderophores in *P. aeruginosa*, at least over the time scale of our tests. Presence of smectite promoted both planktonic cell growth of *P. aeruginosa* and formation of biofilms (Figure 1 and 3A). However at high ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) smectite concentration, biofilm was favored (Figure 3A). Vandevivere and Kirchman (1993) showed that EPS production by bacteria is stimulated by attachment to mineral surfaces. In our experimental conditions, smectite seemed to be an

appropriate surface for *P. aeruginosa* growth: it provided both a surface for this multi-cellular surface-associated life style and supplied the bacteria with iron. Such physical interaction between smectite and Pseudomonads exist in the soils, where Pseudomonads establish dense and stable biofilms (Espinosa-Urgel et al., 2002). Moreover, formation of biofilms with other bacterial species has been observed in the presence of clay minerals (Maurice et al., 2001), including smectite (Alimova et al., 2009; Perdrial et al., 2009). Increasing concentrations of smectite strongly enhanced biofilm formation and decreased the amount of pyoverdine present in solution. However, the siderophore concentration in solution (12.7  $\mu\text{M}$ , Figure 2) remained sufficiently high to chelate the 1.7  $\mu\text{M}$  iron detected in the growth media amended with 10 g L<sup>-1</sup> of smectite (Figure 4B). Pyoverdine was abundant in the biofilm surrounding smectite aggregates (Figures 2 and 3). Pyoverdine production by *P. aeruginosa* is tightly regulated by the iron concentration in the bacterial environment (Visca, 2004), and therefore, the low concentration of pyoverdine in solution may indicate that the concentration of iron solubilized from the smectite was sufficiently high to inhibit pyoverdine production by the planktonic bacteria. In contrast, pyoverdine was still present in the biofilm, suggesting that the concentration of iron, a metal that becomes toxic for bacteria at high concentration, stays low in the biofilm surrounding the smectite aggregates since pyoverdine is detected.

Bacterially produced polymers can have positive, negative or negligible effects on dissolution rates depending on the nature of the interaction between the polymers and the surface, the concentration of the polymers and pH (Welch and Vandevivere, 1995; Ullman et al., 1996). Extracellular polymeric substances produced by bacteria have metal binding capability which may indirectly enhance solubility by forming complexes with metals in solution (Ullman et al., 1996). They may also, under some conditions, inhibit mineral dissolution by blocking cation detachment sites at the mineral surface (Lee and Fein, 2000; Aouad et al, 2008). Many organic compounds irreversibly adsorb onto mineral surfaces or



react with surfaces and solutions to produce stable secondary phases (Davis, 1982; Kirchman et al., 1989). This adsorption and precipitation may have the effect of limiting the exchange between the mineral surface and the surrounding fluid, thus reducing the rate of dissolution. We showed previously that *P. aeruginosa* can colonize various types of complex silicates (basaltic glass or vitrified bottom ash) by forming a biofilm on mineral surfaces and can stimulate iron release with concomitant production of pyoverdine in an iron-limited medium (Aouad et al., 2006). In long-term experiments with municipal waste bottom ash, the alteration rate in the presence of these bacteria was lower than in the abiotic condition leading to the hypothesis that biofilm has a protective effect (Aouad et al., 2008). In our experiments with microbial polymers, dissolution rates were enhanced two fold in the presence of bacteria and more than a ten fold in the presence of pyoverdine. Batch experiments allowed colonization of minerals by planktonic bacteria as a first step, and thus direct interaction with metabolites secreted and finally development of a growing biofilm. Biofilm creates an interface between the mineral and the alterative solution, thereby changing the exchange between the solution and the solid. Attached bacteria create microenvironments at the attachment site that may affect the flow through porous material. Our bacterial growth experiments showed that Pseudomonads can alter clay mineral during a short period of time but were insufficiently long to assess the long-term consequences of bacteria on the alteration of clay minerals. This issue is of significance to the safety of clay sealants used in waste confinement.

In conclusion, this study demonstrates that pyoverdine and pyochelin efficiently increase the dissolution of iron-bearing minerals. Pyoverdine, the siderophore produced by *P. aeruginosa* with the highest affinity for iron, has a major role in the solubilization of iron and aluminum from smectite, in conditions of both planktonic and biofilm growth. Pyochelin, the second siderophore, with a lower affinity for iron, is used *P. aeruginosa* only if the

microorganism is unable to produce pyoverdine, and solubilizes only iron and not aluminum from smectite. The high affinity of the siderophores for iron is therefore a key factor in mineral weathering.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Program Interdisciplinaire CNRS - CEMAGREF Ingénierie écologique, the “Alsace Region Research Network in Environmental Sciences and Engineering” (Réalise) and the Alsace Region. C. Ferret had a fellowship from the Alsace Region and the French ministry of defense (DGA).

**REFERENCES**

- Albrecht-Gary, A.M., Blanc, S., Rochel, N., Ocacktan, A.Z., and Abdallah, M.A. (1994) Bacterial iron transport: coordination properties of pyoverdine PaA, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorganic Chemistry* 33: 6391-6402.
- Alimova, A., Katz, A., Steiner, N., Rudolph, E., Wei, H., Steiner, J.C., and Gottlieb, P. (2009) Bacteria-clay interaction: structural changes in smectite induced during biofilm formation. *Clays and Clay Minerals* 57: 205-212.
- Ams, D.A., Maurice, P.A., Hersman, L.E., and Forsythe, J.H. (2002) Siderophore production by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium in the presence of kaolinite. *Chemical Geology* 188: 161-170.
- Aouad, G., Crovisier, J.-L., Damidot, D., Stille, P., Hutchens, E., Mutterer, J., Meyer, J.-M. and Geoffroy, V.A. (2008) Interaction between municipal solid waste incinerator bottom ash and *Pseudomonas aeruginosa*. *Science of the Total Environment*: 393 385-393.
- Aouad, G., Geoffroy, V.A., Meyer, J.-M., Crovisier, J.-L., Damidot, D. and Stille, P. (2006) Microbially-mediated glass dissolution and sorption of metals by *Pseudomonas aeruginosa* cells and biofilm. *Journal of Hazardous Materials B* 136: 889-895.
- Boukhalfa, H. and Crumbliss, A. L. (2002). Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *BioMetals* 15: 325-339.
- Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I.J., Mislin, G.L.A., and Albrecht-Garry, A.-M. (2012) Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton Transactions* 41: 2820-2834.

- Braud, A., Hannauer, M., Mislin, G.L.A., and Schalk, I.J. (2009a) The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *Journal of Bacteriology* 191: 5317-5325.
- Braud, A., Hoegy, F., Jezequel, K., Lebeau, T., and Schalk, I.J. (2009b) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environmental Microbiology* 11: 1079-1091.
- Cheah, S.-F., Kraemer, S.M., Cervini-Silva, J., and Sposito, G. (2003). Steady-state dissolution kinetics of goethite in the presence of desferrioxamine B and oxalate ligands: implications for the microbial acquisition of iron. *Chemical Geology* 198 (1–2): 63-75.
- Chen, Y., Jurkewitch, E., Bar-Ness, E., and Hadar, Y. (1994) Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil Science of Society America Journal* 58: 390-396.
- Cocozza, C., Tsao, C.G., Cheah, S.-F., Kraemer, S.M., Raymond, K.N., Miano, T.M., Sposito, G. (2002) Temperature dependence of goethite dissolution promoted by trihydroxamate siderophores. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66: 431-438.
- Davis, J.A. (1982) Adsorption of natural dissolved organic matter at the oxide/water interface. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 46: 2381-2393.
- Dehner C., Awaya, J., Maurice, P., DuBois, J. (2010) Iron mobilization from hematite by aerobic *Pseudomonas mendocina*: siderophores, oxalate, and reductant. *Applied Environmental Microbiology* 76: 2041-2048.
- Devineau K., Montargès-Pelletier E., Villiéras F., Maddi S., Woimbée J.Cl., Pelletier M., Bihannic I., Michot L.J., Razafitianamaharavo A., Barrès O., Gérard G. (2004) Compréhension du comportement à long terme d'une barrière ouvragée en argile pour le

stockage de déchets radioactifs en formation géologique profonde. *Rapport C.RP.IENG.04.2 Contrat ANDRA 024386-CM/CC*, (37 pp. 9 tab. 17 fig. 108 p ann.).

Ernstsen, V., Gates, W. P., Stucki, J.W. (1998). Microbial reduction of structural iron in clays-a renewable source of reduction capacity. *Journal of Environmental Quality* 27: 761–766.

Espinosa-Urgel, M., Kolter, R., Ramos, J.-L. (2002) Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology* 148: 341-343.

Folschweiller, N., Gallay, J., Vincent, M., Abdallah, M.A., Pattus, F., and Schalk, I.J. (2002) The interaction between pyoverdine and its outer membrane receptor in *Pseudomonas aeruginosa* leads to different conformers: a time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* 41: 14591-14601.

Gates, W.P., Stucki, J.W., and Kirpatrick, R. J. (1996) Structural properties of reduced uppton montmorillonite. *Physics and Chemistry of Minerals* 23: 535-541.

Gates, W.P., Jaunet, A.M., Tessier, D., Cole, M.A., Wilkinson, H.T., and Stucky, J. (1998). Swelling and texture of iron-bearing smectites reduced by bacteria. *Clays and clay mineral*, 46: 487-497.

Hannauer, M., Braud, A., Hoegy, F., Ronot, P., Boos, A., and Schalk, I.J. (2012) The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 14: 1696-708.

Haack, E. A., C. T. Johnston, et al. (2008). Mechanisms of siderophore sorption to smectite and siderophore-enhanced release of structural Fe<sup>3+</sup>. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 72(14): 3381-3397.

- Hasnaoui, M., Kassila, J., Loudiki, M., Droussi, M., Balvay, G., and Barrouin, G. (2001) Phosphate release at the water-sediment interface in a fisheries pond of the Deroua fish farm. *Revue des Sciences de l'Eau* 14: 407-422.
- Hersman, L., T. Lloyd, and Sposito G. (1995). Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59(16): 3327-3330.
- Hersman, L., Maurice, P., Sposito, G. (1996). Iron acquisition from hydrous Fe(III)-oxides by an aerobic *Pseudomonas* sp. *Chemical Geology* 132(1-4): 25-31.
- Hersman, L.E., Huang, A., Maurice, P.A., and Forsythe, J.E. 2000. Siderophore production and iron reduction by *Pseudomonas mendocina* in response to iron deprivation. *Geomicrobiology Journal* 17:261-273.
- Holmén, B. A. and W. H. Casey (1996) Hydroxamate ligands, surface chemistry, and the mechanism of ligand-promoted dissolution of goethite [ $\alpha$ -FeOOH(s)]. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 60(22): 4403-4416.
- Holmén, B. A., Sison, J. D., Nelson, J.D., Casey, W.H. (1999). Hydroxamate siderophores, cell growth and Fe(III) cycling in two anaerobic iron oxide media containing *Geobacter metallireducens*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63(2): 227-239.
- Hider, R.C., and Kong, X. (2011) Chemistry and biology of siderophores. *Nature Product Reports* 27: 637-657.
- Kirchman, D.L., Henry, D.L., and Dexter, S.C. (1989) Adsorption of proteins to surfaces in seawater. *Marine Chemistry* 27: 201-217.
- Kostka, J.E., Haefele, E., Viehweger, R., and Stucki, J.W. (1999) Respiration and dissolution of iron(III)-containing clay minerals by bacteria. *Environmental Science and Technology*. 33: 3127-3133.

- Kraemer, S. M., Cheah, S.F., Zapf, R., Xu, J., Raymond, K.N., Sposito, G. (1999). Effect of hydroxamate siderophores on Fe release and Pb(II) adsorption by goethite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63(19–20): 3003-3008.
- Kraemer, S.M. (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic Science* 66: 3-18.
- Latour, X., Philippot, L., Corberand, T. and Lemanceau, P. (1999) The establishment of an introduced community of fluorescent Pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 163-170.
- Lee, J.U., and Fein, J.B. (2000) Experimental study of the effects of *Bacillus subtilis* on gibbsite dissolution rates under near-neutral pH and nutrient-poor conditions. *Chemical Geology* 166: 193-202.
- Liermann, L.J., Kalinowski, B.E., Brantley, S.L., and Ferry, J.G. (2000) Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 64: 587-602.
- Lovley, D. R. (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiology Review* 55: 259-87.
- Martell, A.E., Smith, R.M., Motekaitis, R.J. (2004) NIST critically selected stability constants of metal complexes. *Database 46 version 8. NIST Standard Reference Data. Gaithersburg, MD 20899 USA.*
- Maurice, P.A., Vierkorn, M.A., Hersman, L.E., and Fulghum, J.E. (2001a) Dissolution of well and poorly ordered kaolinites by an aerobic bacterium. *Chemical Geology* 180: 81-97.
- Maurice, P.A., Vierkorn, M.A., Hersman, L.E., Fulghum, J.E., and Ferryman, A. (2001b) Enhancement of kaolinite dissolution by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium. *Geomicrobiology Journal* 18: 21-35.

- Maurice, P.A., Haack, E.A., and Mishra, B. (2009) Siderophore sorption to clays. *Biometals* 22: 649-658
- Meyer, J.M., and Abdallah, M.A. (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of Genetic Microbiology* 107: 319-328.
- Michel, L., Bachelard, A., and Reimann, C. (2007) Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153: 1508-1518.
- Neubauer, U., Nowack, B., Furrer, G., and Schulin, R. (2000) Heavy metal sorption on clay minerals affected by the siderophore desferrioxamine B. *Environmental Science and Technology* 34: 2749-2755.
- Page, W.J., and Grant, G.A. (1988) Partial repression of siderophore-mediated iron transport in *Azotobacter vinelandii* grown with mineral iron. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 675-679.
- Perdrial, J.N., Warr, L.N., Perdrial, N., Lett, M.C., and Elsass, F. (2009) Interaction between smectite and bacteria: implications for bentonite as backfill material in the disposal of nuclear waste. *Chemical Geology* 264: 281-294.
- Perrin, D.D. (1979) Stability constants of metal-ion complexes. Part B. *International Union of Pure and Applied Chemistry, Data Series*.
- Powell, P.E., Cline, G.R., Reid, C.P.P., and Szaniszlo, P.J. (1980) Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature* 287: 833-834.
- Roemheld, V. (1991) The role of phytosiderophores in acquisition of iron and others micronutrients in graminaceous species: an ecological approach. *Plant Soil* 130: 127-134.



Rosenberg, D.R., and Maurice, P.A. (2003) Siderophore adsorption to and dissolution of kaolinite at pH 3 to 7 and 22 degrees C. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67: 223-229.

Schalk, I.J. (2008) Metal trafficking via sidérophores in Gram-negative bacteria: specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *Journal of Inorganic Biochemistry* 102: 1159-1169.

Schalk, I.J, Hannauer, M., and Braud, A (2011) New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology* 13: 2844-2854.

Serino, L., Reimann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P., and Haas, D. (1995) Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular and General Genetics* 249: 217-228.

Siebner-Freibach, H., Hadar, Y., and Chen, Y. (2004) Interaction of iron chelating agents with clay minerals. *Soil Science Society of America Journal* 68: 470-480.

Stucki, J.W., Komadel, R, and Wilkinson, H.T. (1987) The microbial reduction of structural iron 3+ in smectites. *Soil Sciences Society of America Journal* 51: 1663-1665.

Stucki, J.W., Kostka, J.E. (2006) Microbial reduction of iron in smectite. *Comptes Rendus de Geoscience*, 338: 468-475.

Tempest, D.W., and Strange, R.E. (1966) Variation in content and distribution of magnesium, and its influence on survival, in *Aerobacter aerogenes* grown in a chemostat. *Journal Genetic Microbiology* 44: 273-279.

Ullman, W.J., Kirchman, D.L., Welch, S.A., and Vandevivere, Ph. (1996) Laboratory evidence for microbially mediated silicate mineral dissolution in nature. *Chemical Geology* 132: 11-17.

Vandevivere, P., and Kirchman, D.L. (1993) Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Applied Environmental Microbiology* 59: 3280-3286.

- Visca, P. (2004) Iron regulation and siderophore signalling in virulence by *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas*, volume 2, edited by Juan-Luis Ramos, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New-York: 69-123.
- Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L. (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiology* 15: 22-30.
- Watteau, F. and Berthelin, J. (1994) Microbial dissolution of iron and aluminum from soils minerals- efficiency and specificity of hydroxamate siderophores compared to aliphatic-acids *European Journal of Soil Biology* 30:1-9.
- Welch, S.A., and Vandevivere, P. (1995) Effect of microbial and other naturally occurring polymers on mineral dissolution. *Geomicrobiol. J.*, 12: 227-238.
- Wu, C.B., Roth, P.F. (1988) Low, biological reduction of structural Fe in sodium-nontronite. *Soil Sciences Society of America Journal* 52: 295-296.
- Youard, Z.A., Wenner, N., and Reimann, C. (2011) Iron acquisition with the natural siderophore enantiomers pyochelin and enantio-pyochelin in *Pseudomonas* species. *Biometals* 24: 513-522.







**Résultats complémentaires  
sur les interactions entre les  
Pseudomonades et les smectites**



## I - Matériel et méthodes

### 1. Cinétique de fluorescence de la pyoverdine en présence de smectite

Les études de spectroscopie de fluorescence ont été effectuées avec un spectrofluorimètre de type PTI (Photon International TimeMaster, Bioritech). Les résultats obtenus ont été traités avec le logiciel Kaleidagraph.

Les échantillons ont été placés dans des cuves en quartz de 1 mL et ont été excités à 400 nm. Le tampon utilisé dans cette étude le Tris-HCl 50 mM à pH 8. Tout d'abord, des cinétiques de fluorescence de la pyoverdine ont été réalisées en présence de concentrations croissantes de smectite (0 - 0,2 - 1 et 10 g.L<sup>-1</sup>) avec une concentration constante de pyoverdine (1 µM). Une seconde expérience a été réalisée avec une concentration, cette fois-ci, constante en smectite (0,2 g.L<sup>-1</sup>) et des concentrations croissantes de pyoverdine (150 - 300 - 600 et 1 000 nM). La fluorescence a été mesurée toutes les 0,1 s pendant 200 s. L'intensité de fluorescence étant dépendante de la turbidité de l'échantillon, les mesures ont été standardisées par la mesure de la fluorescence d'un standard (GFP purifiée) en présence de concentrations croissantes de smectite.

### 2. Croissance bactérienne en milieu carencé en magnésium supplémenté de concentrations croissantes de smectite

Afin d'observer l'utilisation du magnésium structural des smectites par *P. aeruginosa*, des expériences mettant en contact les argiles et les bactéries ont été réalisées. Nous avons utilisé une souche sauvage de *P. aeruginosa* ATCC 15692. Les bactéries ont été revivifiées en milieu LB (LB Broth, Difco) durant 24 h à 30°C et sous agitation (220 rpm). La souche a été conservée à -80°C dans un bouillon LB-glycérol 20 %. Un milieu carencé en magnésium, le milieu PS (composition en g.L<sup>-1</sup> : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 9 ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 ; succinate de sodium, 4 ; pH ajusté à 7 par ajout de NaOH) (Aouad, 2006) a alors été inoculé à partir de la pré-culture, puis incubé sous agitation (220 rpm) durant 48 h. La culture a ensuite été centrifugée (10 min à 8 600 g) et lavée deux fois avec du milieu PS. La concentration bactérienne a été déterminée par mesure de la densité optique à 600 nm.

L'expérience de croissance bactérienne en présence de smectite a été réalisée dans des Erlenmeyers en polycarbonate, contenant 20 mL de milieu PS supplémenté de concentrations



croissantes de minéral argileux (0 - 0,2 - 1 et 10 g.L<sup>-1</sup>). Chaque Erlenmeyer a été ensemencé afin d'obtenir une DO<sub>600</sub> finale de 0,05 par mL. Des témoins, sans bactérie ou sans smectite, ont également été réalisés. Les Erlenmeyers ont ensuite été incubés à 30°C, sous agitation (220 rpm) durant 48 h. 1 mL de chaque échantillon a été prélevé après 4 - 8 - 24 - 28 et 48 h d'incubation. La croissance bactérienne a été déterminée après dilution et étalement de 100 µL de chaque dilution sur milieu gélosé LB et est exprimée en « Unité Formant Colonies » (UFC) par mL.

### 3. Utilisation des éléments des smectites sur 9 jours par *P. aeruginosa*

Afin d'étudier l'utilisation des éléments constitutifs des smectites par les Pseudomonades sur des temps plus longs, une expérience de croissance bactérienne en présence de smectite a été réalisée sur 9 jours. La souche *P. aeruginosa* ATCC 16692 (PAO1) a été revivifiée par ensemencement en milieu nutritif LB (LB Broth, Difco). Afin de carencer les bactéries en fer, deux repiquages en milieu succinate ont été réalisés à 24 h d'intervalle dans les mêmes conditions de culture que citées précédemment.

La souche bactérienne a été ensemencée en présence de 10 g.L<sup>-1</sup> de smectite dans un Erlenmeyer contenant du milieu succinate. La culture a été inoculée avec des cellules bactériennes carencées en fer, afin d'atteindre une DO<sub>600 nm</sub> de 0,05 unité par mL. Les échantillons ont ensuite été incubés à 30°C sous agitation (200 rpm) pendant 9 jours. Chaque jour, la densité bactérienne a été évaluée par dilution et étalement sur milieu gélosé LB (exprimée en UFC.mL<sup>-1</sup>) et la production de pyoverdine dans le surnageant par mesure de la DO<sub>400 nm</sub>. Le milieu est renouvelé quotidiennement et auto-ensemencé par la présence de bactéries dans le biofilm.

## 4. Observations microscopiques du biofilm

### 4.1. Microscopie conventionnelle

La souche bactérienne appelée dans ce manuscrit PAO1-mCherry et utilisée en microscopie est une souche sauvage PAO1 transformée par un plasmide à faible nombre de copies (pMMB) dans lequel est cloné l'ADN codant pour la mCherry sous contrôle du promoteur de l'enzyme PvdA (PAO1+pMMB::*PpvdA*-mCherry, Laurent Guillon, non

publiée). La protéine PvdA est impliquée dans la voie de biosynthèse de la pyoverdine et est exprimée lorsque la bactérie est carencée en fer. Les observations en microscopie des smectites ou des goethites ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) après 24 h d'incubation en absence ou en présence de bactéries en milieu minimum ont été réalisées en microscopie à fond clair et en épifluorescence (Nikon Eclipse 50i, objectif : CFI Achroplan 100 x A ON 1,25 DT 0,18) connectée à une caméra DS-Fi1 numérique 12 bits. La coloration du biofilm par la pyoverdine produite a été détectée par un filtre Bv2A (excitation 400-440 nm, émission « Long Pass » 470 nm). Les bactéries, marquées par la protéine mCherry, ont été détectées par un filtre TRITC-A (excitation « Band Pass » 543 nm, émission 593 nm). Les images ont été capturées en utilisant le logiciel NIS elements.

#### 4.2. Microscopie confocale

Les smectites ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) ont été incubées 24 h en présence de *P. aeruginosa* PAO1-mCherry, en boîte de culture cellulaire 35 mm ( $\mu$ -Dish, Biovalley), sous faible agitation (30 rpm), à 30°C. Les observations microscopiques ont été réalisées grâce à un microscope confocal droit Leica TCS-SP2, avec un objectif HCX PL APO CS 63.0x1.40. Les filtres utilisés sont des « Beam Splitter FW TD » avec pour longueurs d'onde d'excitation 428 nm pour la pyoverdine et 548 nm pour la mCherry.

### 5. Implication du biofilm dans la chélation des métaux constitutifs des smectites

Les smectites ont été confinées ou non dans un boudin de dialyse dont le seuil de coupure est de 12 à 14 000 Da. Il a été au préalable vérifié que la pyoverdine était capable de diffuser à travers la membrane du boudin. Les argiles, emprisonnées ou non, ont ensuite été placées dans un Erlenmeyer contenant du milieu succinate carencé en fer et inoculé avec des cellules bactériennes afin d'atteindre une  $\text{DO}_{600}$  de 0,05 par mL. Les échantillons ont ensuite été incubés à 30°C sous agitation (200 rpm) pendant 48 h. 1 mL de chaque échantillon a été prélevé à 4 - 8 - 24 - 28 et 48 h d'incubation afin de réaliser les dénombrements bactériens et de quantifier la production de pyoverdine par  $\text{DO}_{400 \text{ nm}}$ . La densité bactérienne a été évaluée par dilution et étalement sur milieu gélosé LB et exprimée en  $\text{UFC.mL}^{-1}$ .

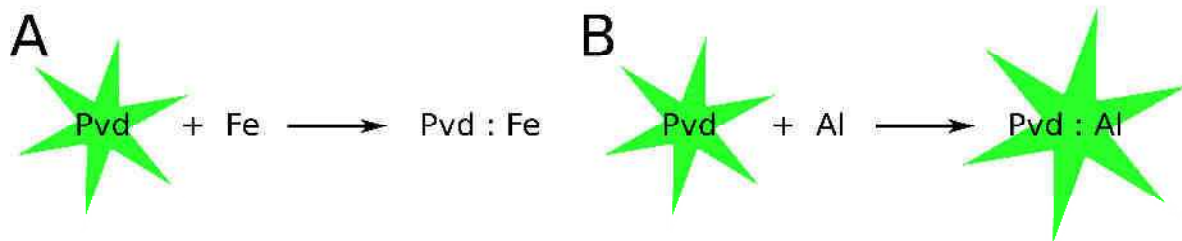
## 6. Détermination des concentrations en métaux

Après 48 h d'incubation de *P. aeruginosa* en présence de smectite, le milieu a été centrifugé 15 min à 4 500 g. Le milieu de culture a ensuite été filtré sur membrane de 0,2 µm et acidifié à pH 1,0 avec de l'HNO<sub>3</sub> à 70 %. Les teneurs des différents métaux (Al, Fe et Si) ont été mesurées par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma, Atomic Emission Spectrometers - Appareil Liberty II, Varian, Inc., Palo Alto, California, USA TY ULTIMA, Jobin Yvon, JY124). Une solution certifiée (EU-H-2, SCP Science, Courtaboeuf, France) a été incluse dans les analyses comme contrôle.

## II - Résultats et discussion

### 1. Etude du complexe pyoverdine-smectite par fluorimétrie

Dans l'article, nous avons montré que la pyoverdine avait un rôle important dans la solubilisation des éléments constitutifs des smectites. Un des atouts des études sur la pyoverdine repose sur ses propriétés de fluorescence qui lui sont conférées par son chromophore (Folschweiller et al, 2002 ; Schalk et al, 1999). En effet, lorsque la pyoverdine est excitée à 400 nm, elle émet une fluorescence à 450 nm. Cette propriété peut être utilisée afin de déterminer les cinétiques de complexation des métaux par la pyoverdine (Clement et al, 2004 ; Schalk et al, 2001 ; Schalk et al, 1999). Néanmoins, cette fluorescence est modulée par le métal chélaté. En effet, la fluorescence sera éteinte lors de la chélation du fer par la pyoverdine (Figure 24A) (Albrecht-Gary et al, 1994 ; Schalk et al, 1999) et, à l'inverse, stimulée par les autres métaux, dont l'aluminium (Figure 24B) (Braud et al, 2009b ; del Olmo et al, 2003). Cette technique n'a, pour l'instant, jamais été explorée pour étudier les interactions entre la pyoverdine et des minéraux.

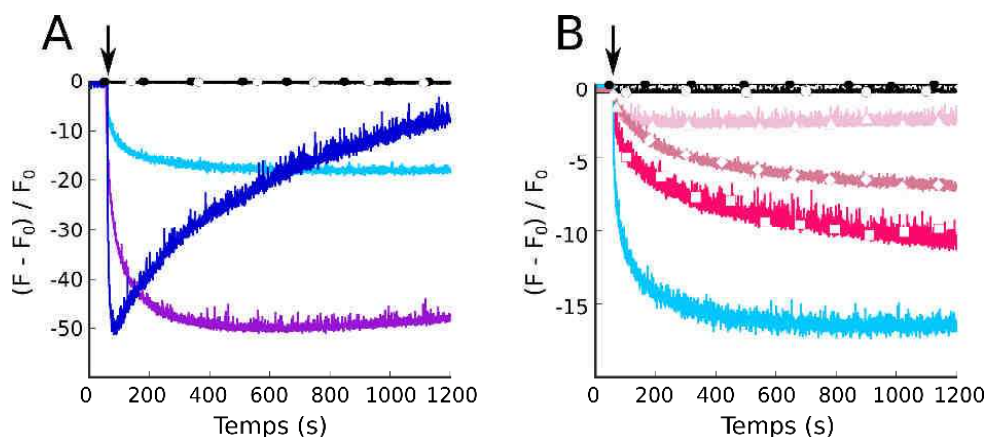


**Figure 24 : Propriétés de fluorescence de la pyoverdine lors de la chélation des métaux. A.** Chélation du fer par la pyoverdine et extinction de la fluorescence. **B.** Chélation de l'aluminium par la pyoverdine et fluorescence du complexe formé.

Afin d'étudier les interactions entre la pyoverdine et les métaux constitutifs des smectites, des expériences de fluorimétrie ont été réalisées. Tout d'abord, des cinétiques de fluorescence de la pyoverdine, à une concentration fixe de 1  $\mu\text{M}$ , ont été réalisées en présence de concentrations croissantes de smectite (0 - 0,2 - 1 et 10  $\text{g.L}^{-1}$ ) (Figure 25A).

Après ajout du sidérophore, une diminution brutale de la fluorescence est observée correspondant à la chélation du fer constitutif de la smectite par la pyoverdine. Pour 1  $\text{g.L}^{-1}$  de smectite, la chute de la fluorescence est plus marquée que pour 0,2  $\text{g.L}^{-1}$  (-17 vs -50). En effet,

la teneur en fer disponible provenant des smectites est alors plus importante, favorisant l'extinction du signal. Néanmoins, à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de smectite, un autre phénomène se produit. Après la chute brutale de la fluorescence, un recouvrement de fluorescence est observé. Le niveau d'extinction de fluorescence observé correspond cependant à celui mesuré pour  $1 \text{ g.L}^{-1}$  ( $-50$ ), laissant supposer une saturation de la pyoverdine par le fer constitutif de la smectite dès  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . La remontée du signal de fluorescence reste cependant difficile à interpréter. Bien que la pyoverdine soit capable de chélater des métaux autres que le fer, tel l'aluminium, il semble peu probable qu'il y ait une chélation préférentielle de l'aluminium à ce moment, provoquant l'augmentation de la fluorescence. Si la constante de complexation de la pyoverdine pour ce métal est encore inconnue, celles pour le zinc, le cuivre et le manganèse sont comprises entre  $10^{17}$  et  $10^{22} \text{ M}^{-1}$  (Chen et al, 1994), et donc très inférieures à celles pour le fer ( $10^{32} \text{ M}^{-1}$ ). Un des paramètres pouvant expliquer ce phénomène est la turbidité de l'échantillon. En effet, malgré la normalisation de la fluorescence en fonction de cette caractéristique, les mesures pourraient être faussées par l'opacité importante du milieu, faisant apparaître ainsi une des limites de cette technique lors de l'étude d'interaction de la pyoverdine avec des minéraux. D'autres phénomènes physico-chimiques d'adsorption ou de dissolution pourraient également devenir non négligeables à de telles concentrations de matériaux et ainsi limiter l'interprétation de cette dernière courbe. Néanmoins, la même courbe de cinétique a été obtenue lors des différents essais. Il serait nécessaire de réaliser des dosages en spectrométrie de masse afin de connaître les complexes pyoverdine-métaux formés.



**Figure 25 : Etude par fluorimétrie de la formation de complexe pyoverdine-métaux en présence de smectite.** **A.** Cinétique de complexation de la pyoverdine ( $1 \mu\text{M}$ ) aux métaux constitutifs de la smectite. Les concentrations utilisées de smectites sont  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  (courbe cyan),  $1 \text{ g.L}^{-1}$  (courbe violette) et  $10 \text{ g.L}^{-1}$  (courbe bleu foncé). Les témoins sont symbolisés par les ronds (● : pyoverdine seule ; ○ : smectite à  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ). **B.** Cinétique de complexation de différentes concentrations de pyoverdine aux métaux constitutifs de la smectite ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ). Les concentrations de pyoverdine utilisées sont  $150 \text{ nM}$  ( $\triangle$ ),  $300 \text{ nM}$  ( $\diamond$ ),  $600 \text{ nM}$  ( $\square$ ) et  $1 \mu\text{M}$  (courbe cyan). Les témoins sont symbolisés par les ronds (● : pyoverdine à  $1 \mu\text{M}$  ; ○ : smectite à  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ). Les expériences sont réalisées dans du tampon Tris-HCl  $50 \text{ mM}$  à pH  $8,0$ . L'ajout de la pyoverdine est symbolisé par la flèche.

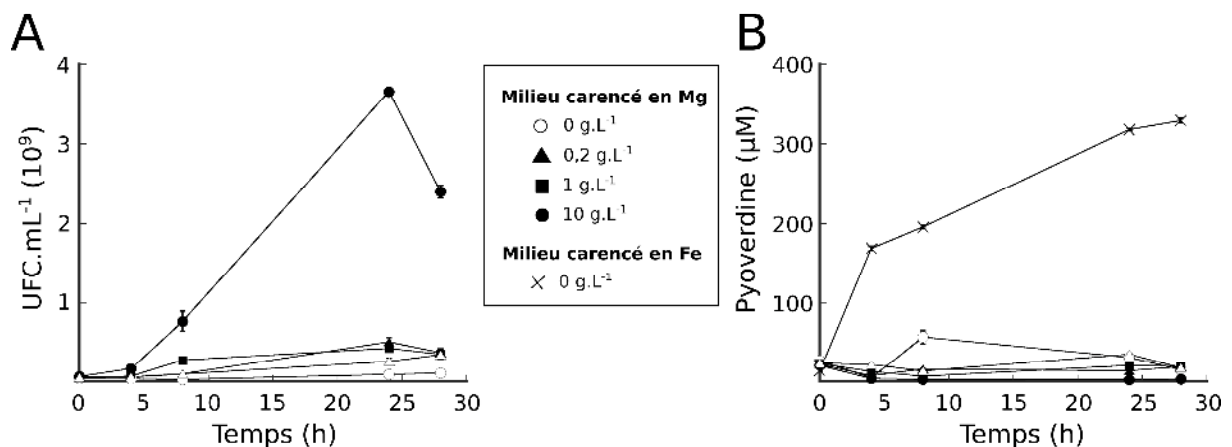
Dans un second temps, nous avons suivi la cinétique de fluorescence de la pyoverdine pour la concentration en smectite la plus faible ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ), concentration pour laquelle la turbidité des échantillons est négligeable. Nous avons ainsi pu quantifier l'effet d'ajout de pyoverdine de  $150 \text{ nM}$  à  $1 \text{ }\mu\text{M}$  sur la cinétique (Figure 25B). La fluorescence diminue avec la quantité de sidérophore ajoutée dans le système. Ainsi, la chélation du fer présent dans la smectite est corrélée à la concentration en pyoverdine ajoutée.

Bien que l'utilisation de la fluorimétrie lors d'études sur les interactions entre la pyoverdine et des minéraux semble être limitée par la composante de turbidité, cette technique, utilisée pour la première fois, semble mettre en évidence le rôle majeur de la pyoverdine dans la solubilisation du fer structural des smectites. Cependant, outre le fait d'être restreinte à de faibles concentrations en minéraux argileux, il reste impossible de savoir quel métal est complexé par la pyoverdine. Ainsi, il serait nécessaire de réaliser des dosages par spectrométrie de masse afin de vérifier les complexes pyoverdine-métaux formés au cours de ces cinétiques.

## **2. Utilisation du magnésium constitutif des smectites par les Pseudomonades**

Nous avons montré que l'ajout de smectite dans un milieu de culture carencé en fer permettait une stimulation de la croissance bactérienne, notamment par la libération du fer structural de ce minéral. Nous nous sommes demandés si la smectite pouvait également être une source de magnésium pour les micro-organismes. De précédentes études ont montré que le magnésium, tout comme le fer, est un des éléments essentiels à la croissance bactérienne (Hoo et al, 2004 ; Tempest & Strange, 1966). Ainsi, afin d'étudier la biodisponibilité du magnésium vis-à-vis de *P. aeruginosa*, des cultures sous agitation en milieu carencé en magnésium, supplémenté ou non par des smectites, ont été effectuées (Figure 26A). La pyoverdine synthétisée par les bactéries a été quantifiée par mesure de l'absorbance à  $400 \text{ nm}$  (Figure 26B). Une stimulation de croissance est observée uniquement pour l'essai contenant  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de smectites (Figure 26A). L'observation de cette stimulation de croissance suggère que les smectites, en plus d'être une source de fer pour les bactéries, fournissent également le magnésium aux Pseudomonades.

De plus, aucune production de pyoverdine n'est observée dans le milieu carencé en magnésium, que ce soit en absence ou en présence de smectites (Figure 26B). Cette observation laisse supposer que la pyoverdine est utilisée seulement pour acquérir le fer des smectites et non le magnésium. Un mécanisme différent de l'utilisation de la pyoverdine, que nous n'avons pas encore déterminé, serait impliqué dans l'acquisition du magnésium par les *Pseudomonades*. Le magnésium étant beaucoup plus soluble que le fer, il est donc possible qu'il diffuse de manière passive au travers des membranes bactériennes *via* des porines.



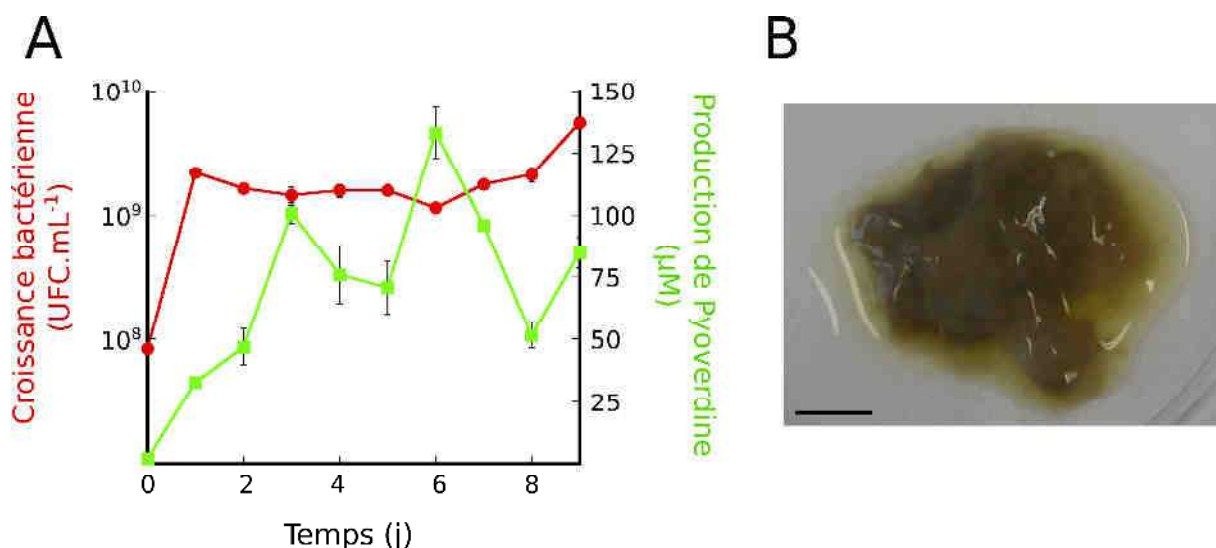
**Figure 26 : Croissance de *P. aeruginosa* et production de pyoverdine en milieu carencé en magnésium.** **A.** Croissance de *P. aeruginosa* PAO1 en milieu PS, carencé en magnésium, supplémenté par des smectites. **B.** Production de pyoverdine par *P. aeruginosa* PAO1 en µM suivie par mesure de l'absorbance à 400 nm ( $\epsilon = 19\ 000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour la pyoverdine à pH 7), quand les bactéries sont incubées en milieu minimum PS en absence et en présence de concentrations croissantes de smectites. En comparaison, la mesure de l'absorbance à 400 nm est représentée quand les bactéries sont incubées en milieu carencé en fer et non en magnésium, en absence de smectite.

### 3. Utilisation des éléments constitutifs des smectites par *P. aeruginosa* sur 9 jours

Nous nous sommes intéressés à l'utilisation des éléments constitutifs des smectites par les *Pseudomonades* sur des durées d'exposition plus longues afin de vérifier une éventuelle raréfaction des éléments provenant des smectites. La figure 27A présente un suivi de la croissance bactérienne ainsi que la production de pyoverdine durant les 9 jours d'incubation, en présence de 10 g.L<sup>-1</sup> de smectite, dans un milieu de culture renouvelé chaque jour. Durant cette période d'incubation, la population planctonique de *P. aeruginosa*, déterminée par dénombrement sur boîtes LB agar, reste constante, mais supérieure à celle observée en absence de smectite (données non présentées). Cette observation suggère une utilisation des

smectites en tant que source de nutriments, et ceci même sur une période dépassant un cycle de croissance. Concernant la production de pyoverdine, celle-ci atteint un maximum à 6 jours d'incubation (130  $\mu\text{M}$ ) pour ensuite diminuer et se stabiliser jusqu'au 9<sup>ème</sup> jour.

Les dosages effectués par ICP-AES sur les surnageants révèlent une augmentation des teneurs en aluminium et en fer durant les trois premiers jours, atteignant respectivement 17 et 1,8  $\mu\text{M}$  (données non présentées). Après ces trois jours, les concentrations en métaux diminuent, n'atteignant plus que 4,5  $\mu\text{M}$  pour l'aluminium et 0,8  $\mu\text{M}$  pour le fer. Si dès les premiers jours d'incubation, de la silice est retrouvée dans le milieu, après 4 jours d'incubation, les teneurs de cet élément augmentent constamment jusqu'à la fin de l'expérience, atteignant une concentration finale de 21  $\mu\text{M}$ , suggérant une dissolution accrue des smectites par *P. aeruginosa* au cours du temps. La présence de fer et d'aluminium est corrélée à la production durant les trois premiers jours de croissance.



**Figure 27 : Utilisation des éléments constitutifs des smectites par les bactéries sur 9 jours.** A. Suivi de la population de *P. aeruginosa* PAO1 et de la production de pyoverdine au cours du temps, en milieu carencé en fer, supplémenté par des smectites, renouvelé quotidiennement. Les bactéries sont incubées en milieu succinate en présence de 10 g.L<sup>-1</sup> de smectite, la croissance est déterminée par dénombrement sur boîtes (courbe rouge) et la production de pyoverdine est suivie par mesure de l'absorbance à 400 nm ( $\epsilon = 19\,000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour la pyoverdine à pH 7). B. Observation macroscopique du biofilm formé en présence de 10 g.L<sup>-1</sup> de smectite, après 9 jours d'incubation dans un milieu carencé en fer et renouvelé chaque jour. Barre d'échelle 1 cm.

De plus, la formation d'un biofilm est observée dès les premières heures d'incubation, puis celui-ci devient très important après renouvellement du milieu (Figure 27B). En parallèle à la formation de cet épais biofilm, les diminutions de la pyoverdine ainsi que des teneurs en fer et en aluminium sont observées, laissant envisager que le biofilm pourrait piéger une partie des éléments métalliques ainsi que la pyoverdine. Cette hypothèse a déjà été proposée



par Maurice *et al.* (Maurice et al, 2000) concernant le fer et nous l'avons également confirmé pour la pyoverdine. L'établissement de ce micro-environnement faciliterait la dissolution des smectites et donc l'accès à de nouveaux nutriments. Ces résultats confirment l'importance du biofilm dans les mécanismes de dissolution des minéraux argileux.

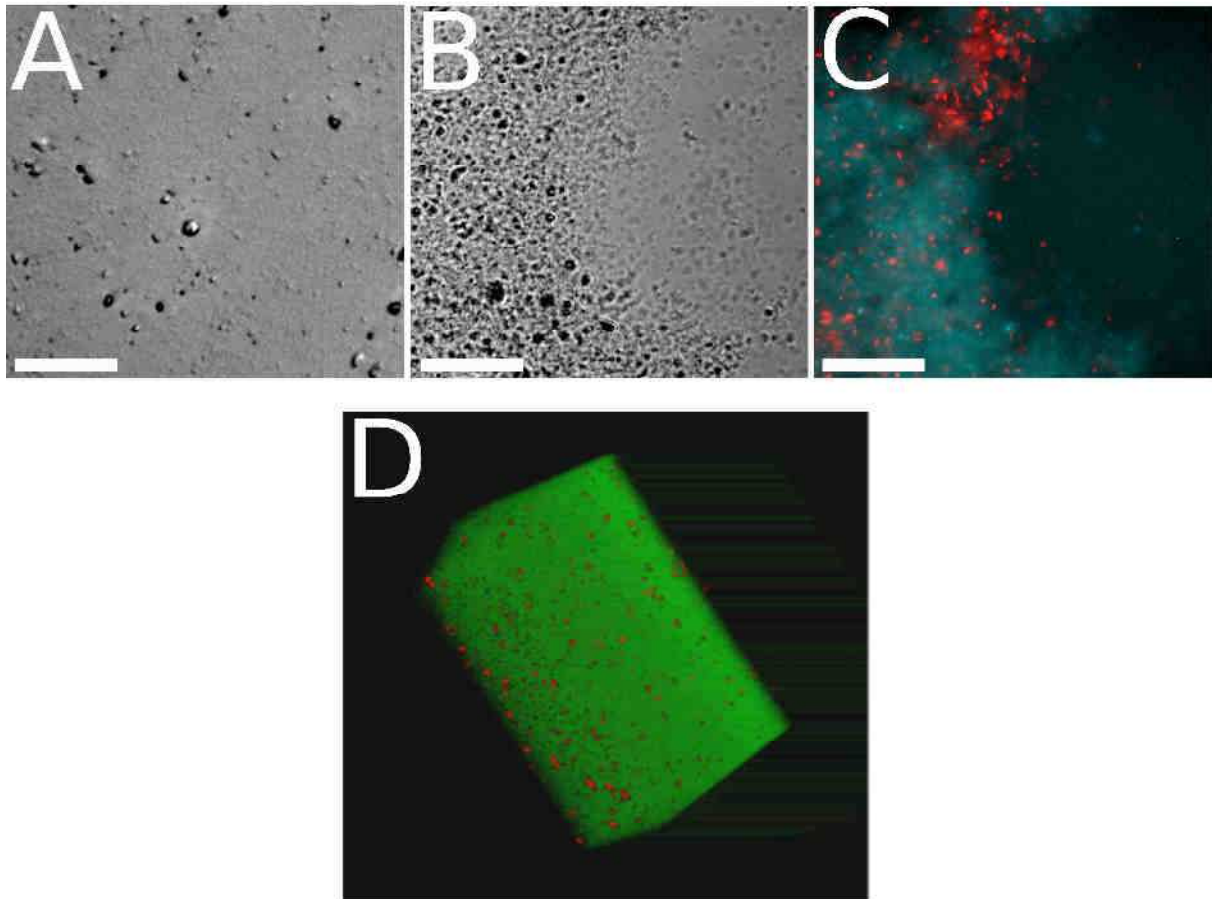
#### **4 - Rôle du biofilm dans l'interaction entre bactéries et smectites**

##### **4.1. Structure du biofilm formé par *P. aeruginosa* en présence des smectites**

Afin d'étudier la structure du biofilm formé autour des grains de smectite et la répartition des bactéries au sein de la matrice, des observations en microscopie conventionnelle et confocale ont été réalisées, en milieu minimum, en présence de *P. aeruginosa* PAO1 marquée par la protéine fluorescente mCherry (Laurent Guillon, non publiée).

En microscopie conventionnelle, comme il a pu être vu dans l'article, la formation d'un biofilm (Figure 28B) entourant les grains de smectite et coloré par la pyoverdine (Figure 28C) est observée. Les bactéries marquées par la mCherry apparaissent très majoritairement au sein de ce biofilm (Figure 28C). Si le rôle du biofilm dans l'altération des minéraux reste peu documenté, de telles structures ont déjà été observées en présence de minéraux argileux (Maurice et al, 2001a) dont les smectites (Alimova et al, 2009 ; Perdrial et al, 2009).

Concernant la microscopie confocale (Figure 28D), le biofilm formé apparaît comme une structure homogène. Néanmoins, de nombreux problèmes ont été rencontrés lors de cette expérience. En effet, les bactéries, très mobiles au sein du biofilm, ont notamment perturbé l'acquisition des images lors de ces observations microscopiques. De plus, lors du déplacement en profondeur, le biofilm constituait une structure trop homogène pour permettre à l'objectif de s'enfoncer correctement au sein de cet assemblage. Si, dans la littérature, en présence de *P. aeruginosa*, la formation de biofilms hétérogènes, dit «biofilm en champignon», est observée, les moyens de culture mis en place diffèrent. En effet, ces études n'utilisent pas, comme nous l'avons fait, des boîtes de cultures cellulaires mais des systèmes de culture en chambre à flux (Banin et al, 2005 ; Klausen et al, 2006 ; Yang et al, 2009). Il est donc possible que les résultats diffèrent en fonction du système de culture utilisé.

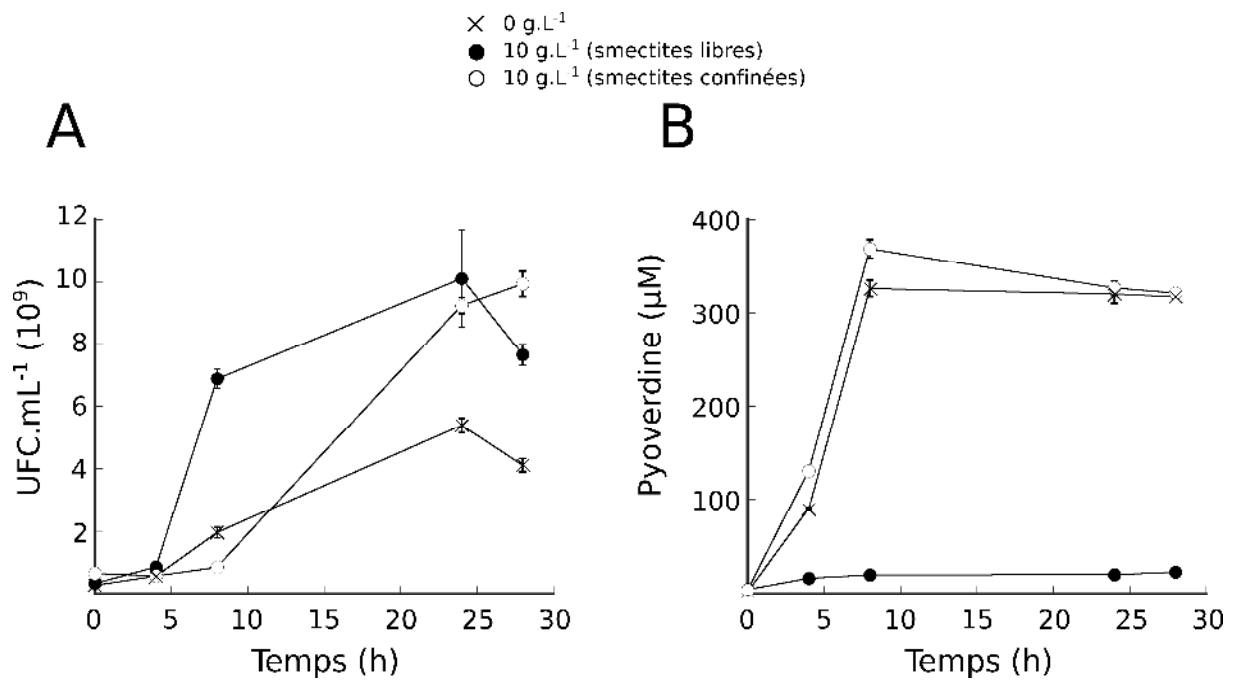


**Figure 28 : Observation du biofilm formé par *P. aeruginosa* en présence de smectites.** Image de microscopie en fond clair de smectite ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) en absence de bactérie (A) ou incubée durant 24 h en milieu minimum en présence de *P. aeruginosa* et sous faible agitation (B). Le biofilm présenté en B a également été observé en microscopie à fluorescence (Ex. 400 – Em. 440 pour la pyoverdine et Ex. 543 nm - Em. 593 nm pour la mCherry) (C) (Barre d'échelle =  $20 \mu\text{m}$ ). D. Image de microscopie confocale, expérience réalisée dans les mêmes conditions qu'en C.

#### 4.2. Implication du biofilm dans la chélation des métaux constitutifs des smectites

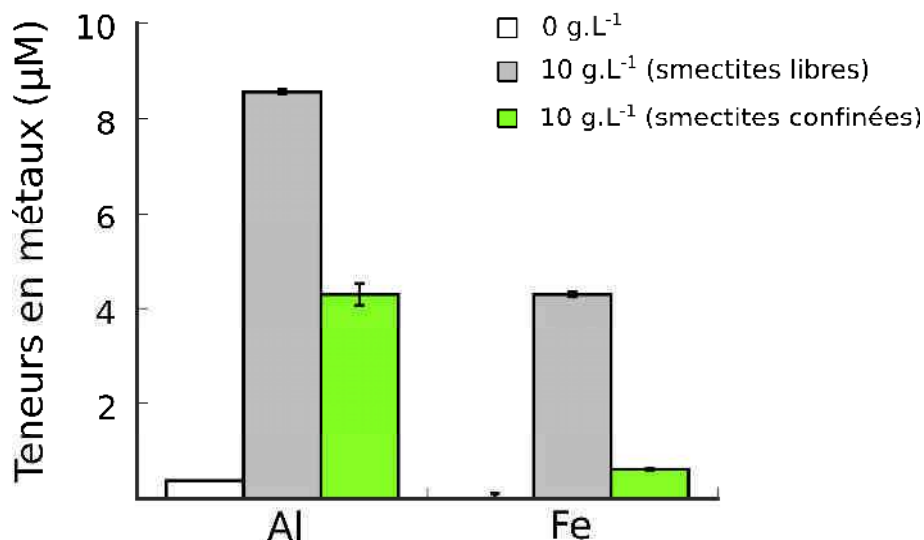
Afin de comprendre le rôle du biofilm dans l'altération des smectites, ces dernières ont été confinées dans un boudin de dialyse, puis placées en présence de *P. aeruginosa*, en conditions habituelles de carence en fer, sous agitation. Le seuil de coupure est de 12 à 14 000 Da, permettant ainsi le passage des sidérophores. Un suivi de la population bactérienne et de la production de pyoverdine, dans les différentes conditions, a été réalisé (Figure 29A). Les courbes obtenues présentent les caractéristiques d'un cycle de croissance en milieu liquide, avec les 4 phases distinctes : latence, exponentielle, stationnaire et de déclin. Néanmoins, le témoin en milieu carencé en fer, ainsi que l'essai contenant les smectites confinées dans le boudin de dialyse, présentent une phase de latence deux fois supérieures à

l'essai où les smectites sont libres. Après 24 h d'incubation, les cultures atteignent la même densité bactérienne, que les minéraux soient confinés ou non. Ce retard laisse supposer que le contact entre les bactéries et les smectites est un facteur essentiel au niveau de l'interaction entre ces deux partenaires. La quantification de la pyoverdine présente dans le milieu de culture est réalisée sur le surnageant par mesure de l'absorbance à 400 nm. En l'absence de smectite, une quantité importante de pyoverdine (325  $\mu\text{M}$ ) est mesurée dans le milieu (Figure 29B), tandis que la présence de 10  $\text{g.L}^{-1}$  de smectite libre dans le milieu entraîne, comme cela a été observé dans l'article, une diminution significative de la production de pyoverdine (15  $\mu\text{M}$ ). De façon très surprenante, lorsque la même quantité de smectite est présente dans le milieu de culture, mais emprisonnée dans le boudin de dialyse, la production de pyoverdine est très importante, atteignant des valeurs supérieures à celles mesurées en absence de smectite (360  $\mu\text{M}$ ) et aucun biofilm n'est formé. Ainsi, il apparaît qu'en absence de contact entre les argiles et les bactéries, le fer présent au sein de la structure des smectites n'est pas accessible aux bactéries.



**Figure 29 : Croissance de *P. aeruginosa* et production de pyoverdine en présence de smectites confinées.** **A.** Croissance de *P. aeruginosa* PAO1 en milieu carencé en fer, supplémenté par des smectites. Les bactéries sont incubées en milieu succinate en absence et en présence de smectites à 10  $\text{g.L}^{-1}$  emprisonnées ou non dans un boudin de dialyse. **B.** Production de pyoverdine par *P. aeruginosa* PAO1 en  $\mu\text{M}$  suivie par mesure de l'absorbance à 400 nm ( $\epsilon = 19\,000\ \text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour la pyoverdine à pH 7), quand les bactéries sont incubées en milieu minimum en absence et en présence de smectites à 10  $\text{g.L}^{-1}$  emprisonnées ou non dans un boudin de dialyse.

Afin de mieux caractériser ces échanges entre smectites et bactéries, les concentrations en silice, en aluminium et en fer ont été mesurées par ICP-AES, après 48 h d'incubation et après centrifugation du milieu de culture (Figure 30). Si les teneurs en silice, constituant majeur des smectites (58,35 %), sont importantes en présence de smectite, elles sont comparables, que les minéraux soient libres ou non dans le milieu (données non présentées). Par contre, lorsque les smectites sont emprisonnées dans le boudin de dialyse, les teneurs en aluminium et en fer mesurées dans le milieu sont nettement inférieures. En effet, lorsque le contact entre bactéries et argiles est possible, une stimulation des taux de solubilisation de ces deux métaux est observée, et ce malgré la formation d'un biofilm pouvant retenir ces éléments. 50 % d'aluminium et plus de 75 % de fer sont détectés par rapport aux smectites emprisonnées dans les boudins de dialyse.

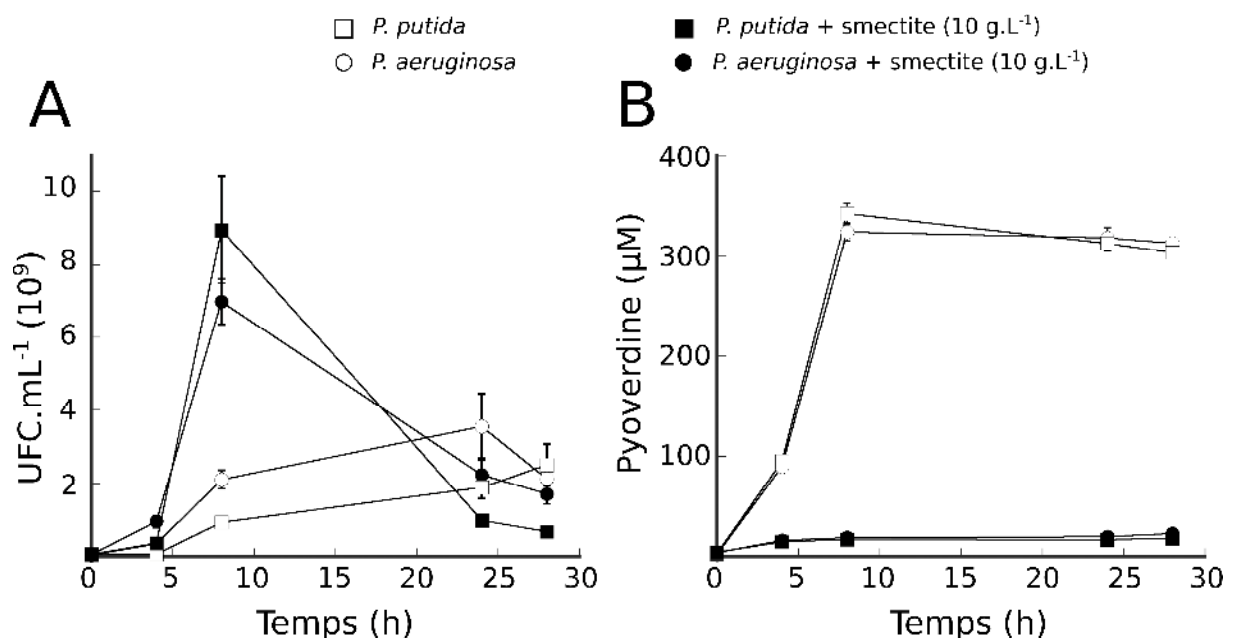


**Figure 30 : Détection par ICP-AES de l'aluminium et du fer solubilisés par les bactéries.** Les bactéries sont incubées en absence ou en présence de smectites confinées ou non dans un boudin de dialyse. Après 48 h d'incubation, les bactéries et les smectites sont centrifugées et les teneurs en métaux présents dans la solution sont mesurées par ICP-AES. Les conditions abiotiques ont été soustraites aux conditions biotiques.

Le biofilm formé autour des grains de smectite aurait ainsi un rôle important dans les interactions entre bactéries productrices de sidérophores et smectites. Le contact entre ces deux partenaires permettrait la déstructuration des smectites et la libération de ses métaux constitutifs favorisant ainsi la croissance bactérienne et diminuant la synthèse de pyoverdine, alors piégée au sein de la matrice d'exopolysaccharides.

## 5. Enjeux environnementaux

Bien que les *Pseudomonas* fluorescents soient ubiquitaires dans l'environnement, *P. aeruginosa* reste un pathogène opportuniste qui ne peut être utilisé dans les sols en vue d'expériences de remédiation. Si *P. aeruginosa* est un modèle au laboratoire très intéressant grâce aux grands nombres de mutants qui ont été développés, nous avons voulu vérifier que notre étude était transposable à un contexte environnemental. Ainsi, des expériences de croissance en présence de smectite et de *Pseudomonas putida* KT2440, bactérie non pathogène et fréquemment retrouvée dans l'environnement, ont été réalisées. De façon similaire à *P. aeruginosa* PAO1, un biofilm apparaît très rapidement autour des grains d'argiles. De plus, la croissance de *P. putida* est également stimulée par la présence de smectite (Figure 31A) et la production de pyoverdine est inhibée à forte concentration en minéral argileux (Figure 31B), tout comme nos observations avec *P. aeruginosa*. Ainsi, *P. putida* est capable d'acquérir le fer des smectites, ce qui nous laisse penser que nos conclusions quant à l'interaction entre *P. aeruginosa* et les smectites pourraient être étendues aux autres espèces de *Pseudomonas* fluorescents.



**Figure 31 : Croissance de *P. aeruginosa* et *P. putida* et production de pyoverdine.** **A.** Croissance de *P. aeruginosa* PAO1 et *P. putida* KT2440 en milieu carencé en fer, supplémenté par des smectites. Les bactéries sont incubées en milieu minimum en absence et en présence de smectites à 10 g.L<sup>-1</sup>. **B.** Production de pyoverdine par *P. aeruginosa* PAO1 et *P. putida* KT2440 en μM suivie par mesure de l'absorbance à 400 nm ( $\epsilon = 19\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour la pyoverdine à pH 7), quand les bactéries sont incubées en milieu minimum en absence et en présence de smectites à 10 g.L<sup>-1</sup>.

**Interactions entre *P. aeruginosa*  
et des goethites substituées par  
différents métaux**



## I - Matériel et méthodes

### 1. Synthèse et caractérisation des goethites

La goethite non substituée ainsi que les goethites substituées en cadmium et en nickel (9,07 %) ont été préparées en utilisant un protocole modifié de la méthode de Schwertmann et Cornell (Schwertmann & Cornell, 1991).

Pour la goethite non substituée, une solution de KOH à 2,5 M (400 mL) a été préparée sous atmosphère inerte ( $N_2$ ), transférée dans un flacon en polyéthylène haute densité et vigoureusement mélangée avec 500 mL d'une solution de  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  à 0,5 M. La suspension a vieilli durant 10 jours à 60°C puis a été transférée dans des tubes de dialyse et dialysée 7 jours avec de l'eau déminéralisée afin d'ôter les ions spectateurs de la réaction de précipitation. Après séchage à l'étuve à 30°C, la goethite a été réduite en poudre dans un mortier d'agate.

Pour les goethites substituées, une solution de  $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$  à 1 M (100 mL) a été mélangée par agitation magnétique dans un bécher en polyéthylène haute densité avec 10 mL d'une solution à 1 M soit de  $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ , soit de  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ . 180 mL d'une solution de KOH à 5 M préparée sous atmosphère inerte ( $N_2$ ) a été ajoutée rapidement dans le bécher. De l'eau déminéralisée a été ajoutée afin de compléter jusqu'à 2 L. La suspension a été transférée dans un flacon en polyéthylène haute densité et maintenue durant 15 jours à 70°C. Le flacon a été agité et ouvert 5 min tous les jours. La préparation a ensuite été dialysée 7 jours avec de l'eau déminéralisée puis séchée à l'étuve à 30°C avant d'être réduite en poudre dans un mortier d'agate.

Toutes les goethites ont été caractérisées par diffraction des rayons X. Pour cela, après broyage dans un mortier en agate, les échantillons ont été caractérisés à l'aide d'un diffractomètre RX Brüker (modèle D5000), en mode  $\theta / 2\theta$  (Balayage de 3 à 65°, par pas de 0,02° d'une durée de 2s, anticathode Cu, 40 kV – 30 mA). Les diagrammes sont présentés en annexes. Grâce aux techniques de diffraction, la cristallinité des échantillons a pu être déterminée (Annexes B-G).

Après avoir été mises en suspension à une concentration de 20 g.L<sup>-1</sup>, les goethites ont été stérilisées par autoclavage (20 min à 121°C). Leur stérilité a ensuite été vérifiée par des



étalements sur gélose LB afin de contrôler la contamination bactérienne et sur gélose dextrose et pomme de terre (Difco) pour contrôler la contamination fongique.

## 2. Cinétique de fluorescence de la pyoverdine en présence de goethite

Les études de spectroscopie de fluorescence ont été effectuées avec un spectrofluorimètre de type PTI (Photon International TimeMaster, Bioritech). Les résultats obtenus ont été traités avec le logiciel Kaleidagraph.

Les études de fluorescence ont été réalisées dans un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8. Tout d'abord, des concentrations croissantes de goethite (0 - 0,2 - 1 et 10 g.L<sup>-1</sup>) ont été incubées à température ambiante avec une concentration constante de pyoverdine (1 µM), durant 90 min. Après incubation, les échantillons ont été centrifugés (14 000 g, 15 min), les surnageants, placés dans une cuve en quartz de 1 mL, ont été excités à 400 nm. Des contrôles, sans goethite ou sans pyoverdine, ont été réalisés. Pour les goethites substituées par de l'Al, du Cd ou du Ni, la procédure a été la même.

## 3. Croissance bactérienne en présence de goethite

Afin d'observer les interactions entre les goethites et les bactéries, nous avons réalisé des expériences les mettant en contact, expériences similaires à celles réalisées pour les smectites. Nous avons utilisé une souche sauvage de *P. aeruginosa* ATCC 15692 ainsi que des mutants dans la production de sidérophores : PAO6297 (souche ne produisant pas de pyochéline, Serino et al, 1995), PAO6382 (souche ne produisant pas de pyoverdine, Braud et al, 2009b) et PAO6383 (double mutant ne produisant ni pyoverdine ni pyochéline, Michel et al, 2007). Une première série d'expériences a été menée sur les différentes goethites en présence de la souche PAO1. Les expériences impliquant les souches mutantes ont été réalisées en utilisant la goethite substituée aluminium. A partir d'une pré-culture en bouillon LB, de 24 h à 30°C sous agitation (220 rpm), un milieu succinate carencé en fer (composition en g.L<sup>-1</sup> : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3 ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 ; succinate de sodium, 4 ; pH ajusté à 7 par ajout de NaOH) (Meyer & Abdallah, 1978) a été inoculé puis incubé sous agitation (220 rpm) durant 48 h. La culture a ensuite été centrifugée (10 min à 8 600 g) et lavée deux fois avec du milieu succinate. La concentration bactérienne a été déterminée par mesure de la densité optique à 600 nm.

L'expérience de croissance bactérienne en présence de goethite a été réalisée dans des Erlenmeyer en polycarbonate, contenant 16 mL de milieu succinate supplémenté de concentrations croissantes du minéral (0 - 1 et 10 g.L<sup>-1</sup>). Chaque Erlenmeyer a été inoculé avec les bactéries afin d'obtenir une DO<sub>600</sub> finale de 0,05 par mL. Des témoins, sans bactérie ou sans goethite, ont également été réalisés. Les Erlenmeyer ont ensuite été incubés à 30°C, sous agitation (220 rpm) durant 48 h. 1 mL de chaque échantillon a été prélevé après 4 - 8 - 24 - 28 et 48 h d'incubation. La croissance bactérienne planctonique a été déterminée après dilution et étalement de 100 µL de chaque dilution sur milieu gélosé LB et est exprimée en UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### 4. Détermination des concentrations en métaux

Pour les différentes expériences réalisées en présence de *P. aeruginosa* et de goethite, le milieu a été centrifugé 15 min à 4 500 g, après 48 h de culture. Le milieu de culture a ensuite été filtré sur membrane de 0,2 µm et acidifié à pH 1,0 avec de l'HNO<sub>3</sub> à 70 %. Les teneurs des différents métaux (Al, Fe, Cd et Ni) présents dans les surnageants de culture ont été mesurées par ICP-AES.

#### 5. Microscopie conventionnelle

La souche PAO1-mCherry (Laurent Guillon, non publiée) décrite dans la partie des interactions entre *P. aeruginosa* et les smectites a également été utilisée pour les observations microscopiques des goethites (1 g.L<sup>-1</sup>) après 24 h d'incubation en absence ou en présence de bactéries en milieu minimum ont été réalisées en microscopie à fond clair et en épifluorescence (Nikon Eclipse 50i, objectif : CFI Achromplan 100 x A ON 1,25 DT 0,18) connectée à une caméra DS-Fi1 numérique 12 bits. La coloration du biofilm par la pyoverdine produite a été détectée par un filtre Bv2A (excitation 400-440 nm, émission « Long Pass » 470 nm). Les bactéries, marquées par la mCherry, ont été détectées par un filtre TRITC-A (excitation « Band Pass » 543 nm, émission 593 nm). Les images ont été capturées en utilisant le logiciel NIS elements.

## II - Résultats et discussion

### 1. Caractérisation des goethites

La goethite non substituée ( $\alpha$ -FeOOH) ainsi que celles substituées en nickel (Ni- $\alpha$ -FeOOH) et en aluminium (Al- $\alpha$ -FeOOH), contenant respectivement 1,3 % et 2,9 % de substitution, ont été synthétisées au Laboratoire Sols et Environnement. La goethite substituée en cadmium (Cd- $\alpha$ -FeOOH) a été synthétisée au Laboratoire d'Hydrologie et de Géochimie de Strasbourg, avec un taux de substitution de 9,01 %. Une seconde goethite substituée en nickel a également été produite dans ce laboratoire, avec un taux de substitution plus élevé que celle de Nancy, de 9,07 %. Les degrés de cristallinité de toutes ces goethites ont été déterminés ainsi que l'estimation de leurs surfaces spécifiques (Tableau 13 et Annexes B-G).

Les techniques de diffraction X ont permis de caractériser les imperfections structurales dans un solide. À partir de l'analyse des profils de raies de diffraction X, il est possible de mesurer des écarts à la structure cristalline parfaite. Les principales imperfections accessibles sont la taille des cristallites et les micro-contraintes.

La loi de Scherrer relie la largeur des raies de diffraction à la taille des domaines cristallins : plus les domaines cristallins sont petits et plus les raies sont larges. La goethite substituée en cadmium est donc la mieux cristallisée alors que la goethite pure est la moins bien cristallisée (Tableau 13).

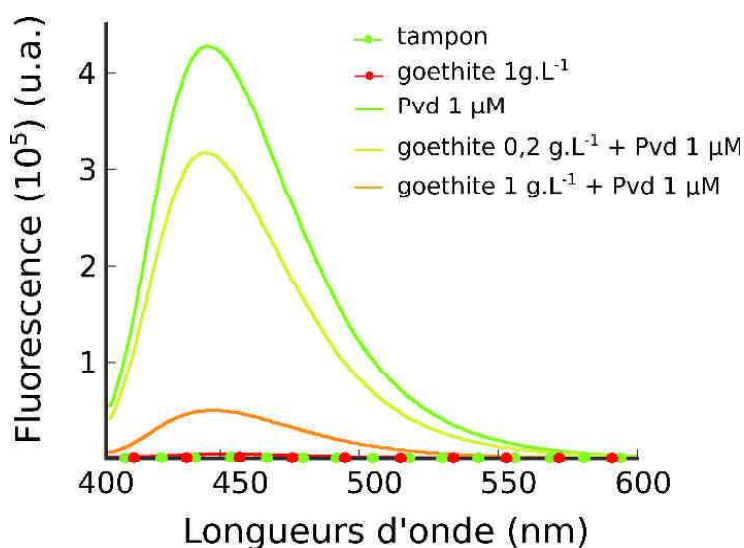
**Tableau 13 : Caractéristiques des différentes goethites utilisées dans notre étude**

Goethites	% de substitution	Composé cristallin identifié	Largeur à mi-hauteur du pic (110), raie la plus intense de la goethite (en $2\theta$ )	Surface spécifique (en $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ )
non substituée	/	goethite	0,557	49,6 $\pm$ 0,6
substituée Cd	9,01 %	goethite	0,280	99,3 $\pm$ 2,6
substituée Ni	9,07 %	goethite	0,381	29 $\pm$ 2,6
substituée Al	2,9 %	goethite	0,493	36,1 $\pm$ 4,9
substituée Ni	1,3 %	goethite	0,487	47,4 $\pm$ 2,6

Toutes les expériences ont été réalisées en absence ainsi qu'en présence de 1 et 10 g.L<sup>-1</sup> de goethites. Néanmoins, pour la plus forte concentration de ces minéraux, les résultats apparaissent très difficiles à interpréter. Une des raisons de cette difficulté peut être une conséquence de la très forte turbidité d'une solution contenant 10 g.L<sup>-1</sup> de goethite. Cette caractéristique n'est alors plus comparable au comportement d'une culture en milieu liquide. Ainsi, nous ne traiterons que des résultats obtenus en présence de 1 g.L<sup>-1</sup> de goethites.

## 2. Etude par fluorimétrie de la formation de complexes pyoverdine-métal en présence de goethite

En présence de goethites, aucune cinétique n'a pu être effectuée en raison de l'opacité du milieu. Néanmoins, des quantités croissantes de minéraux ont été incubées 90 min avec une concentration constante de pyoverdine à 1 μM. Après centrifugation, les surnageants ont été excités à 400 nm (Figure 32) et le signal émis enregistré entre 420 et 600 nm. Lorsque la concentration en goethite augmente, une diminution de fluorescence est observée et ceci jusqu'à atteindre une extinction totale de fluorescence pour une concentration de 10 g.L<sup>-1</sup>. Bien que seuls les spectres réalisés sur la goethite pure soient présentés, une extinction presque totale du signal de fluorescence est observée pour 1 g.L<sup>-1</sup> des différentes goethites substituées, suggérant que la pyoverdine est alors saturée en fer. Ainsi, il semblerait que la pyoverdine soit capable de complexer le fer de ces minéraux.



**Figure 32 : Spectres de fluorescence de la pyoverdine après incubation en présence de goethite.** La pyoverdine à 1 μM est incubée en présence de concentrations croissantes de goethites, substituées ou non, dans un tampon Tris-HCl 50 mM à pH 8. Les concentrations de goethite utilisées sont 0,2 g.L<sup>-1</sup> et 1 g.L<sup>-1</sup>. Après centrifugation, les échantillons sont excités à 400 nm.

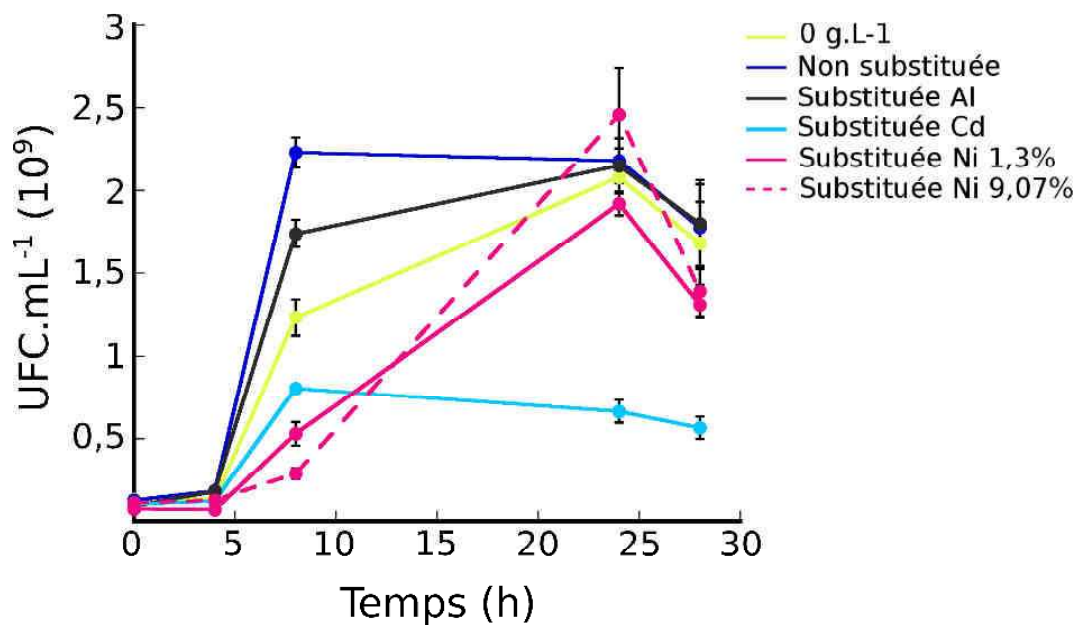
### 3. Croissance de *P. aeruginosa* en présence de goethites substituées ou non

Afin d'étudier la capacité des bactéries à utiliser le fer constitutif des goethites, la souche sauvage de *P. aeruginosa* PAO1 a été cultivée, sous agitation, en milieu carencé en fer, en absence et en présence de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  des différentes goethites substituées ou non (Figure 33). La détermination du nombre de bactéries planctoniques a été réalisée par dénombrement sur boîtes LB agar.

Les courbes de croissance obtenues en absence et en présence de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de goethites présentent les caractéristiques d'un cycle de croissance bactérienne en milieu liquide avec les 4 phases distinctes : latence, exponentielle, stationnaire et déclin. Le comportement de *P. aeruginosa* diffère selon la nature du métal substituant les goethites. La croissance bactérienne est stimulée en présence de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de goethite non substituée ainsi qu'en présence de goethite substituée aluminium par rapport à la croissance obtenue en absence de goethite. Des résultats similaires ont également été obtenus en présence de goethites substituées ou non en aluminium à  $0,4 \text{ g.L}^{-1}$  en contact avec *Pseudomonas mendocina* par Maurice *et al.* (Maurice *et al.*, 2000). Bien que l'aluminium soit un élément toxique pour toutes les formes de vie, la croissance de *P. aeruginosa* n'est apparemment pas inhibée par la présence d'aluminium quand il est fourni sous forme minérale, ou du moins à la concentration retrouvée en solution ( $0,78 \text{ }\mu\text{M}$ ) à partir des goethites substituées. La stimulation de croissance observée en présence de ces deux types de goethites suggère que les bactéries ont la capacité d'utiliser le fer constitutif de ces deux goethites.

Cependant, en présence de goethites substituées en nickel et en cadmium, les résultats obtenus varient. Concernant les goethites substituées en nickel, bien que les pourcentages de substitution soient différents (1,3 % et 9,07 %), la croissance est similaire. Si, à 24 h d'incubation, la croissance bactérienne en présence de ces deux goethites est semblable à celle observée en absence de goethite, la croissance est fortement ralentie lors des premières heures de culture. Il est possible d'envisager une libération importante de nickel qui, bien que micro-élément essentiel à la bactérie, inhiberait la croissance entre 0 et 4 h. En effet, selon le taux de substitution en nickel, des concentrations entre 4 et  $15 \text{ }\mu\text{M}$  sont retrouvées en solution, alors que la concentration minimale inhibitrice du nickel pour cette souche a été déterminée à  $15 \text{ }\mu\text{M}$  (Hannauer *et al.*, 2012a). De plus, après 8 h d'incubation, comme nous le verrons par la suite, un biofilm se met en place autour des goethites, pouvant séquestrer cet élément dans la matrice d'exopolysaccharides et ainsi lever l'inhibition de la croissance planctonique. En

effet, bien que lors d'incubation de plus de 27 h, la résistance du biofilm et de la population planctonique aux métaux soit similaires, en dessous de 27 h, le biofilm permettrait une tolérance aux métaux de 2 à 25 fois supérieure à celle de la population planctonique (Harrison et al, 2005). Concernant la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 en présence de goethite substituée en cadmium, celle-ci est très faible par rapport au témoin, quelque soit le temps de culture. De plus, comme nous le verrons ensuite, aucun biofilm n'est formé en présence de cette goethite, empêchant ainsi la séquestration du métal toxique.



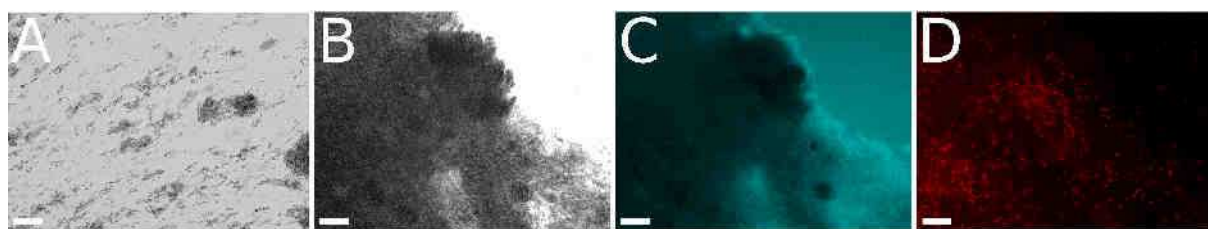
**Figure 33 :** Croissance de *P. aeruginosa* PAO1 à 30°C en milieu carencé en fer, supplémenté ou non par des goethites. Les bactéries sont incubées en milieu succinate en absence et en présence de différentes goethites à 1 g.L<sup>-1</sup>. Les données sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

#### 4. Formation d'un biofilm autour des goethites

Lors des expériences de croissance de *P. aeruginosa* PAO1 en présence des différentes goethites, la formation de biofilm a pu être notée au niveau macroscopique. En effet, de façon similaire aux smectites (article), dès 8 h d'incubation, un biofilm emprisonnant les grains de goethites est observé pour les différents oxy-hydroxydes de fer étudiés, à l'exception de la goethite substituée en cadmium. En effet, pour cette dernière, aucune structure de type biofilm n'a pu être observée, suggérant une toxicité du cadmium pour les bactéries.

Des observations en microscopie de *P. aeruginosa* en présence des goethites, après 24 h d'incubation (Figure 34 A-D), confirment la présence de bactéries et d'une matrice

d'exopolysaccharides formant un biofilm qui emprisonne les goethites (Figure 34B), à l'exception de celle substituée en cadmium. Si les smectites apparaissaient dans une matrice d'exopolysaccharides colorée par la pyoverdine (article), le biofilm formé autour des grains de goethite s'avère peu coloré par la pyoverdine (Figure 34C). Cette observation peut s'expliquer par la forte densité du biofilm formé autour de ce type de minéraux, rendant les observations microscopiques difficiles, mais également par une production de pyoverdine dans le milieu contenant 1 g.L<sup>-1</sup> de goethites, bien plus faible qu'en présence de smectite (50 µM vs 250 µM, voir paragraphe suivant). En outre, comme pour les smectites, les bactéries marquées par la mCherry apparaissent très majoritairement au sein de ce biofilm (Figure 34D). Si le rôle du biofilm en présence de minéraux est peu documenté, de telles structures ont déjà été observées pour des goethites substituées en aluminium en présence de *P. mendocina* (Maurice et al, 2000). De plus, la fixation des micro-organismes à la surface des minéraux a été reportée comme essentielle à la dissolution des oxy-hydroxydes de fer (Arnold et al, 1988).

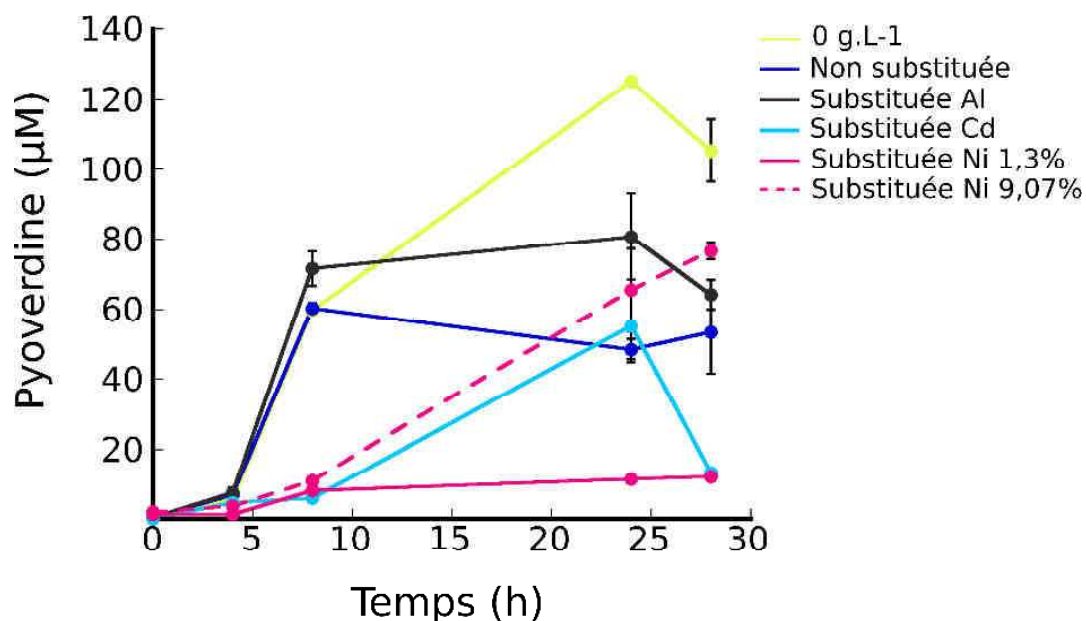


**Figure 34 : Observation du biofilm formé par *P. aeruginosa* en présence de goethite.** Image de microscopie en fond clair de goethite (1 g.L<sup>-1</sup>) en absence de bactérie (A) ou incubée durant 24 h en milieu minimum en présence de *P. aeruginosa* sous faible agitation (B). Le biofilm présenté en B a également été observé en microscopie à fluorescence (Ex. 400 – Em. 440 pour la pyoverdine (C) et Ex. 543 nm - Em. 593 nm pour la mCherry (D)) (Barre d'échelle = 20 µm).

### 5. Production de pyoverdine par *P. aeruginosa* en présence de différentes goethites

Afin de quantifier la production de pyoverdine produite par *P. aeruginosa* PAO1, les milieux de culture contenant les différentes goethites à 1 g.L<sup>-1</sup> ont été centrifugés et l'absorbance à 400 nm a été mesurée dans le surnageant (Figure 35). Cette approche ne prend cependant pas en compte la pyoverdine présente dans le biofilm. En absence de goethite, le milieu de culture des bactéries étant carencé en fer, une quantité importante de pyoverdine (125 µM) est détectée dans le milieu. En présence de 1 g.L<sup>-1</sup> de goethites, qui contiennent des concentrations très élevées de fer (11,2 mM), la quantité de pyoverdine mesurée dans le

milieu diminue d'environ de moitié (63%). En présence de la goethite substituée en cadmium, la production de pyoverdine est retardée, due à une plus longue phase de latence de la croissance, qui est, de plus, très limitée en présence de cette goethite. Bien que pour les goethites substituées en nickel, les croissances présentaient des allures similaires, la synthèse de pyoverdine en présence de ces deux goethites diffère. En effet, si en présence de la goethite substituée à 9,07 %, la production du sidérophore atteint 60  $\mu\text{M}$ , la synthèse de pyoverdine est presque totalement inhibée en présence de la goethite à 1,3 % de substitution en nickel. Outre le fait que la goethite substituée à 1,3 % contienne une quantité légèrement plus élevée de fer, la différence dans la production de pyoverdine pourrait être liée aux degrés de cristallinité de cet oxy-hydroxyde. En effet, cette goethite présente une moins bonne cristallinité, ce qui favoriserait sa dissolution par les bactéries, entraînant une quantité de fer plus importante dans le milieu entraînant une inhibition de la synthèse de pyoverdine. Néanmoins, la goethite substituée en nickel à 1,3 % possède une plus grande surface spécifique ( $47,4 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ) que celle à 9,07 % ( $29 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ). En effet, plus la surface spécifique d'un minéral est élevée, plus grande sera sa réactivité de surface vis-à-vis de sa dissolution.



**Figure 35 : Production de pyoverdine par *P. aeruginosa* PAO1 en  $\mu\text{M}$  suivie par mesure de l'absorbance à 400 nm ( $\epsilon = 19\,000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  pour la pyoverdine à pH 7). Les bactéries sont incubées en milieu succinate en absence et en présence de différentes goethites à  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Les données sont les moyennes de trois expériences indépendantes.**

Ces différents résultats concordent tous avec le fait que *P. aeruginosa*, outre sa capacité à utiliser le fer structural des smectites, est également capable d'utiliser celui de ces différentes goethites comme source de nutriment.

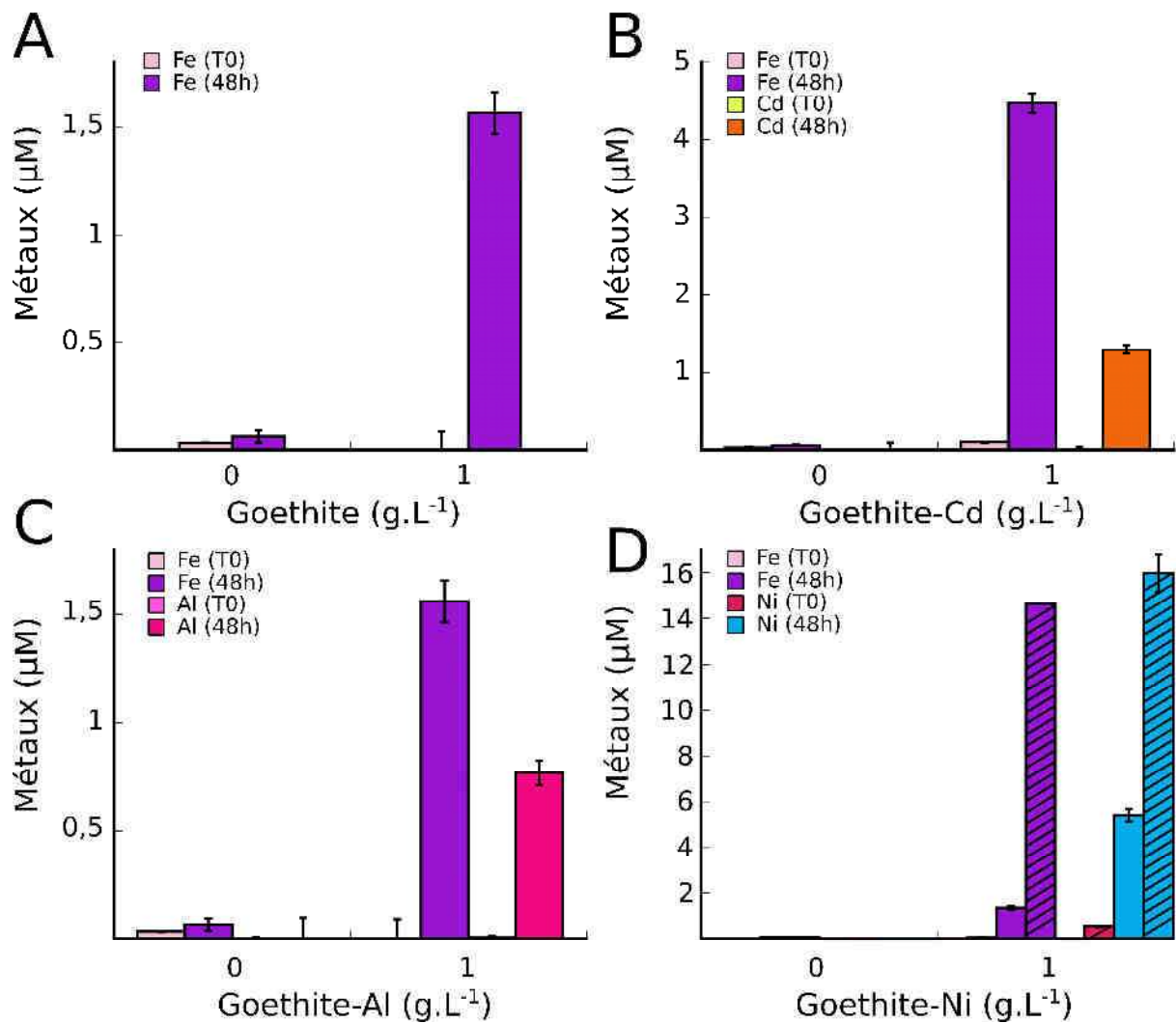


## 6. Implication des bactéries productrices de sidérophores dans la dissolution des goethites

Au temps initial et après 48 h d'incubation des bactéries en absence ou en présence des goethites à  $1 \text{ g.L}^{-1}$ , les quantités de métaux présents en solution ont été déterminées par ICP-AES (Figure 36 A-D). Afin de représenter plus fidèlement l'effet des bactéries sur le minéral, les teneurs en métaux présents par la dissolution des goethites par le milieu seul ont été soustraites à celles mesurées en présence de bactéries.

L'élément constitutif majeur des goethites, le fer, atteint des teneurs d'environ  $1,5 \text{ }\mu\text{M}$ , en solution après 48 h de culture en présence de goethite non substituée. Des quantités comparables sont mesurées pour les différentes goethites, à l'exception de la goethite substituée en cadmium, dont la teneur en fer mesurée est de  $4,5 \text{ }\mu\text{M}$  (Figure 36B), et celle substituée en nickel à 9,07 % avec  $15 \text{ }\mu\text{M}$  de fer libéré (Figure 36D). Pour les smectites, dont les teneurs en fer sont beaucoup plus faibles au sein du minéral, des quantités similaires ( $1,7 \text{ }\mu\text{M}$ ) avaient également été retrouvées dans le milieu. En effet, dans la littérature, Reichard *et al.* ont évalué à  $8 \text{ }\mu\text{M}$  la quantité de fer dissous dans le milieu, après 48 h d'incubation de goethite à  $2,5 \text{ g.L}^{-1}$  en présence de  $50 \text{ }\mu\text{M}$  de DFOB (Reichard et al, 2007), teneurs légèrement supérieures à celles de notre étude. En effet, en présence de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  et d'une production moyenne de pyoverdine de  $60 \text{ }\mu\text{M}$ , les teneurs retrouvées sont d'environ  $1,6 \text{ }\mu\text{M}$ . Les variations observées pour les goethites substituées en cadmium et en nickel 9,07 % pourraient être le fait des degrés de cristallinité variables entre ces goethites et les trois autres. Or, d'après les analyses aux rayons X, ce sont les goethites les mieux cristallisées. La surface spécifique de la goethite substituée en cadmium est extrêmement élevée ( $99,3 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ) comparée à celle de la goethite substituée en nickel 9,07 % qui présente la plus faible des surfaces ( $29 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$ ) de toutes les goethites testées dans ce travail.

Les métaux (aluminium, cadmium et nickel) substituants les atomes de fer dans les goethites ne sont détectés dans le milieu qu'après 48 h d'incubation, et ceci uniquement en présence de bactéries. Si le cadmium ne représente que 9,01 % de la constitution de la goethite, environ  $1,5 \text{ }\mu\text{M}$  de cet élément est retrouvé dans la solution. De même, pour l'aluminium et le nickel, qui ne représentent que de faibles pourcentages de la goethite (inférieurs à 9,07 %), des teneurs parfois supérieures à celle du fer sont mesurées, notamment, dans le cas des goethites substituées en nickel.



**Figure 36 : Détection par ICP-AES des métaux dans les surnageants de culture supplémentés en goethites.** Les bactéries (PAO1, souche sauvage) sont incubées en absence ou en présence de 1 g.L<sup>-1</sup> des différentes goethites (**A** : non substituée ; **B** : substituée en cadmium ; **C** : substituées en aluminium et **D** : substituées en nickel). Initialement et après 48 h d'incubation, les milieux de culture sont centrifugés et les teneurs en métaux présents dans la solution sont mesurées par ICP-AES. Les histogrammes bleus hachurés correspondent à la goethite substituée en nickel à 9,07 % et les histogrammes bleus correspondent à la goethite substituée à 1,3 %. Les valeurs représentent la différence entre les conditions biotiques et abiotiques, au même temps d'incubation.

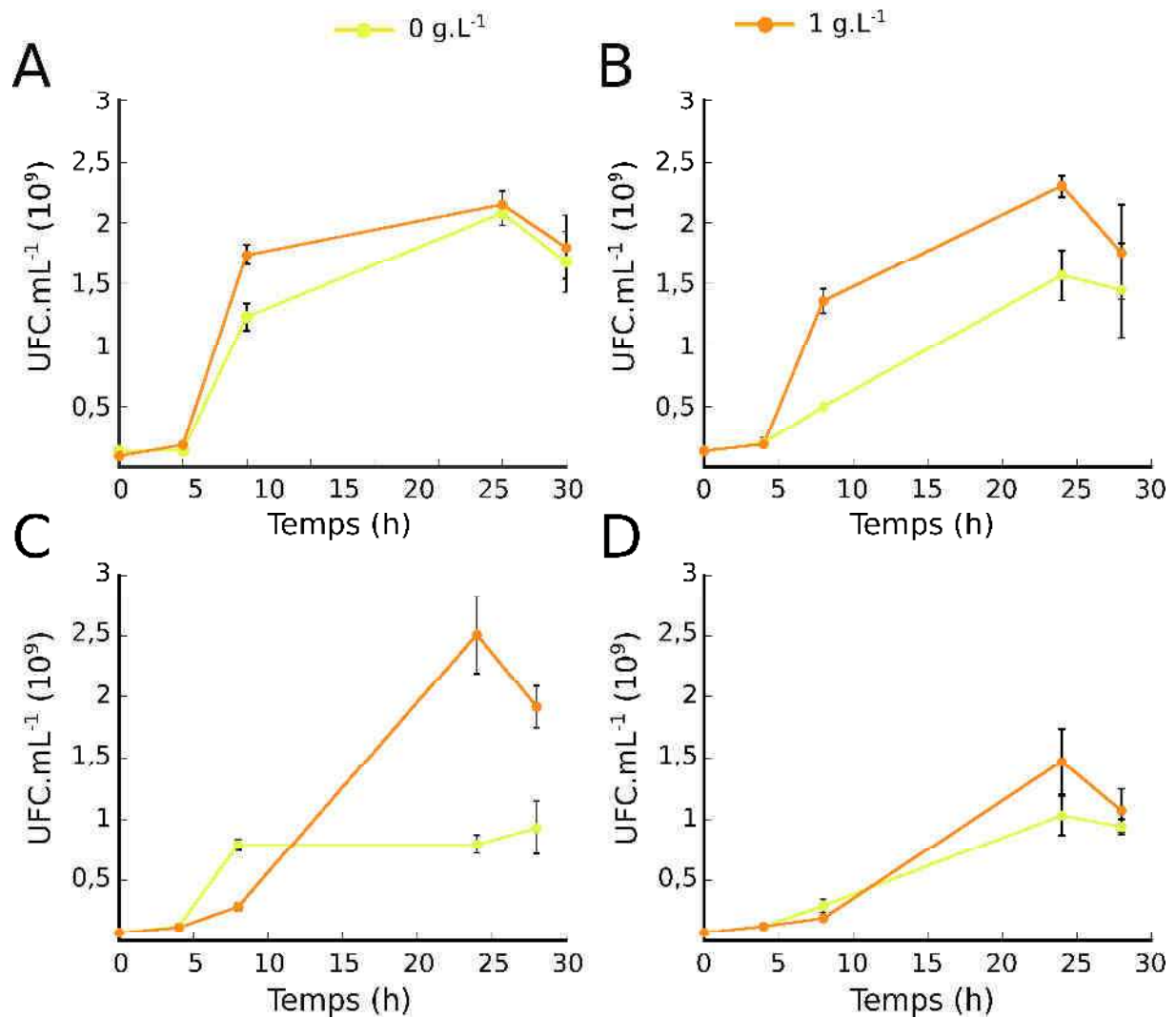
En ce qui concerne ces dernières, si une des goethites possède un taux de substitution sept fois supérieur à l'autre mais seulement trois fois plus de nickel est détecté en solution, suggérant une dissolution plus importante de la goethite faiblement substituée. Ce résultat est cohérent si nous considérons les propriétés cristallographiques et chimiques. En effet, la goethite substituée en nickel 1,3 % présente un degré de cristallinité plus faible, ainsi qu'une surface spécifique plus grande (46,2 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>) que celle substituée à 9,07 %. La nature du cation en substitution dans le minéral influence de manière significative sa dissolution ainsi la croissance bactérienne. Ainsi, la solubilisation du fer des goethites par les bactéries pourrait

être à l'origine des stimulations de croissance observées précédemment. La déstructuration du réseau cristallin par la bactérie dans le but d'acquérir le fer aurait une conséquence importante sur la dissolution des métaux associés, potentiellement toxique. Les deux métaux ne se dissolvent pas dans les mêmes proportions que celles trouvées dans le minéral (Bousserrhine et al, 1999).

### **7. Rôle des sidérophores de *P. aeruginosa* dans la dissolution des goethites alumineuse**

Afin d'étudier l'importance des deux sidérophores synthétisés par *P. aeruginosa*, la pyoverdine et la pyochéline, dans l'acquisition du fer à partir des goethites, la souche sauvage PAO1 de *P. aeruginosa* (Figure 37A) ainsi que des souches mutantes dans la production soit de la pyoverdine, soit de la pyochéline, ou encore des deux sidérophores, ont été cultivées dans un milieu carencé en fer, supplémenté à 1 g.L<sup>-1</sup> de goethites substituées en aluminium (Figure 37 B-D). L'expérience a été effectuée uniquement sur les goethites substituées en aluminium, compte tenu que ce cation est très souvent retrouvé dans les oxydes de fer naturellement présents dans les sols. De plus, ces oxydes ont été très souvent étudiés, notamment dans le mécanisme de la réduction dissimilatrice du fer décrit chez les bactéries du genre *Shewanella* ou *Geobacter*, en condition d'anaérobiose.

De façon similaire à l'étude de la dissolution de la smectite par les Pseudomonades (article), une stimulation de croissance en présence de goethite substituée en aluminium est principalement observée lorsque la souche est capable de produire de la pyoverdine (Figure 37A-B). En absence de sidérophore (Figure 37D), aucune stimulation de croissance n'est observée lors de l'ajout de goethite, alors qu'en présence de la souche capable de synthétiser seulement la pyochéline (Figure 37C), la stimulation est retardée. Cette observation suggère que le fer, présent dans la goethite, est disponible pour les bactéries *via* la pyoverdine, et en son absence, la mise en place de l'acquisition du fer des goethites par la voie pyochéline se met en place plus tardivement.



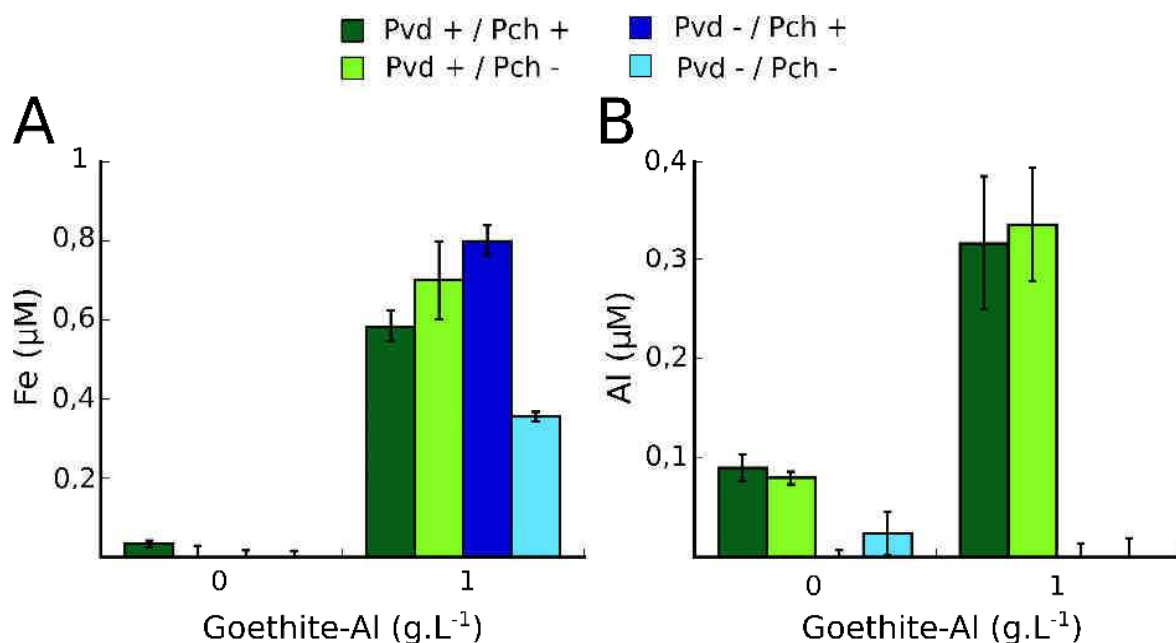
**Figure 37 : Croissance de *P. aeruginosa* PAO1 (A) ; PAO6297 (B), une souche déficiente dans la biosynthèse de la pyochéline ; PAO6382 (C), une souche ne synthétisant pas de pyoverdine et PAO6383 (D), une souche déficiente dans la biosynthèse à la fois de la pyoverdine et de la pyochéline. Ces différentes souches sont cultivées, à 30°C, en milieu carencé en fer, en absence ou en présence de goethite substituée en aluminium à 1 g.L<sup>-1</sup>. Les données sont les moyennes de trois expériences indépendantes.**

Afin de préciser le rôle des sidérophores pyoverdine et pyochéline dans la dissolution des goethites, les teneurs en métaux présentes dans la solution ont été mesurées par ICP-AES après 48 h d'incubation et centrifugation des populations bactériennes et des goethites (Figure 38 A-B).

Concernant les teneurs en fer retrouvées dans le milieu de culture, la présence de pyoverdine et/ou de pyochéline permettrait la solubilisation du fer constitutif des goethites (Figure 38A). En effet, les concentrations en fer obtenues en présence de l'un ou des deux sidérophores mettent en évidence l'implication de ces molécules dans la solubilisation du fer des goethites, confirmant les résultats obtenus lors des expériences avec les smectites (article).

Cependant, lors des expériences similaires avec les smectites, le double mutant ne permettait pas la solubilisation du fer. Dans le cas des goethites, ce résultat est moins marqué. En effet, en absence de production des deux sidérophores, du fer, en plus faibles quantités, est toutefois détecté dans le milieu, suggérant notamment qu'un mécanisme autre, tel que la présence de réductases ou la synthèse de phénazines, pourrait également intervenir en absence de synthèse de sidérophores et en présence de minéraux contenant de fortes teneurs en fer. En effet, Cox (Cox, 1986) a, en effet, montré que la pyocyanine pourrait participer à des réactions de solubilisation et de libération du fer. Le fer obtenu sous sa forme ferreuse pourrait alors s'accumuler dans la bactérie.

Des teneurs en aluminium sont détectées dans le milieu lors de l'utilisation des deux souches produisant la pyoverdine, PAO1 et PAO6297 (Figure 38B), en présence de 1 g.L<sup>-1</sup> de goethite substituée en aluminium. Le comportement similaire de ces deux souches suggère une implication majoritaire de la pyoverdine et non de la pyochéline dans la solubilisation de l'aluminium. Ainsi, en plus de la solubilisation du fer, comme il a pu être observé dans le cas des smectites, une solubilisation non seulement du fer mais également de l'aluminium des minéraux est également possible par la pyoverdine.



**Figure 38 : Dosage du fer (A) et de l'aluminium (B) présents dans les surnageants des cultures bactériennes.** Les souches bactériennes ont été placées en milieu carencé en fer, en absence et en présence de goethite substituée en aluminium. Après 48 h d'incubation, le milieu de culture a été centrifugé et les teneurs en fer et en aluminium ont été mesurées par ICP-AES dans la solution. Les valeurs obtenues pour les essais abiotiques ont été soustraites. Les données sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

## **Conclusions du chapitre 7**



Ce travail nous a, tout d'abord, permis de décrire les interactions entre *P. aeruginosa*, bactérie productrice de sidérophores, et des minéraux tels que les smectites ou les goethites, mais également une avancée dans les mécanismes mis en jeu. En effet, nous avons pu observer qu'en présence de ces minéraux, dans un milieu carencé en fer, la croissance de *P. aeruginosa* est stimulée. Cation au sein des octaèdres des smectites et principal constituant des goethites, le fer présent dans ces minéraux peut être utilisable par la bactérie pour satisfaire ses besoins. Il est intéressant de constater que des observations similaires ont été décrites lors d'interactions entre *Pseudomonas mendocina* et des argiles de type kaolinite (Ams et al, 2002 ; Maurice et al, 2001b) ou de goethite substituée en aluminium (Maurice et al, 2000).

En conditions planctoniques, concernant la production de pyoverdine, sidérophore majeur chez les *Pseudomonas* fluorescents (Folschweiller et al, 2002), nous avons pu montrer qu'elle est intimement liée à la présence de minéraux. En effet, lors de l'ajout de concentrations croissantes de minéraux, et notamment de smectite, la production de pyoverdine diminue jusqu'à inhibition presque totale en présence de concentrations importantes de smectite. La production de pyoverdine étant finement régulée par la concentration en fer dans l'environnement de la bactérie (Visca, 2004), cette observation s'expliquerait par la présence en fer dans les smectites (2,85 %) et dans les goethites.

En présence de bactéries, les teneurs en silice dissoute, traceur naturel d'altération, nous ont permis de déterminer la vitesse d'altération du minéral. Il est alors apparu qu'en présence de bactéries, cette dernière est multipliée par deux, nous permettant de conclure que *P. aeruginosa* intervient dans le processus de dissolution de ce minéral argileux. Dans le cas des goethites, il apparaît que les bactéries solubilisent le fer mais aussi les métaux présents éventuellement en substitution dans ces minéraux, contribuant ainsi à la mobilité de la phase solide à la phase liquide (eau du sol, eau interstitielle des sédiments, par exemple) de ces éléments, potentiellement toxiques. La nature du métal substituant les oxydes semble influencer de façon importante la croissance bactérienne mais aussi la dissolution du minéral. Bousserhine *et al.* ont montré que selon le cation substituant le fer dans la goethite, la dissolution est différente lors de réduction dissimilatrice du fer par les bactéries (Bousserhine et al, 1999). Dans notre étude, la substitution entraîne une solubilisation du fer identique pour la goethite substituée en aluminium mais bien souvent supérieure pour celles substituées en cadmium et en nickel. Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'action du métal par complexation par le sidérophore est bien distinct de celui réalisé par la réduction du fer



ferrique, présent dans les oxydes, en fer ferreux, servant d'accepteur final d'électrons pour ces bactéries en condition d'anaérobiose.

Par une approche de biologie moléculaire reposant sur l'utilisation de mutants dans la production de sidérophores, pyoverdine et/ou pyochéline, utilisée pour la première fois dans ce type d'étude, nous avons pu mettre en évidence le rôle significatif de la pyoverdine dans la solubilisation du fer et de l'aluminium des smectites et des goethites. En effet, quand la bactérie est capable de produire les deux sidérophores, il apparaît clairement que la pyoverdine est principalement utilisée pour solubiliser le fer constitutif des smectites. Cette observation peut s'expliquer par l'affinité de la pyoverdine pour le fer, bien plus importante que celle déterminée pour la pyochéline ( $10^{32} \text{ M}^{-1}$  versus  $10^{17} \text{ M}^{-1}$ ) (Albrecht-Gary et al, 1994; Brandel et al, 2012). En absence de pyoverdine, la bactérie utiliserait alors la pyochéline afin de solubiliser le fer, mais son efficacité est bien plus faible et la solubilisation de l'aluminium n'est pas observée. Pour le double mutant, aucune trace de solubilisation de fer n'est observée, démontrant clairement le rôle des sidérophores dans la dissolution du minéral argileux. En revanche, dans le cas des goethites, les deux sidérophores semblent impliqués dans la solubilisation du fer mais l'absence de sidérophore conduit tout de même à une mobilisation du métal, bien qu'elle soit plus faible. Bien que le fer structural des goethites soit mieux cristallisé que celui présent au sein des smectites, son accessibilité et son abondance pourraient faciliter sa solubilisation ou alors mettre en jeu d'autres mécanismes (phénazines, réductases). En outre, seule la pyoverdine est capable de solubiliser l'aluminium constitutif des smectites et des goethites.

Un mécanisme indépendant de la présence de sidérophores régirait l'utilisation du magnésium par *P. aeruginosa*. Le rôle de la pyoverdine dans la chélation du fer des smectites et des goethites a également été confirmé par une étude *in-vitro* en utilisant un outil nouveau dans ce type d'interactions, la fluorimétrie. Si cette technique a permis de mettre en évidence le rôle de la pyoverdine dans la chélation du fer structural de ces minéraux, son utilisation pour suivre des cinétiques de complexation reste cependant restreinte aux faibles concentrations en minéraux et surtout à un système simple et non à un mélange de métaux.

Afin de progresser dans la compréhension de ces mécanismes, il serait utile de réaliser des expériences complémentaires avec des mutants réductases ou encore des expériences nous permettant de connaître l'implication exacte de la pyoverdine et de la pyochéline dans les interactions avec les minéraux ainsi que leur mise en place au cours du temps.

Concernant le biofilm, celui-ci apparaît comme un paramètre bactérien déterminant dans la mobilisation des éléments structuraux des smectites et des goethites. En effet, très rapidement, une matrice d'exopolysaccharides, entoure les grains des minéraux. Grâce aux observations microscopiques réalisées lors de cette étude, nous avons pu mettre en évidence que le biofilm est naturellement coloré par une substance fluorescente, notamment dans le cas des smectites. Après extraction et caractérisation spectrale de ce composé, il a pu être démontré qu'il s'agissait de pyoverdine. Lors des expériences de confinement des argiles, il est apparu que le contact entre *P. aeruginosa* et les smectites, permettant la formation du biofilm, semble être important dans la déstructuration des argiles ainsi que dans la libération des constituants de ces minéraux. La fixation des micro-organismes à la surface des oxyhydroxydes de fer apparaît comme essentielle à la dissolution de ces minéraux (Arnold et al, 1988), corroborant notre conclusion. Néanmoins, l'utilisation de mutants dans la production de biofilm permettrait de progresser dans la compréhension de son rôle dans les interactions entre bactéries et minéraux, qui constitue un compartiment très complexe.



## *Chapitre 8*

Rôle de *Pseudomonas aeruginosa* et  
de la pyoverdine dans le  
prélèvement par la plante  
de métaux contaminants



# Introduction



Comme nous l'avons vu dans le chapitre 5 (II. 2.), la phytoremédiation présente certains inconvénients. Toutefois, les bénéfices apportés par l'association des plantes avec des bactéries productrices de sidérophores dans le traitement *in-situ* de sols contaminés par des éléments traces métalliques ont été démontrés (Rajkumar et al, 2010 ; Whiting et al, 2001). Bien que des travaux aient montré que l'addition de telles bactéries augmente généralement l'extraction des contaminants (Lebeau et al, 2008 ; Ma et al, 2011), aucun mécanisme n'a encore été réellement appréhendé.

L'objectif ultime de ce travail de thèse est de comprendre les interactions et les mécanismes impliqués dans le prélèvement d'éléments traces métalliques par la plante lors de l'ajout de bactéries productrices de sidérophores en vue de procéder à de la phytoremédiation assistée par de telles bactéries. Cette étude s'est focalisée sur le rôle de la pyoverdine, ainsi que sur celui de *P. aeruginosa*, dans des processus de prélèvement racinaire de cadmium et de nickel.

Dans un premier temps, les expériences ont été menées en culture hydroponique, facilitant ainsi le contrôle des conditions de culture et de la composition du milieu d'exposition des racines. Le milieu de culture a été supplémenté avec (1) des smectites contaminées ou non en cadmium ou nickel, (2) de la pyoverdine ou des bactéries productrices de sidérophores et (3) du métal libre. La plante choisie dans cette étude est la tomate, *Lycopersicon esculentum* cv. Saint-Pierre, facilement cultivable en condition hydroponique et dans les dispositifs utilisés au cours de ces travaux (Cornu et al, 2007). De plus, si peu d'études de phytoremédiation ont été réalisées sur le genre *Lycopersicon*, il est apparu comme un candidat intéressant lors d'une expérience menée sur le prélèvement du cadmium en présence de *Pseudomonas* sp. isolées de sols contaminés (He et al, 2009). Ces résultats sont présentés dans une première partie. Bien que *P. aeruginosa* soit un pathogène opportuniste qui ne pourra être utilisé dans les sols en vue d'expériences de remédiation, cette bactérie reste un modèle, au laboratoire, très intéressant grâce aux grands nombres de mutants qui y ont été développés et à sa grande connaissance quant aux mécanismes d'acquisition notamment du fer.

Dans un second temps, la capacité de la pyoverdine à affecter la mise en solution de contaminants métalliques depuis une phase solide mixte de type organo-minérale, telle qu'un sol, a été étudiée. Ces expériences, en galettes de sol, sont plus proches des conditions rencontrées dans l'environnement. Au pH du sol étudié (pH 8,0), la pyoverdine présente une



affinité similaire pour le nickel et le cadmium (respectivement  $10^7 \text{ M}^{-1}$  et  $10^{6,6} \text{ M}^{-1}$ , communication personnelle M. Elhabiri). Nous avons alors privilégié des métaux dont l'affinité pour la pyoverdine est contrastée, tels que le cadmium et le cuivre, la pyoverdine possédant une affinité relativement forte pour ce dernier ( $10^{16} \text{ M}^{-1}$ , communication personnelle M. Elhabiri). De plus, ces expériences ont été menées dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire Vigne Biotechnologie et Environnement de Colmar, qui s'intéresse particulièrement à l'aspect de dépollution des sols viticoles. Dès 1895, l'utilisation du cuivre en viticulture pour lutter contre *Plasmopara viticola*, parasite responsable du mildiou, s'est généralisée et des applications par pulvérisation sur le feuillage ont été systématiquement réalisées dans l'ensemble des régions viticoles françaises (Branas, 1984). Si 60 à 70 % du cuivre pulvérisé se retrouve sur les vignes, 20 à 30 % se retrouvent sur les sols et 10 % dans l'atmosphère, emportés par les vents (Chaignon, 2001). Les teneurs dans les sols ont ainsi été multipliées par un facteur de 10 à 100, pouvant atteindre de 200 à 1 000  $\text{mg.kg}^{-1}$  (Delas, 1963 ; Flores-Velez, 1996). Ces expériences ont été réalisées en utilisant des DGT (Diffusive Gradient in Thin films) remplacées par la suite par la plante, *L. esculentum* cv. Saint-Pierre. Les DGT, développées par Davison et Zhang (Davison & Zhang, 1994), sont constituées d'une couche de résine chélatante (Chelex-100 ®), séparée de l'échantillon par une couche de gel perméable dont la taille des pores est définie. Les ions métalliques sont accumulés et concentrés sur la résine. Cette accumulation se produit de façon linéaire et quantitative au cours du temps. Les DGT sont généralement utilisées pour mimer l'action des racines sur les prélèvements en métaux. Dans notre étude, nous les avons principalement utilisées afin de caractériser les cinétiques de mise en solution du cuivre et du cadmium associés à la phase solide. Ces résultats sont présentés dans une seconde partie.

L'expérience de culture hydroponique en présence de cadmium et de pyoverdine a été réalisée en collaboration avec le Dr. Karine JEZEQUEL et le Dr. Jean-Yves CORNU du Laboratoire Vigne Biotechnologies et Environnement. Les expériences menées en sol ont été réalisées par le Dr. Jean-Yves CORNU. Les dosages par ICP-AES ont été réalisés par le Dr. Thibault STERCKEMAN, du Laboratoire Sol et Environnement.

**Prélèvement de contaminants  
métalliques par *L. esculentum* en  
présence de *P. aeruginosa*  
ou de pyoverdine, en hydroponie**



## I - Matériel et méthodes

### 1. Purification de la pyoverdine

Pour les expériences d'interaction de la pyoverdine avec les smectites, de la désorption par la pyoverdine des métaux immobilisés sur les argiles ou encore de prélèvement des contaminants par la plante en présence de pyoverdine, ce sidérophore a été purifié comme décrit ci-après. Après 24 h de culture en milieu carencé CAA à 30°C (composition en g.L<sup>-1</sup> : CAA, 5 ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,18 ; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,25), les cellules ont été centrifugées 30 min à 5 000 rpm. Le surnageant a ensuite été filtré sur papier Whatman de 0,45 µm puis sur membrane de nitrocellulose 0,22 µm. Le filtrat, acidifié à pH 6,0 avec de l'acide chloridrique 6N, a été appliqué sur une colonne de résine Amberlite XAD-4 (Sigma), échangeuse d'ions, selon la méthode décrite par Carson *et al.* (Carson et al, 2000). La pyoverdine a été éluée avec de l'éthanol 50 %. L'éluât a été évaporé grâce à un évaporateur rotatif puis la pyoverdine a été reprise dans de l'eau ultra-pure, congelée et ensuite lyophilisée. La pyoverdine a ensuite été conservée à -20°C, à l'abri de la lumière.

### 2. Stabilité de la pyoverdine au cours du temps

La pyoverdine étant utilisée dans les expériences de phytoremédiation, sur des durées de traitement de deux jours, nous avons voulu vérifier la stabilité de la molécule au cours du temps. Pour cela, la pyoverdine a été incubée dans le milieu de culture utilisé pour les plantes (MES + Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), puis l'ensemble a été placé sous agitation (220 rpm), à l'obscurité, durant plusieurs jours, à 30°C. A chaque temps (0 - 4 - 7 et 10 jours), un prélèvement de 200 µL a été effectué. Les spectres d'absorbance ont été réalisés afin de vérifier la stabilité du chromophore responsable des caractéristiques spectrales et les profils isoélectrophorétiques (IEF) afin de s'assurer de la stabilité de la chaîne peptidique de la pyoverdine.

La méthode d'isoélectrophorèse utilisée est celle décrite par Koedam *et al.* (Koedam et al, 1994). Un film support (gel Bio-Rad, réf. 1702983) a été utilisé pour un gel polyacrylamide 5 % (125 x 65 x 0,4 mm) contenant des ampholines (Byolyte 3/10, Bio-Rad), qui développent durant l'électrophorèse un gradient de pHi de 3,5 à 9,3. La préparation des gels et les conditions d'électrophorèse correspondent aux recommandations du fabricant. Les

dépôts sur le gel des échantillons (1  $\mu$ L à 5 mM) de pyoverdine purifiée sur XAD, présente dans le milieu de culture, ont ensuite été effectués. Les bandes ont été visualisées sous UV et leur point isoélectrique a été déterminé grâce à un marqueur de pHi.

### 3. Prélèvement des métaux en présence de pyoverdine ou *P. aeruginosa*, en culture hydroponique, par *L. esculentum*

#### 3.1. Germination et pré-culture en système hydroponique

Le système de culture utilisé pour l'essai biologique a été adapté à partir de celui conçu par Chaignon and Hesinger (Chaignon & Hinsinger, 2003). Les graines de tomates (*Lycopersicon esculentum* cv. Saint Pierre) ont été stérilisées avec de l' $H_2O_2$  pendant 10 min et rincées abondamment avec de l'eau ultra-pure. Dix graines ont ensuite été placées par dispositif afin d'obtenir une « couverture » adéquate sur le maillage (Figure 39A). La pré-culture s'est déroulée en conditions hydroponiques durant 13 jours (Figure 39B-C).

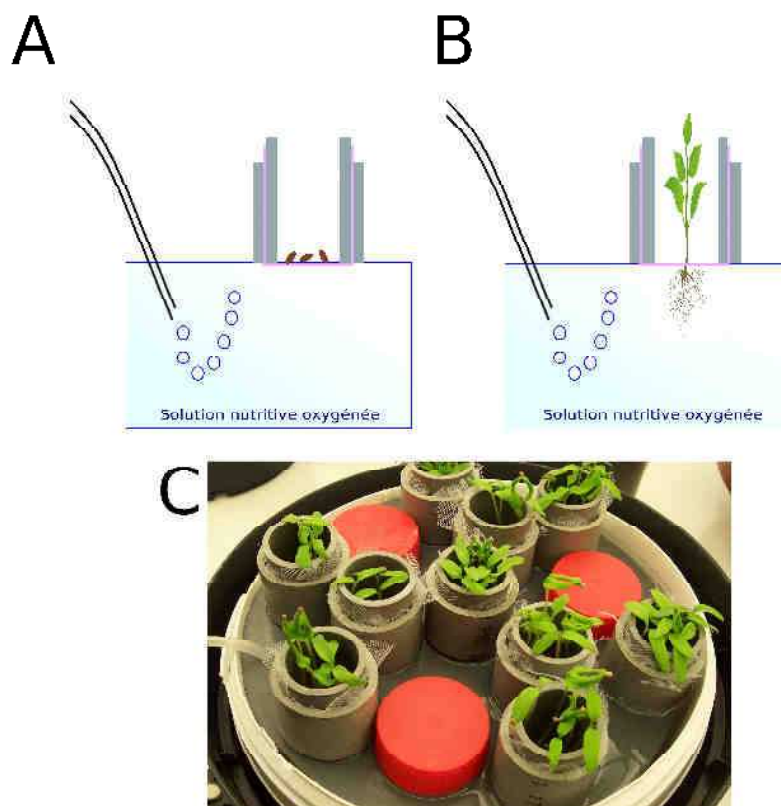


Figure 39 : Dispositif utilisé lors de la phase de germination (A) et de pré-culture (B-C) de *L. esculentum* cv. Saint-Pierre.

Les 5 premiers jours correspondent à la phase de germination. Cette dernière est effectuée dans une solution germinative composée de 600  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  et 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Les dispositifs ont ensuite été placés à l'obscurité jusqu'à l'apparition des premiers cotylédons. La germination s'est déroulée en chambre de culture sous conditions contrôlées à 70 % d'humidité, 16 h à 25°C et 8 h à 20°C de température.

A partir du 6<sup>ème</sup> jour, la solution de germination a été remplacée par une solution nutritive composée de 2 mM  $\text{KNO}_3$ , 2 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 50  $\mu\text{M}$   $\text{FeNaEDTA}$ , 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 2  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ , 0,2  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  et 0,05  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ . Cette solution a été renouvelée tous les deux jours. L'expérience a été menée en chambre de culture sous conditions contrôlées : 16 h de photopériode (flux de photons 300  $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ ), 25/20°C de température jour/nuit et 70 % d'humidité.

### **3.2. Prélèvement des contaminants métalliques par la plante en présence de pyoverdine ou de *P. aeruginosa***

Pour mener l'expérience, des groupes de 6 répétitions ont été formés aléatoirement. Les plants âgés de 13 jours ont été exposés, en conditions hydroponiques, pendant deux jours, à différentes conditions. En effet, le milieu a été supplémenté avec (1) des smectites ou des smectites contaminées en métal, (2) de la pyoverdine ou des bactéries productrices de sidérophores, *P. aeruginosa*, (3) du métal libre. Des contrôles sans smectite ou métal ainsi que sans sidérophores ou bactéries ont été inclus (Figure 40).

Tout d'abord, pour le prélèvement par la plante en présence de pyoverdine, les paramètres sont les suivants : pyoverdine à 50  $\mu\text{M}$ , des métaux à 1  $\mu\text{M}$  (nickel ou cadmium) et des smectites à 0,2  $\text{g.L}^{-1}$ . L'absorption des métaux contaminants sur les smectites a été réalisée en incubant les smectites et le métal, 24 h avant le début de l'expérience. Le milieu de culture était composé de 2 mM de MES et 725  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Le pH de la solution a été ajusté à 6,4. Les godets ont été placés sous agitation grâce à un barreau magnétique (200 rpm) (Figure 40).

Ensuite, pour les expériences de prélèvement des contaminants en présence de bactéries productrices de sidérophores, *P. aeruginosa* ATCC 15692 (PAO1) a été utilisée. A partir d'une pré-culture en LB de 18 à 24 h à 30°C et sous agitation (220 rpm), un milieu (CAA)

carencé en fer a été inoculé et incubé sous agitation (220 rpm) durant 48 h. La culture a ensuite été centrifugée (10 min à 8 600 g) et lavée deux fois avec du milieu CAA. La concentration bactérienne a été déterminée par mesure de la densité optique à 600 nm. Les échantillons ont été inoculés à  $10^8$  CFU.mL<sup>-1</sup>. La concentration en nickel était de 1  $\mu$ M et celle de smectite de 0,2 g.L<sup>-1</sup>. Les essais ont été effectués dans un milieu CAA modifié, permettant la survie bactérienne et végétale (composition en g.L<sup>-1</sup> : casamino-acides 5,0 ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,18 ; MgSO<sub>4</sub> 0,25 ; tampon MES 0,39 et Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,118 ; pH ajusté à 6,4). En fin d'expérience, la production de pyoverdine a été déterminée par mesure de l'absorbance à 400 nm et la population bactérienne a été estimée par dénombrement sur boîte LB Agar.

- *P. aeruginosa* ou pyoverdine (50  $\mu$ M)
- Smectite (0,2 g.L<sup>-1</sup>)
- Ni ou Cd (1  $\mu$ M)

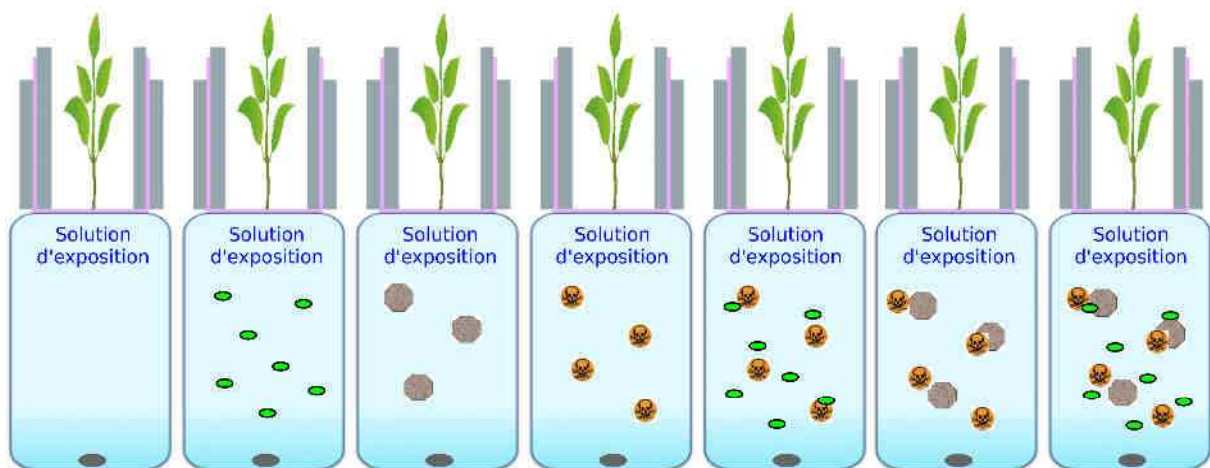


Figure 40 : Conditions de culture testées.

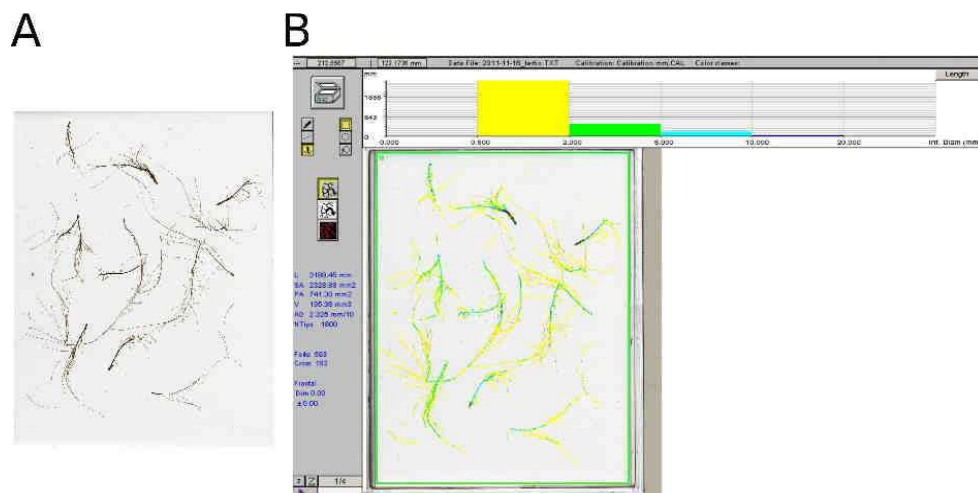
A l'issue des deux jours de traitement, les plants ont été récoltés, les racines et les parties aériennes ont été séparées puis rincées à l'eau ultra-pure (Figure 41).



Figure 41 : Séparation des racines et des parties aériennes qui seront ensuite pesées.

### 3.3. Analyses des racines

L'analyse des racines consistant à la détermination de leur longueur, de leur diamètre et de leur surface, a été réalisée à l'aide du logiciel WinRHIZO (Regent Instruments Inc., Québec, Canada) (Arsenault et al, 1995). La première étape a permis l'acquisition des images des racines (Figure 42A). Pour ceci, les racines ont été déposées dans un bac rempli d'eau ultra-pure puis étalées au maximum. Pour obtenir les meilleures images, WinRHIZO a été utilisé avec un scanner approuvé, qui permet aux racines d'être éclairées au dessus et en dessous pendant qu'elles sont scannées afin de réduire au maximum les ombres. Les images obtenues ont alors été traitées grâce au logiciel WinRhizo (Figure 42B). La répartition des différents paramètres mesurés a alors été exprimée en classes.



**Figure 42 : Analyses des racines.** A. Acquisition des images des racines par scan. B. Traitement des images scannées grâce au logiciel WinRHIZO, permettant une répartition des valeurs par classes.

### 3.4. Dosage des métaux contenus dans les plantes

Pour chaque traitement, les 6 répétitions ont été collectées et analysées séparément. Les échantillons ont ensuite été pesés puis placés à l'étuve (65°C) durant 48 h et ont été, à l'issue de la dessiccation, à nouveau pesés.

Les métaux ont été dosés à partir des échantillons préalablement minéralisés. Pour la minéralisation, la totalité des racines et des parties aériennes réduites en poudre a été introduite dans chacune des bombes du minéralisateur. Les échantillons ont été introduits dans un réacteur en téflon. 8 mL d'HNO<sub>3</sub> 65 % (v/v) et 2 mL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % (v/v) ont été



ajoutés, selon le protocole préconisé par le fournisseur du micro-onde (Milestone, Inc., USA), l' $\text{H}_2\text{O}_2$  ayant pour but de diminuer la formation des vapeurs nitriques. Le programme consiste en 3 étapes : 10 min à 1 000 W (0 à 180°C), 10 min à 1 000 W (180°C) et 20 min à 1 000 W (ventilation). Le minéralisât a été repris dans de l'eau ultra-pure et ajusté à 25 mL dans une fiole jaugée (Borkowska-Burnecka, 2000). Les concentrations en fer, en cadmium ou en nickel ont été déterminées par ICP-AES (Liberty II, Varian, Inc., Palo Alto, California, USA TY ULTIMA, Jobin Yvon, JY124), au laboratoire Sols et Environnement à l'Institut National Polytechnique de Lorraine, à Nancy. Une solution certifiée (EU-H-2, SCP Science, Courtaboeuf, France) a été incluse dans les analyses comme contrôle.

### **3.5. Analyses statistiques**

Afin de tester la pertinence des différentes variables déterminées (longueurs et surfaces racinaires, teneurs en métaux, croissance bactérienne et désorption du fer de la smectite et des contaminants adsorbés sur le minéral), une analyse de variance a été conduite à l'aide du logiciel R. Lorsque l'ANOVA a conclu à une différence significative, les traitements ont été séparés en utilisant le test de Tukey (Tukey, 1951).

## **4. Mobilisation par la pyoverdine des contaminants adsorbés sur les smectites ou présents dans la structure cristalline des goethites**

### **4.1. Désorption des contaminants adsorbés sur les smectites**

La première étape de 24 h sous agitation permet la floculation des smectites. Pour ceci,  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  de smectite a été incubé dans 10 mL de tampon contenant 2 mM de MES et  $725 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , le pH ayant été ajusté à 6,4. L'expérience a été réalisée dans des tubes en polypropylène de 50 mL. Comme contrôles, des sidérophores (sans argile) et des argiles (sans pyoverdine), ont été inclus. La seconde étape correspond à l'adsorption de  $1 \mu\text{M}$  de contaminants (nickel ou cadmium) sur les smectites. Une concentration initiale de  $50 \mu\text{M}$  a été ajoutée, correspondant à l'étape de sorption des contaminants. Après 24 h d'incubation, les échantillons ont été centrifugés (8 000 g, 20min) et les surnageants ont été filtrés ( $0,22 \mu\text{m}$ ). Pour mesurer les éléments par ICP-AES, les filtrats ont été acidifiés à pH 1,0 avec de l' $\text{HNO}_3$  (70 %). 5 répétitions ont été réalisées.

#### **4.2. Mobilisation des métaux présents dans la structure cristalline des goethites**

Afin d'étudier la capacité de la pyoverdine à solubiliser les métaux présents dans la structure cristallines des goethites, 1 g.L<sup>-1</sup> d'oxy-hydroxyde de fer a été placé dans 10 mL de tampon contenant 2 mM de MES et 725 µM de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, le pH ayant été ajusté à 6,4. 50 µM de pyoverdine ont été ajoutés. Des contrôles, de la pyoverdine (sans goethite) et des goethites (sans pyoverdine), ont été inclus. Après 24 h d'incubation, les échantillons ont été centrifugés (8 000g, 20 min) et les surnageants filtrés (0,22 µm). Pour mesurer les éléments par ICP-AES, les filtrats ont été acidifiés à pH 1,0 avec de l'acide nitrique (HNO<sub>3</sub> 70 %). 5 répétitions ont été réalisées.

## II - Résultats et discussion

Les expériences ont été menées en culture hydroponique, sur des plants de tomate, *Lycopersicon esculentum* cv. Saint-Pierre. Les premières expériences ont été réalisées en présence de pyoverdine purifiée, dans un milieu dédié à la culture des plantes supplémenté avec (1) des smectites ou des smectites contaminées en cadmium ou en nickel, (2) de la pyoverdine ou des bactéries productrices de sidérophores et (3) du cadmium ou du nickel libre. Des contrôles, sans smectites ou sans métaux, ou en absence de pyoverdine ou de bactéries, ont été inclus. Au préalable, la stabilité de la pyoverdine au cours du temps a été vérifié dans le milieu choisi.

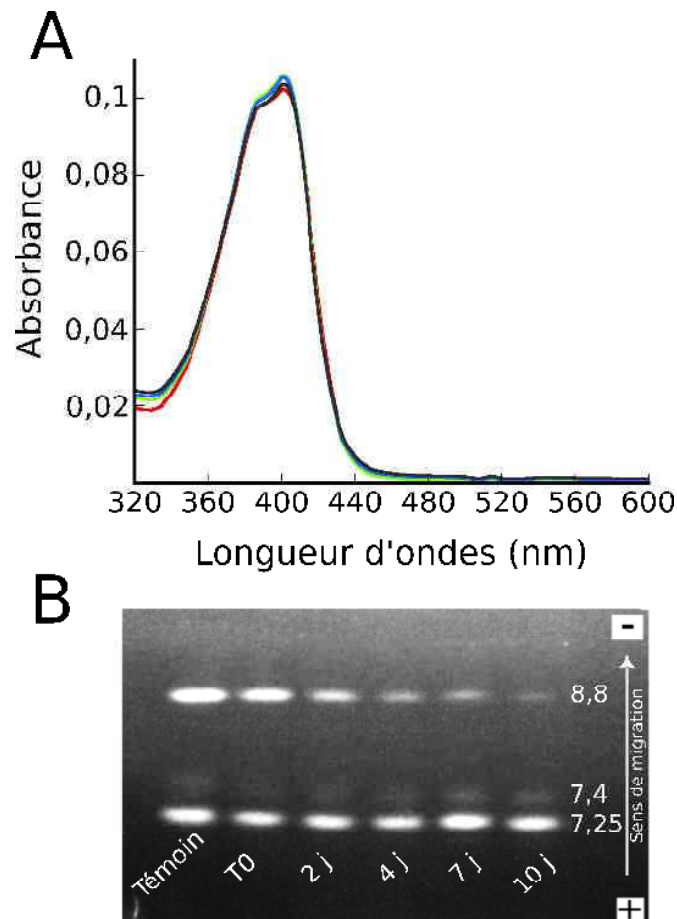
### 1. Etude de la stabilité de la pyoverdine au cours du temps

Afin d'étudier si la diminution des quantités restantes de pyoverdine en solution était due à une dégradation de la molécule au cours du temps ou à son incorporation par la plante, nous avons vérifié la stabilité du sidérophore dans le temps. Ainsi, la pyoverdine purifiée sur résine Amberlite XAD-4 a été placée durant 10 jours, dans le tampon utilisé comme milieu de culture pour les végétaux et composé de 2 mM de MES et de 725  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , dont le pH est ajusté à 6,4. Aux différents temps de prélèvement, des spectres d'absorbance et des profils isoélectrophorétiques de la pyoverdine ont été réalisés afin d'évaluer sa stabilité dans le temps.

Si, dans la littérature, peu d'études ont été menées sur la stabilité de la pyoverdine, cette dernière apparaît cependant comme une molécule plutôt labile, en particulier lors de variations de pH (Meyer & Abdallah, 1978), en présence de lumière (Eraso & Albesa, 1998), d'acide ou encore d'oxygène (Budzikiewicz, 1993). Bien qu'au cours de nos expériences, nous n'ayons pas pu nous affranchir de ce dernier paramètre, nous nous sommes placés dans un tampon ajusté à pH 6,4 qui a été constant durant les 10 jours d'incubation. De plus, l'expérience a été conduite à l'obscurité, tout comme les expériences de phytoremédiation (godets recouverts de papier aluminium).

Concernant les mesures d'absorbance de la pyoverdine incubée en présence du tampon composé de MES et  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , aucune variation n'est observée au cours du temps (Figure 43A). En effet, tous les spectres réalisés à 0 - 2 - 4 - 7 et 10 jours d'incubation ont une allure

similaire. Ainsi, même après 10 jours d'expérience, le chromophore, qui confère les propriétés de couleurs et de fluorescence à la pyoverdine (Demange et al, 1990 ; Wendenbaum et al, 1983), n'est pas dégradé.



**Figure 43 : Etude de la stabilité de la pyoverdine produite par *P. aeruginosa* PAO1 au cours du temps, dans un tampon ajusté à pH 6,4, contenant 2 mM de MES et 725 de  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .** **A.** Spectres d'absorbance de la pyoverdine (T0, rouge ; 2 j, bleu ; 4 j, vert ; 7 j, gris et 10 j, violet). **B.** Evolution des profils isoélectrophorétiques de la pyoverdine au cours du temps. Le témoin correspondant à la solution de pyoverdine non incubée.

La migration par IEF (isoélectrophorèse) permet l'observation de trois bandes distinctes (7,25 - 7,4 et 8,8) pour les différents temps d'incubation (Figure 43B). Une première bande, à un pI de 7,25, une seconde à 7,4 et enfin, une dernière possédant un pI de 8,8, sont visibles. Ces différentes bandes correspondent aux différentes isoformes de la pyoverdine de *P. aeruginosa* PAO1, l'acide succinique, le succinamide et l'alpha-cétoglutarique (Meyer, 2000). Bien que tous les échantillons présentent ces trois bandes, des variations d'intensités sont présentes au cours du temps. En effet, la bande au pI le plus élevé, de forte intensité pour le témoin et lors du premier jour d'incubation, s'atténue dès le deuxième jour pour n'être que

très faible en fin d'expérience. A l'inverse, la bande migrant à un pI de 7,4 s'intensifie légèrement au cours du temps alors que l'intensité de la troisième bande ne varie pas. Ces observations suggèrent la disparition d'une des isoformes de la pyoverdine, au profit de l'apparition d'une nouvelle.

Dans la littérature, aucune donnée n'existe concernant la chélation du fer par les trois isoformes. En revanche, le radical R n'intervenant pas dans la complexation du fer, ces différentes isoformes doivent très certainement fixer le fer avec la même efficacité. Ainsi, la pyoverdine apparaît stable au cours de temps, vis-à-vis des propriétés de chélation du fer qui nous intéresse dans cette étude, malgré les modifications des isoformes observées durant les 10 jours d'incubation.

## **2. Suivi de la quantité de pyoverdine au cours des expériences de prélèvement de cadmium et de nickel**

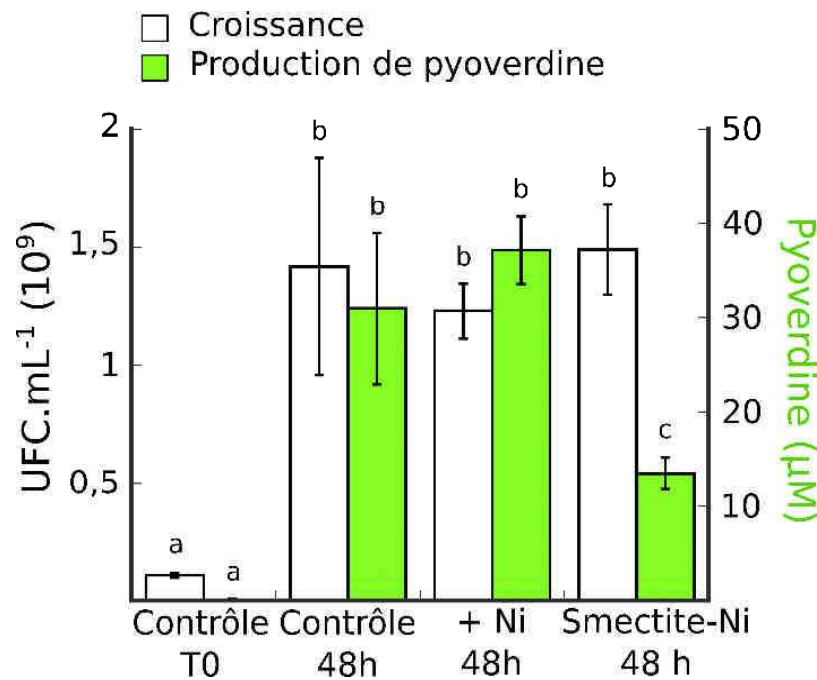
Pour les expériences de prélèvement de cadmium ou de nickel en présence de pyoverdine, la concentration initiale du sidérophore est de 50  $\mu\text{M}$ . A l'issue des deux jours d'exposition des végétaux, les milieux de culture ont été centrifugés et la quantité de pyoverdine restante a été estimée par mesure de l'absorbance à 400 nm.

Il apparaît qu'à l'issue des deux jours d'exposition, en absence de smectite, une diminution d'environ 3 % de la concentration initiale de pyoverdine est observée lors de l'expérience de phytoremédiation du cadmium, tandis que la diminution observée lors de l'expérience en présence du nickel est d'environ 15 % (données non présentées). La différence entre ces expériences menées sur les deux métaux peut s'expliquer en partie par une croissance inférieure des plantes utilisées dans le cas de la phytoremédiation du cadmium, plantes pourtant du même âge en début d'expérience. De plus, la diminution des quantités de pyoverdine durant les deux jours d'exposition pourrait être due, non pas à sa dégradation, comme nous avons pu le vérifier mais à sa possible incorporation par la plante. En effet, dans la littérature, il a déjà été montré que la pyoverdine de *Pseudomonas fluorescens* était incorporée dans les racines d'*Arabidopsis thaliana* suggérant ainsi l'acquisition, par une voie encore inconnue, du complexe pyoverdine-fer par les racines de la plante (Vansuyt et al, 2007). Il en serait de même chez la tomate.

Lors des mesures effectuées sur les solutions ayant contenu les smectites contaminées par les métaux, une diminution d'environ 38 % est observée pour les deux métaux, suggérant qu'une partie de la pyoverdine doit être adsorbée sur les argiles.

### 3. Croissance bactérienne et production de pyoverdine lors des expériences de prélèvement du nickel en présence de *P. aeruginosa*

A la fin de l'expérience de prélèvement du nickel en présence *P. aeruginosa*, la croissance bactérienne a été estimée par dénombrement sur milieu gélosé LB et la production de pyoverdine a été déterminée par mesure de l'absorbance à 400 nm sur les milieux de culture des végétaux (Figure 44).



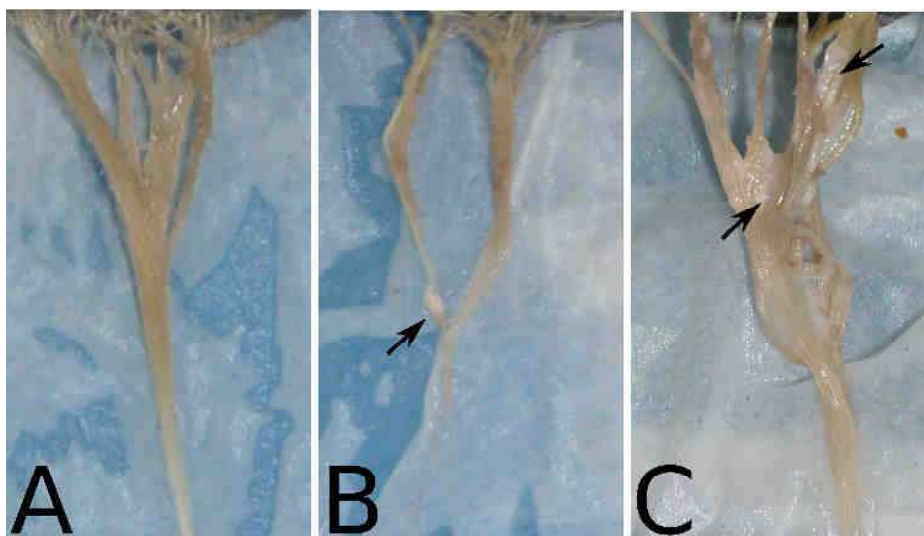
**Figure 44 : Croissance de *P. aeruginosa* et production de pyoverdine dans différentes conditions, après deux jours d'exposition en présence de *L. esculentum* cv. Saint-Pierre dans le milieu CAA modifié.** Les smectites sont présentes à une concentration de 0,2 g.L<sup>-1</sup> et le nickel à 1 µM. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard des 6 répétitions et les lettres diffèrent pour les valeurs présentant des différences significatives (ANOVA,  $P < 0,001$  ; test de Tukey  $P < 0,05$ ).

Initialement, le milieu de culture végétale a été inoculé à 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Il apparaît que la présence de nickel et de smectite ne perturbe pas la croissance des bactéries, étant donné qu'une croissance d'environ un log est observée. En effet, à l'issue des deux jours d'incubation avec les plantes, la population de *P. aeruginosa* retrouvée est similaire pour les

différentes conditions, néanmoins, seules les bactéries planctoniques ont été dénombrées. En présence de la plante, ainsi qu'en présence de la plante et du nickel, la production de pyoverdine présente dans le milieu est de l'ordre de  $35 \mu\text{M}$  tandis que la présence de smectite réduit la synthèse de ce sidérophore, ou en absorbe une partie. Si lors des expériences réalisées dans le chapitre précédent (article), il est apparu qu'en présence de smectite à  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ , la production de pyoverdine n'était pas diminuée, il se peut que la différence observée soit due à l'agitation qui varie entre ces deux types d'expériences, modifiant ainsi le contact entre les smectites et les bactéries. De plus, comme nous le verrons par la suite, un biofilm visuellement plus important se forme autour des racines pouvant emprisonner la pyoverdine.

#### 4. Formation d'un biofilm bactérien autour des racines de *L. esculentum*

A l'issue des deux jours d'exposition des plants de tomates à différentes conditions, il a été remarqué qu'un biofilm était présent autour des racines, en présence de *P. aeruginosa* (Figure 45B-C), tandis qu'en absence de bactérie (Figure 45A), aucune structure de ce type n'est observée. Bien que la quantification du biofilm n'ait pas été réalisée, la présence de smectite semble favoriser la formation d'un biofilm plus important, résultat déjà observé dans le précédent chapitre, en absence de végétaux (article). En effet, la présence du minéral permet une augmentation de la surface d'échange et ainsi l'établissement des bactéries et la formation de biofilm.



**Figure 45 : Formation d'un biofilm autour des racines des plants de tomate après deux jours d'exposition dans un milieu CAA modifié. A.** En présence de smectite ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) et en absence de *P. aeruginosa*. **B.** En absence de smectite et en présence de *P. aeruginosa*. **C.** En présence de smectite ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) et en présence de *P. aeruginosa*. Les flèches noires indiquent du biofilm.

Les procaryotes interagissant avec les plantes peuvent avoir des rôles divers (pathogènes, commensaux ou mutualistes) s'accompagnant fréquemment de la formation d'un biofilm (Danhorn & Fuqua, 2007). En effet, si le biocontrôle *Bacillus subtilis* forme un biofilm sur les racines d'*Arabidopsis thaliana* les protégeant des bactéries Gram négatives en limitant les sites d'infection, *P. aeruginosa* peut, quant à elle, former un biofilm sur les racines d'*A. thaliana* non bénéfique et même pathogène, tuant les plantes en 7 jours (Bais et al, 2004 ; Walker et al, 2004). Dans notre étude, aucune mortalité des plants de tomate n'a été observée. Cependant, l'expérience ayant été conduite que sur deux jours en présence de *P. aeruginosa*, nous ne pouvons conclure quant à un éventuel rôle pathogène, dans le cas d'une exposition prolongée.

### 5. Influence de la pyoverdine et de *P. aeruginosa* sur la croissance végétale

A l'issue des deux jours d'exposition, les plantes sont récoltées, les racines, d'une part, et les parties aériennes, d'autre part, sont séchées puis pesées (Tableau 14). L'expérience ayant été menée sur deux jours, peu de différences sont attendues. Majoritairement, la smectite et les métaux n'influencent pas la croissance des parties aériennes et des racines. Néanmoins, le cadmium, lorsqu'il est présent seul dans le milieu semble inhiber la croissance racinaire des plants de tomate. En accord avec de précédentes études impliquant le cadmium, cet élément non essentiel est connu pour inhiber l'élongation racinaire et influencer l'anatomie des racines (Lux et al, 2011), tandis que la biomasse des feuilles n'est pas significativement réduite (Pahlsson, 1989). En présence de smectite, le cadmium, majoritairement adsorbé sur le minéral, n'a pas d'impact sur les racines. De même, la pyoverdine, en complexant ce métal protégerait les racines. La présence de *P. aeruginosa* semble, quant à elle, défavoriser la croissance racinaire mais n'a aucun effet sur les parties aériennes. De façon surprenante, la majorité des études de phytoremédiation, assistée par des bactéries, signale une stimulation de la biomasse (Ma et al, 2009). En effet, en présence de *P. aeruginosa*, Sinha et Mukherjee (Sinha & Mukherjee, 2008) ont constaté une augmentation de la biomasse végétale des plants de concombre et de Brassicacées. De même, une stimulation de la croissance de plants de tomate est observée en présence de bactéries telles que *Methylobacterium* sp. ou de *Burkholderia* sp. (Madhaiyan et al, 2007). Cependant, outre le fait d'être réalisées sur des temps d'exposition plus longs (15 à 45 jours), ces expériences se déroulent toutes en sols dont les compositions sont différentes de celles du milieu de culture hydroponique. Ainsi, les bactéries ont notamment pu rendre disponible le phosphore insoluble



**Tableau 14 : Influence de la pyoverdine ou de *P. aeruginosa* sur la masse sèche en mg des racines et des parties aériennes de *L. esculentum* cv. Saint-Pierre en présence de différentes conditions.** Les expériences en présence de pyoverdine ont été réalisées en milieu contenant du MES et Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> tandis que les expériences en présence de bactéries ont été réalisées en milieu CAA modifié. Les valeurs représentent la moyenne ± la déviation standard des 6 répétitions et les lettres diffèrent pour les valeurs présentant des différences significatives (ANOVA,  $P < 0,001$  ; test de Tukey  $P < 0,05$ ).

	Traitements						
	Milieu	Pvd / Bactéries	Smectite	Métaux	Smectite-métaux	Métaux + Pvd / Bactéries	Smectite-métaux + Pvd / Bactéries
<b>Cd (Pvd)</b>							
Racines	17.33 ± 2.25 <sup>ab</sup>	17.65 ± 7.84 <sup>ab</sup>	14.60 ± 1.71 <sup>bc</sup>	11.28 ± 2.25 <sup>b</sup>	20.90 ± 3.65 <sup>ac</sup>	24.02 ± 3.20 <sup>a</sup>	21.73 ± 2.79 <sup>ac</sup>
Parties aériennes	146.15 ± 24.08 <sup>a</sup>	101.99 ± 4.47 <sup>b</sup>	138.21 ± 22.80 <sup>ab</sup>	128.21 ± 19.24 <sup>ab</sup>	130.11 ± 22.8 <sup>ab</sup>	145.12 ± 17.61 <sup>a</sup>	133.33 ± 24.22 <sup>ab</sup>
<b>Ni (Pvd)</b>							
Racines	21.22 ± 3.74 <sup>a</sup>	23.44 ± 2.38 <sup>a</sup>	19.6 ± 1.59 <sup>a</sup>	24.60 ± 4.30 <sup>a</sup>	24.60 ± 4.60 <sup>a</sup>	19.05 ± 3.24 <sup>a</sup>	17.75 ± 2.09 <sup>a</sup>
Parties aériennes	174.96 ± 8.23 <sup>a</sup>	262.90 ± 11.83 <sup>b</sup>	180.83 ± 39.23 <sup>a</sup>	277.48 ± 27.81 <sup>ab</sup>	183.94 ± 30.03 <sup>a</sup>	189.50 ± 32.96 <sup>a</sup>	196.32 ± 30.62 <sup>a</sup>
<b>Ni (Bactéries)</b>							
Racines	36.73 ± 7.51 <sup>ad</sup>	21.15 ± 3.83 <sup>bc</sup>	41.72 ± 9.20 <sup>d</sup>	37.82 ± 6.00 <sup>d</sup>	34.50 ± 8.39 <sup>bd</sup>	23.28 ± 9.86 <sup>abc</sup>	18.22 ± 7.14 <sup>c</sup>
Parties aériennes	287.30 ± 24.61 <sup>a</sup>	261.10 ± 60.80 <sup>a</sup>	310.57 ± 85.61 <sup>a</sup>	273.6 ± 53.58 <sup>a</sup>	236.42 ± 42.86 <sup>a</sup>	232.73 ± 16.61 <sup>a</sup>	257.05 ± 40.20 <sup>a</sup>

grâce à des réactions d'acidification, de libération d'acides organiques (Chung et al, 2005) et ainsi favoriser la croissance des végétaux. De plus, si le biofilm entourant les racines semble favoriser la croissance de la plante hôte (Lugtenberg et al, 2001), les plants de tomate de notre étude en présentent, à l'inverse, une croissance inférieure.

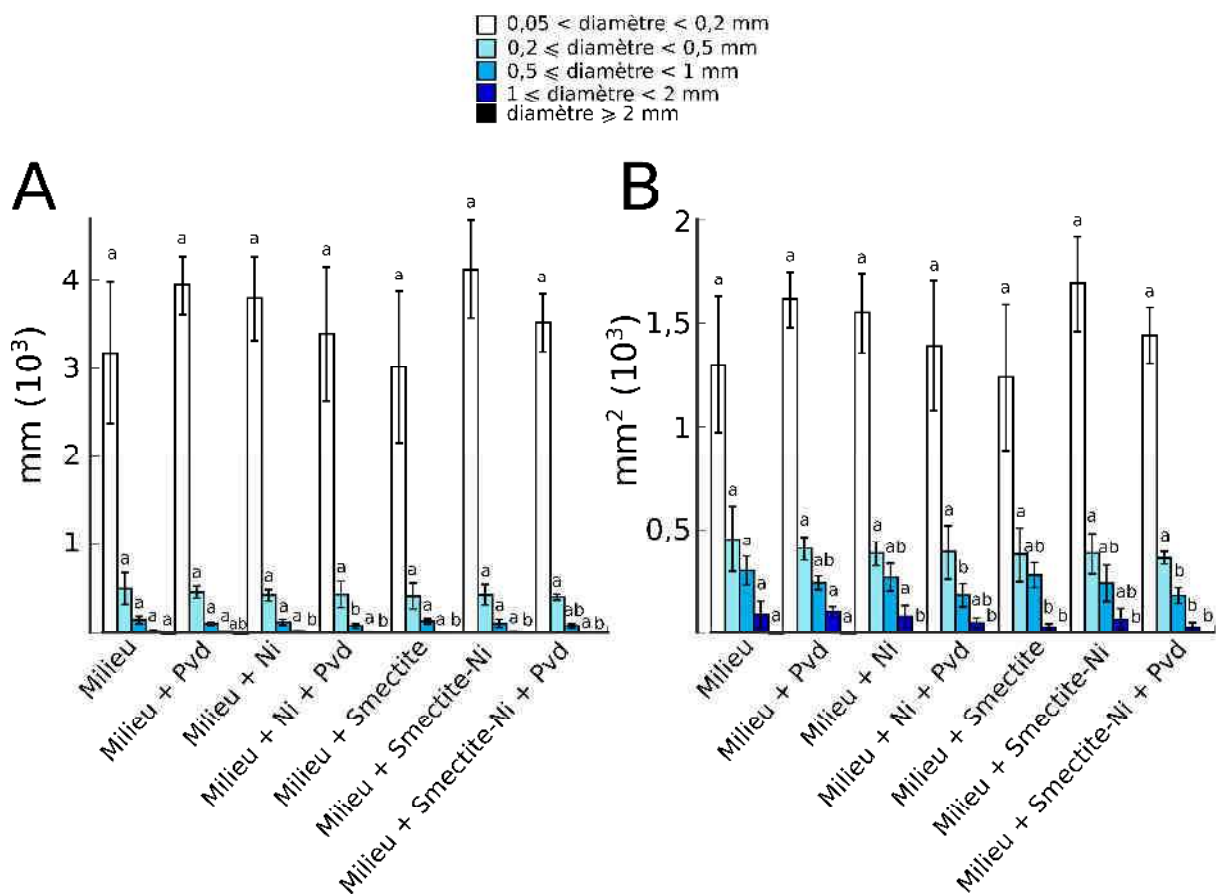
## 6. Influence de la pyoverdine sur les longueurs et les surfaces racinaires

Après avoir étudié l'influence de la pyoverdine sur la biomasse végétale, nous nous sommes également intéressés aux longueurs et aux surfaces racinaires lors d'un stress métallique. Les longueurs, les diamètres et les surfaces des racines ont été mesurés, après avoir été scannées et les résultats traités grâce au logiciel WinRHIZO (Arsenault et al, 1995). Seules les racines de l'expérience de phytoremédiation du nickel assistée par la pyoverdine ont été utilisées et l'utilisation de WinRHIZO a permis de classer les deux paramètres étudiés par classes de diamètre (Figure 46).

A l'issue de cette analyse, il apparaît que les racines dont le diamètre est le plus faible constituent celles les plus abondamment retrouvées (histogrammes blancs), quelles que soient les conditions de culture. A l'inverse, les racines au diamètre supérieur à 2 mm sont peu représentées. Ces observations pouvant s'expliquer notamment par l'âge peu avancé des cultures. Globalement, aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne les longueurs totales et les surfaces racinaires en fonction des différents traitements. En effet, les racines ayant un diamètre compris entre 0,05 et 0,5 mm présentent toutes des longueurs et des surfaces racinaires du même ordre de grandeur selon les traitements. Néanmoins quelques légères différences peuvent être observées pour les plantes ayant subi des traitements « Ni + Pvd » ainsi que « Smectite-Ni + Pvd ». Pour celles-ci, une diminution de la longueur totale et de la surface des racines est observée pour les diamètres compris entre 0,5 et 1 mm. De même, les racines plus épaisses (diamètre supérieur à 2 mm), ne sont retrouvées que dans le milieu seul et en présence de pyoverdine.

Si, dans notre étude, la pyoverdine ne semble pas intervenir dans la protection des racines soumises à un stress métallique, la littérature fait plutôt état, en cas de contamination, d'une stimulation de l'élongation racinaire en présence de bactéries, mais ceci sur des durées d'exposition plus longues (15 à 25 jours) (He et al, 2009 ; Ma et al, 2009 ; Sinha & Mukherjee, 2008). Par exemple, la présence de *P. aeruginosa* dans un sol polycontaminé en cadmium et en plomb stimule l'élongation des racines de façon significative (He et al, 2009).

Ainsi, il semblerait que si des métabolites bactériens ont un rôle au niveau des racines, la pyoverdine n'interviendrait pas ou alors pas comme seul facteur. Parmi les métabolites cités dans la littérature, l'acide indole-3-acétique, largement synthétisé par les bactéries de la rhizosphère, favoriserait l'élongation des racines (Patten & Glick, 1996). De plus, il a également été montré que la majorité des *Pseudomonades* associées aux racines favorisaient leur croissance en formant d'importants biofilms autour des racines (Lugtenberg et al, 2001 ; Ramey et al, 2004).



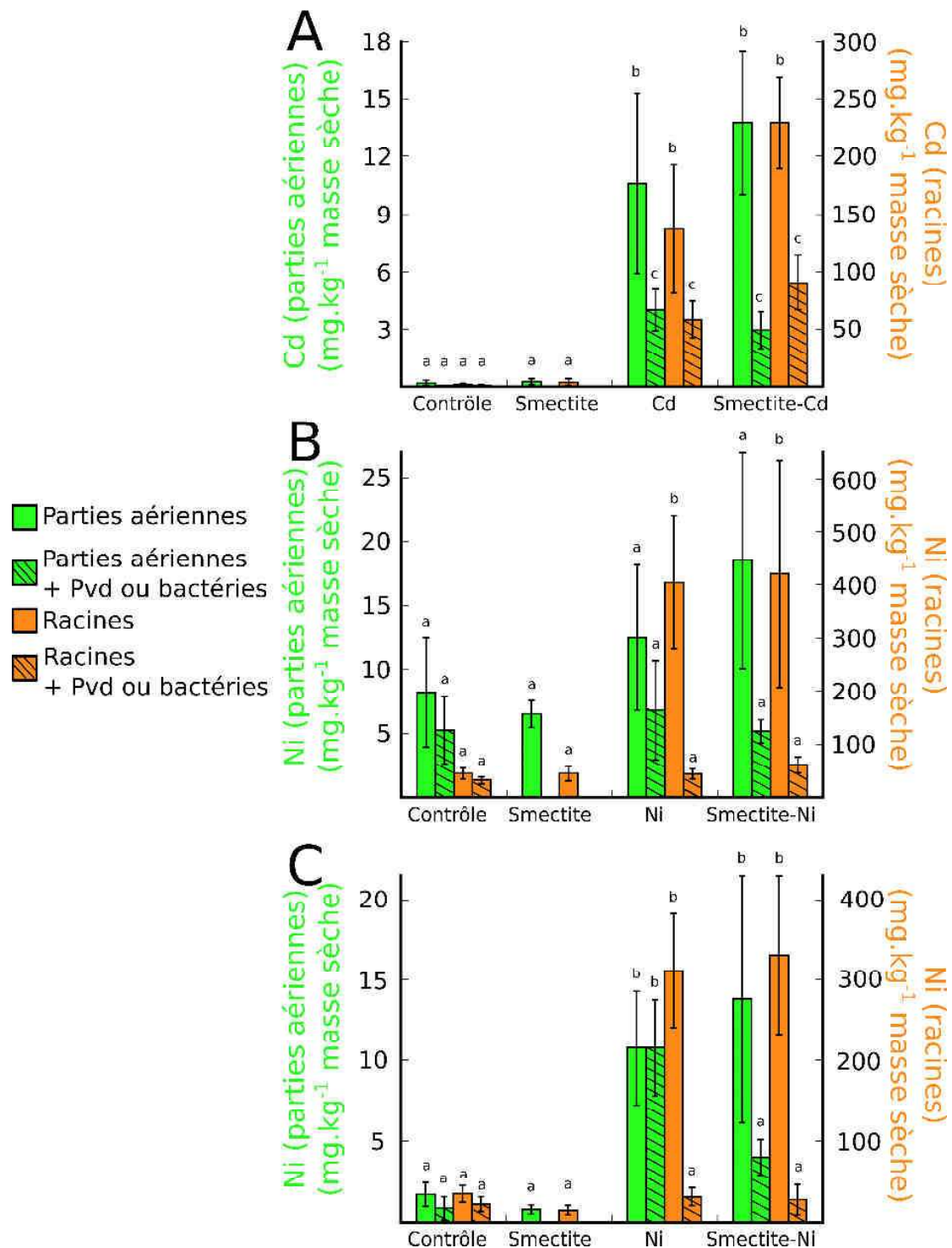
## 7. Influence de la pyoverdine et de *P. aeruginosa* sur les prélèvements en nickel, en cadmium et en fer par les plants de tomate, en hydroponie

A l'issue des deux jours d'exposition, les prélèvements en cadmium et en nickel par les racines et les parties aériennes des plants de tomate, cultivés sous différentes conditions, ont été déterminés par ICP-AES (Figure 47).

Aussi bien pour le cadmium que pour le nickel en présence de pyoverdine ou de *P. aeruginosa*, les quantités en métaux prélevés sont plus importantes dans les racines que dans les parties aériennes (Figure 47). En effet, les teneurs en métaux accumulées dans les racines sont de l'ordre de la centaine de  $\text{mg.kg}^{-1}$  de masse sèche alors que dans les parties aériennes, les concentrations en métaux sont d'une dizaine de  $\text{mg.kg}^{-1}$  de masse sèche. En présence de pyoverdine, à concentration égale en métal, la teneur en nickel dans les parties aériennes est légèrement supérieure à celles retrouvées pour le cadmium. Dans la littérature, il a été montré que le prélèvement et la translocation du cadmium dans les parties aériennes sont moins efficaces par rapport à des métaux tels que le nickel ou le zinc (Page & Feller, 2005). De plus, l'ajout, aussi bien de pyoverdine que de bactéries, réduit de façon significative les quantités en métaux accumulées dans les racines et les parties aériennes, à l'exception du nickel, qui dans ces dernières, en présence de bactéries, ne modifie par le prélèvement. En effet, en présence de pyoverdine, les teneurs en cadmium et en nickel dans les racines sont respectivement de l'ordre de 75 et 50  $\text{mg.kg}^{-1}$  de masse sèche, tandis qu'en absence de pyoverdine, les teneurs sont de l'ordre de 200 et 400  $\text{mg.kg}^{-1}$ . De même, en absence de *P. aeruginosa*, la teneur en nickel dans les racines est de l'ordre de 300  $\text{mg.kg}^{-1}$  de masse sèche, mais, en présence de bactéries que de 40  $\text{mg.kg}^{-1}$ . Ces résultats indiquent que la pyoverdine ou les bactéries productrices de sidérophores réduisent le prélèvement de cadmium ou de nickel par les racines et leur accumulation dans les plants de tomate.

Dans la littérature, à l'inverse de nos observations, de nombreuses études menées en sol ont montré une augmentation des prélèvements en éléments traces métalliques en présence de bactéries. Récemment, Braud *et al.* (Braud *et al.*, 2009c ; Lebeau *et al.*, 2008) ont mis en évidence que l'inoculation de maïs par *P. aeruginosa* augmentait l'incorporation de chrome et de plomb dans les parties aériennes de la plante. De façon similaire, le rôle des sidérophores produits par *Streptomyces tendae* dans l'accumulation du cadmium par le tournesol a été étudié (Dimkpa *et al.*, 2009b). Cette étude a montré que la présence de sidérophores pouvait

réduire la toxicité du métal dans la bactérie et, en parallèle, faciliter l'incorporation par la plante.



**Figure 47 : Effet de la pyoverdine (A-B) et de *P. aeruginosa* (C) sur l'incorporation du cadmium (A) et du nickel (B et C) par *L. esculentum* cv. Saint-Pierre, en condition hydroponique.** Les quantités de métaux ont été déterminées dans les parties aériennes (histogrammes verts) et dans les racines (histogrammes orange), par dosages en ICP-AES. La présence de pyoverdine ou de bactéries est représentée par des hachures. Les valeurs présentées sont les moyennes  $\pm$  la déviation standard des 6 répétitions et les lettres correspondent aux différences significatives (ANOVA,  $P < 0,001$  ; test de Tukey  $P < 0,05$ ).

Par ailleurs, conformément à notre étude, il a été mis en évidence que l'inoculation avec des bactéries de type PGPR diminuait l'incorporation des éléments traces métalliques. En effet, en présence de *P. aeruginosa*, l'incorporation du cadmium est diminuée jusqu'à 37 % chez des Brassicacées et des Cucurbitacées (Sinha & Mukherjee, 2008), ou encore chez le haricot mungo (Ganesan, 2008). Kuffner *et al.* (Kuffner et al, 2008) ont également observé une diminution de l'incorporation du cadmium et du zinc par le saule, en présence notamment de *Pseudomonas* sp. et de *Streptomyces* sp., toutes deux productrices de sidérophores. Des plants de tomates, en présence de *Methylobacterium oryzae* et de *Burkholderia* sp., présentent une incorporation du cadmium et du nickel inférieure à celle des plants seuls. L'explication la plus probable de ces observations serait une réduction des effets phytotoxiques des métaux par les bactéries qui empêcheraient le prélèvement des éléments traces métalliques par différents mécanismes bactériens tels que leur capacité de biosorption ou de bio-accumulation (Zaidi et al, 2006).

En parallèle de la détermination des éléments contaminants, la teneur en fer a également été déterminée dans les parties aériennes et dans les racines des plants de tomate. Cependant, les tests statistiques effectués sur les résultats ne révèlent aucune différence significative selon les conditions d'exposition (données non présentées). Ainsi, dans notre étude, la présence de pyoverdine ou de bactéries productrices de sidérophores n'améliore pas les prélèvements en fer par la plante, à l'inverse de ce qui a été montré dans la littérature. En effet, des sidérophores tels que les hydroxamates produits par *Streptomyces tendae* ou la pyoverdine synthétisée par *P. fluorescens*, favorisent l'incorporation en fer, en absence ou en présence de stress métalliques, respectivement chez le tournesol et *Arabidopsis thaliana* (Cline et al, 1984; Dimkpa et al, 2009b ; Vansuyt et al, 2007).

Concernant ces différents résultats, il est fort probable que les complexes pyoverdine-métaux ne puissent traverser les plasmalemmes, ce qui serait défavorable à l'adsorption des métaux. En effet, les ions métalliques, complexés à la pyoverdine, seraient moins facilement prélevés que les ions libres. Ainsi, la pyoverdine ne faciliterait pas le prélèvement par la plante, mais à l'inverse, l'empêcherait.

## 8. Complexation in-vitro des contaminants présents dans les minéraux par la pyoverdine

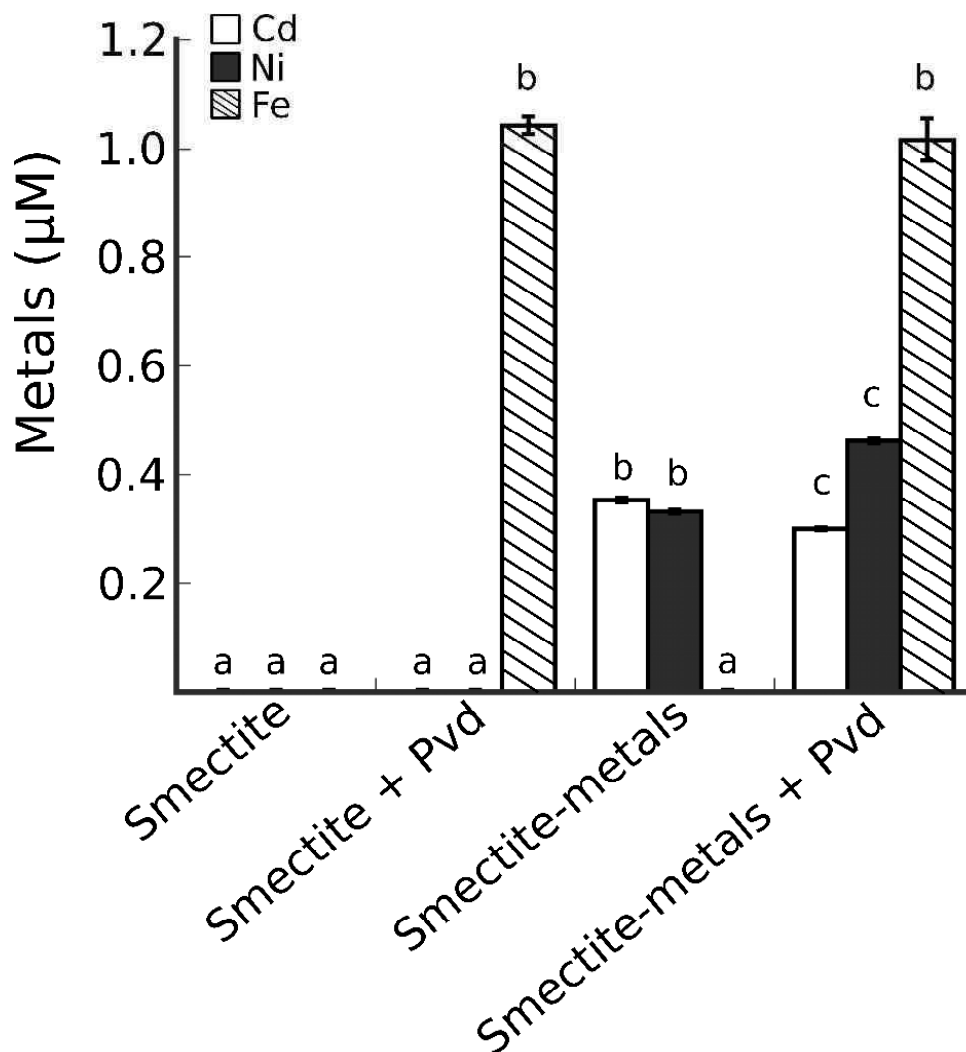
Si le rôle des sidérophores en tant que chélateurs de fer est bien admis, nous avons vu dans le chapitre 3 que les travaux de Braud *et al.* (Braud et al, 2009b) ont montré que les sidérophores produits par *P. aeruginosa*, la pyoverdine mais également la pyochéline, complexaient de nombreux métaux tels que  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , rendant ces molécules très intéressantes pour éventuellement solubiliser les métaux dans le sol. Néanmoins, l'utilisation de la pyoverdine ne s'étant pas montrée efficace dans les expériences de prélèvement des métaux en présence de pyoverdine ou de *P. aeruginosa*, nous avons voulu étudier le rôle exact de la pyoverdine dans la solubilisation *in-vitro* des contaminants adsorbés sur les smectites ou substituant les atomes de fer dans les goéthites.

### 8.1. Rôle de la pyoverdine dans la désorption des contaminants adsorbés sur les smectites

La pyoverdine n'ayant pas favorisé les prélèvements par la plante, nous avons déterminé si celle-ci était capable de mobiliser le cadmium et le nickel adsorbés sur les argiles. Ainsi, les smectites à  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$  et les contaminants à  $1 \text{ }\mu\text{M}$  ont été incubés en présence de pyoverdine à  $50 \text{ }\mu\text{M}$  dans un tampon contenant  $2 \text{ mM}$  de MES et  $725 \text{ }\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , à un pH ajusté à 6,4. Après 24 h d'incubation avec la pyoverdine, les échantillons ont été centrifugés et la teneur en métaux présents dans la solution a été mesurée par ICP-AES (Figure 48).

A l'issue des dosages, il apparaît que la pyoverdine permet une dissolution significative du fer structural des smectites, confirmant les résultats obtenus dans le chapitre précédent. En effet, à l'issue des 24 h d'incubation en présence de pyoverdine, environ  $1 \text{ }\mu\text{M}$  de fer est retrouvé dans le milieu tandis qu'aucune trace de fer n'est détectée en absence du sidérophore. Néanmoins, son rôle dans la désorption des métaux contaminants immobilisés sur les argiles est moins marqué. Tout d'abord, si  $1 \text{ }\mu\text{M}$  de métal a été incubé en présence de smectite, environ  $0,35 \text{ }\mu\text{M}$  est retrouvé en solution en absence de pyoverdine. Ainsi, le nickel et le cadmium ne semblent pas adsorbés en totalité sur les smectites. Ensuite, si la pyoverdine accroît la désorption du nickel, elle n'a aucun effet sur celle du cadmium. Cette différence pourrait être due à une différence d'adsorption des contaminants sur la smectite.

A l'issue de cette expérience, il apparaît que la pyoverdine, si elle est capable de mobiliser le fer structural des smectites, ne complexe pas ou peu les métaux contaminants adsorbés sur les smectites. Si ces résultats observés n'expliquent pas l'absence de différence significative dans les prélèvements en fer, ils pourraient néanmoins justifier, en partie, le fait que la pyoverdine n'améliore pas les prélèvements par la plante en métaux contaminants.



**Figure 48 : Désorption du fer structural des smectites (hachuré) et des métaux adsorbés sur ce minéral (Cd, blanc ; Ni, gris) par la pyoverdine.** La smectite ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) et les contaminants ( $1 \text{ } \mu\text{M}$ ) ont été incubés en absence ou en présence de pyoverdine ( $50 \text{ } \mu\text{M}$ ) dans un tampon contenant  $2 \text{ mM}$  de MES et  $725 \text{ } \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Après 24 h d'incubation avec la pyoverdine, les échantillons ont été centrifugés et les teneurs en métaux déterminées par ICP-AES. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  les déviations standard des 5 répétitions et les lettres indiquent les différences significatives (ANOVA,  $P < 0,001$  ; test de Tukey  $P < 0,05$ ).



## 8.2. Rôle de la pyoverdine dans la solubilisation du fer et des métaux présents dans la structure cristalline des goethites

Afin de tester la capacité de la pyoverdine à mobiliser les métaux présents dans la structure cristalline des goethites, 1 g.L<sup>-1</sup> des différents oxy-hydroxydes de fer ont été incubés dans un tampon contenant du MES et du Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, en absence ou en présence de 50 µM de pyoverdine purifiée. La teneur en métaux présents dans le milieu à l'issue des 24 h d'incubation a été déterminée par dosages en ICP-AES (Figure 49).

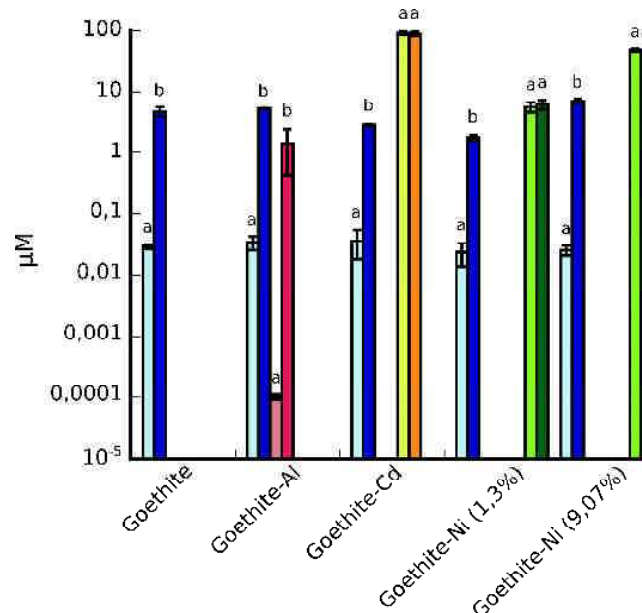
D'une façon très reproductible, l'ajout de pyoverdine sur les différentes goethites permet d'augmenter d'un facteur 100 la dissolution du minéral (histogrammes bleus) atteignant des concentrations de 2,6 à 9,1 µM de fer dissous dans le milieu. Ces concentrations correspondent aux besoins nutritionnels en fer de la plupart des bactéries. Dans la littérature, l'ajout d'une concentration similaire de sidérophores de type DFOB sur 2,5 g.L<sup>-1</sup> d'une goethite pure a permis la dissolution d'environ 5 µM de fer, après 24 h d'incubation (Reichard et al, 2007). Ces différentes observations viennent confirmer le rôle de la pyoverdine dans la dissolution des minéraux.

La pyoverdine semble également complexer l'aluminium présent au sein de la goethite (histogramme rose), observations cohérentes avec les résultats obtenus précédemment par l'utilisation de souches mutantes (chapitre 7, partie VI). La goethite substituée en aluminium présente un profil de dissolution qui se différencie des autres goethites. Néanmoins, la pyoverdine n'aurait aucun effet sur la mobilité du cadmium (histogrammes jaune et orange) ou du nickel, quel que soit le pourcentage de substitution au sein de la goethite (histogrammes verts). En effet, une quantité similaire de métal est retrouvée en présence ou en absence de pyoverdine, quantité plus élevée que celle en fer. Comme nous l'avons vu précédemment, la goethite substituée en cadmium présente une surface spécifique importante (99,3 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>), ce qui peut expliquer l'importante quantité de cadmium solubilisé (95,6 µM). En ce qui concerne le nickel, la quantité solubilisée à partir de la goethite substituée à 9,07 % (78,2 µM) est 10 fois supérieure à celle retrouvée pour la goethite plus faiblement substituée (6,9 µM), la goethite la plus fortement substituée possédant cependant la plus faible surface spécifique (29 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup>). Norrish et Taylor (Norrish & Taylor, 1961), ainsi que Jeanroy *et al.* (Jeanroy et al, 1991) ont montré que plus le taux de substitution est important, plus la dissolution par des agents chimiques, tels que le citrate, diminue. Des résultats différents sont obtenus en présence d'agents biologiques chélatants, comme les sidérophores. De plus, la présence de

chrome ou d'aluminium dans des goethites synthétiques diminue de façon importante la dissolution du fer par réduction bactérienne (Bousserrhine et al, 1999). Dans notre expérience, quelque soit le métal substituant le fer, la quantité solubilisée de ce dernier ne varie pas. Ces hypothèses devront être confirmées en analysant par microscopie électronique (EDAX, Energy dispersive X-ray spectroscopy) la distribution des métaux substituant le minéral qui pourrait également être hétérogène.

La pyoverdine ayant une très forte affinité pour le fer ( $10^{32} \text{ M}^{-1}$  Albrecht-Gary et al, 1994), cette dernière lierait préférentiellement ce métal, au détriment du cadmium et du nickel, pour lesquels les affinités sont bien plus faibles. Nous ne disposons malheureusement pas de telles données pour l'aluminium qui justifieraient la solubilisation dépendante de la pyoverdine comparée à celle indépendante des sidérophores des deux autres métaux.

Ainsi, de façon similaire aux résultats obtenus pour la mobilisation du cadmium et du nickel sur les smectites, la pyoverdine ne permet pas la solubilisation *in-vitro* de ces métaux dans la structure cristalline des goethites. Néanmoins, elle permettrait la mobilisation de l'aluminium, suggérant une meilleure affinité pour ce métal et la possibilité d'étudier ce contaminant dans de futures expériences de phytoremédiation assistée.



**Figure 49 : Solubilisation des métaux présents dans les goethites par la pyoverdine.** Les différentes goethites  $1 \text{ g.L}^{-1}$  sont incubées en absence ou en présence de pyoverdine à  $50 \text{ } \mu\text{M}$  en milieu  $\text{MES-Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Après 24 h d'incubation, les échantillons sont centrifugés et les teneurs en métaux présents dans la solution sont mesurées par ICP-AES. Sont représentés en bleu, les teneurs en fer, en rose, celles en aluminium, en jaune-orange, les quantités de cadmium et en vert, celles de nickel. Les histogrammes clairs correspondent aux échantillons sans ajout de pyoverdine tandis que les couleurs foncées, aux teneurs mesurées en présence de pyoverdine. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  les déviations standards des 5 répétitions et les lettres indiquent les différences significatives (ANOVA,  $P < 0,001$  ; test de Tukey  $P < 0,05$ ).



**Prélèvement de contaminants  
métalliques par *L. esculentum* en  
présence de pyoverdine  
en galettes de sol**



## I - Matériel et méthodes

### 1. Echantillon de sol

Le sol utilisé lors des expériences a été prélevé en avril 2009 dans le bassin d'orage de Rouffach, à 20 km de Colmar. Il a été séché à l'air, à température ambiante, puis tamisé à 2 mm. Une analyse de sol a été effectuée par le laboratoire d'analyse des sols de l'INRA d'Arras (Tableau 15). Il s'agit d'un sédiment calcaire de texture limono-argileuse dont la teneur en matière organique est faible. Sa teneur en cuivre est étonnamment peu élevée. Une contamination artificielle a été réalisée (février 2010) au  $\text{CuCl}_2$  afin de rapprocher sa teneur totale en Cu de celles couramment observées en sédiments et sols viticoles, soit  $400 \text{ mg Cu.kg sol sec}^{-1}$  (476 en réalité après dosage ICP-AES). Une co-contamination au Cd ( $\text{CdCl}_2$ ) a été réalisée, au même moment, de manière à amener sa teneur totale en Cd à  $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  de sol sec.

**Tableau 15 : Analyse du sol utilisé dans cette étude.**

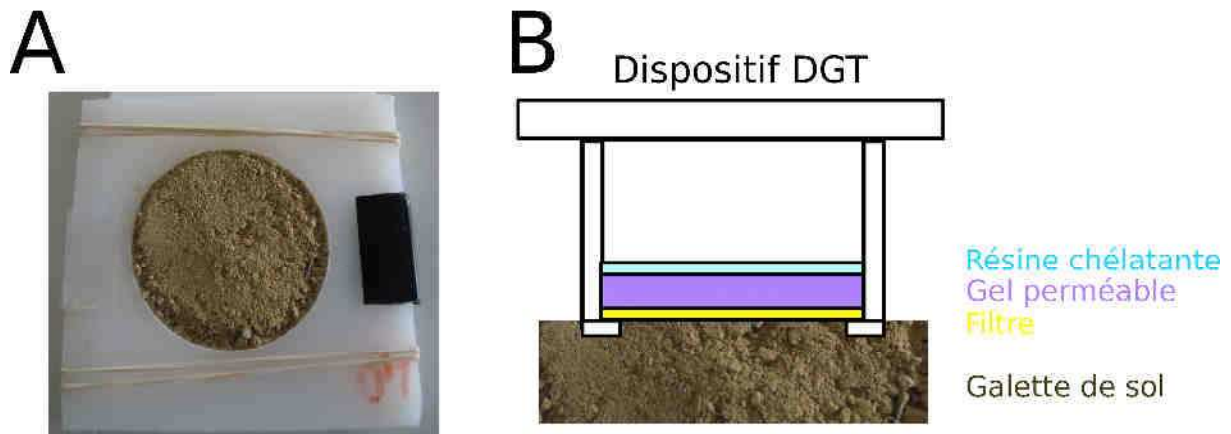
Argile	Limon	Sable	MO	Calcaire totale	C/N	CEC	pH <sub>eau</sub>	Total Cu	Total Fe
		(g kg <sup>-1</sup> )				(cmol <sub>+</sub> kg <sup>-1</sup> )		(mg kg <sup>-1</sup> )	(g 100g)
206	247	254	4,1	287	3,08	13,6	8,07	36,1	3.2

### 2. Cinétique de mise en solution du cadmium et du cuivre associés à la phase solide en présence de pyoverdine

Afin d'estimer les cinétiques de mise en solution des métaux contaminants, le cuivre et le cadmium, associés à la phase solide, en présence ou en absence de pyoverdine, nous avons réalisé des mesures moyen de DGT (Diffusive Gradient in Thin films) (Davison & Zhang, 1994). Pour cela, 5 g de sol sec ont été répartis dans des opercules plastiques (Figure 50A), puis ont été humectés grâce à 2,5 mL d'eau ultra pure et incubés durant une semaine à 20°C avant le début de l'expérience. A l'issue de ce temps, sur certaines galettes ont été ajoutés 250 nmoles de pyoverdine par gramme de poids sec de sédiment, puis les DGT ont été disposées sur les galettes de sol, sur une période d'exposition allant de 4 à 96 h, selon le protocole décrit par Ciffroy (Ciffroy et al, 2011). Les unités DGT utilisées sont constituées d'une couche de résine chélatante de 0,4 mm (Chelex-100 ®), séparée de l'échantillon par

une couche de gel perméable (gel polyacrylamide) de 0,8 mm et d'un filtre de 0,13 mm (nitrate de cellulose) (Figure 50B). A l'issue des temps d'exposition, les métaux accumulés dans la résine ont été élués avec 1 M d' $\text{HNO}_3$  puis dosés par spectroscopie d'absorption atomique (Solaar M6). Les flux ( $F_{\text{DGT}}$ ) de métaux au sein des DGT ont été calculés à partir de masses de métaux accumulés ( $M$ ), de la surface de résine exposée ( $A = 3,14 \text{ cm}^2$ ) et du temps d'exposition ( $t$ ), en utilisant l'équation suivante :

$$F_{\text{DGT}} = M / (At)$$



**Figure 50 : Dispositifs utilisés lors de la cinétique de mise en solution du cadmium et du cuivre associés à la phase solide.** A. Galette de sol formée de 5 g de sédiment dans son opercule plastique. B. Schéma d'un dispositif DGT.

### 3. Influence de la pyoverdine sur les prélèvements en cadmium, en cuivre et en fer par les plants de tomate, en sol contaminé

Afin d'étudier l'influence de la pyoverdine sur les prélèvements en métaux contaminants et en fer par les plants de tomates, des expériences ont été réalisées en galettes de sol. Le sol, trop argileux, a été allégé par du sable dans un rapport 2/1. Le sol a été incubé une semaine en chambre de culture. A l'issue de cette semaine, les graines de tomate, *Lycopersicon esculentum* cv. Saint-Pierre ont été disposées sur le sol. Une semaine après leur germination, la pyoverdine a été ajoutée tous les 5 jours, durant 20 jours, à une teneur de  $169 \text{ nmole.g}^{-1}$  de sol. La teneur en pyoverdine a été fixée par rapport à des expériences préliminaires montrant un effet net de la pyoverdine sur la solubilité du cuivre dans notre sol à partir de 120 nmoles de pyoverdine par gramme de sol sec. Chaque jour, les pots ont été

ré-humectés à raison d'1 mL. L'expérience a été menée en chambre de culture sous conditions contrôlées : 16 h de photopériode (flux de photons  $300 \mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ ), 25/20°C de température jour/nuit et 70 % d'humidité. A la récolte, les parties aériennes ont été coupées, pesées puis placées à l'étuve (65°C) durant 48 h et ont été, à l'issue de la dessiccation, à nouveau pesées. Les racines, quant à elles, ont été récupérées sur tamis en déstructurant le sol sous la pression du robinet d'eau distillée. Les racines fraîches, non pesées, ont été placées en Falcon 50 mL pour leur lavage. Celui-ci, qui a été réalisé en chambre froide (4°C), était constitué de 4 étapes (à raison de 20 mL par système racinaire) : 10 min dans l'eau ultra-pure, 10 min dans  $\text{CaCl}_2$  à 100 mM, puis 10 min dans l'EDTA 10 mM, à pH 8 et enfin 10 min dans l'eau ultra-pure. Après lavage, les racines ont été lyophilisées puis pesées. Les métaux ont été dosés à partir des échantillons préalablement minéralisés, suivant le même protocole que décrit dans la partie précédente.



## II - Résultats et discussion

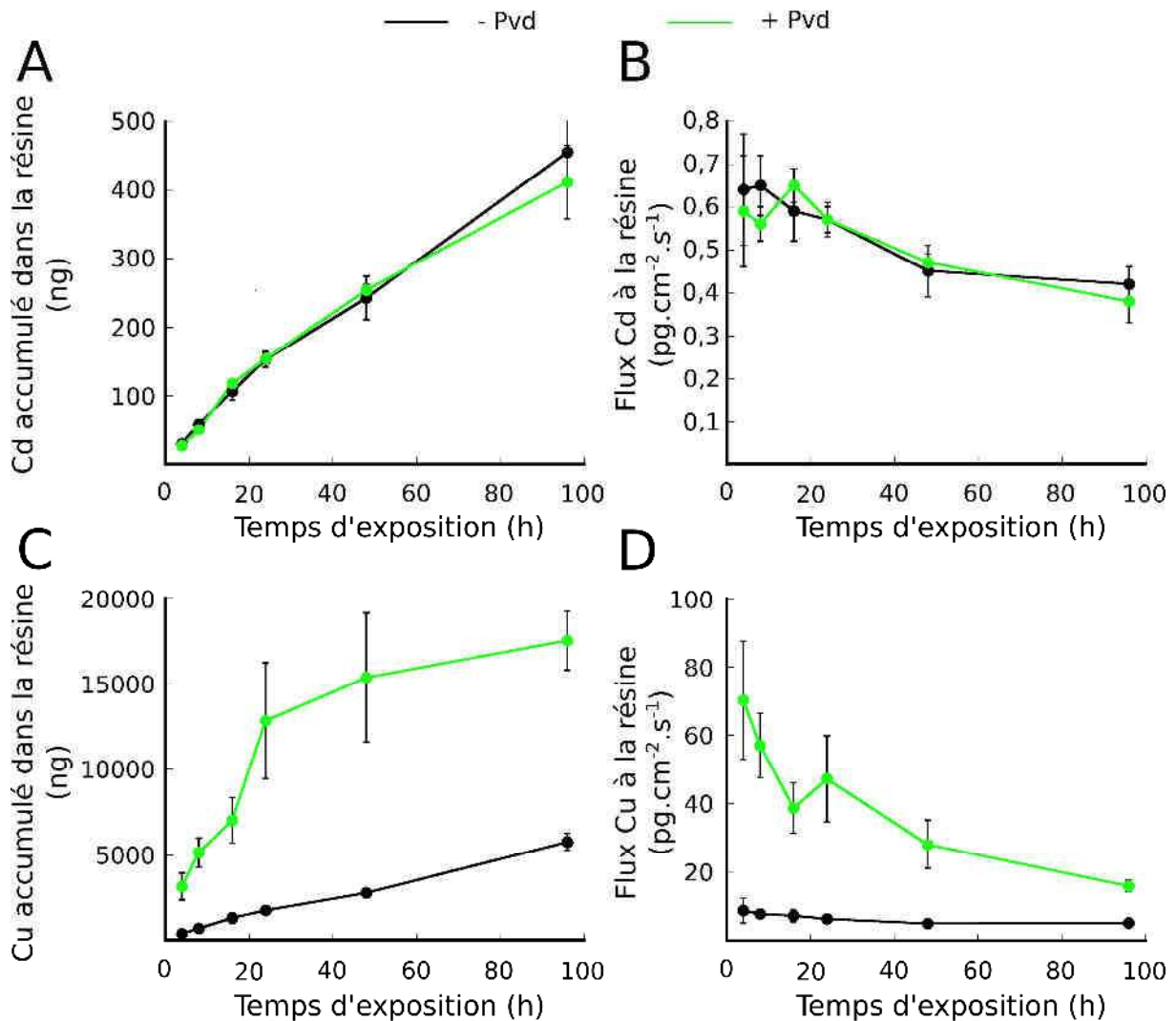
### 1. Cinétique de mise en solution du cadmium et du cuivre associés à la phase solide en présence de pyoverdine

Après exposition des DGT sur un sol contaminé en cuivre ( $400 \text{ mg.kg}^{-1}$  de sol sec) et en cadmium ( $5 \text{ mg.kg}^{-1}$  de sol sec), en absence ou en présence de 250 nmoles de pyoverdine par gramme de poids sec de sédiment, les métaux accumulés dans la résine ont été élués par une solution à 1 M d' $\text{HNO}_3$  et les teneurs ont été déterminées par spectroscopie d'absorption atomique (Figure 51A et C). Les flux de métaux vers le dispositif DGT ont également été calculés (Figure 51B et D).

En ce qui concerne la mise en solution du cadmium et du cuivre associés à la phase solide, une accumulation de ces deux métaux dans la résine a été observée, confirmant le bon déroulement de l'expérience (Figure 51A et C). Pour les deux métaux contaminants, l'accumulation n'est pas linéaire en fonction du temps, indiquant ainsi une limitation cinétique de la mobilisation du cadmium et du cuivre depuis la phase solide. De plus, cette observation est renforcée par des flux moyens de prélèvement DGT qui décroissent au cours de l'exposition.

En ce qui concerne l'influence du traitement pyoverdine, nous pouvons remarquer qu'aucune différence n'est observée pour le cadmium entre la présence ou l'absence du sidérophore. A l'inverse, pour le cuivre, l'accumulation et les flux sont supérieurs en présence de pyoverdine, et ceci quelque soit le temps d'exposition. La différence entre ces deux métaux est très certainement due à l'affinité de la pyoverdine bien plus forte pour le cuivre ( $10^{16} \text{ M}^{-1}$ ) comparé à celle pour le cadmium ( $10^{6,6} \text{ M}^{-1}$ ). Néanmoins, concernant le cuivre, la différence relative entre les flux en présence ou non de pyoverdine tend à diminuer au cours du temps. En effet, en début d'expérience, la présence de pyoverdine induit un flux 10 fois plus important que lors de son absence. A 96 h d'exposition, seul un facteur 3 est observable entre ces deux traitements. La pyoverdine s'associerait ainsi avec le cuivre, métal le plus facilement mobilisable, mais celui-ci serait en quantité limitée et une fois ce compartiment épuisé, la pyoverdine n'améliorerait plus la mobilité du métal.

Dans la littérature, les flux DGT apparaissent comme de bons indicateurs de phytodisponibilité (Zhang & Davison, 2000), notamment pour le cuivre (Zhang et al, 2001). Couramment, le flux à 24 h est l'indicateur utilisé. Dans notre étude, à ce temps, une phytodisponibilité potentielle du cuivre 7 fois plus élevée est observée en présence de pyoverdine. Ainsi, dans le cas du cuivre, ces résultats suggèrent que l'ajout de pyoverdine pourrait réellement favoriser la phytoextraction du métal en sols contaminés calcaires.



**Figure 51 : Cinétique de mise en solution du cadmium et du cuivre associés à la phase solide en absence ou en présence de pyoverdine. A. C. Teneurs en cadmium (A) et en cuivre (C) accumulés dans la résine des DGT. B. D. Flux de cadmium (B) et de cuivre (D) à la résine.**

## 2. Influence de la pyoverdine sur les prélèvements en cadmium, en cuivre et en fer par les plants de tomate, en sol contaminé

Une semaine après la germination des graines, les plants de tomate ont été disposés sur les galettes de sol contaminé en cadmium et en cuivre, en présence ou non de pyoverdine à une concentration de 169 nmoles par gramme de sédiment sec. A l'issue des 20 jours de contact avec la galette de sol, les plants ont été prélevés. Les parties aériennes et les racines ont été séparées, séchées puis pesées (Figure 52A). Les prélèvements en cadmium, en cuivre et en fer par les racines ont été déterminés par ICP-AES (Figure 52B).

Concernant les biomasses, si celles des parties aériennes restent comparables en absence ou en présence de pyoverdine, les racines ont, quant à elles, une masse très légèrement supérieure en absence de pyoverdine. Il est intéressant de remarquer que si les racines ont une masse similaire à celles déterminées en culture hydroponique, la biomasse des parties aériennes est, par ailleurs, plus faible en galette de sol qu'en hydroponie (environ 60 mg *vs* 180 mg).

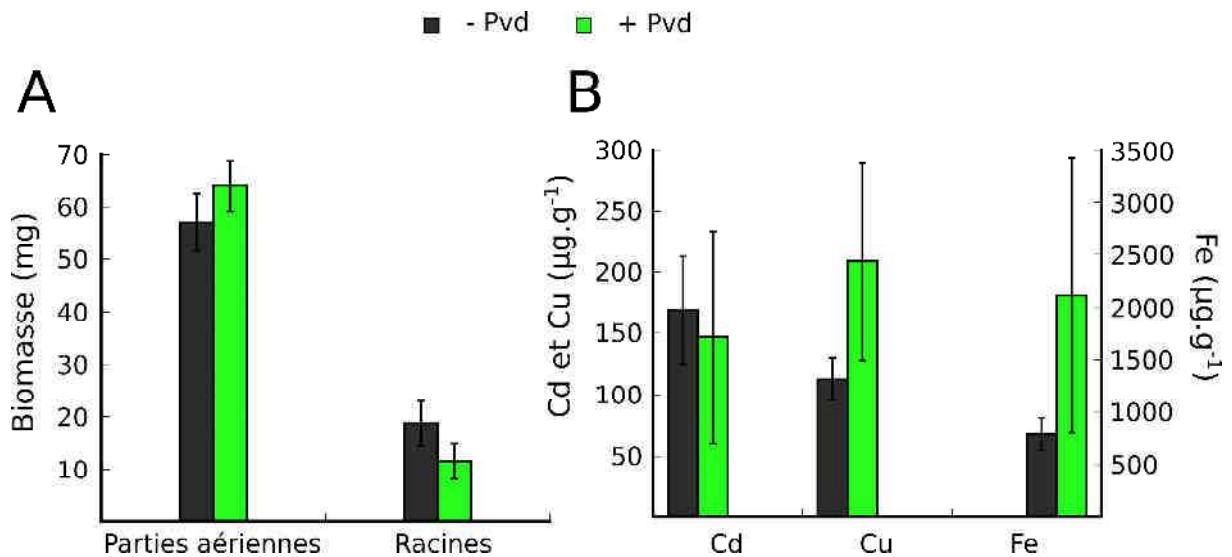
En conditions hydroponiques, le prélèvement en cadmium était plus faible en présence de pyoverdine. En revanche, aucune différence significative n'a été observée en sol, en absence ou en présence de pyoverdine pour les racines (Figure 52B). De même, dans les parties aériennes, aucun effet de la pyoverdine n'a été constaté (données non présentées).

En ce qui concerne le cuivre, son accumulation racinaire est favorisée en présence de pyoverdine. En effet, les teneurs en cuivre mesurées dans les plantes sont multipliées par deux en présence du sidérophore (Figure 52B). Dans les parties aériennes, aucune différence n'est cependant observée (données non présentées), mais la translocation du cuivre dans les racines est contrôlée par la plante.

Enfin, dans l'expérience en hydroponie, la pyoverdine n'a eu aucun effet sur le prélèvement en fer par la plante. En galette de sol, la pyoverdine favoriserait l'incorporation du fer dans les racines des plants de tomate, résultat concordant avec les résultats de la littérature (Cline et al, 1984 ; Dimkpa et al, 2009b ; Vansuyt et al, 2007).

Dans cette expérience en galette de sol, il est apparu que la pyoverdine favorise le prélèvement des métaux tels que le cuivre et le fer. Néanmoins, de façon similaire aux conditions hydroponiques, la pyoverdine n'améliore pas le prélèvement en cadmium par le

plant de tomate. Par conséquence, si la pyoverdine peut favoriser la phytoextraction des métaux, son utilisation est largement dépendante de la constante d'affinité de la pyoverdine pour le métal contaminant qui devient, alors, un paramètre déterminant pour envisager son utilisation.



**Figure 52 : Biomasse et prélèvement en métaux par les tomates en sol contaminé, en absence ou en présence de pyoverdine.** A. Biomasse des plants de tomate après 20 jours en contact avec les galettes de sol contaminé en cadmium et en cuivre. B. Prélèvements en métaux par les racines de *L. esculentum* sur une galette de sol en présence ou non de pyoverdine.



## **Conclusions du chapitre 8**



Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, le cadmium et le nickel représentent actuellement une préoccupation environnementale importante (Zafar et al, 2007). Comme nous l'avons vu dans le chapitre 6, ces métaux, phytotoxiques, provoquent une inhibition de la croissance végétale ainsi que des perturbations dans les prélèvements en nutriments et dans les métabolismes physiologiques et métaboliques de la plante (di Toppi & Gabbrielli, 1999 ; Molas, 1997). Ces travaux de thèse concernent l'immobilisation des métaux contaminants par la pyoverdine ou la bactérie productrice de sidérophores, *P. aeruginosa*, afin de protéger les plants d'un prélèvement trop important en métal et, donc d'un stress métallique. Si la présence de pyoverdine n'affecte pas la biomasse végétale ni la longueur ou la surface des racines, notamment en présence de nickel, l'inoculation par la bactérie aurait, cependant, tendance à réduire la biomasse racinaire. Un biofilm, observé en présence de bactéries et, entourant les racines, accompagne cette diminution. Il est possible que ce micro-environnement soit pathogène et entraîne un ralentissement de la croissance aboutissant à la mort de la plante, comme cela a pu être décrit dans la littérature pour *Arabidopsis thaliana*, lors de culture en présence de *P. aeruginosa* (Bais et al, 2004 ; Walker et al, 2004). A l'inverse, le biofilm, emprisonnant les smectites et d'autres composants du milieu, pourrait servir de réserves à la plante, qui n'aurait donc plus la nécessité d'accroître ses extensions. Par la suite, il serait intéressant de réaliser ce type d'expérience sur une durée d'exposition plus longue afin de comprendre le rôle de la bactérie vis-à-vis de la plante (pathogénicité, mutualisme, commensalisme). De même, si l'analyse des racines en présence de *P. aeruginosa* par WinRHIZO n'a pu être réalisée, faute de temps, il serait intéressant de la mettre en œuvre à l'avenir.

Au laboratoire, il a récemment été mis en évidence que les concentrations minimales de cadmium et de nickel inhibant 50 % de la croissance de *P. aeruginosa* PAO1 en milieu succinate, sont, respectivement de 30 et 15  $\mu\text{M}$  (Hannauer et al, 2012a). De façon cohérente, au cours des deux jours d'exposition, la présence des métaux n'a pas affecté la croissance de la bactérie qui supporte ainsi la concentration de 1  $\mu\text{M}$  testée dans notre étude. Il est possible que les bactéries empêchent le prélèvement par la plante des éléments traces métalliques afin de réduire les effets phytotoxiques des métaux, et ceci par différents mécanismes bactériens tels que la biosorption, la bio-accumulation ou encore la bio-immobilisation (Zaidi et al, 2006).



Dans la littérature, il a été montré que la présence de bactéries productrices de sidérophores favorise le prélèvement en métaux par la plante. A l'inverse, dans notre étude, l'ajout de pyoverdine ou de *P. aeruginosa* dans une solution contaminée en cadmium ou en nickel réduit le prélèvement en éléments métalliques dans les racines et les parties aériennes des plants de tomate. En galette de sol, le prélèvement en cadmium n'est pas diminué en présence de pyoverdine mais le sidérophore n'engendre aucun effet. En condition hydroponique, l'incorporation en fer par la plante reste, quant à elle, inchangée en présence ou en absence de sidérophores ou de bactéries. De façon similaire à notre étude, il a été montré que l'inoculation de plantes avec des bactéries productrices de sidérophores peut également entraîner la diminution des prélèvements métalliques, en sol (Ganesan, 2008 ; Kuffner et al, 2008 ; Sinha & Mukherjee, 2008). Dans notre travail, à l'issue des deux jours d'exposition, une diminution de la quantité initiale de pyoverdine, pouvant atteindre jusqu'à 15 % en présence de smectite, a été observée. La pyoverdine n'étant pas dégradée durant la durée du traitement, ces résultats suggèrent une incorporation du sidérophore par la plante. Une telle observation a déjà été effectuée par Vansuyt *et al.* (Vansuyt et al, 2007). Les auteurs ont ainsi suggéré l'acquisition, par une voie encore inconnue, de la pyoverdine de *P. fluorescens* dans les racines d'*A. thaliana*. Cependant, s'il est possible que la pyoverdine soit incorporée par la plante, la situation serait différente pour les complexes pyoverdine-métaux. En effet, les prélèvements en métaux contaminants et en fer n'étant pas améliorés en présence de pyoverdine ou de *P. aeruginosa*, il est possible que les sidérophores, en complexant les ions métalliques, rendent leurs prélèvements difficiles, hypothèse également suggérée par Kuffner *et al.* (Kuffner et al, 2008). De plus, la complexation en solution des métaux par la pyoverdine réduirait fortement la disponibilité du métal. La conception d'anticorps anti-pyoverdine serait souhaitable afin de conclure plus précisément sur l'incorporation de la pyoverdine et l'influence de la présence d'ions métalliques par le plant de tomate.

De plus, la mauvaise solubilisation du cadmium et du nickel adsorbés sur les smectites par la pyoverdine est également un paramètre à considérer. En effet, dans un tel cas de figure, il est impossible d'améliorer par ajout de la pyoverdine de *P. aeruginosa* le prélèvement par la plante. En outre, parmi la grande diversité de sidérophores décrite au sein de la famille des pyoverdines, il se pourrait que certaines d'entre elles puissent avoir des affinités pour ces métaux, supérieures à celle de la pyoverdine testée. Ainsi, il conviendrait de poursuivre par des expériences de phytoextraction assistée par d'autres types de pyoverdines. En effet, il est apparu, lors de l'expérience en galettes de sol, que l'impact de la pyoverdine sur le

prélèvement par la plante était dépendant du métal. Si la pyoverdine ne confère aucun avantage dans l'incorporation du cadmium pour la plante, celle-ci a, à l'inverse, un effet sur le prélèvement du cuivre, pour lequel son affinité est plus forte que pour le cadmium.

Bien que le résultat en conditions hydroponiques ne soit pas celui initialement attendu, la réduction du prélèvement par la plante pourrait constituer un atout important. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre 5, les techniques biologiques de dépollution actuelles sont très variées. Parmi ces stratégies, l'utilisation de bactéries, en particulier des bactéries productrices de sidérophores, pour réduire le prélèvement en métaux par les végétaux ou leur translocation dans les parties aériennes (Ma et al, 2011) est en plein essor. En effet, dans notre société actuelle, de plus en plus de surfaces sont défrâchées à des fins agricoles mais ces nouvelles terres ne sont pas suffisamment fertiles et/ou sont sensibles à l'érosion. De plus, avec l'augmentation de la présence de contaminants métalliques dans les sols, la phytostabilisation apparaît comme une stratégie pleinement adaptée, permettant l'utilisation de ces sols pour la culture sans phytoextraction, traitement nécessitant une durée importante. Nos résultats suggéreraient, dans ce contexte, que l'ajout de *P. aeruginosa* sur un sol contaminé par du cadmium et/ou du nickel permettrait de limiter son incorporation par les plants de tomate. Il conviendrait dès lors d'étendre la variété des plantes testées afin d'évaluer la pertinence de cette stratégie.



# **Conclusions et perspectives**



L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les possibilités de développer des procédés de phytoremédiation assistée par des bactéries productrices de sidérophores dans le but de dépolluer des sols contaminés par des éléments traces métalliques. L'étude s'est principalement focalisée sur la compréhension des mécanismes impliqués dans les interactions entre les divers partenaires (minéraux du sol, bactéries, sidérophores et plante). Ce travail a apporté tout d'abord de nouveaux éléments quant à la disponibilité du fer et des métaux potentiellement toxiques dans les sols. La problématique du fer est importante car il s'agit d'un élément essentiel pour les micro-organismes ou les plantes. De part sa faible biodisponibilité, les organismes ont dû développer de nombreuses stratégies leur permettant d'acquérir cet élément. Ces stratégies sont fondées sur des processus chimiques tels que l'acidification des sols, la réduction ou encore la synthèse de ligand, comme par exemple les sidérophores. Un des facteurs importants contrôlant la disponibilité du fer dans le sol est la solubilité des minéraux, représentant une source de fer. La solubilité des minéraux est, quant à elle, influencée par le pH, le potentiel redox et la concentration en agents complexants. Ces paramètres peuvent être modifiés par l'activité microbienne, mais également par les racines des plantes, au niveau de la rhizosphère. Néanmoins, un paramètre délicat à appréhender est l'influence de la dissolution des minéraux sur la dynamique du fer dans la rhizosphère.

Dans ce travail, trois aspects majeurs peuvent être mis en avant et seront discutés dans cette partie :

- le premier concerne le rôle des *Pseudomonas* dans la dissolution des minéraux argileux et des oxy-hydroxydes de fer ;
- le second consiste en l'étude de la capacité de la pyoverdine à complexer les contaminants adsorbés sur les smectites ou présents dans la structure cristalline des goethites ;
- et enfin le troisième a porté sur le rôle de la pyoverdine ou des bactéries productrices de sidérophores dans l'amélioration du prélèvement des contaminants par la plante.

Lors de ce travail de thèse, je me suis particulièrement intéressée à la compréhension des mécanismes mis en place entre une bactérie productrice de sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa*, et des constituants du sol, des argiles et des oxy-hydroxydes de fer.

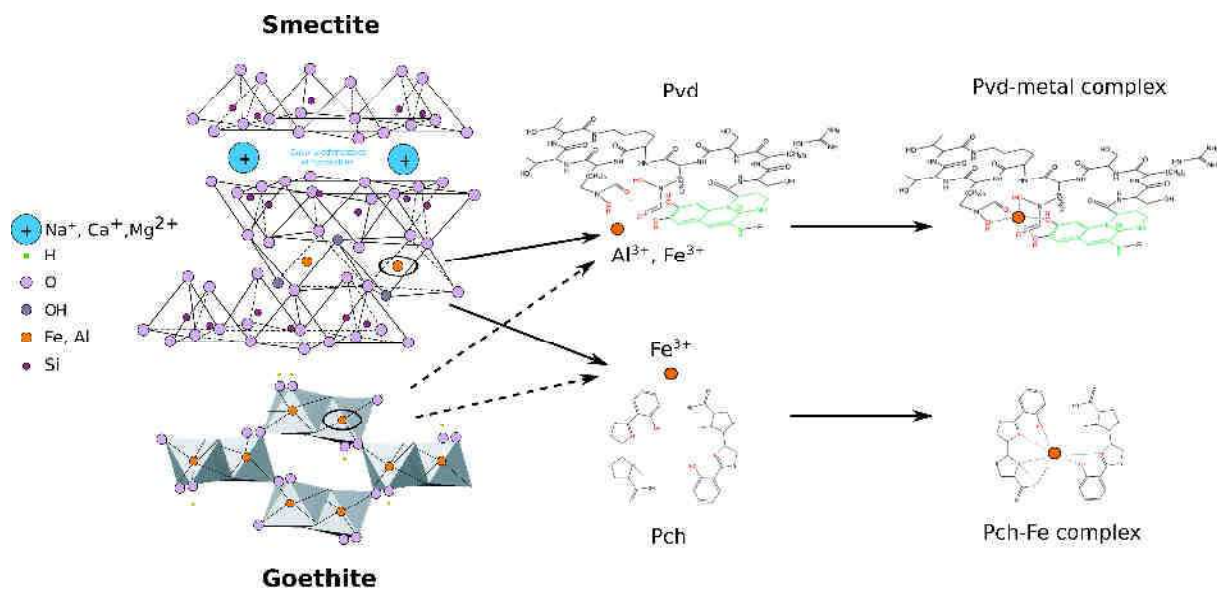
Tout d'abord, il a été intéressant de remarquer, qu'en présence de minéraux, deux populations distinctes, une planctonique et une sessile, sont apparues. En effet, très

rapidement, un biofilm entourant les grains de minéraux s'est formé. Nous avons pu observer que la présence de ces minéraux stimulait la croissance de la population planctonique, aussi bien les argiles que les oxy-hydroxydes de fer. De plus, la production de pyoverdine, sidérophore majeur chez les *Pseudomonas* fluorescents, était réprimée. Les dosages chimiques ont révélé la présence de fer dans les surnageants de culture, confirmant que la production de pyoverdine est finement régulée par la concentration en fer présente dans l'environnement bactérien (Visca, 2004). Au sein des smectites, le fer est présent au niveau des octaèdres tandis qu'il est le principal constituant des goethites. Ainsi, ces minéraux peuvent donc représenter des sources en fer, nécessaires au développement de la bactérie.

Afin d'appréhender le rôle des sidérophores, et en particulier celui de la pyoverdine, dans les interactions entre ces minéraux et *P. aeruginosa*, une approche de biologie moléculaire, impliquant des mutants dans la production des sidérophores, a été menée. Ce type d'approche a été utilisé pour la première fois dans une étude sur la dissolution des minéraux par des micro-organismes. Il est tout d'abord apparu, de façon intéressante, que la stimulation de croissance en présence de minéraux était principalement observée lorsque les souches produisaient de la pyoverdine, suggérant ainsi que le fer, associé à ces minéraux, était principalement disponible pour la bactérie *via* la pyoverdine. Par la suite, les dosages ont clairement indiqué que la dissolution du fer et de l'aluminium de ces minéraux était réalisée pour les deux souches produisant la pyoverdine. En absence de pyoverdine, il a cependant été constaté que la pyochéline était capable de complexer le fer, bien qu'en quantités plus faibles (Figure 53). Dans le cas des smectites, en absence des deux sidérophores, aucune trace de fer et d'aluminium n'a été détectée dans le milieu. Ces observations confirment ainsi l'implication des sidérophores dans la dissolution de ce minéral. Dans le cas des goethites, une mobilisation du fer, bien que faible, est cependant observée. Il est possible que l'abondance du fer dans les goethites facilite sa solubilisation en l'absence de sidérophore.

Afin de progresser dans la compréhension de ces mécanismes impliquant les sidérophores, il serait utile de réaliser des expériences complémentaires. Il serait intéressant de connaître l'implication exacte de la pyoverdine et de la pyochéline dans les interactions avec les minéraux ainsi que leur mise en place au cours du temps. Pour ceci, l'utilisation d'une souche exprimant des protéines de fusion avec des protéines fluorescentes, dont nous disposons désormais au laboratoire, permettra d'apporter des éléments fonctionnels totalement nouveaux. En effet, au sein de cette souche, un premier marquage fluorescent sur

une protéine essentielle dans la production de la pyoverdine et un second dans la voie de biosynthèse de la pyochéline constituent des rapporteurs de l'activation de chacune de ces voies pouvant être aisément suivis au cours du temps par mesure de niveau de fluorescence. De plus, l'utilisation de mutants réductases nous permettrait d'observer si des mécanismes autres que la synthèse de sidérophores seraient impliqués dans la réduction du fer constitutif de ces minéraux.



**Figure 53 : Représentation schématique de l'interaction entre les sidérophores pyoverdine et pyochéline et les minéraux de type smectite ou goethite.** Le fer, sous forme  $\text{Fe}^{3+}$ , présent dans la structure octaédrique des smectites et principaux constituants des goethites est mobilisé par la pyoverdine et la pyochéline, formant le complexe pyoverdine-fer. L'aluminium, quant à lui, n'est mobilisé que par la pyoverdine.

Concernant l'étude du biofilm, nous avons moins approfondi l'étude de ce compartiment très complexe. En effet, en présence de smectites ou de goethites, il se forme très rapidement un biofilm, entourant les minéraux dans une matrice d'exopolysaccharides. Dans cet environnement, où le fer est également en quantités limitées, les bactéries synthétisent de la pyoverdine, se fixant à l'intérieur du biofilm et contribuant probablement à la chélation du métal. Nous avons mis en évidence que le contact entre *P. aeruginosa* et les minéraux était primordial dans l'acquisition du fer. De plus, la quantité de biofilm formé augmente avec la quantité de minéral présent (Figure 54), suggérant que les minéraux constituent une surface adéquate à la formation de tels micro-environnements. Lors des expériences de prélèvement des contaminants métalliques par les plantes, la formation d'un biofilm entourant les racines est également observée, ce dernier étant plus important en



présence de smectites (Figure 54). Afin de mieux comprendre le rôle du biofilm dans les interactions entre les bactéries et les minéraux, et plus particulièrement l'implication de celui-ci dans la solubilisation des éléments constitutifs des smectites et des goethites, il serait utile de réaliser des expériences complémentaires en utilisant des mutants dans la production de biofilm. Pour cela, il serait intéressant de construire des souches déficientes dans la production de biofilm et à l'inverse, des souches hyper-productrices. Dans la littérature, très peu de données existent sur les interactions entre le biofilm et les minéraux. Les smectites ayant une taille identique à celle des cellules bactériennes, il a été, pour l'instant, au sein du biofilm, difficile de séparer les deux et donc de quantifier la population bactérienne sessile.

Enfin, des expériences actuellement menées en collaboration (IPHC, UMR 7178, équipe Radiochimie) nous permettront, probablement, de déterminer les fonctions de la pyoverdine impliquées dans la sorption sur les minéraux argileux par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (ATR-FTIR) ainsi qu'une meilleure connaissance dans la spéciation des espèces en solutions (LC/MS Orbitrap).

La seconde partie de ce manuscrit s'est focalisée sur le rôle des Pseudomonades, et plus particulièrement de la pyoverdine, dans le prélèvement par la plante du cadmium et du nickel. En effet, si le rôle de bactéries productrices de sidérophores dans l'amélioration de la phytoremédiation a été démontré, les mécanismes mis en place restent mal connus. Dans notre étude, il est apparu que l'extraction du cadmium ou du nickel par la plante, en présence de pyoverdine, n'était pas améliorée, même lorsque le métal était immobilisé sur les smectites. Il se pourrait que les complexes pyoverdine-métaux ne puissent traverser les plasmalemmes, ce qui serait défavorable à l'adsorption des métaux. S'il a été montré, dans la littérature, que la pyoverdine était capable de complexer, avec une affinité moindre que celle du fer, des métaux autres que le fer, la pyoverdine est incapable de solubiliser efficacement le cadmium et le nickel adsorbés sur les smectites ou présents au sein de la structure cristalline des goethites, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus. Par la suite, des expériences ont été menées en galettes de sol polycontaminé en cuivre et en cadmium. Si la pyoverdine n'a pas amélioré les prélèvements par la plante en cadmium, le sidérophore a, quant à lui, favorisé le prélèvement du cuivre, suggérant que l'utilisation de la pyoverdine dans des expériences de phytoextraction est dépendante du métal utilisé. Dans la littérature, les expériences de bioaugmentation sont menées directement en présence de bactéries productrices de sidérophores. Pour cette raison, après avoir mis au point un milieu de culture permettant à la fois la survie

de la plante en hydroponie mais également celle des bactéries, nous avons réalisé une expérience faisant interagir les plantes, le nickel immobilisé sur les smectites et des bactéries productrices de sidérophores. Néanmoins, des résultats similaires à ceux obtenus par l'ajout seul du sidérophore bactérien, ont été obtenus en présence de la bactérie d'étude. Lors de notre investigation sur l'interaction entre les oxy-hydroxydes de fer et les *Pseudomonades*, nous avons pu mettre en évidence la capacité de la bactérie à solubiliser, outre le fer, les éléments substitués, tels que le nickel et le cadmium. Si la présence de *P. aeruginosa* n'améliore pas les prélèvements en métaux par la plante, la bactérie protégerait, par contre, les plants de tomate du stress métallique. Dans la littérature, le fait que des souches ne produisant pas de sidérophores favorise le prélèvement des éléments métalliques met en évidence l'importance d'autres mécanismes dans ces interactions. Si dans notre étude, le résultat obtenu n'est pas celui escompté initialement, la réduction du prélèvement par la plante pourrait, par ailleurs, constituer un atout important dans les stratégies de phytostabilisation développées actuellement.

Par la suite, il serait également intéressant de conduire les expériences avec une nouvelle espèce végétale, hyperaccumatrice ou non. L'équipe de Dépollution Biologique des Sols de Colmar avait montré que le prélèvement du chrome et du plomb par le maïs était amélioré en présence de *P. aeruginosa* (Braud et al, 2009c), il pourrait être intéressant de réaliser ces expériences en présence des souches mutantes dans la production de sidérophores afin d'étudier exactement le rôle de ces molécules dans de telles expériences. De plus, la grande diversité des pyoverdines connues nous permettrait de tester une nouvelle pyoverdine dont l'affinité pour les contaminants métalliques pourrait s'avérer meilleure. Nous pourrions également comprendre les mécanismes qui contrôlent les transferts de la solution à la plante en modélisant le système. En effet, des modèles basés sur une approche mécanistique proposés par Barber (Barber, 1995) sont utilisés pour décrire l'incorporation d'éléments par la plante. La surface racinaire ayant été déterminée par le logiciel WinRHIZO pourrait ainsi être utilisée dans un tel modèle. Néanmoins, il serait judicieux de déterminer les constantes cinétiques d'association et de dissociation des complexes pyoverdine-métaux. Enfin, en collaboration avec l'équipe Dépollution Biologique des Sols (UHA Colmar), des expériences de prélèvement du cadmium et du cuivre, en présence de *P. aeruginosa* sont actuellement conduites en galettes de sol.

Pour conclure, cette étude a permis une avancée dans la compréhension des interactions entre les micro-organismes, des constituants du sol et des plantes. Si la dissolution des minéraux, qu'ils soient de structure phyllosilicate ou oxyde de fer, apparaît clairement influencée par la sécrétion de sidérophores, le biofilm reste encore un compartiment complexe où les interactions sont à définir.

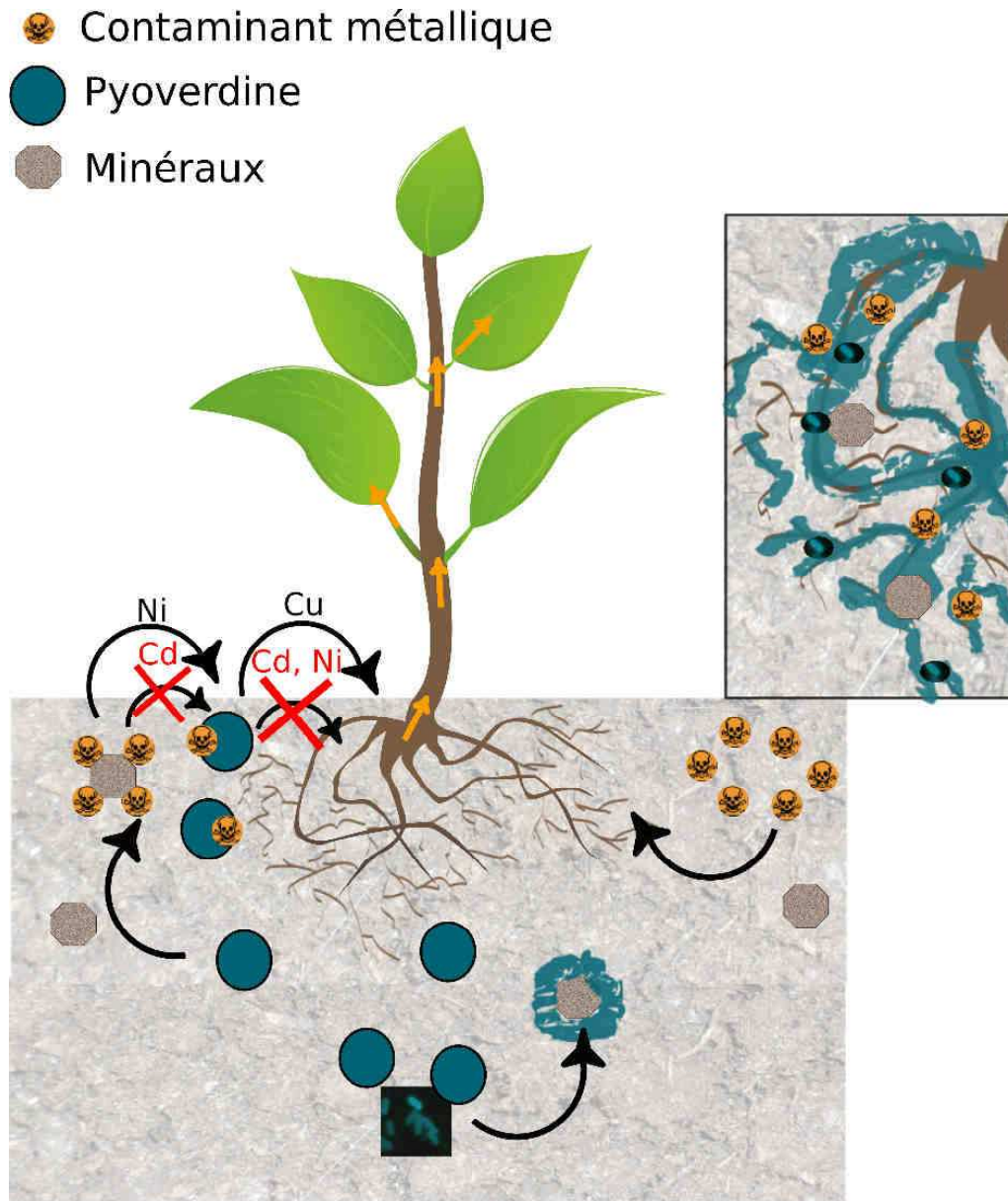


Figure 54 : Schéma récapitulatif des différentes interactions étudiées lors de ce travail de thèse.

# Monitorat



Suite au concours de l'École Doctorale, j'ai eu la chance d'obtenir un poste en tant que monitrice à l'Université de Strasbourg. J'ai intégré l'équipe pédagogique de licence première année, en travaux pratiques (TP) et en travaux dirigés (TD) de microbiologie ainsi que de physiologie végétale. Ces travaux ont pour objectif d'enseigner les techniques de bases nécessaires en microbiologie ainsi que les premières connaissances en botanique.

En microbiologie, les TP/TD sont organisés en trois parties complémentaires comprenant l'apprentissage des techniques élémentaires de microbiologie (un TP), la manipulation afin de mettre en évidence le pouvoir pathogène des bactériophages (un TP) et enfin, l'analyse des résultats obtenus lors de la séance précédente (un TD).

En physiologie végétale, les TP/TD sont divisés en deux séances afin de couvrir l'évolution des végétaux, la première portant sur les mousses et fougères et la seconde sur les angiospermes. Lors de ces travaux, les étudiants acquièrent les premières bases d'identification des végétaux ainsi que la biologie de ces derniers.

Lors de ces 64 heures d'enseignement, j'ai été en charge de différents groupes d'étudiants que j'ai suivi en microbiologie et en physiologie végétale. Outre l'encadrement, j'étais par ailleurs en charge de l'évaluation des étudiants par un contrôle terminal, mais également par des dessins de végétaux lors des séances de TP.

Au cours de ma première et seconde année de thèse, j'ai ainsi allié recherche et enseignement. Cette expérience pédagogique a été des plus enrichissantes et m'a notamment permis d'acquérir une certaine assurance lors de la prise de parole en public. De plus, le monitorat est une façon d'exercer l'un des aspects importants de la formation scientifique, c'est-à-dire de partager ses connaissances ainsi que de transmettre la méthode scientifique. Lors de l'élaboration de ces enseignements, j'ai été soucieuse d'utiliser un vocabulaire scientifique mais adapté aux étudiants. Les retours positifs de ces derniers, quant à ma méthodologie pédagogique, ont été très motivants. Ainsi, j'ai pris beaucoup de plaisir à enseigner et à transmettre mes connaissances.



# **Communications scientifiques**





## Publications scientifiques

**C. Ferret**, T. Sterckeman, S. Gangloff, J.-Y. Cornu, I.J. Schalk & V. A. Geoffroy - Siderophore promoted dissolution of smectite by fluorescent *Pseudomonas*. *Soumis à Environmental Microbiology*.

**C. Ferret**, J.-Y. Cornu, T. Sterckeman, K. Jézéquel, T. Lebeau, I.J. Schalk & V. A. Geoffroy – Effect of pyoverdine and *Pseudomonas* on metal mobilisation from smectite and uptake by tomato plants. *En preparation pour soumission à Plant and Soil*.

J.-Y. Cornu, **C. Ferret**, M. Elhabiri, M. Lollier, V. A. Geoffroy, K. Jezequel & T. Lebeau - Pyoverdine promotes the mobilisation and the phytoextraction of Cu in calcareous sediment. *En preparation*.

## Communications orales

**C. Ferret** – Implication des sidérophores et du biofilm dans les interactions bactéries-argiles : vers une meilleure compréhension des processus de phytoextraction bio-augmentée. *Séminaire de Microbiologie de Strasbourg (31 mars 2011)*.

**C. Ferret** – Role of siderophore-producing bacteria in clay dissolution. *Journées Campus d'Illkirch (3 mai 2011)*.

**C. Ferret** – Siderophores, tools for bioaugmentation-assisted phytoextraction. *Séminaire de département, Illkirch (20 juin 2011)*.

## Communications par affiche

**C. Ferret**, J.-Y. Cornu, T. Sterckeman, S. Raous, G. Morvan, K. Jézéquel, T. Lebeau, I. Schalk & V. Geoffroy - Rôle des sidérophores et du biofilm bactériens dans la complexation du fer présent dans les smectites. *Forum Réalise, Strasbourg (31 mars 2010)*.

**C. Ferret**, J.-Y. Cornu, T. Sterckeman, S. Raous, G. Morvan, K. Jézéquel, T. Lebeau, I. Schalk & V. Geoffroy – Involvement of siderophore and biofilm produced by *Pseudomonas aeruginosa* in iron chelation from clay. *Journées Campus d'Illkirch (3-4 mai 2010)*.

**C. Ferret**, J.-Y. Cornu, T. Sterckeman, K. Jézéquel, T. Lebeau, I. Schalk & V. Geoffroy – Mobilisation sélective des métaux par la pyoverdine dans un sol contaminé : un enjeu en dépollution. *Forum Réalise, Strasbourg (29 mars 2011)*.

J.-Y. Cornu, C. Ponçot, Y. Leva, **C. Ferret**, V. Geoffroy, M. Lollier, T. Lebeau & K. Jézéquel – Copper solubility and phytoavailability in the rhizosphere of tomato as influence by bacterial siderophore. *11<sup>th</sup> ICOBTE, Florence (Italie) (3 au 7 juillet 2011)*.

**C. Ferret**, J.-Y. Cornu, T. Sterckeman, K. Jézéquel, T. Lebeau, I. Schalk & V. Geoffroy – Metal transfer from contaminated soils to plants: the siderophore-producing bacteria connection. *Séminaire de Microbiologie de Strasbourg (15 mars 2012) ; Journée Campus d'Illkirch (2-3 avril 2012)*.

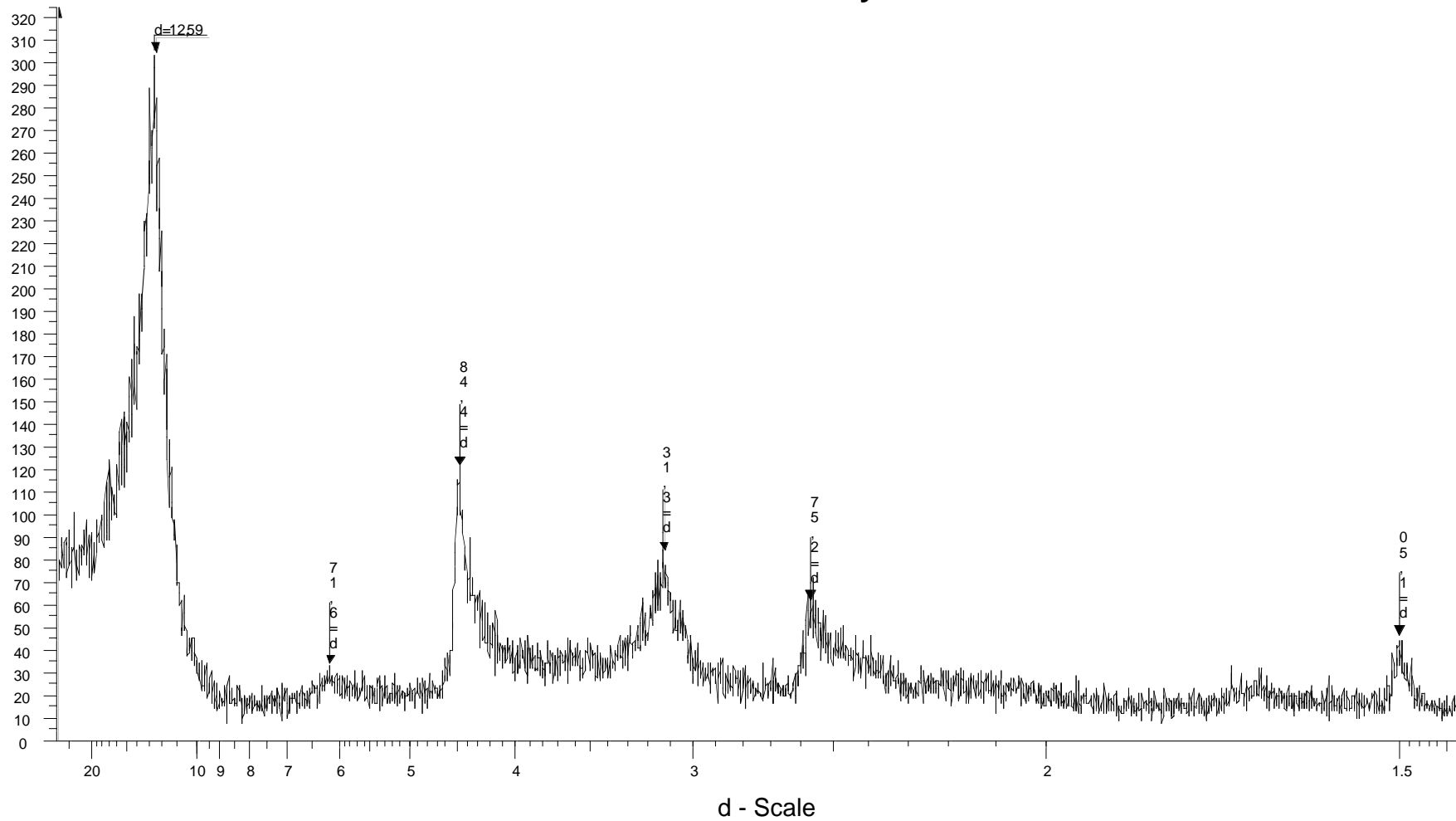
J.-Y. Cornu, **C. Ferret**, M. Elhabiri, M. Lollier, V. Geoffroy, K. Jézéquel & T. Lebeau – Pyoverdine interactions with trace elements in sediments: relevance for phytoremediation. *4<sup>th</sup> International Congress Eurosoil 2012, Bari (Italie) (2 au 6 juillet 2012)*.

**C. Ferret**, T. Sterckeman, J.-Y. Cornu, S. Gangloff, I. J. Schalk & V. A. Geoffroy - Smectite alteration by siderophore-producing Pseudomonads. *Biometals 2012, 8<sup>th</sup> International Biometals Symposium, Bruxelles (Belgique) (15-19 juillet 2012)*.

# Annexes

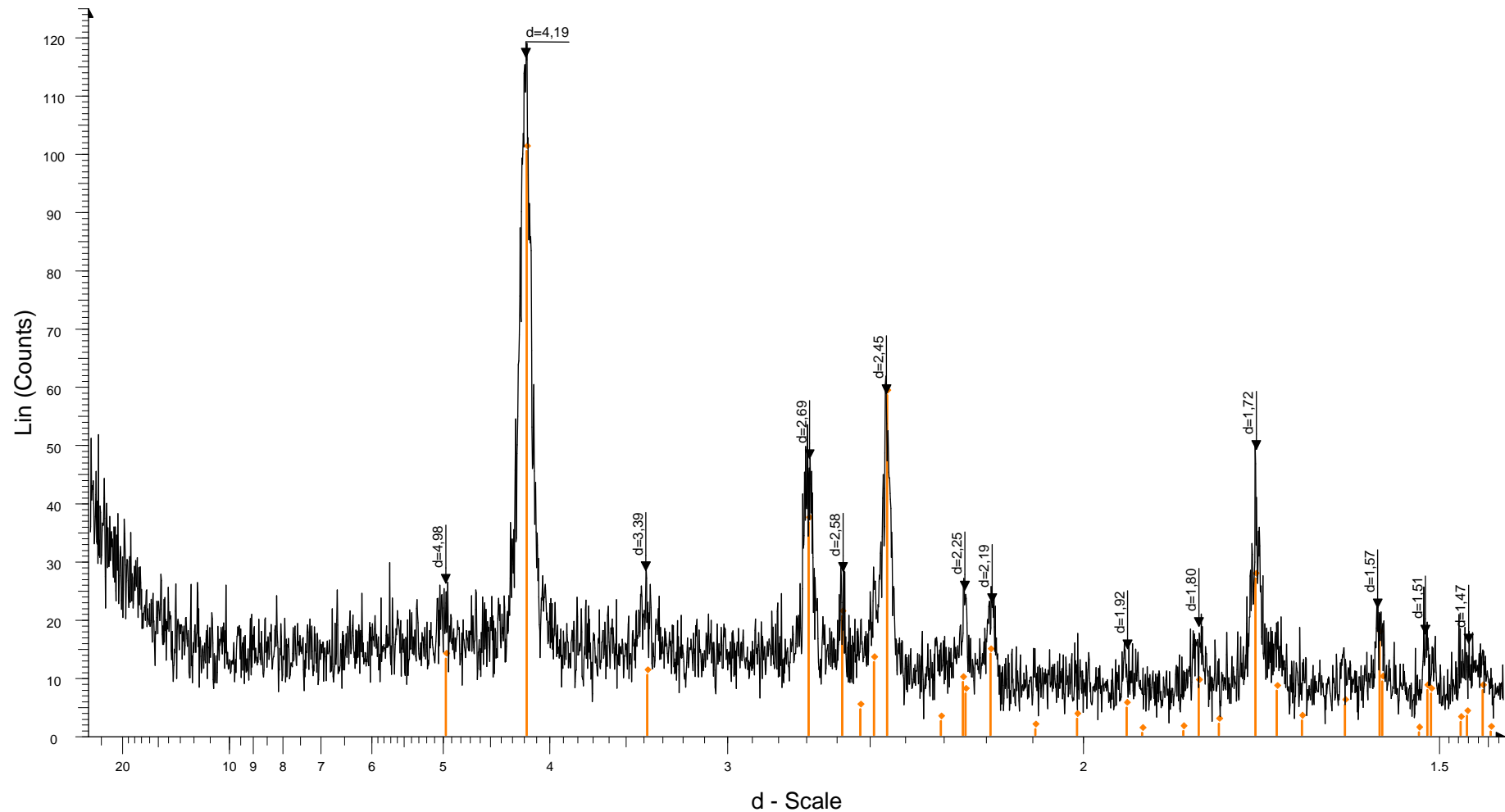


## Annexe A : Diffractométrie de rayons X sur les smectites



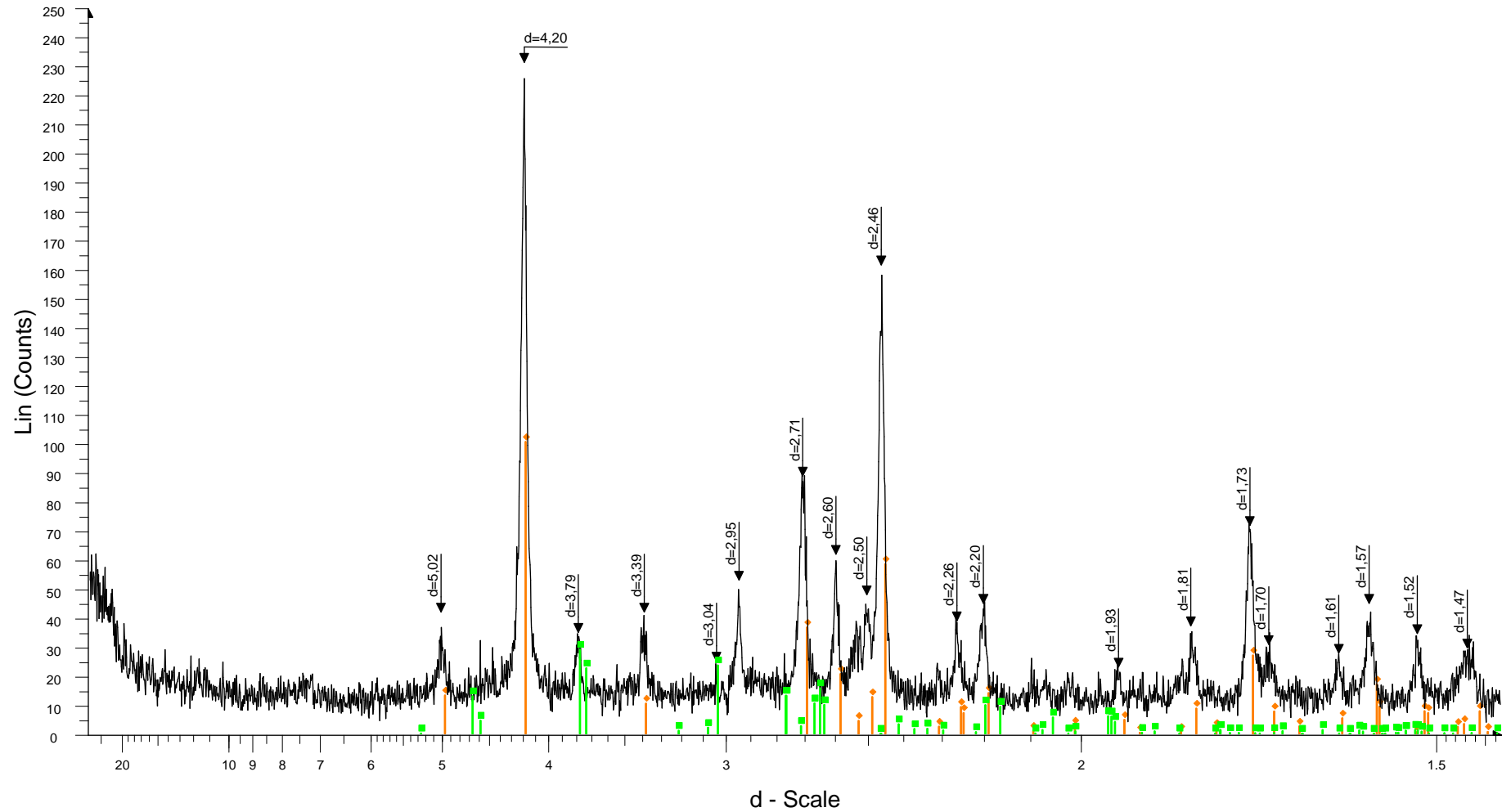
Smectite de G Oorgie (ESBS / V. Geoffroy) - File: RX0088.raw - Type: 2Th/Th locked - Start: 3.000 ° - End: 65.000 ° - Step: 0.020 ° - Step time: 1. s - Temp.: 25 °C (Ro om) - Time Started: 20 s - 2-Theta: 3.00 ° - Operations: Import

## Annexe B : Diffraction de rayons X sur la goéthite non substituée



Goethite non substituée - File: RX0144.raw - Type: 2Th/Th locked - Start: 3.000 ° - End: 65.000 ° - St ep: 0.020 ° - Step time: 1. s - Temp.: 25 °C (Room) - Time Started: 20 s - 2-Theta: 3.00 ° - Theta: 1.50 ° - Chi: 0.00 ° - Phi: Operations: Import  
01-081-0463 (C) - Goethite, syn - FeO(OH) - Y: 82.63 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Orthorhombic - a 4.61580 - b 9.95450 - c 3.02330 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Primitive - Pbnm (62) - 4 - 138.915 - I/c P

## Annexe C : Diffractométrie de rayons X sur la goethite substituée cadmium



Goethite substituée Cd - File: RX0142.raw - Type: 2Th/Th locked - Start: 3.000 ° - End: 65.000 ° - Ste p: 0.020 ° - Step time: 1. s - Temp.: 25 °C (Room) - Time Started: 26 s - 2-Theta: 3.00 ° - Theta: 1.50 ° - Chi: 0.00 ° - Phi:

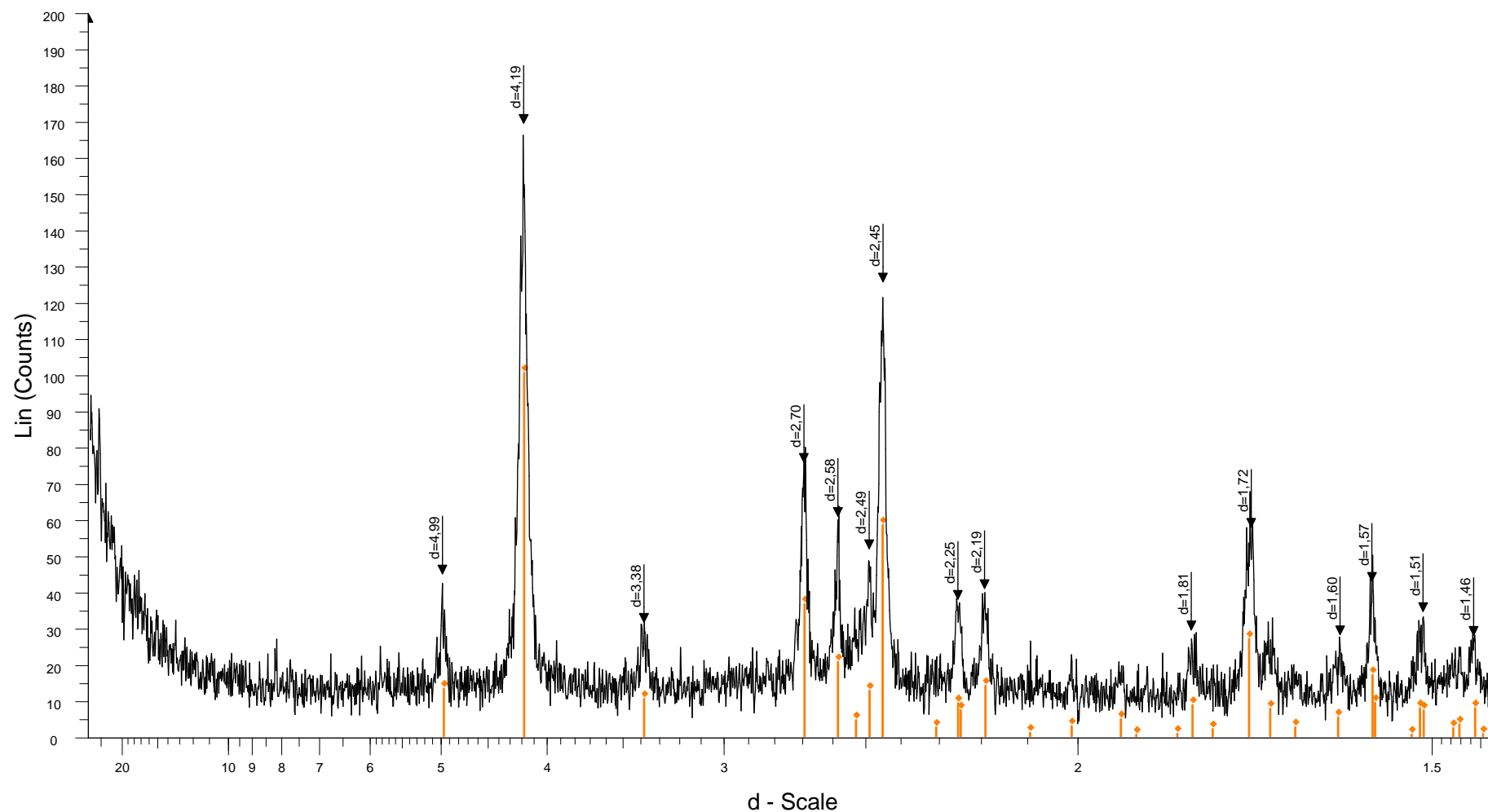
Operations: Import

01-081-0463 (C) - Goethite, syn - FeO(OH) - Y: 44.54 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Orthorhombic - a 4.61580 - b 9.95450 - c 3.02330 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Primitive - Pbnm (62) - 4 - 138.915 - I/c P

01-074-2055 (C) - Niter, syn - KNO3 - Y: 12.83 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Orthorhombic - a 6.43600 - b 5.43000 - c 9.19200 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Primitive - Pnma (62) - 4 - 321.237 - I/c PDF 0.8

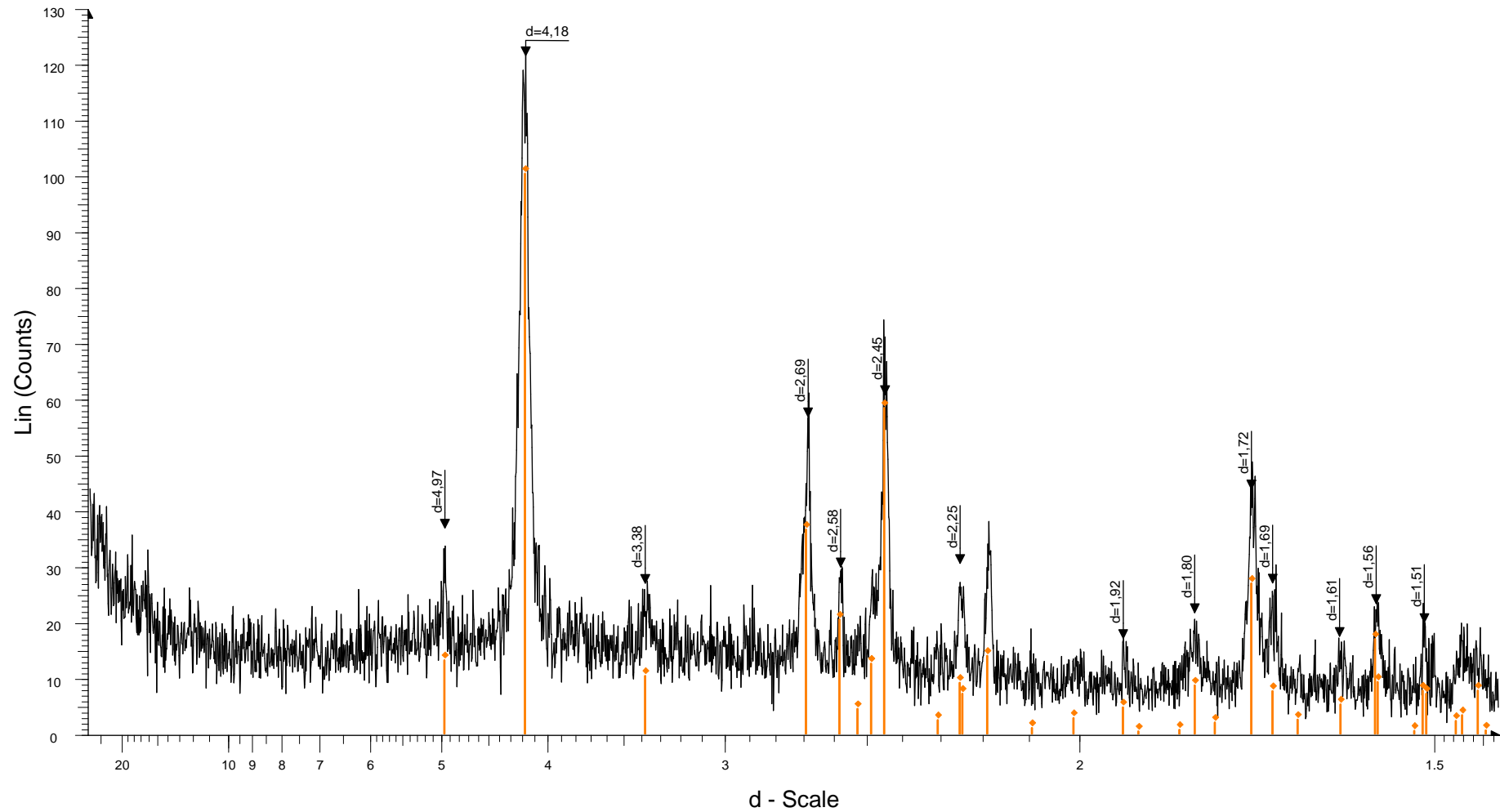


## Annexe D : Diffractométrie de rayons X sur la goéthite substituée nickel (9,07 %)



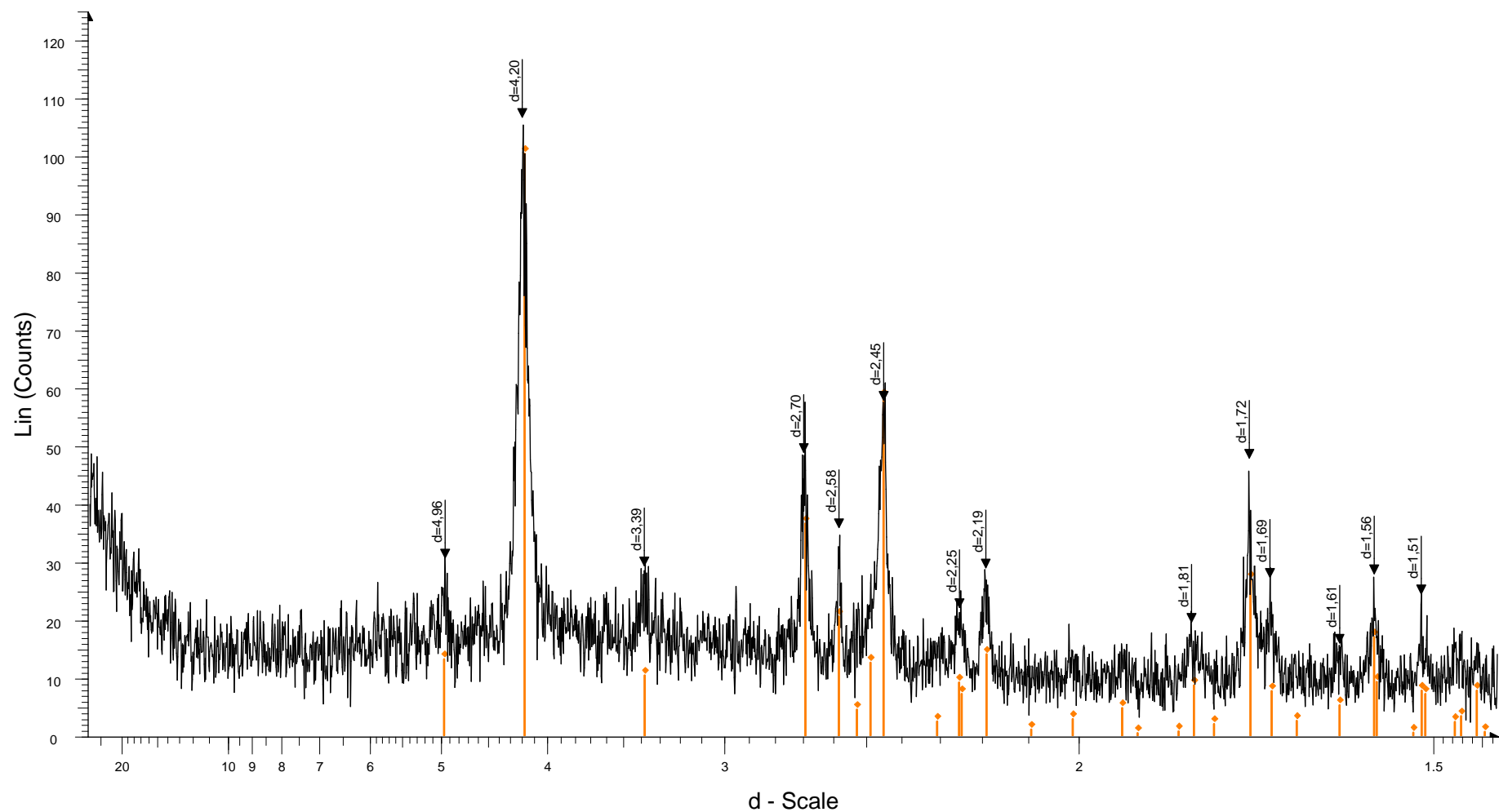
Goethite substituée Ni - File: RX0143.raw - Type: 2Th/Th locked - Start: 3.000 ° - End: 65.000 ° - Ste p: 0.020 ° - Step time: 1. s - Temp.: 25 °C (Room) - Time Started: 15 s - 2-Theta: 3.00 ° - Theta: 1.50 ° - Chi: 0.00 ° - Phi: 0  
Operations: Import  
01-081-0463 (C) - Goethite, syn - FeO(OH) - Y: 60.47 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Orthorhombic - a 4.61580 - b 9.95450 - c 3.02330 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Primitive - Pbnm (62) - 4 - 138.915 - I/c P

# Annexe E : Diffractométrie de rayons X sur la goethite substituée aluminium



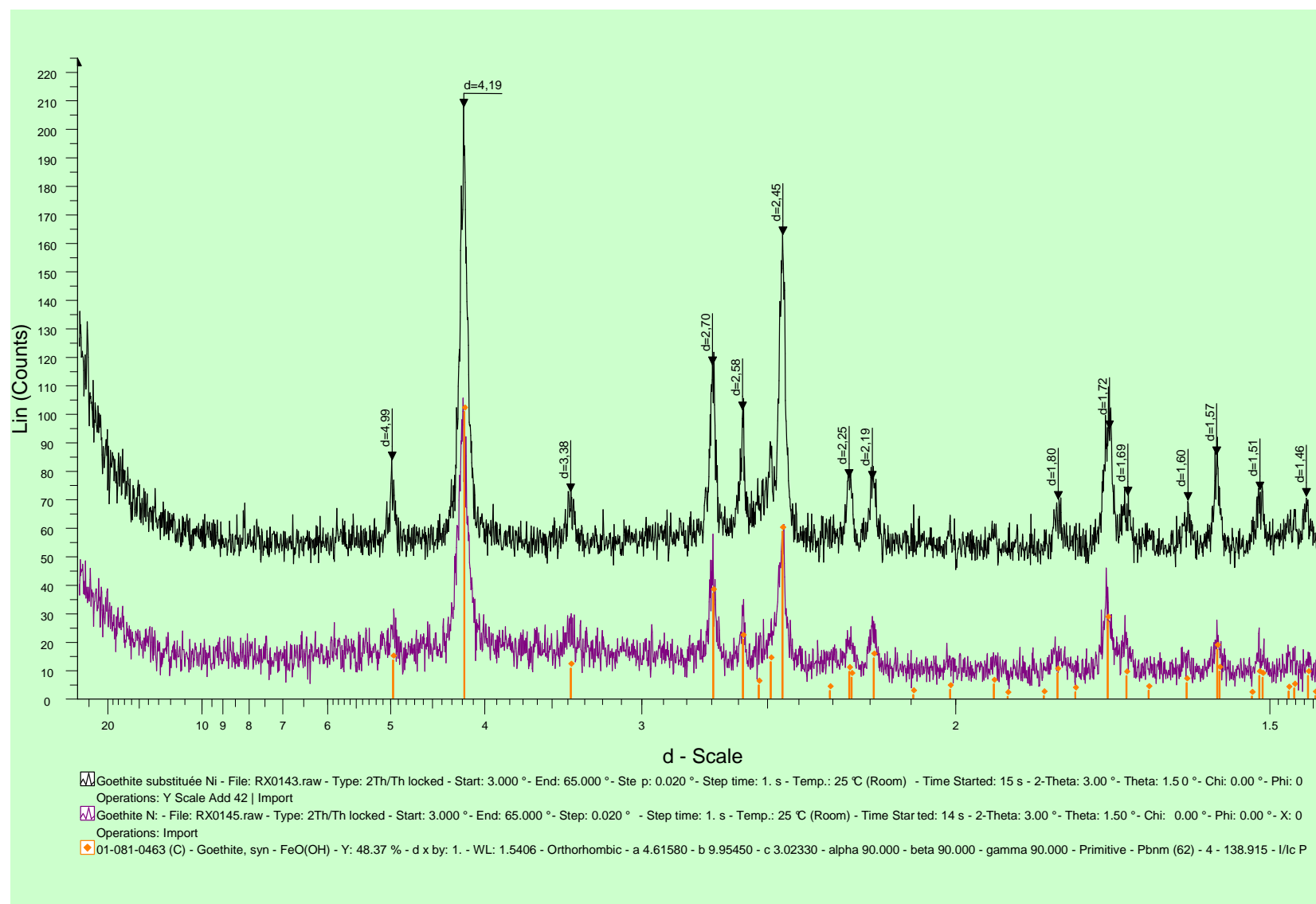
Goethite substituée Al - File: RX0146.raw - Type: 2Th/Th locked - Start: 3.000 ° - End: 65.000 ° - Ste p: 0.020 ° - Step time: 1. s - Temp.: 25 °C (Room) - Time Started: 14 s - 2-Theta: 3.00 ° - Theta: 1.50 ° - Chi: 0.00 ° - Phi: 0  
Operations: Import  
01-081-0463 (C) - Goethite, syn - FeO(OH) - Y: 82.63 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Orthorhombic - a 4.61580 - b 9.95450 - c 3.02330 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Primitive - Pbnm (62) - 4 - 138.915 - I/c P

## Annexe F : Diffractométrie de rayons X sur la goéthite substituée nickel (1,3 %)



Goethite substituée Ni - File: RX0145.raw - Type: 2Th/Th locked - Start: 3.000 ° - End: 65.000 ° - Ste p: 0.020 ° - Step time: 1. s - Temp.: 25 °C (Room) - Time Started: 14 s - 2-Theta: 3.00 ° - Theta: 1.50 ° - Chi: 0.00 ° - Phi: 0  
Operations: Import  
01-081-0463 (C) - Goethite, syn - FeO(OH) - Y: 95.41 % - d x by: 1. - WL: 1.5406 - Orthorhombic - a 4.61580 - b 9.95450 - c 3.02330 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Primitive - Pbnm (62) - 4 - 138.915 - I/c P

## Annexe G : Comparaison des deux goethites substituées en nickel ( en noir, goethite substituée à 9,07 % et en violet à 1,3%)





# Bibliographie



- Abhilash PC, Yunus M (2011) Can we use biomass produced from phytoremediation? *Biomass & Bioenergy* **35**: 1371-1372
- Adamo P, Violante P (2000) Weathering of rocks and neogenesis of minerals associated with lichen activity. *Applied Clay Science* **16**: 229-256
- Adriano DC (1986) Trace elements in the terrestrial environment. *In Trace elements in the environment New York, Springer Verlag, pp 106-155*
- Agricola G (1546) De Natura Fossilium. *Translated by Mark Chance Bandy and Jean A Bandy New York: Mineralogical Society of America, 1955*
- Albrecht-Gary AM, Blanc S, Rochel N, Ocaktan AZ, Abdallah MA (1994) Bacterial iron transport - coordination properties of pyoverdine Paa, a peptidic siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Inorganic Chemistry* **33**: 6391-6402
- Alimova A, Katz A, Steiner N, Rudolph E, Wei H, Steiner JC, Gottlieb P (2009) Bacteria-clay interaction: structural changes in smectite induced during biofilm formation. *Clays and Clay Minerals* **57**: 205-212
- Alkorta I, Garbisu C (2001) Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology* **79**: 273-276
- Alkorta I, Hernandez-Allica J, Becerril JM, Amezaga I, Albizu I, Garbisu C (2004) Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **3**: 71-90
- Alloway BJ (1995) Heavy metals in soils. *Edited by Alloway, B J (Dir) London: Blackie Academic and Professional, 368 p*
- Ams DA, Maurice PA, Hersman LE, Forsythe JH (2002) Siderophore production by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium in the presence of kaolinite. *Chemical Geology* **188**: 161-170
- Anderson PR, Christensen TH (1988) Distribution coefficients of Cd, Co, Ni, and Zn in soils. *Journal of Soil Science* **39**: 15-22
- Anderson TA, Guthrie EA, Walton BT (1993) Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Science & Technology* **27**: 2630-2636



Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *Fems Microbiology Reviews* **27**: 215-237

Aouad G (2006) Influence de *Pseudomonas aeruginosa* sur la dégradation des silicates : incidence sur la stabilité de matrices de confinement de déchets et d'un machefer industriel. Ecole Doctorale Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Strasbourg.

Apak R (2002) Adsorption of heavy metal ions on soil surfaces and similar substances. In A Hubbard (Eds) *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, Dekker, New York, p 385

Arkhipova TN, Prinsen E, Veselov SU, Martinenko EV, Melentiev AI, Kudoyarova GR (2007) Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil* **292**: 305-315

Arnold RG, Dichristina TJ, Hoffmann MR (1988) Reductive dissolution of Fe(III) oxides by *Pseudomonas* sp 200. *Biotechnology and Bioengineering* **32**: 1081-1096

Arsenault JL, Pouleur S, Messier R, Guay R (1995) WinRHIZO, a root-measuring system with a unique overlap correction method. *Hortscience* **30**: 906

ASPA (2012) <http://www.atmo-alsace.net/site/Accueil-2.html>.

Bailey SW (1980) Summary of recommendations of Aipea nomenclature committee on clay-minerals. *American Mineralogist* **65**: 1-7

Bais HP, Fall R, Vivanco JM (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology* **134**: 307-319

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* **57**: 233-266

Baker AJM, Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery* **1**: 81-126

Baker AJM, Brooks RR, Reeves RD (1988) Growing for gold and copper and zinc. *New Scientist* **10**

- Banin E, Vasil ML, Greenberg EP (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 11076-11081
- Barber SA (1995) Soil nutrient bioavailability. A mechanistic approach. *John Wiley and Sons, New York, 414 pp*
- Barkay T, Schaefer J (2001) Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 318-323
- Barker WW, Welch SA, Banfield JF (1997) Biogeochemical weathering of silicate minerals. *Review of Mineralogy* **35**: 391-428
- Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, Gabbrielli R, Galardi F, Gonnelli C, Mengoni A (2007) Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*. *Microbial Ecology* **53**: 306-316
- BASOL (2012) <http://basol.ecologie.gouv.fr/>.
- Benner SG, Blowes DW, Gould WD, Herbert RB, Ptacek CJ (1999) Geochemistry of a permeable reactive barrier for metals and acid mine drainage. *Environmental Science & Technology* **33**: 2793-2799
- Berti WR, Cunningham SD (2000) Phytostabilization of metals. In *Phytoremediation of Toxic Metals Using Plants to Clean up the Environment*, ed I Raskin, BD Ensley, pp 71-88 New York: Wiley
- Bertin C, Yang XH, Weston LA (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* **256**: 67-83
- Bienfait HF (1985) Regulated redox processes at the plasmalemma of plant-root cells and their function in iron uptake. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **17**: 73-83
- Bisson M, Diderich R, Houeix N, Hulot C, Lacroix G, Lefevre JP, Leveque S, Magaud H, Morin A, Pepin G, Pichard A (2011) Cadmium et ses dérivés. *Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - INERIS*
- Bisson M, Houeix N, Gay G, Jolibois B, Lacroix G, Lefevre JP, Magaud H, Morin A, Tissot S (2006) Nickel et ses dérivés. *Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - INERIS*

Black H (1995) Absorbing possibilities: Phytoremediation. *Environmental Health Perspectives* **103**: 1106-1108

Blanchard C (2000) Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. Thèse : Ecole Doctorale de Chimie de Lyon.

Blaylock MJ, Salt DE, Dushenkov S, Zakharova O, Gussman C, Kapulnik Y, Ensley BD, Raskin I (1997) Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environmental Science & Technology* **31**: 860-865

Bloemberg GV, Wijnjes AHM, Lamers GEM, Stuurman N, Lugtenberg BJJ (2000) Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: New perspectives for studying microbial communities. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 1170-1176

Bond PL, Druschel GK, Banfield JF (2000) Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4962

Bonneau M, Souchier B (1994) Pédologie. 2. Constituants et propriétés du sol. *Deuxième édition Paris : Masson, 479 p*

Boopathy R (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* **74**: 63-67

Borkowska-Burnecka J (2000) Microwave assisted extraction for trace element analysis of plant materials by ICP-AES. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **368**: 633-637

Bosecker K (1997) Bioleaching: Metal solubilization by microorganisms. *Fems Microbiology Reviews* **20**: 591-604

Boukhalfa H, Crumbliss AL (2002) Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. *Biomaterials* **15**: 325-339

Bousserrhine N, Gasser UG, Jeanroy E, Berthelin J (1999) Bacterial and chemical reductive dissolution of Mn-, Co-, Cr-, and Al-substituted goethites. *Geomicrobiology Journal* **16**: 245-258

Bradl HB (2004) Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. *Journal of Colloid and Interface Science* **277**: 1-18

- Branas J (1984) Histoire et fonction du cuivre dans la viticulture de qualité. *Le Progrès Agricole et Viticole* **22**: 521-523
- Brandel J, Humbert N, Elhabiri M, Schalk IJ, Mislin GLA, Albrecht-Gary AM (2012) Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: Physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton T* **41**: 2820-2834
- Braud A, Geoffroy V, Hoegy F, Mislin GLA, Schalk IJ (2010) Presence of the siderophores pyoverdine and pyochelin in the extracellular medium reduces toxic metal accumulation in *Pseudomonas aeruginosa* and increases bacterial metal tolerance. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 419-425
- Braud A, Hannauer M, Mislin GLA, Schalk IJ (2009a) The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *Journal of Bacteriology* **191**: 3517-3525
- Braud A, Hoegy F, Jezequel K, Lebeau T, Schalk IJ (2009b) New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. *Environmental Microbiology* **11**: 1079-1091
- Braud A, Jezequel K, Bazot S, Lebeau T (2009c) Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere* **74**: 280-286
- Braun V, Killmann H (1999) Bacterial solutions to the iron supply problem. *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 104-109
- Briat JF, Lebrun M (1999) Plant responses to metal toxicity. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, série III Sciences de la Vie* **322**: 43-54
- Briat JF, Lobreaux S (1997) Iron transport and storage in plants. *Trends in Plant Science* **2**: 187-193
- Briat JF, Vert G (2004) Acquisition et gestion du fer par les plantes. *Cahiers Agricultures* **13**: 183-201
- Bridgwater AV, Meier D, Radlein D (1999) An overview of fast pyrolysis of biomass. *Organic Geochemistry* **30**: 1479-1493
- Brigatti MF, Galan E, Theng BKG (2006) Chapter 2: Structures and mineralogy of clay minerals. *Developments in Clay Science* **1**

- Briskot G, Taraz K, Budzikiewicz H (1989) Bacterial constituents pyoverdinin-type siderophores from *Pseudomonas aeruginosa*. *Liebigs Annalen der Chemie* **37**: 375-384
- Brooks RR, Morrison RS, Reeves RD, Dudley TR, Akman Y (1979) Hyperaccumulation of nickel by *Alyssum linneaeus* (Cruciferae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **203**
- Brown SL, Chaney RL, Angle JS, Baker AJM (1994) Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc-contaminated and cadmium-contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* **23**: 1151-1157
- Bruemmer GW, Gertj J, Tiller KG (1988) Reaction kinetics of the adsorption and desorption of nickel, zinc and cadmium by goethite. I. Adsorption and diffusion of metals. *Journal of Soil Science* **39**: 37-52
- Bruins MR, Kapil S, Oehme FW (2000) Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **45**: 198-207
- Bucheli-Witschel M, Egli T (2001) Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 69-106
- Budzikiewicz H (1993) Secondary metabolites from fluorescent Pseudomonads. *FEMS Microbiology Reviews* **104**: 209-228
- Budzikiewicz H (1997) Siderophores of fluorescent Pseudomonads. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **52**: 713-720
- Budzikiewicz H, Kilz S, Taraz K, Meyer JM (1997) Identical pyoverdines from *Pseudomonas fluorescens* 9AW and from *Pseudomonas putida* 9BW. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **52**: 721-728
- Burd GI, Dixon DG, Glick BR (2000) Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. *Canadian Journal of Microbiology* **46**: 237-245
- Calmano W, Hong J, Forstner U (1993) Binding and mobilization of heavy-metals in contaminated sediments affected by pH and redox potential. *Water Science and Technology* **28**: 223-235
- Carrillo-Castaneda G, Munoz JJ, Peralta-Videa JR, Gomez E, Gardea-Torresdey JL (2003) Plant growth-promoting bacteria promote copper and iron translocation from root to shoot in alfalfa seedlings. *Journal of Plant Nutrition* **26**: 1801-1814

- Carson KC, Meyer JM, Dilworth MJ (2000) Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology & Biochemistry* **32**: 11-21
- Cataldo DA, Mcfadden KM, Garland TR, Wildung RE (1988) Organic-constituents and complexation of nickel(Ii), iron(Iii), cadmium(Ii), and plutonium(Iv) in soybean xylem exudates. *Plant Physiology* **86**: 734-739
- Chaignon V (2001) Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse : Ecole Doctorale, Sciences de l'Environnement : Système Terre, Université d'Aix-Marseille.
- Chaignon V, Hinsinger P (2003) A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* **32**: 824-833
- Chakraborty U, Chakraborty B, Basnet M (2006) Plant growth promotion and induction of resistance in *Camellia sinensis* by *Bacillus megaterium*. *Journal of Basic Microbiology* **46**: 186-195
- Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJM (1997) Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 279-284
- Chardot V, Echevarria G, Gury M, Massoura S, Morel JL (2007) Nickel bioavailability in an ultramafic toposequence in the Vosges Mountains (France). *Plant and Soil* **293**: 7-21
- Charlatchka R, Cambier P (2000) Influence of reducing conditions on solubility of trace metals in contaminated soils. *Water Air and Soil Pollution* **118**: 143-167
- Chaudhry Q, Schröder P, Werck-Reichhart D, Grajek W, Marecik R (2002) Prospects and limitations of phytoremediation for the removal of persistent pesticides in the environment. *Environmental Science & Technology* **9**: 4-17
- Chen Y, Jurkevitch E, Barness E, Hadar Y (1994) Stability-constants of pseudobactin complexes with transition-metals. *Soil Science Society of America Journal* **58**: 390-396
- Chen YX, Lin Q, Luo YM, He YF, Zhen SJ, Yu YL, Tian GM, Wong MH (2003) The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere* **50**: 807-811
- Cheng SP (2003) Effects of heavy metals on plants and resistance mechanisms. *Environmental Science and Pollution Research* **10**: 256-264

- Cherian S, Oliveira MM (2005) Transgenic plants in phytoremediation: Recent advances and new possibilities. *Environmental Science & Technology* **39**: 9377-9390
- Chiarini L, Bevivino A, Dalmastrì C, Nacamulli C, Tabacchioni S (1998) Influence of plant development, cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. *Applied Soil Ecology* **8**: 11-18
- Childers SE, Ciufo S, Lovley DR (2002) *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature* **416**: 767-769
- Choudhry GG (1984) Humic substances: sorptive interactions with environmental chemicals. *In Humic substances: structural, photophysical, photochemical and free radical aspects and interactions with environmental chemicals* New York: Gordon and Breach Science Publishers Inc: 95-134
- Chuan MC, Shu GY, Liu JC (1996) Solubility of heavy metals in a contaminated soil: effects of redox potential and pH. *Water Air and Soil Pollution* **90**: 543-556
- Chung H, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, Sa T (2005) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 1970-1974
- Ciffroy P, Nia Y, Garnier JM (2011) Probabilistic multicompartimental model for interpreting DGT kinetics in sediments. *Environmental Science & Technology* **45**: 9558-9565
- Clark RB, Zeto SK (1996) Growth and root colonization of mycorrhizal maize grown on acid and alkaline soil. *Soil Biology and Biochemistry* **28**: 1505-1511
- Clemens S (2001) Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* **212**: 475-486
- Clemens S, Palmgren MG, Kramer U (2002) A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science* **7**: 309-315
- Clement E, Mesini PJ, Pattus F, Schalk IJ (2004) The binding mechanism of pyoverdine with the outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on its iron-loaded status. *Biochemistry* **43**: 7954-7965
- Cline GR, Reid CPP, Powell PE, Szaniszló PJ (1984) Effects of a hydroxamate siderophore on iron-absorption by sunflower and sorghum. *Plant Physiology* **76**: 36-39

- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 159-182
- Cooksey DA (1994) Molecular Mechanisms of Copper Resistance and Accumulation in Bacteria. *Fems Microbiology Reviews* **14**: 381-386
- Cornu JY, Staunton S, Hinsinger P (2007) Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant and Soil* **292**: 63-77
- Corticeiro SC, Lima AIG, Figueira EMDAP (2006) The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* under Cd exposure. *Enzyme and Microbial Technology* **40**: 132-137
- Cox CD (1986) Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infection and Immunity* **52**: 263-270
- Cox CD, Graham R (1979) Isolation of an iron-binding compound from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **137**: 357-364
- Cox CD, Rinehart KL, Moore ML, Cook JC (1981) Pyochelin - Novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America-Biological Sciences* **78**: 4256-4260
- Cudennec Y, Lecerf A (2003) Study of the formation processes of iron oxy-hydroxides; hypotheses of topotactic transformations. *Comptes Rendus de Chimie* **6**: 437-444
- Cudennec Y, Lecerf A (2005) Topotactic transformations of goethite and lepidocrocite into hematite and maghemite. *Solid State Sciences* **7**: 520-529
- Cuiv PO, Clarke P, Lynch D, O'Connell M (2004) Identification of *rhtX* and *fptX*, novel genes encoding proteins that show homology and function in the utilization of the siderophores rhizobactin 1021 by *Sinorhizobium meliloti* and pyochelin by *Pseudomonas aeruginosa*, respectively. *Journal of Bacteriology* **186**: 2996-3005
- Cunningham CJ, Philip JC (2000) Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination and Reclamation* **8**: 261-269
- Cunningham SD, Berti WR, Huang JWW (1995) Phytoremediation of Contaminated Soils. *Trends in Biotechnology* **13**: 393-397



- Cunningham SD, Ow DW (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* **110**: 715-719
- Curl EA, Truelove B (1986) The rhizosphere. *Springer-Verlag*, 288 pp
- Danhorn T, Fuqua C (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology* **61**: 401-422
- Davis JA (1984) Complexation of trace-metals by adsorbed natural organic matter. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **48**: 679-691
- Davison W, Zhang H (1994) In-situ speciation measurements of trace components in natural-waters using thin-film gels. *Nature* **367**: 546-548
- de Souza MP, Huang CPA, Chee N, Terry N (1999) Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants. *Planta* **209**: 259-263
- de Weert S, Vermeiren H, Mulders IHM, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R, Lugtenberg BJJ (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**: 1173-1180
- del Olmo A, Caramelo C, SanJose C (2003) Fluorescent complex of pyoverdins with aluminum. *Journal of Inorganic Biochemistry* **97**: 384-387
- Delas J (1963) La toxicité du cuivre accumulé dans les sols. *Agrochimica* **7**: 258-288
- Demange P, Bateman A, Mertz C, Dell A, Piemont Y, Abdallah MA (1990) Bacterial siderophores - Structures of pyoverdins Pt, siderophores of *Pseudomonas tolaasii* Ncpcb-2192, and pyoverdins Pf, siderophores of *Pseudomonas fluorescens* Ccm-2798 - Identification of an unusual natural amino-acid. *Biochemistry* **29**: 11041-11051
- Deneux-Mustin S, Roussel-Debet S, Mustin C, Henner P, Munier-Lamy C, Colle C, Berthelin J, Garnier-Laplace J, Leyval C (2003) Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol. *TEC & DOC, Paris*
- Desroches S, Biron F, Berthon G (1999) Aluminum speciation studies in biological fluids Part 5. A quantitative investigation of Al(III) complex equilibria with desferrioxamine, 2,3-dihydroxybenzoic acid, Tiron, CP20 (L1), and CP94 under physiological conditions, and computer-aided assessment of the aluminum-mobilizing capacities of these ligands in vivo. *Journal of Inorganic Biochemistry* **75**: 27-35

- di Toppi LS, Gabbriellini R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* **41**: 105-130
- Dimkpa CO, Merten D, Svatos A, Buchel G, Kothe E (2009a) Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 154-162
- Dimkpa CO, Merten D, Svatos A, Buchel G, Kothe E (2009b) Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 1687-1696
- Dimkpa CO, Svatos A, Dabrowska P, Schmidt A, Boland W, Kothe E (2008) Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere* **74**: 19-25
- do Nascimento CWA, Amarasiriwardena D, Xing BS (2006) Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environmental Pollution* **140**: 114-123
- Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences* **22**: 107-149
- Doelman P, Jansen E, Michels M, Vantil M (1994) Effects of heavy-metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of Soils* **17**: 177-184
- Dong H (2010) Mineral-microbe interactions: a review. *Frontiers of Earth Science in China* **4**: 127-147
- Dougherty MJ, Downs DM (2006) A connection between iron-sulfur cluster metabolism and the biosynthesis of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine pyrophosphate in *Salmonella enterica*. *Microbiology-Sgm* **152**: 2345-2353
- DRE (2004) Direction Régionale de l'Environnement : Profil environnemental de la région Alsace - Partie 1 - Diagnostic. <http://www.walsace.developpement-durable.gouv.fr/profil-environnemental-r182.html>
- Duckworth OW, Bargar JR, Jarzecki AA, Oyerinde O, Spiro TG, Sposito G (2009a) The exceptionally stable cobalt(III)-desferrioxamine B complex. *Marine Chemistry* **113**: 114-122

- Duckworth OW, Bargar JR, Sposito G (2009b) Coupled biogeochemical cycling of iron and manganese as mediated by microbial siderophores. *Biometals* **22**: 605-613
- Duckworth OW, Sposito G (2005) Siderophore-manganese(III) interactions. I. Air-oxidation of manganese(II) promoted by desferrioxamine B. *Environmental Science & Technology* **39**: 6037-6044
- Duhoux E, Franche C (2003) Actinorhizal nodules of Casuarina. *Biofutur*: 45
- Dushenkov V, Kumar PBAN, Motto H, Raskin I (1995) Rhizofiltration - The use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science & Technology* **29**: 1239-1245
- Dussart L, Dupont JP, Zimmerlin I, Lacroix M, Saiter JM, Junter GA, Jouenne T (2003) Occurrence of sessile *Pseudomonas oryzihabitans* from a karstified chalk aquifer. *Water Research* **37**: 1593-1600
- Eraso AJ, Albesa I (1998) Elevation of alanine amino transferase and aspartate amino transferase produced by pyoverdine, a photolabile pigment of *Pseudomonas fluorescens*. *Natural Toxins* **6**: 61-65
- Eslinger E, Peaver D (1988) Clay minerals for petroleum geologists and engineers. *Short course No 22 (SEPM, Society of Economic Paleontologists and Mineralogists, Tulsa)*
- Espinosa-Urgel M, Kolter R, Ramos JL (2002) Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight. *Microbiology-Sgm* **148**: 1-3
- Evans KM, Gatehouse JA, Lindsay WP, Shi J, Tommey AM, Robinson NJ (1992) Expression of the pea metallothionein-like gene Psmta in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace-metal ion accumulation - Implications for Psmta function. *Plant Molecular Biology* **20**: 1019-1028
- Faraldo-Gomez JD, Sansom MSP (2003) Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**: 105-116
- Fein JB, Boily JF, Guclu K, Kaulbach E (1999) Experimental study of humic acid adsorption onto bacteria and Al-oxide mineral surfaces. *Chemical Geology* **162**: 33-45
- Filloux A, Vallet I (2003) Biofilm: positioning and organisation of bacterial communities. *M S-Medecine Sciences* **19**: 77-83

- Flemming HC (1995) Sorption sites in biofilms. *Water Science and Technology* **32**: 27-33.
- Flemming HC, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 623-633
- Flores-Velez LM (1996) Essai de spéciation des métaux dans les sols : cas du Cu dans les vignobles. Thèse : Université de Paris XII, Val de Marne.
- Folschweiller N, Gallay J, Vincent M, Abdallah MA, Pattus F, Schalk IJ (2002) The interaction between pyoverdine and its outer membrane receptor in *Pseudomonas aeruginosa* leads to different conformers: A time-resolved fluorescence study. *Biochemistry* **41**: 14591-14601
- Forstner U (1995) Land contamination by heavy metals: global scope and magnitude of problems. In *Metal speciation and contamination of soils*, Allen, H E (eds), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp 1-33
- Foy CD, Chaney RL, White MC (1978) Physiology of metal toxicity in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **29**: 511-566
- Francis AJ, Dodge CJ (1990) Anaerobic microbial remobilization of toxic metals coprecipitated with iron-oxide. *Environmental Science & Technology* **24**: 373-378
- Frey B, Zierold K, Brunner I (2000) Extracellular complexation of Cd in the Hartig net and cytosolic Zn sequestration in the fungal mantle of *Picea abies* Hebeloma crustuliniforme ectomycorrhizas. *Plant, Cell & Environment* **23**: 1257-1265
- Gadd GM (2007) Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycol Res* **111**: 3-49
- Gadd GM (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology-Sgm* **156**: 609-643
- Gaille C, Kast P, Haas D (2002) Salicylate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* - Purification and characterization of PchB, a novel bifunctional enzyme displaying isochorismate pyruvate-lyase and chorismate mutase activities. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 21768-21775
- Gaille C, Reimann C, Haas D (2003) Isochorismate synthase (PchA), the first and rate-limiting enzyme in salicylate biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 16893-16898

- Gallego SM, Benavides MP, Tomaro ML (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: Evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* **121**: 151-159
- Galli U, Schuepp H, Brunold C (1995) Thiols of Cu-treated maize plants inoculated with the Arbuscular-Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices*. *Physiologia Plantarum* **94**: 247-253
- Ganesan V (2008) Rhizoremediation of cadmium soil using a cadmium-resistant plant growth-promoting rhizopseudomonad. *Current Microbiology* **56**: 403-407
- Garbeva P, van Veen JA, van Elsas JD (2004) Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *Fems Microbiology Ecology* **47**: 51-64
- Ghiorse WC (1984) Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. *Annual Review of Microbiology* **38**: 515-550
- Gisbert C, Ros R, De Haro A, Walker DJ, Bernal MP, Serrano R, Navarro-Avino J (2003) A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **303**: 440-445
- Gleba D, Borisjuk NV, Borisjuk LG, Kneer R, Poulev A, Sarzhinskaya M, Dushenkov S, Logendra S, Gleba YY, Raskin I (1999) Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 5973-5977
- Glick BR (1995) The enhancement of plant-growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 109-117
- Glick BR (2003) Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances* **21**: 383-393
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng ZY, Duan J, McConkey B (2007) Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**: 227-242
- Gobran GR, Clegg S, Courchesne F (1998) Rhizospheric processes influencing the biogeochemistry of forest ecosystems. *Biogeochemistry* **42**: 107-120
- Godbold DL, Horst WJ, Collins JC, Thurman DA, Marschner H (1984) Accumulation of zinc and organic-acids in roots of zinc tolerant and non-tolerant ecotypes of *Deschampsia caespitosa*. *Journal of Plant Physiology* **116**: 59-69

- Gonzalez H, Jensen TE (1998) Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* **93**: 179-185
- Gorbushina AA (2007) Life on the rocks. *Environmental Microbiology* **9**: 1613-1631
- Gray EJ, Smith DL (2005) Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry* **37**: 395-412
- Gray TRG, Williams ST (1971) Microbial productivity in soil. In *Microbes and Biological productivity*, Eds D E Hughes and A H Rose, Cambridge, University Press, London, p 225
- Greenwald J, Hoegy F, Nader M, Journet L, Mislin GLA, Graumann PL, Schalk IJ (2007) Real time fluorescent resonance energy transfer visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa* - A role for ferrous iron. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 2987-2995
- Greger M (2004) Metal availability and bioconcentration on plants. In Prasad, M N V & Hagemayer, J (Eds) *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*, Second Edition Springer-Verlag, Berlin, pp 231-251
- Griffiths WJH, Kelly AL, Cox TM (1999) Inherited disorders of iron storage and transport. *Molecular Medicine Today* **5**: 431-438
- Grim RE, Güven H (1978) Bentonites - geology, mineralogy, properties and uses. *Developments in Sedimentology*, 24 Elsevier
- Guggenheim S, Martin RT (1995) Definition of clay and clay mineral - Joint report of the Aipea and Cms Nomenclature Committees. *Clay Minerals* **30**: 257-259
- Guo Y, George E, Marschner H (1996) Contribution of an arbuscular mycorrhizal fungus to the uptake of cadmium and nickel in bean and maize plants. *Plant and Soil* **184**: 195-205
- Gutierrez-Manero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR, Talon M (2001) The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* **111**: 206-211
- Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* **245**: 83-93

- Haferburg G, Kothe E (2007) Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology* **47**: 453-467
- Hale VQ, Wallace A (1970) Effect of chelates on uptake of some heavy metal radionuclides from soil by bush beans. *Soil Science* **109**: 262-263
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1-11
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**: 95-108
- Hallmann J, QuadtHallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* **43**: 895-914
- Hameeda B, Reddy YHK, Rupela OP, Kumar GN, Reddy G (2006) Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna. *Current Microbiology* **53**: 298-302
- Hannauer M, Yeterian E, Martin LW, Lamont IL, Schalk IJ (2010) An efflux pump is involved in secretion of newly synthesized siderophore by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Letters* **584**: 4751-4755
- Hannauer M, Braud A, Hoegy F, Ronot P, Boos A, Schalk IJ (2012a) The PvdRT-OmpQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* **14**: 1696-1708
- Hannauer M, Schafer M, Hoegy F, Gizzi P, Wehrung P, Mislin GLA, Budzikiewicz H, Schalk IJ (2012b) Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain. *FEBS Letters* **586**: 96-101
- Hantke, K (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 172-177
- Hansel CM, Fendorf S, Sutton S, Newville M (2001) Characterization of Fe plaque and associated metals on the roots of mine-waste impacted aquatic plants. *Environmental Science & Technology* **35**: 3863-3868
- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* **16**: 463-471

- Harrison JJ, Turner RJ, Ceri H (2005) Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* **7**: 981-994
- Hartwig UA, Joseph CM, Phillips DA (1991) Flavonoids Released Naturally from Alfalfa Seeds Enhance Growth-Rate of Rhizobium-Meliloti. *Plant Physiology* **95**: 797-803
- He L-Y, Chen Z-J, Ren G-D, Zhang Y-F, Qian M, Sheng X-F (2009) Increased cadmium and lead uptake of a cadmium hyperaccumulator tomato by cadmium-resistant bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**: 1343-1348
- Heggo A, Angle JS, Chaney RL (1990) Effects of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on heavy-metal uptake by soybeans. *Soil Biology & Biochemistry* **22**: 865-869
- Heinrichs DE, Poole K (1993) Cloning and Sequence-Analysis of a Gene (Pchr) Encoding an Arac family activator of pyochelin and ferripyochelin receptor synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **175**: 5882-5889
- Heinrichs DE, Poole K (1996) PchR, a regulator of ferripyochelin receptor gene (fptA) expression in *Pseudomonas aeruginosa*, functions both as an activator and as a repressor. *Journal of Bacteriology* **178**: 2586-2592
- Heitzer A, Sayler GS (1993) Monitoring the efficacy of bioremediation. *Trends in Biotechnology* **11**: 334-343
- Hernandez ME, Newam, DK (2001) Extracellular electron transfer. *Cellular and Molecular Life Sciences* **58**: 1562-1571
- Hernandez ME, Kappler A, Newman DK (2004) Phenazines and other redox-active antibiotics promote microbial mineral reduction. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 921-928
- Hernlem BJ, Vane LM, Sayles GD (1996) Stability constants for complexes of the siderophore desferrioxamine B with selected heavy metal cations. *Inorganica Chimica Acta* **244**: 179-184
- Hersman L, Lloyd T, Sposito G (1995a) Siderophore-promoted dissolution of hematite. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **59**: 3327-3330
- Hersman L, Maurice P, Sposito G (1995b) Iron Acquisition from hematite by an aerobic *Pseudomonas* Sp. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **209**: 94-GEOC



- Hersman LE, Forsythe JH, Ticknor LO, Maurice PA (2001) Growth of *Pseudomonas mendocina* on Fe(III) (hydr)oxides. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4448-4453
- Hersman LE, Huang A, Maurice PA, Forsythe JE (2000) Siderophore production and iron reduction by *Pseudomonas mendocina* in response to iron deprivation. *Geomicrobiology Journal* **17**: 261-273
- Hider RC, Kong X (2010) Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports* **27**: 637-657
- Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrungen und Probleme auf Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arb Dtsch Landwirtsch Ges Berlin* **98**: 59-78
- Hinsinger P, Jaillard B, Dufey JE (1992) Rapid weathering of a trioctahedral mica by the roots of ryegrass. *Soil Science Society of America Journal* **56**: 977-982
- Hinsinger P, Plassard C, Tang CX, Jaillard B (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil* **248**: 43-59
- Hirsch RE, Lewis BD, Spalding EP, Sussman MR (1998) A role for the AKT1 potassium channel in plant nutrition. *Science* **280**: 918-921
- Hoegy FO, Celia H, Mislin GL, Vincent M, Gallay J, Schalk IJ (2005) Binding of iron-free siderophore, a common feature of siderophore outer membrane transporters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry* **280**: 20222-20230
- Hoo H, Hashidoko Y, Islam MT, Tahara S (2004) Requirement of a relatively high threshold level of Mg<sup>2+</sup> for cell growth of a rhizoplane bacterium, *Sphingomonas yanoikuyae* EC-S001. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5214-5221
- Huang B, Gong ZT (2005) Geochemical barriers and element retention in soils in different landscapes of the Tianshan Mountain area, Xinjiang, China. *Geoderma* **126**: 337-351
- Hutchins SR, Sewell GW, Kovacs DA, Smith GA (1991) Biodegradation of aromatic-hydrocarbons by aquifer microorganisms under denitrifying conditions. *Environmental Science & Technology* **25**: 68-76

- Hutchinson SL, Schwab AP, Banks MK (2003) Biodegradation of petroleum hydrocarbon in the rhizosphere. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants* (eds S C McCutcheon and J L Schnoor), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp 355-386
- Imbert M, Blondeau R (1998) On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. *Current Microbiology* **37**: 64-66
- Imperi F, Tiburzi F, Visca P (2009) Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 20440-20445
- Jaffre T, Brooks RR, Lee J, Reeves RD (1976) *Sebertia acuminata* - Hyper-accumulator of nickel from New-Caledonia. *Science* **193**: 579-580
- Jankong P, Visoottiviseth P (2008) Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on plants growing on arsenic contaminated soil. *Chemosphere* **72**: 1092-1097
- Jeanroy E, Rajot JL, Pillon P, Herbillon AJ (1991) Differential dissolution of hematite and goethite in dithionite and its implication on soil yellowing. *Geoderma* **50**: 79-94
- Jiang W, Saxena A, Song B, Ward BB, Beveridge TJ, Myneni SCB (2004) Elucidation of functional groups on gram-positive and gram-negative bacterial surfaces using infrared spectroscopy. *Langmuir* **20**: 11433-11442
- Johansson JF, Paul LR, Finlay RD (2004) Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *Fems Microbiology Ecology* **48**: 1-13
- Joner EJ, Leyval C (1997) Uptake of Cd-109 by roots and hyphae of a *Glomus mosseae* *Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytologist* **135**: 353-360
- Joner EJ, Leyval C (2001) Time-course of heavy metal uptake in maize and clover as affected by root density and different mycorrhizal inoculation regimes. *Biology and Fertility of Soils* **33**: 351-357
- Jones DL (1998) Organic acids in the rhizosphere - a critical review. *Plant and Soil* **205**: 25-44
- Jorgensen SE (1993) Removal of heavy metals from compost and soil by ecotechnological methods. *Ecological Engineering* **2**: 89-100

- Kabata-Pendias A (2004) Soil-plant transfer of trace elements - an environmental issue. *Geoderma* **122**: 143-149
- Kabata-Pendias A, Pendias H (2001) Trace elements in soils and plants. *3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington, D C, pp 403*
- Kalinowski BE, Liermann LJ, Brantley SL, Barnes A, Pantano CG (2000a) X-ray photoelectron evidence for bacteria-enhanced dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**: 1331-1343
- Kalinowski BE, Liermann LJ, Givens S, Brantley SL (2000b) Rates of bacteria-promoted solubilization of Fe from minerals: a review of problems and approaches. *Chemical Geology* **169**: 357-370
- Kamilova F, Lamers G, Lugtenberg B (2008) Biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 inhibits germination of *Fusarium oxysporum* spores in tomato root exudate as well as subsequent formation of new spores. *Environmental Microbiology* **10**: 2455-2461
- Kamnev AA, van der Lelie D (2000) Chemical and biological parameters as tools to evaluate and improve heavy metal phytoremediation. *Bioscience Reports* **20**: 239-258
- Khan AG (2005) Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **18**: 355-364
- Kim C, Lorenz WW, Hoopes JT, Dean JFD (2001) Oxidation of phenolate siderophores by the multicopper oxidase encoded by the *Escherichia coli* *yacK* gene. *Journal of Bacteriology* **183**: 4866-4875
- Kim KY, Jordan D, Krishnan HB (1998) Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Letters* **159**: 121-127
- Kirchman DL, Keil RG, Wheeler PA (1989) The effect of amino-acids on ammonium utilization and regeneration by heterotrophic bacteria in the Sub-Arctic Pacific. *Deep-Sea Res* **36**: 1763-1776
- Klausen M, Gjermansen M, Kreft JU, Tolker-Nielsen T (2006) Dynamics of development and dispersal in sessile microbial communities: examples from *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* model biofilms. *Fems Microbiology Letters* **261**: 1-11

- Knox AS, Gamedainger AP, Adriano DC, Kolka RK, Kaplan DI (1999) Sources and practices contributing to soil contamination. *In Bioremediation of Contaminated Soils, Am Soc Agron, Madison, WI, p 53*
- Koedam N, Wittouck E, Gaballa A, Gillis A, Hofte M, Cornelis P (1994) Detection and differentiation of microbial siderophores by isoelectric-focusing and chrome azurol-S overlay. *Biometals* **7**: 287-291
- Kohler A, Blaudez D, Chalot M, Martin F (2004) Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. *New Phytologist* **164**: 83-93
- Kos B, Lestan D (2004) Chelator induced phytoextraction and in situ soil washing of Cu. *Environmental Pollution* **132**: 333-339
- Kraemer SM (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquatic Sciences* **66**: 3-18
- Kramer U (2005) Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* **16**: 133-141
- Krämer U, Chardonens AN (2001) The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**
- Kramer U, CotterHowells JD, Charnock JM, Baker AJM, Smith JAC (1996) Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* **379**: 635-638
- Kramer U, Pickering IJ, Prince RC, Raskin I, Salt DE (2000) Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology* **122**: 1343-1353
- Kramer U, Smith RD, Wenzel WW, Raskin I, Salt DE (1997) The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy. *Plant Physiology* **115**: 1641-1650
- Krupa Z, Baszynski T (1995) Some aspects of heavy-metals toxicity towards photosynthetic apparatus - Direct and indirect effects on light and dark reactions. *Acta Physiologiae Plantarum* **17**: 177-190
- Kuffner M, Puschenreiter M, Wieshammer G, Gorfer M, Sessitsch A (2008) Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant and Soil* **304**: 35-44

- Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I (1995) Phytoextraction - The use of plants to remove heavy-metals from soils. *Environmental Science & Technology* **29**: 1232-1238
- Kupper H, Lombi E, Zhao FJ, Wieshammer G, McGrath SP (2001) Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *Journal of Experimental Botany* **52**: 2291-2300
- Lasat MM (2002) Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *Journal of Environmental Quality* **31**: 109-120
- Latour X, Philippot L, Corberand T, Lemanceau P (1999) The establishment of an introduced community of fluorescent Pseudomonads in the soil and in the rhizosphere is affected by the soil type. *Fems Microbiology Ecology* **30**: 163-170
- Lawton JH, Jones CG (1995) Linking species and ecosystems. Organisms as ecosystems engineers. In Jones CG and Lawton JH (Eds) *Linking Species and Ecosystems* Chapman and Hall Inc 9 pp
- Lear G, Harbottle MJ, Sills G, Knowles CJ, Semple KT, Thompson IP (2007) Impact of electrokinetic remediation on microbial communities within PCP contaminated soil. *Environmental Pollution* **146**: 139-146
- Lebeau T, Braud A, Jezequel K (2008) Performance of bioaugmentation-assisted phytoextraction applied to metal contaminated soils: A review. *Environmental Pollution* **153**: 497-522
- Leblanc JC, Verger P, Guérin T, Volatier JL (2004) Etude de l'alimentation totale française. Mycotoxines, minéraux et éléments traces. *Institut National Agronomique de Paris-Grignon, Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation, de la Pêche et des Affaires Rurales, Paris, p 68*
- LeDuc DL, Tarun AS, Montes-Bayon M, Meija J, Malit MF, Wu CP, AbdelSamie M, Chiang CY, Tagmount A, DeSouza M, Neuhierl B, Bock A, Caruso J, Terry N (2004) Overexpression of selenocysteine methyltransferase in Arabidopsis and Indian mustard increases selenium tolerance and accumulation. *Plant Physiology* **135**: 377-383
- Lee JU, Fein JB (2000) Experimental study of the effects of *Bacillus subtilis* on gibbsite dissolution rates under near-neutral pH and nutrient-poor conditions. *Chemical Geology* **166**: 193-202

- Lemanceau P, Alabouvette C (1991) Biological-control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and nonpathogenic *Fusarium*. *Crop Protection* **10**: 279-286
- Levitt J (1980) Responses of plants to environmental stresses. *In Volume II: Water, radiation, salt, and other stresses Academic Press, New York*
- Leyval C, Turnau K, Haselwandter K (1997) Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7**: 139-153
- Li WC, Ye ZH, Wong MH (2007) Effects of bacteria an enhanced metal uptake of the Cd/Zn-hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. *Journal of Experimental Botany* **58**: 4173-4182
- Liermann LJ, Guynn RL, Anbar A, Brantley SL (2005) Production of a molybdophore during metal-targeted dissolution of silicates by soil bacteria. *Chemical Geology* **220**: 285-302
- Liermann LJ, Kalinowski BE, Brantley SL, Ferry JG (2000) Role of bacterial siderophores in dissolution of hornblende. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**: 587-602
- Lindsay WL (1979) Chemical equilibria in soils. *John Wiley and Sons, New York, 423 pp*
- Liss SN, Bicho PA, Saddler JN (1997) Microbiology and biodegradation of resin acids in pulp mill effluents: a minireview. *Canadian Journal of Microbiology* **43**: 599-611
- Loneragan JF (1975) The availability and absorption of trace elements in soil-plant systems and their relation to movement and concentration of trace elements in plants. *In Trace elements in soil-plant-animal systems, Nicholas, D J D and Egan, A R, Eds, Academic Press, New York, p 109*
- Lucy M, Reed E, Glick BR (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **86**: 1-25
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology* **63**: 541-556
- Lugtenberg BJJ, Dekkers L, Bloemberg GV (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology* **39**: 461

- Luo CL, Shen ZG, Lou LQ, Li XD (2006) EDDS and EDTA-enhanced phytoextraction of metals from artificially contaminated soil and residual effects of chelant compounds. *Environmental Pollution* **144**: 862-871
- Lux A, Martinka M, Vaculik M, White PJ (2011) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany* **62**: 21-37
- Ma M, Lau PS, Jia YT, Tsang WK, Lam SKS, Tam NFY, Wong YS (2003) The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. *Plant Science* **164**: 51-60
- Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H (2011) Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* **29**: 248-258
- Ma Y, Rajkumar M, Freitas H (2009) Improvement of plant growth and nickel uptake by nickel resistant-plant-growth promoting bacteria. *Journal of Hazardous Materials* **166**: 1154-1161
- Machemer SD, Wildeman TR (1992) Adsorption compared with sulfide precipitation as metal removal processes from acid-mine drainage in a constructed wetland. *Journal of Contaminant Hydrology* **9**: 115-131
- Madhaiyan M, Poonguzhali S, Sa T (2007) Metal tolerating methylotrophic bacteria reduces nickel and cadmium toxicity and promotes plant growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Chemosphere* **69**: 220-228
- Manceau A, Marcus MA, Tamura N (2002) Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **49**: 341-428
- Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. *Second Edition, Academic Press*, 889 pp
- Marschner H, Romheld V (1994) Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil* **165**: 261-274
- Marschner H, Romheld V, Kissel M (1986) Different strategies in higher-plants in mobilization and uptake of iron. *Journal of Plant Nutrition* **9**: 695-713

- Mauck BS, Roberts JA (2007) Mineralogic control on abundance and diversity of surface-adherent microbial communities. *Geomicrobiology Journal* **24**: 167-177
- Maurice PA, Haack EA, Mishra B (2009) Siderophore sorption to clays. *Biometals* **22**: 649-658
- Maurice PA, Lee YJ, Hersman LE (2000) Dissolution of Al-substituted goethites by an aerobic *Pseudomonas mendocina* var. bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **64**: 1363-1374
- Maurice PA, Vierkorn MA, Hersman LE, Fulghum JE (2001a) Dissolution of well and poorly ordered kaolinites by an aerobic bacterium. *Chemical Geology* **180**: 81-97
- Maurice PA, Vierkorn MA, Hersman LE, Fulghum JE, Ferryman A (2001b) Enhancement of kaolinite dissolution by an aerobic *Pseudomonas mendocina* bacterium. *Geomicrobiology Journal* **18**: 21-35
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 565-572
- Mazzola M, Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM, Pierson LS (1992) Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent *Pseudomonads* in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 2616-2624
- McBride MB (1989) Reactions controlling heavy metal solubility in soils. *Advances in Soil Science* **10**: 1-56
- McCutcheon SC, Schnoor JL (2004) Overview of phytotransformation and control of wastes. in *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants* (eds S C McCutcheon and J L Schnoor), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA
- McGrath SP, Zhao FJ, Lombi E (2002) Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Advances in Agronomy*, **75**: 1-56
- McLaren RG, Crawford DV (1973) Studies on soil cooper. II. The specific adsorption of copper by soils. *Journal of Soil Science* **24**: 443-452
- McLaughlin MJ, Zarcinas BA, Stevens DP, Cook N (2000) Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **31**: 1661-1700
- Means JL, Kucak T, Crerar DA (1980) Relative degradation rates of NTA, EDTA and DTPA and environmental implications. *Environmental Pollution B* **1**: 45-60



- Meharg AA (1993) The Role of the plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. *Physiologia Plantarum* **88**: 191-198
- Mench M, Martin E (1991) Mobilization of cadmium and other metals from 2 soils by root exudates of *Zea mays* L, *Nicotiana tabacum*-L and *Nicotiana rustica* L. *Plant and Soil* **132**: 187-196
- Meyer JM (2000) Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Archives of Microbiology* **174**: 135-142
- Meyer JM, Abdallah MA (1978) Fluorescent Pigment of *Pseudomonas fluorescens* - Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology* **107**: 319-328
- Meyer JM, Gruffaz C, Raharinosy V, Bezverbnaya I, Schafer M, Budzikiewicz H (2008) Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method. *Biometals* **21**: 259-271
- Michel L, Bachelard A, Reimann C (2007) Ferripyochelin uptake genes are involved in pyochelin-mediated signalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology-Sgm* **153**: 1508-1518
- Michel L, Gonzalez N, Jagdeep S, Nguyen-Ngoc T, Reimann C (2005) PchR-box recognition by the AraC-type regulator PchR of *Pseudomonas aeruginosa* requires the siderophore pyochelin as an effector. *Molecular Microbiology* **58**: 495-509
- Miransari M (2011) Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnology Advances* **29**: 645-653
- Mishra D, Kar M (1974) Nickel in plant growth and metabolism. *The Botanical Review* **40**: 395-452
- Misra S, Gedamu L (1989) Heavy-metal tolerant transgenic *Brassica napus* L and *Nicotiana tabacum* L Plants. *Theoretical and Applied Genetics* **78**: 161-168
- Molas J (1997) Changes in morphological and anatomical structure of cabbage (*Brassica oleracea* L.) outer leaves and in ultrastructure of their chloroplasts caused by an in vitro excess of nickel. *Photosynthetica* **34**: 513-522

- Moll H, Johnsson A, Schafer M, Pedersen K, Budzikiewicz H, Bernhard G (2008) Curium(III) complexation with pyoverdins secreted by a groundwater strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Biometals* **21**: 219-228
- Morris CE, Monier JM (2003) The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **41**: 429-453
- Mulligan CN, Yong RN (2004) Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International* **30**: 587-601
- Negri MC, Gatliff EG, Quinn JJ, Hinchman RR (2003) Root development and rooting at depths. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants* (eds S C McCutcheon and J L Schnoor), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp 233-262
- Neilands JB (1972) Evolution of biological iron binding centers. *Structure and Bonding* **11**: 147-170
- Neilands JB (1981a) Iron absorption and transport in microorganisms. *Annual Review of Nutrition* **1**: 27-46
- Neilands JB (1981b) Microbial Iron Compounds. *Annual Review of Biochemistry* **50**: 715-731
- Newman DK (2001) Microbiology - How bacteria respire minerals. *Science* **292**: 1312-1313
- Newman LA, Reynolds CM (2004) Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology* **15**: 225-230
- Nies DH (1999) Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* **51**: 730-750
- Nowack B, Kari FG, Kruger HG (2001) The remobilization of metals from iron oxides and sediments by metal-EDTA complexes. *Water Air and Soil Pollution* **125**: 243-257
- Nowack B, Schulin R, Robinson BH (2006) Critical assessment of chelant-enhanced metal phytoextraction. *Environmental Science & Technology* **40**: 5225-5232
- Nwoko CO, Okeke PN, Agwu OO, Akpan IE (2007) Performance of *Phaseolus vulgaris* L. in a soil contaminated with spent-engine oil. *African Journal of Biotechnology* **6**: 1922-1925
- Ochsner UA, Vasil AI, Vasil ML (1995) Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin a expression - Purification and activity on iron-regulated promoters. *Journal of Bacteriology* **177**: 7194-7201

- Okamura MY, Isaacson RA, Feher G (1975) Primary acceptor in bacterial photosynthesis: obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centers of *Rhodospseudomonas spheroides*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 3491-3495
- Olson PE, Reardon KF, Pilon-Smits E (2003) Ecology of rhizosphere bioremediation. In *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants* (eds S C McCutcheon and J L Schnoor), John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA, pp 317-354
- O'Sullivan DJ, Ogara F (1992) Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp involved in suppression of plant-root pathogens. *Microbiological Reviews* **56**: 662-676
- Page V, Feller U (2005) Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. *Annals of Botany-London* **96**: 425-434
- Page WJ, Huyer M (1984) Derepression of the *Azotobacter vinelandii* siderophore system, using iron-containing minerals to limit iron repletion. *Journal of Bacteriology* **158**: 496-502
- Pahlsson AMB (1989) Toxicity of heavy-metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants - a literature-review. *Water Air and Soil Pollution* **47**: 287-319
- Pal SS (1998) Interactions of an acid tolerant strain of phosphate solubilizing bacteria with a few acid tolerant crops. *Plant and Soil* **198**: 169-177
- Pan AH, Yang MZ, Tie F, Li LG, Chen ZL, Ru B (1994) Expression of mouse metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic Tobacco plants. *Plant Molecular Biology* **24**: 341-351
- Panfili F, Manceau A, Sarret G, Laboudigue A, Bert V, Marcus MA (2005) Changes in Zn speciation in the rhizosphere of graminaceous plants induced by phytostabilization of a contaminated sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **69**: A626-A626
- Patten CL, Glick BR (1996) Bacterial biosynthesis on indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology* **42**: 207-220
- Paulsen IT, Sliwinski MK, Saier MH (1998) Microbial genome analyses: Global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *Journal of Molecular Biology* **277**: 573-592

- Pawlowski K, Bisseling T (1996) Rhizobial and actinorhizal symbioses: What are the shared features? *Plant Cell* **8**: 1899-1913
- Peer WA, Baxter IR, Richards EL, Freeman JL, Murphy AS (2005) Phytoremediation and hyperaccumulator plants. *Topics in Current Genetics* **14**: 299-340
- Perdrial JN, Warr LN, Perdrial N, Lett MC, Elsass F (2009) Interaction between smectite and bacteria: Implications for bentonite as backfill material in the disposal of nuclear waste. *Chemical Geology* **264**: 281-294
- Perrin DD (1979) Stability constants of metal-ion complexes. Part B. *International Union of Pure and Applied Chemistry, Data Series* **22**
- Pillay VK, Nowak J (1997) Inoculum density, temperature, and genotype effects on in vitro growth promotion and epiphytic and endophytic colonization of tomato (*Lycopersicon esculentum* L) seedlings inoculated with a pseudomonad bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* **43**: 354-361
- Pilon-Smits E (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 15-39
- Pilon-Smits E, Pilon M (2002) Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **21**: 439-456
- Ping LY, Boland W (2004) Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Sciences* **9**: 263-266
- Pokrovsky OS, Shirokova LS, Benezeth P, Schott J, Golubev SV (2009) Effect of organic ligands and heterotrophic bacteria on wollastonite dissolution kinetics. *American Journal of Science* **309**: 731-772
- Poole K, McKay GA (2003) Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Frontiers in Bioscience* **8**: D661-D686
- Posey JE, Gherardini FC (2000) Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. *Science* **288**: 1651-1653
- Posey JE, Hardham JM, Norris SJ, Gherardini FC (1999) Characterization of a manganese-dependent regulatory protein, TroR, from *Treponema pallidum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 10887-10892

- Powell PE, Cline GR, Reid CPP, Szaniszlo PJ (1980) Occurrence of hydroxamate siderophore iron chelators in soils. *Nature* **287**: 833-834
- Prasad MNV, Freitas H, Fraenzle S, Wuenschmann S, Markert B (2010) Knowledge explosion in phytotechnologies for environmental solutions. *Environmental Pollution* **158**: 18-23
- Prasad MNV, Freitas HMD (2003) Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of Biotechnology* **6**: 285-321
- Quadri LEN, Keating TA, Patel HM, Walsh CT (1999) Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* nonribosomal peptide siderophore pyochelin: In vitro reconstitution of aryl-4,2-bisthiazoline synthetase activity from PchD, PPchE, and PchF. *Biochemistry* **38**: 14941-14954
- Rajkumar M, Ae N, Prasad MNV, Freitas H (2010) Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends in Biotechnology* **28**: 142-149
- Ramey BE, Koutsoudis M, von Bodman SB, Fuqua C (2004) Biofilm formation in plant-microbe associations. *Current Opinion in Microbiology* **7**: 602-609
- Ramos I, Esteban E, Lucena JJ, Garate A (2002) Cadmium uptake and subcellular distribution in plants of *Lactuca* sp Cd-Mn interaction. *Plant Science* **162**: 761-767
- Raskin I, Smith RD, Salt DE (1997) Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* **8**: 221-226
- Rausser WE (1995) Phytochelatins and related peptides - Structure, biosynthesis, and function. *Plant Physiology* **109**: 1141-1149
- Ravel J, Cornelis P (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends in Microbiology* **11**: 195-200
- Read DJ, Perez-Moreno J (2003) Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems - a journey towards relevance? *New Phytologist* **157**: 475-492
- Recourt K, Schripsema J, Kijne JW, Vanbrussel AAN, Lugtenberg BJJ (1991) Inoculation of *Vicia sativa* Subsp *Nigra* Roots with *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Viciae* Results in release of Nod gene activating flavanones and chalcones. *Plant Molecular Biology* **16**: 841-852

- Reichard PU, Kretzschmar R, Kraemer SM (2007) Dissolution mechanisms of goethite in the presence of siderophores and organic acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **71**: 5635-5650
- Reimann C, Patel HM, Serino L, Barone M, Walsh CT, Haas D (2001) Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **183**: 813-820
- Reimann C, Serino L, Beyeler M, Haas D (1998) Dihydroaeruginosic acid synthetase and pyochelin synthetase, products of the pchEF genes, are induced by extracellular pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology-Uk* **144**: 3135-3148
- Remon E (2006) Tolérance et accumulation des métaux lourds par la végétation spontanée des friches métallurgiques : vers de nouvelles méthodes de bio-dépollution. Thèse : Ecole Doctorale, Sciences et Techniques : Biologie Végétale.
- Rengel Z (2004) Heavy metals as essential nutrients. In Prasad, M N V & Hagemayer, J (Eds) *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems, Second Edition Springer-Verlag, Berlin, pp 231-251*
- Ribet I, Ptacek CJ, Blowes DW, Jambor JL (1995) The Potential for Metal Release by Reductive Dissolution of Weathered Mine Tailings. *Journal of Contaminant Hydrology* **17**: 239-273
- Richards BN (1987) The microbiology of terrestrial ecosystems. In *John Wiley and Sons New York, 28 pp*
- Rivetta A, Negrini N, Cocucci M (1997) Involvement of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin in Cd<sup>2+</sup> toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L) seed germination. *Plant, Cell and Environment* **20**: 600-608
- Rizzi L, Petruzzelli G, Poggio G, Guidi GV (2004) Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere* **57**: 1039-1046
- Robinson BH, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP (2003) Uptake and distribution of nickel and other metals in the hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *New Phytologist* **158**: 279-285
- Robinson NJ, Procter CM, Connolly EL, Guerinot ML (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature* **397**: 694-697

- Rodriguez H, Gonzalez T, Goire I, Bashan Y (2004) Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* **91**: 552-555
- Rohwerder T, Gehrke T, Kinzler K, Sand W (2003) Bioleaching review part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**: 239-248
- Romkens P, Bouwman L, Japenga J, Draaisma C (2002) Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. *Environmental Pollution* **116**: 109-121
- Roosens NH, Bernard C, Lepplae R, Verbruggen N (2004) Evidence for copper homeostasis function metallothionein of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *FEBS Letters* **577**: 9-16
- Rosenblueth M, Martinez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 827-837
- Rosling A, Roose T, Herrmann AM, Davidson FA, Finlay RD, Gadd GM (2009) Approaches to modelling mineral weathering by fungi *Fungal Biology Review* **23**: 138-144
- Rotenberg B (2007) Modélisation multi-échelles du comportement de l'eau et des ions dans les argiles. Thèse : Ecole Doctorale 388 : Chimie et Organisation, Université Paris 6.
- Rouch DA, Lee BTO, Morby AP (1995) Understanding Cellular-Responses to Toxic Agents - a Model for Mechanism-Choice in Bacterial Metal Resistance. *Journal of Industrial Microbiology* **14**: 132-141
- Rufyikiri G, Declerck S, Dufey JE, Delvaux B (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi might alleviate aluminium toxicity in banana plants. *New Phytologist* **148**: 343-352
- Rugh CL, Senecoff JF, Meagher RB, Merkle SA (1998) Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. *Nature Biotechnology* **16**: 925-928
- Rugh CL, Wilde HD, Stack NM, Thompson DM, Summers AO, Meagher RB (1996) Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial merA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 3182-3187

- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *Fems Microbiology Letters* **278**: 1-9
- Sagner S, Kneer R, Wanner G, Cosson JP, Deus-Neumann B, Zenk MH (1998) Hyperaccumulation, complexation and distribution of nickel in *Sebertia acuminata*. *Phytochemistry* **47**: 339-347
- Salt DE, Blaylock M, Kumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I (1995a) Phytoremediation - A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Bio-Technology* **13**: 468-474
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ, Raskin I (1995b) Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. *Plant Physiology* **109**: 1427-1433
- Sammut M (2007) Spéciation du cadmium, du plomb et du zinc dans les poussières d'émissions atmosphériques d'origine sidérurgique - Approche de l'impact toxicologique des poussières. Thèse : Ecole Doctorale Sciences et Techniques : Géosciences de l'Environnement, Université d'Aix-Marseille III.
- Sand W, Gehrke T (2006) Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Research in Microbiology* **157**: 49-56
- Santibanez C, Verdugo C, Ginocchio R (2008) Phytostabilization of copper mine tailings with biosolids: Implications for metal uptake and productivity of *Lolium perenne*. *Science of the Total Environment* **395**: 1-10
- Saravanan VS, Madhaiyan M, Thangaraju M (2007) Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere* **66**: 1794-1798
- Sas-Nowosielska A, Kucharski R, Malkowski E, Pogrzeba M, Kuperberg JM, Krynski K (2004) Phytoextraction crop disposal - an unsolved problem. *Environmental Pollution* **128**: 373-379
- Sawhney BL (1972) Selective sorption and fixation of cations by clays minerals: a review. *Clays and Clay Minerals* **20**



- Sayer JA, Gadd GM (2001) Binding of cobalt and zinc by organic acids and culture filtrates of *Aspergillus niger* grown in the absence or presence of insoluble cobalt or zinc phosphate. *Mycol Res* **105**: 1261-1267
- Sayer JA, Raggett SL, Gadd GM (1995) Solubilization of insoluble metal-compounds by soil fungi - Development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycol Res* **99**: 987-993
- Sayler GS, Ripp S (2000) Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology* **11**: 286-289
- Schafer G, Purschke WG, Gleissner M, Schmidt CL (1996) Respiratory chains of archaea and extremophiles. *Bba-Bioenergetics* **1275**: 16-20
- Schalk IJ, Abdallah MA, Pattus F (2002) Recycling of pyoverdinin on the FpvA receptor after ferric pyoverdinin uptake and dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **41**: 1663-1671
- Schalk IJ, Hennard C, Dugave C, Poole K, Abdallah MA, Pattus F (2001) Iron-free pyoverdinin binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Molecular Microbiology* **39**: 351-360
- Schalk IJ, Kyslik P, Prome D, van Dorsselaer A, Poole K, Abdallah MA, Pattus F (1999) Copurification of the FpvA ferric pyoverdinin receptor of *Pseudomonas aeruginosa* with its iron-free ligand: Implications for siderophore-mediated iron transport. *Biochemistry* **38**: 9357-9365
- Schindler PW, Sposito G (1991) Surface complexation at (hydr)oxide surfaces: . In *Interactions at the Soil Colloid-Soil Solution Interface*, G H Bolt, M F DeBoodt, M H B Hayes, and M B McBride, eds NATO ASI Series; Series E; Applied Sciences Vol 190; Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London
- Schulz B, Boyle C (2006) What are endophytes? *Soil Biology* **9**: 1-13
- Schwertmann U, Cornell RM (1991) Iron oxides in the laboratory: preparation and characterization. In *First Edition*, Wiley VCH Publishers: New York
- Scott JA, Palmer SJ (1990) Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Applied Microbiology and Biotechnology* **33**: 221-225

- Scott JA, Sage GK, Palmer SJ (1990) Metal immobilization by microbial capsular coatings. *Biorecovery* **1**: 51-58
- Seddoh FK, Pedro G (1975) Aspects microgéochimiques de l'altération superficielle : application à l'étude de l'évolution des minéraux dans les arènes granitiques. *Cahiers ORSTOM, série pédologie* **8**: 7-25
- Serino L, Reimann C, Baur H, Beyeler M, Visca P, Haas D (1995) Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular & General Genetics* **249**: 217-228
- Shann JR, Boyle JJ (1994) Influence of plant-species on in-situ rhizosphere degradation. *ACS Symposium Series* **563**: 70-81
- Sheng XF, Xia JJ, Jiang CY, He LY, Qian M (2008) Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environmental Pollution* **156**: 1164-1170
- Shenker M, Fan TWM, Crowley DE (2001) Phytosiderophores influence on cadmium mobilization and uptake by wheat and barley plants. *Journal of Environmental Quality* **30**: 2091-2098
- Shiragami T, Matsumoto J, Inoue H, Yasuda M (2005) Antimony porphyrin complexes as visible-light driven photocatalyst. *Journal of Photochemistry and Photobiology C* **6**: 227-248
- Singh OV, Labana S, Pandey G, Budhiraja R, Jain RK (2003) Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* **61**: 405-412
- Sinha S, Mukherjee SK (2008) Cadmium-induced siderophore production by a high cd-resistant bacterial strain relieved cd toxicity in plants through root colonization. *Current Microbiology* **56**: 55-60
- Smith MR (1990) The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Biodegradation* **1**: 191-206
- Smolders E (2001) Cadmium uptake by plants. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* **14**: 177-183
- Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M (2004) Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology* **30**: 205-240

Sterflinger K (2000) Fungi as geologic agents. *Geomicrobiology Journal* **17**: 97-124

Stumm W, Morgan JJ (1981) Aquatic chemistry: an introducing emphasizing. *Chemical Equilibria in natural waters 2nd Ed John Wiley & Sons, Inc, USA, 583 pp*

Supalkova V, Huska D, Diopan V, Hanustiak P, Zitka O, Stejskal K, Baloun J, Pikula J, Havel L, Zehnalek J, Adam V, Trnkova L, Beklova M, Kizek R (2007) Electroanalysis of plant thiols. *Sensors-Basel* **7**: 932-959

Syers JK, Iskandar IK (1973) Pedogenetic significance of lichens. In *Ahmadjian, V, Hall, M E (Eds), The Lichens Academix Press, London, pp 225-248*

Taghavi S, Garafola C, Monchy S, Newman L, Hoffman A, Weyens N, Barac T, Vangronsveld J, van der Lelie D (2009) Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 748-757

Taylor SR (1964) Abundance of chemical elements in the continental crust: a new table. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **28**: 1273-1285

Tempest DW, Strange RE (1966) Variation in content and distribution of magnesium, and its influence on survival, in *Aerobacter aerogenes* grown in a chemostat. *Journal of General Microbiology* **44**: 273-279

Tester M, Leigh RA (2001) Partitioning of nutrient transport processes in roots. *Journal of Experimental Botany* **52**: 445-457

Tiffin LO (1972) Translocation of micronutrients in plants. In *Micronutrients in Agriculture, Mortvedt, J J, Giordano, P M, and Lindsay, W L, Eds, Soil Science Society of America, Madison, WI, 199*

Trevors JT, Stratton GW, Gadd GM (1986) Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Canadian Journal of Microbiology* **32**: 447-464

Tripathi M, Munot HP, Shouche Y, Meyer JM, Goel R (2005) Isolation and functional characterization of Siderophore-producing lead- and cadmium-resistant *Pseudomonas putida* KNP9. *Current Microbiology* **50**: 233-237

- Trivedi P, Pandey A, Sa TM (2007) Chromate reducing and plant growth promoting activities of psychrotrophic *Rhodococcus erythropolis* MtCC 7905. *Journal of Basic Microbiology* **47**: 513-517
- Troxler J, Svercel M, Natsch A, Zala M, Keel C, Moenne-Loccoz Y, Defago G (2012) Persistence of a biocontrol *Pseudomonas* inoculant as high populations of culturable and non-culturable cells in 200-cm-deep soil profiles. *Soil Biology & Biochemistry* **44**: 122-129
- Tseng CF, Burger A, Mislin GLA, Schalk IJ, Yu SSF, Chan SI, Abdallah MA (2006) Bacterial siderophores: the solution stoichiometry and coordination of the Fe(III) complexes of pyochelin and related compounds. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **11**: 419-432
- Tukey JW (1951) Components in regression. *Biometrics* **7**: 33-69
- Ulrich B (1987) Stability, elasticity, and resilience of terrestrial ecosystems with respect to matter balance. In Shultze ED & Zölfer H (Eds) *Ecological Studies 61 Springer-Verlag, Berlin Heidelberg* 38 pp
- Uroz S, Calvaruso C, Turpault MP, Frey-Klett P (2009) Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology* **17**: 378-387
- Van Huysen T, Abdel-Ghany S, Hale KL, LeDuc DL, Terry N, Pilon-Smits E (2003) Overexpression of cystathionine-γ-synthase enhances selenium volatilization in *Brassica juncea*. *Planta* **218**: 71-78
- Vanrhijn P, Vanderleyden J (1995) The rhizobium-plant symbiosis. *Microbiological Reviews* **59**: 124-142
- Vansuyt G, Robin A, Briat JF, Curie C, Lemanceau P (2007) Iron acquisition from Fe-pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 441-447
- Verrier PJ, Bird D, Buria B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu U, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EP, Yazaki K, Theodoulou FL (2008) Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Sciences* **13**: 151-159
- Vervaeke P, Luysaert S, Mertens J, Meers E, Tack F, Lust N (2003) Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. *Environmental Pollution* **126**: 275-282

- Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**: 571-586
- Vidali M (2001) Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* **73**: 1163-1172
- Visca P (2004) Iron regulation and siderophore signalling in virulence by *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas, volume 2 (Eds) Juan-Luis Ramos, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York pp 69-123*
- Visca P, Imperi F, Lamont IL (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology* **15**: 22-30
- Visca P, Leoni L, Wilson MJ, Lamont IL (2002) Iron transport and regulation, cell signalling and genomics: lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*. *Molecular Microbiology* **45**: 1177-1190
- Vogel TM (1996) Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* **7**: 311-316
- von Wiren N, Marschner H, Romheld V (1995) Uptake kinetics of iron-phytosiderophores in maize genotypes differing in iron efficiency. *Physiologia Plantarum* **93**: 611-616
- Wagner GJ (1993) Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Advances in Agronomy* **51**: 173-212
- Wainwright SJ, Woolhouse HW (1977) Some physiological aspects of copper and zinc tolerance in *Agrostis tenuis* Sibth - Cell elongation and membrane damage. *Journal of Experimental Botany* **28**: 1029-1036
- Walker TS, Bais HP, Deziel E, Schweizer HP, Rahme LG, Fall R, Vivanco JM (2004) *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiology* **134**: 320-331
- Wandersman C, Delepelaire P (2004) Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology* **58**: 611-647
- Wang AS, Angle JS, Chaney RL, Delorme TA, McIntosh M (2006) Changes in soil biological activities under reduced soil pH during *Thlaspi caerulescens* phytoextraction. *Soil Biology & Biochemistry* **38**: 1451-1461

- Wang X, Liu YO, Zeng GM, Chai LY, Song XC, Min ZY, Xiao X (2008) Subcellular distribution and chemical forms of cadmium in *Bechmeria nivea* (L.) Gaud. *Environmental and Experimental Botany* **62**: 389-395
- Warscheid T, Braams J (2000) Biodeterioration of stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation* **46**: 343-368
- Warscheid T, Krumbein WE (1994) Biodeterioration processes on inorganic materials and means of countermeasures. *Werkst Korros* **45**: 105-113
- Wei SH, Li YM, Zhou QX, Srivastava M, Chiu SW, Zhan J, Wu ZJ, Sun TH (2010) Effect of fertilizer amendments on phytoremediation of Cd-contaminated soil by a newly discovered hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Journal of Hazardous Materials* **176**: 269-273
- Weissenhorn I, Leyval C, Belgy G, Berthelin J (1995) Arbuscular mycorrhizal contribution to heavy-metal uptake by maize (*Zea-Mays* L) in pot culture with contaminated soil. *Mycorrhiza* **5**: 245-251
- Welch SA, Taunton AE, Banfield JF (2002) Effect of microorganisms and microbial metabolites on apatite dissolution. *Geomicrobiology Journal* **19**: 343-367
- Welch SA, Ullman WJ (1993) The effect of organic-acids on plagioclase dissolution rates and stoichiometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**: 2725-2736
- Wendenbaum S, Demange P, Dell A, Meyer JM, Abdallah MA (1983) The structure of pyoverdine Pa, the siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*. *Tetrahedron Letters* **24**: 4877-4880
- Whiting SN, De Souza MP, Terry N (2001) Rhizosphere bacteria mobilize Zn for hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environmental Science & Technology* **35**: 3144-3150
- Williams LE, Pittman JK, Hall JL (2000) Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Bba-Biomembranes* **1465**: 104-126
- Winkelmann G (2007) Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals* **20**: 379-392
- Wojcik M, Vangronsveld J, D'Haen J, Tukiendorf A (2005) Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* - II. Localization of cadmium in *Thlaspi caerulescens*. *Environmental and Experimental Botany* **53**: 163-171

- Wu J, Hsu FC, Cunningham SD (1999) Chelate-assisted Pb phytoextraction: Pb availability, uptake, and translocation constraints. *Environmental Science & Technology* **33**: 1898-1904
- Yang CH, Crowley DE (2000) Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 345-351
- Yang L, Nilsson M, Gjermansen M, Givskov M, Tolker-Nielsen T (2009) Pyoverdine and PQS mediated subpopulation interactions involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Molecular Microbiology* **74**: 1380-1392
- Yang X, Feng Y, He ZL, Stoffella PJ (2005) Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **18**: 339-353
- Yeterian E, Martin LW, Guillon L, Journet L, Lamont IL, Schalk IJ (2009) Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino acids* **38**: 1447-1459
- Yeterian E, Martin LW, Lamont IL, Schalk IJ (2010) An efflux pump is required for siderophore recycling by *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports* **2**: 412-418
- Yoshihara T, Hodoshima H, Miyano Y, Shoji K, Shimada H, Goto F (2006) Cadmium inducible Fe deficiency responses observed from macro and molecular views in tobacco plants. *Plant Cell Rep* **25**: 365-373
- Zafar MN, Nadeem R, Hanif MA (2007) Biosorption of nickel from protonated rice bran. *Journal of Hazardous Materials* **143**: 478-485
- Zaidi S, Usmani S, Singh BR, Musarrat J (2006) Significance of *Bacillus subtilis* strain SJ-101 as a bioinoculant for concurrent plant growth promotion and nickel accumulation in *Brassica juncea*. *Chemosphere* **64**: 991-997
- Zappi ME, Rogers BA, Teeter CL, Gunnison D, Bajpai R (1996) Bioslurry treatment of a soil contaminated with low concentrations of total petroleum hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials* **46**: 1-12

- Zhang H, Davison W (2000) Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Analytical Chemistry* **72**: 4447-4457
- Zhang H, Zhao FJ, Sun B, Davison W, McGrath SP (2001) A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environmental Science & Technology* **35**: 2602-2607
- Zhang XH, Lin AJ, Gao YL, Reid RJ, Wong MH, Zhu YG (2009) Arbuscular mycorrhizal colonisation increases copper binding capacity of root cell walls of *Oryza sativa* L. and reduces copper uptake. *Soil Biology & Biochemistry* **41**: 930-935
- Zhang YW, Tam NFY, Wong YS (2004) Cloning and characterization of type 2 metallothionein-like gene from a wetland plant, *Typha latifolia*. *Plant Science* **167**: 869-877
- Zobell CE (1946) Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriology Review* **10**: 1-49





Claire FERRET

## Rôle des *Pseudomonas* fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation

Le développement de l'industrie et de l'agriculture a entraîné l'accumulation d'éléments métalliques dans les sols. Dans ces écosystèmes, la fraction vivante intervient de façon importante dans la modification de la rétention des contaminants. Parmi les techniques de décontamination, la phytoremédiation apparaît comme un outil de choix. Si un des inconvénients majeurs de cette technique réside dans des durées de traitement pouvant atteindre plusieurs années, l'ajout de micro-organismes couplé aux plantes améliorerait les prélèvements et réduirait les temps de décontamination.

Cette étude s'est intéressée aux possibilités de développer des procédés de phytoremédiation associés à des bactéries productrices de sidérophores, molécules ayant une forte affinité pour le fer mais également pour d'autres métaux. Dans ce contexte, un système de complexité croissante, jusqu'au modèle complet comprenant les constituants du sol, les bactéries, les métaux contaminants et les plantes, a été étudié avec pour objectif la compréhension des processus intervenant dans ces différentes interactions.

Ces travaux ont conduit, dans un premier temps, à la compréhension, notamment par une approche de biologie moléculaire, des interactions intervenant entre des minéraux du sol, des argiles et des oxy-hydroxydes de fer, et une bactérie productrice de sidérophores, *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats ont mis en évidence le rôle majeur de l'un de ces sidérophores, la pyoverdine, ainsi que du biofilm, dans la dissolution des minéraux par cette bactérie. Une étude en fluorimétrie et dosages des métaux a, quant à elle, montré que la pyoverdine était capable de complexer des métaux contaminants adsorbés sur les argiles ou présents dans la structure cristalline des oxy-hydroxydes de fer. Enfin, ces travaux ont abouti à la mise en place du système d'étude dans sa globalité. Si la pyoverdine ou les bactéries productrices de sidérophores n'ont pas amélioré le prélèvement par les plantes du cadmium et du nickel, des résultats prometteurs ont cependant été obtenus pour le cuivre. De plus, les bactéries productrices de sidérophores s'avèrent être des cibles intéressantes en phytostabilisation.

Mots clés : sidérophores, *Pseudomonas* fluorescents, sols pollués, phytoremédiation, minéraux, biodisponibilité, métaux

## Role of fluorescent *Pseudomonas* in the biodisponibility of metals contaminating the soil minerals: application to the phytoremediation

The industrial and agricultural development caused a metallic element accumulation in the soils. In these ecosystems, the living fraction significantly operates in the changes of contaminants retention. Among the decontamination techniques, the phytoremediation appears as a tool of choice. If one of major disadvantages of this technique is the long-term remediation process, the addition of microorganisms with the plants could enhance the uptakes and decrease the time to remediate.

This work focused on the possibility to develop processes for siderophore-producing bacteria-assisted phytoremediation, siderophores being molecules with a high affinity for iron and also able to chelate other metals. In this context, a system with an increasing complexity until a complete model including the soil constituents, the bacteria, the contaminant metals and the plants, has been studied to understand the processes involved in these different interactions.

The understanding of the interactions between the soil minerals, clays and iron oxyhydroxides, and a siderophore-producing bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, have been first performed with, in particular, a molecular biology approach. These results have highlighted the major role of the one of siderophores, the pyoverdine, and also the biofilm in the mineral dissolution by this bacteria. Fluorimetry and metal quantification assays showed that the pyoverdine was able to chelate the contaminant metals adsorbed on the clays or present in the crystal structure of the iron oxyhydroxides. Lastly, the global system has demonstrated that if the pyoverdine or the siderophore-producing bacteria do not enhance the cadmium and nickel uptake by plants, promising results were obtained for copper. Moreover, siderophore-producing bacteria turn out to be interesting asset for the phytostabilization.

Key words: siderophores, fluorescent *Pseudomonas*, polluted soils, phytoremediation, minerals, biodisponibility, metals