



HAL
open science

Caractérisation de l'accumulation des éléments traces métalliques chez trois espèces du genre *Atriplex* et chez *Pseudomonas fluorescens* ainsi que l'étude de leurs répercussions sur certains paramètres biochimiques de ces espèces

Housseem Kahli

► **To cite this version:**

Housseem Kahli. Caractérisation de l'accumulation des éléments traces métalliques chez trois espèces du genre *Atriplex* et chez *Pseudomonas fluorescens* ainsi que l'étude de leurs répercussions sur certains paramètres biochimiques de ces espèces. Biochimie [q-bio.BM]. Université de Bordeaux; Université Badji Mokhtar-Annaba, 2021. Français. NNT : 2021BORD0403 . tel-04357159

HAL Id: tel-04357159

<https://theses.hal.science/tel-04357159>

Submitted on 21 Dec 2023

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.

THÈSE EN COTUTELLE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ET DE L'UNIVERSITÉ DE BADJI MOKHTAR ANNABA

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGENIEURS

ÉCOLE DOCTORALE TOXICOLOGIE ENVIRONNEMENTALE

SPÉCIALITÉ LASERS MATIERES ET NANOSCIENCES

Par KAHLI HOUSSEM

Caractérisation de l'accumulation des éléments traces métalliques chez trois espèces du genre *Atriplex* et chez *Pseudomonas fluorescens* ainsi que l'étude de leurs répercussions sur certains paramètres biochimiques de ces espèces

Sous la direction de Mme Touria COHEN-BOUHACINA (UB/France)
Et de Mme Hana SBARTAI (UBMA/Algérie)

Soutenue le 21/12/2021

Membres du jury :

Mme. BERREBAH, Houria
M. VERDON, Julien
M. DJEBAR, Mohamed Réda
Mme. SOUIKI, Linda
Mme. BEVEN, Laure

Professeur. Université de Badji Mokhtar Annaba
Maitre de conférences. Université de Poitiers
Professeur. Centre de Recherche Environnemental
Professeur. Université 8 mai 1945, Guelma
Professeur. Université de Bordeaux

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice

Résumé : Caractérisation de l'accumulation des éléments traces métalliques chez trois espèces du genre *Atriplex* et chez *Pseudomonas fluorescens* ainsi que l'étude de leurs repercussions sur certains paramètres biochimiques de ces espèces

La révolution industrielle a accéléré de façon spectaculaire la pollution de l'environnement par des métaux toxiques d'où la nécessité de rechercher des modèles biologiques capables de réhabiliter différents milieux contaminés par les métaux. Et c'est dans ce contexte que se situe notre étude.

Nous avons consacré une partie de nos travaux à l'étude comparative de la résistance de trois espèces halophytes *Atriplex* (*A. canescens*, *A. halimus* et *A. nummularia*) au stress en cadmium (Cd). L'autre partie de nos travaux porte sur la caractérisation morphologique de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* avant et après exposition au cadmium à l'aide de plusieurs techniques d'imagerie (microscopie optique, microscopie à force atomique, et par microscopie électronique à balayage) avec une approche comparative (*P. fluorescens* et *E. coli*).

Les travaux de la 1^{ère} partie ont conduit à la compréhension des mécanismes de défenses antioxydants intervenant dans la restauration de l'homéostasie des cellules (neutralisation de l'excès d'espèces réactives de l'oxygène). Nous avons montré que les trois espèces d'*Atriplex* étudiées sont capables d'accumuler des quantités importantes de Cd, phénomène amplifié en présence de sel, ce qui fait de ces plantes hyperaccumulateurs de bonnes candidates dans une stratégie de phytoextraction du Cd.

Les résultats de la 2^{ème} partie de cette thèse montrent que, lorsque les conditions de croissance sont optimales, *P. fluorescens* a une forme allongée présentant des invaginations à sa surface et une structuration membranaire assez caractéristique. Les populations bactériennes de *P. fluorescens* et *E. coli* sont ensuite fixés sur un substrat solide fonctionnalisé (PEM ou PLL), et/ou traités au glutaraldéhyde qui permet un meilleur attachement au substrat mais n'est pas sans conséquence sur la morphologie bactérienne. Enfin, l'exposition de *P. fluorescens* au cadmium (à la dose CMI=1g/L) fait évoluer ses caractéristiques morphologiques (forme, taille, ...) mais n'est pas suivie (ou très peu) de lyse cellulaire contrairement à *E. coli* pour laquelle cette même dose de cadmium s'avère être létale. Ces résultats mettent bien en évidence l'effet toxique du cadmium sur *E. coli* ainsi que la tolérance de *P. fluorescens* à ce même xénobiotique.

Mots clés : Halophytes, stress cadmique, *Pseudomonas fluorescens*, biorémediation, AFM, tolérance.

Abstract: Characterization of metal trace elements accumulation in three species of the genus *Atriplex* and at *Pseudomonas fluorescens* and the study of their repercussions on certain biochemical parameters of these species

The industrial revolution dramatically accelerated the pollution of the environment by toxic metals, hence the need to search for biological models capable of rehabilitating different environments contaminated by metals. It is in this context that our study takes place.

We devoted part of our work to the comparative study of the resistance of three *Atriplex* halophyte species (*A. canescens*, *A. halimus* and *A. nummularia*) to cadmium stress (Cd). The other part of our work concerns the morphological characterization of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* before and after exposure to cadmium using several imaging techniques (optical microscopy, atomic force microscopy, and scanning electron microscopy) with a comparative approach (*P. fluorescens* and *E. coli*).

The work of the 1st part led to the understanding of antioxidant defense mechanisms involved in the restoration of cell homeostasis (neutralization of excess reactive oxygen species). We have shown that the three species of *Atriplex* studied are capable of accumulating significant amounts of Cd, a phenomenon amplified in the presence of salt, which makes these hyperaccumulator plants good candidates in a Cd phytoextraction strategy.

The results of the 2nd part of this thesis show that, when the growth conditions are optimal, *P. fluorescens* has an elongated shape with invaginations on its surface and a rather characteristic membrane structure. The bacterial populations of *P. fluorescens* and *E. coli* are then fixed on a functionalized solid substrate (PEM or PLL), and/or treated with glutaraldehyde which allows better attachment to the substrate but is not without consequence on the bacterial morphology. Finally, exposure of *P. fluorescens* to cadmium (at the *MIC* dose=1g/L) changes its morphological characteristics (shape, size, etc.) but is not followed (or very little) by cell lysis unlike *E. coli* for which this same dose of cadmium proves to be lethal. These results clearly highlight the toxic effect of cadmium on *E. coli* as well as the tolerance of *P. fluorescens* to this same xenobiotic.

Keywords : Halophytes, cadmium stress, *Pseudomonas fluorescens*, bioremediation, AFM, tolerance.

Unité de recherche

Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine, UMR 5798, 351 cours de la Libération-33400 Talence.

Remerciements

Cette thèse est le fruit de longues années de travail, c'est donc avec grande émotion que je rédige ces remerciements qui marquent la fin de cette aventure enrichissante.

Ce travail de thèse s'est déroulé en cotutelle entre l'université Badji Mokhtar de Annaba (Algérie) et l'université de Bordeaux (France). Dans ce cadre j'ai effectué la première partie de mon doctorat au sein du Laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC). Je remercie Monsieur le directeur, ainsi que tous les membres du laboratoire, de m'avoir accueillie chaleureusement. La deuxième partie de ma thèse s'est déroulée au sein du Laboratoire Ondes et Matière d'Aquitaine (LOMA). Je remercie les deux directeurs successifs, de m'y avoir accueilli dans les meilleures conditions, et de m'avoir aidé pour les différentes démarches administratives. Je remercie également le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche scientifique Algériens et le Ministère de l'Europe et des Affaires étrangères Français pour leur financement.

Je tiens dans un premier temps à remercier mes deux directrices de thèse, Mmes **Touria Cohen-Bouhacina** et **Hana Sbartai**. Pour la confiance qu'elles ont placée en moi, dès le début de cette thèse. Le temps qu'elles m'ont consacré, les mots bienveillants qu'elles ont eus durant les périodes difficiles, les concepts scientifiques qu'elles m'ont appris sont autant de pierres portées à l'édifice de ces travaux.

Touria je tiens à te dire merci pour ton aide précieuse, ton encadrement efficace, ton soutien permanent, ta grande rigueur ainsi que ton impressionnante capacité de travail, merci aussi pour tes recommandations qui m'ont permis d'acquérir de nombreuses compétences dans les domaines scientifiques mais surtout celui de la microscopie. J'ai beaucoup appris à tes côtés, tu as su me guider tout en me laissant une grande liberté et en me déléguant plusieurs responsabilités dont j'espère avoir été à la hauteur.

Hana merci non seulement pour m'avoir fait l'honneur d'être ma directrice de thèse, mais également pour tes précieux conseils et orientations. Qu'ils sachent combien tes encouragements m'ont été d'une grande utilité durant toutes ces années.

J'exprime toute ma gratitude à Mme **Berrebbah Houria** Professeur à l'université de Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je souhaite remercier aussi Madame **Laure Beven** Professeur à l'université de Bordeaux, Monsieur **Julien Verdon** Maître de conférences de l'université de Poitiers, et Monsieur **Djebar Mohamed Réda** Professeur à l'université de Annaba, pour avoir accepté d'évaluer ce travail doctoral et de participer à ce jury de thèse. Enfin, je remercie Monsieur Jacques Bourguignon, Chercheur-responsable d'équipe au Laboratoire physiologie cellulaire & végétale de l'université de Grenoble, d'avoir accepté de participer au jury et de l'intérêt qu'il a porté pour mon travail.

Je tiens aussi à remercier Madame **Linda Souiki** Professeur à l'université 8 mai 1945 de Guelma pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Au sein du LOMA, j'ai eu la chance de rencontrer de nombreuses personnes issues de disciplines variées qui ont participé de près ou de loin à ce travail et aux quel je suis très reconnaissant. Tout d'abord mes amies LOMiens Quentin, Paul, Julie, Goce, Raphael, Marion, Alizée, Stéphano et Mathilde. Je tiens à remercier aussi le service Gestion du LOMA - Sophie, Suzanne, Isabelle, et Josiane, Je n'oublie pas les services Optique, Électronique et Informatique – Marc, Sébastien, William, Bernard, Etienne, Eric, Alain, David et Romain – merci pour votre bonne humeur.

Je remercie aussi les membres de l'équipe BIOPHYNA pour leur accueil, leur conseil et surtout leur soutien tout au long de cette thèse, Merci Fabien et Christine.

Du côté du LTC, un merci particulier à Amina & Lyes, on a été sur deux continents différents ces dernières années, mais vos attentions et messages d'encouragement étaient-là, je suis fier de votre réussite et j'espère qu'on se réunira très vite pour fêter cela. Merci à Tayeb, pour son soutien matériel et moral, et surtout pour ses déplacements à Tebessa pour me procurer les fameuses plantes (El-Gttaf) ton humour est tout simplement introuvable ailleurs. Merci à Rym, Meriem Djekoun, Marwa et Asma pour leurs soutiens, le démarrage de cette thèse a été un supplice sans votre compagnie, merci à Sabrina pour ses histoires et surtout la façon unique de les raconter, merci à Chiraz pour sa joie sincère pour chacun de mes pas positifs et inshallah tu sera la prochaine sur la liste à soutenir ta thèse. De manière générale merci à tous d'avoir été là, même si par moments j'avais un peu déserté la planète...

Un merci spécial à ma petite sœur par adoption Sarah pour tes encouragements, ta bonne humeur et surtout pour tous ces restos et sorties (*Nany*) ensemble qui ont été pour moi une vraie bouffée d'oxygène, sans toi je n'ai pas pu réaliser toutes ces surprises à Nesrine. Ta présence pour moi était indispensable.

La thèse a parfois été un moment difficile pour mes proches. Elle est très preneuse en temps et j'avoue ne pas les avoir consacrés le temps qu'ils méritent, je voudrais donc remercier tous les membres de ma famille, mon frère unique Seif (merci pour ton soutien infaillible, ton aide a été inestimable à chacun de mes séjours en France, merci pour tes larmes à chaque départ et à chaque retour, tu es le frère dont chacun rêve), merci à ma belle –sœur Rabab et toutes mes félicitations pour la naissance de mon unique petite nièce « Dania » qui m'a fait le grand bonheur de devenir *ton-ton* pour la première fois. Merci à ma grand-mère, mes tantes paternelle et maternelle, mes oncles maternels, mes cousins et mes cousines, et toutes la nouvelle génération qui pousse rapidement, merci à vous pour votre soutien et vos encouragements. Un énorme merci à toutes ma belle-famille, Tata Latifa tu étais toujours une deuxième maman pour moi durant toutes ces années, merci pour tes visites surprises qui nous ont aidé à surmonter les difficultés de se retrouver loin de la famille, merci à mes deux beaux-frères Abdelrahim et Nounou, que j'ai toujours considéré comme mes deux petits frères.

Je souhaite enfin remercier les personnes les plus chères à mon cœur, qui m'ont le plus aidé et soutenu dans cette aventure, Ma mère et ma femme. Leur présence, encouragement, soutien quotidien indéfectible et enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Merci d'avoir toujours cru en moi. Je vous aime. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. J'espère que vous trouverez dans ce travail et à travers son aboutissement toute l'expression de ma gratitude.

Ma maman chérie : Farida comme elle a pu le faire tout au long de ma vie. Sans toi, je n'aurais jamais eu l'opportunité de continuer mes études en France et effectuer cette thèse.

Ma chère femme Nesrine, merci pour toutes les nuits blanches que tu as passé avec moi, merci car tu es toujours là pour moi, dans n'importe quelle circonstance. Tu m'écoutes te raconter mes problèmes, tu me remontes le moral quand je suis triste, tu m'encourages quand je baisse les bras et tu me consoles quand je subis un échec. Un énorme merci car tu m'as offert le plus beau des cadeaux, notre rayon de soleil, notre petite princesse Sofia Amélia. Tu as fait de moi l'homme et le papa le plus heureux au monde, un père fier de son épouse et de sa nouvelle petite famille. Les mots sont peu de choses pour te dire merci pour tout cela, je le sais. Mais je tenais à le faire.

Pour finir, j'adresse une pensée émue à la mémoire de tous ceux qui nous ont quitté tout au long de ces dernières années, Ma grand-mère Fafani, mes Oncles Raouf et Azzedine, ma tante Faiza, mon oncle maternel préféré Hacene, mon beau père Mohamed et mon ami de toujours Sami. Sachez que je ne vous oublierai jamais, vous êtes gravés à jamais dans mon cœur et ma mémoire. J'espère que de là où vous êtes, vous êtes tous fiers de moi.

Et pour tous ceux que je n'ai pas mentionné, sachez que si vous êtes assez proches de moi pour regarder si vous êtes cités dans les remerciements, je vous assure qu'au moment de rédiger ces lignes, je pense à vous.

Sommaire

Introduction générale

Partie 1 : Etude de l'interaction avec le cadmium de trois espèces de plantes *Atriplex* (*halimus*, *canescens* et *nummularia*)

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Introduction.....	6
2. Pollutions des sols	6
2.1 Définitions.....	6
2.2 Sources de pollution	7
3. Les éléments traces métalliques dans le sol	8
3.1 Définition	8
3.2 Source des ETM	9
3.3 Circulation des ETM dans la plante	11
3.4 Toxicité des ETM	11
3.5 Mécanismes de défense de la plante.....	13
4. Le Cadmium.....	13
4.1. Origines et utilisation du cadmium.....	14
4.2. Circulation du cadmium dans le sol	15
4.3 Absorption, accumulation et translocation du cadmium dans la plante	16
4.4 Phytotoxicité du cadmium	18
4.5 Stress oxydant	20
4.6 Les différentes stratégies de défense	23
5. Technique de dépollution des sols.....	23
5.1 Méthodes physico-chimiques	24
5.2 Méthodes biologiques.....	26
5.3 Les différents procédés de la phytoremédiation	28
6. Utilisation des halophytes en phytoremédiation	28
6.1 Plantes accumulatrices et hyperaccumulatrices.....	30
6.2 Mécanismes de tolérance au stress abiotique chez les halophytes	31
6.3 Les plantes du genre <i>Atriplex</i>	35
7. Références.....	36

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Matériel végétal	51
1.1 <i>Atriplex halimus</i>	51
1.2 <i>Atriplex nummularia</i>	52
1.3 <i>Atriplex canescens</i>	53
2. Le dispositif expérimental	54
3. Méthodes d'analyses	57
3.1 Dosage des chlorophylles	57
3.2 Dosage des lipides	58
3.3 Les biomarqueurs de stress	58
3.3.1 Biomarqueurs enzymatiques	58
3.3.1.1 Détermination de l'activité Catalase (CAT)	58
3.3.1.2 Détermination de l'activité Guaiacol-Peroxydase (GPX)	58
3.3.1.3 Détermination de l'activité Ascorbate -Peroxydase (APX)	59
3.3.1.4 Quantification des mesures spectrophotométriques	59
3.3.2 Biomarqueur non enzymatique	59
3.3.2.1 Détermination des concentrations du malondialdéhyde (MDA)	59
3.4 Caractérisation de l'accumulation chez les trois espèces	60
3.4.1 Détermination de la quantité de Cd accumulée	60
3.4.2 Détermination de la quantité du Cd et NaCl excrétée à la surface des feuilles	60
4. Analyses statistiques des résultats	60
5. Références	62

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Résultats	66
1.1 Effet du Cd et du Cd/NaCl sur la teneur en chlorophylles	68
1.2 Effet du Cd et Cd/NaCl sur le taux des lipides	71
1.3 Effet du Cd et Cd/NaCl sur le taux de MDA	74
1.4 Effet du Cd et Cd/NaCl sur les activités enzymatiques du système antioxydant chez <i>Atriplex canescens</i> , <i>nummularia</i> , <i>halimus</i>	77
1.4.1 Effet du Cd et Cd/NaCl sur l'activité CAT	77
1.4.2 Effet du Cd et Cd/NaCl sur l'activité APX	80
1.4.3 Effet du Cd et Cd/NaCl sur l'activité GPX	83
1.5 Caractérisation de l'accumulation chez les trois espèces (<i>A. canescens</i> , <i>A. nummularia</i> et <i>A. halimus</i>)	86

1.5.1 Détermination de la quantité de Cd accumulée	86
1.5.2 Détermination de la quantité de Cd et NaCl excrétée à la surface des feuilles	90
2. Discussion	93
3. Références	98

Conclusion 1

Partie 2 : Etude morphologique de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* et son interaction avec le cadmium

Introduction 2

Chapitre I : Etat de l'art

1. Introduction.....	107
2. Pollution des sols.....	108
3. La dépollution des sols (biologique et chimique).....	109
4. Le monde de microorganismes.....	112
4.1 Les champignons	112
4.2 Les lichens.....	111
4.3 Les bactéries.....	112
5. Le monde bactérien	112
5.1 Présentation.....	112
5.2 Classification des bactéries	113
5.2.1 Classification bactérienne selon leurs structures et formes (classification de Linné)	113
5.2.2 Classification bactérienne par Gram.....	114
5.2.3 Classification bactérienne par température optimale de croissance	116
5.3 Présence bactérienne dans l'environnement	116
5.4 Rôles des bactéries associées aux plantes	117
6 Caractéristiques du genre <i>Pseudomonas</i>	118
6.2 Caractéristiques métaboliques	119
6.3 Classification du genre <i>Pseudomonas</i>	122
6.4 Distribution écologique et rôle du genre <i>Pseudomonas</i>	123
6.5 <i>Pseudomonas</i> fluorescentes comme agents de biocontrôle et de croissance des plantes	124
7. Caractérisation de la bactérie <i>Pseudomonas fluorescens</i>	126
7.1 Identification et caractérisation morphologique	126
7.2 Classification de l'espèce <i>Pseudomonas fluorescens</i>	127

8. Etude structurale de la membrane bactérienne de la souche <i>Pseudomonas</i>	128
8.1 Structure membranaire	128
9. Utilisation de la microscopie pour caractériser le genre <i>Pseudomonas</i>	130
9.1 Etude par microscope à force atomique	130
10. Conclusion	138
11. Références.....	139

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Matériels.....	150
1.1 Matériel biologique	150
1.2 Matériel chimique.....	150
2. Protocoles expérimentaux	152
2.1 Conditions de culture	152
2.2 Dépôt Bactérien sur un substrat solide.....	153
2.2.1 Dépôt sur un substrat non traité	153
2.2.2 Dépôt sur substrat fonctionnalisé.....	154
2.2.3 Fixation des bactéries avec du glutaraldéhyde	155
3. Etude de la viabilité bactérienne.....	156
3.1 Repiquage des bactéries	156
3.2 Préparation des solutions diluées de cadmium	157
3.3 Préparation des boîtes de dilution	157
3.4 Préparation de l'inoculum bactérienne.....	158
3.5 Ensemencement	158
3.6 Lecture de la CMI.....	159
4. Caractérisation du système étudié (instrumentation)	159
4.1 La Microscopie à Force Atomique (AFM)	159
4.1.1 Introduction	159
4.1.2 Microscopie de force atomique (AFM) et forces mises en jeu	160
4.1.3 Fonctionnement et principe de l'AFM	162
4.1.4 Les modes d'utilisation de l'AFM.....	164
4.1.5 Conditions d'imagerie et préparation des échantillons	167
4.2 Microscopie Optique	168
4.2 Microscopie Electronique à Balayage.....	168
5. Références.....	171

Résultats et Discussion

Chapitre III – Optimisation des conditions de culture et caractérisations morphologiques

1. Introduction.....	173
2. Optimisation des conditions de culture de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	174
2.1 Effet du solvant sur le dépôt bactérien	174
2.2. Concentration optimale du dépôt bactérien pour une étude par microscopie	176
2.3 Influence de la température d’incubation de la croissance de <i>P. fluorescens</i> en milieu LB	179
2.4 Influence de la durée d’incubation sur la croissance de <i>P. fluorescens</i> en milieu LB	183
2.5 Influence du milieu de culture sur la croissance de <i>P. fluorescens</i>	187
3. Caractérisations morphologiques de cellules <i>Pseudomonas fluorescens</i> saines	190
3.1. Morphologie et comportement des bactéries	190
3.2 Modification de la morphologie bactérienne, invaginations.....	194
3.3. Structuration membranaire	195
4. Conclusion	200
5. Références.....	201

Chapitre IV – Dépôts sur substrats fonctionnalisés et observation en milieu liquide

1. Introduction.....	211
2. Immobilisation de <i>Pseudomonas Fluorescens</i> sur un substrat	212
2.1 Immobilisation de <i>P. fluorescens</i> sur une surface fonctionnalisée.....	213
2.2 Test de l’efficacité de l’immobilisation de <i>P. fluorescens</i> sur une surface fonctionnalisée	218
2.2.1 Effet du rinçage.....	218
2.2.2 caractérisation par AFM en milieu liquide d’un dépôt de <i>P. fluorescens</i> sur les substrats fonctionnalisés	220
2.2.3 Caractéristiques morphologiques de <i>Pseudomonas fluorescens</i> in vitro	223
3. Fixation de <i>Pseudomonas fluorescens</i> au glutaraldéhyde	222
3.1 Caractérisation par MEB d’un dépôt bactérien de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	225
3.2 Effet de l’éthanol dans le processus de fixation de <i>P. fluorescens</i> au glutaraldéhyde	227
3.3 Caractérisation par AFM de dépôts bactériens de <i>P. fluorescens</i> fixés au glutaraldéhyde sans éthanol	236
3.4 Analyse comparative des caractéristiques morphologiques.....	237
4. Conclusion	239
5. Annexes.....	234

6. Références.....	237
--------------------	-----

Chapitre V – Interaction de *Pseudomonas fluorescens* avec le cadmium

1. Introduction.....	244
2. Etude de la croissance bactérienne en présence de cadmium et préparation des dépôts	246
2.1 Détermination de la CMI	247
2.2 CMI du cadmium vis-à-vis de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	248
3. Caractérisation morphologique par AFM de <i>P. fluorescens</i> exposée au cadmium.....	250
3.1 Préparation des dépôts bactériens.....	250
3.2 Résistance de <i>Pseudomonas fluorescens</i> au cadmium	251
3.3 Effet toxique du cadmium chez <i>E. coli</i>	255
4. Etude morphologique de <i>P. fluorescens</i> couplée à une analyse chimique (MEB-EDX)	259
4.1 Caractéristiques morphologiques complémentaires de <i>P. fluorescens</i> par MEB	259
4.2 Analyse de la composition chimique du dépôt bactérien par MEB-EDX	263
5. Synthèse des principaux résultats et discussion	267
6. Conclusion	271
7. Annexes du chapitre V	272
8. Références.....	276

Conclusion 2

Conclusion Générale et perspectives

Liste des abréviations

ABREVIATIONS	DEFINITION
ETM	Eléments traces métalliques
NPs	Nanoparticules
CdCl₂	Chlorure de cadmium
Ag	Argent
MDA	Malondialdéhyde
GST	Glutathion S transférase
CAT	Catalase
GSH	Glutathion réduit
BBC	Bleu brillant de Comassie
BSA	Albumine sérum de boeuf
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
SH	Groupements thiol
MTS	Métallothionéines
O₂⁻	Radical superoxyde
Cu	Cuivre
Fe	Fer
Al	Aluminium
Cr	Chrome
Zn	Zinc
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SOD	Superoxyde Dismutase
SAA	Spectrométrie d'Absorption Atomique
Ni	Nickel
Hg	Mercure
ADEME	Agence de la transition écologique
<i>P. fluorescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
LPS	Lipopolysaccharide
EPS	Exopolysaccharides
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
T°	Température
DO	Densité optique
MH+	Muller Hinton- Cation ajusté (milieu nutritif)

MH	Muller Hinton
LB	Luria Burtani
MO	Microscopie optique
MEB	Microscopie électronique à balayage
EDX	Energy Dispersive X-ray
MET	Microscopie électronique en transmission
PLL	Poly-L-Lysine
OM	Membrane externe
MFA (AFM)	Microscopie à Force Atomique (Atomique Force Microscopy)
CAR	Courbe d'approche retrait
CF	Courbe de force
CFU	Unité formant colonie
Milli-Q	Eau Ultra pure
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
PAH	Poly chlorhydrate d'allylamine
PBS	Tampon phosphate salin
PEM	Multicouche de polyélectrolytes
PSS	Poly styrène sulfonate

Introduction générale

Introduction générale

La pollution des sols a un impact majeur sur la planète entière et elle va certainement jouer un rôle important dans les conditions de vie des générations futures et de leur bien-être. Elle est causée par des produits chimiques nocifs qui pénètrent dans le sol et provoquent leur détérioration conduisant ainsi à des nombreux risques pour la santé humaine.

Comment alors ses produits chimiques sont-ils arrivés dans nos sols ?

Une des réponses de la présence de ses produits chimiques est l'industrialisation qui, en prenant de l'essor pour soutenir la population croissante ainsi que l'utilisation intensive des engrais et des pesticides dans l'agriculture contribue à la dissémination des polluants chimiques toxiques et à leur accumulation dans les sols (Fasani et al., 2018). Ces éléments chimiques se sont avérés avoir un impact négatif grave sur divers organismes vivants (Bartrons et al., 2016) (Jaishankar et al., 2014). Cela est particulièrement vrai pour les êtres humains, qui se situent au sommet de la chaîne alimentaire.

Alors que la plupart des polluants organiques sont dégradés avec le temps, les polluants inorganiques ne le sont pas et s'accumulent dans les sols. Ces polluants inorganiques incluent les métaux lourds « cadmium (Cd), plomb (Pb), chrome (Cr), mercure (Hg) et nickel (Ni) » ainsi que les métalloïdes, comme l'Arsenic (As), qui polluent l'environnement et entravent gravement la croissance et le développement des plantes en diminuant, par exemple, leur productivité (Clemens, 2006).

Cette dangereuse pollution exige la mise en place de mesures qui pourraient la réduire et nettoyer les zones concernées.

La dépollution peut se faire par plusieurs méthodes dont les traitements physico-chimiques qui se font par injection soit d'un liquide soit d'un gaz sous pression, induisant ainsi la dissolution des polluants ou également le piégeage des métaux contaminants dans la structure cristalline des minéraux en cours de formation. Une autre méthode consiste tout simplement à remplacer le sol contaminé par une terre propre, ce qui est très limite et peut même présenter des inconvénients.

Parmi les méthodes émergentes, on peut trouver la bioremédiation qui consiste à utiliser des organismes vivants tels que les plantes halophytes (phytoremediation) dont le genre *Atriplex*, déjà utilisées dans la dépollution des sols salés et récemment les sols contaminés par les métaux

lourds. On peut aussi utiliser des microorganismes, comme les champignons et les bactéries, pour éliminer les polluants toxiques des différents milieux naturels (sols, milieux aquatiques). Le genre *Pseudomonas* et, plus particulièrement, l'espèce de *P. fluorescens* fait partie de ces microorganismes.

En effet, *P. fluorescens* est une bactérie PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) ou Rhizobactéries (Baranski et al., 2007 ; Wu et al., 2020), qui stimule la croissance de la plante ainsi que sa protection contre des microorganismes pathogènes (Bolwerk et al., 2003), ce qui favorise une augmentation significative du rendement de la culture concernée (Lemanceau, 1992). D'autre part, et en plus de son rôle de PGPR, *P. fluorescens* possède un pouvoir de bioremédiation par la bioaccumulation et la dégradation des composés toxiques pour la plante (Garbeva et al., 2004; Wu et al., 2020). Par exemple, cette bactérie contribue de manière significative à la réduction des nitrates et nitrites connus pour être de grands polluants des eaux souterraines (Latour and Lemanceau, 1997). Il apparaît évident qu'avec de telles propriétés, cette espèce s'avère d'un grand intérêt pour les domaines de l'agroalimentaire (Gamalero et al., 2004), la biotechnologie (Tomer et al., 2021) ainsi que pour le transfert technologique (Aponte et al., 2017).

Par exemple, parmi les caractéristiques qui méritent d'être approfondies, il y a l'impact des variations des conditions physico-chimiques et biologiques (temps d'incubation, température et milieu de culture) sur ces bactéries pourrait permettre d'augmenter la densité et l'activité des populations microbiennes et, par conséquent, l'accélération de la décontamination des sites pollués les contenant.

C'est dans ce contexte que se situe mon travail de thèse dans lequel nous nous sommes fixés deux objectifs distincts.

Le premier étant d'effectuer un suivi dans le temps de la bioaccumulation d'un métal lourd, le cadmium, chez les trois espèces de plantes du genre *Atriplex* (*halimus*, *canescens* et *nummularia*) en présence et en absence de NaCl. Nous avons aussi évalué l'excrétion du cadmium et du NaCl à la surface foliaire comme moyen possible de détoxification.

Le second objectif consiste, dans un premier temps, à optimiser les conditions de croissance de l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, celles de la fixation des bactéries sur un substrat solide (fonctionnalisation du substrat ou enrobage des bactéries) pour une meilleure caractérisation de la population bactérienne (organisation du dépôt bactérien, morphologie cellulaire et structuration membranaire). Et, dans un deuxième temps, l'étude portant sur l'interaction de *P.*

fluorescens avec le cadmium a été initiée à titre exploratoire. Le suivi de l'évolution morphologique de *P. fluorescens* a été effectué par différentes techniques dont la microscopie optique (MO), la MEB couplée à une analyse chimique par l'EDX (spectromètre à dispersion d'énergie) et surtout la microscopie à force atomique (AFM). Cette technique, outre sa très haute résolution, a l'avantage de ne nécessiter aucun traitement particulier de la population bactérienne et de permettre des études in-vitro.

Le manuscrit commence par une introduction générale et est organisé en deux grandes parties indépendantes. La 1^{ère} partie est dédiée à l'étude de l'interaction avec le cadmium de trois espèces de plantes *Atriplex* (*halimus*, *canescens* et *nummularia*) et la 2^{ème} est consacrée à l'étude morphologique de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* et à son interaction avec le cadmium. Chacune des deux parties est composée d'une introduction, une revue de la littérature, des matériels et méthodes, des résultats, une discussion, et un dernier chapitre pour la conclusion. Enfin, le manuscrit s'achève sur une conclusion générale de l'ensemble des travaux et les perspectives qui permettraient non seulement de compléter les résultats de cette thèse mais aussi de donner des pistes pour relier les deux parties, comme l'étude de l'interaction des plantes *Atriplex* en présence de cadmium et des bactéries, *P. fluorescens*.

Références

- Aponte, A., Castillo, O., Cabrera, G., Pernia, M., Hernandez, Y., 2017. Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum sp.* association enhances growth of *Lactuca sativa* L. under tropical conditions. *J. Cent. Eur. Agric.* 18, 424–440. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/18.2.1916>
- Baranski, R., Klocke, E., Nothnagel, T., 2007. Enhancing resistance of transgenic carrot to fungal pathogens by the expression of *Pseudomonas fluorescens* microbial factor 3 (MF3) gene. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.12.002>
- Bartrons, M., Catalan, J., Penuelas, J., 2016. *1Spatial And Temporal Trends Of Organic Pollutants In Vegetation From Remote And Rural Areas. *Sci. Rep.* 6, 25446. <https://doi.org/10.1038/srep25446>
- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijffjes, A.H.M., Lamers, G.E.M., Chin-A-Woeng, T.F.C., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G.V., 2003. Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic *Fungus Fusarium oxysporum f. sp. radicle-lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interactions*® 16, 983–993. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.11.983>
- Clemens, S., 2006. *3Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88, 1707–1719. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>
- Fasani, E., Manara, A., Martini, F., Furini, A., DalCorso, G., 2018. *4The potential of genetic engineering of plants for the remediation of soils contaminated with heavy metals. *Plant Cell Environ.* 41, 1201–1232. <https://doi.org/10.1111/pce.12963>
- Gamalero, E., Trotta, A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, M.G., Berta, G., 2004. Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* 14, 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0256-3>
- Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2004. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 51–64. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00234-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00234-4)
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. *2Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 7, 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
- Latour, X., Lemanceau, P., 1997. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie* 9–10, 427–443.
- Lemanceau, P., 1992. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas spp fluorescents*. *Agronomie* 12, 413–437. <https://doi.org/10.1051/agro:19920601>
- Tomer, A., Sigh, R., Prasad, D., Singh, S., 2021. *Pseudomonas fluorescens* on the growth of paddy.
- Wu, B., He, T., Wang, Z., Qiao, S., Wang, Y., Xu, F., Xu, H., 2020a. Insight into the mechanisms of plant growth promoting strain SNB6 on enhancing the phytoextraction in cadmium contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 385, 121587. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121587>
- Wu, B., He, T., Wang, Z., Qiao, S., Wang, Y., Xu, F., Xu, H., 2020b. Insight into the mechanisms of plant growth promoting strain SNB6 on enhancing the phytoextraction in cadmium contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 385, 121587. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121587>

Partie 1

Etude de l'interaction avec le cadmium
de trois espèces de plantes *Atriplex*
(*halimus*, *canescens* et *nummularia*)

Introduction générale

La pollution des sols a un impact majeur sur la planète entière et elle va certainement jouer un rôle important dans les conditions de vie des générations futures et de leur bien-être. Elle est causée par des produits chimiques nocifs qui pénètrent dans le sol et provoquent leur détérioration conduisant ainsi à des nombreux risques pour la santé humaine.

Comment alors ses produits chimiques sont-ils arrivés dans nos sols ?

Une des réponses de la présence de ses produits chimiques est l'industrialisation qui, en prenant de l'essor pour soutenir la population croissante ainsi que l'utilisation intensive des engrais et des pesticides dans l'agriculture contribue à la dissémination des polluants chimiques toxiques et à leur accumulation dans les sols (Fasani et al., 2018). Ces éléments chimiques se sont avérés avoir un impact négatif grave sur divers organismes vivants (Bartrons et al., 2016) (Jaishankar et al., 2014). Cela est particulièrement vrai pour les êtres humains, qui se situent au sommet de la chaîne alimentaire.

Alors que la plupart des polluants organiques sont dégradés avec le temps, les polluants inorganiques ne le sont pas et s'accumulent dans les sols. Ces polluants inorganiques incluent les métaux lourds « cadmium (Cd), plomb (Pb), chrome (Cr), mercure (Hg) et nickel (Ni) » ainsi que les métalloïdes, comme l'Arsenic (As), qui polluent l'environnement et entravent gravement la croissance et le développement des plantes en diminuant, par exemple, leur productivité (Clemens, 2006).

Cette dangereuse pollution exige la mise en place de mesures qui pourraient la réduire et nettoyer les zones concernées.

La dépollution peut se faire par plusieurs méthodes dont les traitements physico-chimiques qui se font par injection soit d'un liquide soit d'un gaz sous pression, induisant ainsi la dissolution des polluants ou également le piégeage des métaux contaminants dans la structure cristalline des minéraux en cours de formation. Une autre méthode consiste tout simplement à remplacer le sol contaminé par une terre propre, ce qui est très limite et peut même présenter des inconvénients.

Parmi les méthodes émergentes, on peut trouver la bioremédiation qui consiste à utiliser des organismes vivants tels que les plantes halophytes (phytoremediation) dont le genre *Atriplex*, déjà utilisées dans la dépollution des sols salés et récemment les sols contaminés par les métaux

lourds. On peut aussi utiliser des microorganismes, comme les champignons et les bactéries, pour éliminer les polluants toxiques des différents milieux naturels (sols, milieux aquatiques). Le genre *Pseudomonas* et, plus particulièrement, l'espèce de *P. fluorescens* fait partie de ces microorganismes.

En effet, *P. fluorescens* est une bactérie PGPR (plant growth promoting rhizobacteria) ou Rhizobactéries (Baranski et al., 2007 ; Wu et al., 2020), qui stimule la croissance de la plante ainsi que sa protection contre des microorganismes pathogènes (Bolwerk et al., 2003), ce qui favorise une augmentation significative du rendement de la culture concernée (Lemanceau, 1992). D'autre part, et en plus de son rôle de PGPR, *P. fluorescens* possède un pouvoir de bioremédiation par la bioaccumulation et la dégradation des composés toxiques pour la plante (Garbeva et al., 2004; Wu et al., 2020). Par exemple, cette bactérie contribue de manière significative à la réduction des nitrates et nitrites connus pour être de grands polluants des eaux souterraines (Latour and Lemanceau, 1997). Il apparaît évident qu'avec de telles propriétés, cette espèce s'avère d'un grand intérêt pour les domaines de l'agroalimentaire (Gamalero et al., 2004), la biotechnologie (Tomer et al., 2021) ainsi que pour le transfert technologique (Aponte et al., 2017).

Par exemple, parmi les caractéristiques qui méritent d'être approfondies, il y a l'impact des variations des conditions physico-chimiques et biologiques (temps d'incubation, température et milieu de culture) sur ces bactéries pourrait permettre d'augmenter la densité et l'activité des populations microbiennes et, par conséquent, l'accélération de la décontamination des sites pollués les contenant.

C'est dans ce contexte que se situe mon travail de thèse dans lequel nous nous sommes fixés deux objectifs distincts.

Le premier étant d'effectuer un suivi dans le temps de la bioaccumulation d'un métal lourd, le cadmium, chez les trois espèces de plantes du genre *Atriplex* (*halimus*, *canescens* et *nummularia*) en présence et en absence de NaCl. Nous avons aussi évalué l'excrétion du cadmium et du NaCl à la surface foliaire comme moyen possible de détoxification.

Le second objectif consiste, dans un premier temps, à optimiser les conditions de croissance de l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, celles de la fixation des bactéries sur un substrat solide (fonctionnalisation du substrat ou enrobage des bactéries) pour une meilleure caractérisation de la population bactérienne (organisation du dépôt bactérien, morphologie cellulaire et structuration membranaire). Et, dans un deuxième temps, l'étude portant sur l'interaction de *P.*

fluorescens avec le cadmium a été initiée à titre exploratoire. Le suivi de l'évolution morphologique de *P. fluorescens* a été effectué par différentes techniques dont la microscopie optique (MO), la MEB couplée à une analyse chimique par l'EDX (spectromètre à dispersion d'énergie) et surtout la microscopie à force atomique (AFM). Cette technique, outre sa très haute résolution, a l'avantage de ne nécessiter aucun traitement particulier de la population bactérienne et de permettre des études in-vitro.

Le manuscrit commence par une introduction générale et est organisé en deux grandes parties indépendantes. La 1^{ère} partie est dédiée à l'étude de l'interaction avec le cadmium de trois espèces de plantes *Atriplex* (*halimus*, *canescens* et *nummularia*) et la 2^{ème} est consacrée à l'étude morphologique de la bactérie *Pseudomonas fluorescens* et à son interaction avec le cadmium. Chacune des deux parties est composée d'une introduction, une revue de la littérature, des matériels et méthodes, des résultats, une discussion, et un dernier chapitre pour la conclusion. Enfin, le manuscrit s'achève sur une conclusion générale de l'ensemble des travaux et les perspectives qui permettraient non seulement de compléter les résultats de cette thèse mais aussi de donner des pistes pour relier les deux parties, comme l'étude de l'interaction des plantes *Atriplex* en présence de cadmium et des bactéries, *P. fluorescens*.

Références

- Aponte, A., Castillo, O., Cabrera, G., Pernia, M., Hernandez, Y., 2017. Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum sp.* association enhances growth of *Lactuca sativa* L. under tropical conditions. *J. Cent. Eur. Agric.* 18, 424–440. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/18.2.1916>
- Baranski, R., Klocke, E., Nothnagel, T., 2007. Enhancing resistance of transgenic carrot to fungal pathogens by the expression of *Pseudomonas fluorescens* microbial factor 3 (MF3) gene. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.12.002>
- Bartrons, M., Catalan, J., Penuelas, J., 2016. *1Spatial And Temporal Trends Of Organic Pollutants In Vegetation From Remote And Rural Areas. *Sci. Rep.* 6, 25446. <https://doi.org/10.1038/srep25446>
- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijffjes, A.H.M., Lamers, G.E.M., Chin-A-Woeng, T.F.C., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G.V., 2003. Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic *Fungus Fusarium oxysporum f. sp. radicle-lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interactions*® 16, 983–993. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.11.983>
- Clemens, S., 2006. *3Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88, 1707–1719. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>
- Fasani, E., Manara, A., Martini, F., Furini, A., DalCorso, G., 2018. *4The potential of genetic engineering of plants for the remediation of soils contaminated with heavy metals. *Plant Cell Environ.* 41, 1201–1232. <https://doi.org/10.1111/pce.12963>
- Gamalero, E., Trotta, A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, M.G., Berta, G., 2004. Impact of two fluorescent pseudomonads and an arbuscular mycorrhizal fungus on tomato plant growth, root architecture and P acquisition. *Mycorrhiza* 14, 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0256-3>
- Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2004. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 51–64. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00234-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00234-4)
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. *2Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscip. Toxicol.* 7, 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
- Latour, X., Lemanceau, P., 1997. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie* 9–10, 427–443.
- Lemanceau, P., 1992. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas spp fluorescents*. *Agronomie* 12, 413–437. <https://doi.org/10.1051/agro:19920601>
- Tomer, A., Sigh, R., Prasad, D., Singh, S., 2021. *Pseudomonas fluorescens* on the growth of paddy.
- Wu, B., He, T., Wang, Z., Qiao, S., Wang, Y., Xu, F., Xu, H., 2020a. Insight into the mechanisms of plant growth promoting strain SNB6 on enhancing the phytoextraction in cadmium contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 385, 121587. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121587>
- Wu, B., He, T., Wang, Z., Qiao, S., Wang, Y., Xu, F., Xu, H., 2020b. Insight into the mechanisms of plant growth promoting strain SNB6 on enhancing the phytoextraction in cadmium contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 385, 121587. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121587>

Introduction 1

La pollution par les métaux lourds est devenue un problème majeur dans le monde entier depuis de nombreuses années, s'aggravant encore en raison de leur accumulation dans l'environnement puisqu'elles ne se dégradent pas avec le temps contrairement aux substances organiques. Ces polluants sont naturellement présents et/ou dus aux activités humaines telles que : agricoles, minières ou industrielles (Choppala et al., 2014). Les principaux métaux lourds étant le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le chrome (Cr), le mercure (Hg), le nickel (Ni) ou les métalloïdes (Clemens, 2006 ; Sarry et al., 2006). En particulier, le Cd est l'un des métaux les plus phytotoxiques en raison de sa grande solubilité dans l'eau, de sa mobilité relative et de sa longue demi-vie biologique (Wang et al., 2014). Ce n'est pas un nutriment essentiel pour les plantes et une toxicité élevée pour les plantes résulte de leur exposition, même à des concentrations relativement faibles (Redondo-Gómez et al., 2010).

Plusieurs études ont montré que le métabolisme des plantes est affecté par le Cd de différentes manières, à savoir : inhibition de la croissance (Clemens, 2006 ; Verbruggen et al., 2009 ; Zemanová et al., 2016), ouverture des stomates (Mesnoua et al, 2016), altération de l'absorption de nutriments (Zhou et Qiu, 2005 ; DalCorso et al., 2013), un déséquilibre osmotique (Singh et Tewari, 2003), etc. De même, le processus photosynthétique apparaît particulièrement sensible à ce métal qui endommage les photosystèmes I et II (Li et al., 2015 ; Mesnoua et al., 2016) et inhibe certaines enzymes du cycle de Calvin (Pendias et Kabata-Pendias, 2000). Une concentration élevée de Cd induit également une augmentation de l'intensité respiratoire (Sbartai et al., 2008) et des activités du cycle de l'acide tricarboxylique (Liphadzi et al., 2005). Enfin, le Cd peut également augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules végétales, ce qui peut provoquer des dommages oxydatifs tels que la peroxydation des lipides membranaires et la carbonylation des protéines (Gill et al., 2012). Pour résister aux dommages oxydatifs, les plantes disposent d'un système efficace de piégeage des ROS composé d'antioxydants enzymatiques et non enzymatiques (Choppala et al., 2014 ; Sarwar et al., 2010). Parmi les enzymes antioxydantes, la superoxyde dismutase (SOD), la guaiacol peroxydase (GPX) et la catalase (CAT) jouent un rôle important dans le contrôle des niveaux de ROS (Villiers et al., 2012 ; Parlak et Yilmaz, 2013).

Cependant, et dans les régions arides et semi-arides, des niveaux élevés de salinité, un autre stress environnemental critique, s'accompagnent généralement d'une contamination par différents métaux, dont le Cd, ce qui complique le processus de remédiation (Lutts et Lefèvre,

2015 ; Chen et al., 2018). En effet, la phytoremédiation apparaît comme une solution intéressante et peu coûteuse pour réduire la concentration de contaminants ou leurs effets toxiques, ou les rendre inoffensifs (Chaney et al., 1997 ; Huang et al., 2017b). La plupart des espèces végétales utilisées dans ce procédé sont des glycophytes, mais elles ne peuvent survivre dans les zones salines polluées par les métaux lourds, contrairement aux halophytes. Ces dernières plantes sont naturellement adaptées à ces environnements difficiles, et peuvent constituer le candidat idéal pour la phytoremédiation (Liang et al., 2016 ; Nikalje et Suprasanna, 2018). La phytoextraction, qui est la décontamination in situ des sols pollués, utilise des méthalophytes capables de stocker de grandes quantités de polluants métalliques dans leurs parties aériennes (Bani et al., 2007 ; Badache et al., 2015 ; Gong et al., 2018).

Dans ce contexte, des études récentes ont rapporté la forte tolérance des halophytes à de fortes concentrations d'ions métalliques toxiques alors que la plupart des plantes ne survivent pas (Wang et al., 2013), notamment en conditions salines (Manousaki et Kalogerakis, 2009 ; Wali et al., 2013), 2016, hen et al., 2018). On sait que chez les espèces halophytes, NaCl peut influencer la mobilité du Cd par la formation de complexes $CdCl_2$ qui sont plus faiblement liés aux particules du sol. Le Cd originaire de ces complexes peut pénétrer directement dans les racines et/ou se dissocier du complexe *chloro* déclenchant sa compétition avec le sodium au niveau des sites d'adsorption augmentant ainsi l'activité et la biodisponibilité du Cd et provoquer son absorption par les racines (López-Chuken et al., 2010 ; Filipović et al., 2018). Les espèces halophytes ont également la capacité de retenir NaCl dans leurs vacuoles cellulaires sous forme d'osmoticum (Nikalje et Suprasanna, 2018). Enfin, on pense que des doses modérées de NaCl stimulent la croissance des plantes et jouent un rôle important dans la protection contre la toxicité des métaux lourds en médiant l'absorption des ions, l'ajustement osmotique et l'induction de systèmes antioxydants (Han et al., 2013 ; Manousaki et Kalogerakis, 2009).

De plus, les plantes du genre *Atriplex* sont des xéro-halophytes pérennes originaires des régions méditerranéennes arides et semi-arides, et elles se présentent comme un arbuste naturel envahissant dans plusieurs zones minières d'Afrique du Nord et d'Europe du Sud (Rahmoune et al., 2004 ; Javier et al., 2013). Ces plantes poussent rapidement et de manière dense sur des sols dégradés et tolèrent des conditions environnementales extrêmes telles que la sécheresse (Martínez et al., 2005) et la salinité (Mahi et al., 2015). Des travaux récents sur *Atriplex halimus* L (Amaranthaceae) et *Atriplex nummularia* (Lindl) ont montré que ces plantes peuvent accumuler des concentrations élevées de Cd, jusqu'à 400 μ M (Lefèvre et al., 2010 ; Javier et al., 2013). De plus, ces espèces peuvent utiliser l'exclusion d'un éventuel mécanisme de

détoxification (Kachout et al., 2012 ; Manousaki et al., 2014) ainsi que l'excrétion pour éliminer le métal en excès des tissus sensibles comme observé chez *A. halimus*, *A. nummularia*, *A. marina*, *Armeria maritima* et *Tamarix aphylla* où les glandes salines ne sont pas seulement spécifiques aux ions sels mais peuvent également excréter d'autres ions métalliques toxiques (Lokhande et Suprasanna, 2012 ; Badache et al., 2015).

Par conséquent, l'intérêt croissant qui porte sur l'utilisation de nouvelles techniques biologiques dans la décontamination des sols nous amène à nous intéresser aux problématiques qui permettent d'explorer l'effet de la salinité et du Cd sur le comportement biochimique de tels plantes halo-xérophytes du genre *Atriplex*. Nous avons alors étudié l'accumulation et la translocation de Cd au niveau de leurs racines et feuilles ainsi que certains biomarqueurs de stress impliqués dans le rétablissement de l'équilibre cellulaire de ces plantes et dans la neutralisation d'excès de ROS.

La partie 1 de ce manuscrit s'articule de la façon suivante :

Le chapitre 1 fait le rappel de quelques bases bibliographiques nécessaires à la compréhension de l'étude ; nous décrivons d'abord, la pollution des sols et les différentes sources de contamination causées par les éléments traces métalliques –ETM) en particulier le cadmium et leur mécanisme d'action contre les différents stress. Nous évoquons ensuite les différentes stratégies de la décontamination des sols pollués, méthodes physico-chimiques et biologiques, ainsi que le rôle important des plantes dans la dépollution des sols. Et enfin, nous introduisons les espèces halophytes et les mécanismes de tolérance aux différentes sources de stress notamment les ETM. Dans le chapitre 2, nous présentons les protocoles expérimentaux que nous avons utilisés pour préparer les échantillons et nous abordons les différentes techniques qui nous ont permis de caractériser l'accumulation du cadmium chez trois espèces de la plantes halo-xérophytes *Atriplex* : *Atriplex canescens*, *Atriplex halimus* et *Atriplex nummularia*. C'est dans le chapitre 3 que nous reportons l'étude de l'évaluation de la toxicité du cadmium sur les trois espèces halophytes qui semblent constituer des candidates idéales pour la dépollution des sols. Dans la conclusion 1 qui clôture cette première partie du manuscrit nous proposons des perspectives pour de futurs développements issus des résultats de ce travail, tant d'un point de vue académique qu'applicatif.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Ce premier chapitre de la première partie de la thèse présente une description globale de quelques bases bibliographiques nécessaires à la compréhension de l'étude. Nous décrivons dans cette partie la pollution des sols et les différentes sources de contamination causées par les éléments traces métalliques (ETM) en particulier le cadmium et leur mécanisme d'action contre les différents stress. La deuxième partie porte sur les différentes stratégies de la décontamination des sols pollués, méthodes physico-chimiques et biologiques, ainsi que le rôle important des plantes dans la dépollution des sols. Dans la troisième partie, nous présentons les espèces halophytes et les mécanismes de tolérance aux différentes sources de stress notamment les ETM.

Plan du chapitre I

1. Introduction.....	6
2. Pollutions des sols	6
2.1 Définitions.....	6
2.2 Sources de pollution.....	7
3. Les éléments traces métalliques dans le sol	8
3.1 Définition.....	8
3.2 Source des ETM.....	8
3.3 Circulation des ETM dans la plante.....	9
3.4 Toxicité des ETM.....	11
3.5 Mécanismes de défense de la plante	11
4. Le Cadmium.....	13
4.1. Origines et utilisation du cadmium	13
4.2. Circulation du cadmium dans le sol.....	14
4.3 Absorption, accumulation et translocation du cadmium dans la plante	15
4.4 Phytotoxicité du cadmium.....	16
4.5 Stress oxydant	18
4.6 Les différentes stratégies de défense.....	20
5. Technique de dépollution des sols	23
5.1 Méthodes physico-chimiques.....	23
5.2 Méthodes biologiques	24
5.3 Les différents procédés de la phytoremédiation.....	26
6. Utilisation des halophytes en phytoremédiation.....	28
6.1 Plantes accumulatrices et hyperaccumulatrices	28
6.2 Mécanismes de tolérance au stress abiotique chez les halophytes	31
6.3 Les plantes du genre <i>Atriplex</i>	35
7. Références.....	36

1. Introduction

La pollution des sols est le résultat d'activités minières et d'industries lourdes, comme l'industrie pétrolière et la sidérurgie, ou d'industries chimiques. Les polluants sont majoritairement des composés organiques (hydrocarbures, composés phénolés et chlorés...) mais la contamination par des métaux est également importante, (Gaston et al., 2013). Elle concerne notamment l'aluminium (Al), le chrome (Cr), le manganèse (Mn), le zinc (Zn), le plomb (Pb), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), l'arsenic (As), l'étain (Sn), le cadmium (Cd), le titane (Ti), le mercure (Hg), etc. Les sols sont une ressource limitée, ce qui signifie que leur perte et leur dégradation ne sont pas récupérables au cours d'une vie humaine. Aujourd'hui, ce patrimoine est menacé à la fois par l'héritage du passé et par l'extension des surfaces consacrées au développement industriel et urbain. Les sols ne sont pas isolés, ils font partie de l'écosystème (Raap et al., 2017)

Contrairement aux composés organiques, les métaux et les radionucléides ne peuvent pas être dégradés. Il est donc primordial non seulement de mieux connaître les facteurs essentiels contrôlant la mobilité et la biodisponibilité des métaux dans les sols, mais aussi de développer des solutions de réhabilitation efficaces et durables visant à limiter les risques liés à la pollution métallique, et à restaurer et à préserver les ressources en sols (Beygi and Jalali, 2019).

2. Pollutions des sols

2.1 Définitions

La pollution des sols est la présence de produits chimiques toxiques (polluants) dans le sol à des concentrations suffisamment élevées provoquant ainsi des risques pour la santé humaine et à la perturbation de l'écosystème. D'autre part, même si la concentration des polluants dans le sol est inférieure à celle définie pour ce risque, le sol peut être considéré comme pollué car le taux des contaminants dans le sol dépasse le seuil naturellement présent dans le sol (dans le cas des contaminants qui se produisent naturellement dans le sol).

Les Polluants des sols comprennent une grande variété de contaminants ou de produits chimiques (organiques et inorganiques) (figure I-1), d'origine naturelle ou bien anthropique. Les principales causes de pollution des sols sont les activités humaines, telles que les fuites accidentelles et les déversements, le dumping¹, les procédés de fabrication, etc... Le cumul en raison de processus naturels est également possible, mais il n'a été enregistré que dans quelques rares cas (comme l'accumulation de niveaux élevés de perchlorate dans le sol à partir du désert d'Atacama au Chili par exemple, qui est

¹ Le dumping environnemental ou dumping écologique désigne le fait pour un territoire d'établir moins de règles environnementales que celles qui s'appliquent ailleurs.

purement due à des processus naturels dans les milieux arides).



Figure I-1: les diverses formes de contamination des sols (www.fao.org).

2.2 Sources de pollution

Selon l'agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie (ADEME), on peut classer 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. Les éléments traces métalliques dans le sol

3.1 Définition

D'un point de vue purement chimique, les éléments de la classification périodique formant des cations en solution sont des métaux. D'un point de vue physique, le terme « métaux lourds désigne les éléments métalliques naturels, métaux ou dans certains cas métalloïdes (environ 65 éléments), caractérisés par une forte masse volumique supérieure à 5 g/cm³ (Adriano, 2001).

D'un autre point de vue biologique, on en distingue deux types en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques : métaux essentiels et métaux toxiques. (i) Les métaux essentiels sont des éléments indispensables à l'état de trace pour de nombreux processus cellulaires et qui se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (Bai et al., 2019). Certains peuvent devenir toxiques lorsque la concentration dépasse un certain seuil. C'est le cas du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du zinc (Zn), du fer (Fe). (ii) Les métaux toxiques ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faible concentration. Ils n'ont aucun effet bénéfique connu pour la cellule. C'est le cas du plomb (Pb), du mercure (Hg) et du cadmium (Cd). Le terme métaux lourds, « *heavy metal* », implique aussi une notion de toxicité. Le terme « éléments traces métalliques » est aussi utilisé pour décrire ces mêmes éléments, car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement (Filipović et al., 2018).

3.2 Source des ETM

Le problème principal avec les métaux lourds comme le plomb, le cadmium, le cuivre et le mercure est qu'ils ne peuvent pas être biodégradés, et donc persistent pendant de longues périodes dans des sols. Leur présence dans les sols peut être naturelle ou anthropogénique.

➤ Origine naturelle

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (Beygi and Jalali, 2019). La concentration naturelle de ces métaux lourds dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge.

➤ Origine anthropique

La source majeure de contamination est d'origine anthropique. Au cours des décennies dernières, l'apport de métaux lourds au sol dans le monde s'est étendu ; à l'heure actuelle on l'estime à 22000

tonnes de cadmium, 939000 tonnes de cuivre, 783000 tonnes de plomb, et 1350000 tonnes de zinc (Singh et al., 2003). Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle.

La pollution atmosphérique résulte des activités industrielles (rejets d'usine) et urbaines (gaz d'échappement, etc...). Il faut distinguer les apports diffus aériens d'origine lointaine des apports massifs localisés d'origine proche. Dans les apports diffus sont classés les poussières et aérosols provenant des chauffages ainsi que des moteurs d'automobiles. Les apports massifs localisés résultent d'apports anthropiques accidentels liés aux activités industrielles sans protection efficace contre la dispersion dans l'environnement (Beygi and Jalali, 2019)

Certaines pratiques agricoles sont à l'origine de l'introduction de métaux lourds dans le sol. Les produits destinés à améliorer les propriétés physico-chimiques du sol sont souvent plus riches en métaux lourds que le sol lui-même par exemple les engrais, les composts et les boues de station d'épuration (Morales Ruano et al., 2019)

La pollution industrielle provenant des usines de production de l'activité humaine tels que les matières organiques et graisses (industries agro-alimentaires), les produits chimiques divers (industries chimiques), les matières radioactives (centrales nucléaires, traitement des déchets radioactifs) et la métallurgie (Grunst et al., 2019). Les déchets miniers et les terrils industriels sont une source particulièrement importante de pollution par le zinc, le plomb et le cadmium.

Le rôle des pratiques industrielles et agricoles dans la contamination des sols doit être pris en compte : cela concerne une grande partie du territoire. Leur accumulation et leur transfert constituent donc un risque pour la santé humaine via la contamination de la chaîne alimentaire, mais aussi pour le milieu naturel dans son ensemble (Bourrelier et Berthelin, 1998)

3.3 Circulation des ETM dans la plante

Parmi l'ensemble des métaux lourds, une vingtaine d'entre eux sont indispensable aux processus physiologiques majeurs, en particulier la respiration, la photosynthèse ou l'assimilation des macronutriments (azote, soufre...) (Kabata-Pendias, 2011). Certains de ces métaux, Cu, Zn, Ni, Fe, Co, Se et Ba sont aussi impliqués dans un processus moléculaires tels que le contrôle de l'expression des gènes de certaines espèces (Prasad, 2008) ; la biosynthèse des protéines, des acides nucléiques, des substances de croissance, de la chlorophylle et des métabolites secondaires ; le métabolisme lipidique dont la tolérance au stress (Prasad, 2008).

En outre, certains éléments trace peuvent se présenter sous différents états d'oxydation (Cu^{2+} , Cu^{+}). Ils

jouent ainsi un rôle d'accepteurs ou de donneurs d'électrons, très important dans les multiples systèmes enzymatiques mettant en jeu des réactions d'oxydoréduction (Chaignon, 2001).

3.3.1 Absorption racinaire

La voie principale d'absorption des métaux se fait par simple diffusion au travers de l'apoplaste du cortex racinaire et de l'endoderme (voie apoplastique). Le transport des éléments métalliques à travers la paroi cellulaire se fait passivement (non métabolique et donc dans le sens du gradient de concentration) par les pores du réseau de la cellulose, de l'hémicellulose et des glycoprotéines. Cependant, une partie des ions peut être adsorbés par les charges négatives de surface de l'acide polygalacturonique des pectines, qui agissent comme des échangeurs d'ions (Sterckeman et al., 2017). Puis au niveau de l'endoderme, le transport peut devenir actif au niveau de la membrane plasmique des cellules de la bande de Caspary (voie symplastique), autorisant cette fois un transfert contre le gradient de concentration.

On considère de nos jours que le plomb et le nickel sont absorbés passivement via certaines protéines de type purine, alors que le zinc et le cuivre sont absorbés activement par une protéine de transport sélective, nécessitant de l'énergie (Bini and Bech, 2014)

Par ailleurs, bien que le transport actif soit en principe spécifique, certains cations toxiques (Cs, Cd, Pb ou Cr) sont des compétiteurs potentiels vis-à-vis des cations essentiels. Par exemple, le cadmium semble être un compétiteur connu du calcium en empruntant les canaux calciques membranaires (Sterckeman et al., 2019a) où 70% du Cd pénètre par ce biais dans la racine. Une partie des métaux apoplastiques peut donc rejoindre la voie symplastique puis le xylème par les plasmodesmes.

3.3.2 Translocation

Après leur absorption, le transport des éléments dans le xylème de la plante vers les parties aériennes, appelé « translocation », peut nécessiter ou non la prise en charge des éléments par des agents complexants, tels que les acides organiques, les acides aminés et divers peptides. En effet, le fer est pris en charge par le citrate ; le zinc peut être transporté par un complexe anionique (Alloway, 2013); la majorité du cuivre et une partie du nickel sont chélatés par un acide polyaminopolycarboxylique encore non identifié chez la tomate (Beygi and Jalali, 2019) ; le cadmium est transporté sous forme libre. La translocation d'éléments toxiques est plus importante chez certaines espèces pouvant ainsi conduire à une accumulation des métaux dans les feuilles et les autres parties aériennes qui est probablement due à un transport plus actif ou une absence d'immobilisation dans les racines (Beygi and Jalali, 2019).

Le transport des éléments toxiques par le phloème est moins évident du fait que les cellules qui le

constituent sont vivantes et forment un piège supplémentaire. Toutefois, chez certaines plantes, la nicotianamine, dérivée de la méthionine, pourrait être responsable du transport des métaux, Fe, Cu, Zn et Mn, dans la sève du phloème (Beygi and Jalali, 2019).

3.3.3 Accumulation

La non-biodégradabilité des ions métalliques conduit souvent à une accumulation de leur concentration malgré leur dissipation par lessivage et séquestration sous certaines formes insolubles et biodisponibles (Singh et al, 2005). Certaines plantes accumulent des quantités inhabituelles d'éléments métalliques ; 100 mg/kg de matière sèche pour le Cd, 1000 mg/kg pour le Ni, le Cu, le Co ainsi que 10 000 mg/kg pour le Zn et le Mn. Ces espèces sont alors qualifiées de plante « hyperaccumulatrice » telles (*Alyssum bertolonii*, *Sebertia acuminata*, *Silene cobalticola*, *Thlaspi caerulescens*, *Brassica napus*, *Pteris vittata*) (Brooks, 1998).

3.4 Toxicité des ETM

Le premier effet des métaux lourds observable chez les végétaux est une inhibition de la croissance. Celle-ci s'accompagne très souvent de nombreux autres indices de dysfonctionnement : chlorose foliaire, importantes lésions nécrotiques, jaunissement progressif, repliement ou dessèchement du feuillage... A l'heure actuelle, les bases moléculaires de ces perturbations sont encore mal connues, mais on admet généralement qu'elles résultent d'un stress oxydatif, dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène ou « *Reactive Oxygen Species* » (ROS). Les ROS altèrent toute une série de substrats biologiques importants, avec comme conséquence la modification des domaines fonctionnels des biomolécules : inhibition de l'activité enzymatique, perturbation du métabolisme végétal (notamment la photosynthèse et la respiration), oxydation de protéines, altération des membranes cellulaires via l'induction de phénomènes de peroxydation lipidique, apparition de cassures au sein de l'ADN, pouvant conduire à la mort cellulaire (Huang et al., 2017) (Ondrasek et al., 2018).

3.5 Mécanismes de défense de la plante

En utilisant des phénomènes de reconnaissance et de transduction des signaux, les plantes possèdent des mécanismes de défense particuliers qui se basent principalement sur le regroupement ou le blocage de la progression du xénobiotique (Panda and Choudhury, 2005). Ils se traduisent par un renforcement ou la mise en place de barrières structurales et par la production de molécules ayant des activités antioxydantes. Parmi ces phénomènes on note : la modification de la perméabilité membranaire, qui permet de réduire l'entrée des métaux dans la cellule, le système anti-oxydant, qui limite les dégâts des espèces réactives de l'oxygène et la chélation intracellulaire, qui empêche l'activité de l'ion métallique.

Dans une grande majorité d'organismes vivants l'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ROS)

générées par des stress environnementaux est indispensable. Les métaux lourds sont connus par leurs grandes capacités à produire ces ROS extrêmement toxiques qui dégradent des composants cellulaires très importants induisant à leurs tours un stress oxydatif (Panda and Choudhury, 2005).

Dans l'intention du contrôle de niveau des ROS et de la protection des cellules contre les dommages oxydatifs, les plantes ont développé un système de défense antioxydant complexe. Ces systèmes antioxydants comprennent divers mécanismes enzymatiques et non enzymatiques, jouant un rôle très important dans la signalisation des espèces réactives de l'oxygène chez les végétaux (Vranová et al., 2002). La réponse antioxydante des plantes au stress oxydatif dû à la présence du métal peut être variable et dépendante du type de plante et du métal en question. Les enzymes antioxydantes (CAT, GPX, APX, GR et SOD) ont été étudiées chez de nombreux végétaux supérieurs et inférieurs comme le riz, le blé, les petits pois, les tomates et les mousses (Panda and Choudhury, 2005) (Sbartai et al., 2008) (Yahyaoui et al., 2018).

3.5.1 Les métallothionéines, les phytochélatines et les acides organiques

La majorité des éléments traces métalliques : Cr, Cd, Zn, Fe, Al, Pb et As sont connus par leur réactivité et leur toxicité vis-à-vis des cellules vivantes. Certains d'entre eux, notamment, le Cu, Zn et Fe sont des micronutriments essentiels impliqués dans plusieurs mécanismes physiologiques mais deviennent toxiques d'une concentration donnée. Les plantes ont développé des mécanismes complexes impliquant la chélation et la séquestration des ions métalliques par une classe particulière de liaisons des ligands métalliques phytochélatines libellés (PC) et les métallothionéines (MTS), pour le contrôle de l'absorption et l'accumulation des métaux (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Les métallothionéines ont un rôle possible dans la désintoxication du chrome dans les plantes et il a été rapporté pour le sorgho que les métalloprotéines sont exprimées sous contrainte du chrome (Shanker, 2004). Les métallothionéines sont le produit de traduction de l'ARNm qui se caractérisent par un faible poids moléculaire riche en cystéine (ligand qui lie les métaux).

Les phytochélatines (PCs) sont (comme les métallothionéines (MT) et certains acides organiques) des agents de chélation naturels, c'est-à-dire capables de fixer les métaux et métalloïdes. Les phytochélatines sont responsables de la tolérance des plantes aux ions métalliques notamment au cadmium (Cd^{2+}) (Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Les acides organiques comme l'acide citrique, l'acide aspartique et l'acide oxalique peuvent convertir les ions métalliques inorganiques en se liant organiquement, ce qui les rend soluble pendant une période de temps plus longue et, par conséquent disponible pour les plantes (James and Bartlett, 1983). D'autres acides organiques peuvent jouer un rôle important dans la désintoxication des métaux mais leurs

mécanismes ne sont pas encore complètement compris (Patra et al., 2005).

Dans cette étude notre choix s'est porté sur le cadmium.

4. Le Cadmium

4.1. Origines et utilisation du cadmium

Le cadmium est un métal blanc argenté avec des teintes de bleu appartenant à la famille des métaux de transition. Le cadmium élémentaire a un numéro atomique de 48 et une masse atomique de 112,4 g ; il se trouve souvent associé dans les roches aux éléments du même groupe, comme le zinc et le mercure. La valence du Cd^{2+} est la valence la plus souvent rencontrée dans l'environnement et est vraisemblablement la seule valence du cadmium dans les systèmes aqueux (McLaughlin and Singh, 1999).

Naturellement, le cadmium n'est pas très abondant dans la croûte terrestre. Dans les sols non pollués, son contenu est généralement entre 0,1 et 2 ppm et la plupart du temps il est inférieur à 1 ppm (Kabata-Pendias, 2011). Les processus naturels d'érosion et d'altération de la roche mère, ainsi que le transport par les fleuves et dans l'air des particules contribuent au cycle naturel du cadmium. Le volcanisme de surface et sous-marin participe aussi à la libération du cadmium dans l'environnement.

Or, les activités anthropiques contribuent depuis la moitié du 20^{ème} siècle à augmenter les teneurs en Cd dans les sols, les principales sources de contamination des sols étant les pratiques agricoles telle que l'utilisation excessive des produits chimiques: fongicides, insecticides et herbicides qui peuvent contenir plusieurs métaux toxiques comme le Cu, Cd, Zn et Pb et donc contribuer à la contamination des terres agricoles (Z. L. He et al., 2005)

Néanmoins, au cours de la dernière décennie, plusieurs gouvernements conscients du risque des produits chimiques, ont émis des réglementations limitant la présence de métaux lourds dans ces produits. D'autre part l'utilisation répétée d'eaux usées d'origine domestique et industrielle, en agriculture peut donc contribuer à l'accumulation de ce métal dans les sols (Z. L. He et al., 2005). En outre l'enrichissement des sols en engrais minéraux contaminés par du cadmium, essentiellement les phosphates, constitue une autre source de pollution des sols agricoles. En effet, les teneurs en Cd^{2+} des engrais phosphatés sont dans la plupart des cas supérieures aux normes. Certains engrais phosphatés contiennent plus de 50 mg de Cd/Kg (Prasad and Strzalka, 2013). En Algérie, le cadmium est très répandu dans ces engrais qui contiennent plus de 13 mg Cd/Kg (Ghnaya et al., 2005a).

Malgré leur richesse en matière organique pouvant constituer un apport intéressant en éléments essentiels (N, P et K) pour les sols, les boues d'épuration et les composts des déchets urbains et

industriels renferment du cadmium à des niveaux parfois élevés. L'utilisation de ces engrais insuffisamment purs en agriculture est une des causes de la pollution des sols par le cadmium (McBride and Cherney, 2004).

De plus, le cadmium est un métal à usage industriel, ainsi les retombées atmosphériques provenant de l'activité industrielle et du trafic urbain contribuent à la pollution des sols et des eaux de surface et souterraines. Ces retombées représentent une source principale de contamination par le cadmium dans les zones urbaines (Z. He et al., 2005)

Le rejet des déchets industriels contribue aussi à la pollution des sols et des eaux par le cadmium. Il s'agit essentiellement du cadmium renfermé dans des déchets industriels variés stockés sur des anciennes friches industrielles ainsi que le cadmium contenu dans les produits en fin de vie comme les batteries et les piles à Cd/Ni ou de celui existant dans des effluents liquides issus des usines (Zorrig, 2011). Il est utilisé pour la métallisation anticorrosion des surfaces (cadmiage) et il entre dans la fabrication des accumulateurs électriques (batteries et piles), des pigments, des stabilisateurs de matières plastiques et des alliages (INERIS, 2005).

4.2. Circulation du cadmium dans le sol

Les conséquences écologiques d'une pollution métallique sont fortement dépendantes de la solubilité et de la mobilité du métal dans le profil de sol (Redon, 2009). Dans le sol, le cadmium se trouve sous les formes chimiques suivantes : Cd^{2+} , CdSO_4 , CdCl^+ , CdHCO^+ , CdO , CdCO_3 , $\text{Cd}(\text{PO}_4)_2$, CdS . Cependant, Cd^{2+} peut former des complexes avec les principaux acides organiques carboxyliques (acide citrique, oxalique, malique) susceptibles de se trouver dans les zones superficielles des sols cultivés. Ces associations modifient son comportement aux interfaces et peuvent faciliter, dans certaines conditions son entraînement avec la phase liquide. Dans les sols calcaires, la faible solubilité du carbonate de cadmium (CdCO_3) limite fortement la concentration de l'ion libre (Cd^{2+}) en solution du sol. Dans ce cas, les carbonates (CaCO_3) constituent également une phase de sorption dominante qui contrôle la distribution de l'élément cadmium et sa biodisponibilité dans le milieu (Zorrig, 2011).

Le sol peut avoir à l'égard des éléments minéraux trois réactions différentes : stockage (insolubilisation, adsorption), libération « par le haut » (transmission aux plantes) ou libération « par le bas » (transfert dans les eaux souterraines ou la roche-mère) (Koller, 2009). De nombreux facteurs tels que le pH, la teneur en matières organiques et la présence d'autres éléments minéraux influencent fortement la disponibilité du cadmium pour les plantes (Fodor, 2002). Seule une fraction du cadmium total est disponible ; le cadmium est dissous dans le sol sous forme hydratée et complexée par les ligands organiques ou inorganiques, se situant dans la gamme des nanomoles dans la plupart des sols

(Clemens, 2006).

4.3 Absorption, accumulation et translocation du cadmium dans la plante

Selon leurs aptitudes à tolérer, à absorber ou à accumuler le cadmium dans les tissus, les plantes peuvent être caractérisées d'indicatrices, d'exclusives ou d'accumulatrices voire d'hyperaccumulatrices. Chez les plantes indicatrices, le prélèvement et le transport du cadmium dépendent linéairement de la concentration dans le sol et la concentration du cadmium dans la plante reflète celle du sol. Chez les plantes exclusives, la concentration du cadmium dans la plante est nettement inférieure à celle que l'on peut observer dans le sol. A l'inverse, chez les plantes accumulatrices ou hyperaccumulatrices la concentration du cadmium est nettement supérieure à celle que l'on observe dans le sol (Beygi and Jalali, 2019, Sterckeman et al., 2019b).

4.3.1 Absorption du Cadmium

L'absorption du cadmium par les racines est déterminée par la concentration en cadmium du sol et par sa disponibilité biologique. Seule une fraction du cadmium est disponible pour l'absorption. Le cadmium dissous dans la solution du sol, sous forme d'ions libres hydratés et complexés par des ligands organiques et inorganiques, est présent dans la plupart des sols dans une gamme de concentrations proche de la nanomole (Prasad and Strzalka, 2013). De nombreux facteurs tels que le pH du sol, le contenu en matières organiques et la concentration des autres éléments minéraux peuvent influencer fortement la fraction de cadmium disponible. En effet, l'absorption du cadmium semble être en compétition avec des éléments tels que K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Ni pour les mêmes transporteurs transmembranaires (Clemens, 2006).

Au niveau des racines, le continuum apoplastique de l'épiderme et du cortex est facilement perméable aux solutés. La paroi des cellules de la couche de l'endoderme agissant comme une barrière pour la diffusion apoplastique, les solutés doivent alors passer dans le symplasme racinaire avant qu'ils ne puissent entrer dans le xylème. Le transport membranaire du cadmium dans les cellules est alors vraisemblablement réalisé par des transporteurs d'autres ions divalents en particulier du fer et du zinc (Clemens, 2006) mais probablement aussi par les canaux à calcium (Clemens, 2006). Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, le transporteur du fer ferreux IRT1 (Iron Regulated Transporter), qui appartient à la famille ubiquitaire ZIP de transporteurs de métaux (Zinc Regulated Transporter/IRT Related proteins), pourrait contribuer à l'influx racinaire de différents cations dont le cadmium (Clemens, 2006). Par ailleurs, chez l'hyperaccumulateur *Thlaspi caerulescens*, le transport du zinc, réalisé par le transporteur *ZNT1*, appartenant aussi à la famille ZIP, s'avère également capable de prendre en charge le cadmium (Clemens, 2006).

Une autre famille de transporteurs de métaux permettant potentiellement l'entrée du cadmium est constituée par la famille *Nramp* (protéines de macrophages associées à la résistance naturelle) (Thomine et al., 2000). La surexpression du gène *AtNramp3* chez *Arabidopsis thaliana* lui confère une hypersensibilité au cadmium (Thomine et al., 2000) et le transporteur *Nramp3* serait localisé au niveau du tonoplaste (Clemens, 2006). Normalement, les ions cadmium sont majoritairement retenus dans les racines et seules, de petites quantités sont transportées vers les parties aériennes (Cataldo et al., 1988).

4.3.2 Accumulation du Cadmium

L'absorption du Cd par les plantes dépend d'un système à médiation métabolique et compétitif avec le système d'absorption du Zn et, éventuellement d'autres métaux. Une grande partie du Cd absorbé par les plantes est retenue dans la racine, mais une portion est transférée vers les parties aériennes de la plante et dans les graines. La quantité de Cd accumulée et transférée varie selon les espèces et selon les cultivars au sein d'une même espèce (Chong and Wang, 2001)

A l'échelle de la plante, il a généralement moins de Cd dans les feuilles que dans les racines, et encore moins dans les fruits et dans les graines (Clemens, 2006).

A l'échelle cellulaire, deux compartiment cellulaires semblent jouer un rôle important dans le stockage et la localisation du cadmium : les parois cellulaires et les vacuoles (Zorrig, 2011).

4.3.3 Translocation du Cadmium

Après son efflux dans le xylème, le cadmium, libre et lié aux phytochélatines, est transporté vers les parties aériennes de la plante par la sève xylémienne (Gong et al., 2003). Dans les plantes normales, la teneur en Cd des feuilles est comprise entre 0,1-3 µg / g de matière sèche (M.S), chez les plantes qui l'excluent, elle est de 0,03 µg / g M.S. et chez les plantes accumulatrices, de 20 µg / g MS. (Gadd, 2001). La plus grande partie du cadmium accumulée reste dans les racines, seules de petites quantités sont transportées vers les parties aériennes. Ainsi, chez le blé, 78 % du cadmium sont retenus dans les racines (Zhang et al., 2000). En général, la teneur en cadmium des plantes diminue dans l'ordre suivant : racines>tiges> feuilles>fruits>graines. L'accumulation de cadmium dans les fruits reste controversée. Pour (Hemantaranjan, 2018), bien que le cadmium soit facilement transporté vers les parties aériennes des plants de tomate, aucune détection de Cd n'était faite dans les fruits. A l'opposé, (Wenzel et al., 1996) émettent l'hypothèse d'une accumulation de cadmium dans les fruits, pouvant résulter d'une redistribution par le phloème.

4.4 Phytotoxicité du cadmium

N'ayant aucun rôle physiologique connu à ce jour, le cadmium ne possède pas de voie d'entrée ou de

sortie qui lui soit spécifique. Il agit donc en mimant les métaux physiologiques afin de traverser les membranes cellulaires. Parmi les différentes voies de pénétration connues se trouve IRT *Nramp* qui est un transporteur protéique permettant l'import de fer. Ce transporteur a été identifié comme impliqué dans l'absorption du cadmium dans les végétaux. D'ailleurs, une carence en fer induite par une surexpression de ferritine conduit à augmenter le prélèvement de Cd, Mn et Zn (Vansuyt et al., 2000).

Dans la plante, la quantité de métal accumulée dépend de l'organe : Un gradient d'accumulation semble s'établir selon les organes : Racines > Feuilles > Tiges > Inflorescence > Graines ; mais cet ordre varie selon les espèces. Le cadmium est fortement accumulé au niveau de la partie souterraine, organe en contact direct avec le métal, chez la plupart des espèces végétales (Mishra et al., 2006) (Liu et al., 2007). D'ailleurs, certains auteurs ont suggéré que cette accumulation racinaire pourrait être une stratégie pour limiter son transport vers la partie aérienne et donc défendre le système aérien de l'intoxication par le métal (Jarvis et al., 1976). La capacité des feuilles à accumuler ce métal peut aussi dépendre de leur âge (Souguir, 2009).

Ainsi le cadmium est un élément non nécessaire pour les plantes et il est hautement toxique. Sa toxicité est considérée de 2 à 20 fois plus élevée que celle des autres métaux lourds (Das et al., 1997) et pour (Påhlsson, 1989) il constitue le quatrième élément métallique le plus toxique pour les plantes vasculaires après le zinc, le cuivre et le plomb. Cependant, la sensibilité à l'égard du cadmium varie suivant les espèces et même les cultivars d'une même espèce. Bien qu'un nombre restreint de plantes tolèrent et/ou accumulent de fortes teneurs de ce métal, toutes les plantes manifestent des symptômes de toxicité qui apparaissent également chez les plantes tolérantes pour de plus fortes concentrations en métal (Fodor, 2002) (Weber et al., 2019).

Chez les plantes, le cadmium n'a aucune fonction biologique connue (Pokorny et al., 2004), et il est toxique à de faibles concentrations (de la Rosa et al., 2004). Les symptômes que présente une plante cultivée en présence de cadmium sont l'inhibition de la croissance, la diminution de sa biomasse, la chlorose, la nécrose, la perturbation des flux d'eau, la déficience en phosphore et en azote, l'accélération de la sénescence, l'apparition du retard dans le développement des jeunes pousses et des perturbations de la photosynthèse (Cosio et al., 2006) (Clemens, 2006) (Zorrig, 2011).

Parmi les symptômes visibles, le cadmium induit une inhibition de la croissance de différentes parties des plantes. Ainsi, il produit une réduction de la biomasse des différents organes chez des plants très variés. On peut en citer quelques exemples : le haricot et le pois (Romero-Puertas et al., 2004) (Chaoui et al., 2004), le tournesol (Groppa et al., 2007), le riz (Fodor, 2002) (Aina et al., 2007), la saule et le peuplier (Lunáčková et al., 2003), l'ail (Liu et al., 2003), la tomate (Sbartai, 2008), le blé et l'orge

(Alayat et al., 2014), l'atriplex (Badache et al., 2015), et des plantes du genre *Brassica* comme le colza (Larsson et al., 1998) et la moutarde indienne (Haag-Kerwer et al., 1999). Ces inhibitions de la croissance s'accompagnent de changements anatomiques, structuraux et ultra-structuraux importants au niveau des feuilles, mais également des racines (Lunáčková et al., 2003) (Patel et al., 2005). La réduction de l'élongation racinaire peut être causée par une inhibition de la division cellulaire et de la synthèse des polysaccharides pariétaux (Ernst et al., 1992) (Punz and Sieghardt, 1993). L'exposition à long terme au cadmium produit au niveau des feuilles, l'apparition du phénomène de chlorose due à une diminution de la teneur en chlorophylle (Fodor, 2002).

L'inhibition de la croissance par le cadmium est interprétée de différentes façons : altération de l'équilibre hydrique de la plante ou/et effets direct et indirect sur la photosynthèse, processus primaire fournisseur d'énergie chez les plantes (Myśliwa-Kurdziel and Strzałka, 2002). En effet, à la réduction de la teneur en chlorophylle induite par le cadmium, s'ajoute une inhibition directe de l'activité des photosystèmes et de l'assimilation du CO₂ par la Rubisco (Romanowska, 2002). De plus, la disponibilité en CO₂ peut être réduite par un abaissement de la conductance des stomates observée dans certains cas, sous l'effet du cadmium (Ali et al., 2000) (Sandalio et al., 2001). L'augmentation de la résistance des stomates entraîne obligatoirement une baisse de la transpiration et donc de l'absorption et de la distribution des macro- et microéléments dans la plante (Krupa et al., 2002), en particulier du potassium et des nitrates (Fodor, 2002). La conséquence directe en est alors une réduction de la croissance (Haag-Kerwer et al., 1999).

4.5 Stress oxydant

Le stress oxydatif, appelé aussi stress oxydant, se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les systèmes oxydants et les capacités antioxydantes (figure I-2) de l'organisme en faveur des premiers, ce qui conduit à des dommages cellulaires irréversibles (Pincemail et al., 2002) (Wang et al., 2019).

La particularité des végétaux réside dans le fait qu'ils sont des producteurs de l'oxygène, molécule à la fois vitale et nocive. La présence de cette molécule entretient de surcroît toute une chaîne de réactions radicalaires ayant pour conséquence la génération de molécules oxydantes couramment appelées "espèces réactives de l'oxygène : *Reactive oxygen species* (ROS)". Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ceci

explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule (Ramel, 2009).

Dans tous les systèmes vivants aérobies, ces espèces sont produites habituellement par voie endogène durant le métabolisme cellulaire (Kumari and Kakkar, 2008). Dans les cellules végétales, les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes sont les principales sources génératrices des ROS (Lamb and Dixon, 1997). Ces espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent engendrer des dommages importants dans la structure et le métabolisme cellulaire en dégradant de nombreuses cibles : protéines, lipides et acides nucléiques (Pincemail et al., 2002) (Cadenas and Davies, 2000).

L'appellation ROS incluent les radicaux libres de l'oxygène : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Garrel et al., 2007). L'anion superoxyde et le radical hydroxyle sont très instables par comparaison au H_2O_2 qui diffuse librement et possède une durée de vie plus longue. La réactivité d'un radical dépend de sa nature. Ainsi, parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire ($O_2^{\cdot-}$) n'est pas très réactif mais constitue un des radicaux précurseurs pouvant être activés en d'autres espèces plus réactives. Sa faible réactivité permet son utilisation par l'organisme comme médiateur régulant des fonctions biologiques (Nzengue, 2008). Par contre, les radicaux comme les peroxydes (ROO^{\cdot}) ou surtout le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules biologiques. Le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) est formé principalement par la dégradation du H_2O_2 en présence de métaux de transition sous leur forme réduite, ainsi le H_2O_2 associé à du fer ferreux conduit à la réaction de Fenton :



Ces ROS possèdent des caractéristiques bien distinctes. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas un radical libre extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production (Garait, 2006). Le H_2O_2 est caractérisé par une stabilité et une concentration dans les tissus cellulaires plus élevées que les autres ROS de l'ordre de micromolaire au milimolaire en fonction des différents compartiments cellulaires (Cheeseman, 2006). Quant à l'oxygène singulet (1O_2) est une autre espèce oxygénée très réactive. C'est une molécule à l'état excité qui peut réagir avec différents accepteurs d'électrons pour produire des peroxydes. L'oxygène singulet n'apparaît que dans des cas particuliers comme pendant les processus de photosensibilisation ou une molécule excitée transfère son énergie à l'oxygène et l'active en oxygène singulet. Il a pour cible biologique les membranes, les acides nucléiques et les protéines (Nzengue, 2008).

Le cadmium, à l'inverse des métaux de transition tels que le fer et le cuivre, ne participe pas directement à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), à savoir par les réactions de Fenton et d'Haber-Weiss. Cependant, c'est un métal hautement réactif qui stimule la formation des ROS, conduisant au développement d'un stress oxydatif secondaire (Siedlecka and Krupa, 2002). Les ROS sont en effet capables d'oxyder les groupes thiols des protéines, affectant ainsi l'activité de nombreuses enzymes (Flohé and Harris, 2007), mais aussi de provoquer la peroxydation des lipides, conduisant à une altération des fonctions des membranes. En outre, la modification par le cadmium de la composition des phospholipides des membranes contribue également à la modification de leurs propriétés (Fodor, 2002) (Romero-Puertas et al., 2004). Les symptômes du stress oxydatif dus au cadmium sont en fait une conséquence de sa liaison avec GSH, produisant un épuisement du glutathion réduit et l'empêchant ainsi d'assurer sa fonction d'élimination des ROS (Clemens, 2006) (Aoun, 2008).

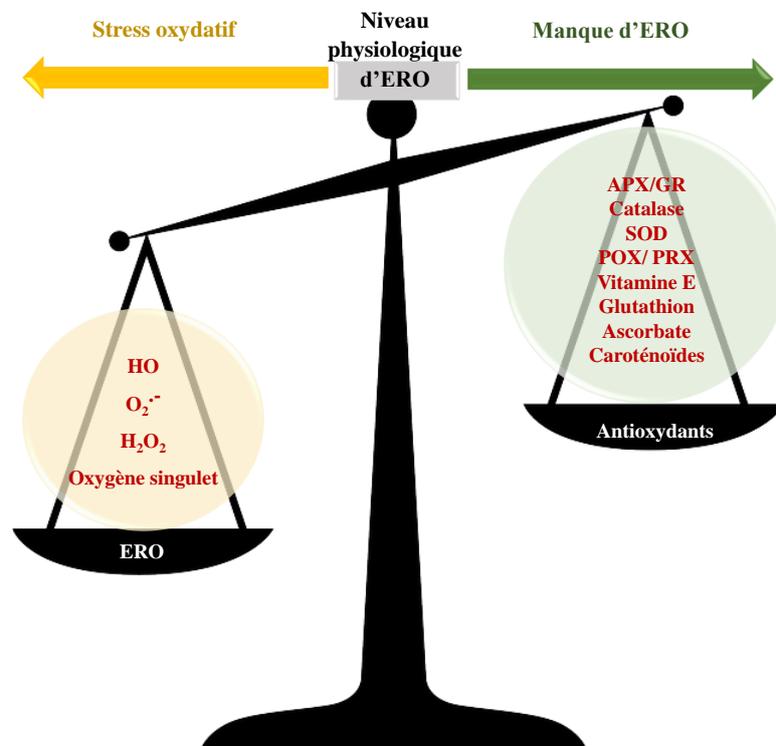


Figure I-2: Schématisation de la balance entre les espèces réactives oxygénées (ROS) et les antioxydants. (Clemens, 2006)

4.6 Les différentes stratégies de défense

Les plantes ont mis en œuvre des mécanismes particuliers incluant l'inactivation des métaux par chélation et par leur exclusion des compartiments cellulaires dans lesquels ils sont toxiques. Ceci suppose cependant que les métaux sont séquestrés dans des organites spécifiques comme les vacuoles ou dans certaines structures telles que les trichomes (Clemens, 2006).

4.6.1 La chélation et la séquestration du cadmium

4.6.1.1 Les chélateurs spécifiques

a) Les métallothionéines

Les métallothionéines (MT), petites protéines riches en cystéines, jouent également un rôle important de désintoxication du cadmium dans les cellules de mammifères (Hamer, 1986). Les métallothionéines sont codées par des gènes qui sont classés en deux groupes (*MT1* et *MT2*). Chez certaines plantes supérieures, l'existence de deux autres types de métallothionéines a été observée, *MT3* et *MT4* en plus des classes 1 et 2 de métallothionéines (Terry and Banuelos, 1999). Les métallothionéines des plantes peuvent conférer une tolérance aux métaux une fois exprimée chez la levure, et quelques-unes d'entre elles sont régulées positivement dans des conditions d'excès métallique (Rauser, 1999, Cobbett and Goldsbrough, 2002). Néanmoins, une participation des métallothionéines à la désintoxication du cadmium chez les plantes n'est pas certaine (Cobbett and Goldsbrough, 2002; Nzengue, 2008). Alternativement, les métallothionéines peuvent fonctionner comme antioxydants et probablement intervenir dans la réparation de la membrane plasmique (Salt et al., 1998).

b) Les phytochélatines

Les voies de séquestration du métal dans la racine jouent un rôle en déterminant la vitesse de translocation vers les parties aériennes de la plante. Après l'entrée dans le cytosol, le cadmium, qui présente une forte affinité pour les thiolates, est en grande partie chélaté par le glutathion ou par des peptides dérivés du glutathion : les phytochélatines mais aussi par des acides organiques comme le citrate (Clemens, 2006).

Les phytochélatines (PCs) sont des peptides de faible poids moléculaire qui présentent une forte affinité pour les métaux bivalents, essentiellement le Cd^{2+} (Clemens, 2006). Les phytochélatines ont été découvertes pour la première fois chez la levure *Schizo saccharomyces pombe* (Kondo et al., 1984), puis chez les plantes (Grill et al., 1985) et les algues (Hanikenne, 2003). Ces peptides sont synthétisés en réponse à la présence d'ions métalliques libres dans le cytoplasme. Ils sont synthétisés à partir du glutathion par la phytochélatine synthase (PS) (Zhu et al., 1999). Le cadmium forme avec les phytochélatines des complexes de faible masse moléculaire (*Low Molecular Weight, LMW*). Le complexe PC-Cd (LMW) n'affecte pas le métabolisme au niveau du cytoplasme. Il est acheminé vers la vacuole. Une fois dans la vacuole, les complexes PC-Cd (LMWs) s'agrègent les uns aux autres par des ponts sulfures pour former des complexes de masse moléculaire élevée (*High Molecular Weight (HMW)*) (Clemens, 2006) (DalCorso et al., 2008). Ce cycle se termine par la dissociation de ces complexes, à cause du pH vacuolaire, provoquant la libération des ions Cd^{2+} qui seront pris en charge

par les acides organiques présents, tels que le malate, le citrate ou encore l'oxalate. Les phytochélatines sont recyclées et réexportées dans le cytoplasme pour capter d'autres ions et les réacheminer dans la vacuole (Sanità di Toppi and Gabbrielli, 1999). D'une manière plus générale, l'exposition au Cd induit une remarquable augmentation de la quantité de composés contenant des groupements thiols (Astolfi et al., 2004).

c) Les autres chélateurs

Outre les métallothionéines et les phytochélatines d'autres composés semblent être impliqués dans la complexation des ions métalliques au niveau cellulaire : les acides carboxyliques, les acides organiques comme le citrate, l'oxalate ou le malate et les acides aminés comme l'histidine et la proline. Ils peuvent avoir un rôle important dans la tolérance des plantes aux métaux et dans la détoxification de ces éléments (Rauser, 1999) (Clemens, 2006) (Sharma and Dietz, 2006). À titre d'exemple, des complexes Cd-citrate ont été identifiés dans la sève xylémique collectée chez la tomate traitée par le cadmium (Senden et al., 1995). Le système racinaire des plantes peut aussi excréter ou exsuder dans le sol des molécules organiques diverses tels que les phytosidérophores en quantité assez importante pour mobiliser certains ions nutritifs. Les phytosidérophores peuvent jouer un rôle important pour la nutrition minérale des végétaux, en participant à la mobilisation de micronutriments tels que Fe, Zn et Cu. Une fois introduit dans la plante, le chélat formé avec le phytosidérophore est dissocié et le métal libéré. Ce même processus peut s'appliquer probablement au cadmium, vu sa grande similitude avec le zinc (Shanker et al., 2005).

D'autres petites molécules comme la nicotianamine (dérivé de la méthionine et résultant de l'oligomérisation de trois S-adenosyl méthionines) peuvent fixer les métaux de transition tel que le cuivre ou bien le fer (Curie et al., 2009), mais il n'existe pas à ce jour de travaux qui montrent clairement l'implication de ce type de molécule dans la chélation du cadmium.

d) La séquestration avec les antiports $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$

Outre la séquestration du cadmium par l'intermédiaire de chélateurs spécifiques, un deuxième mécanisme de séquestration vacuolaire de cadmium reposant sur l'activité de transporteurs de Cd^{2+} a été à plusieurs reprises discuté (Zorrig, 2011). Ainsi, un antiport $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$ présent sur la membrane tonoplastique a été décrit dans les racines d'avoine (Salt and Wagner, 1993). Cet antiport présente une faible affinité pour le cadmium mais qui est similaire à celle de l'antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$. Cette similitude soulève la question de la nature de l'antiport $\text{Cd}^{2+}/\text{H}^{+}$: s'agit-il d'un nouvel antiport ou plutôt d'une substitution du Ca^{2+} par Cd^{2+} au niveau de l'antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ (Krämer, 2005). Une deuxième question peut être posée concernant le degré d'implication de ces antiports dans la séquestration du cadmium,

sachant que la majeure partie du cadmium forme des complexes avec les phytochélatines (Vatamaniuk et al., 2001).

4.6.2 Autres stratégies de défense

D'autres stratégies pourraient être impliquées dans la tolérance des plantes aux métaux lourds en général comme l'évitement ou la réduction de l'absorption (Meharg and MacNair, 1992), l'efflux actif à partir du cytoplasme (Kim et al., 2007) et la fixation des métaux dans le compartiment apoplasmique (Gadd, 2001). Pour le cadmium, l'accumulation de ce métal dans les feuilles âgées pourrait également être considérée comme une stratégie de tolérance au cadmium. En général, la teneur en cadmium dans les feuilles augmente avec l'âge des feuilles (Zorrig, 2011). Par exemple, chez *Armeria maritima*, la teneur en cadmium des feuilles âgées est 3 à 8 fois supérieure à celle des jeunes feuilles (Dahmani-Muller et al., 2000).

L'accumulation du cadmium dans les trichomes pourrait également être considérée comme une stratégie de tolérance au cadmium (Salt et al., 1995). Enfin, le cadmium pourrait induire une biosynthèse d'éthylène dans les racines et les feuilles. L'éthylène serait alors un messenger stimulant la lignification limitant de ce fait les flux de cadmium dans les systèmes vasculaires et accélérant la réponse antioxydante par induction de l'activité ascorbate peroxydase (APX), ainsi que par la synthèse des chélateurs.

5. Technique 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 and 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).

5.1 Méthodes physico-chimiques

Jusqu'à présent, la majorité des sites contaminés par des métaux étaient traités par plusieurs approches physico-chimiques telles que l'excavation et le stockage, la fixation ou encore le lessivage du sol (Salt et al., 1995). Ces différentes méthodes altèrent significativement la qualité agronomique des sols contrairement aux méthodes biologiques (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., 1998) 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 (Ferret, 2012).

5.2 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).

5.2.1 La bioremédiation

Les techniques de bioremédiation utilisent les propriétés dépolluantes de microorganismes (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 (Kadukova et al., 2008a) (Fig I-3).



Figure I-3: Cercle de la bioremédiation

5.2.2 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. Les différentes études réalisées à ce jour permettent d'envisager six types de stratégies de Phytoremédiation particulièrement prometteuses (Fig. I-4).

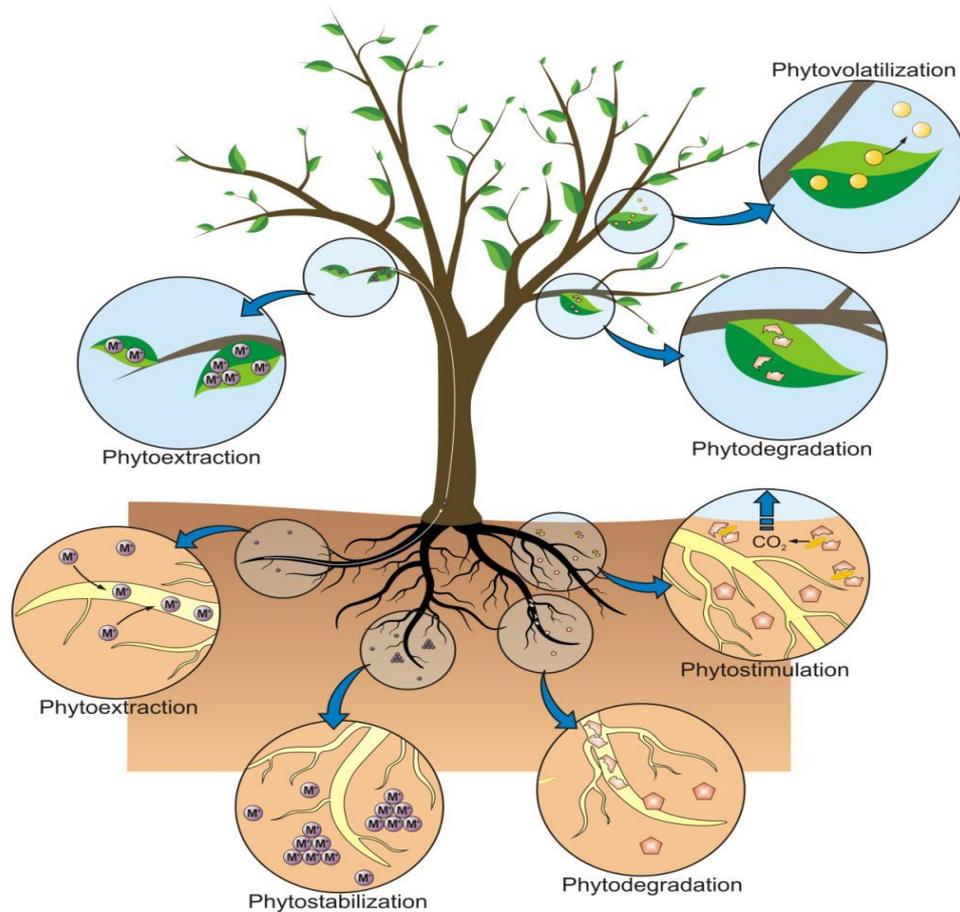


Figure I-4: Différentes formes de Phytoremédiation (*alchimiaweb.com*)

5.3 Les différents procédés de la phytoremédiation

5.3.1 La Phytovolatilisation

Elle ne consiste pas en une technique de dépollution mais de dispersion des contaminants (Krämer, 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 (Krämer, 2005). Les techniques de phytovolatilisation sont variées comme l'utilisation d'espèces phréatophytes², par exemple, dans le cas

² Phréatophytes : espèces présentant des taux d'évapo-transpiration importants.

du sélénium, (Van Huysen et al., 2003) ou même encore le couplage avec des bactéries dans le cas du mercure (Rugh et al., 1996).

5.3.2 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. 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., 1995). Elle peut être appliquée aux traitements des eaux de surface, aux nappes phréatiques, aux effluents industriels et résidentiels ainsi qu'aux eaux de drainage (Fig. I-5).

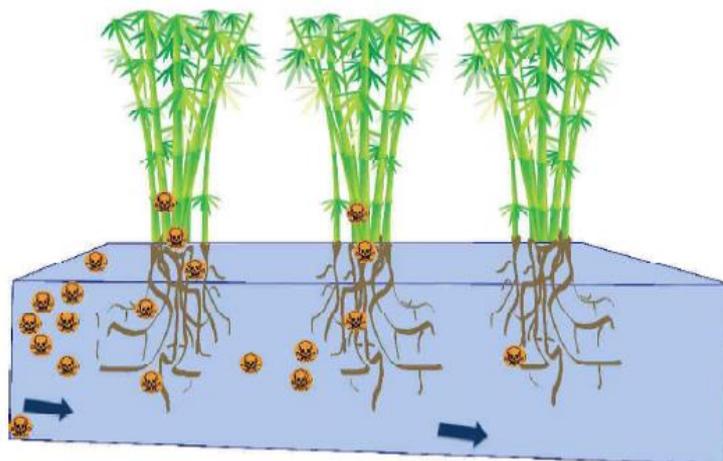


Figure I-5: Système de rhizofiltration (Salt et al., 1995).

5.3.3 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 (Panfili et al., 2005) (Vervaeke et al., 2003), ce qui limite l'érosion et le lessivage des polluants (Santibáñez 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 (Raskin et al., 1997). 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., 1995) et ceci afin de limiter la propagation des métaux dans la chaîne alimentaire (Ribeta et al., 1995).

5.3.4 La Phytodégradation

La phytodégradation (ou phytotransformation) repose sur l'effet rhizosphère qui stimule la dégradation des composés organique des sols. Cette décomposition est réalisée grâce à des enzymes variées, internes ou sécrétées par la plante (Peer et al., 2006).

5.3.5 La phytoextraction

La phytoextraction représente la seule voie biologique d'extraction *in situ* des métaux. Cette technique est basée sur le prélèvement des métaux par leurs racines et de les transporter ensuite vers les parties aériennes (Xiaomel et al., 2005) (Mackova et al., 2006), où ils sont généralement séquestrés sous la forme de complexe dans les vacuoles (Montargès-Pelletier et al., 2008). Cette voie de décontamination des sols a été testée au laboratoire puis au terrain, avec la découverte d'espèces nouvelles pour l'extraction de métaux toxiques comme le cadmium (Schwartz et al., 2003).

Dans son principe, la Phytoextraction consiste à cultiver des plantes accumulatrices, avec une forte production de biomasse, ou des plantes hyperaccumulatrices afin de réduire la concentration en métaux assimilable dans le sol (Bani et al., 2007) (Badache et al., 2015).

6. Utilisation des halophytes en phytoremédiation

6.1 Plantes accumulatrices et hyperaccumulatrices

Les plantes hyperaccumulatrices sont des espèces capables d'accumuler des teneurs élevées en métaux lourds dans leurs organes aériens, à des concentrations 10 à 100 fois plus élevées que celles tolérées par la plupart des plantes (Baker and Brooks, 1989) (Alharby et al., 2018) :

- ✓ 10 µg de Hg/g de MS (matière sèche) ;
- ✓ 100 µg de Cd/g de MS ;
- ✓ 1000 µg d'As, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Se/g de MS ;
- ✓ 10 000 µg de Mn, Zn/g de MS.

L'hyperaccumulation a été confirmée par la mesure de teneurs qui, rapportées à la biomasse sèche aérienne, étaient supérieures à 0,2 % pour le Cd, 1,2 % pour le Co, 3,8% pour le Ni et 4 % pour le Zn

(Krämer and Chardonnens, 2001). Cependant, l'hyperaccumulation implique trois processus majeurs (Alharby et al., 2018):

- ✓ Absorption rapide des métaux par les racines,
- ✓ Taux élevé de translocation des racines vers les parties aériennes,
- ✓ Capacité élevée de stockage par compartimentation dans la vacuole.

Avec plus de 397 espèces végétales répertoriées, les plantes hyperaccumulatrices appartiennent à 45 familles différentes (Salt et al., 1998) et environ 75% de ces espèces accumulent préférentiellement le Ni se développant sur des sols à serpentine (Gratão et al., 2005). La plupart des hyperaccumulateurs appartiennent à la famille des Brassicaceae, famille qui ne possède pas d'associations mycorhiziennes (McGrath et al., 2002). *Thlaspi caerulescens* est considéré comme une espèce modèle. Métallophyte endémique, hyperaccumulatrice principalement du Cd, Zn et Ni, elle constitue l'une des espèces les plus étudiées car elle possède les trois caractéristiques énoncées ci-dessus (Zhao et al., 2002) (Badache et al., 2015).

Selon (Baker, 1981), il existe trois catégories de plantes pouvant pousser sur des sols métallifères tels que les sols de serpentine (contenant Co, Cr, Mg, Mn et Ni), les sols sélénifères (sols riches en Se), uranifères, ou calaminaires (sols riches en Cd et Zn) (Raskin et al., 1994)

- ✓ Les exclusives qui maintiennent une faible concentration en métaux dans leurs feuilles quelle que soit la teneur du sol et qui sont principalement utilisées en phytostabilisation ;
- ✓ Les accumulatrices et hyperaccumulatrices qui accumulent les métaux dans leurs parties aériennes indépendamment de la concentration du sol ;
- ✓ Les indicatrices dont le prélèvement en métaux reflète la concentration du sol jusqu'à ce que la teneur dans le sol leur soit toxique.

6.1.1 Cas des halophytes

Le terme halophyte (du grec « *halo* » : sel et « *phyt(o)* » : plante) définit un organisme végétal qui vit, croît et se reproduit naturellement dans un milieu salin. Par opposition, un glycophyte (du grec « *glyco* » : sucré) ne peut croître en milieu salin. L'halophilie est l'aptitude d'une espèce végétale à réaliser son cycle de développement en milieu fortement salin. Les halophytes sont des plantes naturellement tolérantes aux sels solubles et poussent aussi bien dans un environnement salin qu'en conditions normales (Malcolm et al., 2003).

Les halophytes ont la capacité de réexpédier l'excès de sel présent dans leurs feuilles vers les racines par l'intermédiaire de la sève descendante (*excluder*). Par ce mécanisme d'exclusion, couplé à des

systèmes de transport sélectif permettant d'absorber les ions nutritifs utiles et de ré-excréter les ions Na^+ , la plante empêche les sels de remonter dans la sève jusqu'aux feuilles (Badache et al., 2015b) (Ghnaya et al., 2005a). Un second mécanisme de tolérance aux sels est présent dans les feuilles, il s'agit de l'inclusion (*Includer*).

Les halophytes utilisent les sels pour ajuster la pression osmotique de leurs cellules. Elles laissent donc monter les sels dans leurs parties aériennes pour les stocker dans les vacuoles et les isoler des constituants cellulaires vitaux (Parida and Das, 2005)

À l'échelle de la plante entière, les ions chlorure de sodium, qui sont souvent en excès dans les solutions des sols salés, entrent par les racines et sont véhiculés par la sève xylémique jusqu'aux tiges et aux feuilles. Par la suite, ils sont soit stockés (dans le cas des plantes de type *includer*), soit, au contraire, ils sont revéhiculés par la sève phloémique jusqu'aux racines (dans le cas des plantes de type *excluder*). Les ions chlorure de sodium pénètrent dans les cellules de la racine, puis circulent à travers le cortex racinaire jusqu'à la stèle (voie symplasmique), où ils sont sécrétés dans le xylème comme les autres ions minéraux (Chen et al., 2002). Chez les espèces du genre *Atriplex*, il y a une translocation préférentielle des ions Na^+ vers les parties aériennes (Bajji et al., 1998). Le transport du sel peut se faire par la voie symplastique ou par la voie apoplastique. Le transport symplastique se ferait par le biais de vésicules de pinocytose et d'exocytose contenant le sel dans le cytoplasme.

Chez de nombreuses halophytes (*Chenopodiaceae*), la résistance au stress salin est associée à la présence d'organes spécialisés tels que les poils vésiculaires (trichomes) et les glandes excrétrices à la surface des feuilles qui leur donnent un aspect blanchâtre plus ou moins luisant (Malcolm et al., 2003). Ces structures anatomiques sont spécialisées dans l'élimination du Na^+ qui arrive au niveau des feuilles à travers le xylème puis au niveau du mésophylle. Le Na^+ est emmagasiné dans ces trichomes avant qu'il ne soit excrété par la dégénérescence de ces derniers, empêchant ainsi l'accumulation toxique de ce cation dans les tissus foliaires (Barhoumi et al., 2007).

Les poils vésiculaires sont constitués d'un pédicelle unicellulaire ou pluricellulaire portant une tête distendue. Les cellules de ces poils possèdent en plus du réticulum endoplasmique de l'appareil de Golgi et de nombreux chloroplastes, de petites vacuoles (vésicules) qui joueraient un rôle dans le transport des sels (ces vésicules semblent être plus développées dans le cas des plantes cultivées sur un milieu riche en sels solubles). Les plasmodesmes, qui favorisent le transport des ions entre les cellules, sont nettement visibles à l'intérieur de la cellule. Grâce à l'utilisation des sels de potassium marqué, il a été montré dans le cas d'*Atriplex spongia* et *Atriplex nummularia* que les poils vésiculaires sont plus riches en sels que le limbe des feuilles (Acosta et al., 2018) (Al-shareef and Tester, 2019). Des cristaux

de sels se forment dans ces cellules vésiculaires, faisant éclater la cellule, permettant le rejet du sel à la surface de la feuille. La présence de ces poils pourrait également aider la plante à diminuer son évapotranspiration et assurer une protection contre une illumination trop intense (Malcolm et al., 2003). En général, les systèmes cellulaires responsables du transport d'ions chez les végétaux sont encore peu caractérisés aux niveaux génétiques ou moléculaires. C'est pourquoi les mécanismes qui conditionnent la circulation et la répartition du NaCl à l'échelle de la plante entière ou à l'échelle cellulaire sont encore peu élucidés (Munns, 2005) (Al-shareef and Tester, 2019).

6.2 Mécanismes de tolérance au stress abiotique chez les halophytes

Au cours de leur évolution, les plantes halophytes des régions arides se sont adaptées à des conditions xériques, tels la sécheresse des sols, la salinisation intense et les basses températures hivernales (Shevyakova et al., 2003). La capacité des halophytes à s'adapter à des environnements caractérisés par un excès d'ions toxiques (principalement le sodium et le chlorure) repose principalement sur leurs capacités à localiser des ions toxiques dans des organes métaboliquement inactifs et des compartiments cellulaires, pour synthétiser des osmolytes compatibles, et induire des systèmes antioxydants (Shevyakova et al., 2003) (Zemanová et al., 2016). Par conséquent, on peut supposer que les halophytes sont des espèces végétales tolérantes aux métaux lourds, possèdent en général deux mécanismes spécifiques de tolérance aux stress abiotiques (Shevyakova et al., 2003). La tolérance des halophytes au stress salin est liée à leur capacité à synthétiser des osmoprotecteurs afin de maintenir un gradient de potentiel favorable à l'absorption de l'eau et de protection des structures cellulaires (Lefèvre et al., 2009).

Une attention particulière est accordée à la proline, dont un grand nombre de données suggère que cette dernière est accumulée dans les cellules en réponse de Cd, Cu, et d'autres métaux lourds (Shevyakova et al., 2003) (Lefèvre et al., 2009) (Nedjimi and Daoud, 2009). En outre, dans une étude récente, (Lefèvre et al., 2009) ont démontré pour la première fois que la présence de cadmium peut déclencher une production plus abondante (sous stress) de la glycine-bétaïne (*glycinebetaine oversynthesis*) qui est une osmoprotectrice synthétisée par les *Chenopodiaceae* considérée comme étant la plus efficace. La capacité des halophytes à synthétiser ces osmoprotecteurs peut être impliquée dans leur tolérance aux métaux lourds (Lefèvre et al., 2009).

Cependant, la résistance à la sécheresse contribue indirectement à la tolérance aux métaux lourds, car le stress métallique est responsable du stress hydrique secondaire chez les plantes, de la même manière que le stress salin (Zhou and Qiu, 2018).

La résistance des plantes halophytes au stress salin est généralement en corrélation positive avec le

système antioxydant (Zhu et al., 2004) et, par conséquent, les halophytes sont plus capables à résister au stress métallique par rapport à d'autres espèces (Shah et al., 2001) (Verma and Dubey, 2003).

En outre, les halophytes ont été proposés pour remédier naturellement aux contraintes environnementales (sont mieux adaptés), y compris les métaux lourds par rapport aux plantes cultivées sensibles au sel, comme le tournesol (*Helianthus annuus*), le maïs (*Zea mays* L.), pois (*Pisum sativum* L.) et la moutarde (*Brassica juncea* L.) communément choisis à des fins de phytoextraction (Jordan et al., 2002) (Ghnaya et al., 2005b). Comme il a été signalé au paragraphe précédent, Au niveau des feuilles, les halophytes présentent des organes spécialisés tels que les poils vésiculaires (trichomes) et les glandes excrétrices. Ces structures anatomiques sont spécialisées dans l'élimination de l'excès d'ions toxiques nuisibles à la photosynthèse et ajuster la concentration d'ions du tissu végétal (Morkunas et al., 2018) (Lefèvre et al., 2009).

Des études ont révélé que dans certains cas, ces tissus glandulaires des halophytes ne sont pas toujours spécifiques pour Na^+ et Cl^- ; mais elles peuvent accumuler d'autres éléments toxiques tels que le cadmium, le zinc, le plomb et le cuivre (Manousaki and Kalogerakis, 2011). Cependant, l'excrétion des métaux à partir des tissus de la feuille semble être une méthode efficace pour faire face à l'excès des métaux chez les halophytes. Par exemple, des travaux de plusieurs auteurs sur une halophyte facultative *Tamarix aphylla* L. ont montré que les trichomes (glandes excrétrices) ne sont pas sélectifs envers le sodium et le chlorure, mais sécrètent, également, des ions Cd et Li, et les types de sels sécrétés sont directement liés à la composition de l'environnement des racines (Hagemeyer and Waisel, 1988) (Moura et al., 2019).

En plus des espèces halophytes, la présence des métaux lourds tels que le Cd, Zn, Mn et le Pb a été détectée dans les trichomes des espèces non-halophytes comme le tabac *Nicotiana tabacum* L. (Choi et al., 2001) (Sarret et al., 2006), *Brassica juncea* (Mayer et al., 1995), le tourne sol *Helianthus annuus* L. (Blamey et al., 2015), et *Arabidopsis halleri* (Küpper et al., 2000).

6.2.1 La phytoremédiation et les métaux lourds

Les halophytes sont potentiellement résistants non seulement aux sels mais aussi aux métaux lourds ainsi qu'à d'autres contraintes telles que la chaleur et la sécheresse. Un grand nombre de ces espèces peuvent croître sur des terres de qualité médiocre (sols caractérisés par une mauvaise structure et une faible fertilité) ce qui permet leur utilisation dans le domaine de la phytoremédiation avec des coûts d'exploitation moins onéreux (Manousaki and Kalogerakis, 2011). Par exemple, certaines espèces d'*Atriplex* accumulent le molybdène (Mo) et le sélénium (Se) en grandes quantités, dans ce cas la plante pourrait être capable d'en assurer la volatilisation des terres contaminées (Carolyn Watson et al., 1994).

Cependant, et comme il a été mentionné précédemment, certaines plantes tolérantes au sel sont en mesure d'accumuler des métaux, offrant des opportunités à la recherche dans le domaine de phytoextraction (figure I-6). En effet, des études récentes ont porté sur la phytoextraction ou la phytostabilisation chez des plantes halophytes telles que *Atriplex halimus* L. (Manousaki and Kalogerakis, 2009) (Nedjimi and Daoud, 2009), *Mesembryanthemum crystallinum* (Shevyakova et al., 2003) (Ghnaya et al., 2005b), *Sesuvium portulacastrum* (Ghnaya et al., 2007) et *Tamarix smyrnensis* Bunge (Kadukova et al., 2008) (Manousaki et al., 2009) (Manousaki et al., 2008). L'ensemble de ces études confirment le fait que les halophytes devraient recevoir de plus en plus l'attention des chercheurs dans le domaine de la phytoremédiation dans le proche avenir.

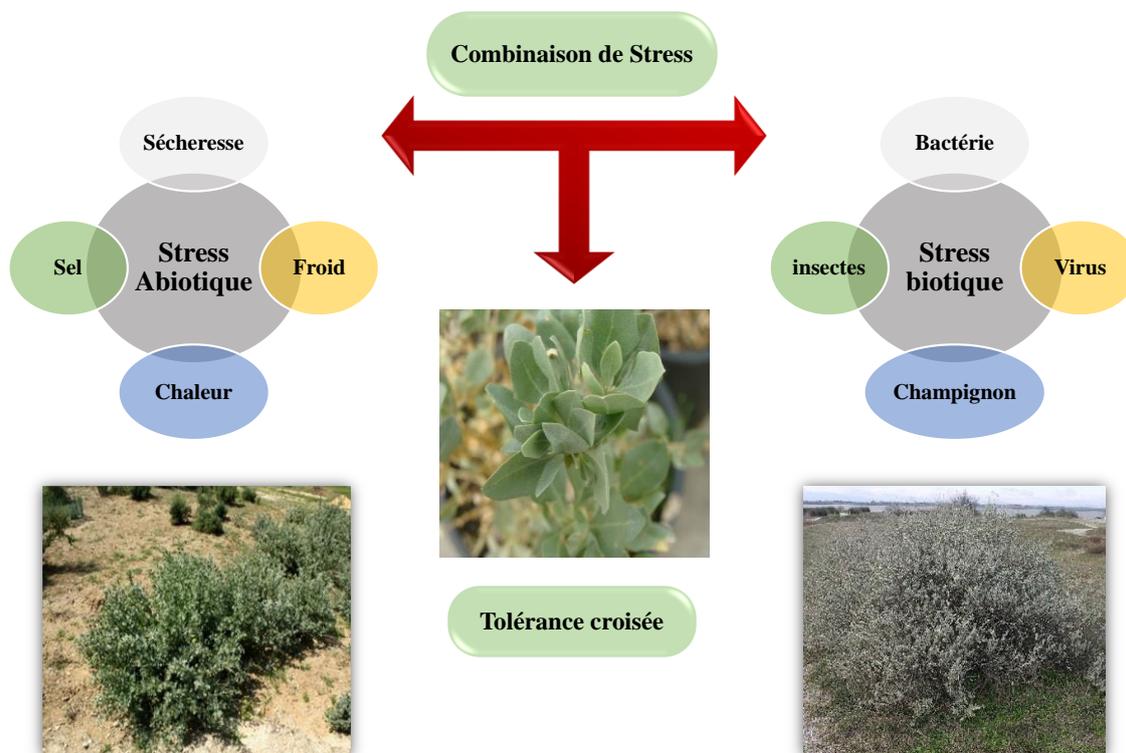


Figure I-6: La tolérance croisée au stress chez les halophytes notamment le genre *Atriplex*

D'après plusieurs auteurs, les plantes halophytes peuvent être considérées comme des candidates prometteuses pour l'immobilisation ou l'élimination des métaux lourds non seulement des sols ordinaires, mais aussi des sols salins (Manousaki and Kalogerakis, 2009) (Nedjimi and Daoud, 2009) (Manousaki et al., 2009).

Des résultats récents indiquent que certaines espèces tolérantes à la salinité ont la capacité à excréter des métaux toxiques par des glandes excrétrices (spécialisées) à la surface des feuilles, qui leurs donnent un aspect blanchâtre plus ou moins luisant (figure I.7), comme une méthode de désintoxication

des métaux. Le terme « phyto-excrétion" a été introduit récemment dans la littérature comme un nouveau processus de phytoremédiation utilisé pour les sites contaminés par des métaux (Kadukova et al., 2008) (Manousaki et al., 2008).



Figure 1.7: Des cristaux de sels du cadmium et du plomb sécrétés par les glandes excrétrices sur les feuilles de *Tamarix smyrnensis* (Kadukova et al., 2008)

6.2.2 La phytoremédiation et les sols salins

La salinité du sol est l'une des principales contraintes environnementales qui limitent la production végétale dans les régions arides, elle est souvent associée à la sécheresse et elle entraîne une réduction des surfaces cultivables (Le Houerou, 1977)

La FAO (2006, 2014) estime que 7 à 10 % des terres agricoles dans le monde (920 millions d'hectares) sont affectées par les sels solubles. Par ailleurs, 25 % environ des terres irriguées sont confrontées au problème de la salinité (Hopkins, 2001). Tenant compte du fait que le rendement est contrôlé par l'interaction entre le potentiel génétique d'une plante et son environnement physique, deux solutions seraient possibles pour valoriser les sols salés. D'une part, il est possible d'agir sur le sol lui-même, en éliminant l'excès de sels solubles qu'il contient (Kotzer, 2005). Cette opération nécessite une disponibilité en eau de qualité acceptable, elle exige des investissements importants pour la mise en place d'un réseau de drainage pour évacuer les sels solubles du profil. D'autre part, il est possible de valoriser les sols salés par la culture de plantes résistantes aux conditions salines et qui présentent un intérêt agricole (Masters et al., 2007).

Cependant, les halophytes ont la capacité d'accumuler des concentrations très élevées de sels et Na^+ dans leurs parties aériennes. De ce fait, les halophytes sont des candidates idéales pour la phytoremédiation des sols salins (Manousaki and Kalogerakis, 2011), et d'après (Khan and Duke, 2001.), les *Atriplex* peuvent être utilisés pour désaliniser les sols. En effet, il est donc possible selon

(Barrett-Lennard, 2002) d'extraire d'un hectare d'*Atriplex* 1000 kg de NaCl des horizons superficiels en une année de culture. De même, (Ghnaya et al., 2005b) ont montré que pour un rendement de biomasse de 20 à 30 tonnes par hectare et par an, la teneur de NaCl atteint jusqu'à 40 % de la matière sèche pour l'*Atriplex nummularia*. Donc, il est possible d'extraire d'un hectare d'*Atriplex* 1100 kg de sel NaCl des couches superficielles du sol en une année de culture (Le Houerou, 1977). Des résultats similaires ont conduit les chercheurs à penser que les halophytes pourraient être cultivées sur des sols salins, pour permettre la récupération des zones salées (Khan, 2000) (Owens, 2001) (Keiffer and Ungar, 2002) (Goyal and Manoharachary, 2014) (Ravindran et al., 2007).

6.3 Les plantes du genre *Atriplex*

Le genre *Atriplex* appartient à la famille des *Chenopodiaceae*, il comprend près de 420 espèces réparties dans les diverses régions arides du monde, les zones tempérées, méditerranéennes et subtropicales, entre 20 et 50° de latitude Nord et Sud (Le Houerou, 1977). En Algérie, l'*Atriplex* est spontané dans les étages bioclimatiques semi-arides et arides. Les plus grandes superficies correspondent aux zones dites steppiques (Batna, Biskra, Bousaâda, Djelfa, saïda, Tebessa et Tiaret) (Pouget, 1980). Les zones arides et semi-arides sont les loges écologiques préférentielles de la plupart des espèces du genre *Atriplex*. Toutes ces espèces présentent des adaptations particulières à ce type d'habitat. En effet, l'introduction d'arbustes fourragers résistants à l'aridité est l'un des moyens utilisés pour la valorisation des sols dégradés. En raison de leur intérêt écologique et pastoral, les espèces du genre *Atriplex* ont particulièrement retenu l'attention des organismes étatiques (Moura et al., 2019) (Al-shareef and Tester, 2019). Les *Atriplex* sont les arbustes les mieux adaptés aux régions arides et aux sols pauvres. La couverture d'*Atriplex* accroît considérablement la perméabilité des sols et l'augmentation de drainage dans les horizons superficiels. Elle permet la reconstitution d'un tapis végétal herbacé (Herrero Isern, 1992).

Le genre *Atriplex* est un halophyte présentant une photosynthèse en C4. Néanmoins, les plantes en C4 possèdent des caractéristiques anatomiques leur permettant d'augmenter le taux de CO₂ dans les cellules photosynthétiques tout en diminuant la transpiration (Wang et al, 2008). Vues en coupe, les feuilles des plantes en C4 contiennent deux types de cellules particulières, les cellules de la gaine fasciculaire autour des faisceaux et les cellules du mésophylle autour des cellules de la gaine fasciculaire. La physiologie des plantes en C4 leur confèrent une protection contre les fortes températures (les enzymes thermosensibles se trouvant dans la gaine fasciculaire) et une faible photorespiration (le taux de CO₂ étant suffisamment élevé pour que le Rubisco ne fonctionne qu'en carboxylase) (Meinzer & Zhu 1999). Les plantes en C4 ont une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau que les plantes en C3 en conditions d'illumination et de température élevées (Broetto et al, 2007).

7. Références

- Acosta, J.A., Abbaspour, A., Martínez, G.R., Martínez-Martínez, S., Zornoza, R., Gabarrón, M., Faz, A., 2018. Phytoremediation of mine tailings with *Atriplex halimus* and organic/inorganic amendments: A five-year field case study. *Chemosphere* 204, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.04.027>
- Adriano, D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Aina, R., Labra, M., Fumagalli, P., Vannini, C., Marsoni, M., Cucchi, U., Bracale, M., Sgorbati, S., Citterio, S., 2007. Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environmental and Experimental Botany* 59, 381–392. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2006.04.010>
- Alayat, A., Souiki, L., Grara, N., Djebbar, M.R., Boumedris, Z.E., Benosmane, S., Amamra, R., Berrebbah, H., 2014. Effects of Cadmium on Water Content, Soluble Protein, Proline Changes and Some Antioxidant Enzymes in Wheat (*Triticum durum* desf.) Leaves. 1 3835–3847. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2014/10641>
- Alharby, H.F., Colmer, T.D., Barrett-Lennard, E.G., 2018. Salinization of the soil solution decreases the further accumulation of salt in the root zone of the halophyte *Atriplex nummularia* Lindl. growing above shallow saline groundwater. *Plant, Cell & Environment* 41, 99–110. <https://doi.org/10.1111/pce.12958>
- Ali, G., Srivastava, P.S., Iqbal, M., 2000. Influence of Cadmium and Zinc on Growth and Photosynthesis of *Bacopa monniera* Cultivated in vitro. *Biologia Plantarum* 43, 599–601. <https://doi.org/10.1023/A:1002852016145>
- Alloway, B.J. (Ed.), 2013. Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability, 3rd ed, Environmental Pollution. Springer Netherlands.
- Al-shareef, N.O., Tester, M., 2019. Plant Salinity Tolerance, in: ELS. American Cancer Society, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001300.pub3>
- Aoun, M., 2008. Action du cadmium sur les plants de moutarde indienne [*Brassica juncea* (L.) Czern] néoformés à partir de couches cellulaires minces et issus de semis. Analyses physiologiques et rôle des polyamines. (phdthesis). Université de Bretagne occidentale - Brest.
- Astolfi, S., Zuchi, S., Passera, C., 2004. Role of sulphur availability on cadmium-induced changes of nitrogen and sulphur metabolism in maize (*Zea mays* L.) leaves. *J. Plant Physiol.* 161, 795–802. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2003.11.005>
- Badache, H., Sbartai, H., Djebbar, M.R., Manousaki, E., Bourguignon, J., 2015. Phytoextraction of Cd by *Atriplex nummularia* L., a xero-halophyte species. *International Journal of Biosciences (IJB)* 6, 130–139.
- Bai, J., Zhao, Q., Wang, W., Wang, X., Jia, J., Cui, B., Liu, X., 2019. Arsenic and heavy metals pollution along a salinity gradient in drained coastal wetland soils: Depth distributions, sources and toxic risks. *Ecological Indicators* 96, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.08.026>
- Bajji, M., Kinet, J.M., Lutts, S., 1998. Salt stress effects on roots and leaves of *Atriplex halimus* L. and their corresponding callus cultures. *Plant Science* 137, 131.
- Baker, A.J.M., 1981. Accumulators and excluders -strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3, 643–654. <https://doi.org/10.1080/01904168109362867>
- Baker, A.J.M., Brooks, R.R., 1989. Terrestrial Higher Plants which Hyper- accumulate Metallic Elements - A Review of their Distribution, Ecology and Phytochemistry 47.
- Bani, A., Echevarria, G., Sulçe, S., Morel, J.L., Mullai, A., 2007. 34In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). *Plant Soil* 293, 79–89. <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9245-1>
- Barhomi, Z., Djebali, W., Smaoui, A., Chaïbi, W., Abdelly, C., 2007. Contribution of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus litoralis* (Willd) Parl. *Journal of Plant Physiology* 164, 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.05.008>

- Barrett-Lennard, E., 2002. Restoration of saline land through revegetation. *Agricultural Water Management* 53, 213–226. [https://doi.org/10.1016/S0378-3774\(01\)00166-4](https://doi.org/10.1016/S0378-3774(01)00166-4)
- Beygi, M., Jalali, M., 2019. Assessment of trace elements (Cd, Cu, Ni, Zn) fractionation and bioavailability in vineyard soils from the *Hamedan, Iran*. *Geoderma* 337, 1009–1020. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.11.009>
- Bini, C., Bech, J., 2014. PHEs, Environment and Human Health: Potentially harmful elements in the environment and the impact on human health. Springer.
- Blamey, F.P.C., Hernandez-Soriano, M.C., Cheng, M., Tang, C., Paterson, D.J., Lombi, E., Wang, W.H., Scheckel, K.G., Kopittke, P.M., 2015. Synchrotron-Based Techniques Shed Light on Mechanisms of Plant Sensitivity and Tolerance to High Manganese in the Root Environment [OPEN]. *Plant Physiol* 169, 2006–2020. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00726>
- Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology* 74, 63–67. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00144-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00144-3)
- Bourrelie, H., Berthelin, J., 1998. Contamination des sols par les éléments en trace : les risques et leur gestion., Tec&Doc Lavoisier (Ed.). ed. Paris.
- Cadenas, E., Davies, K.J., 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230.
- Carolyn Watson, M., Banuelos, G.S., O’Leary, J.W., Riley, J.J., 1994. Trace element composition of *Atriplex* grown with saline drainage water. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 48, 157–162. [https://doi.org/10.1016/0167-8809\(94\)90086-8](https://doi.org/10.1016/0167-8809(94)90086-8)
- Cataldo, D.A., McFadden, K.M., Garland, T.R., Wildung, R.E., 1988. Organic Constituents and Complexation of Nickel(II), Iron(III), Cadmium(II), and plutonium(IV) in *Soybean Xylem Exudates*. *Plant Physiology* 86, 734–739. <https://doi.org/10.1104/pp.86.3.734>
- Chaignon, V., 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par de fongicides (thesis). Aix-Marseille 3.
- Chaoui, A., Jarrar, B., El Ferjani, E., 2004. Effects of cadmium and copper on peroxidase, NADH oxidase and IAA oxidase activities in cell wall, soluble and microsomal membrane fractions of pea roots. *J. Plant Physiol.* 161, 1225–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.02.002>
- Cheeseman, J.M., 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *J Exp Bot* 57, 2435–2444. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl004>
- Chen, S., Li, J., Fritz, E., Wang, S., Hüttermann, A., 2002. Sodium and chloride distribution in roots and transport in three poplar genotypes under increasing NaCl stress. *Forest Ecology and Management - FOREST ECOL MANAGE* 168, 217–230. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(01\)00743-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(01)00743-5)
- Choi, Y.-E., Harada, E., Wada, M., Tsuboi, H., Morita, Y., Kusano, T., Sano, H., 2001. Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta* 213, 45–50. <https://doi.org/10.1007/s004250000487>
- Chong, K., Wang, W.-X., 2001. Comparative studies on the biokinetics of Cd, Cr, and Zn in the green mussel *Perna viridis* and the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Environmental Pollution* 115, 107–121. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00087-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00087-2)
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88, 1707–1719. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>
- Cobbett, C., Goldsbrough, P., 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53, 159–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>
- Cosio, C., Vollenweider, P., Keller, C., 2006. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis L.*): I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 58, 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.06.017>

- Curie, C., Cassin, G., Couch, D., Divol, F., Higuchi, K., Le Jean, M., Misson, J., Schikora, A., Czernic, P., Mari, S., 2009. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters. *Ann Bot* 103, 1–11. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn207>
- Dahmani-Muller, H., van Oort, F., Gélie, B., Balabane, M., 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environ. Pollut.* 109, 231–238.
- DalCorso, G., Farinati, S., Maistri, S., Furini, A., 2008. How Plants Cope with Cadmium: Staking All on Metabolism and Gene Expression. *Journal of Integrative Plant Biology* 50, 1268–1280. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2008.00737.x>
- Das, P., Samantaray, S., Rout, G.R., 1997. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ. Pollut.* 98, 29–36.
- de la Rosa, G., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., Parsons, J.G., Cano-Aguilera, I., Gardea-Torresdey, J.L., 2004. Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere* 55, 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.01.028>
- Dushenkov, Viatcheslav., Kumar, P.B.A.Nanda., Motto, Harry., Raskin, Ilya., 1995. Rhizofiltration: The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Aqueous Streams. *Environ. Sci. Technol.* 29, 1239–1245. <https://doi.org/10.1021/es00005a015>
- Ernst, W.H.O., Verkleij, J. a. C., Schat, H., 1992. Metal tolerance in plants. *Acta Botanica Neerlandica* 41, 229–248. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1992.tb01332.x>
- Ferret, C., 2012. Rôle des *Pseudomonas fluorescents* dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation (thesis). Strasbourg.
- Filipović, L., Romić, M., Romić, D., Filipović, V., Ondrašek, G., 2018. Organic matter and salinity modify cadmium soil (phyto)availability. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 824–831. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.041>
- Flohé, L., Harris, J.R., 2007. Peroxiredoxin Systems: Structures and Functions. Springer Science & Business Media.
- Fodor, F., 2002. Physiological Responses of Vascular Plants to Heavy Metals, in: Prasad, M.N.V., Strzalka, K. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 149–177. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2660-3_6
- Gadd, G.M., 2001. Phytoremediation of toxic metals; using plants to clean up the environment. Edited by Ilya Raskin and Burt D Ensley, John Wiley & Sons, Inc, New York, 2000, 304 pp, price UK £58.80, ISBN 0 471 19254 6. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 76, 325–325. <https://doi.org/10.1002/jctb.374>
- Garait, B., 2006. Le stress oxydant induit par voie métabolique (régimes alimentaires) ou par voie gazeuse (hyperoxie) et effet de la glisodin® (phdthesis). Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- Garrel, C., Ceballos-Picot, I., Germain, G., Al-Gubory, K.H., 2007. Oxidative stress-inducible antioxidant adaptive response during prostaglandin F₂ α -induced luteal cell death in vivo. *Free Radical Research* 41, 251–259. <https://doi.org/10.1080/10715760601067493>
- Gaston, K.J., Bennie, J., Davies, T.W., Hopkins, J., 2013. The ecological impacts of nighttime light pollution: a mechanistic appraisal. *Biol Rev Camb Philos Soc* 88, 912–927. <https://doi.org/10.1111/brv.12036>
- Ghnaya, T., Nouairi, I., Slama, I., Messedi, D., Grignon, C., Abdelly, C., Ghorbel, M.H., 2005. Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Plant Physiol.* 162, 1133–1140. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.11.011>
- Ghnaya, T., Slama, I., Messedi, D., Grignon, C., Ghorbel, M.H., Abdelly, C., 2007. Cd-induced growth reduction in the halophyte *Sesuvium portulacastrum* is significantly improved by NaCl. *J Plant Res* 120, 309–316. <https://doi.org/10.1007/s10265-006-0042-3>
- Gong, J.-M., Lee, D.A., Schroeder, J.I., 2003. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatin and

- cadmium in *Arabidopsis*. PNAS 100, 10118–10123. <https://doi.org/10.1073/pnas.1734072100>
- Goyal, A., Manoharachary, C., 2014. *Future Challenges in Crop Protection Against Fungal Pathogens*. Springer.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biol.* 32, 481–494. <https://doi.org/10.1071/FP05016>
- Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H., 1985. Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. *Science* 230, 674–676. <https://doi.org/10.1126/science.230.4726.674>
- Groppa, M.D., Tomaro, M.L., Benavides, M.P., 2007. Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *Biometals* 20, 185–195. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9026-y>
- Grunst, A.S., Grunst, M.L., Pinxten, R., Eens, M., 2019. Personality and plasticity in neophobia levels vary with anthropogenic disturbance but not toxic metal exposure in urban great tits: Urban disturbance, metal pollution and neophobia. *Science of The Total Environment* 656, 997–1009. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.383>
- Haag-Kerwer, A., Schäfer, H.J., Heiss, S., Walter, C., Rausch, T., 1999. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J Exp Bot* 50, 1827–1835. <https://doi.org/10.1093/jxb/50.341.1827>
- Hagemeyer, J. (Bielefeld U. (Germany, Waisel, Y., 1988. Excretion of ions (Cd²⁺, Li⁺, Na⁺, and Cl⁻) by *Tamarix aphylla* [*Tamarix aphylla*, mineral selectivity, positive and negative ions]. *Physiologia Plantarum* (Denmark).
- Hamer, D.H., 1986. Metallothionein. *Annual Review of Biochemistry* 55, 913–951. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.55.070186.004405>
- Hanikenne, M., 2003. *Chlamydomonas reinhardtii* as a Eukaryotic Photosynthetic Model for Studies of Heavy Metal Homeostasis and Tolerance. *The New Phytologist* 159, 331–340.
- He, Z., Li, J., Zhang, H., Ma, M., 2005. Different effects of calcium and lanthanum on the expression of phytochelatin synthase gene and cadmium absorption in *Lactuca sativa*. *Plant Science* 168, 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.001>
- He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>
- Hemantaranjan, A., 2018. *Molecular Physiology of Abiotic Stresses in Plant Productivity*. Scientific Publishers.
- Herrero Isern, J., 1992. *Dégradation des sols et salinité associées à l'irrigation. Corrections apportées en Aragon (Espagne)*. Syros Alternatives.
- Hopkins, D.W., 2001. Sumner, M.E. (ed.) *Handbook of Soil Science*. *European Journal of Soil Science* 52, 167–168. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2389.2001.00373.x>
- Huang, D., Gong, X., Liu, Y., Zeng, G., Lai, C., Bashir, H., Zhou, L., Wang, D., Xu, P., Cheng, M., Wan, J., 2017. Effects of calcium at toxic concentrations of cadmium in plants. *Planta* 245, 863–873. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2664-1>
- James, B.R., Bartlett, R.J., 1983. Behavior of Chromium in Soils. VI. Interactions Between Oxidation-Reduction and Organic Complexation 1. *Journal of Environmental Quality* 12, 173–176. <https://doi.org/10.2134/jeq1983.00472425001200020004x>
- Jarvis, S.C., Jones, L.H.P., Hopper, M.J., 1976. Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. *Plant Soil* 44, 179–191. <https://doi.org/10.1007/BF00016965>
- Jordan, F.L., Robin-Abbott, M., Maier, R.M., Glenn, E.P., 2002. A comparison of chelator-facilitated metal uptake by a halophyte and a glycophyte. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2698–2704.
- Kabata-Pendias, A., 2011. *Trace Elements in Soils and Plants*., CRC Press, Boca Raton, 201-213. ed. Taylor & Francis Group.

- Kadukova, J., Manousaki, E., Kalogerakis, N., 2008. Pb and Cd accumulation and phyto-excretion by salt cedar (*Tamarix smyrnensis* Bunge). *Int J Phytoremediation* 10, 31–46. <https://doi.org/10.1080/15226510701827051>
- Keiffer, C.H., Ungar, I.A., 2002. Germination and establishment of halophytes on brine-affected soils. *Journal of Applied Ecology* 39, 402–415. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2002.00720.x>
- Khan, M., 2000. Effects of Salinity on Growth, Water Relations and Ion Accumulation of the Subtropical Perennial Halophyte, *Atriplex griffithii* var. *stocksii*. *Annals of Botany* 85, 225–232. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.1022>
- Khan, M.A., Duke, N.C., 2001. Halophytes – A resource for the future 2.
- Kim, T.-H., Jung, S.H., Cho, K.-H., 2007. Interlinked mutual inhibitory positive feedbacks induce robust cellular memory effects. *FEBS Lett.* 581, 4899–4904. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.09.020>
- Koller, E., 2009. *Traitement des pollutions industrielles*, 2eme édition. ed.
- Kondo, N., Imai, K., Isobe, M., Goto, T., Murasugi, A., Wada-Nakagawa, C., Hayashi, Y., 1984. Cadystin a and b, major unit peptides comprising cadmium binding peptides induced in a fission yeast ----- separation, revision of structures and synthesis. *Tetrahedron Letters* 25, 3869–3872. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)91190-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)91190-6)
- Kotzer, E., 2005. Artificial kidneys for the soil — solving the problem of salinization of the soil and underground water. *Desalination, Desalination and the Environment* 185, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.02.075>
- Krämer, U., 2005. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology, Plant biotechnology/Food biotechnology* 16, 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.006>
- Krämer, U., Chardonens, A.N., 2001. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 661–672.
- Krupa, Z., Siedlecka, A., Skórzynska-Polit, E., Maksymiec, W., 2002. Heavy Metal Interactions with Plant Nutrients, in: Prasad, M.N.V., Strzałka, K. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 287–301. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2660-3_11
- Kumari, A., Kakkar, P., 2008. Screening of Antioxidant Potential of Selected Barks of Indian Medicinal Plants by Multiple *in vitro* Assays. *Biomedical and Environmental Sciences* 21, 24–29. [https://doi.org/10.1016/S0895-3988\(08\)60003-3](https://doi.org/10.1016/S0895-3988(08)60003-3)
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.-J., McGrath, S.P., 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta* 212, 75–84. <https://doi.org/10.1007/s004250000366>
- Lamb, C., Dixon, R.A., 1997. The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 251–275. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.251>
- Larsson, E.H., Bornman, J.F., Asp, H., 1998. Influence of UV-B radiation and Cd²⁺ on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. *J Exp Bot* 49, 1031–1039. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.323.1031>
- Le Houerou, H.N., 1977. *Plant Sociology and Ecology Applied to Grazing Lands Research, Survey and Management in the Mediterranean Basin*, in: Krause, W. (Ed.), *Application of Vegetation Science to Grassland Husbandry, Handbook of Vegetation Science*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 211–274. https://doi.org/10.1007/978-94-010-1315-4_5
- Lear, G., Harbottle, M.J., Sills, G., Knowles, C.J., Semple, K.T., Thompson, I.P., 2007. Impact of electrokinetic remediation on microbial communities within PCP contaminated soil. *Environmental Pollution* 146, 139–146. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.09.020>
- Lear, G., Harbottle, M. J.; Sills, G.; Knowles, C. J.; Semple, K. T.; Thompson, I. P.. 2007 Impact of electrokinetic remediation on microbial communities within PCP contaminated

- soil. *Environmental Pollution*, 146 (1). 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.06.037>
<<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.06.037>>
- Lefèvre, I., Marchal, G., Meerts, P., Corréal, E., Lutts, S., 2009. Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. *Environmental and Experimental Botany* 65, 142–152.
- Liu, D., Jiang, W., Gao, X., 2003. Effects of Cadmium on Root Growth, Cell Division and Nucleoli in Root Tip Cells of Garlic. *Biologia Plantarum* 47, 79–83. <https://doi.org/10.1023/A:1027384932338>
- Liu, Y., Wang, X., Zeng, G., Qu, D., Gu, J., Zhou, M., Chai, L., 2007. Cadmium-induced oxidative stress and response of the ascorbate–glutathione cycle in *Beckermia nivea* (L.) Gaud. *Chemosphere* 69, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.04.040>
- Lunáčková, L., Šottníková, A., Masarovičová, E., Lux, A., Streško, V., 2003. Comparison of Cadmium Effect on Willow and Poplar in Response to Different Cultivation Conditions. *Biologia Plantarum* 47, 403–411. <https://doi.org/10.1023/B:BIOP.0000023884.54709.09>
- Mackova, M., Dowling, D., Macek, T. (Eds.), 2006. *Phytoremediation and Rhizoremediation, Focus on Biotechnology*. Springer Netherlands.
- Malcolm, C.V., Lindley, V.A., O’Leary, J.W., Runciman, H.V., Barrett-Lennard, E.G., 2003. Halophyte and glycophyte salt tolerance at germination and the establishment of halophyte shrubs in saline environments. *Plant and Soil* 253, 171–185. <https://doi.org/10.1023/A:1024578002235>
- Manousaki, E., Kadukova, J., Papadantonakis, N., Kalogerakis, N., 2008. Phytoextraction and phytoexcretion of Cd by the leaves of *Tamarix smyrnensis* growing on contaminated non-saline and saline soils. *Environmental Research, Special Section: 8th International Conference on the Protection and Restoration of the Environment* 106, 326–332. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.04.004>
- Manousaki, E., Kalogerakis, N., 2011. Halophytes—An Emerging Trend in Phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation* 13, 959–969. <https://doi.org/10.1080/15226514.2010.532241>
- Manousaki, E., Kalogerakis, N., 2009. Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): metal uptake in relation to salinity. *Environ Sci Pollut Res* 16, 844–854. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0224-3>
- Manousaki, E., Kokkali, F., Kalogerakis, N., 2009. Influence of salinity on lead and cadmium accumulation by the salt cedar (*Tamarix smyrnensis* Bunge). *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 84, 877–883. <https://doi.org/10.1002/jctb.2177>
- Masters, D.G., Benes, S.E., Norman, H.C., 2007. Biosaline agriculture for forage and livestock production. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 119, 234–248. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.08.003>
- Mayer, L.M., L, S.L., Sawyer, T., Plante, C.J., Jumars, P.A., Sel, R.L., 1995. Bioavailable amino acids in sediments: A biomimetic, kinetics based approach. *Limnology and Oceanography* 40, 511–520. <https://doi.org/10.4319/lo.1995.40.3.0511>
- McBride, M.B., Cherney, J., 2004. Molybdenum, Sulfur, and Other Trace Elements in Farm Soils and Forages After Sewage Sludge Application. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35, 517–535. <https://doi.org/10.1081/CSS-120029729>
- McGrath, S.P., Zhao, J., Lombi, E., 2002. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides, in: *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 1–56. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)75002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)75002-5)
- McLaughlin, M.J., Singh, B.R., 1999. Cadmium in Soils and Plants, in: McLaughlin, M.J., Singh, B.R. (Eds.), *Cadmium in Soils and Plants, Developments in Plant and Soil Sciences*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–9. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4473-5_1
- Meharg, A.A., MacNair, M.R., 1992. Genetic correlation between arsenate tolerance and the rate of influx of arsenate and phosphate in *Holcus lanatus* L. *Heredity* 69, 336–341. <https://doi.org/10.1038/hdy.1992.133>
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V., 2006.

- Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 25–37. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.01.007>
- Montargès-Pelletier, E., Chardot, V., Echevarria, G., Michot, L.J., Bauer, A., Morel, J.-L., 2008. Identification of nickel chelators in three hyperaccumulating plants: an X-ray spectroscopic study. *Phytochemistry* 69, 1695–1709. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.02.009>
- Morales Ruano, S., Martín-Peinado, F.J., Estepa Molina, C.M., Bagur-González, M.G., 2019. A quick methodology for the evaluation of preliminary toxicity levels in soil samples associated to a potentially heavy-metal pollution in an abandoned ore mining site. *Chemosphere* 222, 345–354. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.123>
- Morkunas, I., Woźniak, A., Mai, V.C., Rucińska-Sobkowiak, R., Jeandet, P., 2018. The Role of Heavy Metals in Plant Response to Biotic Stress. *Molecules* 23. <https://doi.org/10.3390/molecules23092320>
- Moura, E.S.R. de, Cosme, C.R., Leite, T. de S., Dias, N. da S., Fernandes, C. dos S., Neto, O.N. de S., Junior, F.S. de S., Rebouças, T.C., 2019. Phytoextraction of salts by *Atriplex Nummularia* Lindl. irrigated with reject brine under varying water availability. *International Journal of Phytoremediation* 0, 1–7. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019.1583633>
- Munns, R., 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167, 645–663. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01487.x>
- Myśliwa-Kurdziel, B., Strzałka, K., 2002. Influence of Metals on Biosynthesis of Photosynthetic Pigments, in: Prasad, M.N.V., Strzałka, Kazimierz (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 201–227. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2660-3_8
- Nedjimi, B., Daoud, Y., 2009. Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp. *schweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 204, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.03.004>
- Nzengue, Y., 2008. Comparaison des mécanismes de toxicité redox du cadmium, du cuivre et du zinc : place des métallothionéines et de p53 (phdthesis). Université Joseph-Fourier - Grenoble I.
- Ondrasek, G., Rengel, Z., Romic, D., 2018. Humic acids decrease uptake and distribution of trace metals, but not the growth of radish exposed to cadmium toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 151, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.055>
- Owens, S., 2001. Salt of the Earth: Genetic engineering may help to reclaim agricultural land lost due to salinisation. *EMBO reports* 2, 877–879. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve219>
- Påhlsson, A.-M.B., 1989. Toxicity of heavy metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants. *Water Air Soil Pollut* 47, 287–319. <https://doi.org/10.1007/BF00279329>
- Panda, S.K., Choudhury, S., 2005. Chromium stress in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 95–102. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202005000100008>
- Panfili, F., Manceau, A., Sarret, G., Laboudigue, A., Bert, V., Marcus, M.A., 2005. Changes in Zn speciation in the rhizosphere of graminaceous plants induced by phytostabilization of a contaminated sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta Supplement* 69, A626.
- Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 324–349. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.010>
- Patel, M.J., Patel, J.N., Subramanian, R.B., 2005. Effect of cadmium on growth and the activity of H₂O₂ scavenging enzymes in *Colocassia esculentum*. *Plant Soil* 273, 183–188. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-7402-3>
- Patra, R.C., Swarup, D., Naresh, R., Kumar, P., Shekhar, P., Ranjan, R., 2005. Cadmium level in blood and milk from animals reared around different polluting sources in India [WWW Document]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. URL <https://eurekamag.com/research/004/062/004062433.php> (accessed 4.12.19).

- Peer, W.A., Baxter, I.R., Richards, E.L., Freeman, J.L., Murphy, A.S., 2006. Phytoremediation and hyperaccumulator plants, in: Tamas, M.J., Martinoia, E. (Eds.), *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification: From Microbes to Man*, Topics in Current Genetics. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 299–340. https://doi.org/10.1007/4735_100
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56, 15–39. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>
- Pilon-Smits, E., Pilon, M., 2002. Phytoremediation of Metals Using Transgenic Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21, 439–456. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044313>
- Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J.-O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutrition Clinique et Métabolisme* 16, 233–239. [https://doi.org/10.1016/S0985-0562\(02\)00166-8](https://doi.org/10.1016/S0985-0562(02)00166-8)
- Pokorny, B., Al Sayegh-Petkovšek, S., Ribarič-Lasnik, C., Vrtačnik, J., Doganoc, D.Z., Adamič, M., 2004. Fungi ingestion as an important factor influencing heavy metal intake in roe deer: evidence from faeces. *Science of The Total Environment* 324, 223–234. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2003.10.027>
- Pouget, M., 1980. Les relations sol-végétation dans les steppes Sud-Algéroises, Travaux et Documents de l'ORSTOM. ORSTOM, Paris.
- Prasad, M.N., Strzalka, K., 2013. *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Springer Science & Business Media.
- Prasad, M.N.V., 2008. Trace Elements as Contaminants and Nutrients: Consequences in Ecosystems and Human Health. John Wiley & Sons.
- Prasad, M.N.V., Freitas, H., Fraenzle, S., Wuenschmann, S., Markert, B., 2010. Knowledge explosion in phytotechnologies for environmental solutions. *Environ. Pollut.* 158, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.038>
- Punz, W.F., Sieghardt, H., 1993. The response of roots of herbaceous plant species to heavy metals. *Environmental and Experimental Botany, The Impact of the Environment on Roots and Root Systems* 33, 85–98. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(93\)90058-N](https://doi.org/10.1016/0098-8472(93)90058-N)
- Raap, T., Pinxten, R., Casasole, G., Dehnhard, N., Eens, M., 2017. Ambient anthropogenic noise but not light is associated with the ecophysiology of free-living songbird nestlings. *Scientific Reports* 7, 2754. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02940-5>
- Ramel, F., 2009. Implication des sucres solubles dans les réponses aux stress xénobiotique et oxydatif chez *Arabidopsis thaliana* (thesis). Rennes 1.
- Raskin, I., Kumar, P.N., Dushenkov, S., Salt, D.E., 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current opinion in biotechnology* 5, 285–290. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90030-2)
- Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 221–226. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80106-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80106-1)
- Rauser, W.E., 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem. Biophys.* 31, 19–48. <https://doi.org/10.1007/BF02738153>
- Ravindran, K.C., Venkatesan, K., Balakrishnan, V., Chellappan, K.P., Balasubramanian, T., 2007. Restoration of saline land by halophytes for Indian soils. *Soil Biology and Biochemistry* 39, 2661–2664. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.005>
- Redon, P.-O., 2009. Rôle de champignons mycorhiziens à arbuscules dans le transfert du cadmium (Cd) du sol à la luzerne (*Medicago truncatula*) (phdthesis). Université Henri Poincaré - Nancy 1.
- Ribeta, I., Ptacek, C.J., Blowes, D.W., Jambor, J.L., 1995. The potential for metal release by reductive dissolution of weathered mine tailings. *Journal of Contaminant Hydrology* 17, 239–273. [https://doi.org/10.1016/0169-7722\(94\)00010-F](https://doi.org/10.1016/0169-7722(94)00010-F)

- Rizzi, L., Petruzzelli, G., Poggio, G., Guidi, G.V., 2004. Soil physical changes and plant availability of Zn and Pb in a treatability test of phytostabilization. *Chemosphere* 57, 1039–1046. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.048>
- Romanowska, E., 2002. Gas Exchange Functions in Heavy Metal Stressed Plants, in: Prasad, M.N.V., Strzałka, K. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 257–285. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2660-3_10
- Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gómez, M., Río, L. a. D., Sandalio, L.M., 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂^{·-} and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell & Environment* 27, 1122–1134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01217.x>
- Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stack, N.M., Thompson, D.M., Summers, A.O., Meagher, R.B., 1996. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial merA gene. *PNAS* 93, 3182–3187. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3182>
- Salt, D.E., Blaylock, M., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I., 1995. *Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants*. *Bio/Technology* 13, 468. <https://doi.org/10.1038/nbt0595-468>
- Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 643–668. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.643>
- Salt, D.E., Wagner, G.J., 1993. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots. Evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity. *J. Biol. Chem.* 268, 12297–12302.
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J Exp Bot* 52, 2115–2126. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2115>
- Sanità di Toppi, L., Gabbrielli, R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41, 105–130. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(98\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(98)00058-6)
- Santibáñez, 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.12.033>
- Sarret, G., Harada, E., Choi, Y.-E., Isaure, M.-P., Geoffroy, N., Fakra, S., Marcus, M.A., Birschwilks, M., Clemens, S., Manceau, A., 2006. Trichomes of tobacco excrete zinc as zinc-substituted calcium carbonate and other zinc-containing compounds. *Plant Physiol.* 141, 1021–1034. <https://doi.org/10.1104/pp.106.082743>
- Sbartai, H., 2008. Étude des effets du cadmium sur la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) : Essai in vivo et in vitro. (Thèse de Doctorat). Université d'Annaba.
- Sbartai, H., Rouabhi, R., Sbartai, I., Berrebah, H., Djebar, M.R., 2008. Induction of anti-oxidative enzymes by cadmium stress in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Afr. J. Plant Sci.* 5.
- Schwartz, C., Echevarria, G., Morel, J.L., 2003. Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil* 249, 27–35. <https://doi.org/10.1023/A:1022584220411>
- Senden, M.H.M.N., van der Meer, A.J.G.M., Verburg, T.G., Wolterbeek, H.Th., 1995. Citric acid in tomato plant roots and its effect on cadmium uptake and distribution. *Plant Soil* 171, 333–339. <https://doi.org/10.1007/BF00010289>
- Shah, K., G Kumar, R., Verma, S., Dubey, R.S., 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Science* 161, 1135–1144. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00517-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00517-9)
- Shanker, A., 2004. Expression of metallothionein 3-like protein mRNA in sorghum cultivars under chromium (VI) stress.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., 2005. Chromium toxicity in plants. *Environment international* 31, 739–753. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.02.003>

- Sharma, S.S., Dietz, K.-J., 2006. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *J Exp Bot* 57, 711–726. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj073>
- Shevyakova, N.I., Netronina, I.A., Aronova, E.E., Kuznetsov, V.I., 2003. Compartmentation of Cadmium and Iron in *Mesembryanthemum crystallinum* Plants during the Adaptation to Cadmium Stress. *Russian Journal of Plant Physiology* 50, 678–685. <https://doi.org/10.1023/A:1025652510658>
- Siedlecka, A., Krupa, Z., 2002. Functions of Enzymes in Heavy Metal Treated Plants, in: Prasad, M.N.V., Strzałka, K. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 303–324. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2660-3_12
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R.K., 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 405–412. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1244-4>
- Souguir, D., 2009. Modifications métaboliques, moléculaires et génotoxicité induites par le cadmium chez *Vicia faba* (thesis). Clermont-Ferrand 2.
- Sterckeman, T., Cazes, Y., Gonneau, C., Sirguey, C., 2017. Phenotyping 60 populations of *Noccaea caerulea* provides a broader knowledge of variation in traits of interest for phytoextraction. *Plant Soil* 418, 523–540. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3311-0>
- Sterckeman, T., Cazes, Y., Sirguey, C., 2019a. Breeding the hyperaccumulator *Noccaea caerulea* for trace metal phytoextraction: first results of a pure-line selection. *International Journal of Phytoremediation* 0, 1–8. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1537250>
- Sterckeman, T., Gossiaux, L., Guimont, S., Sirguey, C., 2019b. How could phytoextraction reduce Cd content in soils under annual crops? Simulations in the French context. *Science of The Total Environment* 654, 751–762. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.173>
- Terry, N., Banuelos, G.S., 1999. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. CRC Press.
- Thomine, S., Wang, R., Ward, J.M., Crawford, N.M., Schroeder, J.I., 2000. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4991–4996.
- Van Huysen, T., Abdel-Ghany, S., Hale, K.L., LeDuc, D., Terry, N., Pilon-Smits, E.A.H., 2003. Overexpression of cystathionine- γ -synthase enhances selenium volatilization in *Brassica juncea*. *Planta* 218, 71–78. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1070-z>
- Vansuyt, G., Mench, M., Briat, J.F., 2000. Soil-dependent variability of leaf iron accumulation in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant Physiology and Biochemistry (Paris)* 38, 499–506.
- Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T., Rea, P.A., 2001. A New Pathway for Heavy Metal Detoxification in Animals PHYTOCHELATIN SYNTHASE IS REQUIRED FOR CADMIUM TOLERANCE IN CAENORHABDITIS ELEGANS. *J. Biol. Chem.* 276, 20817–20820. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100152200>
- Verma, S., Dubey, R.S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164, 645–655. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00022-0)
- Vervaeke, P., Luysaert, S., Mertens, J., Meers, E., Tack, F.M.G., Lust, N., 2003. Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. *Environmental Pollution* 126, 275–282. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00189-1](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00189-1)
- Vidali, M., 2001. Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry* 73, 1163–1172. <https://doi.org/10.1351/pac200173071163>
- Vranová, E., Inzé, D., Van Breusegem, F., 2002. Signal transduction during oxidative stress. *J. Exp. Bot.* 53, 1227–1236.
- Wang, H., Shabala, L., Zhou, M., Shabala, S., 2019. Developing a high-throughput phenotyping method for

- oxidative stress tolerance in barley roots. *Plant Methods* 15, 12. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0397-9>
- Weber, A.M., Mawodza, T., Sarkar, B., Menon, M., 2019. Assessment of potentially toxic trace element contamination in urban allotment soils and their uptake by onions: A preliminary case study from Sheffield, England. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 170, 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.090>
- Wenzel, W.W., Blum, W.E.H., Brandstetter, A., Jockwer, F., Köchl, A., Oberförster, M., Oberländer, H.E., Riedler, C., Roth, K., Vladeva, I., 1996. Effects of soil properties and cultivar on cadmium accumulation in wheat grain. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 159, 609–614. <https://doi.org/10.1002/jpln.1996.3581590613>
- Xiaomel, L., Qttang, W., Banks, M.K., Ebbs, S.D., 2005. Phytoextraction of Zn and Cu from Sewage Sludge and Impact on Agronomic Characteristics. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 40, 823–838. <https://doi.org/10.1081/ESE-200048281>
- Yahyaoui, A., Djebbar, M.R., Khene, L., Bouarroudj, T., kahli, H., Bourayou, C., 2018. Assessment of exposure wheat triticum aestivum L. To zinc oxide nanoparticles (ZNO): Evaluation of oxidative damage [WWW Document]. [ResearchGate](https://www.researchgate.net/publication/323586692_Assessment_of_exposure_wheat_triticum_aestivum_L_To_zinc_oxide_nanoparticles_ZNO_Evaluation_of_oxidative_damage). URL https://www.researchgate.net/publication/323586692_Assessment_of_exposure_wheat_triticum_aestivum_L_To_zinc_oxide_nanoparticles_ZNO_Evaluation_of_oxidative_damage (accessed 4.2.19).
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18, 339–353. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.007>
- Zemanová, V., Pavlík, M., Pavlíková, D., Hnilička, F., Vondráčková, S., 2016. 13 Responses to Cd Stress in Two *Noccaea* Species (*Noccaea praecox* and *Noccaea caerulescens*) Originating from Two Contaminated Sites in Mežica, Slovenia and Redlschlag, Austria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 464–474. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0198-8>
- Zhang, G., Fukami, M., Sekimoto, H., 2000. Genotypic differences in effects of cadmium on growth and nutrient compositions in wheat. *Journal of Plant Nutrition* 23, 1337–1350. <https://doi.org/10.1080/01904160009382104>
- Zhao, F.-J., Hamon, R.E., Lombi, E., McLaughlin, M.J., McGrath, S.P., 2002. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* 53, 535–543. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.368.535>
- Zhou, W., Qiu, B., 2018. 17 Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (Crassulaceae) - ScienceDirect [WWW Document]. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945205001950> (accessed 11.29.18).
- Zhu, Y.L., Pilon-Smits, E.A.H., Jouanin, L., Terry, N., 1999. Overexpression of Glutathione Synthetase in Indian Mustard Enhances Cadmium Accumulation and Tolerance. *Plant Physiology* 119, 73–80. <https://doi.org/10.1104/pp.119.1.73>
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J., 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science* 167, 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.04.020>
- Zorrig, W., 2011. Research of determinants controlling cadmium accumulation in lettuce "Lactuca sativa". (Theses). Montpellier SupAgro ; Faculté des Sciences de Tunis.

Chapitre II : Matériel et méthodes

Ce chapitre (première partie de la thèse) décrit en détail les procédures expérimentales pour l'évaluation et la caractérisation de l'accumulation du cadmium chez trois espèces halo-xérophytes du genre *Atriplex*, ainsi que l'étude de leurs répercussions sur les paramètres physiologiques et biochimiques. Notre travail a été réalisé en intégralité dans le laboratoire de Toxicologie Cellulaire (LTC) de l'Université Badji Mokhtar-Annaba.

Plan du chapitre II

1.	Matériel végétal	49
1.1	<i>Atriplex halimus</i>	49
1.2	<i>Atriplex nummularia</i>	50
1.3	<i>Atriplex canescens</i>	51
2.	Le dispositif expérimental	52
3.	Méthodes d'analyses	55
3.1	Dosage des chlorophylles	55
3.2	Dosage des lipides	56
3.3	Les biomarqueurs de stress	56
3.3.1	Biomarqueurs enzymatiques.....	56
3.3.1.1	Détermination de l'activité Catalase (CAT).....	56
3.3.1.2	Détermination de l'activité Guaiacol-Peroxydase (GPX)	56
3.3.1.3	Détermination de l'activité Ascorbate -Peroxydase (APX)	57
3.3.1.4	Quantification des mesures spectrophotométriques	57
3.3.2	Biomarqueur non enzymatique.....	57
3.3.2.1	Détermination des concentrations du malondialdéhyde (MDA)	57
3.4	Caractérisation de l'accumulation chez les trois espèces	58
3.4.1	Détermination de la quantité de Cd accumulée	58
3.4.2	Détermination de la quantité du Cd et NaCl excrétée à la surface des feuilles	58
4.	Analyses statistiques des résultats	58
5.	Références.....	60

1. Matériel végétal

Trois espèces de la plante xéro-halophyte *Atriplex* ont été choisies dans notre travail, la première est *Atriplex halimus* (originaire d'Afrique, acclimatée et introduite autour du bassin méditerranéen et sur le littoral atlantique), la deuxième est *Atriplex nummularia* (originaire d'Australie, poussant sur le continent australien, ainsi dans les zones méditerranéennes arides et semi-arides), est la troisième espèce utilisée est *Atriplex canescens* (originaire de l'ouest et du Moyen-ouest des États Unis, naturalisée en Afrique du nord)

1.1 *Atriplex halimus*

Atriplex halimus est un arbuste pérenne originaire du bassin méditerranéen. Son nom vernaculaire français : pourpier de mer, arroche marine ou arroche des sables et en **Arabe** : g'ttaf. Selon le polymorphisme morphologique d'*Atriplex halimus*, cette espèce appartient à la famille des chénopodiacées (Ozenda 1983). Ce dernier se manifeste au niveau de la dimension et de la forme des feuilles, des valves fructifères, des graines (Osmond, Björkman & Anderson 1980) et dans la production de biomasse (Chatterton, McKell & Strain 1970). La plante est adaptée aux variations de température chaudes et froides et s'épanouit dans les zones recevant 150 à 500 mm de précipitations annuelles et présente une excellente tolérance à la sécheresse, à la salinité et aux sols alcalins (Lieth & Masoom 2012) d'où son utilisation en Phytoremédiation des sols argileux sodiques hautement salins (Maire, Quézel & Quézel 1967).

Elle pousse dans les sols pauvres et peu profonds, sur les pentes abruptes et dans les dépressions à argile limoneuse, les sols salins, alcalins ou gypsifères, ainsi que sur les sols lourds. C'est un arbuste à feuillage persistant de taille moyenne, de forme elliptique et arrondie, de deux mètres (m) de hauteur (Baskin & Baskin 1998).

Les feuilles sont alternes, argentées et charnues, ovales ou ovales-triangulaires (fig. II-1). Il présente des fleurs mâles, femelles et bisexuées. Les fleurs mâles sont situées au sommet des branches et les fleurs femelles sont à la base, ce qui permet à la plante de se reproduire d'elle-même (Julve 1998).

La floraison a lieu de juin à septembre et les graines mûrissent en novembre-décembre. Les graines sont noires, entourées de débris durs de la fleur (bractéoles) et recouvertes d'un revêtement extérieur vert et arrondi, également appelé utricule, qui brunit après séchage (Khan & Weber 2006). Il est utilisé comme plante de Phytoremédiation dans les sols argileux sodiques hautement salins (Maire, Quézel & Quézel 1967).

Les *Atriplex* présentent une bonne tolérance aux conditions défavorables du milieu : l'*Atriplex halimus* L. peut supporter des concentrations élevées de chlorure de sodium (NaCl) voisines de celles de l'eau de mer (30 g/l) (Baskin & Baskin 1998). Contrairement aux graines qui ne sont pas aussi

tolérantes au sel au stade de la germination. Tels les résultats de (Belkhodja & Bidai 2004) , qui rapportent que la germination des graines d'*Atriplex halimus* des sites de Djelfa et de Senia (Oran) est inhibée dès que la concentration en NaCl dépasse les 5 g/l. L'examen de la répartition du genre *Atriplex* , montre que la plupart des espèces se situent dans les régions où les précipitations annuelles varient entre 200 et 400 mm/an (Lieth & Masoom 2012). L' *Atriplex* supporte des températures minimales allant de 5 à 10°C (Froment 1972) et jusqu'à -15°C pour *Atriplex halimus* selon (Caldwell, Osmond & Nott 1977) . Selon (Froment 1972), cette espèce peut s'adapter à des milieux divers , et elles prospèrent dans les sols sableux et limoneux(Lieth & Masoom 2012). L'espèce *Atriplex halimus* s'accommode à divers types de sols mais selon (Froment 1972), elle préfère les sols limoneux.

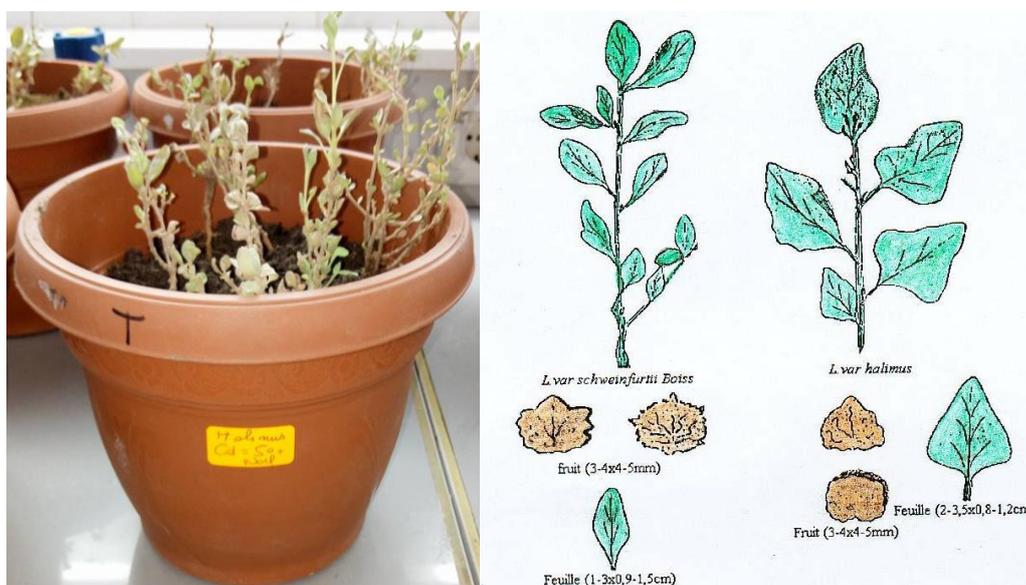


Figure II-1: *Atriplex halimus* ((Froment 1972).

1.2 *Atriplex nummularia*

Appelée communément "Old Man Saltbush" (Malan 2007), est une espèce originaire d'Australie (Qureshi & Barrett Lennard 1998). Elle est classée en première position pour la superficie occupée (Martínez, Kinet, Bajji & Lutts 2005). *Atriplex nummularia* a été introduit en Afrique du Nord vers la fin du 19^{ème} siècle. Cette espèce a été souvent utilisée particulièrement à des fins ornementales et parfois pastorales. *A. nummularia* est un arbuste dioïque, qui peut atteindre une hauteur de 1 à 3 m et une largeur de 2,4 m (Ashraf, Ozturk & Ahmad 2010). Les individus femelles sont plus feuillus que les mâles et perdent leurs feuilles plus tardivement. Les feuilles sont alternées de couleur gris verdâtre (fig. II-2). Le feuillage est persistant mais la durée de vie des feuilles paraît ne pas excéder un an. Les inflorescences femelles sont rassemblées en épis feuillés. (Dinar, Hassan, Mendelsohn, Benhin & al 2012), signalent en plus de la tolérance à la sécheresse et à la salinité déjà évoquée, sa résistance au froid (au-dessous de -10 °C). Il est généralement admis cependant que cette espèce est moins résistante au froid qu'*Atriplex canescens* et qu'elle ne convient pas très bien en Afrique du Nord aux

altitudes supérieures à 1000 mètre.



Figure II-2: *Atriplex nummularia*

L'*Atriplex nummularia* peut également être utilisé comme une ressource alimentaire intéressante pour l'alimentation et la sauvegarde des animaux élevés dans des conditions difficiles. L'avantage de cet arbuste est qu'il est à usage multiple, disponible sur pieds tout au long de l'année, génère une biomasse consommable relativement importante et joue un rôle important au niveau de la lutte contre la désertification. Sur le plan nutritionnel, il renferme des niveaux élevés d'azote et il est pauvre en substances anti-nutritionnelles (tanins) (manque auteur).

Atriplex nummularia L. est un halophyte présentant une photosynthèse en C4. Néanmoins, les plantes en C4 possèdent des caractéristiques anatomiques leur permettant d'augmenter le taux de CO₂ dans les cellules photosynthétiques tout en diminuant la transpiration (Wang, Huang, Baskin, Baskin & Dong 2008). Vues en coupe, les feuilles des plantes en C4 contiennent deux types de cellules particulières, les cellules de la gaine fasciculaire autour des faisceaux et les cellules du mésophylle autour des cellules de la gaine fasciculaire. La physiologie des plantes en C4 leurs confèrent une protection contre les fortes températures (les enzymes thermosensibles se trouvant dans la gaine fasciculaire) et une faible photorespiration (le taux de CO₂ étant suffisamment élevé pour que le Rubisco ne fonctionne qu'en carboxylase) (Meinzer & Zhu 1999). Les plantes en C4 ont une meilleure efficacité d'utilisation de l'eau que les plantes en C3 en conditions d'illumination et de température élevées (Broetto, Monteiro Duarte & Lüttge 2007).

1.3 *Atriplex canescens*

Dans sa terminologie originelle (Etats-Unis), il est connu sous le nom de « Forwingsaltbush », dans le sens de buisson salé. Son nom arabe est aussi le G'ttaf. Plante originaire du Mexique et du Canada, elle s'est largement propagée en Afrique du Nord et au Moyen-Orient. Elle est cultivée dans les étages humides et subhumides, semi-arides et arides (Caldwell *et al.* 1977). Description L'*Atriplex canescens* est un arbuste buissonnant de 1 à 3 m de hauteur, à port plus ou moins étrié, formant des touffes de

1 à 3 m de diamètre. Les rameaux blanchâtres sont étalés, ascendants ou arqués, retombants vers l'extrémité. Les feuilles courtement pétiolées ou sub-sessiles, sont alternes, et leur limbe linéaire, lancéolé est vert grisâtre (fig. II-3). Il peut atteindre 3 à 5 cm de longueur et 0,3 à 0,5 cm de largeur. Des feuilles axillaires plus petites (0,5 à 1,5 sur 0,1 à 3 cm) sont aussi présentes le long de l'axe feuillé. Les inflorescences dioïques en épis simples ou panicules sont au sommet des rameaux pour les fleurs mâles et axillaires ou en épis sub-terminaux pour les fleurs femelles. Les vêtues de 4 ailes à bords denticulés, ont des dimensions de 10 à 20 mm (Benrebiha 1987).



Figure II-3: *Atriplex canescens*

2. Le dispositif expérimental

Les plantules d'*Atriplex halimus*, *nummularia* et *canescens* (*Amaranthaceae*, anciennement famille des *Chenopodiaceae*), âgés de deux mois (Fournies par la pépinière de Thlidjen, dans la province de Tebessa, Algérie, sont transférées ensuite par lot de cinq dans des pots en plastique (21,5 cm de hauteur et 24 cm de diamètre) remplis avec la même quantité de substrat (2/3 tourbe et 1/3 sable). L'apport en oligoéléments est assuré par une irrigation régulière (une fois par semaine) de solution nutritive d'Hoagland (tableau II-2). Après deux semaines d'acclimatation sous serre, les plantes ont été traitées pendant huit semaines avec deux doses de Chlorure de Cadmium (CdCl_2 , 20 et 50 μM) en présence ou non du chlorure de sodium (NaCl , 50 mM) contre un lot témoin pour chaque espèce (tableau II-1). Les plantes traitées ont été arrosées trois fois par semaine avec 100 ml de solution contenant les différentes concentrations.

Tableau II.1: Dispositif expérimental

Concentrations de NaCl (mM)	Concentrations de Cd (μ M)	Traitements
0	[Cd0]	0 μ M Cd
0	[Cd20]	20 μ M Cd
0	[Cd50]	50 μ M Cd
50	[Cd0]	0 μ M Cd +50mM NaCl
50	[Cd20]	20 μ M Cd+50mM NaCl
50	[Cd50]	50 μ M Cd+50mM NaCl

Tableau II.2: Composition de la solution nutritive de (Hoagland & Arnon 1950)

Composants	Nomenclature	Poids en g/l
Nitrate de Potassium	KNO ₃	191,20
Nitrate de Calcium	(NO ₃) Ca 4H ₂ O	129,80
Nitrate d'ammonium	NO ₃ NH ₄	210
Sulfate de magnésium	SO ₄ Mg 7H ₂ O	61,5
Phosphate monopotassique	PO ₄ H ₂ K	54,40
Di-potassium hydrogénophosphate	PO ₄ K ₂ H 3H ₂ O	34,23
Chlorure de manganèse	Cl ₂ Mn 4H ₂ O	1,80
Sulfate de cuivre	Cu SO ₄ 5H ₂ O	0,176
Sulfate de Zinc	Zn SO ₄ 7H ₂ O	0,219
Acide borique	H ₃ BO ₃	2,861
Molybdate d'ammonium	Mo ₇ O ₂₄ (NH ₄) 7H ₂ O	0,285
Complexe ferrique	EDTA ferrique (C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₈)	0,050

Nos expérimentations, se déroulent sous conditions contrôlées : 16 h de lumière/8h d'obscurité avec une température ambiante qui varie entre 20 et 30°C (figure. II 4-7). Pour chaque traitement, 3 répétitions sont réalisées, les plantes sont récoltées après 4 puis 8 semaines de traitement.



Figure II-4: Mise en pots des plantules d'Atriplex canescens sous condition semi-contrôlées



Figure II-5: Mise en pots des plantules d'Atriplex nummularia sous condition semi-contrôlées



Figure II-6: Mise en pots des plantules d'Atriplex halimus sous condition semi-contrôlées



Figure II-7: Mise en pots des plantules des trois espèces d'*Atriplex* sous condition semi-contrôlées

3. Méthodes d'analyses

3.1 Dosage des chlorophylles

L'extraction des chlorophylles est effectuée selon la méthode de (Goodwin 1965), qui consiste en une macération du végétal dans de l'acétone. Le traitement des échantillons se fait comme suit :

On pèse 0,1 g des feuilles de la plante coupée en petits morceaux et broyées dans un mortier avec 12,5 ml d'acétone à 80% et une pincée de bicarbonate de calcium (CaCO_3). Après le broyage total, la solution est ensuite filtrée et mise dans des boîtes noires afin d'éviter l'oxydation des chlorophylles par la lumière. La lecture se fait aux deux longueurs d'onde 645nm et 663nm, après étalonnage de l'appareil avec une solution témoin d'acétone à 80%. Les équations ci-dessous nous permettent de calculer les valeurs des chlorophylles (Arnon 1949):

$$\begin{aligned} \text{Chl } a &= 12,70.\text{DO (663nm)} - 2,69.\text{DO (645nm)} \\ \text{Chl } b &= 22,90.\text{DO (645nm)} - 4,60.\text{DO (663nm)} \\ \text{Chl (a+b)} &= 8,02.\text{DO (663nm)} + 20,2\text{DO (645nm)} \end{aligned}$$

3.2 Dosage des lipides

Les lipides totaux sont dosés selon la méthode (Goldsworthy, Mordue & Guthkelch 1972). Chaque échantillon constitué de 0.5g de matière fraîche foliaire, est découpé et macéré dans 10ml de l'acide trichloroacétique acide TCA (20%). Après broyage et filtration dans des tubes à essai, 1ml de l'extrait est prélevé et centrifugé à 5000 t/min pendant 10min. On verse le surnageant et on garde, dans le même tube, le culot qui contient les lipides. On ajoute à ce dernier 1ml du mélange Ether/Chloroforme (1/1), puis on procède à une deuxième centrifugation (5000 t/min pendant 10min) qui donne deux phases : un culot (contenant les protéines) et un surnageant (contenant les lipides). On prélève 100µl du surnageant auquel on ajoute 1ml de l'acide sulfurique et on met, après agitation, les tubes dans un bain-marie à 100°C pendant 10min. Après refroidissement, on prélève encore une fois, 200µl de l'extrait, auquel on ajoute 2.5ml du mélange sulfo-phospho-vanillinique à 85% (0.38g Vanilline + 195ml acide orthophosphorique + 55ml H₂O). Cette réaction développe une couleur rose. Ainsi, la lecture en spectrophotométrie est réalisée à une longueur d'onde 530nm.

3.3 Les biomarqueurs de stress

3.3.1 Biomarqueurs enzymatiques

Préparation de l'extrait enzymatique : Les échantillons des racines et des feuilles (1 g de matière fraîche) sont homogénéisés dans un tampon phosphate (50 mM phosphate, pH = 7,8) dans un bain de glace. L'homogénat est ensuite filtré à l'aide d'une toile adéquate avant de procéder à une centrifugation à froid de 12000 g pendant 15 min (centrifugeuse Sigma 3-16 k), le surnageant est stocké à 4°C et utilisé pour les dosages enzymatiques.

3.3.1.1 Détermination de l'activité Catalase (CAT)

L'activité de la catalase (CAT) est déterminée selon (Cakmak & Horst 1991). Pour un volume final de 3 ml, le mélange réactionnel contient 100µl de l'extrait enzymatique brute, 50 µl de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0,3 % et 2,8 ml de tampon NaK (50 mM Na K, pH= 7,2). La vitesse de décomposition de H₂O₂ est déterminée en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm pendant une minute, l'étalonnage de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. L'activité Catalase est exprimée en nmol/min/mg de protéines ($\Sigma = 39,4M^{-1} cm^{-1}L$).

3.3.1.2 Détermination de l'activité Guaiacol-Peroxydase (GPX)

L'activité guaiacol - peroxydase (GPX) est déterminée spectrophotométriquement (spectrophotomètre Jenway- 6300) à 470 nm suivant le procédé de (Hiner, Raven, Thorneley, García-Cánovas & Rodríguez-López 2002), avec quelques modifications (Ali et al., 2011). Le mélange réactionnel final de 3ml, contient 100µl de l'extrait enzymatique, 100µl guaiacol (1,5% v/v), 100µl H₂O₂ (300mM) et 2,7 ml de tampon phosphate (25mM) et 2mM EDTA (pH=7,0). L'étalonnage

de l'appareil se fait en l'absence de l'extrait enzymatique. La réaction est déclenchée par l'ajout du peroxyde d'hydrogène. L'activité GPX est exprimée en nmol/min /mg de protéines ($\Sigma = 26,6 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$).

3.3.1.3 Détermination de l'activité Ascorbate -Peroxydase (APX)

Le dosage spectrophotométrique de l'activité ascorbate peroxydase est réalisé suivant la méthode (Nakano & Asada 1981). Le mélange réactionnel est constitué de 100µl d'extrait enzymatique, 0,5 mM d'ascorbate, 50 mM du tampon phosphate (pH=7,2) et 50 µl de H₂O₂ à 0,3 % et 2850 µl de tampon NaK. Ascorbate (50 mM NaK, 0,5 mM Ascorbate, pH = 7,2). L'oxydation de l'ascorbate a été déterminée par le changement de l'absorbance à 290 nm ($\Sigma = 2,8 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{L}$).

3.3.1.4 Quantification des mesures spectrophotométriques

La formule suivante est utilisée dans la quantification des différentes mesures spectrophotométriques suite aux dosages enzymatiques de la GPX, APX et CAT (Servais, 2004).

$$Act. = \frac{\Delta A \cdot V_t}{\varepsilon \Delta t \cdot L \cdot V_e \cdot p}$$

Act: Activité enzymatique en nmole/min/mg de Protéines.

ε : Coefficient d'extinction linéique molaire en M.

ΔA : Différence moyenne de l'absorbance.

V_t : Volume total du mélange réactionnel en ml.

V_e : Volume de l'extrait enzymatique en ml.

L : Largeur de la cuve de mesure en cm.

P : Teneur en protéine en mg/g.

T : Temps de lecture.

3.3.2 Biomarqueur non enzymatique

3.3.2.1 Détermination des concentrations du malondialdéhyde (MDA)

La peroxydation des lipides est estimée par l'évolution de la teneur en malondialdéhyde (MDA) déterminée selon la méthode décrite par (Draper & Hadley 1990). L'homogénéisation du tissu végétal dans l'acide trichloroacétique (TCA) 5% à raison de 10 ml pour 1g de tissu végétal est suivie d'une centrifugation pendant 15 min à 1200g. Le surnageant est ajouté à un volume égal d'acide thiobarbiturique (TBA) 0,5% dans le TCA 20%. Le mélange est incubé à 100°C pendant 25min. L'absorbance du surnageant, obtenu après centrifugation à 10000g pendant 5min, est lue à 532 nm. La densité optique est ensuite corrigée par la soustraction de l'absorbance non spécifique à 600 nm.

La concentration de MDA est calculée en utilisant son coefficient d'extinction ($155\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.4 Caractérisation de l'accumulation chez les trois espèces

3.4.1 Détermination de la quantité de Cd accumulée

La détermination de la quantité de Cd accumulée par les plantes d'*Atriplex* a été réalisée selon la méthode décrite par Moussavou Moudouma (Moussavou Moudouma 2010). Les parties aériennes et racinaires sont séchées à l'étuve à $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 72 h puis réduites en poudre au mortier. La matière sèche récupérée (100mg) est mélangée à 5 ml d'acide nitrique à 69 %. Après dégazage de l'acide pendant environ 15 min, les échantillons sont passés dans une deuxième étuve (Mimmert) selon un mode opératoire optimisé pour notre étude (augmentation de la température de 0 à $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 20 min, maintien à $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 10 min puis refroidissement pendant 20 min). Les mesures des concentrations de Cd ont été effectuées par spectrométrie d'émission atomique (Perkin-Elmer Analyst 300) sur des extraits préalablement filtrés.

3.4.2 Détermination de la quantité du Cd et NaCl excrétée à la surface des feuilles

La détermination de l'excrétion du Cd sur la surface des feuilles a été réalisée selon la méthode de (Hagemeyer & Waisel 1988). La partie supérieure de la plante est lavée avec 100 ml d'une solution d'acide nitrique 0,1 % (v/v) pendant 2 minutes. Une telle procédure de rinçage complète a été appliquée afin de dissoudre tous les composés sur la surface de la feuille et à l'intérieur des cryptes. Le dosage du Cd est réalisé par spectrométrie d'émission atomique (Perkin-Elmer Analyst 300) sur des extraits préalablement filtrés (Fig. II-8).



Figure II-8: Protocole expérimental de la détermination du cadmium excrétée à la surface de la feuille

4. Analyses statistiques des résultats

Nous avons effectué une analyse de variance afin de comparer l'impact des différentes concentrations de Cd en absence ou en présence de NaCl par rapport au témoin, et de déterminer les tendances

significatives à 1 et 2 mois. Nous avons également effectué une ANOVA à un facteur avec des niveaux de signification déterminés à $P \leq 0,05$. Lorsque les résultats étaient significatifs, un test de Tukey a été utilisé pour identifier les différences entre les groupes (a,b,c). En cas de non-normalité ou d'homogénéité des variances, les ensembles de données ont été comparés à un test de Kruskal-Wallis non paramétrique.

Toutes les analyses paramétriques et non paramétriques ont été réalisées avec le logiciel statistique INFO-STAT (Di Rienzo et al., 2012).

5. Références

- Arnon D.I. (1949) copper enzymes in isolated chloroplasts. polyphenoloxidase in beta vulgaris. *Plant Physiology* 24, 1–15.
- Ashraf M., Ozturk M. & Ahmad M.S.A. (2010) *Plant Adaptation and Phytoremediation*. Springer Science & Business Media.
- Baskin C.C. & Baskin J.M. (1998) *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Elsevier.
- Belkhodja M. & Bidai Y. (2004) La réponse des graines d'*Atriplex halimus* L. à la salinité au stade de la germination. *Science et changements planétaires / Sécheresse* 15, 331–335.
- Benrebaha F.Z. (1987) Contribution à l'étude de la germination de quelques espèces d'*Atriplex* locales et introduites.
- Cakmak I. & Horst W.J. (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83, 463–468.
- Caldwell M.M., Osmond C.B. & Nott D.L. (1977) C4 Pathway Photosynthesis at Low Temperature in Cold-tolerant *Atriplex* Species 1. *Plant Physiology* 60, 157–164.
- Chatterton N.J., McKell C.M. & Strain B.R. (1970) Intraspecific Differences in Temperature-Induced Respiratory Acclimation of Desert Saltbush. *Ecology* 51, 545–547.
- Dinar A., Hassan R., Mendelsohn R., Benhin J. & al(2012) *Climate Change and Agriculture in Africa: Impact Assessment and Adaptation Strategies*. Routledge.
- J. Di Rienzo, F. Casanoves, M. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, C. Robledo, others Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (2012).
- Draper H.H. & Hadley M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 186, 421–431.
- Froment A. (1972) Soil Respiration in a Mixed Oak Forest. *Oikos* 23, 273–277.
- Goldsworthy G.J., Mordue W. & Guthkelch J. (1972) Studies on insect adipokinetic hormones. *General and Comparative Endocrinology* 18, 545–551.
- Goodwin T.W. (1965) Chemistry and biochemistry of plant pigments. *Chemistry and biochemistry of plant pigments*.
- Hagemeyer J. & Waisel Y. (1988) Excretion of ions (Cd²⁺, Li⁺, Na⁺ and Cl⁻) by *Tamarix aphylla*. *Physiologia Plantarum* 73, 541–546.
- Hiner A.N.P., Raven E.L., Thorneley R.N.F., García-Cánovas F. & Rodríguez-López J.N. (2002) Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *Journal of Inorganic Biochemistry* 91, 27–34.
- Hoagland D.R. & Arnon D.I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station* 347.
- Julve P. (1998) Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France.
- Khan M.A. & Weber D.J. (2006) *Ecophysiology of High Salinity Tolerant Plants*. Springer Science & Business Media.
- Lieth H. & Masoom A.A.A. (2012) *Towards the rational use of high salinity tolerant plants: Vol 1: Deliberations about High Salinity Tolerant Plants and Ecosystems*. Springer Science & Business Media.
- Maire R. (1878-1949), Quézel P. (1926-2015) & Quézel P. (1967) *Flore de l'Afrique du Nord : Maroc, Algérie, Tunisie, Tripolitaine, Cyrénaïque et Sahara. Volume XIII, Dicotyledonae : Rhoedales : Cruciferae p. p / par le Dr. René Maire...* P. Lechevalier. Paris.
- Malan P.J. (2007) Selection and propagation of elite *Atriplex* material.
- Martínez J.-P., Kinet J.-M., Bajji M. & Lutts S. (2005) NaCl alleviates polyethylene glycol-induced water

- stress in the halophyte species *Atriplex halimus* L. *Journal of Experimental Botany* 56, 2421–2431.
- Meinzer F.C. & Zhu J. (1999) Efficiency of C4 photosynthesis in *Atriplex lentiformis* under salinity stress. *Functional Plant Biology* 26, 79–86.
- Moussavou Moudouma C.F.M. (2010) *Etude des mécanismes d'accumulation du cadmium chez Arabidopsis thaliana (écotype Wassilewskija) et chez un mélèze hybride (Larix x eurolepis) par des approches moléculaire et développementale.*
- Nakano Y. & Asada K. (1981) Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22, 867–880.
- Osmond C.B., Björkman O. & Anderson D.J. (1980) *Physiological Processes in Plant Ecology: Toward a Synthesis with Atriplex.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ozenda P. (1983) *Flore du Sahara.* Ed. CNRS, Paris, 622 p.
- Qureshi R.H. & Barrett Lennard E.G. (1998) Saline agriculture for irrigated land in Pakistan: a handbook. *Saline agriculture for irrigated land in Pakistan: a handbook.*
- Wang L., Huang Z., Baskin C.C., Baskin J.M. & Dong M. (2008) Germination of Dimorphic Seeds of the Desert Annual Halophyte *Suaeda aralocaspica* (Chenopodiaceae), a C4 Plant without Kranz Anatomy. *Annals of Botany* 102, 757–769.

Chapitre III : Résultats et discussion

Dans le troisième chapitre de la première partie de la thèse nous avons réalisé une comparaison entre la résistance de trois espèces halophytes : *Atriplex canescens*, *Atriplex halimus* et *Atriplex nummularia* face au stress cadmique (Cd) en plus de leur tolérance déjà connue au sel et à la sécheresse. Les plantes ont été exposées au cadmium sous forme de chlorure de cadmium (CdCl_2) en présence et en absence de sel (NaCl) pendant deux mois de traitement. La quantité de Cd accumulée a été évaluée séparément dans les racines et les feuilles ainsi que la quantité excrétée à la surface foliaire. Les paramètres physiologiques tels que la teneur en lipides, la teneur en chlorophylle et les biomarqueurs de stress, dont le malondialdéhyde et les activités enzymatiques, ont ensuite été analysés.

Plan du chapitre III

1. Résultats	64
1.1 Effet du Cd et du Cd/NaCl sur la teneur en chlorophylles	64
1.2 Effet du Cd et Cd/NaCl sur le taux des lipides	68
1.3 Effet du Cd et Cd/NaCl sur le taux de MDA	71
1.4 Effet du Cd et Cd/NaCl sur les activités enzymatiques du système antioxydant chez <i>Atriplex canescens</i> , <i>nummularia</i> , <i>halimus</i>	75
1.4.1 Effet du Cd et Cd/NaCl sur l'activité CAT	75
1.4.2 Effet du Cd et Cd/NaCl sur l'activité APX	78
1.4.3 Effet du Cd et Cd/NaCl sur l'activité GPX	81
1.5 Caractérisation de l'accumulation chez les trois espèces (<i>A. canescens</i> , <i>A. nummularia</i> et <i>A. halimus</i>)	84
1.5.1 Détermination de la quantité de Cd accumulée	84
1.5.2 Détermination de la quantité de Cd et NaCl excrétée à la surface des feuilles	88
2. Discussion	91
3. Références	96

1. Résultats

1.1 Effet du Cd et du Cd/NaCl sur la teneur en chlorophylles

D'après le tableau III-1, on observe une augmentation significative de la teneur en chlorophylles totales chez les deux espèces *A. canescens* et *A. nummularia* en fonction des différentes concentrations de CdCl₂ comparé au témoin où la plus grande valeur (35,56mg/g MF) est enregistrée pour 20µM de CdCl₂ chez *A. nummularia*. Alors que chez *A. halimus*, la teneur en chl (a+b) diminue progressivement. Il est à signaler que la présence de NaCl dans un milieu sans CdCl₂ fait décroître la teneur en chlorophylles totale chez *halimus*. Parallèlement, l'ajout de 50mM de NaCl en présence du cadmium augmente la teneur en (Chla+chlb) chez *A. canescens* et juste pour 50µM de CdCl₂/50mM de NaCl chez *A. halimus* comparée au traitement seul du cadmium alors qu'elle diminue chez *A. nummularia* quel que soit le traitement.

Après deux mois de traitements (tableau III-2), les teneurs en chlorophylles totales augmentent chez les trois espèces concernant les traitements seuls. L'ajout du sel en absence du cadmium, augmente la teneur totale en chlorophylle chez *A. halimus* et chez *A. canescens* mais la réduit fortement chez *A. nummularia* (facteur d'environ 10). De plus, le traitement au cadmium en milieu salin ne provoque pas les mêmes effets chez ces trois plantes. En effet, on n'observe qu'une variation non significative de la teneur totale en chlorophylles totales chez *A. halimus* et une diminution dose dépendante des concentrations croissante du cadmium chez *A. canescens* mais c'est *A. nummularia* qui répond le plus à ce traitement car l'augmentation de sa teneur totale en chlorophylle est radicale. Enfin, selon les tableaux 1 et 2, on peut noter que l'indicateur de stress (le quotient Chla / Chlb) a enregistré des valeurs inférieures à deux, à l'exception du traitement combiné pour *A. canescens*. Ensuite, les valeurs correspondantes enregistrées au cours du 1er mois de traitement sont légèrement supérieures à celles du deuxième mois.

Tableau III-1: Effet du cadmium combiné ou non avec du chlorure de sodium sur la teneur en chlorophylle des trois espèces d'*Atriplex* après un mois de traitement. Les données sont des moyennes des valeurs obtenues à partir de trois répétitions \pm SE. En considérant les mêmes lignes, les différentes lettres indiquent une différence significative entre les groupes de traitement selon une ANOVA à un facteur ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

Traitements CdCl ₂ [μM]		<i>A. canescens</i>				<i>A. halimus</i>				<i>A. nummularia</i>			
		Chla	Chlb	Chla+Chlb	Chla/Chlb	Chla	Chlb	(Chla+Chlb)	Chla/Chlb	Chla	Chlb	Chla+Chlb	Chla/Chlb
Sans sel	0 (Control)	1.3±0.1 ^a	12±0.1 ^b	13.0±0.1 ^a	0.11±0.01 ^{ab}	2.5±0.1 ^b	8.3±0.1 ^b	11.7±0.3 ^a	0.3±0.1 ^b	2.4±0.1 ^b	4.3±0.1 ^{ab}	32.0±0.3 ^a	1±0.1 ^a
	20	1.05±0.02 ^a	15 ±0.1 ^b	16.0±0.1 ^a	0.07±0.02 ^b	1.0±0.2 ^a	17.0±0.1 ^a	18.9±0.1 ^a	0.1±0.1 ^a	0.3±0.1 ^b	12.4±0.1 ^{ab}	71.0±0.1 ^b	1±0.1 ^a
	50	2.1±0.02 ^a	27±0.1 ^b	29.0±0.1 ^{ab}	0.07±0.01 ^{ab}	0.9±0.3 ^a	16.9±1.0 ^a	18.0±0.3 ^a	0.11±0.02 ^a	0.3±0.1 ^a	10.3±0.1 ^b	39.5±0.4 ^a	0.6±0.1 ^a
Avec sel (50 mM)	0	2.0±0.1 ^a	25.5±0.1 ^b	27.0±0.1 ^a	0.08±0.01 ^{ab}	0.7±0.1 ^b	12.9±0.1 ^b	14.0±0.3 ^a	0.1±0.1 ^a	0.3±0.1 ^a	0.4±0.1 ^{ab}	52.0±0.3 ^a	0.4±0.1 ^b
	20	2.5±0.1 ^b	23.0 ±0.1 ^a	25.0±0.1 ^b	0.11±0.01 ^b	4.8±0.7 ^a	10.8±0.3 ^b	16.1±0.2 ^b	1±0.1 ^b	0.48±0.02 ^a	8.5±0.1 ^b	34.3±0.2 ^b	1±0.1 ^a
	50	1.7±0.1 ^a	18.3±0.1 ^b	20.0±0.1 ^{ab}	0.09±0.01 ^{ab}	0.9±0.1 ^a	13.7±0.1 ^b	15.0±0.1 ^{ab}	0.11±0.01 ^a	1.1±0.1 ^a	11.6±0.1 ^b	37.6±0.1 ^b	0.69±0.1 ^a

Tableau III-2: Effet du cadmium combiné ou non avec du chlorure de sodium sur la teneur en chlorophylle des trois espèces d'*Atriplex* après deux mois de traitement. Les données sont des moyennes des valeurs obtenues à partir de trois répétitions \pm SE. En considérant les mêmes lignes, les différentes lettres indiquent une différence significative entre les groupes de traitement selon une ANOVA à un facteur ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

Traitements CdCl ₂ [μ M]		<i>A. canescens</i>				<i>A. halimus</i>				<i>A. nummularia</i>			
		Chla	Chlb	(Chla+Chlb)	Chla/Chlb	Chla	Chlb	(Chla+Chlb)	Chla/Chlb	Chla	Chlb	(Chla+Chlb)	Chla/Chlb
Chlorophylles (mg/g)													
Sans sel	0 (Control)	2.6 \pm 0.1 ^b	11.01 \pm 0.12 ^a	14.0 \pm 0.1 ^a	0.24 \pm 0.1 ^a	11.3 \pm 0.1 ^b	20.3 \pm 0.1 ^a	32.0 \pm 0.2 ^{ab}	1.0 \pm 0.1 ^a	4.9 \pm 0.2 ^a	11.5 \pm 0.1 ^{ab}	13.0 \pm 0.4 ^a	0.2 \pm 0.01 ^a
	20	3.6 \pm 0.1 ^a	9.22 \pm 0.16 ^a	13.0 \pm 0.1 ^a	0.4 \pm 0.1 ^{ab}	10.9 \pm 0.1 ^a	17.5 \pm 0.5 ^a	28.4 \pm 1.0 ^a	1 \pm 0.1 ^a	7.3 \pm 0.1 ^a	28.4 \pm 0.2 ^a	25.0 \pm 0.3 ^{ab}	0.14 \pm 0.01 ^{ab}
	50	4.8 \pm 0.1 ^{ab}	10.33 \pm 0.17 ^a	15.0 \pm 0.2 ^{ab}	0.5 \pm 0.1 ^b	13.5 \pm 0.2 ^a	11.4 \pm 0.1 ^a	25.0 \pm 0.1 ^{ab}	1.2 \pm 0.1 ^b	4.5 \pm 0.4 ^a	15.4 \pm 0.3 ^a	21.0 \pm 0.1 ^a	0.15 \pm 0.01 ^b
Avec sel (50 mM)	0	5.6 \pm 0.1 ^a	16.88 \pm 0.05 ^b	22.4 \pm 0.1 ^a	0.3 \pm 0.1 ^b	14.1 \pm 0.1 ^{ab}	14.4 \pm 0.1 ^b	28.3 \pm 0.1 ^a	1.0 \pm 0.1 ^a	4.7 \pm 0.1 ^a	21.4 \pm 0.1 ^b	1.0 \pm 0.1 ^a	0.16 \pm 0.2 ^b
	20	29.2 \pm 0.1 ^a	8.0 \pm 0.1 ^a	37.0 \pm 0.4 ^{ab}	4 \pm 0.1 ^{ab}	12.8 \pm 0.1 ^{ab}	6.8 \pm 0.1 ^{ab}	20.0 \pm 0.1 ^a	2 \pm 0.2 ^a	5.7 \pm 0.1 ^{ab}	11.5 \pm 0.2 ^a	18.0 \pm 0.1 ^a	0.2 \pm 0.1 ^a
	50	9.0 \pm 0.1 ^{ab}	15.4 \pm 0.2 ^a	24.0 \pm 0.1 ^a	1 \pm 0.1 ^{ab}	19.1 \pm 0.1 ^{ab}	20.8 \pm 0.4 ^a	40.0 \pm 0.3 ^a	1.0 \pm 0.2 ^b	4.9 \pm 0.1 ^{ab}	13.9 \pm 0.1 ^a	25.0 \pm 0.1 ^{ab}	0.19 \pm 0.01 ^a

Remarque : Un Code couleur (tableau III-3) a été établi pour tous nos résultats en histogramme pour les différents traitements (avec et sans NaCl) afin de faciliter la compréhension et éviter les confusions.

Tableau III-3: Le tableau montre que pour tous les résultats en histogramme, un code couleur a été suivi pour les différentes espèces traitées (avec et sans NaCl)

Espèces Traitements	CdCl ₂ Sans NaCl	CdCl ₂ Avec NaCl
<i>Atriplex canescens</i>		
<i>Atriplex nummularia</i>		
<i>Atriplex halimus</i>		

1.2 Effet du Cd et Cd/NaCl sur le taux des lipides

➤ Racines

D'après les données illustrées en Fig III-1 l'effet du Cd et Cd/NaCl sur le taux des lipides dans les trois espèces étudiées, chez *A. canesens*, on constate une augmentation significative de ce taux chez les racines traitées par le Cd (sans sel) en fonction des différentes concentrations comparé au contrôle après un mois de traitement où il atteint une valeur maximale de 7,39 μ g/g pour 50 μ M (sans sel) (Figure III-1a). Alors que le traitement combiné (avec sel) diminue significativement ce paramètre pour atteindre 1,87 μ g/g pour 20 μ M de Cd/50 μ M NaCl et 5,11 μ g/g pour 50 μ M de Cd/50 μ M NaCl comparés aux témoins.

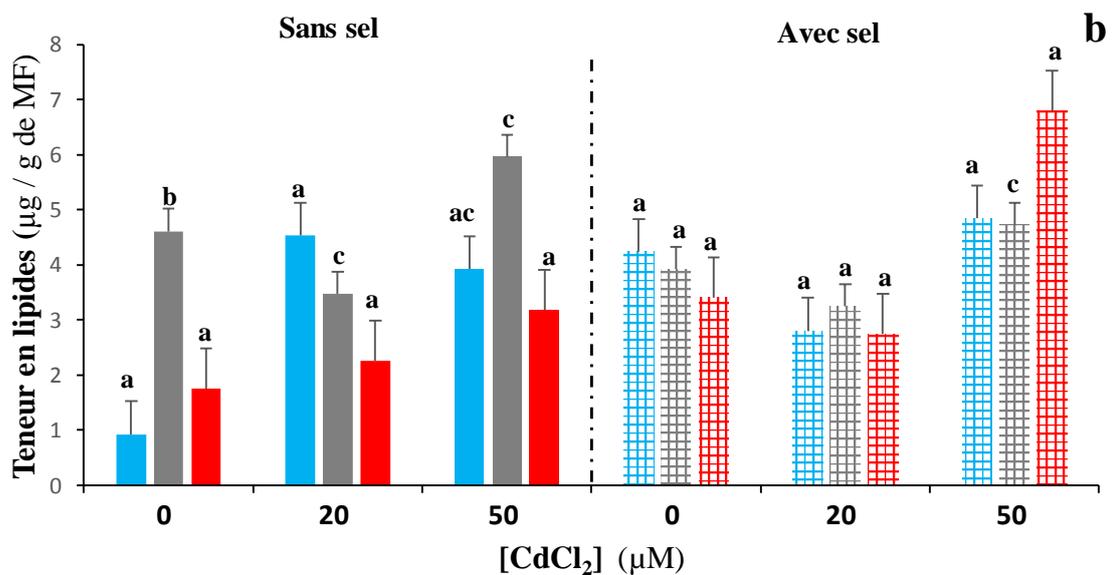
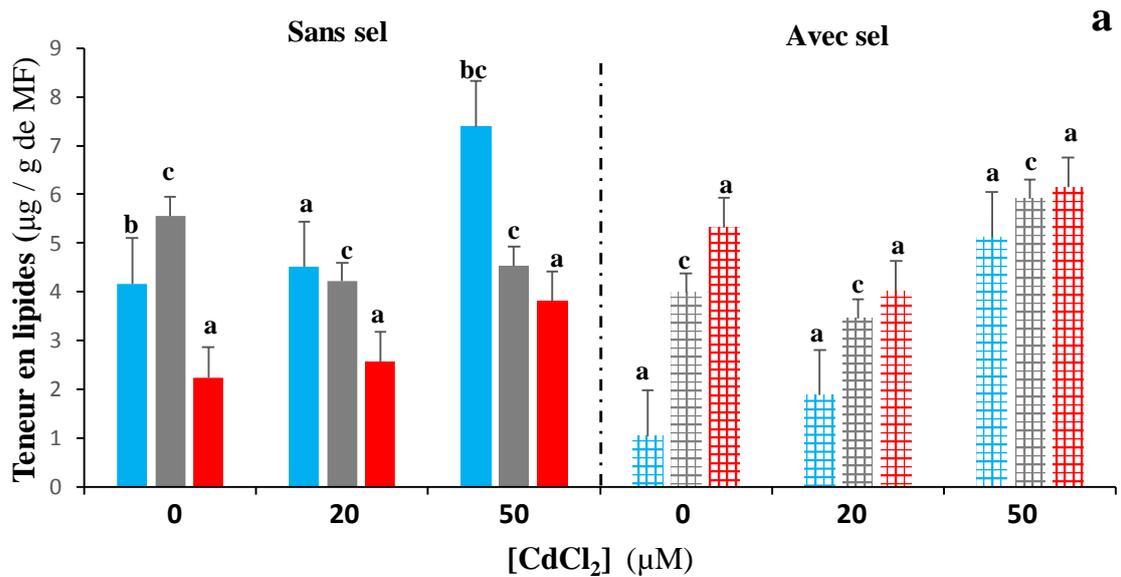


Figure III-1 : Effets du Cd et du Cd / NaCl sur les taux des lipides au niveau des racines après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreurs sont obtenues à partir des moyennes correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$)

Quant aux variations du taux des lipides observés chez les racines de *A. nummularia*, ce dernier diminue significativement pour tous les traitements en fonction du temps sauf pour 50µM de Cd qui fait augmenter ce taux et atteint une valeur de 5,90µg/g comparé à celle de 50µM (sans sel) seul équivalent à 4,54µg/g. (Fig. III-1a).

➤ Feuilles

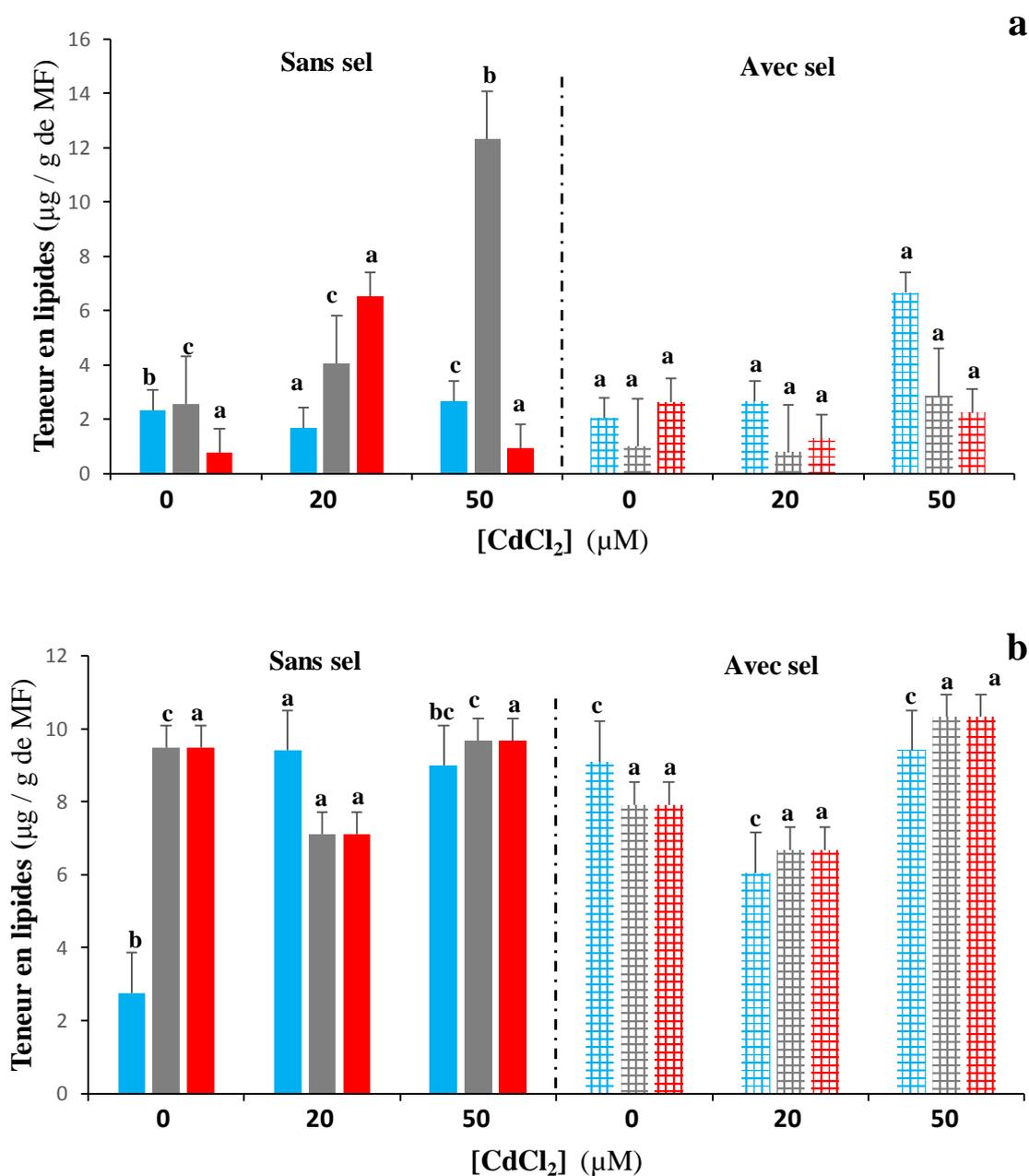


Figure III-2 : Effets du Cd et du Cd / NaCl sur les taux des lipides au niveau des feuilles après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreurs sont obtenues à partir des moyennes correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$)

D'après la figure III-2 qui représente l'effet du Cd et Cd/NaCl sur le taux des lipides au niveau des feuilles, chez *A. halimus*, on observe une augmentation significative de ce taux dans les feuilles en fonction des différents traitements et du temps par rapport au témoin. Cette

augmentation atteint son maximum (6,518 μ g/g) chez les feuilles pour 20 μ M (sans sel). Il est noté que seul les traitements 20 μ M (sans sel) et 50 μ M (avec sel) diminuent significativement le taux des lipides chez les feuilles par rapport à 50 μ M (sans sel) qui est équivalent à 80% après un mois de traitement (Fig. III-2a).

De même, le taux des lipides chez les feuilles de *A. canescens* augmente significativement pour tous les traitements. La valeur maximale de 6,64 μ g/g est enregistrée pour 50 μ M de Cd/50 μ M de NaCl.

En revanche, le taux de lipide augmente chez les feuilles en fonction des concentrations croissantes des différents traitements pour atteindre une valeur maximale de 12,31 μ g/g pour 50 μ M (sans sel) (Fig. III-2a) et 10,32 μ g/g pour 50 μ M (avec sel) (Fig. III-2b).

1.3 Effet du Cd et Cd/NaCl sur le taux de MDA

D'après les résultats représentés dans la figure III-3a, le traitement au cadmium ne produit aucun effet sur le taux de MDA chez les deux espèces, *A. halimus* et *A. nummularia*. En revanche, ce taux augmente significativement chez *A. canescens* en fonction des concentrations croissantes de cadmium administrées jusqu'à atteindre +64% (50 μ M de CdCl₂). L'ajout du sel dans le traitement ne provoque aucun changement pour le taux de MDA chez *A. halimus* mais il le stimule chez *A. nummularia*, et réduit significativement ($P < 0,001$) chez *A. canescens* en comparaison avec celui du témoin (sans cadmium et sans sel) et l'augmente régulièrement pour le traitement combiné. La diminution de ce taux laisse à penser que *A. canescens* n'est pas sensible au sel et que ce dernier n'a pas d'effet toxique sur cette espèce sauf s'il est associé au cadmium.

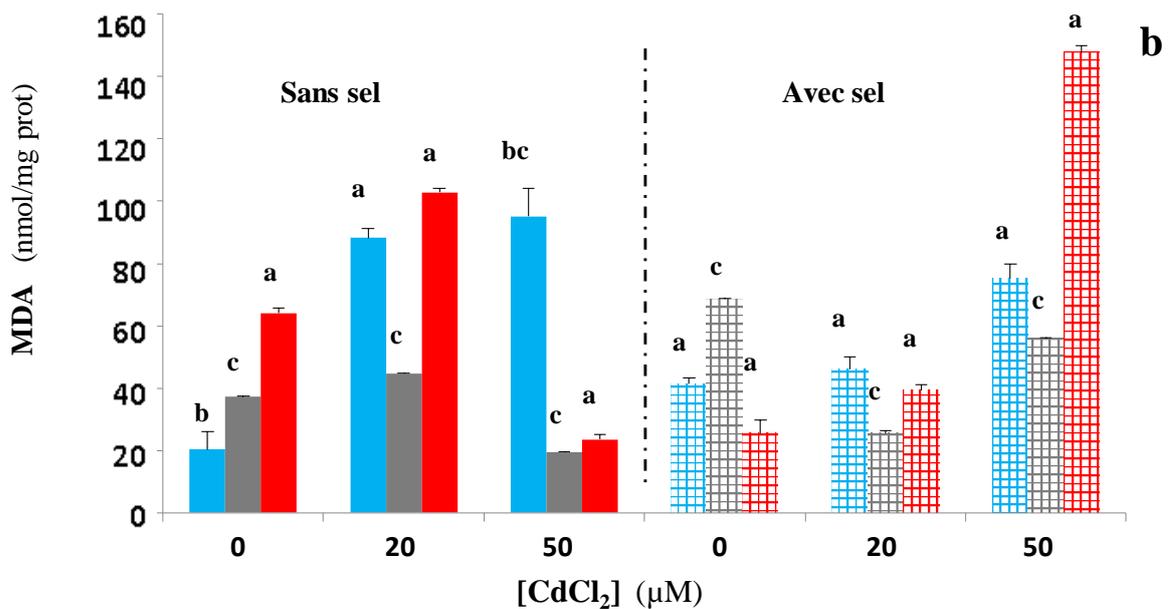
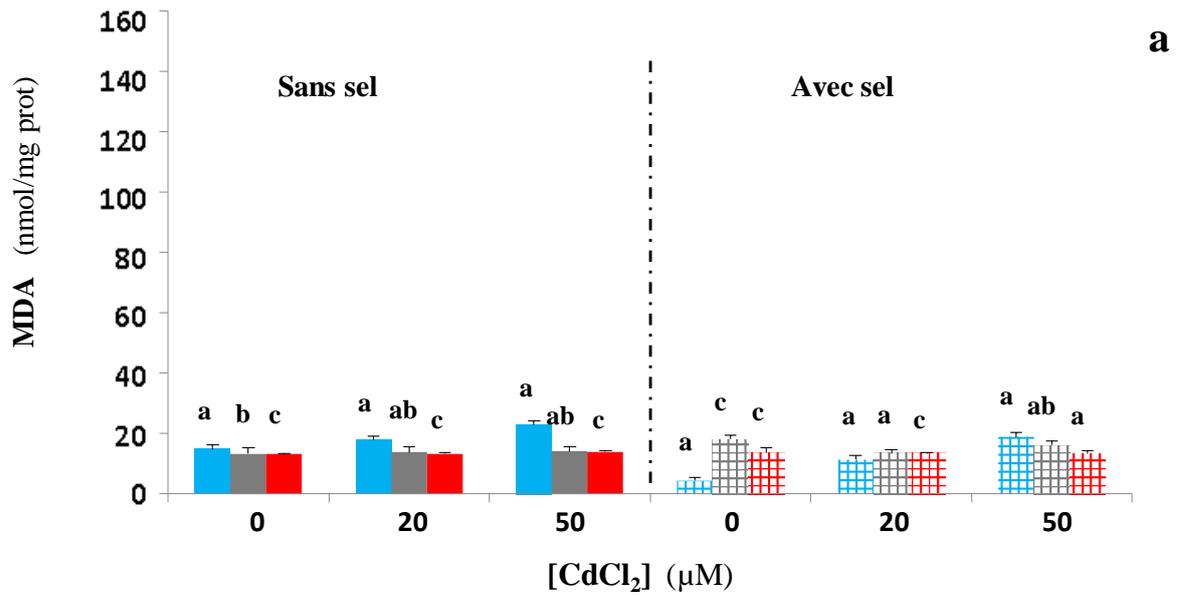


Figure III-3: Effets du Cd et du Cd / NaCl sur le taux de MDA au niveau des racines après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreurs sont obtenues à partir des moyennes correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

La figure III-3b montre qu'à l'issue du 2ème mois, le traitement au cadmium ($[CdCl_2] = 20 \mu M$) provoque une augmentation du taux de MDA chez les 3 plantes dont le plus important a été enregistré pour *A. halimus* (+59%). Pour une concentration plus élevée de cadmium ($[CdCl_2] = 50 \mu M$), ce taux continue d'augmenter pour *A. canescens* prouvant ainsi l'effet toxique du

cadmium mais diminue fortement chez les deux autres plantes. L'introduction du sel seul stimule fortement le taux de MDA chez *A. canescens* et *A. nummularia*. Mais lorsqu'on l'associe au cadmium on obtient les deux comportements suivants : (i) une diminution du taux de MDA chez *A. canescens* ce qui prouve l'effet protecteur du sel vis-à-vis du cadmium ; (ii) et une augmentation de ce taux pour 20 μ M de CdCl₂ (effet toxique du double stress) puis une diminution pour 50 μ M de CdCl₂ chez *A. halimus* et *A. nummularia* en comparaison aux résultats obtenus avec les échantillons témoins (traitement au cd sans sel). Le taux le plus élevé de MDA est enregistré pour le traitement combiné chez *A. halimus* (un facteur d'environ 6).

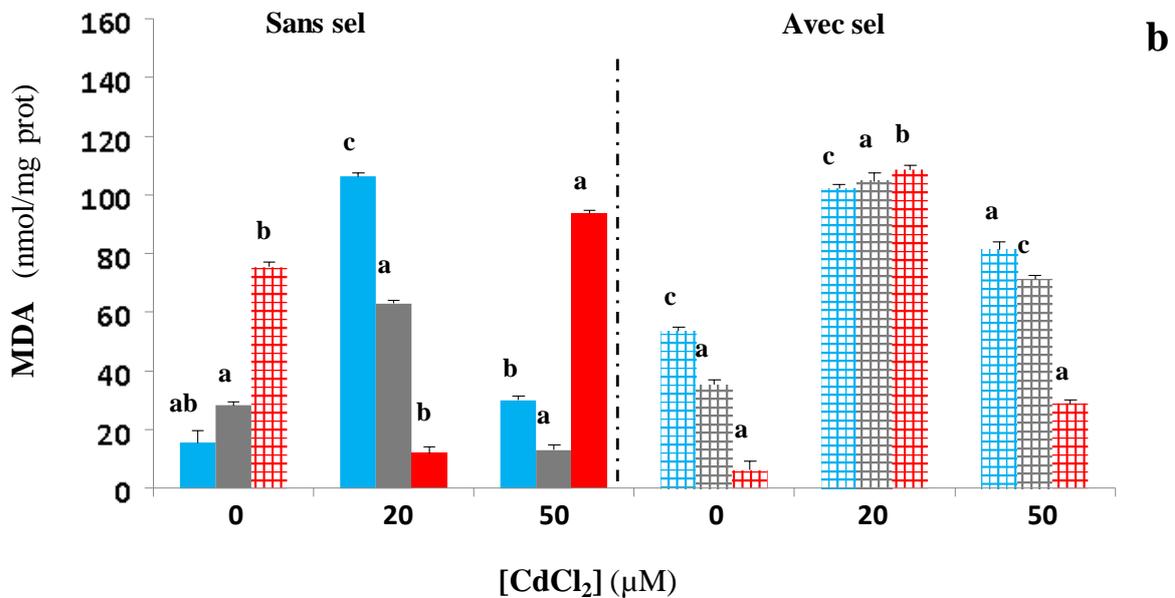
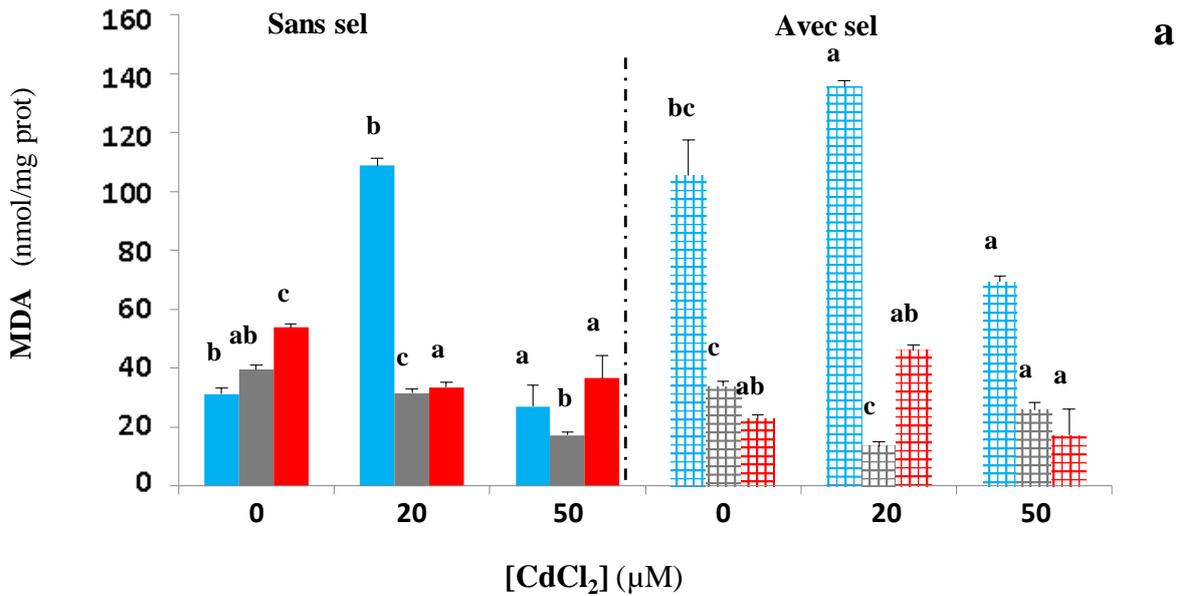


Figure III-4 : Effets du Cd et du Cd / NaCl sur le taux de MDA au niveau des feuilles après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreurs sont obtenues à partir des moyennes correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

La figure III-4 représente l'effet du cadmium (en présence de sel ou non) sur le taux de MDA chez les feuilles. D'après les résultats de la figure III-4a, on peut observer une augmentation spectaculaire de ce taux (+348%) chez *A. canescens* ($[CdCl_2] = 20 \mu M$) et une variation non significative chez les deux autres espèces. Le même schéma est maintenu chez *A. canescens* suite à l'ajout de sel (traitement combiné) ainsi que chez *A. halimus* (+200%) alors que les taux de MDA enregistrés pour *A. nummularia* présentent des valeurs inférieures à celles obtenues

chez les témoins quel que soit le type du traitement prouvant ainsi que ni le traitement au cadmium ni celui du double stress n'ont d'effet toxique sur cette plante.

Le traitement au cadmium à concentration moyenne ($[CdCl_2] = 20 \mu M$) d'une durée de deux mois (Figure III-4b), induit une très forte production de MDA chez deux plantes, *A. canescens* (+ 710%) et *A. nummularia* (+ 225%), alors qu'il provoque une très forte diminution chez *A. halimus* (-490%). Lorsqu'on augmente la concentration de cadmium, ($[CdCl_2] = 50 \mu M$), cette tendance s'inverse. Ainsi, le taux de MDA augmente chez *A. halimus* mais diminue considérablement chez les deux autres espèces. L'ajout du sel stimule la production du MDA chez *A. halimus* et *A. nummularia* alors qu'il n'a aucun effet sur *A. canescens*. Par conséquent, la production de MDA la plus importante concerne les 3 plantes traitées conjointement par ($[CdCl_2] = 20 \mu M$) en milieu salin ainsi que pour *A. canescens* en milieu non salin.

1.4 Effet du Cd et Cd/NaCl sur les activités enzymatiques du système antioxydant chez *Atriplex canescens*, *nummularia*, *halimus*

1.4.1 Effet du Cd et Cd/NaCl sur l'activité CAT

➤ Racines

Les résultats de la figure III-5 représentent l'activité CAT obtenue dans les racines des 3 espèces étudiées montrent des fluctuations non significatives ($P < 0,05$) de cette activité par rapport au contrôle chez *A. halimus* et *A. canescens* (pour laquelle l'activité est la plus élevée) alors qu'une inhibition significative de CAT chez *A. nummularia* (-60%) à la fin du premier mois de traitement au cadmium. En revanche, l'ajout de sel en l'absence de cadmium, stimule fortement l'activité de la CAT chez *A. canescens* (Figure III-5a), alors que le traitement combiné diminue l'activité CAT en fonction des concentrations croissantes du cadmium.

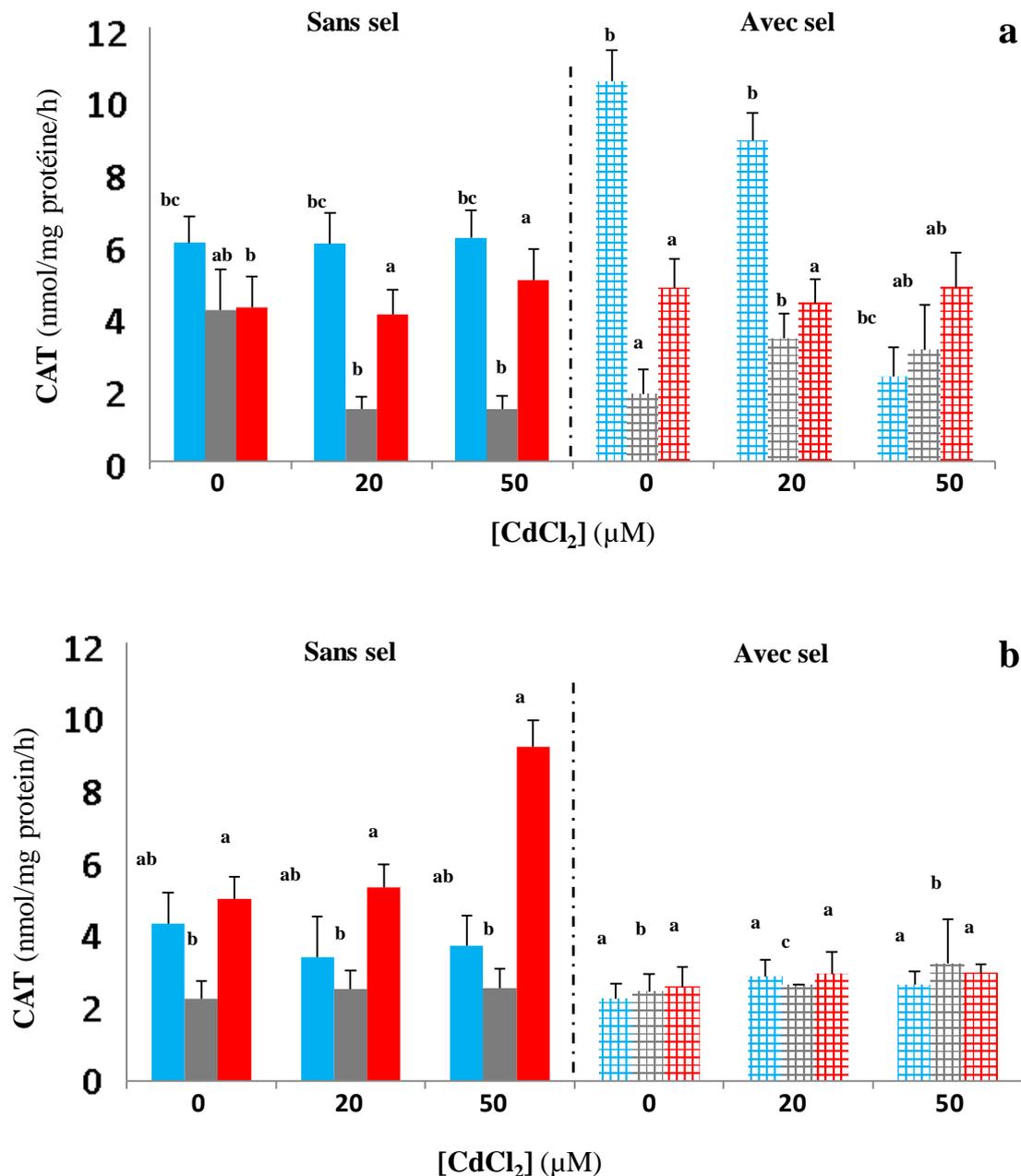


Figure III-5: Effets du Cd et du Cd / NaCl sur l'activité catalase au niveau des racines chez les trois espèces d'*Atriplex* après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreurs sont obtenues à partir des moyennes correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

De plus, lorsque la durée du traitement au cadmium est prolongée (2 mois, Fig. III-5b), l'activité CAT est induite chez *A. halimus* (+ 50% environ). En revanche et l'introduction de sel inhibe l'activité de l'enzyme CAT chez les 3 espèces.

➤ Feuilles

Quant au suivi de l'activité CAT dans les feuilles (figure III-6b), on constate une induction

significative de cette activité chez les 3 espèces, *A. halimus* étant la plante présentant la plus forte augmentation et, le plus souvent, dose-dépendante des concentrations en cadmium. (Fig. III-6a).

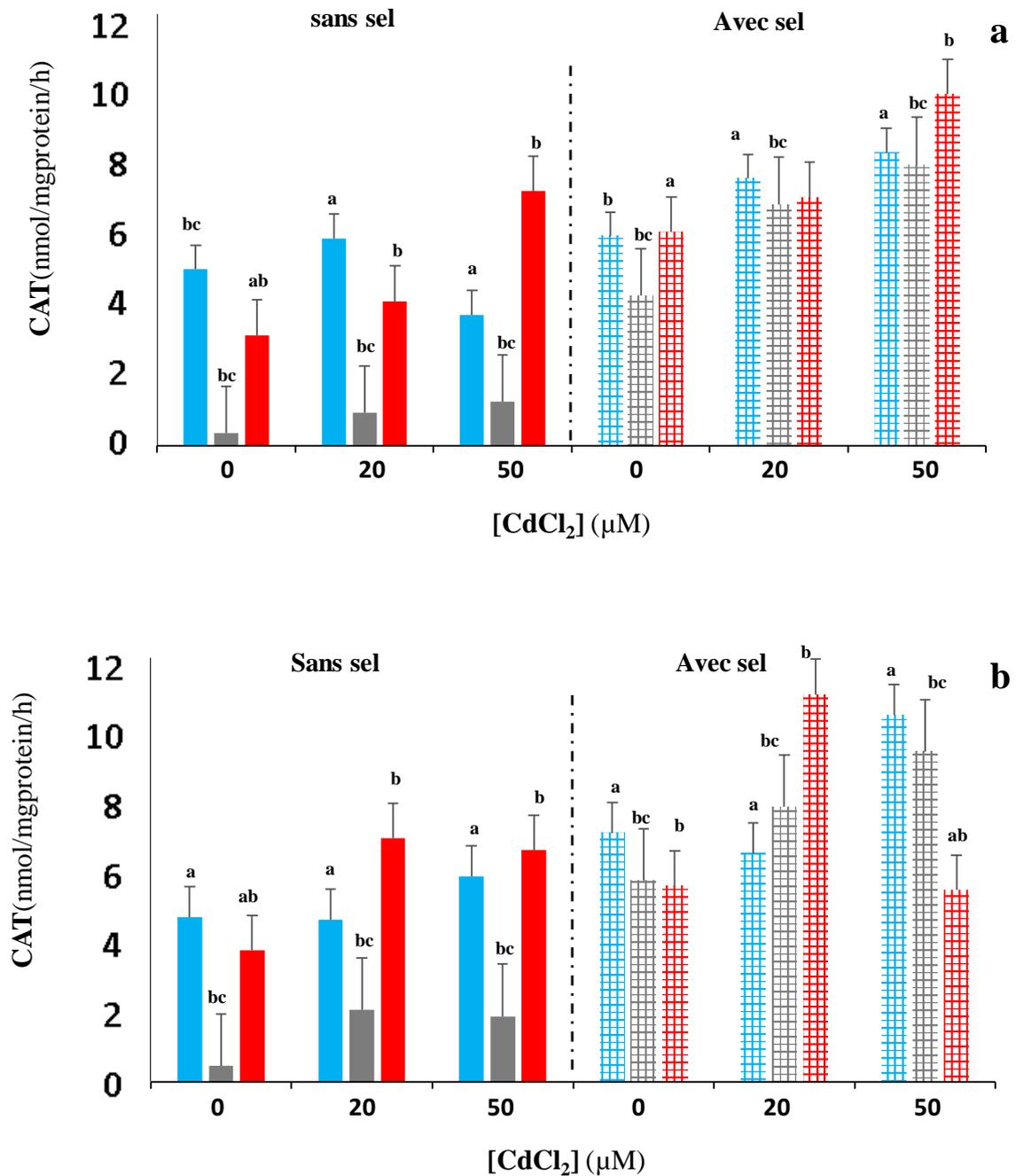


Figure III-6: Effets du Cd et du Cd / NaCl sur l'activité catalase au niveau des feuilles chez les trois espèces d'*Atriplex* après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreurs sont obtenues à partir des moyennes correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

De même, l'ajout du sel stimule cette activité et les valeurs les plus élevées sont obtenues dans ces conditions chez les 3 espèces à la fin du premier mois. En prolongeant le traitement, la CAT continue à activer pour les traitements combinés chez les 3 espèces alors qu'elle diminue fortement chez *A. halimus*. En revanche, les valeurs les plus élevées d'activité CAT chez les 3 espèces sont obtenues en milieu salin (Fig. III-6a-b).

1.4.2 Effet du Cd et Cd/NaCl sur l'activité APX

➤ Racines

Les résultats de la figure III-7 représentent l'activité APX obtenue dans les racines des espèces étudiées. À la fin du premier mois de traitement au cadmium (Fig. III-7a), une inhibition dose-dépendante de l'activité APX a été observée chez *A. nummularia* (- 46%) et chez *A. halimus* (+ 80%). Dans le cas d'*A. canescens*, cette activité n'est stimulée qu'en milieu salin.

De même la figure III-7b montre une induction significative ($P < 0,001$) de l'activité APX (+63%) chez *A. halimus* (facteur 2), en particulier pour pour 50 μM de CdCl_2 , alors que le traitement combiné au sel provoque l'inhibition de cette activité enzymatique chez les trois plantes.

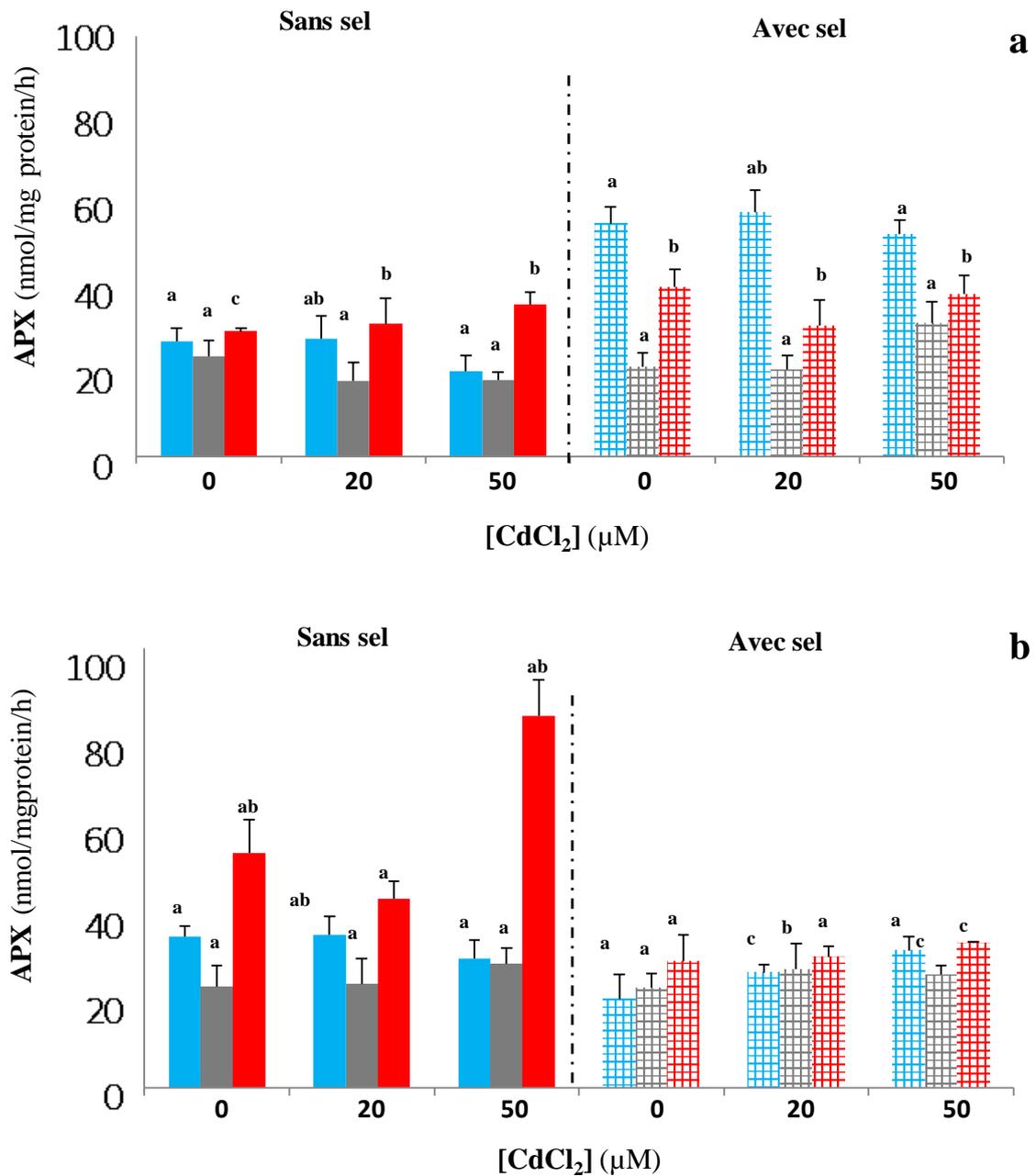


Figure III-7: Effets du Cd et du Cd / NaCl sur l'activité Ascorbate Peroxydase au niveau des racines chez les trois espèces d'Atriplex après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreurs sont obtenues à partir des moyennes correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

➤ Feuilles

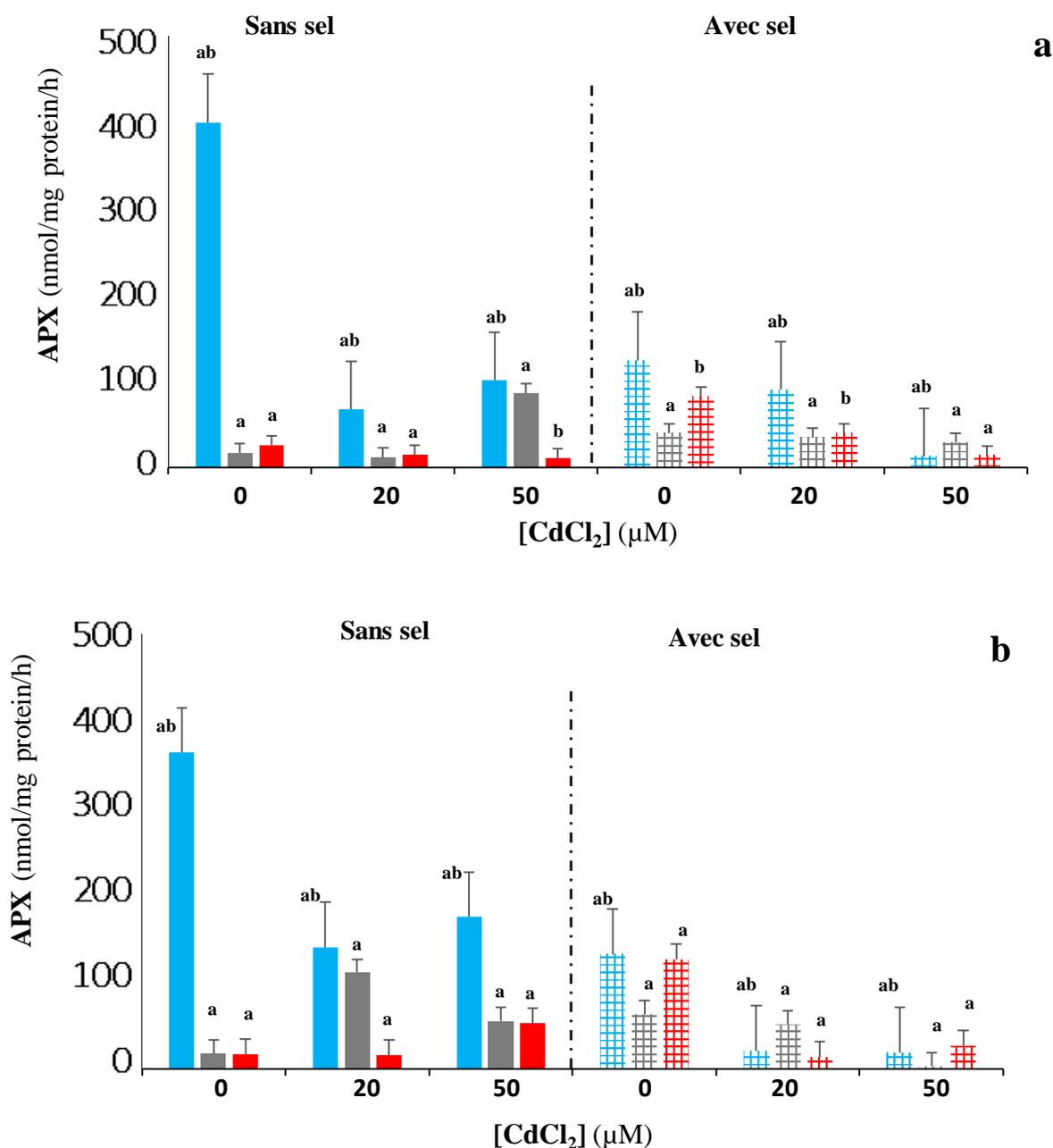


Figure III-8: Effets du Cd et du Cd / NaCl sur l'activité Ascorbate Peroxydase au niveau des feuilles chez les trois espèces d'*Atriplex* après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreurs sont obtenues à partir des moyennes correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

En comparant les figures III-7 et III-8, on peut voir que l'activité de l'enzyme APX est plus importante dans les feuilles que dans les racines, la valeur la plus élevée étant enregistrée pour les feuilles de l'échantillon témoin de l'espèce *A. canescens* (un facteur de 20 entre feuilles et

racines). Par contre, l'activité de l'APX dans les feuilles diminue avec le traitement au cadmium avec ou sans sel.

1.4.3 Effet du Cd et Cd/NaCl sur l'activité GPX

➤ Racines

Les figures III-9 et III-10 montrent que le GPX est le plus active des trois enzymes étudiées en raison de ses valeurs enregistrées qui sont nettement supérieures à celles des activités CAT et APX. En effet, après un traitement d'un mois (Fig. III-9a) le cadmium a pour effet de réduire considérablement l'activité GPX chez *A. canescens* (-88%), alors qu'il varie très peu chez les deux autres espèces. De plus, l'ajout du sel avec 50µm de CdCl₂ stimule l'activité de cette enzyme chez *A. canescens* et *A. halimus*. Un traitement prolongé au cadmium (2 mois, Fig. III-9b) a l'effet inverse, en particulier chez *A. halimus*, entraînant l'inhibition de l'activité GPX (-76%).

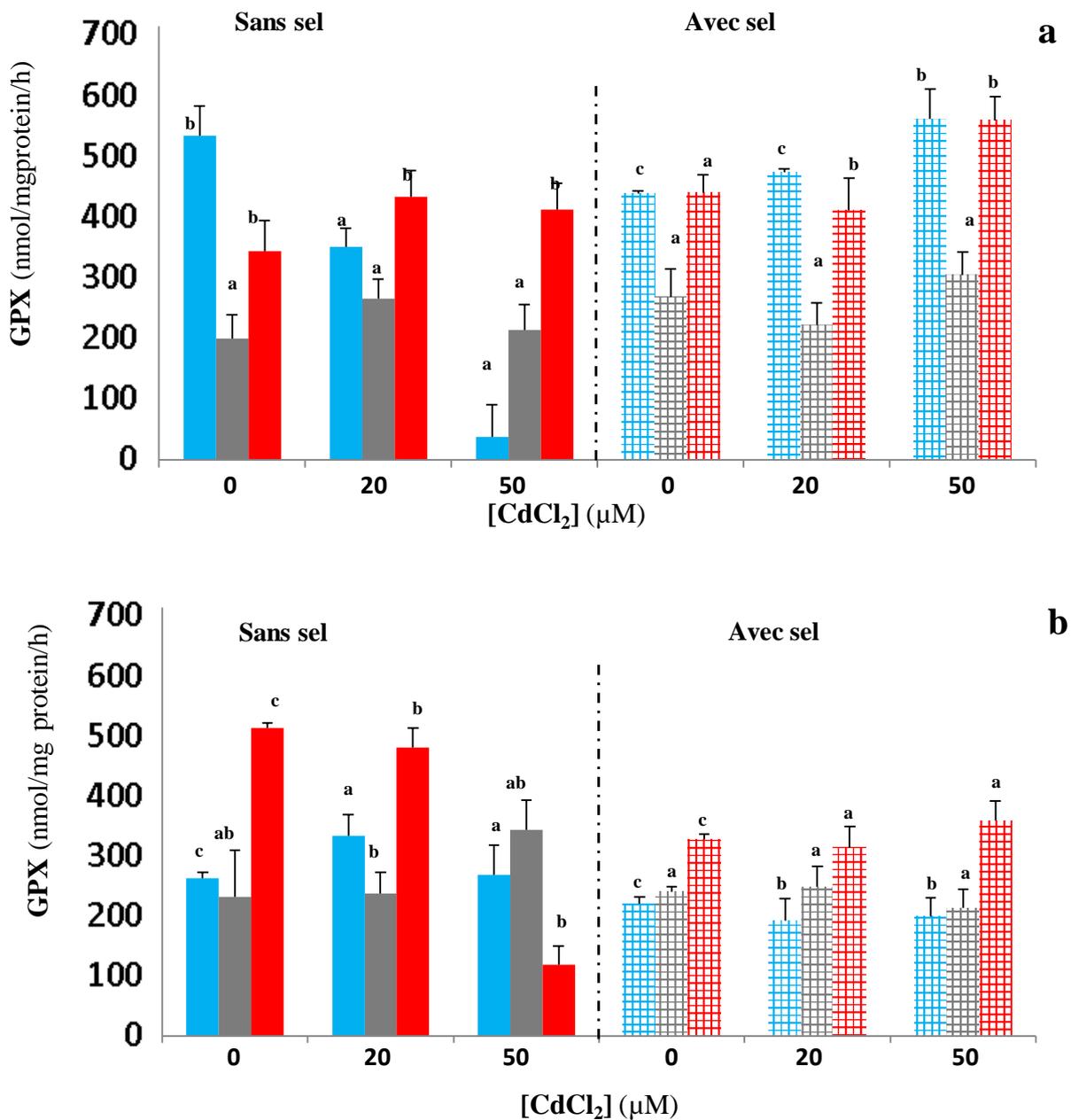


Figure III-9: Effets du Cd et du Cd / NaCl sur l'activité Gaïacol Peroxydase au niveau des racines chez les trois espèces d'*Atriplex* après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreurs sont obtenues à partir des moyennes correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

➤ Feuilles

La mesure de l'activité enzymatique dans les feuilles montre chez *A. halimus*, une induction dose-dépendante de l'activité GPX après le premier mois de traitement, qu'il soit combiné ou non (Fig. III-10a). Une tendance similaire est observée chez les trois plantes après deux mois

de traitement au cadmium, *A. halimus* étant l'espèce ayant le plus haut niveau d'activité enzymatique. En revanche, l'ajout de sel réduit son activité de près d'un facteur deux prouvant encore son effet protecteur vis-à-vis du cadmium.

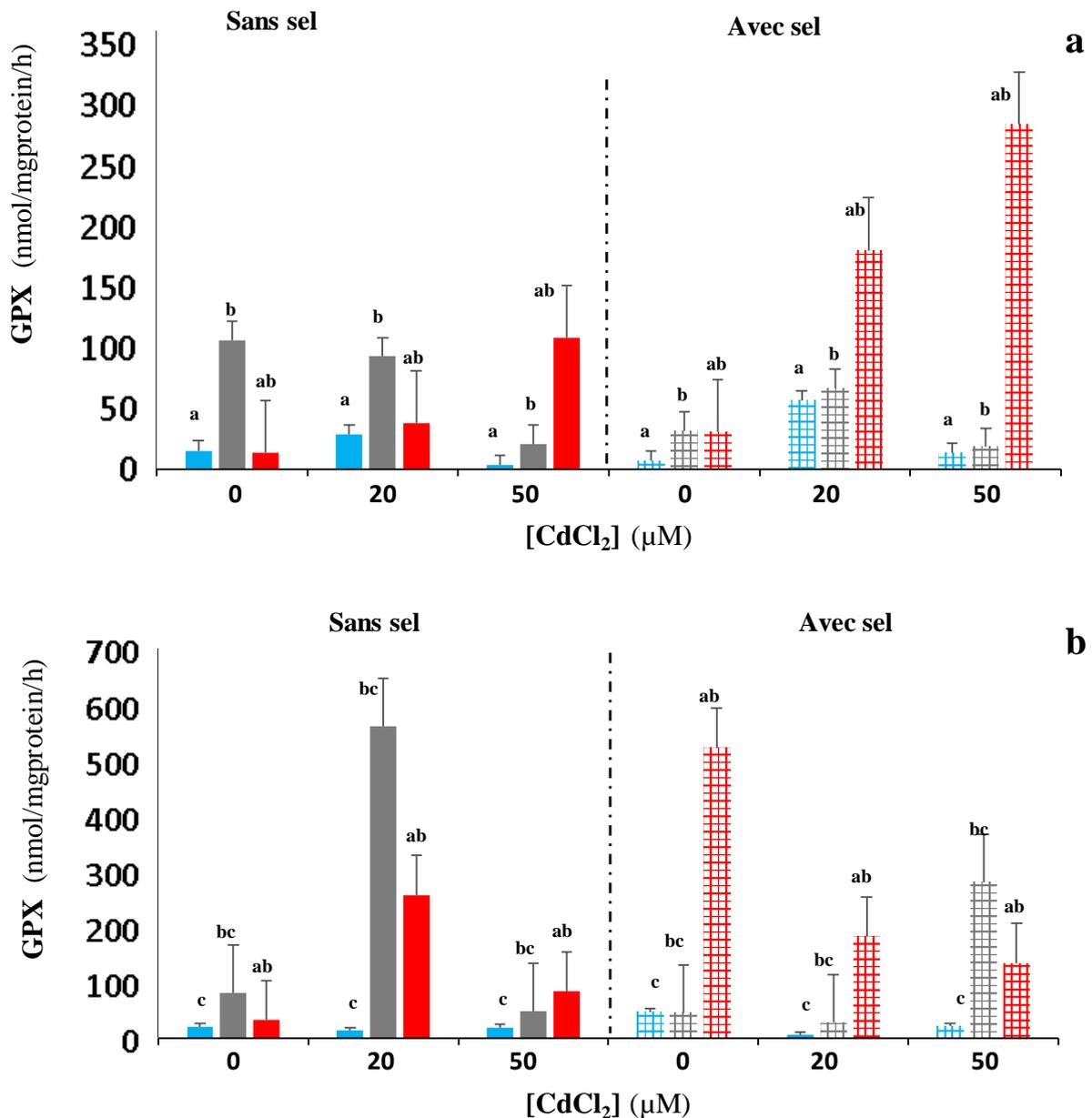


Figure III-10: Effets du Cd et du Cd / NaCl sur l'activité Gaiacol Peroxydase au niveau des feuilles chez les trois espèces d'*Atriplex* après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreurs sont obtenues à partir des moyennes correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$)

1.5 Caractérisation de l'accumulation chez les trois espèces (*A. canescens*, *A. nummularia* et *A. halimus*)

1.5.1 Détermination de la quantité de Cd accumulée

Tableau III-4: Détermination de la quantité de cadmium accumulée chez les trois espèces d'*Atriplex* (Tf = facteur de translocation et Bf = facteur de bioaccumulation)

Espèces		<i>Atriplex canescens</i>				<i>Atriplex halimus</i>				<i>Atriplex nummularia</i>			
		Tf		Bf		Tf		Bf		Tf		Bf	
		Mois				Mois				Mois			
		Traitements		1 ^{er}	2 ^{ème}	1 ^{er}	2 ^{ème}	1 ^{er}	2 ^{ème}	1 ^{er}	2 ^{ème}	1 ^{er}	2 ^{ème}
CdCl ₂ [µM]		1 ^{er}	2 ^{ème}	1 ^{er}	2 ^{ème}	1 ^{er}	2 ^{ème}	1 ^{er}	2 ^{ème}	1 ^{er}	2 ^{ème}	1 ^{er}	2 ^{ème}
Sans sel	0 (control)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	2	0	86	33	3	2	50	6	1	0	14	17
	50	1	0	57	8	0	0	8	1	4	1	104	43
Avec sel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	1	31	206	61	8	1	153	31	2	0	100	36
	50	0	3	43	52	2	94	43	52	0	0	21	1

➤ Racines

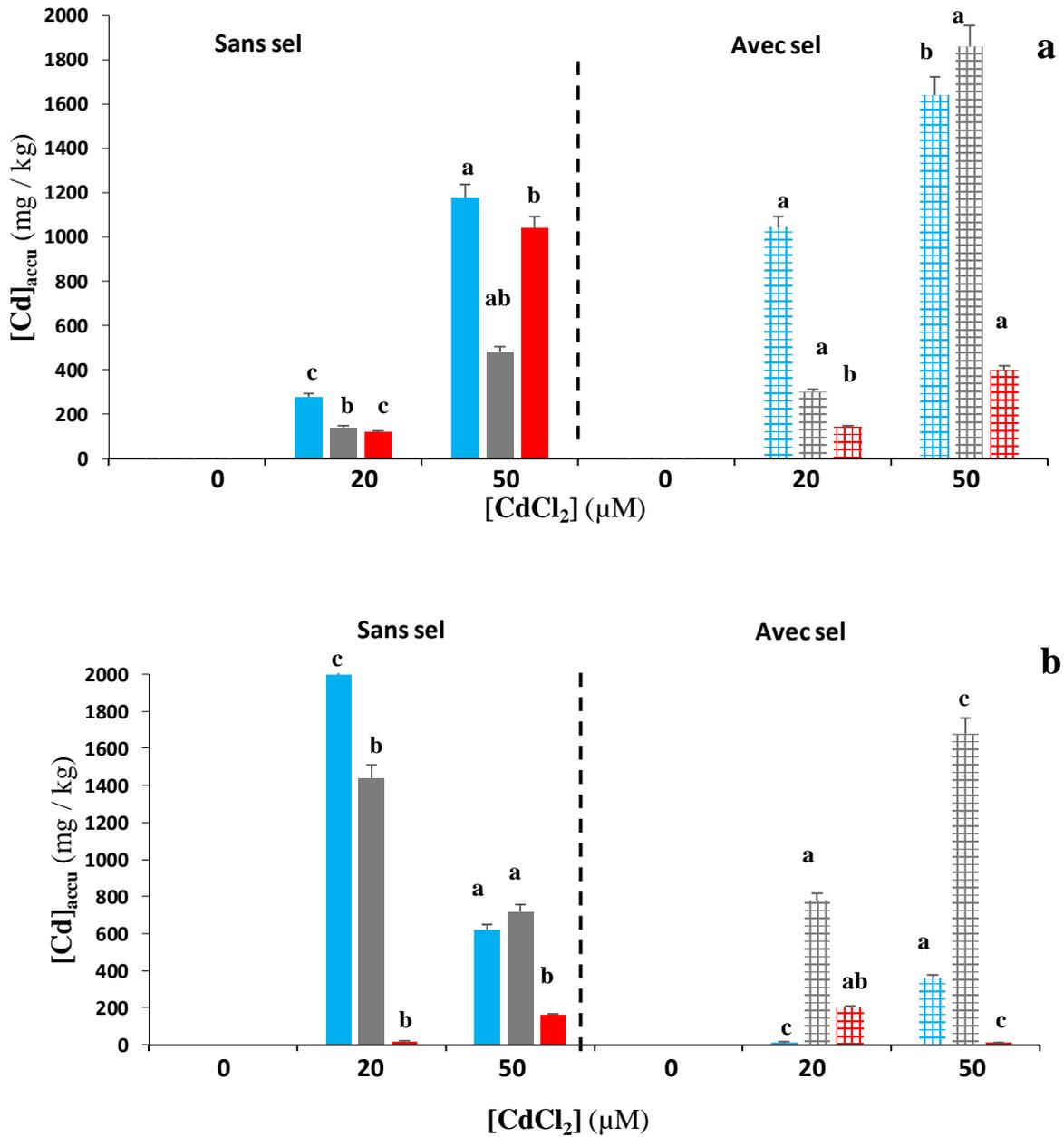


Figure III-11 : Accumulation du cadmium au niveau des racines chez les trois espèces d'*Atriplex* après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreur sont obtenues à partir des moyennes des valeurs correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

➤ Feuilles

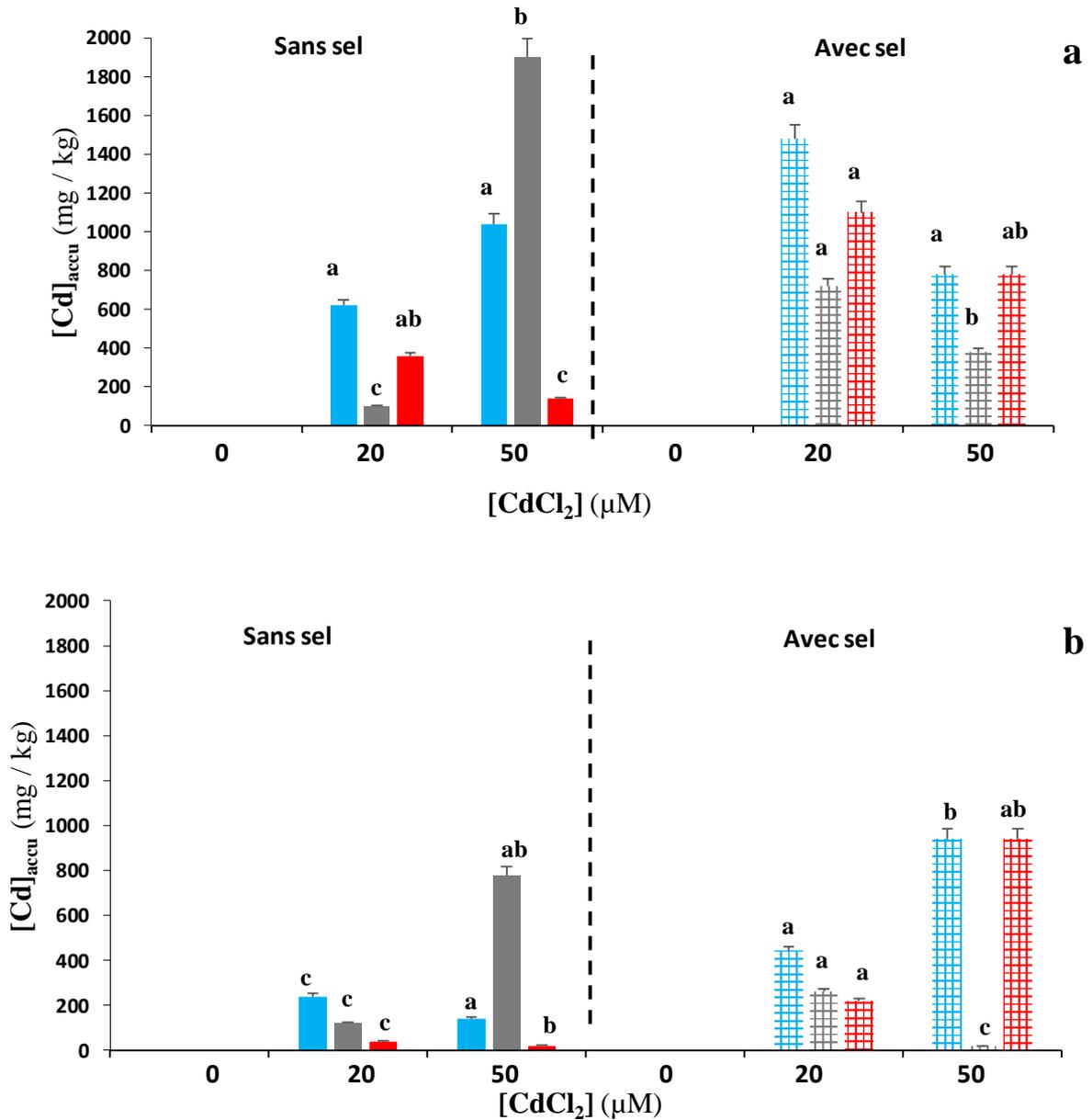


Figure III-12 : Accumulation du cadmium au niveau des feuilles chez les trois espèces d'*Atriplex* après un (a) et deux (b) mois de traitement. Les barres d'erreur sont obtenues à partir des moyennes des valeurs correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

Les figures III-11 et III-12 montre l'évolution de la quantité totale de Cd accumulée dans les trois espèces *Atriplex* selon les deux traitements en CdCl₂ (20 ou 50 µM), et en l'absence ou en présence de sel (50 mM d'NaCl). Après un mois de traitement au Cd en milieu non salin, une augmentation régulière de la teneur en Cd a été observée au niveau des racines et des feuilles. Dans le cas de racines de plantes exposées à une concentration de 50 µM de Cd, les valeurs les plus élevées ont été obtenues avec les racines d'*A. canescens* (1180 mg/kg) et d'*A. halimus* (1040 mg/kg). Dans les mêmes conditions, dans le cas des feuilles, les teneurs les plus élevées en Cd ont été mesurées avec *A. nummularia* (1900 mg/kg) et *A. canescens* (1040 mg/kg). Les facteurs de translocation correspondants Tf sont résumés dans le tableau 1, les valeurs les plus élevées étant mesurées pour *A. nummularia* (4, pour le traitement à 50 µM de CdCl₂), *A. halimus* (3, pour le traitement à 20 µM de CdCl₂) et *A. canescens* (2.2, pour le traitement à 20 µM de CdCl₂). L'extension de la période de traitement à deux mois dans un environnement non salin n'a pas augmenté l'accumulation de Cd au niveau des feuilles.

L'ajout de sel a stimulé l'accumulation de Cd chez les trois espèces à la fin du premier mois de traitement, en particulier à la concentration d'exposition de 20 µM de CdCl₂. Dans le cas d'*A. halimus*, la quantité de Cd accumulée par kg de feuilles sèches a atteint la valeur de 1100 mg/kg, avec un Tf d'environ 8 et Bf inférieur à 1. L'extension de la période de traitement à deux mois a entraîné une diminution de l'accumulation de Cd. À une concentration de 50 µM de CdCl₂, sauf pour *A. halimus*, caractérisé par une accumulation de 940 mg/kg de feuilles sèches avec un Tf de 94 (Figure III-11 et Tableau III-4).

1.5.2 Détermination de la quantité de Cd et NaCl excrétée à la surface des feuilles

Les figures III-13 et III-14 montrent l'évolution de la quantité totale de Cd et de Na excrétée à la surface des feuilles des trois espèces *Atriplex* selon le traitement CdCl_2 (20 ou 50 μM) et en absence ou en présence de sel (50 mM NaCl). Les quantités les plus élevées de Cd excrété à la surface des feuilles des trois espèces ont été observées après un mois de traitement aux deux concentrations de Cd. L'ajout de sel pendant le traitement a eu peu d'impact sur l'excrétion de Cd à la concentration de 20 μM de CdCl_2 . Étonnamment, à la concentration de CdCl_2 de 50 μM , l'excrétion de Cd a été supprimée chez *A. canescens* et augmentée chez *A. halimus*. De ces résultats, on peut déduire que l'excrétion de Cd était importante durant le premier mois de traitement et que la plante la plus efficace semblait être *A. halimus*.

La figure III-14 montre que l'excrétion de Na était faible chez les trois espèces d'*Atriplex* au cours du premier mois et augmentait significativement après le deuxième mois de traitement, mais seulement lorsque les traitements Na et Cd étaient associés alors que l'excrétion du Na est restée faible en l'absence de Cd.

➤ Cd

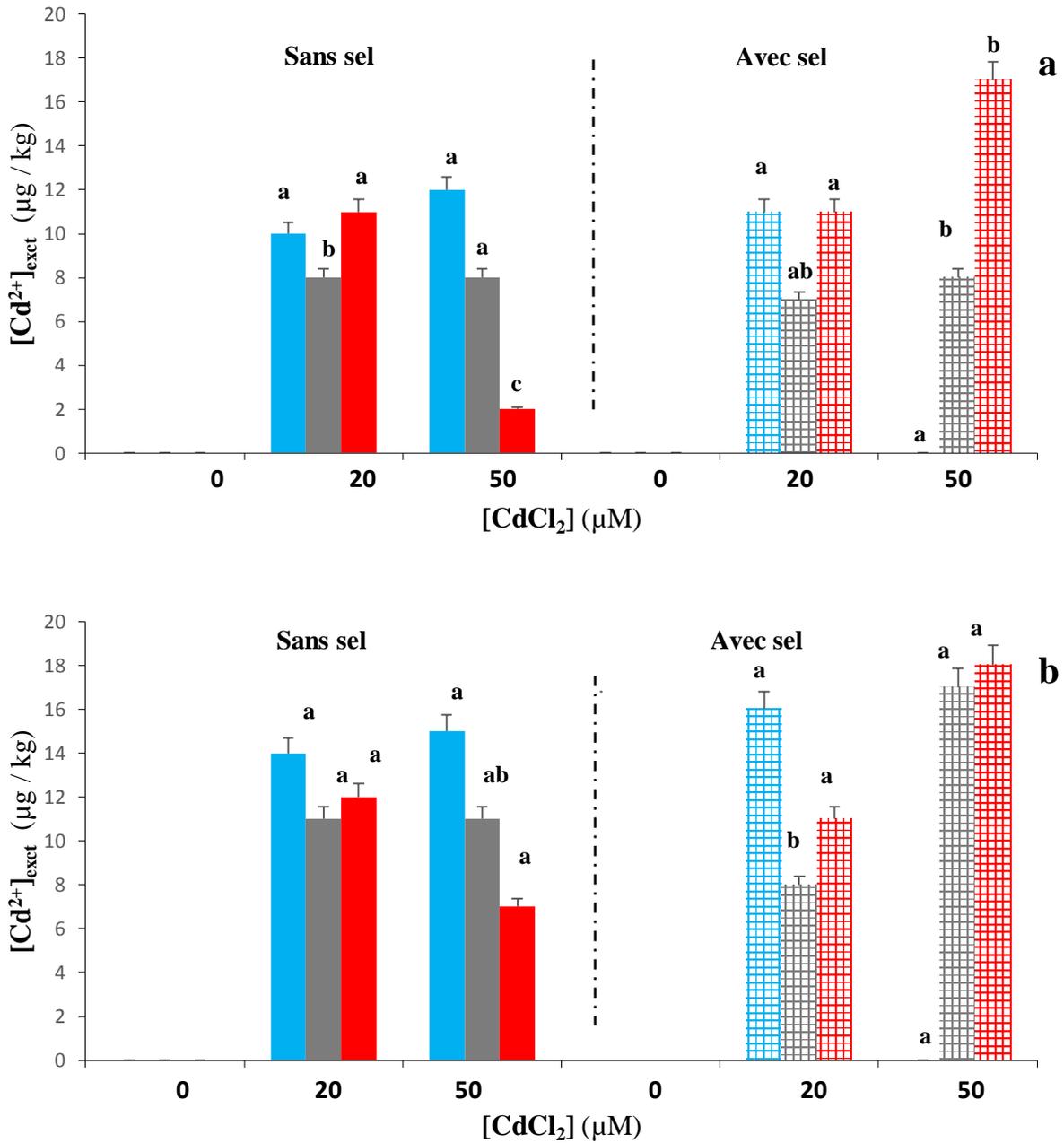


Figure III-13 : Quantité totale de cadmium excrétée à la surface des feuilles chez les trois espèces d'*Atriplex* après un (a) et deux (b) mois de traitements. Les barres d'erreur sont obtenues à partir des moyennes des valeurs correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

➤ NaCl

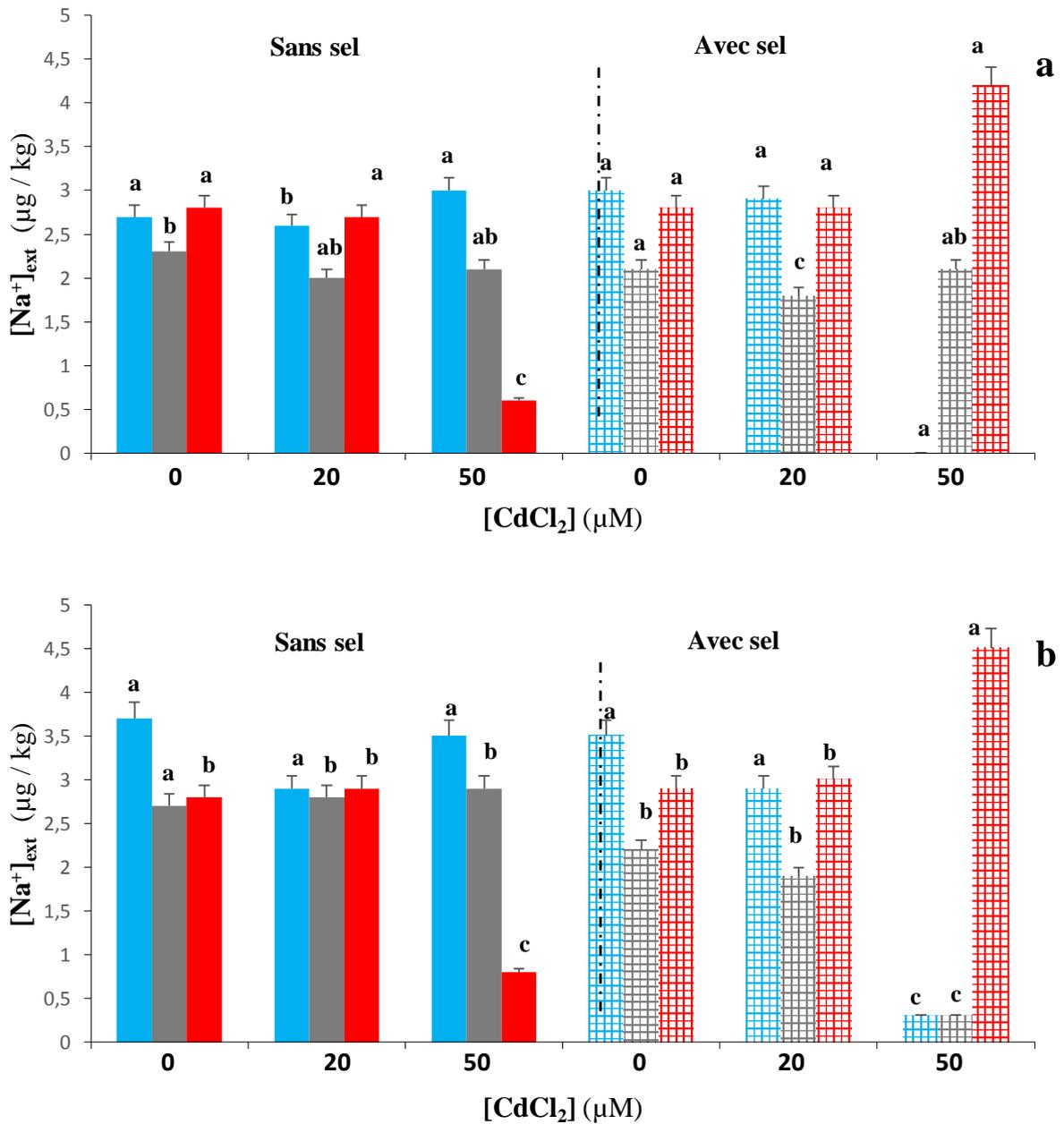


Figure III-14 : Quantité totale du chlorure de sodium excrété à la surface des feuilles chez les trois espèces d'*Atriplex* après un (a) et deux (b) mois de traitements. Les barres d'erreur sont obtenues à partir des moyennes des valeurs correspondant à trois répétitions \pm SE et les lettres indiquent des différences significatives entre les groupes de chaque espèce par rapport au témoin, selon une ANOVA à sens unique ou un test de Kruskal Wallis et Tukey ($P \leq 0,05$).

2. Discussion

Au début de nos expérimentations, nous avons procédé à l'étude de la réponse des trois espèces de plantes du genre *Atriplex* (*halimus*, *canescens* et *nummularia*) au stress métallique par le cadmium seul et au stress combiné (cadmium/sel), pour cela nous avons évalué différents paramètres (biochimique et enzymatiques) chez le système racinaire et foliaire.

Au cours de leur vie, les plantes sont constamment confrontées à différents types de stress influant sur leur croissance et par conséquent leur développement. Plus une plante est capable de mettre en place des mécanismes de défense rapides et appropriés, moins le stress aura de conséquences sur la santé de la plante (Rémus-Borel, 2007).

Le dosage des teneurs moyennes en chl *a* et *b*, et en chlorophylle totale (*a+b*) et (*a/b*) est susceptible de nous indiquer un éventuel stress. En effet, des corrélations entre les densités cellulaires et les paramètres de la fluorescence photosynthétiques ont prouvé que ces dernières pouvaient être considérées comme bio marqueur de la toxicité dans le cadre d'une pollution environnementale (Dewez et al., 2008). Par conséquent, la diminution de la quantité des chlorophylles est à considérer comme un symptôme de toxicité chez les plantes. D'ailleurs, une telle diminution provoquée par le stress cadmique a été observée chez les plantes halophytes *Tamarix smyrnensis* (Kadukova et al., 2008), *Mesembryanthemum muricatum* (Ghnaya et al., 2005), *Atriplex nummularia* (Badache et al., 2015) et *Atriplex halimus* (Mesnoui et al., 2016). Durant notre expérimentation, nous avons enregistré une diminution de la teneur en pigments photosynthétiques avec l'augmentation du cadmium et/ou le NaCl dans le milieu de culture. Or il a été démontré que le traitement au cadmium altère la structure des chloroplastes (Rıdvan Sivaci et al., 2004), la voie de la biosynthèse de la chlorophylle et même l'assemblage correct des complexes pigmenté-protéines des photosystèmes (Ouzounidou et al., 1997) (Li et al., 2008) (Wang et al., 2014). Cela qui peut être la conséquence d'une inhibition de l'activité enzymatique du cycle de Calvin (Vincent, 2006) (Feng et al., 2010) (Gill et al., 2012) (Hegedüs et al., 2001) et (Wang and Zhou, 2005), montrent que le chlorimuron-ethyl dans le sol provoque une réduction des pigments chlorophylliens. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par d'autres chercheurs et qui ont porté sur les métaux lourds. L'acide abscissique appliqué sur le blé dur tend également à réduire la photosynthèse ce qui contribue à réduire le rendement. La diminution de la surface transpirante se traduit par une réduction de la surface photosynthétique. La réduction de la conductance stomatique par l'ABA limite la disponibilité en CO₂ à l'intérieur de la feuille et inhibe ainsi la photosynthèse (Jaafari et al., 1993). Les travaux de (Bensoltane

et al., 2005) montrent que le traitement par NH_4NO_3 affecte négativement beaucoup plus le métabolisme respiratoire que la photosynthèse des mousses et des lichens.

En parallèle, l'augmentation de la teneur en pigments chlorophylliens observée chez les trois espèces et particulièrement l'espèce *A. canescens* n'est qu'une forme de tolérance au cadmium et au double stress où les plantes activent leur métabolisme pour éviter ces stress comme il a été enregistré chez *Sesuvium portulacastrum* (Ghnaya et al., 2005) (Mariem et al., 2014).

En effet, le signal lipidique systémique est parmi les premiers événements impliqués dans la réponse défensive et dans les mécanismes de transmission du signal. Elle joue un rôle principal dans la croissance des plantes. En effet, nos résultats confirment cette hypothèse où on observe une augmentation du taux des lipides presque pour tous les traitements chez les deux espèces (*halimus* et *canescens*). En revanche, une diminution des lipides est observée en fonction des différents traitements chez *nummularia*. Cette diminution est due à différents mécanismes de défense enclenchés vis-à-vis du stress appliqué soit par la production des ROS induisant ainsi un stress oxydatif qui aboutit à une peroxydation lipidique suite à une attaque oxydante par l'oxygène singulet ou le radical hydroxyle soit par l'implication d'autres voies de signalisation tels que l'acide jasmonique (JA) et l'acide méthyle-jasmonate (MEJA) qui sont des molécules signales dérivées d'acide gras et leurs biosynthèse implique des enzymes comme la lipase, lipoxygénase (LOX), etc (Deau et al., 2011, Yaiche et al, 2017).

La surproduction des ROS cause une peroxydation des lipides qui conduit à la formation de certains produits de dégradations tels que les alcanes et les aldéhydes (Malondialdéhyde) (Ferrat et al., 2003). Le malondialdéhyde ou plus connu sous l'abréviation d'MDA est le produit d'oxydation des membranes lipidiques, qui s'accumule quand les plantes sont exposés à un stress. Les différentes concentrations du MDA sont considérées comme un indicateur de la peroxydation lipidique après un stress abiotique (Ding et al., 2004).

En plus, certains auteurs (Ben Youssef et al., 2005) (Amor et al., 2006) (Moradi and Ismail, 2007) (Liang et al., 2008) (Alayat et al., 2015), rapportent que le taux Malondialdéhyde augmente avec la concentration du cadmium, de la salinité et le degré du froid. Récemment, (Daud et al., 2015) constate que la teneur en MDA augmente chez le coton (*Gossypium hirsutum* L.) stressé au cadmium. Ces travaux sont en accord avec nos résultats qui montrent une augmentation de ce taux en fonction des concentrations de Cd et/ou NaCl seules et du traitement combiné chez les racines de l'espèce *A. canescens* et juste pour le NaCl chez *A. nummularia*. Cette augmentation est attribuée au burst oxydatif, engendré par l'accumulation

des ROS provoquant ainsi une peroxydation lipidique. D'autres part, (Mahi et al., 2015) rapportent une diminution du niveau de MDA au niveau des feuilles des espèces *canescens* et *halimus*, quel que soit la concentration saline appliquée. Cette diminution observée chez les feuilles, un peu plus que chez les racines, dans nos travaux semble une caractéristique des plantes tolérantes au Cd et au sel où le degré des dégâts oxydatifs cellulaires des plantes exposées aux stress abiotiques est fonction de la capacité des plantes à se protéger contre les agents oxydatifs (Shalata and Tal, 1998) (Mittova et al., 2002) (Ashraf and Harris, 2004)

Dans l'objectif de réduire les dégâts causés par la libération des ROS, les défenses antioxydatives des végétaux comprennent plusieurs enzymes et molécules anti-oxydantes. En présence du cadmium, la dismutation de l'anion superoxyde engendre une accumulation du peroxyde d'hydrogène. La détoxification de cette molécule peut être envisagée par plusieurs enzymes : La Catalase (CAT) localisée au niveau des peroxysomes et des mitochondries, la gâiicol peroxydase ou GPX localisée au niveau du cytoplasme et des parois cellulaires et les enzymes du cycle ascorbate-glutathion (connu sous le nom de l'ascorbate peroxydase « APX). Ce cycle est localisé dans plusieurs compartiment cellulaires tels que les chloroplastes, le cytosol, les peroxysomes et les membrane plasmiques (Jimenez et al., 1997) (Noctor and Foyer, 1998), en ce qui nous concerne nous avons évalué les effets du stress au cadmium et le stress combiné (sel/cadmium) sur les trois activités enzymatiques antioxydantes (CAT, APX et GPX).

La mesure de l'activité enzymatique CAT, bioindicateurs de stress et responsables de l'élimination de l'eau oxygénée (H_2O_2) formée suite aux stress appliqués, montre une induction chez les racines et feuilles des trois espèces. Plusieurs auteurs rapportent les mêmes résultats chez d'autres espèces (A. Chaoui and E. El Ferjani, 2018) (Cho and Seo, 2005) (Sbartai et al., 2012) (Alayat et al., 2015) (Mesnoua et al., 2016). Cette augmentation est due au déclenchement des systèmes de détoxification qui pour la plupart sont formés d'enzymes dont la CAT, (Gomes-Junior et al., 2006) suggèrent que l'augmentation de la concentration de l'activité de la catalase est étroitement liée à l'augmentation de la concentration intracellulaire du peroxyde d'hydrogène et du Ca^{2+} . En situation de stress, une augmentation de la teneur en calcium entraîne une stimulation de l'activité de cette enzyme suite à la fixation de l'ion calcique à une protéine propre au cytosol appelé calmoduline formant un complexe Ca^{2+} calmoduline. Ce dernier joue un rôle de molécule signal pouvant stimuler ainsi l'activité CAT (Yang et al., 2005). En outre, le traitement cadmique et la forte concentration du traitement combiné diminue cette activité chez les racines des trois espèces prouvant ainsi soit que les systèmes en question sont dépassés et les enzymes sont complètement inhibées soit que le Cd

rentre en compétition avec le NaCl pour les mêmes sites de fixation bloquant ainsi l'absorption des deux éléments d'où cette diminution (Azizi et al., 2016).

De même, l'activité APX dont le rôle vient compléter celui de la CAT, est responsable de l'élimination de l'eau oxygénée formée suite à l'induction d'un stress oxydant généré par la présence des polluants. Dans ce système de détoxification, la transformation de H₂O₂ en eau et en oxygène se fait en présence de l'ascorbate qui joue un rôle de donneur d'électron. Au cours de la première réaction catalysée par l'ascorbate peroxydase, l'ascorbate est transformé en monodéhydroascorbate et/ou déhydroascorbate (Souguir, 2009). La présence du Cd et NaCl dans notre milieu de culture stimule l'activité CAT chez les racines de *A. canescens* et *A. halimus* après un mois de traitement et les racines et feuilles de *A. nummularia* à la fin du traitement.

Outre la catalase et l'activité ascorbate peroxydase, la gaïacol peroxydase (GPX) est aussi une enzyme importante capable d'éliminer le H₂O₂. La GPX est suggérée comme un biomarqueur d'une toxicité d'un métal dans les plantes (Levizou and Manetas, 2001). Selon nos résultats, nous avons constaté que l'activité GPX augmente pour tous les traitements chez les racines et feuilles d'*A. halimus* et juste chez les racines de *A. nummularia* à la fin du premier mois et pour les traitements combinés chez les racines et feuilles de *A. canescens* à la fin du traitement. Il est clair que les antioxydants enzymatiques réagissent différemment et l'augmentation de ces activités n'est qu'un mécanisme compensatoire, comme le soulignent (Gratão et al., 2005). Le schéma de réponse observée dans les racines diffère complètement de celui observé pour les feuilles, ce qui pourrait s'expliquer par le fait que cet organe est le premier à entrer en contact avec le métal, ce qui nécessite donc une réaction rapide et efficace, rajoutant aussi que le rôle principal de la GPX est d'éliminer l'excès de H₂O₂ (Li et al., 2007), elle intervient dans des conditions de stress, car elle possède une importante capacité à éliminer les formes actives de l'oxygène. En effet, cette enzyme consomme le peroxyde d'hydrogène en utilisant le gaïacol ou le pyrogallol comme donneur d'électrons (Anderson et al., 1997).

La caractérisation de l'accumulation chez les trois espèces a été déterminée par la quantification de la quantité de Cd accumulée dans les différents compartiments de la plante. Nos résultats montrent une accumulation du Cd endogène en fonction du Cd exogène chez les racines d'*A. halimus* et l'ajout du sel améliore l'accumulation du Cd chez les feuilles de *A. canescens* et *A. halimus* après un et deux mois de traitement. Ces résultats ont été confirmés par le calcul du facteur d'accumulation et de translocation qui sont supérieurs à l'unité. Une telle observation a été mentionnée par (Mesnoua et al., 2016) chez *Atriplex halimus* où il montre que cette espèce

a une forte capacité à accumuler le Cd dans ces racines et une faible capacité à le transloquer vers les feuilles sans l'ajout du sel qui, dans notre cas, optimise ce phénomène même pour l'espèce *A. canescens*. Contrairement à, *A. nummularia* qui accumule le Cd dans ces feuilles en fonction de la plus forte concentration de Cd et l'ajout de 50mM de NaCl incite la plante à accumuler le Cd dans les racines à la fin du premier mois. Le calcul du $BF > 1$ permet de conclure que l'espèce *A. nummularia* a une forte capacité d'accumulation du Cd dans ces feuilles et un faible Ft à la fin du traitement. Même si (Badache et al., 2015) a montré que l'ajout du sel chez *A. nummularia* (3 et 6g/l) améliore la translocation du Cd des racines vers les feuilles.

Partant du principe que l'excès de sel est éliminé par les trichomes des feuilles, on a voulu appliquer ce même phénomène dans le cas de stress métallique (cadmique) et voir si les plantes halophytes sélectionnées (*Atriplex*) sont capables d'excréter le Cd en présence ou non de NaCl. Nos résultats montrent que l'excrétion du Cd dépend de la plus faible concentration de Cd seul dans le milieu de culture et du traitement combiné (20 μ M de Cd/NaCl) chez *A. canescens* et *A. halimus*. Cette augmentation d'excrétion du Cd après un et deux mois semble être un moyen de détoxification qui lui permet de résister au stress métallique. En revanche, l'excrétion du Cd chez l'espèce *A. nummularia* reste constante à la fin du premier et deuxième mois alors que cette espèce augmente sa capacité d'éliminer le cadmium au deuxième mois puisque les valeurs enregistrées sont supérieures à celles obtenues au premier mois à l'exception de la plus forte concentration. Parallèlement, l'excrétion du NaCl à la surface des feuilles dépend de la concentration du Cd et du sel dans le milieu de culture chez les trois espèces après un et deux mois. Il est à signaler que la plus forte concentration du traitement combiné freine l'excrétion du Cd et du sel chez *A. canescens* qui est probablement dû à la compétition qui existe entre le Cd et Na pour les sites de fixation membranaire des racines limitant ainsi l'absorption de ces deux éléments et par conséquent leur translocation vers la partie aérienne. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par (Sbartai et al., 2012) qui stipule le même phénomène en cas de stress combiné Cd/Zn chez *Lycopersicon esculentum*.

3. Références

- A. Chaoui, E. El Ferjani, 2018. Impact of Cadmium and Copper Excess on Cell Wall Peroxidases in Pea Stems. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 7, 902–904.
- Alayat, A., Souiki, L., Djebbar, M., Boumedris, Z. eddine, Moumeni, O., Berrebbah, H., 2015. Cadmium Stress Induced Changes in Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation and Hydrogen Peroxide Contents in Barley Seedlings. *Advance Journal of Food Science and Technology* P507-513.
- Amor, N.B., Jiménez, A., Megdiche, W., Lundqvist, M., Sevilla, F., Abdelly, C., 2006. Response of antioxidant systems to NaCl stress in the halophyte *Cakile maritima*. *Physiologia Plantarum* 126, 446–457. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00620.x>
- Anderson, J.M., Park, Y.-I., Chow, W.S., 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiologia Plantarum* 100, 214–223. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb04777.x>
- Ashraf, M., Harris, P.J.C., 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.10.024>
- Azizi, N., Djebbar, M., Sbartai, H., 2016. Effect of Mg,Cu,Cd and Mg/Cd, Cu/Cd on stress biomarkers in durum wheat. *International network for natural sciences - research journal*. URL <https://innspub.net/ijb/effect-of-mgcuCd-and-mgCd-cuCd-on-stress-biomarkers-in-durum-wheat/> (accessed 11.30.18).
- Badache, H., Sbartai, H., Djebbar, M.R., Manousaki, E., Bourguignon, J., 2015. Phytoextraction of Cd by *Atriplex nummularia* L., a xero-halophyte species. *International Journal of Biosciences (IJB)* 6, 130–139.
- Ben Youssef, N., Nouairi, I., Ben Temime, S., Taamalli, W., Zarrouk, M., Ghorbal, M.H., Ben Miled Daoud, D., 2005. Effets du cadmium sur le métabolisme des lipides de plantules de colza (*Brassica napus* L.). *Comptes Rendus Biologies* 328, 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2005.05.010>
- Bensoltane, S., Khaldi, F., Djebbar, H., Djebbar, M.R., 2005. Toxicity of the ammonium nitrate NH₄NO₃ on the respiratory metabolism of three biological models: parameciums, mosses and lichens. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 70, 1043–1051.
- Cho, U.-H., Seo, N.-H., 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.021>
- Daud, M.K., Quiling, H., Lei, M., Ali, B., Zhu, S.J., 2015. Ultrastructural, metabolic and proteomic changes in leaves of upland cotton in response to cadmium stress. *Chemosphere* 120, 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.060>
- Deau, B., Nicolini, F.E., Guilhot, J., Hugué, F., Guerci, A., Legros, L., Pautas, C., Berthou, C., Guyotat, D., Cony-Makhoul, P., Gardembas, M., Michallet, M., Hayette, S., Cayuela, J.M., Weiss, I.R., Réa, D., Castaigne, S., Mahon, F.-X., Guilhot, F., Rousselot, P., 2011. The addition of daunorubicin to imatinib mesylate in combination with cytarabine improves the response rate and the survival of patients with myeloid blast crisis chronic *Myelogenous leukemia* (AFR01 study). *Leukemia Research* 35, 777–782. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.11.004>
- Dewez, D., Didur, O., Vincent-Héroux, J., Popovic, R., 2008. Validation of photosynthetic-fluorescence parameters as biomarkers for isotopuron toxic effect on alga *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Pollution* 151, 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.03.002>
- Ding, H., Wan, Y., Qi, N., Zhu, W., Yang, X., Shao, Y., 2004. Effects of Cd²⁺ and Zn²⁺ stress on antioxidant enzyme system of tomato seedlings. *Shanghai Nongye Xuebao* 20, 79–82.
- Feng, Z., Pang, J., Nouchi, I., Kobayashi, K., Yamakawa, T., Zhu, J., 2010. Apoplastic ascorbate contributes to the differential ozone sensitivity in two varieties of winter wheat under fully open-air field conditions. *Environmental Pollution* 158, 3539–3545.

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.019>

- Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Roméo, M., 2003. Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses. *Aquatic Toxicology* 65, 187–204. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(03\)00133-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00133-4)
- Ghnaya, T., Nouairi, I., Slama, I., Messedi, D., Grignon, C., Abdelly, C., Ghorbel, M.H., 2005. Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium portulacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Plant Physiol.* 162, 1133–1140. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.11.011>
- Gill, S.S., Khan, N.A., Tuteja, N., 2012. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). *Plant Sci.* 182, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.018>
- Gomes-Junior, R.A., Moldes, C.A., Delite, F.S., Pompeu, G.B., Gratão, P.L., Mazzafera, P., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2006. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere* 65, 1330–1337. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.04.056>
- Gratão, P., Polle, A., Lea, P., Azevedo, R., 2005. Making the Life of Heavy Metal-Stressed Plants a Little Easier. *Functional Plant Biology* 32, 481–494. <https://doi.org/10.1071/FP05016>
- Hegedüs, A., Erdei, S., Horváth, G., 2001. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science* 160, 1085–1093. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00330-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00330-2)
- Jaafari, S.E., Paul, R., Lepoivre, P., Semal, J., Laitat, É., 1993. Résistance à la sécheresse et réponses à l'acide abscissique : analyse d'une approche synthétique. *Cahiers Agricultures* 2, 256-263 (1).
- Jimenez, A., Hernandez, J.A., Del Rio, L.A., Sevilla, F., 1997. Evidence for the Presence of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Mitochondria and Peroxisomes of Pea Leaves. *Plant Physiol.* 114, 275–284.
- Kadukova, J., Manousaki, E., Kalogerakis, N., 2008. Pb and Cd accumulation and phyto-excretion by salt cedar (*Tamarix smyrnensis* Bunge). *Int J Phytoremediation* 10, 31–46. <https://doi.org/10.1080/15226510701827051>
- Levizou, E., Manetas, Y., 2001. Combined effects of enhanced UV-B radiation and additional nutrients on growth of two Mediterranean plant species, in: Rozema, J., Manetas, Yiannis, Björn, L.-O. (Eds.), *Responses of Plants to UV-B Radiation, Advances in Vegetation Science*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 179–186. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2892-8_17
- Li, M., Zhang, L.J., Tao, L., Li, W., 2008. Ecophysiological responses of *Jussiaea rapens* to cadmium exposure. *Aquatic Botany* 88, 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.01.002>
- Li, M.S., Luo, Y.P., Su, Z.Y., 2007. Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. *Environmental Pollution* 147, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.006>
- Liang, Y., Zhu, J., Li, Z., Chu, G., Ding, Y., Zhang, J., Sun, W., 2008. Role of silicon in enhancing resistance to freezing stress in two contrasting winter wheat cultivars. *Environmental and Experimental Botany* 64, 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.06.005>
- Mahi, Z., Dedaldechamp, F., Maurousse, L., Lemoine, R., Belkhouja, M., 2015. Study of Lipid peroxidation (MDA) and antioxidative Activity (POD) In Two halophyte: *Atriplex halimus* L. and *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt under Salt Effect. *International Journal of Innovation and Applied Studies* 10, 450–458.
- Mariem, W., Kilani, B.R., Benet, G., Abdelbasset, L., Stanley, L., Charlotte, P., Chedly, A., Tahar, G., 2014. How does NaCl improve tolerance to cadmium in the halophyte *Sesuvium portulacastrum*? *Chemosphere* 117, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.041>

- Mesnoui, M., Mateos-Naranjo, E., Barcia-Piedras, J.M., Pérez-Romero, J.A., Lotmani, B., Redondo-Gómez, S., 2016. Physiological and biochemical mechanisms preventing Cd-toxicity in the hyperaccumulator *Atriplex halimus* L. *Plant Physiol. Biochem.* 106, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.04.041>
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M., Volokita, M., 2002. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids. *Free Radic. Res.* 36, 195–202.
- Moradi, F., Ismail, A.M., 2007. Responses of Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence and ROS-Scavenging Systems to Salt Stress During Seedling and Reproductive Stages in Rice. *Ann Bot* 99, 1161–1173. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm052>
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Ouzounidou, G., Moustakas, M., Eleftheriou, E.P., 1997. Physiological and Ultrastructural Effects of Cadmium on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Leaves. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32, 154–160. <https://doi.org/10.1007/s002449900168>
- Rémus-Borel, W., 2007. Étude du rôle de la silice chez le blé dans l'induction des molécules de défense lors d'une infection par le blanc.
- Rıdvan Sivaci, E., Sivaci, A., Sökmen, M., 2004. Biosorption of cadmium by *Myriophyllum spicatum* L. and *Myriophyllum triphyllum* orchard. *Chemosphere* 56, 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.05.032>
- Sbartai, H., Djebbar, M.R., Sbartai, I., Berrabbah, H., 2012. Bioaccumulation of cadmium and zinc in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *C. R. Biol.* 335, 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2012.08.001>
- Shalata, A., Tal, M., 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum* 104, 169–174. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040204.x>
- Souguir, D., 2009. Modifications métaboliques, moléculaires et génotoxicité induites par le cadmium chez *Vicia faba* (phdthesis). Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I; Université du 7 Novembre, Carthage, Tunisie.
- Vincent, M., 2006. Études des effets toxiques des ions métalliques du cadmium sur la formation et l'activité des photosystèmes chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* 143.
- Wang, M., Zhou, Q., 2005. Single and joint toxicity of chlorimuron-ethyl, cadmium, and copper acting on wheat *Triticum aestivum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.12.012>
- Wang, Y., Jiang, X., Li, K., Wu, M., Zhang, R., Zhang, L., Chen, G., 2014. Photosynthetic responses of *Oryza sativa* L. seedlings to cadmium stress: physiological, biochemical and ultrastructural analyses. *Biometals* 27, 389–401. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9720-0>
- Yang, X., Feng, Y., He, Z., Stoffella, P.J., 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 18, 339–353. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.007>

Conclusion 1

Tout au long de leur vie, les plantes sont constamment confrontées à différents types de stress qui influencent leur croissance et leur développement. Par conséquent, plus une plante est capable de développer des mécanismes de défense rapides et adaptés, moins le stress peut affecter sa santé. Dans cette première partie de notre étude (plante/cadmium), nous nous sommes intéressés à trois espèces d'*Atriplex* (*A. halimus*, *A. canescens*, *A. nummularia*) via l'évolution de différents biomarqueurs de stress sur lesquels nous avons pu formuler des conclusions assez claires. En effet, les systèmes racinaire et foliaire de l'espèce *Atriplex* sont capables de faire face à tout excès de ROS en activant les mécanismes de défense antioxydants permettant de restaurer l'homéostasie de la cellule et de tolérer les différents traitements.

Nos résultats montrent que les espèces *A. canescens* et *A. nummularia* ont une capacité d'hyperaccumulation du cadmium plus élevées que chez *A. halimus* dont l'accumulation se fait essentiellement au niveau des racines. De plus, l'ajout de sel semble améliorer cette capacité d'hyperaccumulation de Cd chez les deux plantes (*A. canescens* et *A. nummularia*) et réussit à transformer *A. halimus* en plante hyper accumulatrice dont le facteur de translocation (Ft) devient très élevé.

On observe aussi pour les trois espèces une limite d'accumulation de Cd en présence de sel notamment pour la forte concentration de Cd, ce qui nous permet de conclure que, pour la phytoextraction de Cd, l'extension du temps d'exposition de la plante au Cd jusqu'à deux mois n'est pas nécessaire.

Et enfin, et bien que les trois plantes *Atriplex* ont la capacité d'excréter l'excès de Cd de la surface des feuilles, ce processus est d'une importance mineure comparé à la proportion de Cd transférée aux pousses. Par conséquent, la phytoextraction ne peut être considéré comme un moyen efficace de détoxification des métaux chez les plantes *Atriplex* étudiées.

Au terme de cette première partie de notre étude, il nous apparaît très intéressant de poursuivre le développement de certaines pistes que nous avons initiées afin de mieux apprécier le phénomène de phytoextraction. Par exemple, élargir la gamme de concentration plus importantes des deux éléments de stress à savoir : le chlorure de sodium et le chlorure de cadmium afin d'effectuer une étude caractéristique plus approfondie du genre *Atriplex* vis-à-vis des contraintes climatiques (sècheresse et salinité) et de confirmer le potentiel adaptatif de la plante face au stress métallique et par conséquent sa Fitness.

Une telle étude pourrait être réalisée sur d'autres végétaux telle que *Atriplex patula* L, *Cakile maritima*, *Ammophila arenaria* (etc.) afin d'effectuer un screening de ces plantes vis-à-vis du stress cadmique ou métallique (cas de mixture).

Elle pourrait être aussi réalisée sur des microorganismes dont leurs propriétés dépolluantes, dans la modification et la dégradation des minéraux, déjà utilisées dans les techniques de Bioremédiation des terrains contaminés spécialement pour les champignons qui a été largement étudiée alors que l'impact des bactéries dans ce processus et les mécanismes moléculaires impliqués restent peu compris. Cette problématique a fait l'objet de notre deuxième partie de la thèse où notre choix s'est porté sur la caractérisation cellulaire et morphologique d'une bactérie tellurique « *Pseudomonas fluorescens* » pour mieux comprendre son comportement ainsi que les conditions optimales de sa croissance in situ afin d'optimiser son activité et améliorer le processus de décontamination des sols.

Il serait aussi judicieux dans un deuxième temps de coupler les deux modèles biologiques étudiées plantes (*Atriplex*) et bactéries (*Pseudomonas fluorescens*) afin de mieux exploiter leurs potentiels dans la réhabilitation des sols pollués. Une pré-étude a été déjà entamée dans le cadre d'un travail de master et l'analyse des métaux (Cd) dans différents compartiments (feuilles/racines/sols) est en cours de réalisation.

Partie 2

Etude morphologique de la bactérie
Pseudomonas fluorescens et son
interaction avec le cadmium

Introduction 2

Au cours de ces dernières années, une attention particulière a été portée aux problèmes de contamination des sols par les métaux lourds (Hernández et al., 1999; Singh et al., 2010; Bestawy et al., 2013; Amari et al., 2014) avec un intérêt accru pour les stratégies de dépollution et de remédiation grâce à des micro-organismes et des plantes : c'est la bioremédiation.

La bioremédiation est une branche de la biotechnologie qui utilise des mécanismes biologiques naturels pour résoudre des problèmes environnementaux et qui représente une solution technologique efficace au problème de pollution par les métaux lourds (Basha and Rajaganesh, 2014). Elle a d'ailleurs déjà été appliquée avec succès pour assainir certains sites contaminés (Owolabi and Hekeu, 2015) et s'avère efficace et peu coûteuse (Hrynkiewicz and Baum, 2014). Une vaste gamme de systèmes biologiques dont les champignons, les levures, les algues et les bactéries, est utilisée dans le cadre de cette problématique (Zhang et al., 2013).

Certaines bactéries ont, en particulier, montré une résistance aux métaux lourds ainsi qu'une capacité élevée d'élimination des ions métalliques dans les sols et les eaux (Halder and Basu, 2016; Yakoubi et al., 2018). Parmi ces bactéries, on trouve celles appartenant au genre *Pseudomonas*, bacilles à Gram-négatif, possédant l'avantage d'être omniprésentes dans de nombreux habitats de l'écosystème.

Les espèces du genre *Pseudomonas* sont réparties en deux groupes selon qu'elles sont fluorescentes ou pas. Par exemple, *P. aeruginosa*, *P. putida* et *P. fluorescens*, espèces fluorescentes, se caractérisent par la production de niveaux élevés de deux sidérophores majeurs, la pyoverdine (PVD) et la pyochéline (PCH), qui sont très efficaces dans la captation des métaux lourds (Schalk, 2008). Ces molécules ont des affinités avec différents métaux divalents dont le cadmium ce qui s'avère très utile dans de nombreux processus dont celui de la bioremédiation. L'espèce fluorescente la plus connue est *P. aeruginosa*, dont les mécanismes d'absorption du fer par la PVD ou la PCH ont été largement étudiés (Schalk et al., 2001, 2002; Hoegy et al., 2005; Mislin et al., 2006; Greenwald et al., 2007; Schalk, 2008; Hoegy et al., 2009). De plus, la facilité de culture de telles bactéries en fait un modèle alternatif pour les scientifiques, en particulier pour les études de toxicité (Meyer, 2000).

Pseudomonas fluorescens est, quant à elle, une bactérie fluorescente essentiellement non pathogène. Elle fait partie des bactéries PGPR (*Plant growth promoting rhizobacteria*) ou rhizobactéries (Baranski et al., 2007; Wu et al., 2016). Elle possède aussi un pouvoir de

bioremédiation par la bioaccumulation et la dégradation des composés toxiques notamment pour les plantes dont elle colonise les racines, en augmentant l'efficacité de l'absorption racinaire des oligo-éléments métalliques toxiques présents dans les milieux naturels. Cependant, l'utilisation de *P. fluorescens* comme agent de bio contrôle chez les plantes reste encore limitée.

Le développement de biofilms de *P. fluorescens* et sa tolérance/résistance ont fait l'objet de plusieurs études dont certaines mettant en oeuvre des techniques d'imagerie. Par exemple, (Capdevila et al., 2004) ont analysé des gènes de *P. fluorescens* impliqués dans la synthèse des filaments flagellaires et étudié par microscopie électronique en transmission (TEM) leur rôle dans la colonisation compétitive des racines. (Mitik-Dineva et al., 2008; Mitik-Dineva et al., 2009) se sont intéressés à l'impact de la nano-topographie d'un support sur l'attachement bactérien de *P. fluorescens* en couplant trois techniques, microscopie de force atomique (AFM), microscopie électronique à balayage (SEM) et microscopie confocale à balayage laser (CLSM). Dans une autre étude, (Kang et al., 2021) ont effectué l'analyse protéomique de la réponse de *P. fluorescens* ATCC 13525 à l'acide lactobionique tout en utilisant le SEM et le TEM. Cependant, bien que de nombreuses autres études aient porté sur l'évaluation de la toxicité des métaux lourds vis-à-vis de *P. fluorescens* (Bauda and Block, 1985; Yu et al., 2011; Wang et al., 2014) aucune d'entre elles n'a effectué, à notre connaissance, le suivi de l'interaction du cadmium avec cette bactérie *via* des caractérisations morphologiques sollicitant plusieurs techniques d'imagerie à haute résolution.

L'une de ces techniques est l'AFM qui permet de sonder les propriétés de surface (morphologiques et mécaniques) à une échelle locale. Outre sa très haute résolution, l'AFM a l'avantage de ne nécessiter aucun traitement particulier des échantillons et de permettre des études en temps réel et dans des conditions physiologiques, ce qui explique son utilisation de plus en plus importante dans le domaine biologique (Dufrêne, 2001; Gammoudi, 2012; Mathélié-Guinlet, 2017).

Par conséquent, nous avons consacré cette deuxième partie de ma thèse à l'étude de la souche *P. fluorescens* (ATCC 13525) et à son interaction avec le cadmium. Nous nous sommes fixés deux objectifs :

- Le premier étant de déterminer les caractéristiques morphologiques de *P. fluorescens* saines à l'aide de plusieurs techniques de microscopie dont l'AFM et la microscopie électronique à balayage (MEB) ;

- Le second consistant à utiliser les caractéristiques morphologiques de *P. fluorescens* comme « un marqueur » permettant de nous renseigner sur l'interaction bactérie-cadmium et son impact.

En conséquence, cette partie 2 du manuscrit s'articule autour de 5 chapitres :

- Le Chapitre 1 aborde les différentes bases bibliographiques indispensables à la compréhension de l'étude.
- Dans le Chapitre 2 nous décrivons les protocoles expérimentaux que nous avons mis en place ainsi que les méthodes utilisées pour la caractérisation de *P. fluorescens* dont l'AFM, en particulier.
- Les deux chapitres suivants décrivent nos travaux visant à optimiser les conditions de croissance de l'espèce *P. fluorescens* (Chapitre 3) et ceux sur les méthodes d'immobilisation/fixation des bactéries sur un substrat solide (Chapitre 4).
- Enfin, dans le chapitre 5, nous suivons l'évolution morphologique de *P. fluorescens* suite à son exposition au cadmium en utilisant différentes techniques dont la microscopie optique (MO), le MEB couplé à une analyse chimique par spectrométrie à dispersion d'énergie (EDX) et l'AFM.

Cette partie se termine par une conclusion qui rappelle les principaux résultats et dans laquelle nous évoquons les perspectives de ce travail.

Références :

- Amari, T., Ghnaya, T., Debez, A., Taamali, M., Ben Youssef, N., Lucchini, G., Sacchi, G.A., Abdelly, C., 2014. Comparative Ni tolerance and accumulation potentials between *Mesembryanthemum crystallinum* (halophyte) and *Brassica juncea*: Metal accumulation, nutrient status and photosynthetic activity. *J. Plant Physiol.* 171, 1634–1644. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.06.020>
- Baranski, R., Klocke, E., Nothnagel, T., 2007. Enhancing resistance of transgenic carrot to fungal pathogens by the expression of *Pseudomonas* fluorescence microbial factor 3 (MF3) gene. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.12.002>
- Basha, S.A., Rajaganesh, K., 2014. Microbial bioremediation of heavy metals from textile industry dye effluents using isolated bacterial strains. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 3, 785–794.
- Bauda, P., Block, J.C., 1985. Cadmium biosorption and toxicity to laboratory - grown bacteria. *Environ. Technol.* <https://doi.org/10.1080/09593338509384363>
- Bestawy, E.El., Helmy, S., Hussien, H., Fahmy, M., Amer, R., 2013. Bioremediation of heavy metal-contaminated effluent using optimized activated sludge bacteria. *Appl. Water Sci.* 3, 181–192. <https://doi.org/10.1007/s13201-012-0071-0>
- Capdevila, S., Martínez-Granero, F.M., Sánchez-Contreras, M., Rivilla, R., Martín, M., 2004. Analysis of *Pseudomonas fluorescens F113* genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology*, 150, 3889–3897. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27362-0>
- Dufrêne, Y.F., 2001. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron* 32, 153–165. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00106-7](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00106-7)
- Gammoudi, I., 2012. Biocapteur à base de bactéries pour le contrôle environnemental (phdthesis). Université Sciences et Technologies - Bordeaux I.
- Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G.L.A., Graumann, P.L., Schalk, I.J., 2007. Real Time Fluorescent Resonance Energy Transfer Visualization of Ferric Pyoverdine Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* A ROLE FOR FERROUS IRON. *J. Biol. Chem.* 282, 2987–2995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609238200>
- Halder, D., Basu, M., 2016. Role of *Pseudomonas stutzeri* MTCC101 in Cadmium Bioremediation. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5, 139–148. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2016.502.016>
- Hernández, L.M., Gómara, B., Fernández, M., Jiménez, B., González, M.J., Baos, R., Hiraldo, F., Ferrer, M., Benito, V., Suñer, M.A., Devesa, V., Muñoz, O., Montoro, R., 1999. Accumulation of heavy metals and As in wetland birds in the area around Doñana National Park affected by the Aznalcollar toxic spill. *Sci. Total Environ.* 242, 293–308. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00397-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00397-6)
- Hoegy, F., Celia, H., Mislin, G.L., Vincent, M., Gallay, J., Schalk, I.J., 2005. Binding of Iron-free Siderophore, a Common Feature of Siderophore Outer Membrane Transporters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 280, 20222–20230. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500776200>
- Hoegy, F., Lee, X., Noel, S., Rognan, D., Mislin, G.L.A., Reimann, C., Schalk, I.J., 2009. Stereospecificity of the Siderophore Pyochelin Outer Membrane Transporters in Fluorescent *Pseudomonads*. *J. Biol. Chem.* 284, 14949–14957. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900606200>
- Hryniewicz, K., Baum, C., 2014. Application of Microorganisms in Bioremediation of Environment from Heavy Metals, in: Malik, A., Grohmann, E., Akhtar, R. (Eds.), *Environmental Deterioration and Human Health: Natural and Anthropogenic Determinants*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 215–227. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7890-0_9
- Kang, J.Y., Llewellyn, E., Chen, J., Olinares, P.D.B., Brewer, J., Chait, B.T., Campbell, E.A., Darst, S.A., 2021. Structural basis for transcription complex disruption by the Mfd translocase. *eLife* 10, e62117. <https://doi.org/10.7554/eLife.62117>

- Mathelié-Guinlet, M., 2017. Etude de l'interaction nanoparticules-bactéries : application à l'élaboration d'un biocapteur (These de doctorat). Bordeaux.
- Meyer, J.-M., 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. Arch. Microbiol. 174, 135–142. <https://doi.org/10.1007/s002030000188>
- Mislin, G.L.A., Hoegy, F., Cobessi, D., Poole, K., Rognan, D., Schalk, I.J., 2006. Binding Properties of Pyochelin and Structurally Related Molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Mol. Biol. 357, 1437–1448. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.080>
- Mitik-Dineva, N., Wang, J., Mocanasi, R.C., Stoddart, P.R., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2008. Impact of nano-topography on bacterial attachment. Biotechnol. J. 3, 536–544. <https://doi.org/10.1002/biot.200700244>
- Mitik-Dineva, N., Wang, J., Truong, V.K., Stoddart, P., Malherbe, F., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2009. Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* Attachment Patterns on Glass Surfaces with Nanoscale Roughness. Curr. Microbiol. 58, 268–273. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9320-8>
- Owolabi, J., Hekeu, M., 2015. Isolation and characterization of zinc resistant bacteria from a coil coating industrial wastewater treatment plant. undefined.
- Schalk, I.J., 2008. Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: Specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. J. Inorg. Biochem., 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry 102, 1159–1169. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.11.017>
- Schalk, I.J., Abdallah, M.A., Pattus, F., 2002. Recycling of Pyoverdine on the FpvA Receptor after Ferric Pyoverdine Uptake and Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochemistry 41, 1663–1671. <https://doi.org/10.1021/bi0157767>
- Schalk, I.J., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Abdallah, M.A., Pattus, F., 2001. Iron-free pyoverdine binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. Mol. Microbiol. 39, 351–361. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02207.x>
- Singh, R., Chadetrik, R., Kumar, R., Bishnoi, K., Bhatia, D., Kumar, A., Bishnoi, N.R., Singh, N., 2010. Biosorption optimization of lead(II), cadmium(II) and copper(II) using response surface methodology and applicability in isotherms and thermodynamics modeling. J. Hazard. Mater. 174, 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.097>
- Wang, F., Yao, J., Chen, H., Yi, Z., Yu, C., Tuo, Y., Ma, L., Yu, Q., 2014. Evaluate the heavy metal toxicity to *Pseudomonas fluorescens* in a low levels of metal-chelates minimal medium. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 21, 9278–9286. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2884-x>
- Wu, H., Wu, Q., Wu, G., Gu, Q., Wei, L., 2016. Cd-Resistant Strains of *B. cereus* S5 with Endurance Capacity and Their Capacities for Cadmium Removal from Cadmium-Polluted Water. PLOS ONE 11, e0151479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151479>
- Yakoubi, L., Benmalek, Y., Benayad, T., Fardeau, M.-L., 2018. Caractérisation des bactéries cadmium-résistantes isolées de sols pollués en Algérie et évaluation de l'élimination du cadmium en utilisant des cellules libres ou immobilisées [WWW Document]. URL <http://hdl.handle.net/2042/68139>
- Yu, C.L., Lu, Z.P., Ge, F.Z., Zhao, E.L., 2011. Biosorption of Cadmium onto *Pseudomonas fluorescens*: Application of Isotherm and Kinetic Models. Adv. Mater. Res. 171–172, 49–52. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.171-172.49>
- Zhang, X., Wang, H., He, L., Lu, K., Sarmah, A., Li, J., Bolan, N.S., Pei, J., Huang, H., 2013. Using biochar for remediation of soils contaminated with heavy metals and organic pollutants. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 8472–8483. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1659-0>

Chapitre I : Etat de l'art

Le premier chapitre de la deuxième partie de ma thèse fait le rappel des différentes bases bibliographiques indispensables à la compréhension de l'étude. Nous décrivons brièvement dans la première partie la pollution des sols due à l'accumulation des différents polluants et le rôle de certains microorganismes dans l'immobilisation de ces dernières. La deuxième partie portera sur l'état de l'art des bactéries et leur association avec les plantes pour favoriser le processus de la phytoremédiation. Enfin dans la troisième partie, nous présentons le modèle bactérien de cette étude et les différentes techniques de caractérisation mises en œuvre.

Plan du chapitre I

1.	Introduction	108
2.	Pollution des sols	108
3.	La dépollution des sols (biologique et chimique)	109
4.	Le monde de microorganismes	112
4.1	Les champignons	112
4.2	Les lichens	112
4.3	Les bactéries	112
5.	Le monde bactérien	113
5.1	Présentation	113
5.2	Classification des bactéries	114
5.2.1	Classification bactérienne selon leurs structures et formes (classification de Linné)	114
5.2.2	Classification bactérienne par Gram	115
5.2.3	Classification bactérienne par température optimale de croissance	116
5.3	Présence bactérienne dans l'environnement	116
5.4	Rôles des bactéries associées aux plantes	117
6	Caractéristiques du genre <i>Pseudomonas</i>	118
6.2	Caractéristiques métaboliques	119
6.3	Classification du genre <i>Pseudomonas</i>	121
6.4	Distribution écologique et rôle du genre <i>Pseudomonas</i>	122
6.5	<i>Pseudomonas</i> fluorescentes agents de biocontrôle et croissance des plantes... ..	124
7.	Caractérisation de la bactérie <i>Pseudomonas fluorescens</i>	125
7.1	Identification et caractérisation morphologique	125
7.2	Classification de l'espèce <i>Pseudomonas fluorescens</i>	126
8.	Etude structurale de la membrane bactérienne de la souche <i>Pseudomonas</i>	128
8.1	Structure membranaire	128
9.	Utilisation de la microscopie pour caractériser le genre <i>Pseudomonas</i>	129
9.1	Etude par microscope à force atomique	129
10.	Conclusion	138
11.	Références	139

1. Introduction

Alors que la population humaine augmente et que l'industrialisation explose pour soutenir la population croissante, la pollution de l'environnement est devenue un problème urgent pour les êtres humains. De nombreux cas ont été signalés où des polluants toxiques dans l'environnement se sont avérés avoir un impact négatif grave sur divers organismes vivants (Jaishankar et al., 2014) (Bartrons et al., 2016) (Ding et al., 2018).

Cela est particulièrement vrai pour les êtres humains, qui se situent au sommet de la chaîne alimentaire. La plupart des polluants organiques sont dégradés avec le temps, principalement par des microorganismes, mais les polluants inorganiques ne le sont pas et s'accumulent dans l'environnement. Les polluants inorganiques incluent les métaux lourds (cadmium (Cd), plomb (Pb), chrome (Cr), mercure (Hg) et nickel (Ni)) ou les métalloïdes (As ...) qui polluent l'environnement et entravent gravement la croissance et le développement des plantes, et donc diminuent la productivité des plantes cultivées (Clemens, 2006). Ces contaminants métalliques et métalloïdes proviennent de sources naturelles ou anthropiques, telles que les activités industrielles, agricoles et minières (Fasani et al., 2018).

On s'intéresse dans ce chapitre à la pollution et la dépollution des sols contaminés par les métaux lourds, au monde des microorganismes et bactéries et plus précisément au genre *Pseudomonas*, en faisant une étude bibliographique sur cette bactérie et sur son espèce la *Pseudomonas fluorescens* qui a fait l'objet de notre étude.

2. Pollution des sols

La pollution ou contamination des sols est définie comme la présence de produits chimiques toxiques (polluants ou contaminants) dans le sol, à des concentrations suffisamment élevées pour présenter un risque pour la santé humaine et / ou l'écosystème. La plupart des contaminants du sol proviennent de l'activité humaine, notamment des processus industriels, des mines, des déchets ménagers, des déchets commerciaux, des produits pharmaceutiques humains et animaux.

Les recherches actuelles concernent les métaux lourds et les produits chimiques organiques synthétiques comme principaux contaminants du sol. Plusieurs études ont montré que ces contaminations pourraient avoir des conséquences majeures, par exemple les réserves d'eau autour de la mine de cuivre à Kilembe dans l'ouest de l'Ouganda contaminées par du Cu, Co et Ni (Mwesigye et al., 2016), ou les concentrations de Pb dans les sédiments autour d'une mine de Pb / Zn dans le nord-est du Maroc (Azhari et al., 2017). Liu et coll. (2013) ont signalé des

concentrations de Cu et de Cd atteignant respectivement 426,15 et 2,55 mg.kg⁻¹ autour de la mine Dexing Cu en Chine, (Qiao et al 2020) ont aussi indiqué la présence de concentrations très élevées de métaux lourds dans les eaux de surface, les sédiments et les sols autour du gisement inexploité de Rona Cu au Tibet.

La pollution des sols a un impact majeur sur la planète entière et elle impactera le cadre de vie des générations futures et leur bien-être. Le mieux que nous puissions faire maintenant est de prendre des mesures pour réduire la pollution et nettoyer les zones polluées, dans la mesure du possible, au risque que notre sol devienne la cause d'épidémies sanitaires majeures. En outre, la population humaine devrait augmenter de deux milliards au cours des 40 prochaines années. Cela étant, il est de la plus haute importance que le sol soit préservé pour nourrir la population. Si des mesures visant à réduire la pollution des sols ne sont pas mises en place, il est possible que les terres ne puissent pas subvenir aux besoins de l'ensemble de la population, et beaucoup seront obligées de recourir à des sources synthétiques de nourriture, qui peuvent elles-mêmes causer un certain nombre de maladies (Evangelou et al., 2007).

Il existe diverses méthodes de remédiation des sols pollués ; elles vont des méthodes physiques et chimiques aux méthodes biologiques. La plupart des méthodes physiques et chimiques (telles que l'encapsulation, la solidification, la stabilisation, l'électrocinétique, la vitrification, l'extraction de la vapeur et le lavage et le rinçage du sol) sont coûteuses et ne rendent pas le sol adapté à la croissance des plantes (Marques et al, 2009). L'approche biologique (bioremédiation) encourage par contre l'implantation / le rétablissement des végétaux sur des sols pollués. C'est une approche respectueuse de l'environnement car elle est réalisée via des processus naturels. La bioremédiation est également une technique d'assainissement économique par rapport à d'autres techniques d'assainissement.

3. La dépollution des sols (biologique et chimique)

La dépollution des métaux toxiques nécessite une approche spécifique, car les métaux ne peuvent pas être minéralisés et nécessitent donc des méthodes appropriées pour les éliminer. Différentes techniques telles que physiques, chimiques et biologiques ont été utilisées pour éliminer les contaminants de métaux lourds de l'environnement (Baker, 2000) (Bouwman et al., 2005) (Evangelou et al., 2007). Certaines ont des limites telles que le coût, les aspects chronophages, les problèmes logistiques et l'implication mécanique. De nos jours, l'immobilisation *in situ* des métaux, la biorémédiation et les techniques biologiques se sont révélées être les meilleures solutions pour l'élimination des métaux du sol.

Par ailleurs, la durée relativement plus longue de la bio-décontamination, particulièrement en comparaison avec l'apparente rapidité des techniques d'excavation conventionnelles (Batty et Dolan, 2013), et la difficulté à atteindre les contaminants situés en profondeur (Baker 2000, Cameselle, Chirakkara, et Reddy, 2013) impliquent que la phytoremédiation n'est pas nécessairement adaptée à tous les cas de terrains contaminés. Cependant, comme le résumant (Montpetit et Lachapelle, 2015), la plupart des auteurs cités ici ont identifié des solutions pratiques à chacun des problèmes énumérés.

La phytoremédiation reste sous utilisée. Le nombre de projets entrepris avec cette technologie semble disproportionnellement bas en regard du potentiel identifié et reconnu par la communauté scientifique.

Une alternative prometteuse consiste à optimiser l'effet synergique des plantes et des microorganismes (Glick, 2003), en couplant la phytoextraction à la bio-augmentation du sol, également appelée rhizoremédiation (Kuiper et al., 2004). Cette technique a été largement développée pour la dépollution des sols contaminés par des polluants organiques (Barac et al., 2004) (Aken et al., 2004), mais pas pour les métaux. Globalement, l'absorption de métaux par les plantes peut être améliorée de deux manières complémentaires :

- (i) amélioration de la mobilité des métaux dans les matrices poreuses (sol et sédiments), entraînant des concentrations de métaux plus élevées dans les plantes, grâce aux microorganismes produisant des bio-surfactants (Herman et al., 1995) (Mulligan et al., 1999) (Mulligan et al., 2001) comme les sidérophores (Diels et al., 1999) (Dubbin and Louise Ander, 2003) et les acides organiques (Dubbin and Louise Ander, 2003) et / ou ;
- (ii) amélioration de la biomasse des plantes en les associant à des rhizobactéries promotrices de la croissance des plantes (PGPR) « *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* » (Zhuang et al., 2007) et / ou à des champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF) « *Arbuscular Mycorrhizal Fungi* » (Khan, 2006).

Bien que les études consacrées à l'extraction des métaux du sol par des plantes assistées par des micro-organismes ne soient pas nombreuses on peut quand même noter, depuis quelques années, une légère augmentation de la production scientifique qui lui est dédiée. En outre, seules quelques revues (Khan et al., 2000) (Kuiper et al., 2004) (Peter et al., 2004) (Khan, 2006)(Zhuang et al., 2007) (Wasi et al., 2013) (Chellaiah, 2018) ont été publiées sur ce sujet, décrivant les relations entre les microorganismes et les plantes sur une base métabolique et / ou

physiologique sans considérer la phytoremédiation comme un processus de nettoyage.

L'étude de la littérature montre aussi deux scénarios opposés. Certains microorganismes (i) réduisent la toxicité des métaux pour les plantes en diminuant leur accumulation dans les plantes, tandis que d'autres (ii) augmentent la quantité de métal extraite par les plantes ou en augmentant la biomasse des plantes (effet de dilution) ou la concentration de métaux accumulés chez les plantes. Dans ce dernier cas, les microorganismes réduisent le stress dû à la toxicité des métaux.

Les performances microbiennes ne peuvent pas être comparées car les méthodes utilisées pour estimer la fraction biodisponible des métaux varient d'une expérience à l'autre. En effet, plusieurs agents d'extraction sont utilisés tels que l'eau (Chen et al., 2004) (Di Gregorio et al., 2006) (C. H. Wu et al., 2006) (S. C. Wu et al., 2006a), $MgCl_2$ (Braud et al., 2006a) (Braud et al., 2006b), NH_4NO_3 (Baum et al., 2006), NH_4O-Ac (S. C. Wu et al., 2006a) (S. C. Wu et al., 2006b), DTPA (S. C. Wu et al., 2006b) (Chen et al., 2006), KNO_3 (Di Gregorio et al., 2006) et HCl (Wang et al., 2007). La biodisponibilité des métaux est même divisée en trois pools différents (Aboushanab et al., 2006): métaux immédiatement solubles (avec de l'eau), formes de métaux échangeables (avec KNO_3) et formes de métaux complexés ou adsorbés (avec EDTA).

Les sidérophores microbiens, principalement localisés dans la rhizosphère (Bossier et al., 1988), améliorent la mobilité de Fe^{III} ainsi que divers autres cations (Höfte et al., 1993) (Diels et al., 2002). L'analyse en composantes principales (ACP) montre des relations positives étroites entre les microorganismes producteurs de sidérophores et la quantité de Cr et de Pb dans la fraction échangeable (Braud et al., 2006b). Des bactéries telles que *Azotobacter chroococcum* (bactéries fixatrices d'azote), *Bacillus megaterium* (solubilisant P), *Bacillus mucilaginosus* (solubilisant K) (S. C. Wu et al., 2006a) (S. C. Wu et al., 2006b) et *Bacillus sp. RJ16* (Sheng and Xia, 2006) peuvent diminuer la valeur du pH, probablement en excréant des acides organiques de faible poids moléculaire, améliorant ainsi la biodisponibilité du Cd, du Pb et du Zn (Chen et al., 2005).

Si les effets des micro-organismes sur la disponibilité des contaminants métalliques dans les sols sont relativement bien documentés, la plupart des études repose majoritairement sur une approche géochimique¹ et non biologique (Leyval et al, 1997, Raja et al, 2018). Il est à noter

¹ Approche géochimique : Étude de la répartition des éléments chimiques, de leur distribution dans les sols, les minéraux et les eaux, de leur origine, de leur nature et de leur comportement au cours d'une étude.

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).

4. Le monde de microorganismes

Les bactéries, les microalgues et de nombreux champignons comme les levures font partie des microorganismes. Ils sont très adaptatifs, et interagissent fortement avec leur milieu.

4.1 Les champignons

Les champignons sont des organismes chimio-hétérotrophes (organisme qui doit obtenir à la fois le carbone et l'énergie à partir des substances organiques), ubiquitaires dans les sols.

De par 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) : (i) l'altération organique (par des acides organiques et inorganiques), (ii) l'altération physique (les activités mécaniques qui désagrègent ou agrègent les particules). Ainsi, une altération chimique peut se produire par la production d'acides organiques et de sidérophores (Rosling et al, 2009).

4.2 Les lichens

Un lichen est l'association entre un champignon et un symbiote doué de photosynthèse à l'origine d'un organisme végétatif stable ayant une structure spécifique.

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).

4.3 Les bactéries

Si le rôle des différents microorganismes (notamment les lichens et les champignons) dans la modification et la dégradation des minéraux et des métaux a été largement étudié, l'impact des bactéries dans ce processus et les mécanismes moléculaires impliqués restent peu compris (Uroz et al, 2009).

Possédant une importante diversité phylogénétique et métabolique et une grande habileté à s'adapter, à coloniser différents environnements et 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 microenvironnements 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).

5. Le monde bactérien

5.1 Présentation

Observées pour la première fois au 17^{ème} siècle, les bactéries n'ont longtemps guère suscité d'intérêt. Si au début de 20^{ème} siècle, leur caractère pathogène a surtout été mis en avant, on sait aujourd'hui qu'elles sont à l'origine de l'oxygène atmosphérique, elles sont les reines de la biotransformation. Elles habitent les milieux les plus extrêmes, participent au bon fonctionnement de notre corps et de notre écosystème.

Les bactéries sont des micro-organismes vivants mesurant entre 0,5 et 10-15 μm . Ce sont des organismes procaryotes qui ne possèdent pas de noyau, mais ont pour la majorité un ADN chromosomique circulaire situé dans le cytoplasme. De nombreuses bactéries contiennent de l'ADN extra-chromosomique (*Pseudomonas*, *E. coli*...etc.), sous forme de plasmides. Elles sont entourées d'une paroi complexe (fig. I-1).

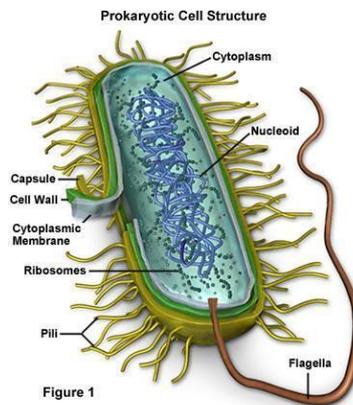


Figure I-1 : Ultrastructure d'une bactérie²

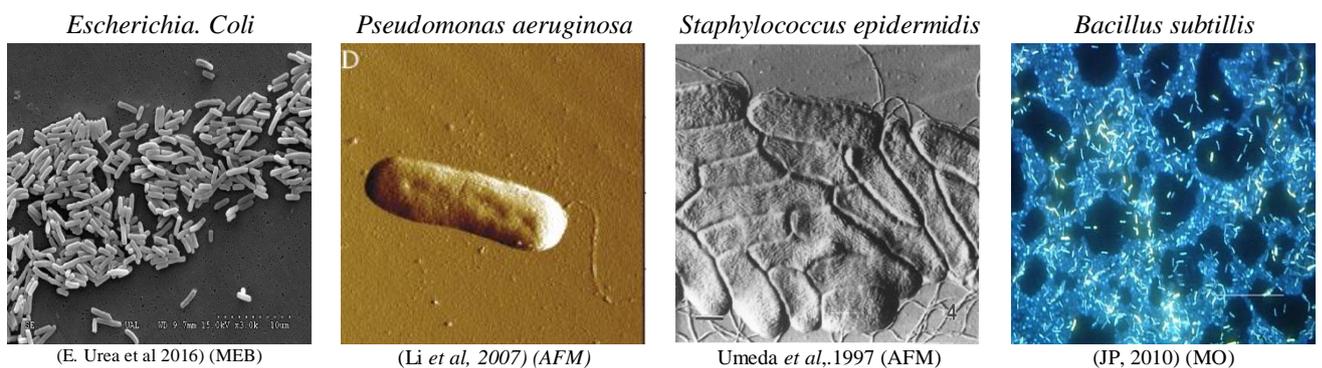


Figure I-2 : Quelques images de microscopie de bactéries répandues dans la littérature.

² <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/bacteriacell.html>

En ce qui concerne la nomenclature des bactéries, le nom est composé de deux mots : le premier mot correspond au genre, le deuxième correspond à l'espèce. Par exemple : *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*.

5.2 Classification des bactéries

Il existe différents types de classifications des bactéries. Dans notre étude, on s'intéressera à 3 types de classifications : structure et forme, type de Gram et température de croissance :

5.2.1 Classification bactérienne selon leurs structures et formes (classification de Linné)

Il existe différentes formes de bactéries, chaque forme ayant une appellation particulière (fig. I-3):

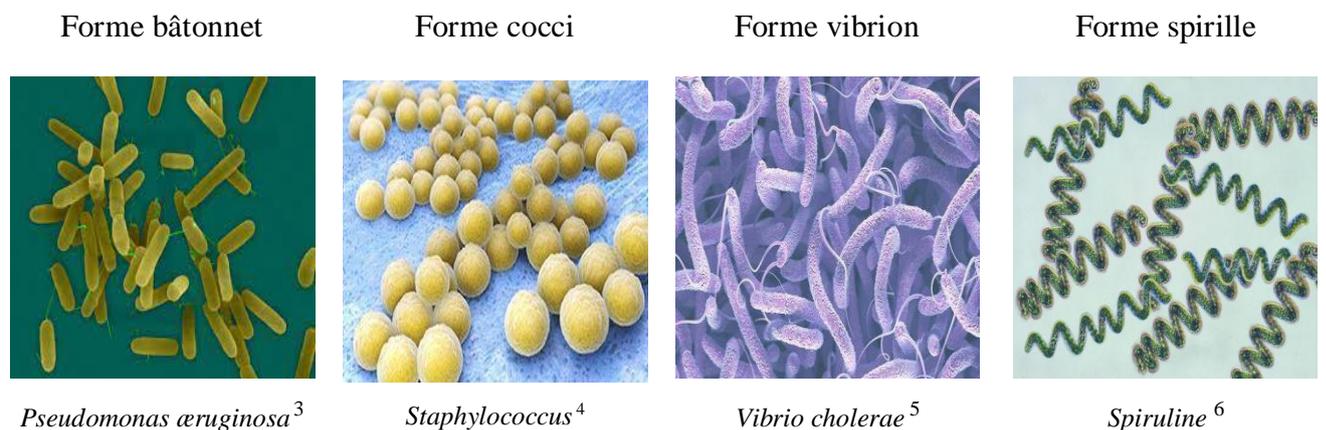


Figure I-3 : Quelques images de microscopie électronique par balayage (MEB) représentant les différentes formes des bactéries.

- **Les bacilles en forme de bâtonnets** possèdent une taille comprise entre 1 à 10 µm de diamètre (largeur et longueur). Exemple : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.
- **Les coques ou cocci** : ce sont des bactéries sphériques, de diamètre compris entre 1 à 2 µm. Exemple : *Sarcina*, *Streptocoques*.
- **Les vibrions ou les incurvés** : ce sont des bâtonnets en forme de virgule. Ce type de bactéries a une longueur de 0.5 µm à 3µm. Exemple : *Vibrio cholerae*.

³ http://www.bacteriologie.wikibis.com/pseudomonas_aeruginosa.php

⁴ <https://www.antibio-responsable.fr/bacteries/staphylocoque-dore>

⁵ https://www.doctissimo.fr/html/sante/encyclopedie/sa_1450_cholera.htm

⁶ <https://blog.olivier-microalgues.fr/506-spiruline-un-concentre-de-mineraux.html>

- **Les spirilles** ont une forme bâtonnet très allongé et ondulatoire, comme un filament spiralé et rigide. Leur longueur peut atteindre quelques millimètres. Exemple : Spiruline.

5.2.2 Classification bactérienne par Gram

Cette classification repose sur les caractéristiques de la membrane et de la paroi de la bactérie. En effet une bactérie Gram-positif a une structure uni-membranée mais elle possède une couche de peptidoglycane très épaisse, contrairement à celle des bactéries à Gram négatif, qui possèdent une structure membranaire double et une paroi mince de peptidoglycane (fig. I-4).

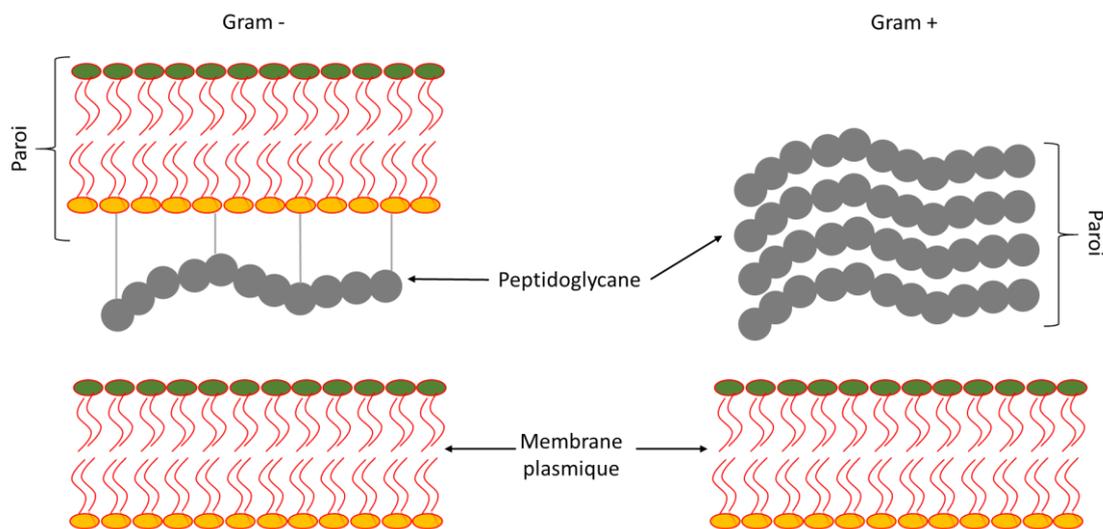


Figure I-4 : Parois des bactéries Gram- et Gram+.

Pour les identifier, il existe un procédé de classification des bactéries appelé coloration de Gram, mis au point en 1884 par le bactériologiste Hans Christian Gram. C'est une procédure simple qui repose sur trois étapes : (i) coloration en violet, (ii) décoloration à l'éthanol, (iii) contre-coloration à la fuchsine.

Exemple de coloration de Gram (figure I-5) : une bactérie à Gram+ a une paroi épaisse, l'ensemble du corps cellulaire sera coloré en violet, l'étape de lavage à l'éthanol n'ayant pas entraîné de décoloration après incubation dans le violet cristal. La bactérie à Gram – qui possède une paroi fine laissera l'éthanol pénétrer à l'intérieur du corps cellulaire et sera décoloré puis contre-colorée en rose (Moyes et al, 2009).

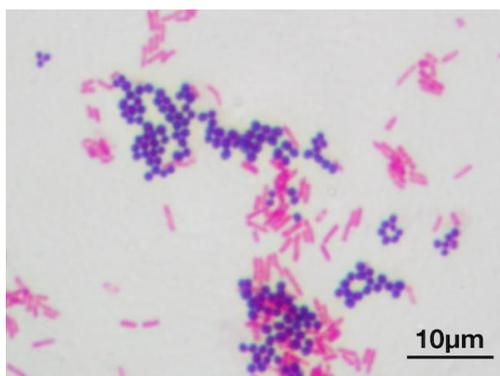


Figure I-5 : Image de microscopie optique de bactéries staphylocoques (Gram +) et *E. coli* (Gram -)

7

5.2.3 Classification bactérienne par température optimale de croissance

- **Bactéries psychophiles** : elles se développent à basse température, de -10 °C à environ 20 °C. Exemple : *Listeria monocytogenes*.
- **Bactéries mésophiles** : elles ont une température de croissance maximale proche de celle du corps humain soit 37°C. Elles peuvent se développer à une température variant entre 15° et 40°C. Exemple : *Escherichia coli*.
- **Bactéries thermophiles** : elles se développent à des températures élevées, supérieures à 45 °C. Exemple : *Thermus aquaticus*.
- **Bactéries hyperthermophiles** : elles poussent à des températures extrêmement élevées, supérieures à 100 °C. Exemple : *Aquifex pyrophilus*

5.3 Présence bactérienne dans l'environnement

Les bactéries sont très nombreuses et ont souvent été considérées comme des agents pathogènes et agressifs, responsables de maladies plus ou moins graves. Mais, ce n'est pas toujours le cas. En effet, le corps humain est colonisé par de nombreuses bactéries qui constituent la « flore commensale » (figure I-6). Par exemple, au niveau du système digestif, le microbiote intestinal, largement impliqué dans les processus de digestion et de défense de l'organisme, est composé d'environ mille milliards de bactéries. Certaines de ces bactéries sont utilisées dans l'alimentation ou dans certains médicaments pour rééquilibrer le microbiote et rétablir une fonction digestive normale (suite à des épisodes de diarrhée), d'autres sont utilisées de façon

⁷ <https://vulgariscience.com/sante/difference-bacterie-gram-positif-gram-negatif/>.

directe ou indirecte pour réaliser la biosolubilisation de métaux toxiques ou précieux présents dans le sol.

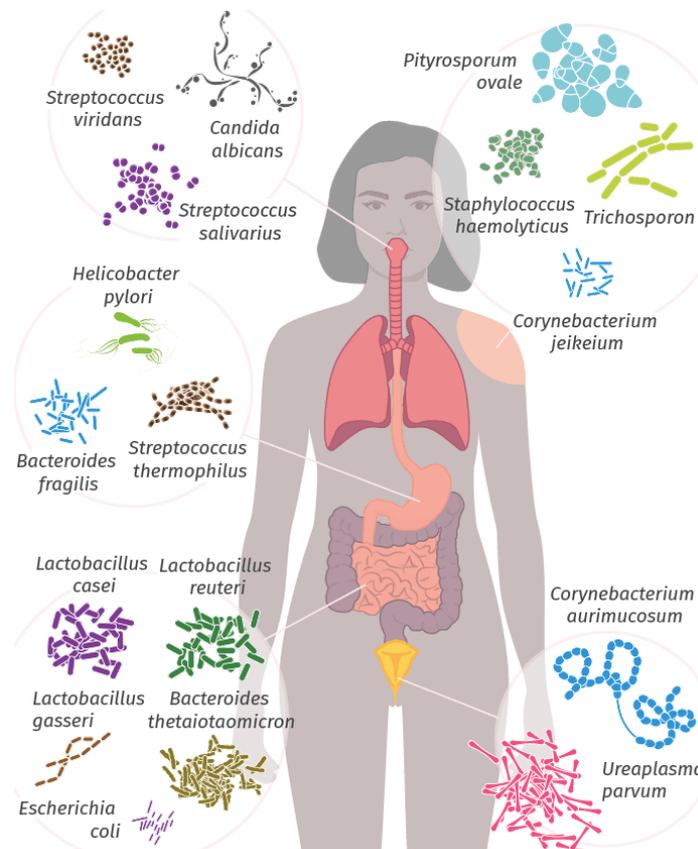


Figure I-6 : Représentation partielle de la diversité du microbiote humain⁸.

5.4 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 (Citterio et al., 2005). Différents mécanismes, directs (solubilisation du phosphore et du potassium, fixation de l'azote (figure I-7), 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) (Yu et al, 2021).

Au niveau des sols, les populations indigènes de *Pseudomonas fluorescens* sont omniprésentes (Latour et al., 1999), et constituent l'un des groupes bactériens importants au niveau de la

⁸ (www.Lelivrescolaire.fr)

rhizosphère. Cependant, très peu d'études se sont focalisées sur l'influence de ces bactéries sur les minéraux du sol.

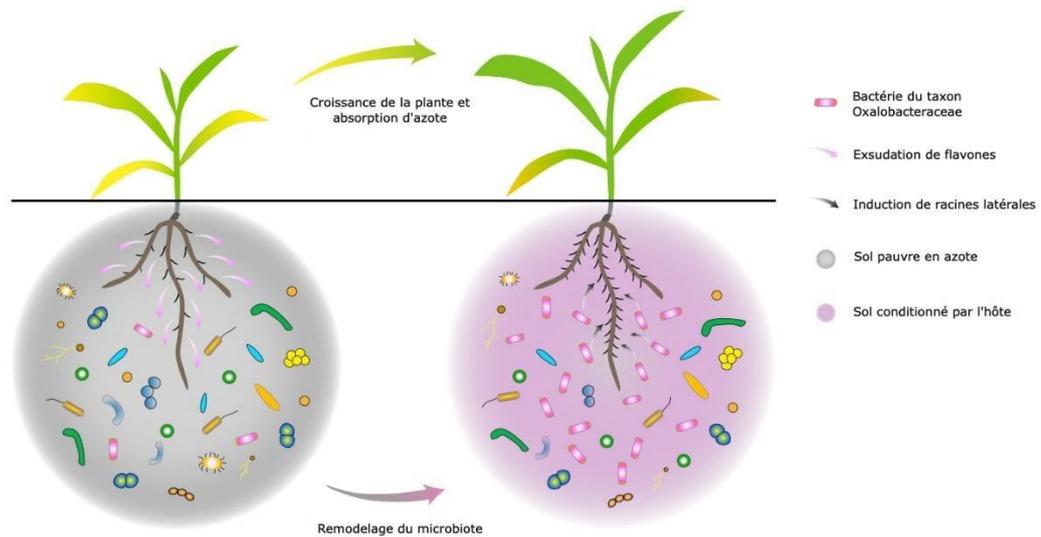


Figure I-7 : L'interaction entre les racines du maïs et certaines bactéries améliore les performances d'absorption d'azote par la plante, (Yu et al 2021).

6 Caractéristiques du genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important qui appartient à la sous-classe γ des protéobactéries⁹ et comprend plus d'une centaine d'espèces ubiquitaires (figure I-8). Cependant, depuis la découverte du genre *Pseudomonas*, beaucoup de noms d'espèces lui ont été assignés (groupes I à V de Palleroni). Le nombre d'espèces quant à lui a subi de nombreuses variations principalement dues à la description de nouvelles espèces et aux différents changements de la définition du genre (Palleroni and Moore, 2004) (Bossis et al., 2000).

⁹ Protéobactéries : désigne les bactéries pathogènes.

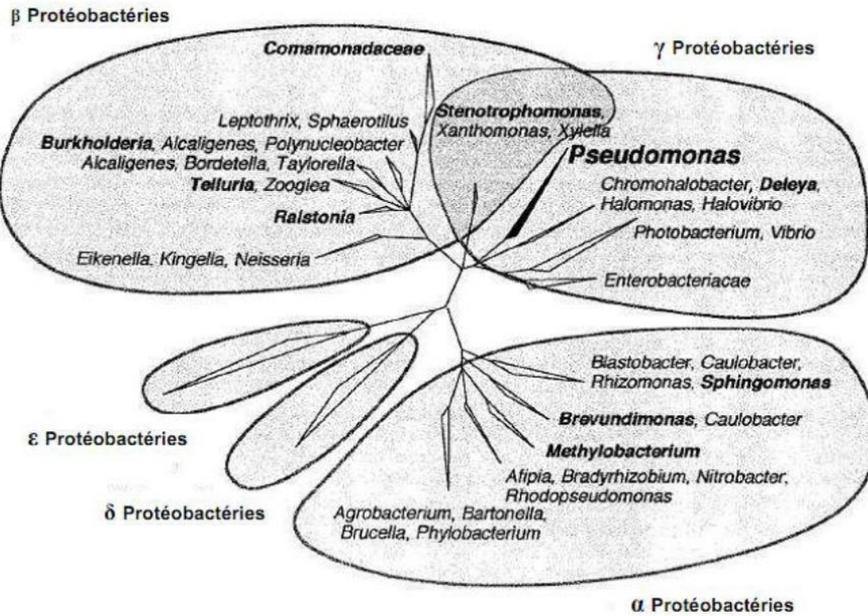


Figure I-8 : Relations phylogénétiques entre les différents groupes des protéobactéries contenant les genres bactériens actuellement ou anciennement (en gras) associés aux *Pseudomonas* (Bossis et al., 2000).

6.2 Caractéristiques métaboliques

Le genre *Pseudomonas* renferme des bacilles à Gram négatif, droits, de 0,5 à 1,0 μm de diamètre sur 1,5 à 5,0 μm (ou plus) de longueur, non sporulés, mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. Il s'agit d'organismes aérobies, à métabolisme strictement respiratoire, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose), oxydase positive¹⁰ et non fermentatif (comme par exemple chez *Pseudomonas aeruginosa* qui ne peuvent pas cataboliser le glucose et sont donc incapable de fermenter, figure I-9).

Les températures cardinales auxquelles les espèces se multiplient varient de 4° à 42°C (Tableau I-1), cette dernière étant caractéristique de l'espèce *P. aeruginosa*, alors que la température optimale pour la croissance des espèces saprophytes (qui dégradent la matière organique) est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4,5, ni métaboliser le lactose. Par exemple, sur le milieu de culture Mc Conkey, l'examen au rouge de méthyle et celui de Voges Proskauer sont négatifs (Palleroni, 1993).

¹⁰ Une bactérie est oxydase positive si un fragment de culture est capable d'oxyder la forme réduite de dérivés N-méthylés du paraphénylènediamine en semi-quinone (rose violacé).

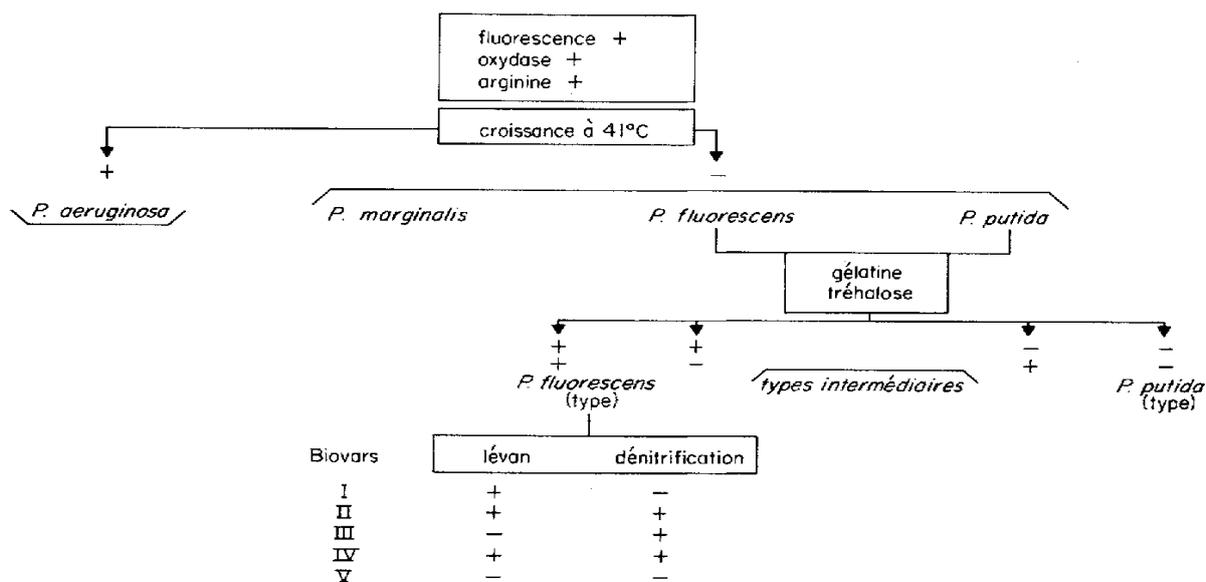


Figure I-9 : Schéma général de caractérisation du groupe *Pseudomonas fluorescens* (Stanier et al., 1966 ; Anzai et al., 2000).

Tableau I-1 : Caractères d'identification des principales espèces de *Pseudomonas*

Espèces caractères	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. pseudo-mallei</i>	<i>P. mallei</i> *	<i>P. cepacia</i>	<i>P. diminuta</i>
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase du glucose	+	+	+	+	+	+	+	-
Pyocyanine/Pyoverdine	+/+	-/+	-/+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Culture à 4°C / Culture à 42°C	-/+	+/-	d/-	+	+	+/d	-/d	-/d
Respiration nitrate	+	d	-	+	+	+	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	-	+	+	-	-
Gélatinase	+	+	-	-	++	+	D	-
Citrate de Simmons	+	+	+	+	-	-	+	-

P. mallei : bacille immobile

d : variable suivant les souches

Les *Pseudomonas* ont la capacité de dégrader des composés complexes, tel que les protéines et les polysaccharides comme l'amidon, la cellulose. Certaines seulement comme *P. pseudoalcaligenes* peuvent dégrader le poly β -hydroxybutyrate (Palleroni, 1993). L'aptitude de certaines espèces à dégrader des substances xénobiotiques à la cellule a également retenu l'attention de différents chercheurs (Latour et Lemanceau, 1997, Bossis et al., 2000). De

nombreux isolats de *P. fluorescens* et *P. putida* ont été cités en exemple comme souches capables de dégrader des molécules aromatiques plus ou moins complexes. L'assimilation de composés aromatiques semble par contre moins courante chez les isolats provenant de sols non contaminés ou de la rhizosphère (Latour et Lemanceau, 1997, Campbell et al., 1995).

Le catabolisme des xénobiotiques par les espèces *Pseudomonas* fluorescentes se caractérise par la variété et la plurifonctionnalité des enzymes de dégradation. Il présente de multiples voies périphériques permettant les premières attaques d'une gamme importante de composés. Enfin, certaines populations des *Pseudomonas* fluorescentes ont la possibilité d'assimiler l'azote (passage de l'azote organique en azote minéral). Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxinomique considéré (Matsubara et Zumft, 1982, Clays-Josserand et al., 1995). Donc ces bactéries contribuent d'une manière significative, à réduire les nitrates en nitrites qui constituent des polluants des nappes phréatiques (Latour et Lemanceau, 1997). En raison de la richesse de leurs voies métaboliques, elles ont aussi la capacité de résister à différents antiseptiques et antibiotiques ce qui justifie leur fréquente présence en milieu hospitalier où elles peuvent être isolées de l'environnement humide (Latour et Lemanceau, 1997).

Comme pour un grand nombre de bactéries, celles du genre *Pseudomonas* sont capables de produire une couche d'exo-polysaccharides (EPS) les entourant et les protègent de la phagocytose par les macrophages chez les mammifères. Cette couche d'EPS leur permet de former des biofilms, grâce auxquels elles peuvent rester collées aux surfaces, de telle manière qu'il est difficile de les déloger (Visca et al., 2007). En soumettant les cellules de *P. aeruginosa* en croissance à des concentrations de phosphate limitantes, Poole & Hancock 1986 ont démontré l'apparition d'une protéine de la membrane externe (protéine R appelée aussi « *OprP* »). Cette protéine a un site de liaison au phosphate et est supposée être impliquée dans le transport du phosphate (Palleroni, 1993). Les espèces authentiques de *Pseudomonas*-Groupe I (*P. putida*, *P. fluorescens* et *P. chlororaphis*) partagent des protéines particulières de la membrane externe, de tailles similaires à celle de *OprP* de *P. aeruginosa*. Ce genre produit aussi beaucoup de poly-hydroxy alcanates et d'alginates ainsi que d'autres substances métaboliques, ce qui les rend d'un grand intérêt biotechnologique.

6.3 Classification du genre *Pseudomonas*

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, non sporulés, aérobies à métabolisme strictement respiratoire et chimio-organotrophes¹¹. Mais cette définition ne permet

¹¹ Chimio-organotrophe : un organisme qui tire son énergie du métabolisme d'un substrat organique.

pas de les différencier des autres bactéries à Gram négatif, et doit être complétée par d'autres caractéristiques phénotypiques.

L'édition du Bergey's (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*) compte de nombreuses méthodes utilisées dans la classification des *Pseudomonas*. Ces méthodes révèlent les efforts fournis pour la caractérisation des espèces de *Pseudomonas*, incluant la sensibilité à certains composés, les caractéristiques génétiques et écologiques (Tableau I-1), le pouvoir pathogène et la structure antigénique (Colwell et Mandel, 1964, Colwell et al., 1965) (de Bruijn et al., 2007; Mulet et al., 2010). L'une des caractéristiques propres au *Pseudomonas* est la production des pigments hydrosolubles diffusant dans les milieux de culture. La présence ou l'absence d'un pigment fluorescent (pyoverdine) permet de séparer les espèces du genre en deux groupes, les *Pseudomonas* fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*) et les *Pseudomonas* non-fluorescentes (*P. stutzeri*). La pyoverdine est un pigment de couleur jaune-verte, soluble dans l'eau. Sa synthèse dépend de la concentration en ions Fe^{2+} et dans les milieux carencés en fer sa production est abondante.

Tableau I-2 : Liste des principales espèces attribuées aux *Pseudomonas* authentiques (ARN groupe I). (Woese et al. 1985).

Espèces	Commentaires
<i>P. aeruginosa</i> <i>P. putida</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. chlororaphis</i>	Espèces fluorescentes, non pathogènes Principalement saprophyte, oxydase (+) ; certaines espèces subdivisées en biovars ; placé dans la branche γ des bactéries violettes.
<i>P. cichorii</i> <i>P. syringae</i> <i>P. viridiflava</i> <i>P. agarici</i> <i>P. tolaasii</i> <i>P. asplenii</i>	Espèces fluorescentes Pathogènes ; <i>P. syringae</i> et <i>P. viridiflava</i> sont négatifs à l'oxydase (-) <i>P. syringae</i> comprend de nombreux pathovars (classement basées sur les caractéristiques de pathogénicité) ; placées dans la branche γ des bactéries violettes.
<i>P. fragi</i> <i>P. stutzeri</i> <i>P. mendocina</i> <i>P. alcaligenes</i> <i>P. pseudoalcaligenes</i>	Espèces non fluorescentes Placées dans la branche γ des bactéries violettes. Responsable de la détérioration des produits laitiers.

6.4 Distribution écologique et rôle du genre *Pseudomonas*

La plupart des *Pseudomonas* étudiées au cours des dernières années sont ubiquitaires et isolées de l'eau, du sol, des poussières en suspension dans l'air et des végétaux. Les souches ont généralement une très large versatilité nutritionnelle et elles peuvent vivre dans des niches écologiques très diverses (figure I-10). Par exemple et dans le cadre du règne animal, *P. plecoglossicida* est un pathogène de poissons (Nishimori et al., 2000) ; *P. salomonii* et *P.*

palleroniana sont des espèces phytopathogènes (Gardan et al., 1992) ; *P. simiae* a été isolé d'un échantillon clinique de singe (Vela et al., 2006) et *P. costantinii* est un pathogène de champignons comestibles (Munsch et al., 2002).

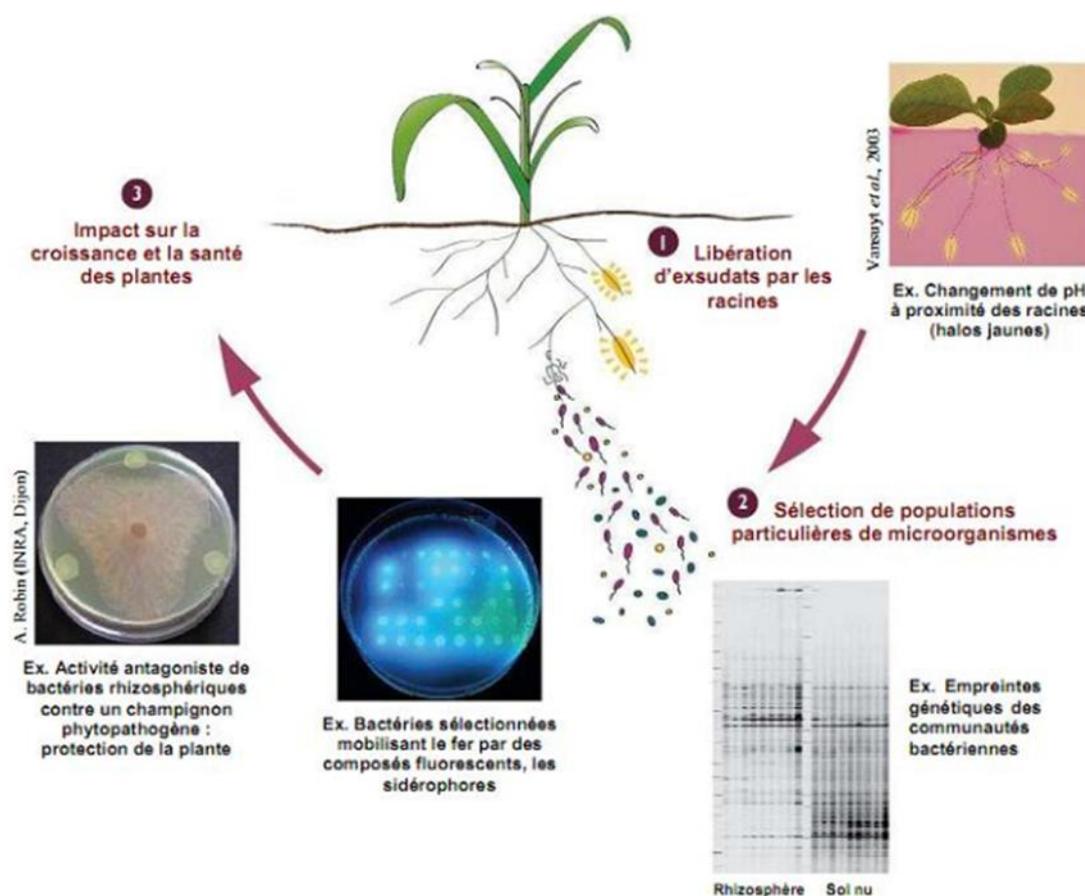


Figure I-10 : Représentation schématique décrivant les interactions plantes-microorganismes (*Pseudomonas fluorescens*) dans la rhizosphère (Lemanceau et al., 2006).

Du côté végétal, certaines bactéries en relation directe avec les racines des plantes ont été isolées. Par exemple, *P. brassicacearum* et *P. thivervalensis* sont isolées respectivement de plants d'ail et de riz (Achouak et al., 2000). *P. rhizosphaerae*, *P. lutea* et *P. argentinensis* sont isolées de la rhizosphère de l'herbe (Peix et al., 2009) (Peix et al., 2004) (Peix et al., 2003). D'autres espèces ont été isolées de la phyllosphère¹² des plantes, comme c'est le cas de *P. lurida* (phyllosphère de l'herbe) (Achouak et al., 2000). D'autres espèces ont été isolées d'écosystèmes marins tels que, *P. marincola* (Manaia and Moore, 2002), ou encore d'écosystèmes désertiques comme *P. duriflava* (Liu et al., 2008), *P. guineae*, une bactérie

¹² Phyllosphère : ensemble des parties des plantes situées au-dessus du niveau du sol.

psychro-tolérante¹³ du sol de l'antarctique (Bozal et al., 2007) et *P. thermotolerans* qui peut croître à 55°C (*in vitro*) même isolée à partir des échantillons d'animaux (Romanenko et al., 2008).

Cette distribution mondiale semble être due à une grande capacité d'adaptation de ce genre de bactérie (Spiers et al., 2000). La clé de cette adaptabilité de souches individuelles à de tels environnements est la présence chez ce genre bactérien de nombreux îlots génomiques¹⁴, comme c'est le cas de la souche *P. aeruginosa* PSE9 (Schroth et al., 1992).

6.5 *Pseudomonas* fluorescentes comme agents de biocontrôle et de croissance des plantes

L'ensemble des travaux des trois dernières décennies ont permis d'identifier les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* comme agents potentiels de bio-contrôle et non pas en tant que phytopathogènes.

Les *Pseudomonas* fluorescentes saprophyte appartenant au groupe I (voir Tableau I-2), sont les habitants type des sols agricoles et la rhizosphère des plantes, ce qui explique leurs implications dans de nombreuses interactions avec les plantes (Sakthivel and Gnanamanickam, 1987, Chellaiah, 2018). Ces bactéries sont considérées comme des composés biologiques du sol agricole et responsables principales de la suppression des maladies fongiques dans les cultures. Ces *Pseudomonas* diminuent la sévérité de la maladie et stimulent la croissance des plantes comme le riz (Lin et al., 2016), le blé (Kloepper et al., 1980), la pomme de terre (Suslow and Schroth, 1982), la canne à sucre (Howell and Stipanovic, 1979), le radis (Hernández-Lucas et al., 1986), la tomate (Gamalero et al., 2004), le coton (García de Salamone et al., 2001) et le manioc (Bano and Musarrat, 2003).

Différentes espèces de *Pseudomonas* ont été rapportés comme étant à la fois PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*) et comme souches de biocontrôle des champignons phytopathogènes (Chin-A-Woeng et al., 1998). *P. putida*, *P. aeruginosa* (Cattelan et al., 1999), *P. chlororaphis* (Digat et Gardan, 1987) et *P. cepacia* (Garbaye, 1994). Toutefois, les *Pseudomonas* fluorescentes ne sont pas toutes des antagonistes (agissant contre les nuisibles).

Les bactéries appartenant à ce groupe sont parmi les plus abondantes dans la rhizosphère. Dans certains cas, elles représentent plus de 60% de la microflore bactérienne totale du sol (Benoussaid and Benchabane, 2018; Azzaoui et al., 2021), d'où leur application comme agents

¹³ Bactérie psychro-tolérante : bactérie qui possède une bonne résistance au froid et pouvant croître à des températures comprises entre 0 et 40 °C

¹⁴ Îlots génomiques : Segment d'ADN d'une cellule bactérienne.

de contrôle biologique grâce à leur abondance dans les sols naturels et les racines des plantes. Ces bactéries sont d'excellents compétiteurs vis-à-vis de la microflore fongique et bactérienne du sol par leur temps de génération *in situ* relativement court (Roquigny et al., 2018), leur capacité à utiliser les exsudats de plantes comme nutriments (Lugtenberg et al., 2002), et à chélater les ions ferriques (Digat et Gardan, 1987; Benoussaid and Benchabane, 2018; Roquigny et al., 2018).

Les bactéries *Pseudomonas* fluorescentes sont bien connues pour leurs aptitudes d'adhésion aux particules du sol et au rhizoplan, mais elles sont aussi mobiles et prototrophes (De Weger et al. 1994), elles produisent des antibiotiques (Garbaye, 1994) et des enzymes hydrolytiques (Lim et al., 1991 ; Neilsen et Sorensen, 1999).

Ces capacités antagonistes et PGPR sont dues à des mécanismes directs et indirects. Les mécanismes indirects utilisés par ces *Pseudomonas* fluorescentes, comprennent la production d'antibiotiques contre des bactéries pathogènes (Thomashow et al., 1990 ; Meyer, 2000; Wang et al., 2020), la réduction de fer disponible pour les phytopathogènes présents dans la rhizosphère (Scher et Baker, 1982 ; Meyer, 2000 ; Wang et al., 2020), la synthèse d'enzymes dégradant les parois cellulaires fongiques et la compétition avec les microorganismes délétères pour les niches sur la plante. Les mécanismes directs concernent la séquestration du fer pour les plantes par les sidérophores. La production de phytohormones ou encore par solubilisation de formes de phosphore insolubles, rend le phosphore biodisponible (Salisbury, 1994), et diminue les taux d'éthylène produits par la plante (Glick et al., 1999). Ces bactéries sont capables d'induire une résistance systémique contre un pathogène donné, et portent le nom d'ISR « *induction of systemic resistance* » (Van Loon et al., 1998 ; Pieterse et al., 2001). Il est également reconnu que des bactéries de la mycorrhizosphère, encore appelées bactéries auxiliaires de la mycorhization (symbiose entre les racines des plantes et les bactéries), stimulent sélectivement l'établissement de la symbiose ectomycorhizienne (Garbaye, 1994 ; David et al., 2018).

7. Caractérisation de la bactérie *Pseudomonas fluorescens*

7.1 Identification et caractérisation morphologique

Pseudomonas fluorescens est une bactérie à Gram négatif, aérobie stricte, sous forme de bâtonnet Elle évolue à un pH neutre et sa température optimale de croissance est de 25 à 30°C (Palleroni, 1984). Cette bactérie ne forme pas de spores ou d'autres structures de survie et ne peut pas se développer dans des conditions acides (inférieures à pH 4,5) (Holt, 1994). En

revanche, elle peut survivre et se multiplier pendant plusieurs mois dans des environnements humides car sa demande nutritionnelle est modeste. La plupart des souches sont des chimio-organotrophes strictement aérobiques nécessitant à la fois de l'oxygène et du carbone organique pour leur croissance (Holt, 1994).

Le tableau I-3 montre les différentes caractéristiques morphologiques d'une colonie bactérienne de *P. fluorescens* ATCC13525.

Tableau I-3 : Morphologie des colonies de *P. fluorescens* ATCC 13525

Caractéristique	Milieu gélosé (Trypton Soja)	Gélose et Bouillon nutritif à 26 °C (ATCC)
Forme	Circulaire	Etalement
Diamètre (µm)	4	/
Marge (les bordures)	Entière	Ondulée
Élévation	Soulevée	Plate
Couleur	Crème-beige	Brillante
Texture	Humide	Lisse ou rugueux
Opacité	Semi-translucide	Transparent
Fluorescence sous excitation dans l'ultraviolet	Oui	Oui
Pigment	Pigment jaune	Pigment fluorescent jaune-vert

7.2 Classification de l'espèce *Pseudomonas fluorescens*

Le genre *Pseudomonas* est l'un des genres bactériens les plus diversifiés, et sa taxonomie a subi de nombreux changements. Des études antérieures ont donné lieu à la division du groupe *Pseudomonas* en cinq biovars (de I à V, synonymes des biotypes A, B, C, F et G) en fonction de caractéristiques phénotypiques tels que les essais métaboliques, la composition des acides gras et les profils des protéines (Palleroni, 2005). *P. fluorescens* est le type de souche biovar I (Palleroni, 2005).

La taxonomie du groupe de *P. fluorescens* est continuellement à l'étude. En effet, même si les caractéristiques phénotypiques et les biovars de I à V sont toujours valides pour identifier les souches de *P. fluorescens*, la caractérisation moléculaire est plus fiable pour démontrer les relations phylogénétiques et les variations entre les souches de *P. fluorescens* et les espèces de *Pseudomonas* étroitement apparentées.

Cette caractérisation comprend des analyses complètes des séquences génomiques (Ivanova et al., 2003, Paulsen et al., 2005 ; Silby et al., 2009) et des analyses du polymorphisme de longueur des fragments de restriction des gènes d'ADNr 16S et 23S (Milyutina et al., 2004; Scarpellini et al., 2004). Par exemple, les analyses phylogénétiques de l'espèce *Pseudomonas* effectuées par Mulet et al. (2010) sur quatre gènes domestiques (ARNr 16s, gyrB, rpoB, et rpoD) ont démontré que le groupe de *Pseudomonas fluorescens* est constitué de neuf sous-groupes, à savoir *P. fluorescens*, *P. mandelii*, *P. corrugata*, *P. gessardii*, *P. fragi*, *P. jessenii*, *P. koreensis*, *P. chloroaphis* et *P. asplenii* (Tableau I-1). Le sous-groupe *Pseudomonas fluorescens* comprend 20 espèces, y compris la souche de notre étude *P. fluorescens* ATCC 13525.

Comme attendu, *Pseudomonas fluorescens* possède un grand nombre de protéines en commun avec son genre (figure I-11), d'après le diagramme de Venn. Les deux espèces *P. aeruginosa* et *P. fluorescens* partagent dans leurs compositions 527 protéines.

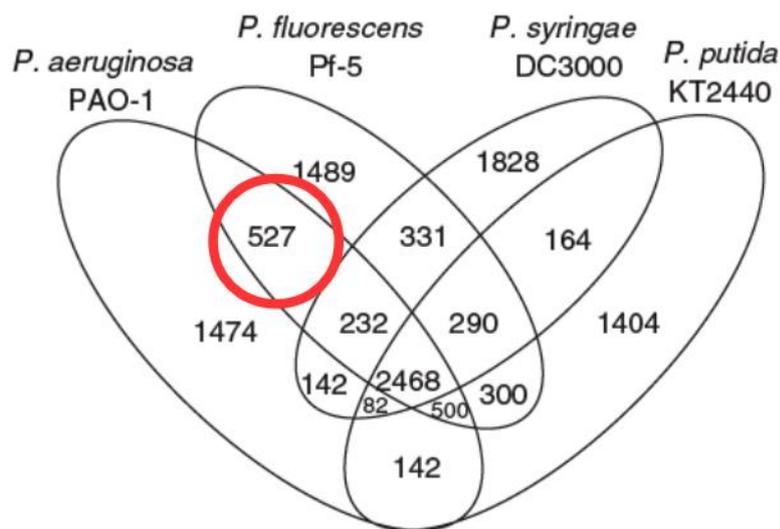


Figure I-11 : Diagramme de Venn montrant le nombre de protéines partagées ou uniques pour quatre espèces de *Pseudomonas* différentes.

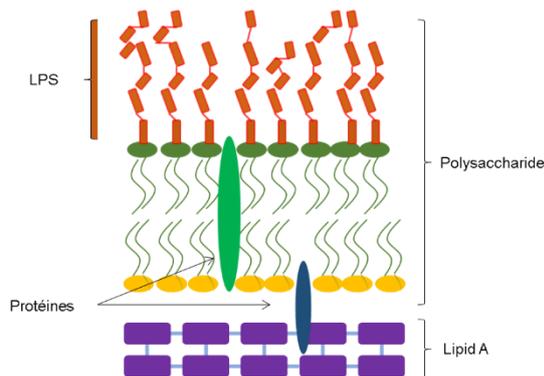
8. Etude structurale de la membrane bactérienne de la souche *Pseudomonas*

8.1 Structure membranaire

Dans cette dernière partie nous abordons les caractérisations morphologiques et membranaires du genre *Pseudomonas* et plus particulièrement *P. fluorescens*.

Comme mentionné plus haut, la bactérie *Pseudomonas* est une bactérie à Gram négatif, possédant une membrane externe constituée d'une double couche de phospholipides dans laquelle tout ou partie des phospholipides classiques (non glycosylés) de la couche la plus externe sont remplacés par des molécules de lipopolysaccharide (LPS).

1)



2)

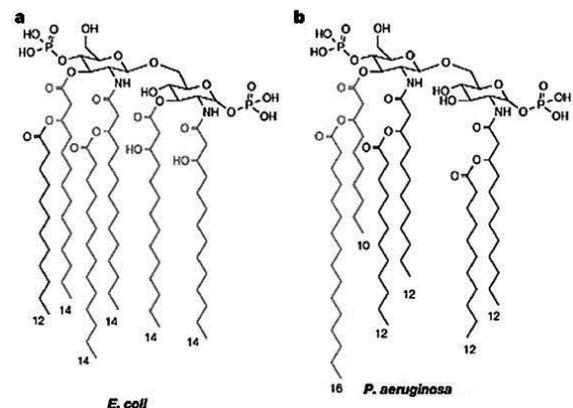


Figure I-12 : 1) Composition de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif ; 2) La diversité structurale du lipide A dans les micro-organismes Gram négatifs. Structures chimiques d'*Escherichia coli* (a) et *Pseudomonas aeruginosa* (b).

Les LPS sont composés d'un lipide A hydrophobe, et d'une queue hydrophile formée par un corps de polysaccharides et l'antigène O. Les antigènes O sont marqueurs de la spécificité des différents sérogroupes bactériens tandis que les lipides A peuvent avoir différentes acylations. Comme le montre l'exemple de la figure I-12.2, les chaînes carboxyliques des lipides A sont différentes en termes de longueur et position selon la nature de la bactérie (ici. *E. coli* et *P. aeruginosa*).

Une étude de caractérisation de *Pseudomonas fluorescens* réalisée par Rhodes M.E (1959) a montré que les caractères suivants étaient communs à tous les isolats testés (169 isolat) :

- Bacille à Gram-négatif ne formant pas d'endospores, d'une taille moyenne : la longueur entre 1,5 et 3 µm et une largeur entre 0,5 et 7 µm.
- Capable de se développer entre 12 et 30 °C.
- Tous les isolats montraient des bâtonnets avec des flagelles polaires, d'amphitriches¹⁵ et de courbures flagellaires variables.
- La formation de mucus exocellulaire était typique à chaque espèce, des facteurs environnementaux tels que la maturation de la culture et la nature du support étaient des facteurs déterminants importants.

9. Utilisation de la microscopie pour caractériser le genre *Pseudomonas*

Plusieurs études réalisées par différentes techniques microscopiques Microscopie électronique en transmission (TEM) , Microscopie électronique à balayage (MEB) et Microscopie à force atomique (AFM) ont porté sur la tolérance et la résistance des *Pseudomonas* ainsi que sur le développement des biofilms de ces espèces (Wang et al, 2020 ; Spiers et al., 2003 ; Capdevila et al., 2004 ; Yuan and Pehkonen, 2009 ; Mitik- Dineva et al., 2008 ; Mitik-Dineva et al., 2009) et SEM (Cai et al, 2019 ; Kang et al, 2021). Ces différentes études montrent que ces bactéries sont résistantes à différents xénobiotiques notamment les métaux lourds.

9.1 Etude par microscope à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM) est une méthode de microscopie de haute résolution permettant l'étude de la morphologie bactérienne (dimensions, forme, flagelles) et de sa membrane, ou son organisation dans le cas de films, et ce sans prétraitement des échantillons, fréquemment nécessaire dans d'autres techniques de microscopie.

Cette technique est complémentaire des méthodes de microscopie optique (OM), y compris l'épifluorescence (EM). Ces méthodes sont mieux adaptées à des observations de l'ensemble du réseau polymérique du biofilm, y compris la distribution des colonies, ce qui fournit des informations supplémentaires sur la vitalité bactérienne.

(Shilardi et al., 2010) ont utilisé cette technique pour étudier les étapes initiales de la formation du biofilm de deux bactéries (*P. fluorescens* et *P. aeruginosa*) sur des substrats avec différentes rugosités et compositions chimiques. Ils ont mis en évidence l'influence de la composition chimique du substrat (or, cuivre, titane, sans et avec modifications chimiques de surfaces et

¹⁵ Amphitriche : cellule bactérienne ayant un ou plusieurs flagelles aux deux extrémités.

revêtements) et de la sous-microstructure de surface (NS, SMS, NRS)¹⁶ sur les premières étapes du développement du biofilm. Cette étude montre, en effet, qu'un grand nombre de bactéries sont piégées à l'intérieur des tranchées et il leur est difficile de gravir les 150 nm de hauteur de leur paroi latérale pour se joindre à d'autres cellules (figure I-13).

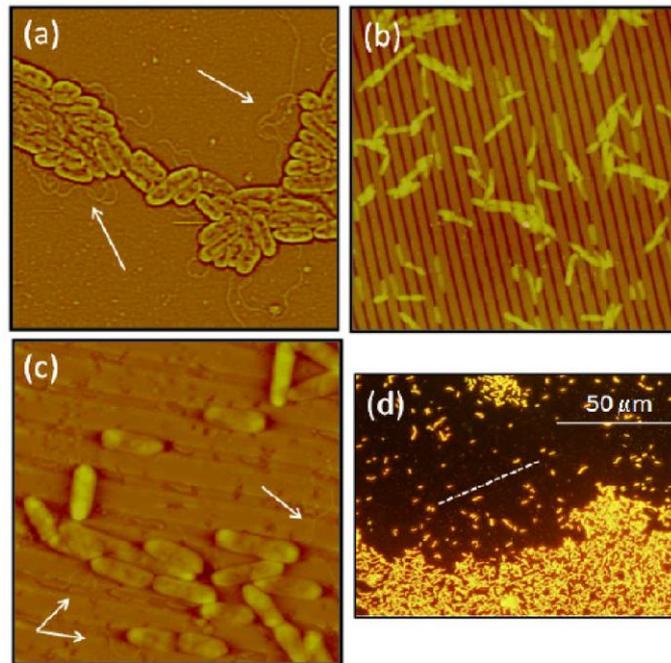


Figure I-13 : Images AFM montrant l'influence de la topographie du substrat d'or sur l'auto-organisation de *P. fluorescens*. Surface de type NS et SMS. Image d'épifluorescence (d) d'une « grande » zone du substrat submicrostructuré où de nombreuses cellules sont piégées dans les tranchées du substrat (Schilardi et al., 2010).

Dans la même étude, on observe que le biofilm de *P. aeruginosa* formé sur un substrat de titane (Figure I-14 a) est plus dense que celui formé sur un substrat de titane modifié par un revêtement de nanoparticules d'argent (Figure I-14 b) après 72 h d'exposition.

¹⁶ (NS) surface lisse nano-aléatoire, (SMS) surface submicrostructurée, (NRS) surface nanostructurée avec ondulations

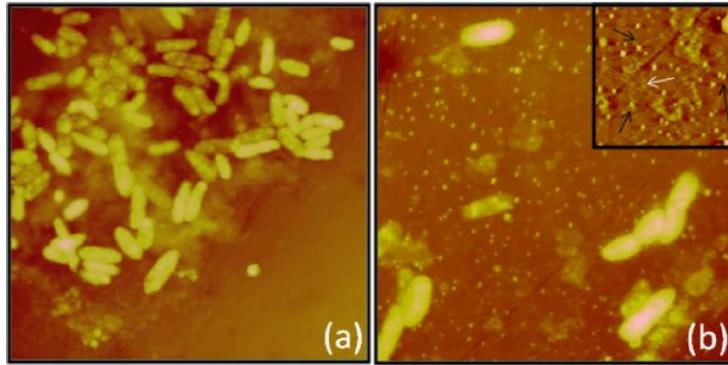


Figure I-14 : (a) Image AFM du biofilm de *P. aeruginosa* sur substrat de titane (b) après 72 h d'exposition à la culture bactérienne aux nanoparticules d'argent (Schilardi et al., 2010).

L'impact de la nanotopographie du substrat sur la population bactérienne de *P. aeruginosa* a également été étudié par Dineva et al. (2008). Ces auteurs ont montré que la majorité des cellules attachées à du verre non fonctionnalisé a une longueur de 2 μm , une largeur de 1 μm et une hauteur de 140 nm. Cependant, sur des surfaces de verre traitées (PLL/PEL), les dimensions sont modifiées (largeur moyenne de 1,3 μm , longueur de 2,9 μm et hauteur de 170 nm). De plus, le nombre des bactéries adhérant à la surface est multiplié par trois en présence d'une rugosité nanométrique, l'augmentation de l'attachement étant également associée à une altération de l'activité métabolique cellulaire, comme en témoignent les modifications de la morphologie des cellules et l'augmentation de la production de substances polymères extracellulaires. Les mêmes études menées sur *P. issachenkonii* montrent que ces cellules ont en général une largeur moyenne de 0,7–0,9 μm et une longueur moyenne de 1,0–2,2 μm . Ces différences de morphologie cellulaire peuvent résulter de stratégies différentes utilisées par les *P. issachenkonii* pour se connecter aux surfaces de verre. Il est suggéré que la différence de rugosité de surface provoque la production de différentes quantités de LPS, ce qui conduit à des changements de morphologie cellulaire.

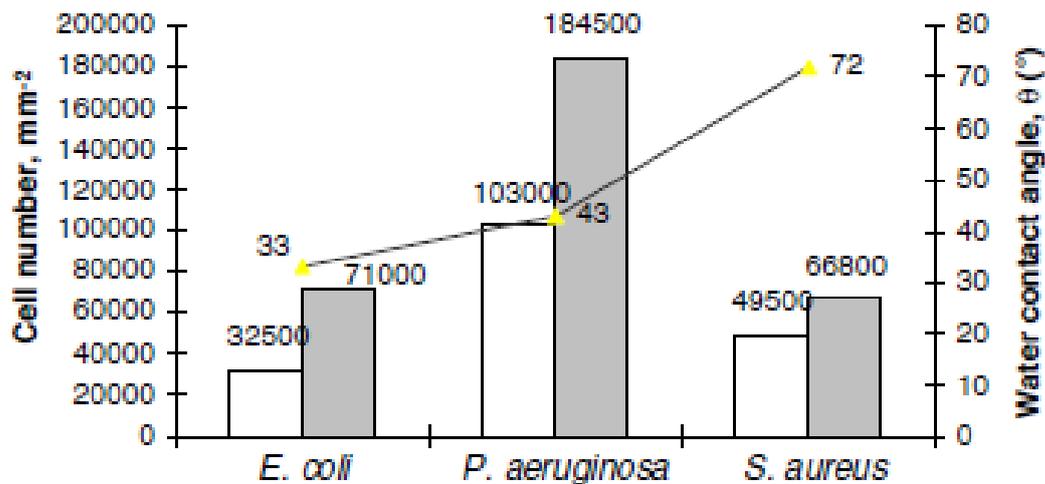


Figure I-15 : Densité de fixation sur les surfaces en verre de *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. La colonne de gauche (en blanc) correspond à la densité de fixation sur les surfaces de verre non fonctionnalisés ; la colonne de droite (en gris) correspond à la densité de fixation sur les surfaces en verre modifiées. La ligne indique le niveau d'hydrophobicité de la surface cellulaire en fonction des mesures de l'angle de contact de l'eau (Mitik_Dineva et al 2009).

Dans le même esprit, les travaux de Mitik-Dineva et al (2009) ont montré que la modification de la surface du substrat de verre traité par une solution tamponnée d'acide fluorhydrique (BHF) entraîne des modifications nanométriques de la topographie de la surface, tandis que les caractéristiques physico-chimiques des surfaces sont restées presque constantes. L'analyse AFM indique que les paramètres de rugosité globale de la surface sont réduits de 60 à 70%. Les analyses SEM, CLSM et AFM montrent clairement que, bien que *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus* présentent des profils d'attachement très différents, toutes les espèces présentent une plus grande propension à adhérer à la surface « nano-lisse » (Figure I-15). De plus, les bactéries répondent à la modification de surface par un changement remarquable de l'activité métabolique cellulaire, comme le montrent les morphologies cellulaires caractéristiques, la production de substances polymères extracellulaires et l'augmentation du nombre de cellules bactériennes en cours de fixation.

Dans une étude réalisée sur des bactéries *Pseudomonas putida*, Auerbach et al (Auerbach et al, 2000) ont montré que la méthode de préparation du biofilm affecte la stabilité de l'imagerie, et que les images les plus stables (meilleures images) ont été obtenues avec des biofilms séchés et lavés par rapport aux biofilms frais et non lavés. La durée de culture a également affecté la qualité des images et, par conséquent, une instabilité accrue pendant la numérisation.

Leurs images AFM montrent que les EPS forment des structures d'ordre supérieur appelées mésostructures, beaucoup plus grandes que les polymères de glycolipides et de protéines qui ont déjà été caractérisés à la surface de ces bactéries. Les mésostructures ont typiquement un diamètre de 40 à 70 nm (figure I-16), bien que certaines aussi petites que 10 à 20 nm sont parfois observées (figure I-16 B). Les mésostructures sont disposées en réseaux présentant des différences d'aspect, allant de structures sphéroïdes arrondies (Fig. I-16 A et I-16 B) à des structures ressemblant à des vers (Figure I-16 C). Parfois, des cellules adjacentes ou des régions adjacentes sur la même cellule présentent à la fois des structures de type ver et sphéroïde (Figure I-16 D). En général, les morphologies des mésostructures semblent être indépendantes des conditions utilisées pour préparer le biofilm avant sa caractérisation par AFM.

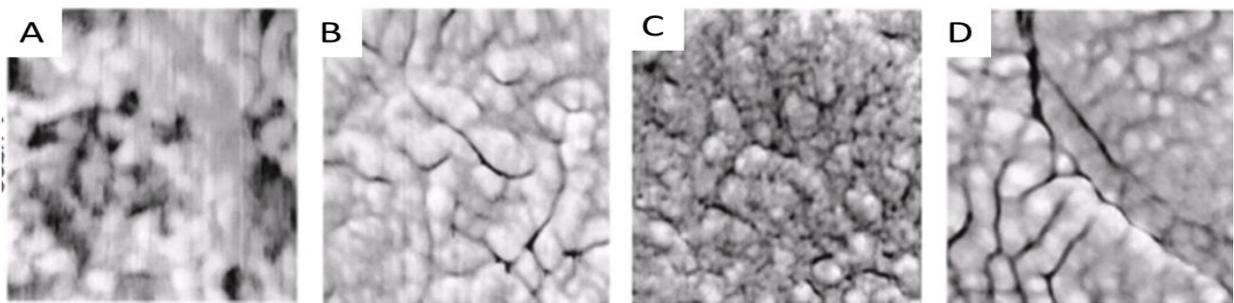


Figure I-16 : Images d'AFM montrant la structure membranaire de la *P. putida* au sein d'un biofilm saturé en fonction du traitement utilisé et de l'âge. Les biofilms sont âgés d'un jour, non lavés et desséchés (A), âgés de 3 jours, non lavés et desséchés (B), âgés de 2 jours, lavés et desséchés (C) et âgés de 2 jours, lavés et non déshydratés (D) (Auerbach et al., 2000).

Dans les mêmes travaux, Auerbach *et al* observent des bactéries présentant des invaginations (figure I-17) sur leur surface, avec des profondeurs de 10 à 60 nm. Ces indentations sont suffisamment larges pour que leur profondeur puisse être mesurée avec précision par AFM.

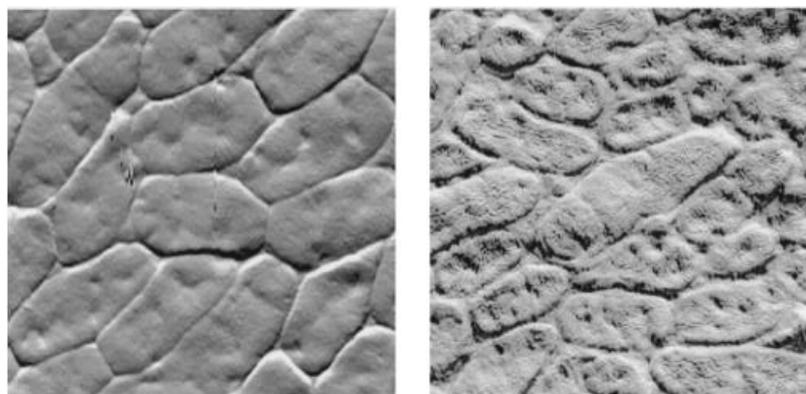


Figure I-17 : Images de Phase (AFM) montrant la présence d'invaginations sur la membrane de la bactérie *P. putida* (Auerbach et al., 2000).

De nombreuses invaginations membranaires, d'un diamètre moyen de 250 ± 61 nm, ont aussi été observées lors d'une étude faite par Kamaeva et al, (2014) sur le changement morphologique de cellules *Chromobacterium violaceum* associé au développement des biofilm (figure I-18).

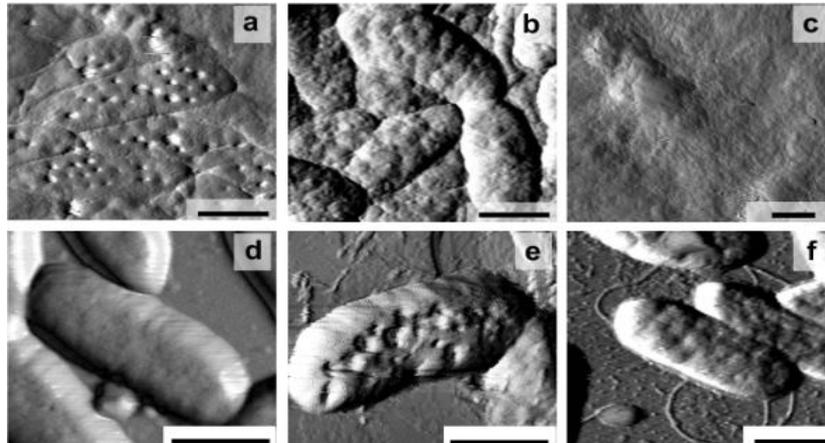


Figure I-18 : Images AFM de la souche sauvage *C. violaceum* ATCC 31532, en croissance pendant 24 (a, d), 48 (b, e) et 72 h (c, f) en conditions de biofilms (a – c) et souches planctoniques (d – f) (Kamaeva et al, 2014).

Une étude par AFM de la morphologie cellulaire a été réalisé par (Liu et al, 2012) sur trois espèces bactériennes, *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* et *Bacillus subtilis*, pendant différentes étapes de maturation des biofilms.

Les résultats présentés dans la figure I-19 montrent les images AFM qui ont été obtenues à partir de cellules non fixées ou fixées au glutaraldéhyde. Ces données montrent que la hauteur moyenne des cellules bactériennes préparées par fixation est supérieure à celle des cellules non-fixées. D'autre part, des différences entre les bactéries Gram-négatives et Gram-positives ont pu être observées. En effet, la hauteur moyenne de deux bactéries Gram-négatives fixées augmente respectivement de 112 et 84% (*X. campestris*, de 170 nm pour les cellules non fixées à 362 nm pour les cellules fixés) et (*P. syringae*, de 198 nm pour les cellules non fixées à 364 nm pour les cellules fixées), alors que l'augmentation de hauteur des bactéries Gram-positives n'a augmenté que de 38% (*B. subtilis*, de 336 à 467 nm).

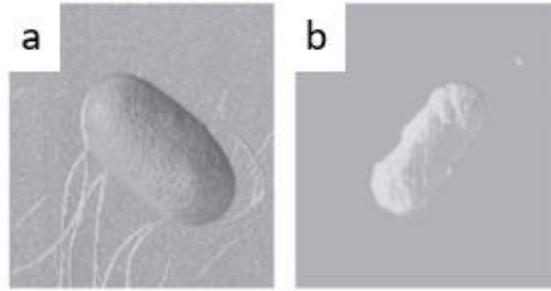


Figure I-19 : Images AFM de *Pseudomonas syringae*. (A) $3\ \mu\text{m} \times 3\ \mu\text{m}$, image de phase de la cellule non fixée, (B) $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$, image de phase de la cellule fixée avec 2% de glutaraldéhyde (Liu et al, 2012).

Une autre étude menée par Yuan et al, 2009 avait pour objectif de comparer les différences morphologiques et membranaires des deux souches bactériennes, *Pseudomonas NCIMB 2021* et *D. desulfuricans*.

Une image typique d'une cellule de *Pseudomonas NCIMB 2021* (figure I-20 a) sur une surface de l'acier inoxydable montre la forme en bâtonnet allongé de la bactérie dont les dimensions moyennes sont respectivement : longueur = $1.78\ \mu\text{m}$; largeur = $0.84\ \mu\text{m}$ et hauteur = $160\ \text{nm}$. La figure I-20 b montre une image typique d'une cellule anaérobie de *D. desulfuricans* dans les mêmes conditions. Les dimensions moyennes de la cellule sont respectivement : longueur = $3.05\ \mu\text{m}$, largeur = $0.73\ \mu\text{m}$ et hauteur $350\ \text{nm}$. Les deux images des cellules bactériennes révèlent également que les EPS sont distribuées à la surface des cellules, en particulier à la périphérie cellule-substrat (Yuan et al, 2009). Les EPS sécrétés par les cellules bactériennes facilitent généralement une fixation irréversible des cellules conduisant ainsi à une colonisation microbienne à la surface du substrat (Yuan et al, 2009).

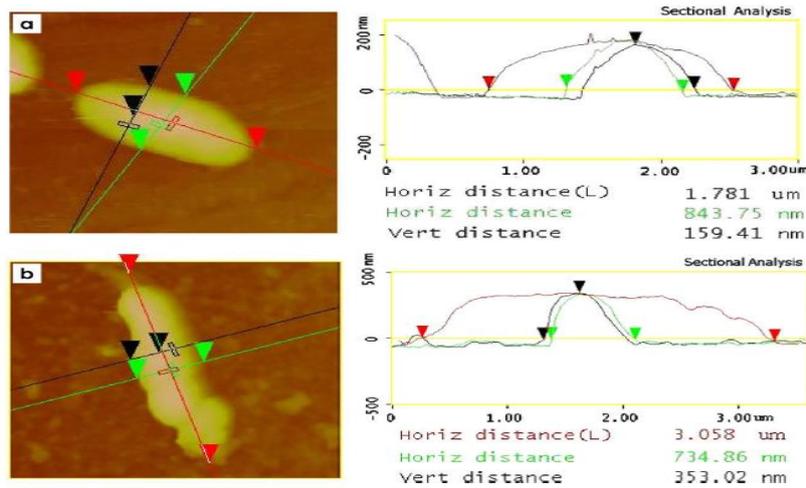


Figure I-20 : Images AFM de (a) une cellule de *Pseudomonas* NCIMB 2021 et (b) une cellule de *D. desulfuricans*. (Yuan et al 2009).

Dans le cadre d'une étude consacrée à la résistance de biofilms en présence de substances antimicrobiennes, différentes autres techniques microscopiques et spectroscopiques ont été menées par (Lauer Cruz et al, 2019) et réalisées sur deux souches différentes de *Pseudomonas fluorescens* (PL 5.4 et PL 7.1) isolées à partir de lait cru de bufflonne. Les résultats (Figure I-21) ont montré que les deux souches sont capables de produire des EPS à différentes températures 7, 23 et 30°C, et que cette production peut continuer durant 72h.

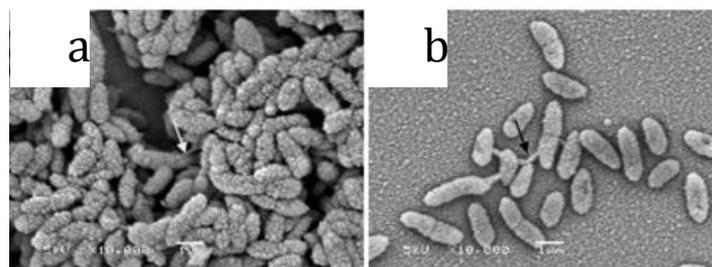


Figure I-21 : Images par microscopie électronique à balayage (MEB) du *P. fluorescens* PL5.4. (a): en biofilm après croissance en TSB (Bouillon Tryptique Soja) à 30 °C pendant 24h,(b): sous forme planctonique, après croissance en TSB à 30 °C pendant 24 h (Lauer Cruz et al, 2019).

Dans une autre étude effectuée par TEM et MEB (Figure I-22), l'analyse protéomique de la réponse de *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 à l'acide lactobionique a été réalisée pour la première fois par Kang et al, 2021. Les auteurs suggèrent que l'acide lactobionique (LBA) provoque différents phénomènes au niveau des mécanismes moléculaires. Le stress oxydatif et les lésions d'ADN agissent comme un signal de stress de la paroi cellulaire et accélèrent la

division cellulaire. Cela provoque un choc hypo-osmotique en augmentant la perméabilité de la membrane externe et en bloquant l'assemblage flagellaire et la production des LPS. C'est ce qui augmenterait la production d'énergie et inhiberait également le métabolisme des nucléotides.

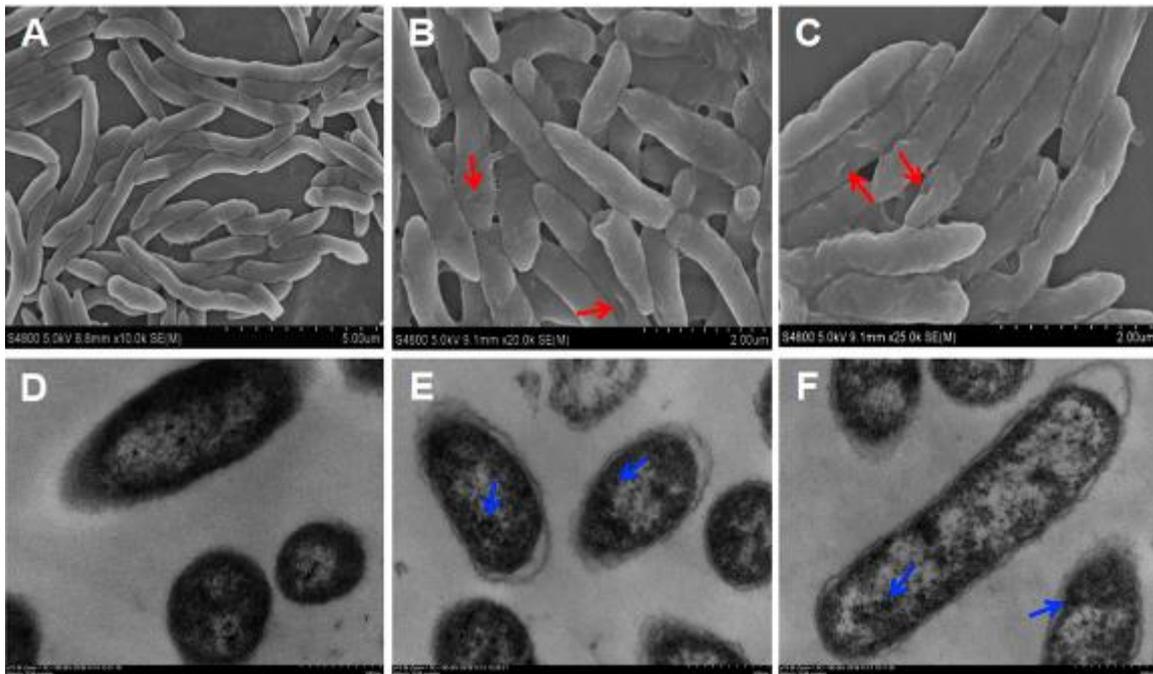


Figure I-22 : Images SEM et TEM de cellules *P. fluorescens* traitées par le LBA pendant 2 h. A, B et C images SEM des cellules témoins, des cellules traitées avec 1/2 CMI (concentration minimale inhibitrice) et des cellules traitées avec 1 CMI LBA, respectivement. D, E et F images TEM des cellules témoins, des cellules traitées avec 1/2 CMI et des cellules traitées avec 1 CMI LBA, respectivement. Flèches rouges : présence des pores ; flèches bleues, granules denses ou substances fortement condensées. (Kang et al, 2021).

(Zeng et al, 2015) ont par ailleurs démontré par l'utilisation de deux techniques de microscopie (TEM et AFM) et par des mesures d'angle de contact que l'amyloïde bactérien fonctionnel¹⁷ augmente l'hydrophobicité et la rigidité des biofilms de *Pseudomonas* et *E. coli*. Ils ont aussi prouvé que *Pseudomonas fluorescens* est non pathogène et omniprésent dans l'environnement où il colonise avec succès les surfaces inorganiques ou biologiques, par exemple, le sol et les environnements aquatiques.

¹⁷ Amyloïde bactérien fonctionnel : agrégat de protéines.

10. Conclusion

De nos jours, de nombreuses recherches sont orientées vers les bactéries du genre *Pseudomonas* et leur grande capacité de tolérance et de résistance aux différents stress environnementaux.

Parmi ces bactéries, on trouve *Pseudomonas fluorescens*, une bactérie Gram-négative, mutualiste, à pouvoir bio dépolluant, capable de produire des antibiotiques qui limite la maladie chez les plantes et d'augmenter l'efficacité de l'absorption racinaire des oligo-éléments métalliques toxiques présents dans les milieux naturels.

Cependant, une caractérisation de cette bactérie est nécessaire pour mieux connaître son comportement ainsi que les conditions optimales de sa croissance afin d'optimiser son activité et améliorer le processus de décontamination *in situ*. Nous donnerons dans le chapitre II les détails sur la mise en évidence des conditions optimales de croissance de l'espèce *Pseudomonas fluorescens*, la caractérisation reposant largement sur l'utilisation de l'AFM.

11. Références

- Aboushanab, R., Angle, J., Chaney, R., 2006. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 2882–2889. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.04.045>
- Achouak, W., Sutra, L., Heulin, T., Meyer, J.M., Fromin, N., Degraeve, S., Christen, R., Gardan, L., 2000. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 9–18. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-9>
- Aken, B.V., Yoon, J.M., Schnoor, J.L., 2004. Biodegradation of Nitro-Substituted Explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5-Tetrazocine by a *Phytosymbiotic Methylobacterium* sp. Associated with Poplar Tissues (*Populus deltoides* × *nigra* DN34). *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 508–517. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.508-517.2004>
- Amaraneni, S.R., 2006. Distribution of pesticides, PAHs and heavy metals in prawn ponds near Kolleru lake wetland, India. *Environ Int* 32, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.06.001>
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.Y., Wakabayashi, H., Oyaizu, H., 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1563–1589. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-4-1563>
- Audet, P., Charest, C., 2007. Heavy metal phytoremediation from a meta-analytical perspective. *Environmental Pollution* 147, 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.08.011>
- Auerbach, I.D., Sorensen, C., Hansma, H.G., Holden, P.A., 2000. Physical Morphology and Surface Properties of Unsaturated *Pseudomonas putida* Biofilms. *Journal of Bacteriology* 182, 3809–3815. <https://doi.org/10.1128/JB.182.13.3809-3815.2000>
- Azzaoui, A., Ben Abdelkarim, E., Idder, B./ promoteur, 2021. Isolement des *Pseudomonas* des Oasis d'Adrar Leur Caractérisation en tant que Rhizobacteries Favorisants la Croissance des Plantes PGPR (Thesis). UNIVERSITE AHMED DRAIA- ADRAR.
- Baker, A.J.M., 2000. Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*.
- Baniasadi, M., Xu, Z., Gandee, L., Du, Y., Lu, H., Zimmern, P., Minary-Jolandan, M., 2014. Nanoindentation of *Pseudomonas aeruginosa* bacterial biofilm using atomic force microscopy. *Mater. Res. Express* 1, 045411. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/1/4/045411>
- Bano, N., Musarrat, J., 2003. Characterization of a New *Pseudomonas aeruginosa* Strain NJ-15 as a Potential Biocontrol Agent. *Curr Microbiol* 46, 0324–0328. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3857-8>
- Bañuelos, G.S., 2006. Phyto-products may be essential for sustainability and implementation of phytoremediation. *Environmental Pollution, Soil and Sediment Remediation (SSR)* 144, 19–23. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.01.015>
- Barac, T., Taghavi, S., Borremans, B., Provoost, A., Oeyen, L., Colpaert, J.V., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology* 22, 583–588. <https://doi.org/10.1038/nbt960>
- Barona, A., Aranguiz, I., Elías, A., 2001. Metal associations in soils before and after EDTA extractive decontamination: implications for the effectiveness of further clean-up procedures. *Environmental Pollution* 113, 79–85. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00158-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00158-5)

- Bartrons, M., Catalan, J., Penuelas, J., 2016. Spatial And Temporal Trends Of Organic Pollutants In Vegetation From Remote And Rural Areas. *Scientific Reports* 6, 25446. <https://doi.org/10.1038/srep25446>
- Baum, C., Hryniewicz, K., Leinweber, P., Meißner, R., 2006. Heavy-metal mobilization and uptake by mycorrhizal and nonmycorrhizal willows (*Salix × dasyclados*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 169, 516–522. <https://doi.org/10.1002/jpln.200521925>
- Benoussaid, N., Benchabane, M., 2018. identification de souches de *Pseudomonas fluorescents* et application de leurs lyophilisats pour le biocontrole de la fusariose vasculaire de la tomate 12.
- Blaylock, M.J., 2000. Field demonstrations of phytoremediation of lead contaminated soils. In: Terry, N., Bañuelos, G. (Eds.), *Phytoremediation of Contaminated Soil and Water*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, 1–12.
- Bossier, P., Hofte, M., Verstraete, W., 1988. Ecological Significance of Siderophores in Soil, in: Marshall, K.C. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology, Advances in Microbial Ecology*. Springer US, Boston, MA, pp. 385–414. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5409-3_9
- Bossis, E., Lemanceau, P.P., Latour, X., Gardan, L., 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* 20, 51–63. <https://doi.org/10.1051/agro:2000112>
- Bouwman, L.A., Bloem, J., Römken, P.F.A.M., Japenga, J., 2005. EDGA amendment of slightly heavy metal loaded soil affects heavy metal solubility, crop growth and microbivorous nematodes but not bacteria and herbivorous nematodes. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.039>
- Bozal, N., Montes, M.J., Mercadé, E., 2007. *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2609–2612. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65141-0>
- Braud, A., Jézéquel, K., Léger, M.-A., Lebeau, T., 2006a. Siderophore production by using free and immobilized cells of two pseudomonads cultivated in a medium enriched with Fe and/or toxic metals (Cr, Hg, Pb). *Biotechnology and Bioengineering* 94, 1080–1088. <https://doi.org/10.1002/bit.20937>
- Braud, A., Jézéquel, K., Vieille, E., Tritter, A., Lebeau, T., 2006b. Changes in Extractability of Cr and Pb in a Polycontaminated Soil After Bioaugmentation With Microbial Producers of Biosurfactants, Organic Acids and Siderophores. *Water Air Soil Pollut: Focus* 6, 261–279. <https://doi.org/10.1007/s11267-005-9022-1>
- Cai, Y., King, R.B., Law, W., McInerney, D.M., 2019. Which comes first, Modeling the relationships among future goals, metacognitive strategies and academic achievement using multilevel cross-lagged SEM. *Learning and Individual Differences* 74, 101750. <https://doi.org/10.1016/j.lindif.2019.06.004>
- Campbell, J.I.A., Jacobsen, C.S., Sørensen, J., 1995. Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS Microbiology Ecology* 18, 51–62. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00163.x>
- Capdevila, S., Martínez-Granero, F.M., Sánchez-Contreras, M., Rivilla, R., Martín, M., 2004. Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology (Reading)* 150, 3889–3897. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27362-0>
- Cattelan, A.J., Hartel, P.G., Fuhrmann, J.J., 1999. Screening for Plant Growth–Promoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Science Society of America Journal* 63, 1670–1680. <https://doi.org/10.2136/sssaj1999.6361670x>
- Chellaiah, E.R., 2018. Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Appl Water Sci* 8, 154. <https://doi.org/10.1007/s13201-018-0796-5>

- Chen, B., Shen, H., Li, X., Feng, G., Christie, P., 2004. Effects of EDTA application and arbuscular mycorrhizal colonization on growth and zinc uptake by maize (*Zea mays L.*) in soil experimentally contaminated with zinc. *Plant and Soil* 261, 219–229. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000035538.09222.ff>
- Chen, B.D., Zhu, Y.-G., Smith, F.A., 2006. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on uranium and arsenic accumulation by Chinese brake fern (*Pteris vittata L.*) from a uranium mining-impacted soil. *Chemosphere* 62, 1464–1473. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.06.008>
- Chen, Y.X., Wang, Y.P., Lin, Q., Luo, Y.M., 2005. Effect of copper-tolerant rhizosphere bacteria on mobility of copper in soil and copper accumulation by *Elsholtzia splendens*. *Environment International, Soil Contamination and Environmental Health* 31, 861–866. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.05.044>
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., van der Bij, A.J., van der Drift, K.M.G.M., Schripsema, J., Kroon, B., Scheffer, R.J., Keel, C., Bakker, P.A.H.M., Tichy, H.-V., de Bruijn, F.J., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J.J., 1998. Biocontrol by Phenazine-1-carboxamide-Producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of Tomato Root Rot Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *MPMI* 11, 1069–1077. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.11.1069>
- Citterio, S., Prato, N., Fumagalli, P., Aina, R., Massa, N., Santagostino, A., Sgorbati, S., Berta, G., 2005. The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* induces growth and metal accumulation changes in *Cannabis sativa L.* *Chemosphere* 59, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.009>
- Clays-Josserand, A., Lemanceau, P., Philippot, L., Lensi, R., 1995. Influence of Two Plant Species (Flax and Tomato) on the Distribution of Nitrogen Dissimilative Abilities within Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1745–1749.
- Clemens, S., 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie, Facets of Environmental Nuclear Toxicology* 88, 1707–1719. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.003>
- Colwell, R.R., Citarella, R.V., Ryman, I., 1965. Deoxyribonucleic acid base composition and Adansonian analysis of heterotrophic aerobic pseudomonads. *J Bacteriol* 90, 1148–1149.
- Colwell, R.R., Mandel, M., 1964. Adansonian Analysis and Deoxyribonucleic Acid Base Composition of Some Gram-Negative Bacteria. *Journal of Bacteriology* 87, 1412–1422.
- David, B.V., Chandrasehar, G., Selvam, P.N., 2018. Chapter 10 - *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops, in: Prasad, R., Gill, S.S., Tuteja, N. (Eds.), *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*. Elsevier, pp. 221–243. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63987-5.00010-4>
- De Bruijn, I., de Kock, M.J.D., Yang, M., de Waard, P., van Beek, T.A., Raaijmakers, J.M., 2007. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Molecular Microbiology* 63, 417–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05525.x>
- Di Gregorio, S., Barbafieri, M., Lampis, S., Sanangelantoni, A.M., Tassi, E., Vallini, G., 2006. Combined application of Triton X-100 and *Sinorhizobium* sp. *Pb002* inoculum for the improvement of lead phytoextraction by *Brassica juncea* in EDTA amended soil. *Chemosphere* 63, 293–299. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.020>
- Dickinson, N.M., Pulford, I.D., 2005. Cadmium phytoextraction using short-rotation coppice *Salix*: the evidence trail. *Environment International* 31, 609–613. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.10.013>
- Diels, L., De Smet, M., Hooyberghs, L., Corbisier, P., 1999. Heavy metals bioremediation of soil. *Mol Biotechnol* 12, 149–158. <https://doi.org/10.1385/MB:12:2:149>

- Diels, L., van der Lelie, N., Bastiaens, L., 2002. New developments in treatment of heavy metal contaminated soils. *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology* 1, 75–82. <https://doi.org/10.1023/A:1015188708612>
- Digat, B., Gardan, L., 1987. Caractérisation, variabilité et sélection des souches bénéfiques de *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida*. *EPPO Bulletin* 17, 559–568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1987.tb00075.x>
- Dubbin, W.E., Louise Ander, E., 2003. Influence of microbial hydroxamate siderophores on Pb(II) desorption from α -FeOOH. *Applied Geochemistry* 18, 1751–1756. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(03\)00084-2](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(03)00084-2)
- Dufrêne, Y.F., 2001. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron* 32, 153–165. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00106-7](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00106-7)
- Etesami, H., 2018. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: Mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147, 175–191. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.032>
- Evangélou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A., 2007. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere* 68, 989–1003. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.01.062>
- Fasani, E., Manara, A., Martini, F., Furini, A., DalCorso, G., 2018. The potential of genetic engineering of plants for the remediation of soils contaminated with heavy metals. *Plant, Cell & Environment* 41, 1201–1232. <https://doi.org/10.1111/pce.12963>
- Fernandez, M., Godino, A., Príncipe, A., Morales, G.M., Fischer, S., 2017. Effect of a *Pseudomonas fluorescens* tailocin against phytopathogenic *Xanthomonas* observed by atomic force microscopy. *Journal of Biotechnology* 256, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.002>
- Gamalero, E., Lingua, G., Giusy Capri, F., Fusconi, A., Berta, G., Lemanceau, P., 2004. Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS Microbiol Ecol* 48, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2003.12.012>
- Gammoudi, I., Raimbault, V., Tarbague, H., Moroté, F., Grauby-Heywang, C., Othmane, A., Kalfat, R., Moynet, D., Rebière, D., Dejous, C., Cohen-Bouhacina, T., 2014. Enhanced bio-inspired microsensor based on microfluidic/bacteria/love wave hybrid structure for continuous control of heavy metals toxicity in liquid medium. *Sensors and Actuators B: Chemical* 198, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.104>
- Garbaye, J., 1994. Tansley Review No. 76 Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 128, 197–210. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb04003.x>
- García de Salamone, I.E., Hynes, R.K., Nelson, L.M., 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* 47, 404–411. <https://doi.org/10.1139/w01-029>
- Gardan, L., Bollet, C., Abu Ghorrah, M., Grimont, F., Grimont, P.A.D., 1992. DNA Relatedness among the Pathovar Strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and Proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 42, 606–612. <https://doi.org/10.1099/00207713-42-4-606>
- GLASS, D.J., 2000. *12Economic potential of phytoremediation ; in *Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean Up the Environment.*
- Glick, B.R., 2003. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances, Proceedings of the Moo-Young Symposium on Biotechnology and Bioengineering* 21, 383–393. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(03\)00055-7](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(03)00055-7)

- Glick, B.R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109–117. <https://doi.org/10.1139/m95-015>
- Gorbushina, A.A., 2007. Life on the rocks. *Environmental Microbiology* 9, 1613–1631. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01301.x>
- Gupta, D.K., Huang, H.G., Corpas, F.J., 2013. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. *Environ Sci Pollut Res* 20, 2150–2161. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1485-4>
- Herman, D.C., Artiola, J.F., Miller, R.M., 1995. Removal of Cadmium, Lead, and Zinc from Soil by a Rhamnolipid Biosurfactant. *Environmental Science & Technology* 29, 2280–2285. <https://doi.org/10.1021/es00009a019>
- Hernández-Lucas, C., Royo, J., Paz-Ares, J., Ponz, F., García-Olmedo, F., Carbonero, P., 1986. Polyadenylation site heterogeneity in mRNA encoding the precursor of the barley toxin β -hordothionin. *FEBS Letters* 200, 103–106. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80519-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80519-1)
- Höfte, M., Buysens, S., Koedam, N., Cornelis, P., 1993. Zinc affects siderophore-mediated high affinity iron uptake systems in the rhizosphere *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Biometals* 6, 85–91. <https://doi.org/10.1007/BF00140108>
- Howell, C.R., Stipanovic, R.D., 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology (USA)*.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. *2Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology* 7, 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
- Jing, D., Fei-bo, W., Guo-ping, Z., 2005. Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 6, 974. <https://doi.org/10.1007/BF02888488>
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., 2004. *28Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *MPMI* 17, 6–15. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.1.6>
- Kamaeva, A.A., Vasilchenko, A.S., Deryabin, D.G., 2014. Atomic Force Microscopy Reveals a Morphological Differentiation of *Chromobacterium violaceum* Cells Associated with Biofilm Development and Directed by N-Hexanoyl-L-Homoserine Lactone. *PLOS ONE* 9, e103741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103741>
- Kang, J.Y., Llewellyn, E., Chen, J., Olinares, P.D.B., Brewer, J., Chait, B.T., Campbell, E.A., Darst, S.A., 2021. Structural basis for transcription complex disruption by the Mfd translocase. *eLife* 10, e62117. <https://doi.org/10.7554/eLife.62117>
- Khan, A.G., 2006. Mycorrhizoremediation—An enhanced form of phytoremediation. *J. Zhejiang Univ. - Sci. B* 7, 503–514. <https://doi.org/10.1631/jzus.2006.B0503>
- Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S., Hayes, W.J., 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41, 197–207. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00412-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00412-9)
- Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M.N., 1980. *Pseudomonas* siderophores: A mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology* 4, 317–320. <https://doi.org/10.1007/BF02602840>
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., 2004. Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *MPMI* 17, 6–15. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.1.6>
- Latour, X., Lemanceau, P., 1997. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie* 9–10, 427–443.
- 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 Microbiol Ecol* 30, 163–170. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00645.x>
- Lewandowski, I., Schmidt, U., Londo, M., Faaij, A., 2006. The economic value of the phytoremediation function – Assessed by the example of cadmium remediation by willow (*Salix* spp). *Agricultural Systems* 89, 68–89. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2005.08.004>
- Lin, X., Mou, R., Cao, Z., Xu, P., Wu, X., Zhu, Z., Chen, M., 2016. Characterization of cadmium-resistant bacteria and their potential for reducing accumulation of cadmium in rice grains. *Science of The Total Environment* 569–570, 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.121>
- Liu, R., Liu, H., Feng, H., Wang, X., Zhang, C.-X., Zhang, K.-Y., Lai, R., 2008. *Pseudomonas duriflava* sp. nov., isolated from a desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 1404–1408. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65716-0>
- Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P., 2001. Phytoremediation of Heavy Metal–Contaminated Soils. *Journal of Environmental Quality* 30, 1919–1926. <https://doi.org/10.2134/jeq2001.1919>
- López-Millán, A.-F., Sagardoy, R., Solanas, M., Abadía, A., Abadía, J., 2009. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany* 65, 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.11.010>
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B.R., 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 86, 1–25. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e>
- Lugtenberg, B.J.J., Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., 2002. Microbe–plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 373–383. <https://doi.org/10.1023/A:1020596903142>
- Manaia, C.M., Moore, E.R.B., 2002. *Pseudomonas thermotolerans* sp. nov., a thermotolerant species of the genus *Pseudomonas* sensu stricto. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 2203–2209. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2203>
- Mathelié-Guinlet, M., 2017. Etude de l'interaction nanoparticules-bactéries : application à l'élaboration d'un biocapteur (phdthesis). Université de Bordeaux.
- Manousaki, E., Kalogerakis, N., 2009. Phytoextraction of Pb and Cd by the Mediterranean saltbush (*Atriplex halimus* L.): metal uptake in relation to salinity. *Environ Sci Pollut Res* 16, 844–854. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0224-3>
- Meyer, J.-M., 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol* 174, 135–142. <https://doi.org/10.1007/s002030000188>
- Mulet, M., Lalucat, J., García-Valdés, E., 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 12, 1513–1530. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x>
- Matsubara, T., Zumft, W.G., 1982. Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) pseudomonads. *Arch. Microbiol.* 132, 322–328. <https://doi.org/10.1007/BF00413383>
- McGrath, S.P., Zhao, J., Lombi, E., 2002. Phytoremediation of Metals, Metalloids, and Radionuclides. In: *Advances in Agronomy*, in: *Advances in Agronomy*. Academic Press, pp. 1–56. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(02\)75002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)75002-5)
- Mitik-Dineva, N., Wang, J., Mocanasi, R.C., Stoddart, P.R., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2008. Impact of nano-topography on bacterial attachment. *Biotechnology Journal* 3, 536–544. <https://doi.org/10.1002/biot.200700244>

- Müller, S.A., Aebi, U., Engel, A., 2008. What transmission electron microscopes can visualize now and in the future. *Journal of Structural Biology*, JSB 50th Anniversary Issue 163, 235–245. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.05.008>
- Mulligan, C. N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology, Geoenvironmental Engineering* 60, 193–207. [https://doi.org/10.1016/S0013-7952\(00\)00101-0](https://doi.org/10.1016/S0013-7952(00)00101-0)
- Mulligan, Catherine N, Yong, R.N., Gibbs, B.F., 2001. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. *Journal of Hazardous Materials, Contaminated Dredged Soils* 85, 111–125. [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(01\)00224-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(01)00224-2)
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F., James, S., Bennett, H.P.J., 1999. Metal Removal from Contaminated Soil and Sediments by the Biosurfactant Surfactin. *Environ. Sci. Technol.* 33, 3812–3820. <https://doi.org/10.1021/es9813055>
- Munsch, P., Alatosava, T., Marttinen, N., Meyer, J.-M., Christen, R., Gardan, L., 2002. *Pseudomonas costantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1973–1983. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-1973>
- Nguyen, H.L., Leermakers, M., Elskens, M., De Ridder, F., Doan, T.H., Baeyens, W., 2005. Correlations, partitioning and bioaccumulation of heavy metals between different compartments of Lake Balaton. *Science of The Total Environment* 341, 211–226. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.019>
- Nishimori, E., Kita-Tsukamoto, K., Wakabayashi, H., 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 83–89. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-83>
- Palleroni, N.J., 1993. *Pseudomonas* classification. *Antonie van Leeuwenhoek* 64, 231–251. <https://doi.org/10.1007/BF00873084>
- Palleroni, N.J., Moore, E.R.B., 2004. Taxonomy of Pseudomonads: Experimental Approaches, in: Ramos, J.-L. (Ed.), *Pseudomonas: Volume 1 Genomics, Life Style and Molecular Architecture*. Springer US, Boston, MA, pp. 3–44. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9086-0_1
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., Velázquez, E., 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution, Includes papers from the Special Issue “Parasitology in Mexico”* 9, 1132–1147. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>
- Peix, A., Rivas, R., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C., Velázquez, E., 2003. *Pseudomonas rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 2067–2072. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02703-0>
- Peix, A., Rivas, R., Santa-Regina, I., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Rodríguez-Barrueco, C., Velázquez, E., 2004. *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 847–850. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02966-0>
- Peter, C., Li, X., Chen, B., 2004. Arbuscular mycorrhiza can depress translocation of zinc to shoots of host plants in soils moderately polluted with zinc. *Plant and Soil* 261, 209–217. <https://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000035542.79345.1b>
- Rai, U.N., Pandey, K., Sinha, S., Singh, A., Saxena, R., Gupta, D.K., 2004. Revegetating fly ash landfills with *Prosopis juliflora* L.: impact of different amendments and Rhizobium inoculation. *Environment International* 30, 293–300. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00179-X](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00179-X)

- Romanenko, L.A., Uchino, M., Tebo, B.M., Tanaka, N., Frolova, G.M., Mikhailov, V.V., 2008. *Pseudomonas marincola* sp. nov., isolated from marine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 706–710. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65406-0>
- Roquigny, R., Novinscak, A., Léger, G., Marcoux, N., Joly, D.L., Filion, M., 2018. Deciphering the Rhizosphere and *Geocaulosphere* Microbiomes of Potato Following Inoculation with the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* Strain LBUM223. *Phytobiomes Journal* 2, 92–99. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-03-18-0013-R>
- Sakthivel, N., Gnanamanickam, S.S., 1987. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for Suppression of Sheath Rot Disease and for Enhancement of Grain Yields in Rice (*Oryza sativa* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2056–2059.
- Santschi, P.H., Lenhart, J.J., Honeyman, B.D., 1997. Heterogeneous processes affecting trace contaminant distribution in estuaries: The role of natural organic matter. *Marine Chemistry*, 4th International Symposium on the Biogeochemistry of Model Estuaries 58, 99–125. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(97\)00029-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(97)00029-7)
- Sas-Nowosielska, A., Kucharski, R., Malkowski, E., Pogrzeba, M., Kuperberg, J.M., Kryński, K., 2004. Phytoextraction crop disposal—an unsolved problem. *Environmental Pollution* 128, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.012>
- Schroth, M.N., Hildebrand, D.C., Panopoulos, N., 1992. Phytopathogenic pseudomonads and related plant-associated pseudomonads. In: *The Prokaryotes* 3104–3131.
- Shen, Z.-G., Li, X.-D., Wang, C.-C., Chen, H.-M., Chua, H., 2002. Lead Phytoextraction from Contaminated Soil with High-Biomass Plant Species. *Journal of Environmental Quality* 31, 1893–1900. <https://doi.org/10.2134/jeq2002.1893>
- Schilardi, P., Diaz, C., Flores, C., Alvarez, F., Fernández, M., Fernández Lorenzo de Mele, M., 2010. Atomic force microscopy and optical microscopy: suitable tools for the study of the initial stages of biofilm formation. pp. 860–869.
- Sheng, X.-F., Xia, J.-J., 2006. Improvement of rape (*Brassica napus*) plant growth and cadmium uptake by cadmium-resistant bacteria. *Chemosphere* 64, 1036–1042. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.01.051>
- Simon, A., Durrieu, M.-C., 2006. Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion. *Micron* 37, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.06.006>
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M., Rainey, P.B., 2003. Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology* 50, 15–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03670.x>
- Spiers, A.J., Buckling, A., Rainey, P.B., 2000. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146, 2345–2350. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-10-2345>
- Suslow, T.V., Schroth, M.N., 1982. Rhizobacteria of sugarbeets: effects of seed application and root colonization on yield [Fungal and bacterial phytopathogens]. *Phytopathology (USA)*.
- Uroz, S., Calvaruso, C., Turpault, M.-P., Frey-Klett, P., 2009. Mineral weathering by bacteria: ecology, actors and mechanisms. *Trends in Microbiology* 17, 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.05.004>
- Vela, A.I., Gutiérrez, M.C., Falsen, E., Rollán, E., Simarro, I., García, P., Domínguez, L., Ventosa, A., Fernández-Garayzábal, J.F., 2006. *Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2671–2676. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64378-0>
- Visca, P., Imperi, F., Lamont, I.L., 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends in Microbiology* 15, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.004>

- Wang, F.Y., Lin, X.G., Yin, R., 2007. Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Acaulospora mellea* decreases Cu phytoextraction by maize from Cu-contaminated soil. *Pedobiologia* 51, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2007.02.003>
- Wang, Q., Yang, Q., Wu, W., 2020. Progress on Structured Biosensors for Monitoring Aflatoxin B1 From Biofilms: A Review. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00408>
- Wang, Z., Mei, X., Du, M., Chen, K., Jiang, M., Wang, K., Zalán, Z., Kan, J., 2020. Potential modes of action of *Pseudomonas fluorescens* ZX during biocontrol of blue mold decay on postharvest citrus. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100, 744–754. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10079>
- Wasi, S., Tabrez, S., Ahmad, M., 2013. Toxicological effects of major environmental pollutants: an overview. *Environ Monit Assess* 185, 2585–2593. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2732-8>
- Whiting, S.N., de Souza, M.P., Terry, N., 2001. Rhizosphere Bacteria Mobilize Zn for Hyperaccumulation by *Thlaspi caerulescens*. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3144–3150. <https://doi.org/10.1021/es001938v>
- Wu, C.H., Wood, T.K., Mulchandani, A., Chen, W., 2006. Engineering Plant-Microbe Symbiosis for Rhizoremediation of Heavy Metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1129–1134. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1129-1134.2006>
- Wu, S.C., Cheung, K.C., Luo, Y.M., Wong, M.H., 2006a. Effects of inoculation of plant growth-promoting rhizobacteria on metal uptake by *Brassica juncea*. *Environmental Pollution* 140, 124–135. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.023>
- Wu, S.C., Luo, Y.M., Cheung, K.C., Wong, M.H., 2006b. Influence of bacteria on Pb and Zn speciation, mobility and bioavailability in soil: A laboratory study. *Environmental Pollution* 144, 765–773. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.02.022>
- Xu, J., Yin, H., Liu, X., Li, X., 2010. Salt affects plant Cd-stress responses by modulating growth and Cd accumulation. *Planta* 231, 449–459. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1070-8>
- Yuan, S.J., Pehkonen, S.O., 2009. AFM study of microbial colonization and its deleterious effect on 304 stainless steel by *Pseudomonas* NCIMB 2021 and *Desulfovibrio desulfuricans* in simulated seawater. *Corrosion Science* 51, 1372–1385. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2009.03.037>
- Zhuang, X., Chen, J., Shim, H., Bai, Z., 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International* 33, 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.12.005>

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Ce chapitre est consacré à la présentation des modèles bactériens utilisés dans notre étude et au protocole expérimental qui a été adapté à la nature des méthodes utilisées pour leur caractérisation. Nous avons ainsi été amenés à utiliser la microscopie à force atomique pour la caractérisation morphologique de notre bactérie, ainsi que la technique de dilution sur milieu gélosé en déduisant la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui matérialise l'action du cadmium sur la croissance de la bactérie *Pseudomonas fluorescens*.

Plan du chapitre II

1. Matériels.....	150
1.1 Matériel biologique.....	150
1.2 Matériel chimique	150
2. Protocoles expérimentaux	152
2.1 Conditions de culture	152
2.2 Dépôt Bactérien sur un substrat solide	153
2.2.1 Dépôt sur un substrat non traité	153
2.2.2 Dépôt sur substrat fonctionnalisé.....	154
2.2.3 Fixation des bactéries avec du glutaraldéhyde.....	155
3. Etude de la viabilité bactérienne.....	156
3.1 Repiquage des bactéries.....	156
3.2 Préparation des solutions diluées de cadmium	157
3.3 Préparation des boîtes de dilution.....	157
3.4 Préparation de l'inoculum bactérien	158
3.5 Ensemencement.....	158
3.6 Lecture de la CMI	158
4. Caractérisation du système étudié (instrumentation)	158
4.1 La Microscopie à Force Atomique (AFM).....	158
4.1.1 Introduction	159
4.1.2 Microscopie de force atomique (AFM) et forces mises en jeu	159
4.1.3 Fonctionnement et principe de l'AFM	161
4.1.4 Les modes d'utilisation de l'AFM	164
4.1.5 Conditions d'imagerie et préparation des échantillons.....	167
4.2 Microscopie Optique.....	168
4.3 Microscopie Electronique à Balayage.....	168
5. Références.....	171

Chapitre II : Matériels et Méthodes

1. Matériels

1.1 Matériel biologique

Dans notre travail, nous avons utilisé deux souches bactériennes (figure II-1), la première étant l'objet de notre étude et la deuxième étant utilisée à titre de comparaison dans le cadre de l'étude de la toxicité du cadmium :

La souche non pathogène à Gram négatif *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (achetée à l'ATCC), est utilisée pour cette étude. Elle est conservée en aérobiose à -80°C dans un bouillon nutritif (Sigma Aldrich/ France).

La bactérie à Gram négatif *Escherichia coli* (souche MRE 162) gracieusement fournie par l'UMR 1332 Biologie du fruit & pathologie (BFP), INRAE (Institut National Recherche Agronomique, France), est aussi utilisée pour cette étude.

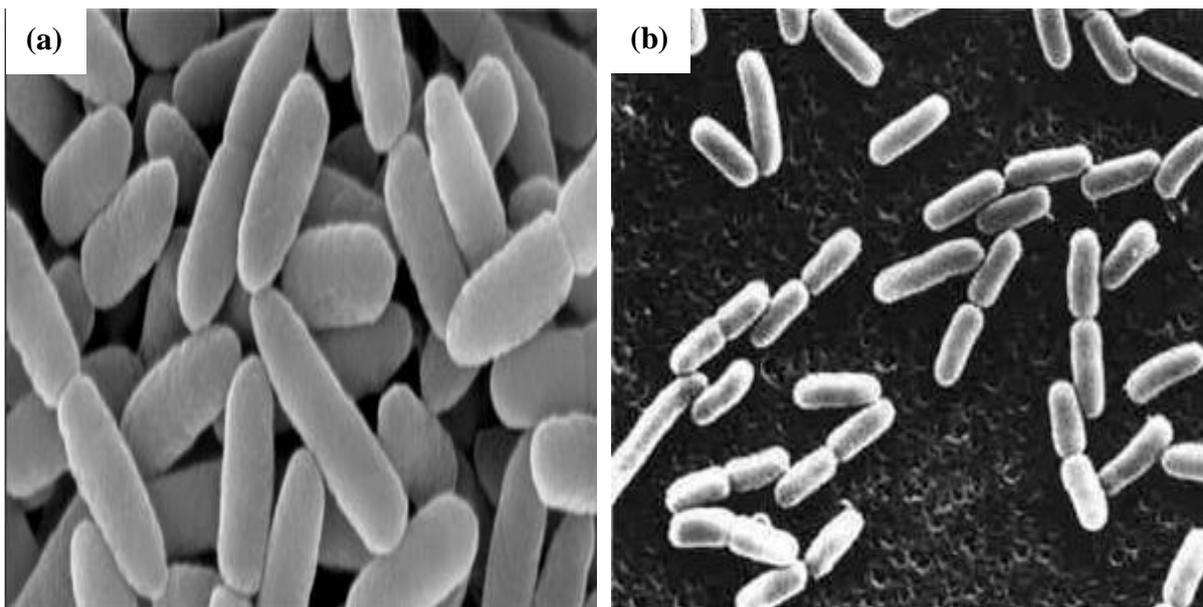


Figure II-1 : Image prise par MEB des deux bactéries *Pseudomonas fluorescens* (a) et *Escherichia coli* (b) (Vojtkova et al, 2012).

1.2 Matériel chimique

Le xénobiotique testé dans notre étude correspond à un élément trace métallique, le cadmium sous forme de CdCl_2 (figure II-2), dilué dans de l'eau ultra pure (*Milli-Q*) avec une large gamme de concentrations variant entre 10 et 10^{-8} g/L.

Dans la présente étude, la souche est cultivée dans trois milieux gélosés différents (Sigma Aldrich/ France) dont les compositions sont les suivantes :

- Milieu de culture LB (Lysogeny Borth) : tryptone 10 g ; extrait de levure 5 g ; chlorure de sodium 10 g ; pH 7,2 à 25° C ;
- Milieu de culture MH (Muller Hinton) : extrait de bœuf 2 g ; hydrolysate acide de caséine 17,5 g ; amidon soluble 1,5 g ; gélose 17,0 g ; pH 7,4 à 25° C ;
- Milieu de culture MH+ (Muller Hinton ajusté en cations) : extrait de bœuf 3 g ; hydrolysate acide de caséine 17,5 g ; amidon soluble 1,5 g ; agar 17,0 g ; pH 7,4 à 25° C.

La caractérisation des bactéries en absence ou présence de cadmium est réalisée sur différents substrats :

- Lame de verre microscopique (Fisher Thermo Scientific/France) ;
- Lame de verre fonctionnalisée à la Poly-L-Lysine (PLL) (Fisher Thermo Scientific/France) (figure II-2) ;
- Lame de verre fonctionnalisée par une multicouche de polyélectrolytes (PEM) ;
- Mica avec une rugosité moyenne de 0,3 nm / m² (Electron Microscopy Sciences/France).

Deux polyélectrolytes (Sigma Aldrich/France) ont été utilisés : le polycation PAH (poly chlorhydrate d'allylamine, Mw = 56000) et le polyanion PSS (poly styrène sulfonate, Mw = 70000) (figure 2), solubilisés dans l'eau à une concentration de 0.5 g/l.

Le glutaraldéhyde et le Phosphate-Buffered Saline (PBS), tous deux achetés chez Sigma Aldrich/France) sont utilisés dans le protocole de fixation des bactéries pour l'étude en milieu liquide.

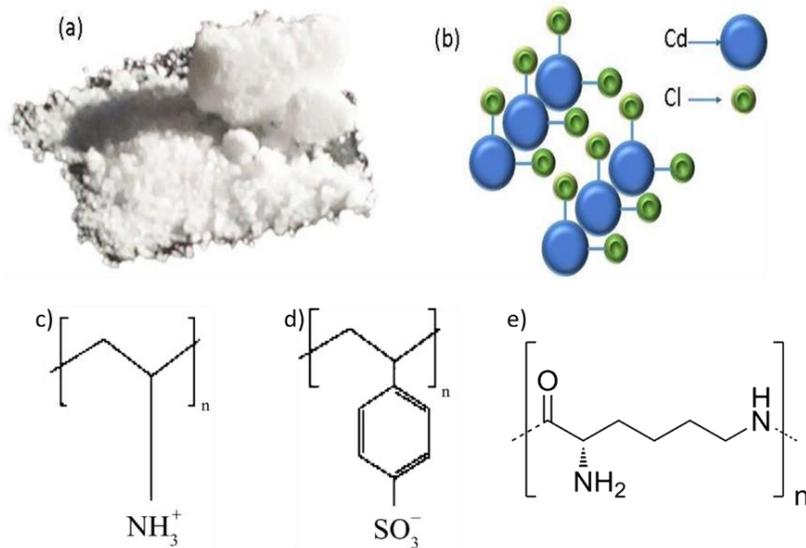


Figure II-2 : (a) Chlorure du cadmium en poudre (b) structure moléculaire du chlorure du cadmium (c) Poly chlorHydrate d'Allylamine (PAH) (e) Poly Styrène Sulfonate (PSS) (f) Poly-L-lysine (PLL).

2. Protocoles expérimentaux

2.1 Conditions de culture

Durant cette étude les bactéries sont cultivées dans trois milieux gélosés différents LB, MH et MH+. Pour chaque expérience, la souche est prélevée de l'agar nutritif dans une culture par lots. Cette culture stock (mère) est utilisée pour inoculer d'autres cultures intermédiaires qui sont mises en croissance par incubation aux températures indiquées dans la partie résultat durant 12h, 15h et 24h.

Les nouvelles cultures intermédiaires sont donc incubées pendant des durées différentes (12h, 15h et 24h) et à différentes températures d'incubation (28 et 37°C). Après prélèvement, les bactéries sont mises en suspension dans 1,5 ml de l'eau ultra pure « Milli-Q » (pH= 5,5; résistivité supérieure à 18,2 MΩ.cm) (figure II-3). Ces cellules bactériennes sont ensuite étudiées par microscopies (AFM et OM).

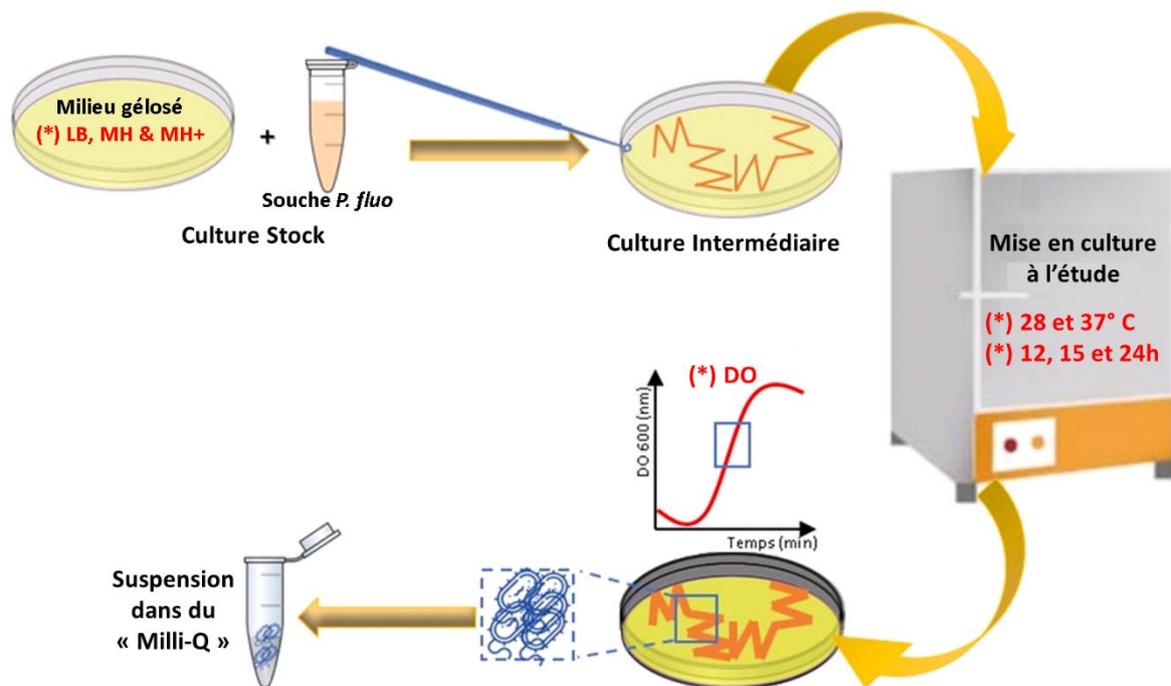


Figure II-3 : Protocole expérimentale de la mise en culture des bactéries *Pseudomonas fluorescens* (*) représente les différents paramètres optimisés durant nos expérimentations.

2.2 Dépôt Bactérien sur un substrat solide

Les dépôts sont effectués sur deux types de substrats, du mica ou des lames de verre largement utilisées dans les études de caractérisation par microscopie en biologie.

L'avantage du substrat de mica est la possibilité de le cliver rapidement et facilement pour obtenir une surface homogène et pratiquement lisse, ce qui permet de discriminer tout contraste topographique en AFM. L'utilisation des lames de verre est avantageuse par rapport à leur transparence et leur faible rugosité. Ces lames ont été potentiellement fonctionnalisées selon l'objectif de l'étude.

Les dépôts bactériens réalisés sont issus d'une culture intermédiaire récoltée et diluée à des concentrations équivalentes aux densités optiques (D.O) de 1 ; 0,7 ; 0,5 ; 0,3 et 0,1 obtenues à une longueur d'onde égale à 600 nm ($1DO = 8 \cdot 10^8$ CFU/ml).

Les paragraphes suivants décrivent le protocole de dépôt.

2.2.1 Dépôt sur un substrat non traité

Dans le cas où la caractérisation des échantillons est réalisée par microscopie optique ou microscopie à force atomique à l'air, il n'est pas nécessaire d'immobiliser les bactéries qui sont alors directement déposées sur le substrat nu (mica/ lame de verre). Plus précisément, 5 μ l de

la suspension bactérienne sont déposés sur la surface de mica, préalablement clivé (figure II-5), il s'agit d'un dépôt simple (durant 2 heures avec un lavage énergétique à l'eau ultra pure).

2.2.2 Dépôt sur substrat fonctionnalisé

Pour une étude suivie dans le temps et/ou en milieu liquide, les bactéries doivent être immobilisées afin de prévenir tout mouvement éventuel ou décollement de la surface après les différents rinçages énergiques¹, mais aussi pour éviter que les cellules ne se décollent suite aux forces hydrodynamiques générées par la pointe lors des balayages en milieu liquide. 5 µl de la suspension bactérienne sont déposés sur un substrat fonctionnalisé, de type lame de verre traité par dépôt de verre/PLL ou mica et/ou lames de verre traitées par dépôt d'une PEM (Figure II-5). La PEM est préparée par la méthode « LbL » (couche par couche, en anglais *Layer by Layer*). Cette méthode est basée sur le dépôt alterné de plusieurs couches de polyélectrolytes chargés positivement et négativement (PSS/PAH) (0,5 g/l). Les étapes d'adsorption et de rinçage² sont répétées trois fois (15 minutes pour chaque étape). Une dernière couche de PAH est déposée afin de garantir l'immobilisation des bactéries, par interaction électrostatique, les bactéries étant globalement chargées négativement et le PAH positivement. Cette méthode permet finalement une immobilisation très efficace des bactéries pour une étude du dépôt en milieu liquide ou pour un suivi dans le temps (Gammoudi et al., 2016 et 2020).

¹ Le rinçage énergétique est réalisé par une pissette, en appuyant avec une forte pression ; le jet d'eau permet d'éliminer les bactéries non adhérentes au substrat (le rinçage a été effectué de la même manière à plusieurs reprises, entre 5 à 10 fois par échantillon, avant la caractérisation).

² Le rinçage doux réalisé à l'aide d'une micropipette, avec le dépôt d'une goutte d'eau ultra pure sur le substrat et la récupération de la goutte d'eau par la suite de la même manière (après 10 secondes), l'opération est répétée à plusieurs reprises de 5 à 10 fois par échantillon, afin d'éliminer les bactéries non adhérentes au substrat.

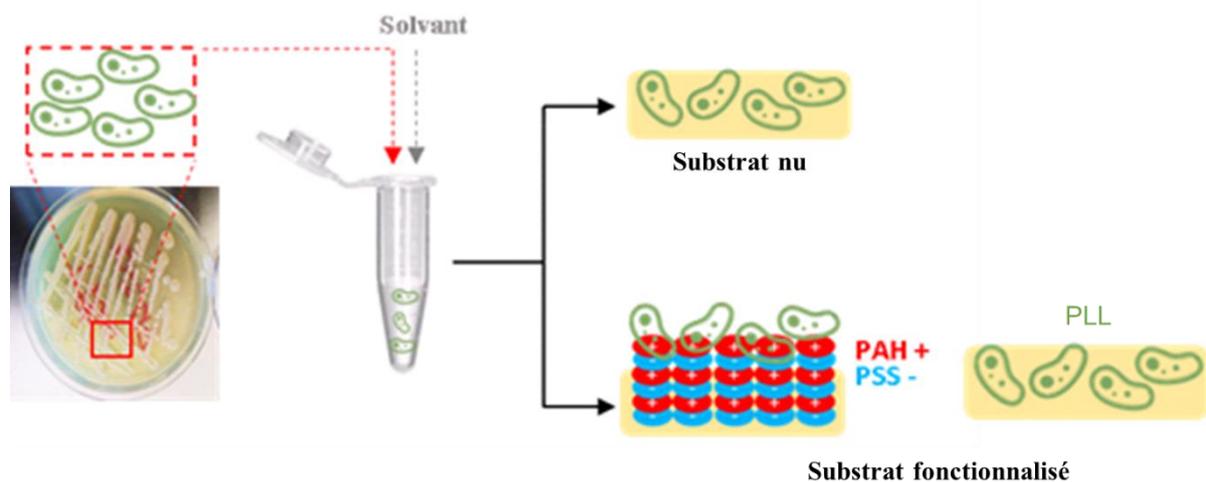


Figure II-4 : Protocoles de dépôt de suspensions bactériennes sur un substrat nu ou fonctionnalisé (PLL ou PEM) selon la nécessité d’immobiliser ou pas les bactéries.

2.2.3 Fixation des bactéries avec du glutaraldéhyde

Une autre méthode de fixation des bactéries est utilisée en plus de la fonctionnalisation des substrats sur lesquels s’effectuent les dépôts bactériens. Cette méthode est utilisée pour la préparation des échantillons pour une caractérisation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et Microscopie à force atomique AFM. Dans le cadre de l’étude de l’interaction entre *Pseudomonas fluorescens* et le xénobiotique (Cd), la fixation des bactéries sur le substrat est effectuée en utilisant du glutaraldéhyde à 2,5% dilué dans du PBS (v/v) pendant 2 heures. Les bactéries ont subi préalablement un lavage au PBS à deux reprises avec une centrifugation à 5000 rpm pendant 5 minutes. Par la suite, les bactéries sont resuspendues dans de l’eau ultra pure (*Milli-Q*) et 5 μ l de la solution bactérienne sont déposés sur du mica (Figure II-6). Les échantillons sont ensuite séchés pendant 30 minutes. Enfin, et avant de les caractériser, les échantillons sont rincés énergiquement afin d’éliminer les bactéries non adhérentes au substrat et de prévenir tout détachement éventuel de la population bactérienne. Les échantillons sont séchés au dessiccateur pendant 2 heures.

Pour les échantillons observés par microscopie électronique à balayage (MEB), des étapes de déshydratation à l’éthanol à différentes concentrations (30, 50, 70, 90 et 100 %), dilué dans de l’eau ultra-pure ont été effectuées.

Pour vérifier la reproductibilité et la répétabilité de nos résultats, quatre échantillons indépendants sont préparés et analysés. Pour les expériences nécessitant une surveillance dans le temps, les échantillons sont stockés dans un dessiccateur à l’abri de la poussière, de la lumière et de l’humidité.

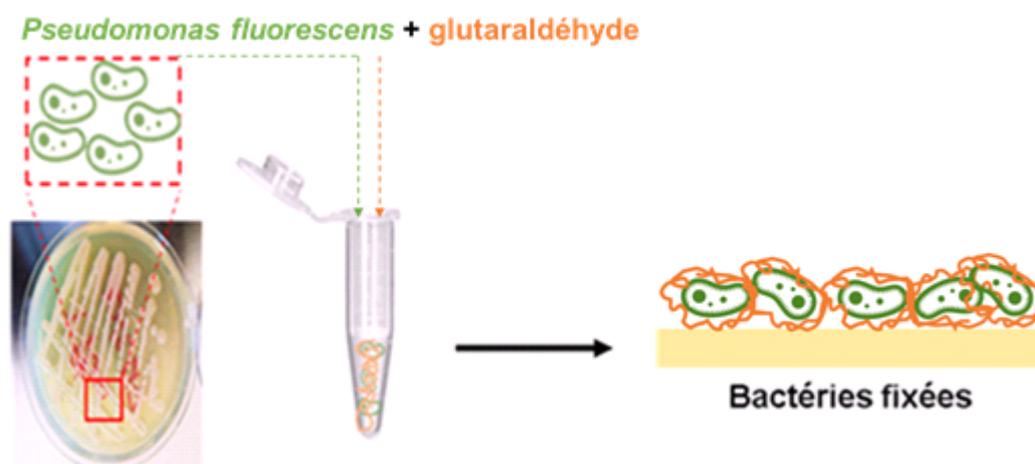


Figure II-5 : Protocole de dépôt des bactéries fixées au glutaraldéhyde sur un support solide non fonctionnalisé.

3. Etude de la viabilité bactérienne

Nous avons déterminé la concentration Minimale Inhibitrice (CMI), autrement dit la plus faible concentration du xénobiotique capable d'inhiber dans un milieu (liquide ou solide) la croissance de la souche étudiée (Ferron, 1983) (Minor and Véron, 1989). La procédure expérimentale suivie est celle indiquée par le comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, et codifiée selon les normes universelles (CASFM, 2019). Elle repose sur le repiquage des souches testées, la préparation de la gamme de dilution du xénobiotique utilisé, la mise en culture sur boîtes de Petri des bactéries à raison d'une concentration par boîte, la préparation de l'inoculum bactérien et pour finir, l'ensemencement du mélange obtenu. Une fois les échantillons préparés, on procède à la lecture de la CMI. Les différentes étapes de cette procédure sont détaillées ci-après.

3.1 Repiquage des bactéries

Cette opération consiste au prélèvement de plusieurs colonies à partir du milieu de conservation de la souche mère *Pseudomonas fluorescens* et à l'ensemencement dans des boîtes de Petri contenant le milieu de culture gélosé (MH) par la méthode des stries. Les boîtes sont ensuite incubées à 28 °C pendant 24 h (figure II-6).

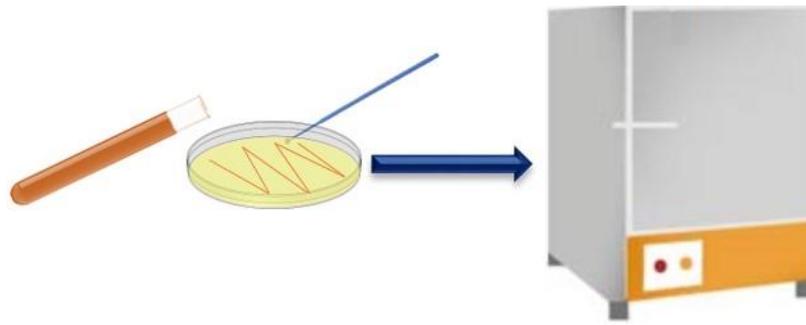


Figure II-6 : Repiquage et mise en culture de la souche bactérienne

3.2 Préparation des solutions diluées de cadmium

Une masse de 0,1 g de CdCl_2 est pesée puis ajoutée à 10 ml d'eau ultra pure (*Milli Q*) afin d'obtenir une concentration finale de 10 g/L (solution mère, SM). Des dilutions semi-logarithmiques sont ensuite réalisées dans de l'eau distillée stérile, jusqu'à l'obtention d'une concentration finale de 10^{-8} g/L. 2 ml de chaque solution sont ensuite ajoutés dans des flacons renfermant 8 ml du milieu MH liquéfié et homogénéisé auparavant.

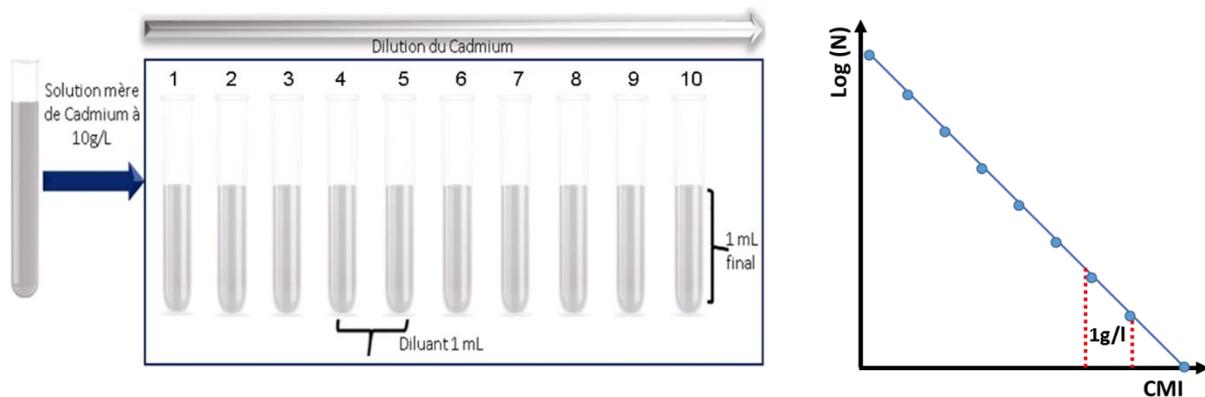


Figure II-7 : Réalisation de la gamme de dilution du cadmium.

3.3 Préparation des boîtes de dilution

Chaque flacon contenant une solution de cadmium avec une concentration bien définie est versé dans la boîte de Petri correspondante, une boîte de Petri témoin étant également préparée en remplaçant le volume du xénobiotique par le même volume d'eau ultra pure (*Milli-Q*) après solidification du milieu.

Toutes les boîtes couvertes par un film protecteur sont conservées à une température ambiante afin d'assurer une bonne diffusion du cadmium dans le milieu MH.

3.4 Préparation de l'inoculum bactérien

À partir d'une culture pure d'une durée d'incubation de 15 et 24 h, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques (3 colonies pour les bacilles à Gram-) sont raclées à l'aide d'une boucle d'inoculation, puis déchargées dans 2 ml d'eau ultra-pure.

La suspension bactérienne obtenue est homogénéisée et sa DO à 600 nm est mesurée pour une éventuelle dilution correspondant à une DO de 0,5 « Mac Farland » (Roessler et Brewer 1967), ce qui correspond à 10^8 CFU/ml en moyenne.

3.5 Ensemencement

Cette méthode repose sur la préparation d'un canevas pour la localisation et l'identification de chaque spot. Ensuite, chaque boîte de dilution est ajustée sur le canevas avant le dépôt des spots sur la gélose, à l'aide d'une boucle d'inoculation, dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum, en commençant par la boîte témoin et en poursuivant le processus de la plus faible concentration (10^{-8} g/L) à la concentration la plus élevée (10 g/L). Après absorption de l'inoculum dans la gélose pendant 30 min, les boîtes sont incubées à 28°C, pendant 24h.

3.6 Lecture de la CMI

La lecture de la CMI est réalisée par deux méthodes : (i) en plaçant les boîtes de différentes concentrations sur une surface sombre, pour y observer la présence ou l'absence de colonies, par rapport à la boîte témoin, (ii) par mesure de turbidité à 595 nm en utilisant le spectrophotomètre (les échantillons remis en suspension après traitement sur boîte).

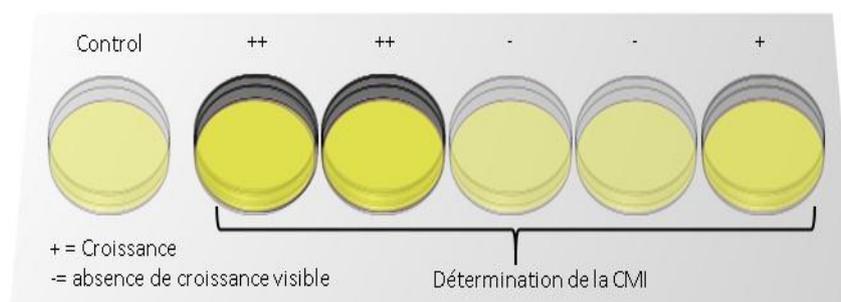


Figure II-8 : Lecture et détermination de la CMI sur les boîtes de Petri

4. Caractérisation du système étudié (instrumentation)

4.1 La Microscopie à Force Atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy* en anglais, AFM), est la technique de caractérisation principale dans le cadre de l'étude de notre modèle bactérien.

Dans cette partie nous allons détailler le principe, les différents composants et les modes de fonctionnement de l'AFM.

4.1.1 Introduction

Certains relient l'invention de l'AFM à un instrument précurseur, le "Topografiner", développé par le physicien américain Russel Young en 1972 et décrit par l'académie des sciences comme « le premier instrument qui fonctionne selon le principe du maintien d'une petite distance constante entre la surface d'un échantillon et celle d'un stylet pointu mécanique ». Mais, c'est bien l'apparition du microscope à effet tunnel (Scanning Tunneling Microscopy ou STM) en 1981, dans les laboratoires IBM à Zurich, développé par Binnig et ses collaborateurs (Binnig et al., 1982), qui a révolutionné le domaine des microscopies classiques. Son fonctionnement repose sur l'apparition d'un courant tunnel lorsqu'une différence de potentiel est appliquée entre une pointe et un échantillon conducteur avec une distance très faible entre les deux. L'intensité de ce courant dépend de la densité électronique de la surface de l'échantillon, de la pointe et de la distance pointe-surface ; il est ainsi possible, en contrôlant l'intensité du courant tunnel, de retracer la topographie de l'échantillon à l'échelle atomique.

Le STM, se limite donc aux échantillons conducteurs, mais la mise en évidence de forces d'interaction d'intensité variable en fonction de la distance pointe-échantillon, a permis l'introduction du microscope à force atomique par Binnig et ses collaborateurs (Binnig et al., 1986), ce qui leur a valu l'obtention du prix Nobel de physique. Par la suite, une nouvelle méthode de détection optique basée sur la réflexion d'un faisceau laser par un micro-levier a permis d'accélérer fortement le développement de l'AFM, comme un nouveau type de microscopie à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon avec une précision nanométrique.

4.1.2 Microscopie de force atomique (AFM) et forces mises en jeu

La surface de l'échantillon est balayée par une sonde (ou pointe) de dimensions nanométriques solidaire d'un microlevier. La cartographie tridimensionnelle est réalisée à partir de la mesure de l'intensité des différentes interactions entre la surface et la pointe. L'approche la plus souvent utilisée pour décrire les forces mises en jeu en AFM consiste à considérer l'énergie d'interaction qui existe entre deux atomes (ou molécules) non liés. Cette énergie est très souvent exprimée sous la forme d'un potentiel par paire de Lennard-Jones liée à la distance pointe-échantillon. Ce potentiel est la combinaison d'une interaction attractive qui prédomine à "grande distance" de séparation et d'une interaction répulsive qui intervient de façon prépondérante à "faible distance" selon le principe d'exclusion de Pauli (principe qui empêche l'interpénétration

mutuelle des nuages électroniques de deux atomes) (Figure II-9).

Expérimentalement, un faisceau laser est focalisé sur l'extrémité du microlevier puis réfléchi sur une photodiode quatre quadrants. Le signal différentiel reçu par la photodiode donne la déflexion subie par le microlevier et donc la force d'interaction pointe-surface.

En l'absence de champ externe, la pointe, étant à une distance d de l'ordre de quelques nm, est sensible aux forces de courte et de longues portées qui dépendent des propriétés physico-chimiques aussi bien du microlevier que de l'échantillon. Les forces de courte portée, comme leur nom l'indique, sont mesurées pour des distances de quelques nm et sont essentiellement des forces répulsives. Les forces de longue portée, quant à elles, sont des forces capillaires, électrostatiques, magnétiques et de van der Waals. La nature des interactions mises en jeu variant avec la distance d , cette notion de distance entre la pointe et la surface de l'échantillon prend toute son importance (Reifenberger Ronald, 2015).

Les forces entrant en jeu durant les mesures AFM sont nombreuses et dépendent du type de pointe utilisée (dimensions, nature du matériau, fonctionnalisation), de l'échantillon sondé et du milieu dans lequel est réalisée la mesure (air, liquide, vide).

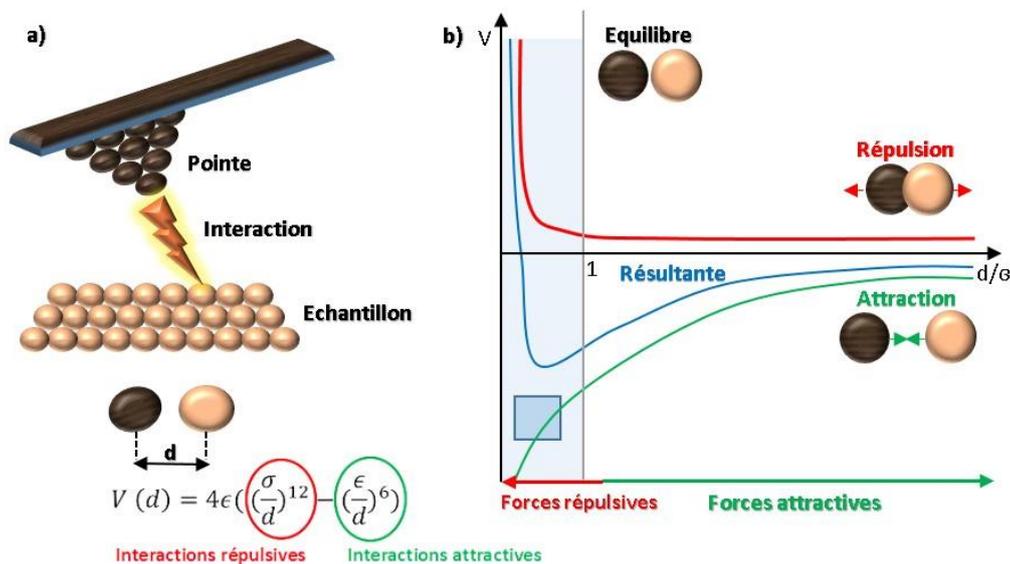


Figure II-9 : a) schéma de l'interaction d'une pointe avec la surface d'un échantillon en AFM, b) représentation du potentiel d'interaction en fonction de la distance pointe-échantillon d .

a) Les forces répulsives sont dues à l'impossibilité pour les nuages électroniques des atomes (pointe/échantillon) de s'interpénétrer, selon le principe d'exclusion de Pauli. Elles sont

importantes au contact de l'échantillon, le potentiel d'interaction correspondant une loi en d^{-12} , d étant la distance pointe-échantillon.

b) Les forces attractives, actives au-delà du nanomètre, sont classées en différentes catégories :

- **Les forces de Van der Waals**, en général dues aux interactions dipolaires existantes entre les deux systèmes entrant en contact. Elles résultent d'effets thermiques ou de fluctuations quantiques induisant des modifications du champ électromagnétique ;

- **Les forces de capillarité**, résultante de l'humidité de l'air environnant, capable de piéger la pointe à la surface, via un ménisque ;

- **Les forces d'adhésion**, dues à toutes les interactions spécifiques qui existe entre la pointe et la surface de l'échantillon.

c) Les forces électrostatiques peuvent être attractives ou répulsives. Cela dépend du changement des propriétés électriques et des charges présentes à la surface de l'échantillon, plus ou moins écrantées selon l'environnement de mesure (liquide, air ou vide).

4.1.3 Fonctionnement et principe de l'AFM

Le montage expérimental de l'AFM est représenté sur le schéma ci-dessous (figure II-10).

L'échantillon est déposé sur une céramique piézoélectrique assurant le déplacement dans les trois directions (x , y et z). Une sonde encastrée à l'extrémité d'un microlevier est en interaction avec la surface de l'échantillon. Un faisceau lumineux issu d'une diode laser est focalisé à l'extrémité du microlevier puis réfléchi via un miroir vers des photodiodes. Lors du balayage de la surface, le point d'incidence du faisceau sur la photodiode se déplace engendrant une différence dans les courants collectés sur les quadrants de la photodiode (quatre cadrans divisée parts égales). Ces variations nous informent sur la déflexion et la torsion du levier.

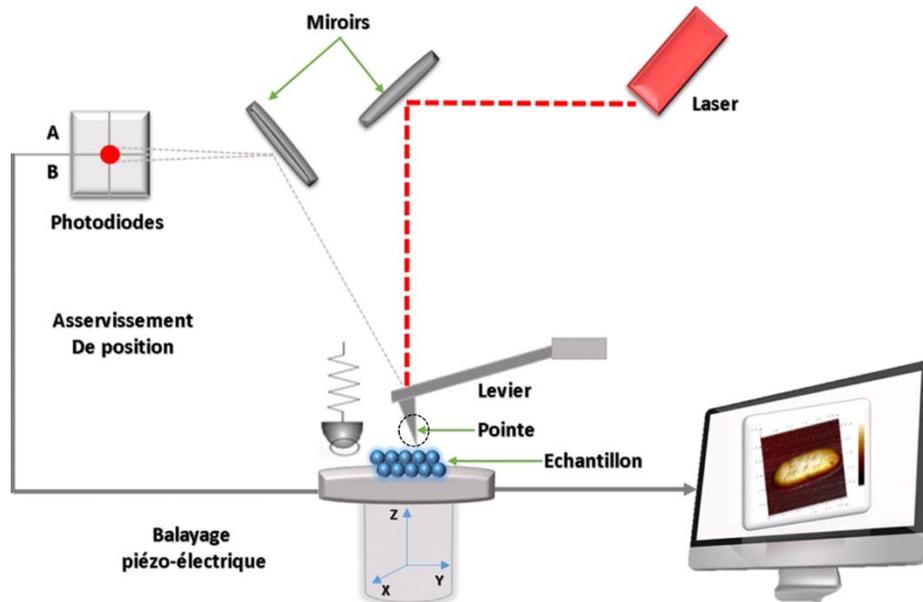


Figure II-10 : principe de fonctionnement du microscope à force atomique (AFM).

Le système microlevier-pointe : la pointe est l'élément important du dispositif, mais elle en constitue aussi le point faible. Elle est fragile et peut évoluer au cours d'une même manipulation. En effet, lors du balayage de la surface d'un échantillon, plusieurs mécanismes d'usure ou de pollution peuvent intervenir.

L'ensemble pointe-microlevier peut être représenté par un ressort de raideur k , le bout de la pointe étant assimilé à une sphère de rayon R (figure II-11). Quand la sonde balaie l'échantillon, les interactions entre la sonde et la surface provoquent une déflexion du levier. On obtient une mesure directe de la force suivant la loi de Hooke : $F = k \cdot z$ où z est la déflexion du levier.

Expérimentalement, nous avons utilisé des microleviers rectangulaires (en silicium) ou triangulaires (en nitrure de silicium) (figure II-12). Leurs constantes de raideurs k varient entre 0.01 et 50 N/m. Celle du levier rectangulaire peut être exprimée par la relation :

$$k = \frac{wEe^3}{4l^3}$$

Avec E : le module d'élasticité (en N.m^{-2}), w : la largeur, l : la longueur et e : l'épaisseur du microlevier (Chen, 1993).

La sonde de mesure étant assimilée à un oscillateur harmonique (figure II-12b), le levier (de masse m) a une fréquence propre d'oscillation, ω_0 , pouvant aller du kHz à plusieurs centaines

de kHz : $\omega_0 = \sqrt{k/m}$.

Le choix du type de pointe et de levier (formes, constante de raideur k) est défini selon le type d'échantillon à analyser et le mode de fonctionnement en AFM.

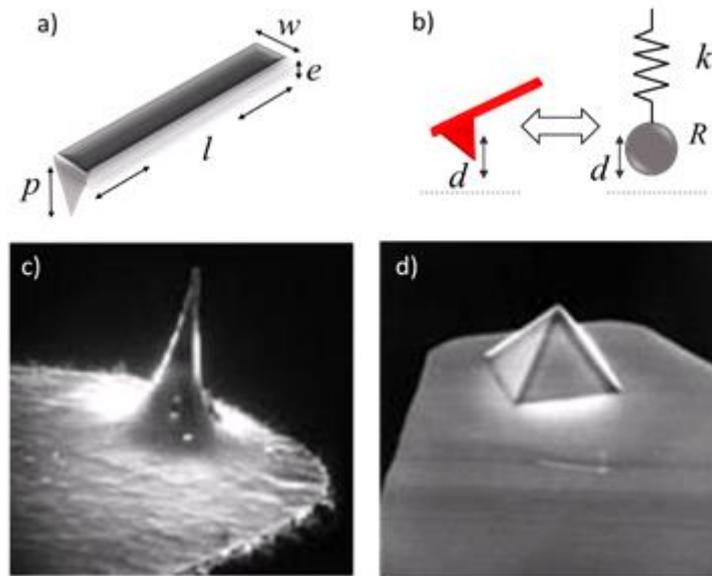


Figure II-11 : a) schémas d'une pointe, b) schéma équivalent entre le système pointe/levier et un oscillateur harmonique, c) pointe pyramidale, d) pointe conique (images en microscopie électronique à balayage) (nanoandmore.fr).

Le système de détection : il est composé d'une diode laser, d'un miroir et d'une cellule photoélectrique. Un faisceau laser envoyé sur l'extrémité du levier est réfléchi vers un miroir puis vers une cellule photoélectrique constituée de quatre photodiodes. Les déflexions du levier induisent des déviations du faisceau laser réfléchi, ce qui se traduit par des différences d'éclairement entre les photodiodes, converties en différence de tension puis en unités de longueur après calibration. Les déflexions du levier sont plus importantes à son extrémité, ainsi il est important d'optimiser le réglage du faisceau afin d'obtenir une sensibilité maximale.

Le système de balayage : il est composé d'une céramique piézoélectrique qui contrôle le déplacement du levier dans les trois directions (x, y et z). Une étape de calibration est indispensable pour éviter les phénomènes de dérive et de non-linéarité. La position du spot laser ainsi de la photodiode permet d'ajuster la position z de l'échantillon, par exemple pour garder une valeur de force constante entre la pointe et l'échantillon. Ces déplacements, inférieurs au dixième d'angström, sont ainsi enregistrés et transmis au système informatique pour permettre une analyse et une représentation en trois dimensions de la surface analysée.

La boucle d'asservissement : elle permet de comparer le signal réfléchi (S_t) par les photodiodes et les valeurs initiales imposées par l'utilisateur (C_t). En mode contact, l'asservissement de l'AFM maintient le levier suffisamment défléchi pour que l'interaction pointe-surface reste dans le domaine répulsif. Le circuit d'asservissement assure cette condition en modifiant la hauteur du piézoélectrique en z de façon à garder la déflexion verticale du levier constante. Les données traduisant les déplacements du levier verticalement comme latéralement sont ainsi enregistrées.

En pratique, une calibration du système piézoélectrique est effectuée régulièrement sur une surface étalon de SiO_2 présentant des microstructures de dimensions connues.

4.1.4 Les modes d'utilisation de l'AFM

L'utilisation de l'AFM se décline en deux modes opératoires spécifiques : l'imagerie et la spectroscopie de force.

L'imagerie repose sur un balayage de la surface de l'échantillon dans le plan (x, y) et à la mesure du signal en hauteur (z) de la céramique piézoélectrique (mode asservi), ou la déflexion du levier (mode non asservi).

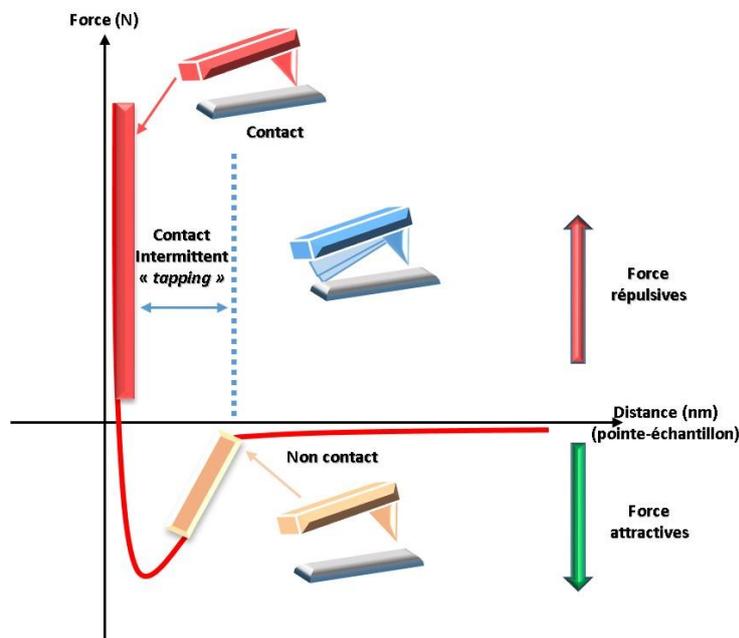


Figure II-12 : Graphe de la force en fonction de la distance entre la pointe et l'échantillon, mettant en évidence les trois modes de fonctionnement de l'AFM.

4.1.4.1 Mode contact

Également appelé mode à force constante, le mode contact est le mode AFM le plus direct, dans lequel la pointe reste en contact avec la surface de l'échantillon. Les forces utilisées sont

principalement répulsives (figure II-12).

Les variations de forces suivant le point considéré de coordonnées (x,y) sur la surface de l'échantillon permettent d'obtenir des images à partir desquelles on peut reconstituer la topographie de cette surface et révéler son hétérogénéité (du point de vue mécanique, chimique, électrique, etc.).

Différentes images sont enregistrées durant une expérience AFM en mode contact (hauteur, déflexion et friction) (figure II-13) :

- **Image de hauteur, dite aussi topographique** : elle représente le contraste de hauteur de la surface de l'échantillon, la position z de l'échantillon étant maintenue constante (pas d'asservissement), et l'image est enregistrée à partir de la mesure de la déflexion du levier.
- **Image de déflexion (ou d'erreur)** : la variation de la déflexion du levier est utilisée comme signal d'asservissement afin de corriger le déplacement en z (piézo, échantillon) et suivre la morphologie de la surface.
- **Image de friction** : elle intègre la force appliquée par la pointe, l'adhésion de la surface, la forme de la pointe utilisée et la force de friction. Le contraste sur l'image est alors lié à l'hétérogénéité des propriétés de frottement de la surface de l'échantillon.

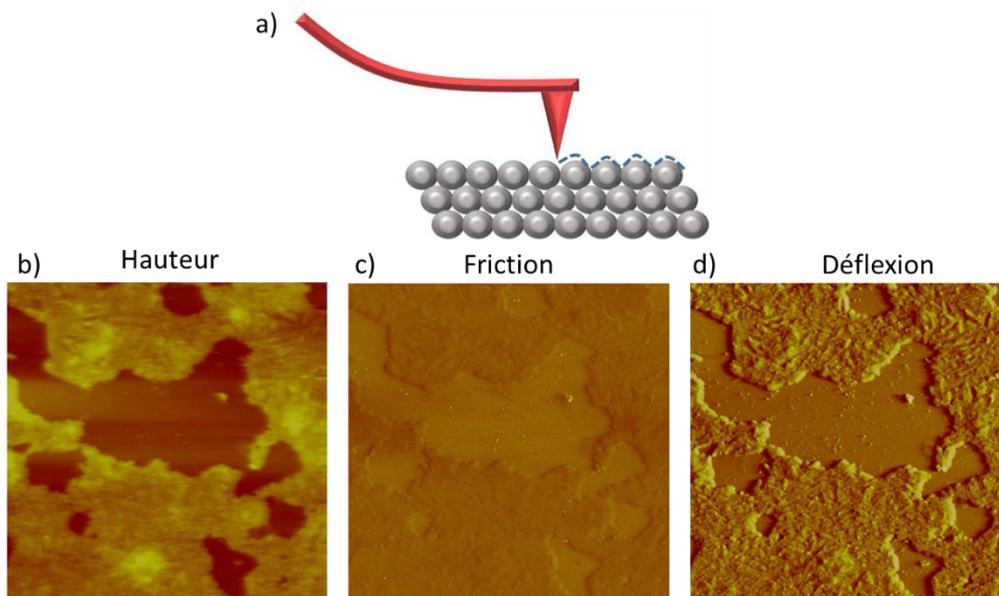


Figure II-13 : (a) En mode contact, la pointe suit directement la topographie de la surface, (b, c, d) Dépôt bactérien de *Pseudomonas fluorescens* $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ (b) image de hauteur (750 nm) (c) image de friction (d) image de déflexion.

4.1.4.2 Le mode contact intermittent

Le mode de contact intermittent, appelé aussi mode « *tapping* », est un autre mode utilisé en imagerie AFM.

Dans ce mode la pointe oscille au voisinage de sa fréquence de résonance venant ainsi périodiquement en contact avec l'échantillon. L'amplitude d'oscillation varie suivant l'interaction pointe-surface. L'asservissement consiste alors à maintenir une amplitude d'oscillation constante. Ce mode oscille entre le domaine répulsif et attractif (figure III-14), et présente l'avantage de limiter le temps de contact entre la pointe et la surface et donc minimiser les forces de cisaillement limitant ainsi l'usure de la pointe et surtout celle de l'échantillon. Ce mode est usuellement destiné à l'imagerie de matériaux souples (polymères, systèmes biologiques).

Lors d'une image AFM en mode « *tapping* » il est possible d'extraire trois informations :

- **L'image de hauteur (topographie) :** l'amplitude d'oscillation est maintenue constante et le système pizelectrique se déplace selon z . Sur l'image enregistrée, plus l'objet est élevée plus le contraste correspondant est claire. Cette image est le plus souvent représentative de la cartographie de la surface de l'échantillon.
- **L'image de phase :** la phase dépend de l'interaction entre la pointe et la surface. En fonction des propriétés de la surface (adhésives, rigidité, viscoélasticité, charges, frottement) l'interaction entre la pointe et la surface peut provoquer un décalage de l'oscillation (en d'autres termes, un déphasage), qui donne un constante nanomécanique
- **L'image d'amplitude (erreur amplitude) :** elle représente la variation de la racine carrée de l'amplitude d'oscillation avant asservissement. Elle fournit des informations sur les changements de relief et souligne toutes les modifications topographiques de l'échantillon quelles soient de l'ordre du nanomètre ou du micromètre. Cette image est très utile quand les objets sondés sont des tailles importantes et des variations de topographies faibles.

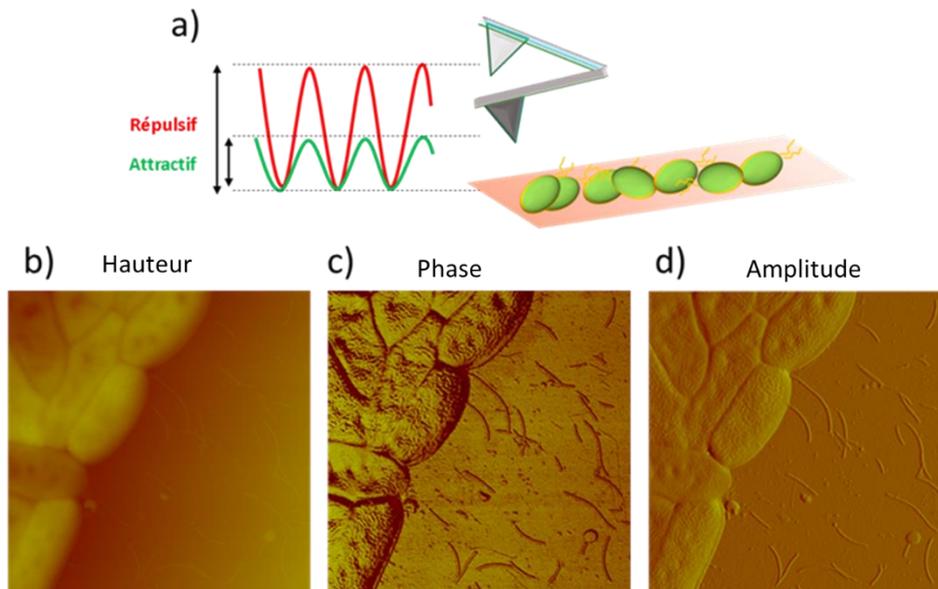


Figure II-14 : (a) Schématisation des régimes attractif et répulsif dominant en AFM. (b, c, d) Dépôt bactérien de *Pseudomonas fluorescens* $5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$ (b) image de hauteur (750 nm) (c) image de phase (d) image topographique (signal d'erreur).

4.1.5 Conditions d'imagerie et préparation des échantillons

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé le Bioscope II doté d'un scanner G dont les déplacements maximaux en x, y et z sont de $150\ \mu\text{m}$ et $18\ \mu\text{m}$. Il est équipé d'une caméra permettant son couplage avec la microscopie optique (figure II-15).

Différentes pointes (Bruker) ont été utilisées :

- * Les pointes *tapping* possèdent une raideur de $42\ \text{N/m}$ et une fréquence de résonance de $190\ \text{kHz}$;
- * Les pointes contact peuvent être montées sur 4 leviers triangulaires dont les raideurs varient entre 0.06 et $0.35\ \text{N/m}$.

Le mode intermittent « *tapping* » a été appliqué en régime répulsif dominant, pour de grandes amplitudes de travail et cela pour l'ensemble des images prises durant nos expérimentations, sauf mention contraire.

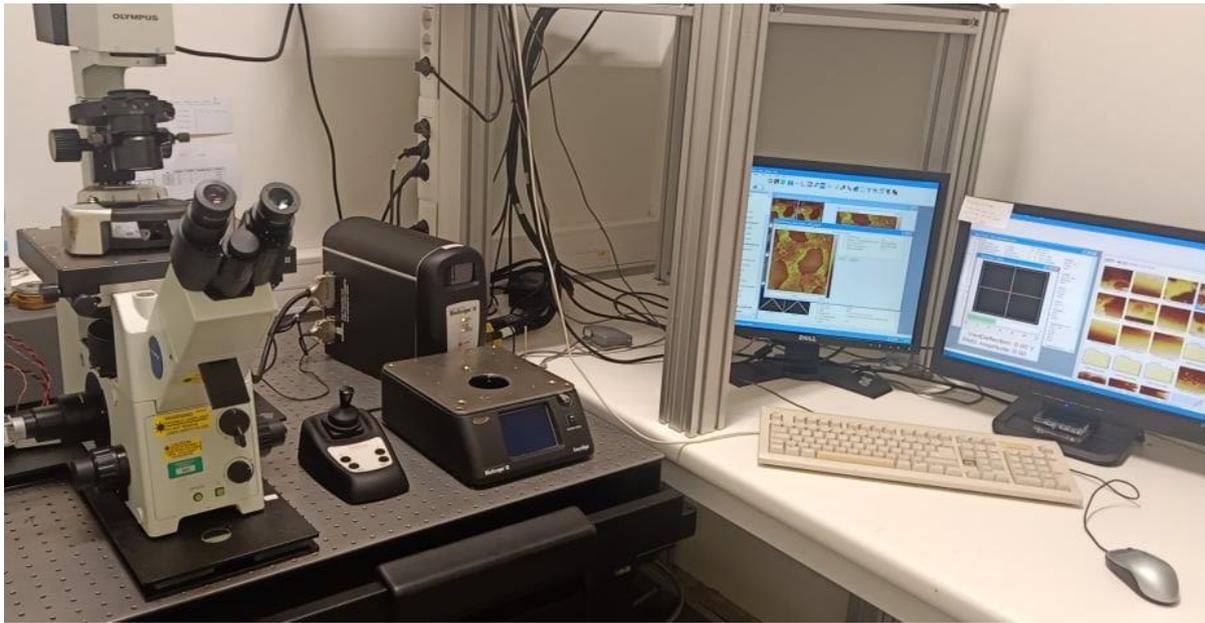


Figure II-15 : Microscope à force atomique (AFM), Bioscope II.

4.2 Microscopie Optique

L'instrument utilisé est le microscope vertical à platine fixe BX51WI d'Olympus, équipé d'une lampe à vapeurs de mercure de 100 W (U-LH100HG), d'un illuminateur BX-RFA et d'un objectif LMPF1 $\times 20$ (donnant des images de $587 \mu\text{m} \times 366 \mu\text{m}$), $\times 50$ (images de $234 \mu\text{m} \times 146 \mu\text{m}$) et $\times 100$ (images de $117 \mu\text{m} \times 73 \mu\text{m}$).

La microscopie optique est la première technique utilisée pour évaluer la qualité des dépôts bactériens. Cela donne une information sur la présence ou pas des bactéries sur le substrat étudié, et permet d'obtenir une vue générale sur l'état, la densité, l'homogénéité et l'organisation du dépôt. Cette caractérisation est simple et rapide mais ne peut fournir que des informations limitées.

4.3 Microscopie Electronique à Balayage

Dans un Microscope Électronique à Balayage (MEB), un faisceau électronique balaye la surface d'un échantillon. L'interaction électron-matière génère alors plusieurs types d'émissions, comme le montre le schéma simplifié (figure II-16). Les électrons secondaires permettent d'imager la surface de l'échantillon en produisant un contraste topographique et les électrons rétrodiffusés donnent une image avec un contraste chimique sur une surface plane. Les photons X rendent possible l'analyse chimique en Spectroscopie à Dispersion d'Énergie (EDS)

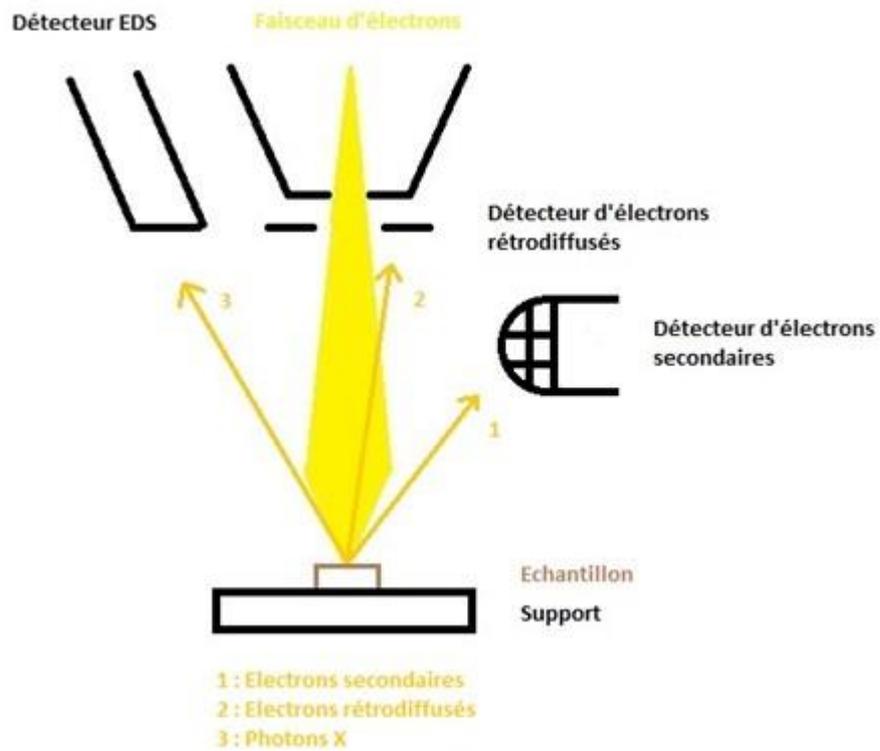


Figure II- 16 : Schéma de fonctionnement d'un microscope électronique à balayage (MEB) associé à détecteur EDS (spectroscopie à dispersion d'énergie).

Nos résultats ont été obtenus à l'aide du microscope électronique à balayage *MEB-EDX Hitachi S2500* (figure II-17).



Figure II-17 : Microscope électronique à balayage (MEB), MEB/EDX - Hitachi S2500

La tension d'accélération que nous avons utilisée pour la prise des images est comprise entre 2 et 10 kV. La distance de travail et les grossissements choisis sont quant à eux dépendants des échelles observées et sont reportées sur les figures correspondantes. La majorité des observations microscopiques présentées sont réalisées avec des électrons secondaires. Les électrons rétrodiffusés ont seulement été utilisés lors des analyses topographiques.

L'analyse dispersive en énergie EDX (Energy Dispersive X-ray spectrometry) nous a permis d'obtenir une analyse aussi bien qualitative que quantitative des éléments chimiques présent sur la surface de nos échantillons.

Nous avons utilisé cette technique dans le cadre de l'étude portant sur l'interaction de *P. fluorescens* avec le cadmium.

5. Références

- Binnig, G., Quate, C.F., Gerber, C., 1986. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.56.930>
- Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., Weibel, E., 1982. Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 49, 57–61. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.49.57>
- CASFM, E., 2019. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. Société Française de Microbiologie. URL <https://www.sfm-microbiologie.org/2019/01/07/casfm-eucast-2019/> (accessed 2.5.19).
- Chang, K.-C., Chiang, Y.-W., Yang, C.-H., Liou, J.-W., 2012. Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal* 24, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.tcmj.2012.08.002>
- Chao, Y., Zhang, T., 2011. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Appl Microbiol Biotechnol* 92, 381–392. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3551-5>
- Chin-A-Woeng, T.F.C., de Priester, W., van der Bij, A.J., Lugtenberg, B.J.J., 1997. Description of the Colonization of a Gnotobiotic Tomato Rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* Biocontrol Strain WCS365, Using Scanning Electron Microscopy. *MPMI* 10, 79–86. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.1.79>
- Daban, J.-R., 2011. Electron microscopy and atomic force microscopy studies of chromatin and metaphase chromosome structure. *Micron* 42, 733–750. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.05.002>
- Dey, P., 2018. Fixation of Histology Samples: Principles, Methods and Types of Fixatives, in: Dey, P. (Ed.), *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer Singapore, Singapore, pp. 3–17. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8252-8_1
- Engel, A., Lyubchenko, Y., Müller, D., 1999. Atomic force microscopy: a powerful tool to observe biomolecules at work. *Trends in Cell Biology* 9, 77–80. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01415-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01415-9)
- Ferron, A., 1983. *bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine*, . Éd. Croun et Roques. ed. France.
- Heus, H.A., Puchner, E.M., van Vugt-Jonker, A.J., Zimmermann, J.L., Gaub, H.E., 2011. Atomic force microscope-based single-molecule force spectroscopy of RNA unfolding. *Analytical Biochemistry* 414, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.03.012>
- Holt, R.D., Lawton, J.H., 1994. The Ecological Consequences of Shared Natural Enemies. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25, 495–520. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.25.110194.002431>
- Hoshi, O., Ushiki, T., 2011. Atomic Force Microscopy Imaging of Human Metaphase Chromosomes in Liquid, in: Braga, P.C., Ricci, D. (Eds.), *Atomic Force Microscopy in Biomedical Research: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 109–115. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-105-5_8
- Kuznetsov, Y.G., Low, A., Fan, H., McPherson, A., 2004. Atomic force microscopy investigation of wild-type Moloney *Murine leukemia* virus particles and virus particles lacking the envelope protein. *Virology* 323, 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.02.023>
- Kuznetsov, Y.G., Ulbrich, P., Haubova, S., Ruml, T., McPherson, A., 2007. Atomic force microscopy investigation of Mason–Pfizer monkey virus and human immunodeficiency virus type 1 reassembled particles. *Virology* 360, 434–446. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.10.015>
- Kuznetsov, Y.G., Victoria, J.G., Robinson, W.E., McPherson, A., 2003. Atomic Force Microscopy Investigation of Human Immunodeficiency Virus (HIV) and HIV-Infected Lymphocytes.

- Journal of Virology 77, 11896–11909. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.22.11896-11909.2003>
- Kuznetsov, Y.G., Xiao, C., Sun, S., Raoult, D., Rossmann, M., McPherson, A., 2010. Atomic force microscopy investigation of the giant mimivirus. *Virology* 404, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.007>
- Kuznetsov, Y.G., Zhang, M., Menees, T.M., McPherson, A., Sandmeyer, S., 2005. Investigation by Atomic Force Microscopy of the Structure of Ty3 Retrotransposon Particles. *Journal of Virology* 79, 8032–8045. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.13.8032-8045.2005>
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A., Klein, W.L., 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6448–6453.
- Liou, J.-W., Gu, M.-H., Chen, Y.-K., Chen, W.-Y., Chen, Y.-C., Tseng, Y.-H., Hung, Y.-J., Chang, H.-H., 2011. Visible Light Responsive Photocatalyst Induces Progressive and Apical-Terminus Preferential Damages on *Escherichia coli* Surfaces. *PLOS ONE* 6, e19982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019982>
- Malkin, A.J., Kuznetsov, Y.G., Lucas, R.W., McPherson, A., 1999. Surface processes in the crystallization of turnip yellow mosaic virus visualized by atomic force microscopy 127, 35–43. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4128>
- Malkin, A.J., McPherson, A., Gershon, P.D., 2003. Structure of Intracellular Mature Vaccinia Virus Visualized by In Situ Atomic Force Microscopy. *Journal of Virology* 77, 6332–6340. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.11.6332-6340.2003>
- Malkin, A.J., Plomp, M., McPherson, A., 2002. Application of atomic force microscopy to studies of surface processes in virus crystallization and structural biology. *Acta Crystallographica Section D* 58, 1617–1621. <https://doi.org/10.1107/S090744490201274X>
- Mastrangelo, I.A., Ahmed, M., Sato, T., Liu, W., Wang, C., Hough, P., Smith, S.O., 2006. High-resolution atomic force microscopy of soluble Abeta42 oligomers. *J. Mol. Biol.* 358, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.042>
- Mathelié-Guinlet, M., Béven, L., Moroté, F., Moynet, D., Grauby-Heywang, C., Gammoudi, I., Delville, M.-H., Cohen-Bouhacina, T., 2017. Probing the threshold of membrane damage and cytotoxicity effects induced by silica nanoparticles in *Escherichia coli* bacteria. *Advances in Colloid and Interface Science* 245, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.012>
- McAllister, C., Karymov, M.A., Kawano, Y., Lushnikov, A.Y., Mikheikin, A., Uversky, V.N., Lyubchenko, Y.L., 2005. Protein Interactions and Misfolding Analyzed by AFM Force Spectroscopy. *Journal of Molecular Biology* 354, 1028–1042. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.10.012>
- Minor, L.L., Véron, M., 1989. *Bactériologie médicale*. Sciences Flammarion.
- Muller, D.J., Fotiadis, D., Engel, A., 1998. Mapping flexible protein domains at subnanometer resolution with the atomic force microscope. *Febs Letters* 430, 105–111.
- Oesterhelt, F., Oesterhelt, D., Pfeiffer, M., Engel, A., Gaub, H.E., Müller, D.J., 2000. Unfolding Pathways of Individual Bacteriorhodopsins. *Science* 288, 143–146. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.143>
- Oh, Y.J., Jo, W., Yang, Y., Park, S., 2007. Influence of culture conditions on *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* 107, 869–874. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2007.01.021>
- Palleroni, N.J., 2010. The *Pseudomonas* story. *Environ. Microbiol.* 12, 1377–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x>
- Read, N., Connell, S., Adams, D.G., 2007. Nanoscale Visualization of a Fibrillar Array in the Cell Wall

- of Filamentous Cyanobacteria and Its Implications for Gliding Motility. *Journal of Bacteriology* 189, 7361–7366. <https://doi.org/10.1128/JB.00706-07>
- Reifenberger Ronald, G., 2015. *Fundamentals Of Atomic Force Microscopy - Part I: Foundations*. World Scientific.
- Ribeiro, M.M.B., Franquelim, H.G., Torcato, I.M., Ramu, V.G., Heras, M., Bardaji, E.R., Castanho, M.A.R.B., 2012. Antimicrobial properties of analgesic kyotorphin peptides unraveled through atomic force microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 420, 676–679. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.065>
- Rippe, K., Guthold, M., von Hippel, P.H., Bustamante, C., 1997. Transcriptional activation via DNA-looping: visualization of intermediates in the activation pathway of *E. coli* RNA polymerase- σ ⁵⁴ holoenzyme by scanning force microscopy¹ Edited by K. Yamamoto. *Journal of Molecular Biology* 270, 125–138. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1079>
- Rossetto, G., Bergese, P., Colombi, P., Depero, L.E., Giuliani, A., Nicoletto, S.F., Pirri, G., 2007. Atomic force microscopy evaluation of the effects of a novel antimicrobial multimeric peptide on *Pseudomonas aeruginosa*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 3, 198–207. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2007.06.002>
- Sol, R.D., Armstrong, I., Wright, C., Dyson, P., 2007. Characterization of Changes to the Cell Surface during the Life Cycle of *Streptomyces coelicolor*: Atomic Force Microscopy of Living Cells. *Journal of Bacteriology* 189, 2219–2225. <https://doi.org/10.1128/JB.01470-06>
- Ushiki, T., Shigeno, M., Hoshi, O., 2008. Techniques for imaging human metaphase chromosomes in liquid conditions by atomic force microscopy. *Nanotechnology* 19, 384022. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/38/384022>
- Xiao, C., Kuznetsov, Y.G., Sun, S., Hafenstein, S.L., Kostyuchenko, V.A., Chipman, P.R., Suzan-Monti, M., Raoult, D., McPherson, A., Rossmann, M.G., 2009. Structural Studies of the Giant Mimivirus. *PLOS Biology* 7, e1000092. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000092>
- Yang, L., Wang, K., Tan, W., He, X., Jin, R., Li, J., Li, H., 2006. Atomic Force Microscopy Study of Different Effects of Natural and Semisynthetic β -Lactam on the Cell Envelope of *Escherichia coli*. *Anal. Chem.* 78, 7341–7345. <https://doi.org/10.1021/ac0604890>
- Zhang, Y., Shao, Z., Somlyo, A.P., Somlyo, A.V., 1997. Cryo-atomic force microscopy of smooth muscle myosin. *Biophysical Journal* 72, 1308–1318. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78777-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78777-0)

Chapitre III – Optimisation des conditions de culture et caractérisations morphologiques

Le troisième chapitre de notre étude porte sur la mise en évidence des conditions optimales de croissance et de dépôts des bactéries sur les supports plans (solvant, concentration, milieu, température et durée d'incubation) de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* grâce à la caractérisation cellulaire et morphologique par microscopie optique (MO) et microscopie à force atomique (AFM).

Dans le cadre de l'optimisation de notre protocole, nous avons effectué les cultures de *Pseudomonas fluorescens* dans trois milieux distincts LB, MH et MH ajusté en cations (MH+) pendant des périodes d'incubation allant de 12h à 24h, à deux températures d'incubation différentes (28 et 37°C). Nous avons également étudié l'impact de deux solvants et de différentes concentrations des suspensions bactériennes sur la qualité des dépôts.

Plan du chapitre III

Chapitre III – Optimisation des conditions de culture et caractérisations morphologiques ...	174
1. Introduction.....	176
2. Optimisation des conditions de culture de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	177
2.1 Effet du solvant sur le dépôt bactérien	177
2.2. Concentration optimale du dépôt bactérien pour une étude par microscopie	179
2.3 Influence de la température d’incubation de la croissance de <i>P. fluorescens</i> en milieu LB.....	182
2.4 Influence de la durée d’incubation sur la croissance de <i>P. fluorescens</i> en milieu LB .	186
2.5 Influence du milieu de culture sur la croissance de <i>P. fluorescens</i>	190
3. Caractérisations morphologiques de cellules <i>Pseudomonas fluorescens</i> saines	193
3.1. Morphologie et comportement des bactéries	193
3.2 Modification de la morphologie bactérienne, invaginations	197
3.3. Structuration membranaire	198
4. Conclusion	203
5. Références.....	204

1. Introduction

De nos jours, l'optimisation des expériences biologiques, notamment l'optimisation des différentes conditions de culture et de croissance des bactéries *in vitro*, joue un grand rôle dans la transmission des résultats de recherche. La raison en est que l'optimisation rend les expériences efficaces en termes de temps, de ressources et de coûts. Il existe un fort mythe dans la communauté scientifique selon lequel l'optimisation peut être réalisée en utilisant simplement l'expérience et l'intuition de l'expérimentateur.

Pour une croissance optimale de la souche bactérienne *Pseudomonas fluorescens* utilisée dans notre travail de thèse, il est nécessaire d'optimiser plusieurs paramètres importants concernant soit la mise en culture, soit la préparation des échantillons (par exemple la composition du milieu de culture, la température d'incubation et le temps de récolte de la culture, la concentration cellulaire de dépôts bactérien ...). Or la littérature sur le sujet est contradictoire sur les conditions de culture (Raja et al., 2006; Raja and Selvam, 2009; Suarez et al., 2013; Allen et al., 2018) alors qu'elles ont un très grand impact sur la croissance bactérienne et qu'il est absolument nécessaire dans notre étude de disposer de bactéries en bonne santé et de conditions reproductibles, avant d'étudier l'impact du cadmium sur elles.

A notre connaissance, aucune étude comparative portant sur les conditions optimales de culture et de croissance de *P. fluorescens* n'a été effectuée par des méthodes d'imagerie microscopiques à haute résolution. Par conséquent, nous nous sommes fixés comme objectif de définir un protocole de culture optimal de *P. fluorescens* en suivant l'évolution de ses caractéristiques morphologiques par AFM.

2. Optimisation des conditions de culture de *Pseudomonas fluorescens*

Nous nous proposons, dans le cadre de ce travail, de commencer tout d'abord par optimiser le protocole de culture de l'espèce bactérienne *Pseudomonas fluorescens*.

Nous avons alors testé pour la culture bactérienne trois paramètres importants : l'effet de la température et la durée d'incubation ainsi que le milieu de culture. Nous avons également évalué l'effet du solvant et des différentes concentrations des suspensions bactériennes sur la qualité des dépôts. Cette optimisation est une étape préalable et nécessaire dans notre étude car elle permet l'obtention d'une population bactérienne avec un grand nombre de cellules saines dont on pourra analyser l'organisation ainsi que la morphologie correspondante.

2.1 Effet du solvant sur le dépôt bactérien

La majorité des espèces bactériennes ont besoin d'un milieu nutritif dans lequel elles se développent correctement, tel que le milieu *Lysogeny broth* (LB) pour *E. coli*. Il doit donc satisfaire leurs exigences nutritives et couvrir leurs besoins en ions, minéraux, facteurs de croissance etc., et leurs apporter une source de carbone et d'énergie. Or ces milieux ne sont pas appropriés pour la réalisation des dépôts avant imagerie.

D'une autre part, il existe des milieux tampons simplifiés, comme le *Phosphate Buffer Saline solution* (PBS), un tampon suffisant à la préservation des souches bactériennes pendant le temps nécessaire aux mesures (Liao and Shollenberger, 2003), ils sont donc couramment utilisés dans les études, notamment de viabilité cellulaire (Sinton et al, 1994).

Nous avons donc comparé dans un premier temps l'effet de la solubilisation des bactéries dans de l'eau ou du PBS sur la qualité des images AFM des dépôts. Pour cela 5 µl de solutions bactériennes dans les deux solvants ont été déposés sur une surface de mica fraîchement clivée¹.

La figure III.1 présente des images typiques des dépôts obtenus avec les deux solvants testés, le PBS et l'eau. On peut tout d'abord remarquer que, pour un même échantillon et quel que soit

¹ La préparation des échantillons de *Pseudomonas fluorescens* a été réalisée selon un protocole déjà adapté par notre équipe de recherche (Biophyna) : un simple repiquage des bactéries dans du milieu LB gélosé, en utilisant la technique classique d'ensemencement, suivi d'une mise en culture à l'étuve à 37°C (temps optimal pour la culture d'*E. coli*) et à 28°C (température idéale pour la culture des *Pseudomonas*) [7] durant 15 h de temps. La préparation de la suspension bactérienne a été effectuée dans du PBS (PBS 1x : 137mM de NaCl, 10mM de Na₂HPO₄, 2,7 mM de KCl et 1,76 mM de KH₂PO₄), les cellules bactériennes ont été récoltées dans la phase de croissance à une concentration équivalente à une DO de 0,3 (600nm), puis déposées sur une surface de mica nu et observées à l'air, en mode (*tapping*).

le solvant utilisé, on observe aussi bien de larges zones complètement recouvertes par le dépôt (Fig. III.1 C-D) que d'autres qui ne le sont que partiellement (Fig. III.1 A-B) et (Fig. III.1 E-F). Dans le cas du PBS, et bien qu'on puisse observer certaines bactéries notamment celles isolées (Fig. III.1 A-B), le dépôt bactérien semble être recouvert par une couche cristallisée, probablement le PBS insuffisamment rincé qui a séché. Nous avons donc procédé à plusieurs rinçages énergiques² pour essayer de dissoudre le PBS et cela semble plutôt concluant comme illustré sur la figure III.1 C. La couche cristallisée s'est dissoute mais pas complètement car la surface du dépôt est rugueuse, les formes sont anguleuses contrairement à ce qui est attendu en termes de morphologie pour des bactéries, suggérant la présence de cristaux résiduels (Fig. III.1 C-D). L'image de phase (Fig. III. 2-B) confirme ces observations puisqu'elle met en évidence une hétérogénéité aussi bien à la surface du substrat que de la cellule. En effet, on observe des agrégats nanométriques qui semblent être plus durs que le reste (Fig. III 2-D) et qui pourraient être attribués à des cristaux.

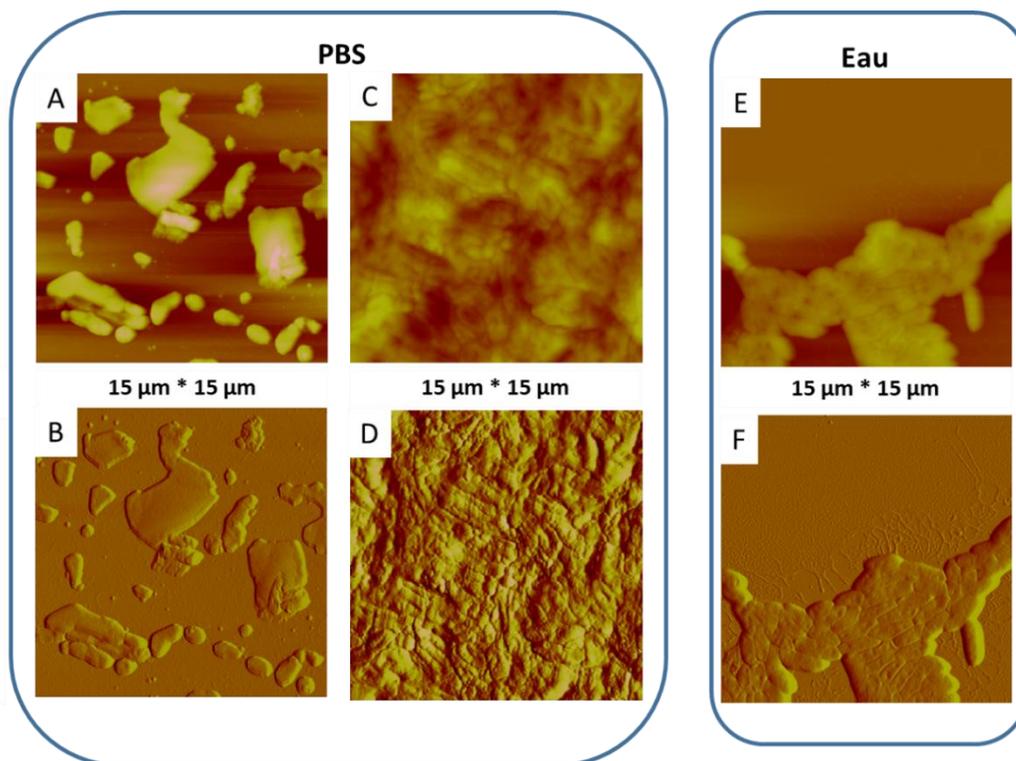


Figure III-1 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* réalisés sur un substrat de mica nu par la méthode d'un dépôt simple à partir d'une solution bactérienne (dans le PBS ou l'eau) de concentration correspondant à une DO de 0,3. Images AFM obtenues en mode tapping à l'air : images de hauteur 2D (A, C, E) et d'amplitude (B, D, F). L'échelle de hauteur maximale des images topographiques est de 750 nm.

² Les rinçages énergiques se font à l'aide d'une poire, avec la force du jet de l'eau. La procédure est répétée à plusieurs reprises pour s'assurer de l'élimination des cristaux sur la surface de l'échantillon.

Avec l'eau comme solvant, les bactéries sont bien apparentes. Elles ont des formes régulières et une structuration membranaire typique des bactéries « Gram-négatif » (Mathélié-Guinlet, 2017).

Suite à cette étude, notre choix du solvant de dépôt s'est donc dirigé vers l'eau ultra pure « milieu-Q », un milieu pauvre en sels et en ions, compatible avec l'imagerie AFM et qui convient cependant à la survie temporaire de beaucoup de bactéries.

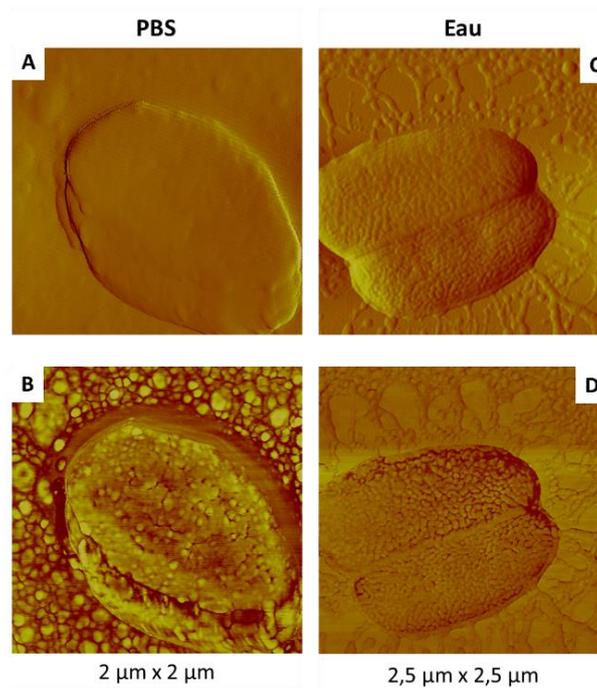


Figure III-2 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* réalisés sur un substrat de mica nu, par la méthode d'un dépôt simple à partir d'une solution bactérienne (dans le PBS ou l'eau) de concentration correspondant à une DO de 0,3. Images AFM obtenues en mode tapping à l'air : images d'amplitude (A, C) et de phase (B, D). L'échelle de hauteur maximale des images topographiques est de 750 nm.

2.2. Concentration optimale du dépôt bactérien pour une étude par microscopie

Déterminer la concentration optimale d'un dépôt bactérien en termes de densité optique de la suspension initiale est une étape importante pour la suite de notre étude. En effet, notre objectif est de pouvoir réaliser des dépôts bactériens sur des substrats solides et d'avoir des bactéries *P. fluorescens* organisées dans un même échantillon sous la forme de colonies et de petits agrégats et de cellules individuelles dont on pourra déduire les caractéristiques morphologiques plus facilement. Plusieurs suspensions bactériennes de DO allant de 0,1 à 1 ont été testées, sachant qu'une DO = 1 à $\lambda = 600$ nm équivaut à la concentration de $1,2 \cdot 10^9$ CFU/mL (Ben-David and Davidson, 2014; Goldman and Green, 2015). Les solutions bactériennes correspondantes (planctoniques) sont déposées sur des substrats de verre non traités et de mica nu. Après les

avoir séchés, les dépôts obtenus sont caractérisés par microscopie optique (MO) et microscopie à force atomique (AFM).

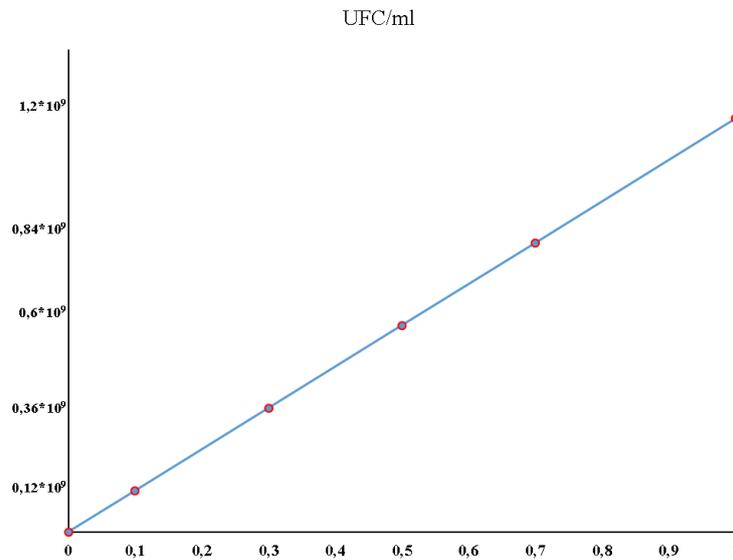


Figure III-3 : Corrélation entre nombre d'Unités Formant des Colonies (UFC) par mL et densité optique à 600 nm pour *P. fluorescens* ($1DO = 1,2 \times 10^9$ UFC/ml).

La figure III.3 montre que le taux de survie (et donc le nombre de UFC) de *P. fluorescens* dans de l'eau ultrapure est dose-dépendant entre le nombre de UFC et la couverture de la surface du substrat par les bactéries. Ce taux est rapporté au milieu le plus favorable.

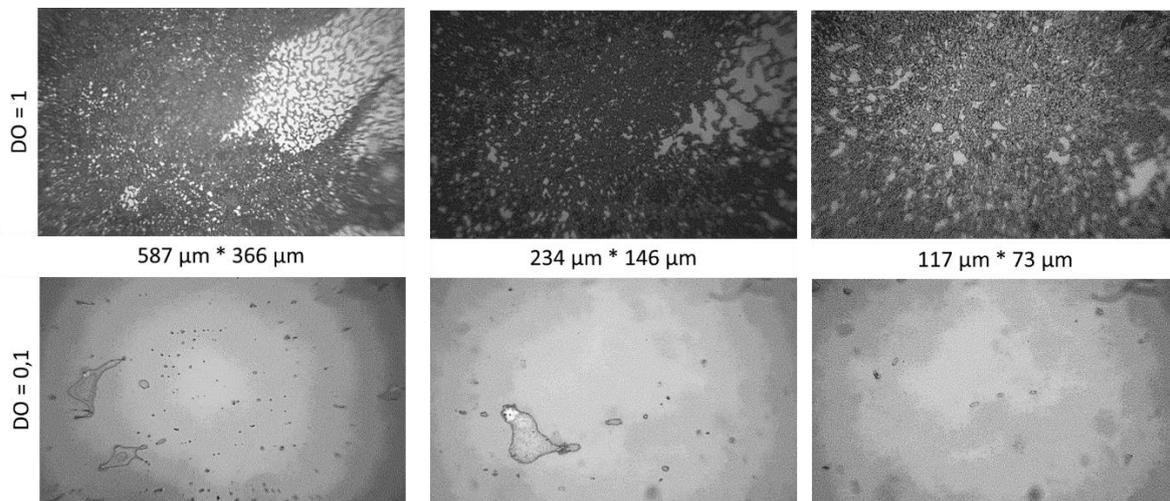


Figure III-4 : Distribution des bactéries *P. fluorescens* réalisée par dépôt simple sur des lames de verre non traitées et observées par microscopie optique montrant une vue d'ensemble de l'état générale et la couverture du substrat par les bactéries *P. fluorescens* à différentes échelles ($587\mu\text{m} \times 366\mu\text{m}$, $234\mu\text{m} \times 146\mu\text{m}$, $117\mu\text{m} \times 73\mu\text{m}$).

Les résultats les plus représentatifs obtenus pour trois DO différentes (0,3 ; 0,5 et 1) sont regroupés dans la figure III-5.

Pour la concentration la plus élevée (DO = 1) (Figure III-5A-B), on observe la présence d'une population bactérienne sous forme de colonies denses couvrant une grande partie de la surface du substrat avec la présence, parfois, de multicouches (voir flèche blanche, Fig.III-5B). Dans le cas de la concentration intermédiaire (DO = 0,5 ; Fig. III-5C-D), la distribution des bactéries sur la surface est relativement hétérogène. En effet, on observe la coexistence de zones très peuplées et d'autres qui le sont beaucoup moins, et on peut même observer des bactéries individuelles. Enfin pour une concentration assez faible (DO = 0,3) (Fig. III-5E-F) les dépôts bactériens sont clairsemés, il existe des agrégats cellulaires de moins de dix cellules ainsi que de nombreuses bactéries isolées.

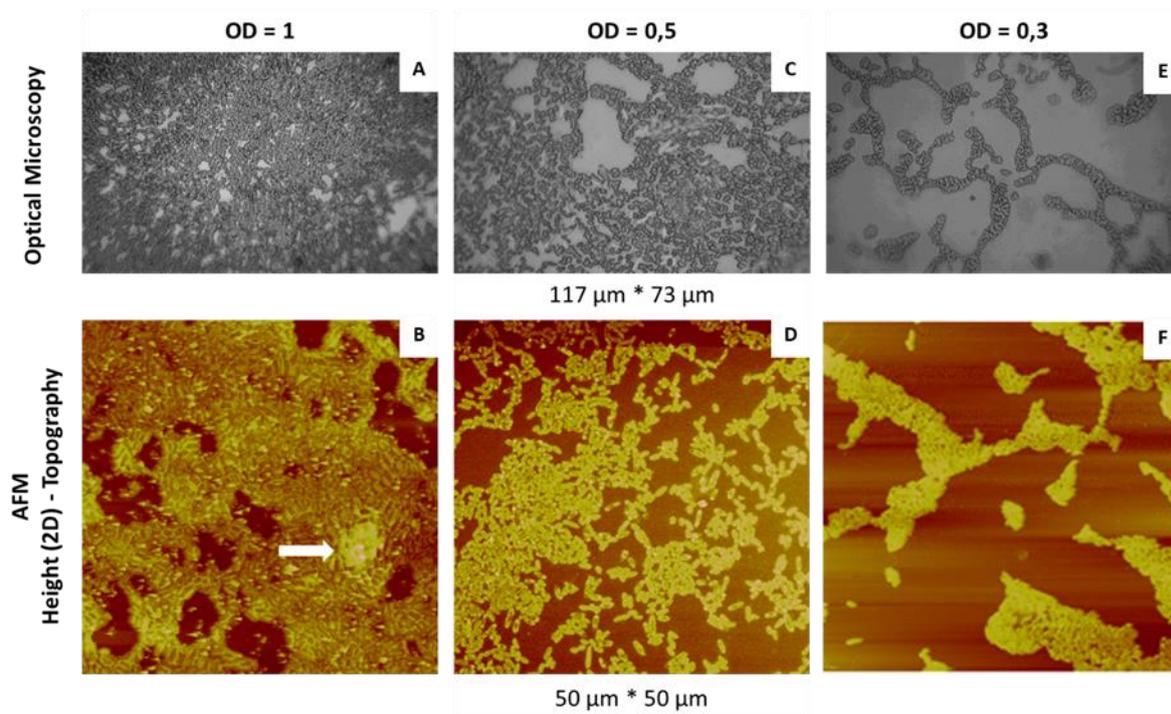


Figure III-5 : Distribution des bactéries *P. fluorescens* dans des échantillons réalisés par dépôt simple sur des lames de verre non traitées et observées par microscopie optique (A, C, E) et par AFM (B, D, F). Les concentrations bactériennes correspondent à des DO de 1 (A, B), 0,5 (C, D) et 0,3 (C, F). Les images de hauteur AFM ont été obtenues en mode tapping. L'échelle de hauteur est de 500 nm (B) et 750 nm (D et F).

La concentration correspondant à une DO = 0,3 est celle que nous retenons pour la suite de l'étude car elle permet d'obtenir des dépôts avec, à la fois, des populations denses (sous forme de monocouches compactes) et d'autres plus dispersées avec quelques cellules isolées qui seront très utiles, en particulier, pour l'étude morphologique.

2.3 Influence de la température d'incubation de la croissance de *P. fluorescens* en milieu LB

L'une des conditions physico-chimiques déterminante sur la croissance des bactéries *in vitro* est la température d'incubation, paramètre sélectif de la croissance des bactéries qui conditionne la prolifération exclusive de certaines espèces dans un biotope donné. La température optimale de croissance dépend donc de la nature de la bactérie considérée (mésophile, thermophile, hyperthermophile, psychrophile ou psychrotrophique). Par exemple, dans le cas d'*Escherichia coli* qui est une bactérie mésophile. Selon Palleroni (2010), *Pseudomonas fluorescens* évolue à une température de croissance optimale comprise entre 25 et 30 °C. Pour la souche objet de notre étude, la température optimale de croissance est 28°C, définie par l'organisme de conservation des souches ATCC.

L'étude réalisée par Gonçalves et al (2017) a montré que l'augmentation ou la diminution du pH avait peu d'effet sur les paramètres de croissance microbienne, par rapport aux effets dûs au changement de température (Gonçalves et al 2017).

Dans une autre étude (Auerbach et al., 2000) relative au suivi par AFM de la croissance de biofilms de *Pseudomonas putida* et de son évolution morphologique, les bactéries ont été cultivées à 27 °C. Les travaux de Raja et Selvam (2009) réalisés sur des souches de *Pseudomonas aeruginosa* (BC2 et BC5), en milieu LB et à différentes températures d'incubation (25, 30, 37 et 40 °C), ont montré que les conditions de croissance optimales sont atteintes à 30 °C y compris dans un environnement toxique (en présence de métaux lourds). Ainsi il est attendu que l'écartement de la température de mise en culture de *P. fluorescens* 13525 par rapport à sa température optimale (28°C) puisse entraîner des changements morphologiques.

Nous avons choisi de tester l'effet de deux températures d'incubation différentes sur l'évolution morphologique de cette bactérie : (i) 37 °C, supérieure à la température optimale de *P. fluorescens* 13525 et (ii) 28 °C, la température optimale de la souche étudiée. Les figures III-6 et III-7 montrent les résultats les plus représentatifs, obtenus par AFM, des dépôts bactériens que nous avons réalisés après incubation aux deux températures sélectionnées.

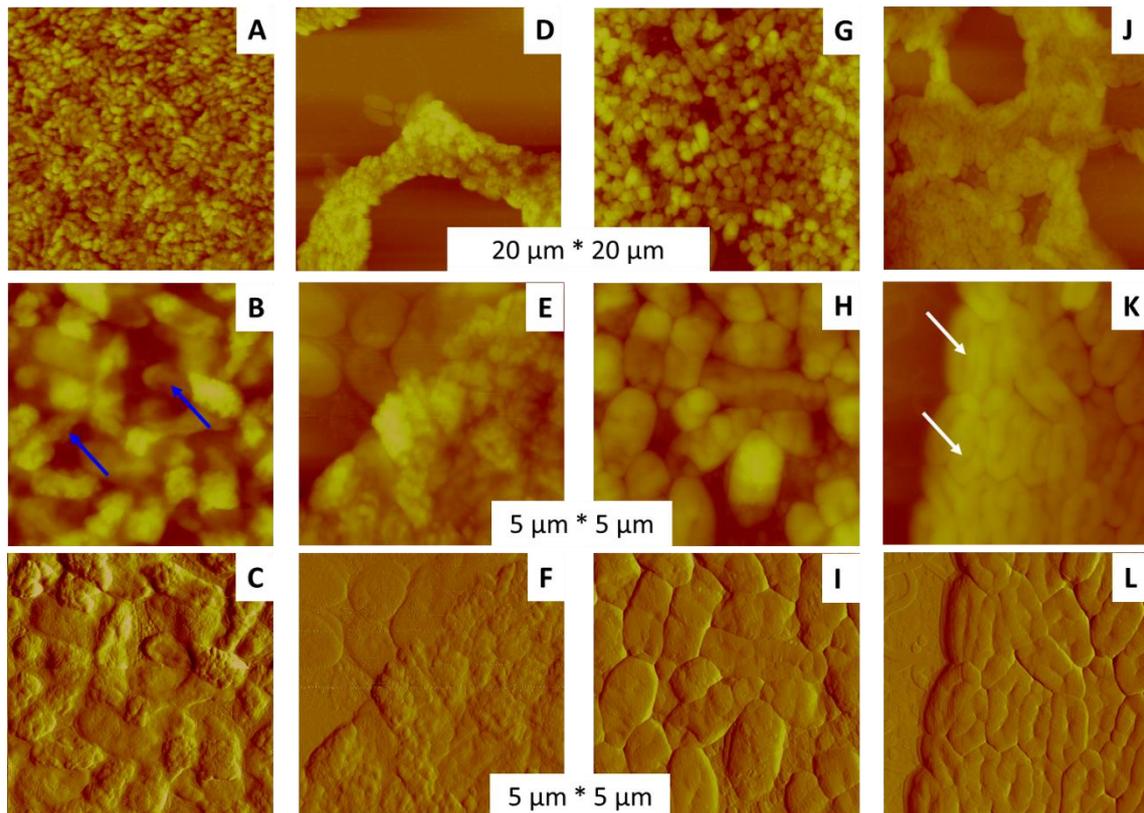


Figure III-6 : Effet de la température d'incubation sur la morphologie de la population bactérienne de *P. fluorescens*, cultivée en milieu LB, incubée pendant 15 heures et à 37 °C. Images AFM obtenues en mode tapping à l'air : images de hauteur 2D (A,D,G,J,B,E,H,K) et d'amplitude (C,F,I,L). L'échelle de hauteur maximale des images topographiques est de 750 nm.

On constate que le taux de couverture du substrat par les bactéries est quasiment le même pour les deux échantillons étudiés (28 et 37 °C). La population bactérienne est rassemblée sous la forme d'agrégats plus ou moins grands et denses (Fig. III-8 A-B et E-F). Certaines zones exemptes de bactéries sont visibles (Fig. III-8 A-B). Une telle organisation est fréquente dans le cadre de simples dépôts et est liée le plus souvent à la manière dont l'échantillon a été préparé, notamment lors du rinçage (énergique ou doux). En effet, selon que le rinçage est vigoureux ou doux, rapide ou lent, il y a un effet (ou pas) sur l'agrégation des bactéries (Gammoudi et al., 2013 ; Mathelié-Guinlet et al., 2016).

Pour les bactéries cultivées à 37 °C, on note une évolution non homogène de la morphologie bactérienne. Certaines n'ont pas la forme allongée habituelle (forme en bâtonnet) mais se présentent plutôt sous la forme de bouées étirées et légèrement dégonflées (Fig III-6 J, K, L) (flèches blanches) et une désagrégation des cellules avec quelques défauts au niveau des bords (Fig III-6 A, B, C, H, I, J) (flèches bleues). Cette forme atypique de la bactérie est associée à une température de croissance un peu plus élevée (37 °C).

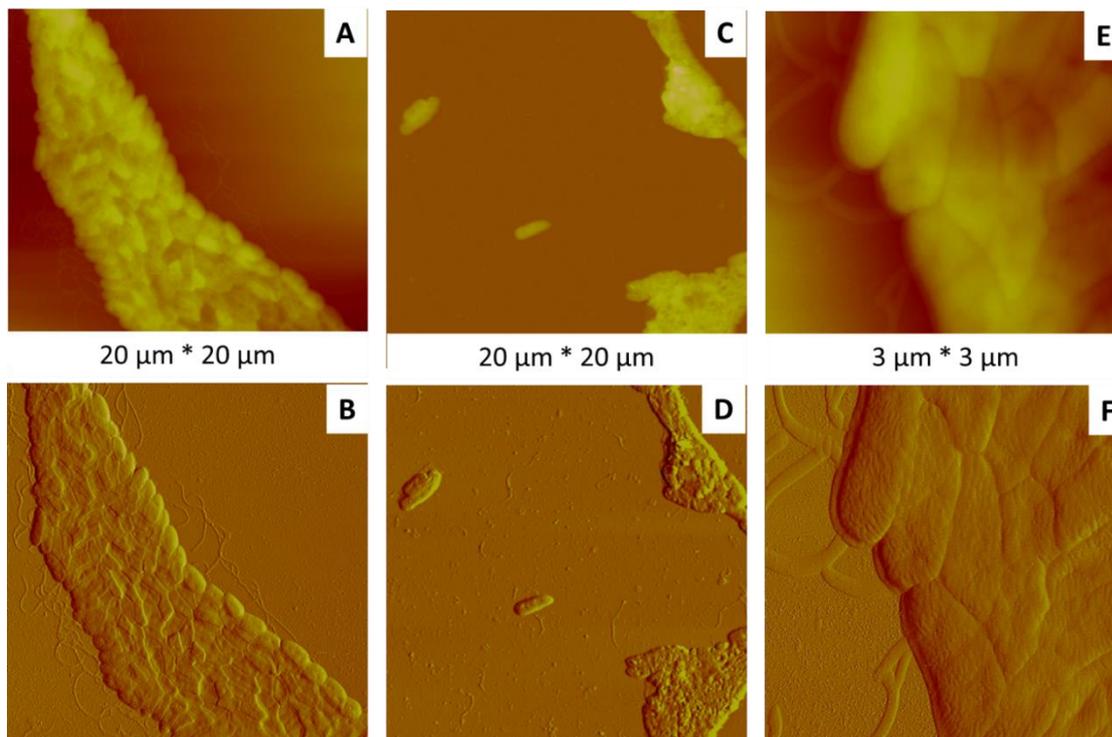


Figure III-7 : Effet de la température d'incubation sur la morphologie de la population bactérienne de *P. fluorescens*, cultivée en milieu LB, incubée pendant 15 heures et à 28 ° C. Images AFM obtenues en mode tapping à l'air : images de hauteur 2D (A, C, E) et d'amplitude (B, D, F). L'échelle de hauteur maximale des images topographiques (A, C, E) est de 750 nm.

Pour les bactéries cultivées à 28 ° C, l'ensemble des cellules possède une structure organisée de la membrane bactérienne externe, qui montre des domaines sous la forme de "ripples" (ondulations), également observés chez *E. coli*.

Dans le cas du dépôt réalisé à 28 ° C, les cellules de *P. fluorescens* présentent la morphologie attendue (Fig. III-8 E-H). Les bactéries entourées de plusieurs cellules voisines sont tellement collées les unes aux autres qu'il ne reste pratiquement plus d'espace vide entre elles, d'où la forme particulière des contours observés (structure « hexagonale »). Quant aux bactéries situées au bord des agrégats, elles ont moins de contraintes et peuvent donc s'organiser plus librement et adopter des formes différentes (Fig. III-8 G-H), ce qui leur donne des contours plus arrondis. On peut aussi observer que la population est assez hétérogène en termes de dimensions, ce qui est peut-être dû à la coexistence de bactéries à différents moments de la croissance (en phase de division plus ou moins active) (Fig. III- 8G-H). De plus, on constate que la taille des bactéries dépend de la température d'incubation : si les longueurs et largeurs respectives des bactéries mesurées (respectivement 1,6 à 2,0 μm et 0,6 à 0,9 μm) sont en moyenne les mêmes pour les deux dépôts, en revanche, la hauteur moyenne de ces bactéries est presque deux fois plus faible dans le cas des bactéries incubées à 37 ° C (60 à 100 nm à 37 ° C et 140 à 180 nm à 28 ° C). Enfin, comme illustré sur les images « zoomées » (Fig. III-9 C-D), la membrane cellulaire des

bactéries incubées à 37 °C est relativement lisse tandis qu'à 28 °C (Fig. III-8 C-D) elle présente une structuration membranaire qui a déjà été observée chez d'autres bactéries à membrane externe (Gram négatives) dont *E. coli* (Mathélié-Guinlet, 2017).

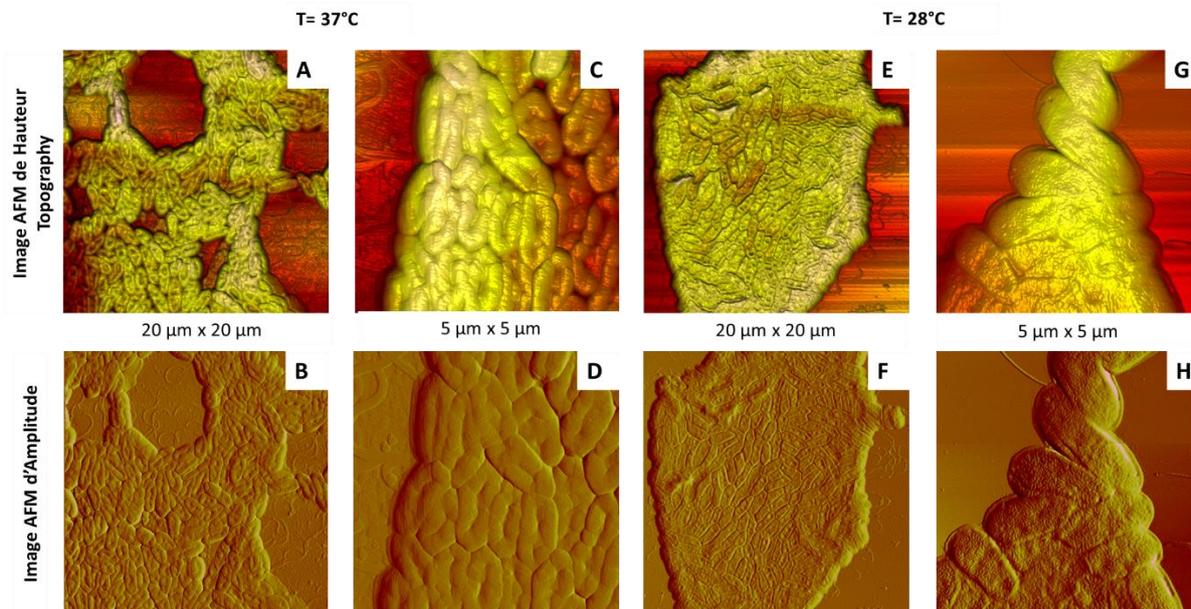


Figure III-8 : Effet de la température d'incubation sur la morphologie de la population bactérienne de *P. fluorescens*, cultivée en milieu LB, incubée pendant 15 heures et à deux températures différentes: 37 °C (A, B, C, D) et 28 °C (E, F, G, H); Images AFM obtenues en mode tapping à l'air : images de hauteur ou topographiques 3D (A, C, E, G) et d'amplitude (B, D, F, H). L'échelle de hauteur maximale des images topographiques (A, C, E et G) est de 750 nm.

Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenus par plusieurs techniques différentes dans le cadre de différents travaux (Meler et al., 2018 ; Haddad et al., 2021 ; Islam et al., 2021) dans lesquels la souche de *P. fluorescens* ATCC 13525 est cultivée selon la cinétique de croissance sur différents supports et à différentes températures (28, 32, 37 et 42 °C). Les résultats correspondants montrent une bonne croissance des bactéries à 28 °C, un faible taux de croissance à 32 °C, un retard de croissance à 37 °C et aucune croissance à 42 °C (une période d'incubation de 15 heures). Nos travaux montrent de plus que l'augmentation de la température lors de la croissance sur milieu gélosé induit des changements morphologiques majeurs.

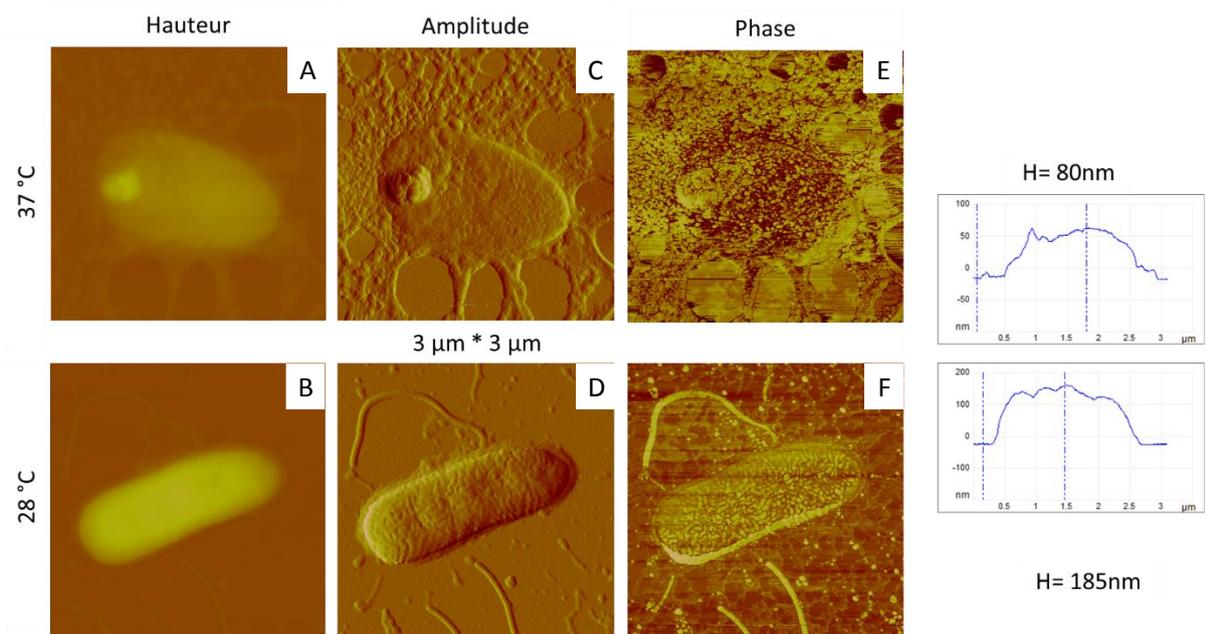


Figure III-9 : Images de deux bactéries isolées de *P. fluorescens* montrant l'effet de la température d'incubation sur leur morphologie, cultivée en milieu LB, incubée pendant 15 heures et à deux températures différentes: 37 ° C (A, C, E) et 28 ° C (B, D, F) ; Images AFM obtenues en mode tapping à l'air: images de hauteur ou topographiques 3D (A, B), d'amplitude (C, D) et de phase (E,F). L'échelle de hauteur maximale des images topographiques est de 750 nm.

2.4 Influence de la durée d'incubation sur la croissance de *P. fluorescens* en milieu LB

La période d'incubation est un paramètre très important pour une population bactérienne homogène donnée qu'elle se développe en milieu liquide ou sur milieu gélosé. En ce qui concerne le genre *Pseudomonas*, plus particulièrement *P. fluorescens*, et selon une étude de Bergey et Holt (1994), cette bactérie peut survivre et se multiplier plusieurs mois en milieu humide (sol / eau) dans la nature (*in vivo*).

Comme dans le cas de la température, la littérature mentionne des durées de croissance parfois variables. En nous basant entre autres sur les travaux de Raja et al. (Raja et al., 2006; Raja et Selvam, 2009) montrant qu'un temps de 12h est le temps de culture optimal et que qu'une durée de 24h est la durée limite maximale, nous avons choisi de tester ces deux périodes d'incubation critiques, 12 h et 24 h, ainsi qu'une durée intermédiaire supplémentaire, à 15 h. Les principaux résultats obtenus sont résumés dans les figures III-10 et III-11.

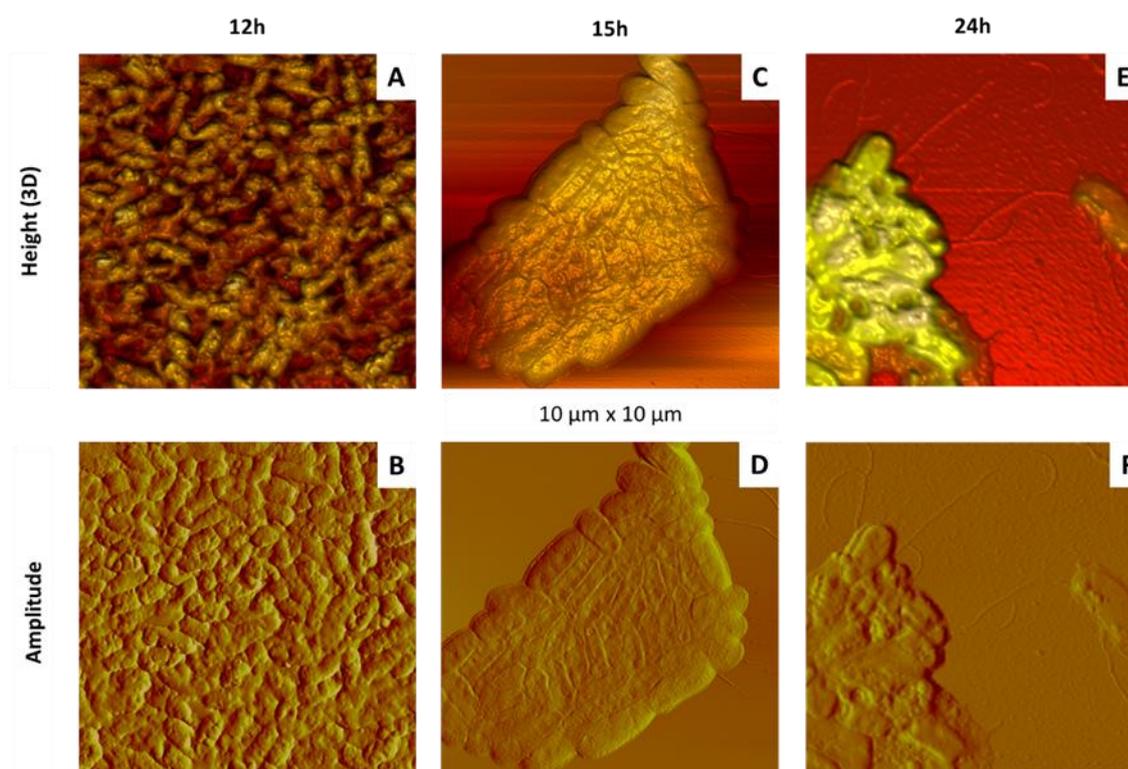


Figure III-10 : Effet de la durée d'incubation sur la morphologie des populations agrégées de *P. fluorescens* réalisées par simple dépôt. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB à une température de 28 °C et à différents temps d'incubation : 12h (A, B) ; 15h (C, D) et 24h (E, F). Images AFM obtenues en mode tapping à l'air : images de hauteur ou topographiques 3D (A, C, E) et d'amplitude (B, D, F). L'échelle de hauteur maximale est de 750 nm (A, C et E).

Dans le cas des échantillons obtenus après la période d'incubation la plus courte, celle de 12 heures, les colonies bactériennes présentes à la surface du substrat sont assez denses et compactes (Fig. III-10 A et B). D'autre part, l'agencement désordonné du dépôt cellulaire de *P. fluorescens* met en évidence l'hétérogénéité du dépôt. En effet, on observe des bactéries de tailles différentes, de formes variées (allongées ou plutôt rondes) avec parfois des contours indéfinissables (Fig. III-10B). De façon générale, et pour l'ensemble des cellules de ce dépôt, les morphologies cellulaires sont relativement irrégulières et les topographies correspondantes sont rugueuses montrant la présence de nodules à la surface de la membrane. Pour ce même échantillon, et comme illustré sur la figure III-12 A-B, on peut trouver des bactéries dont les morphologies paraissent un peu plus homogènes que celles observées dans les zones denses mais dont les formes sont encore atypiques. En effet, la bactérie observée est isolée et bien que sa forme soit en bâtonnet, elle apparaît légèrement « affaissée » et présente des invaginations à sa surface.

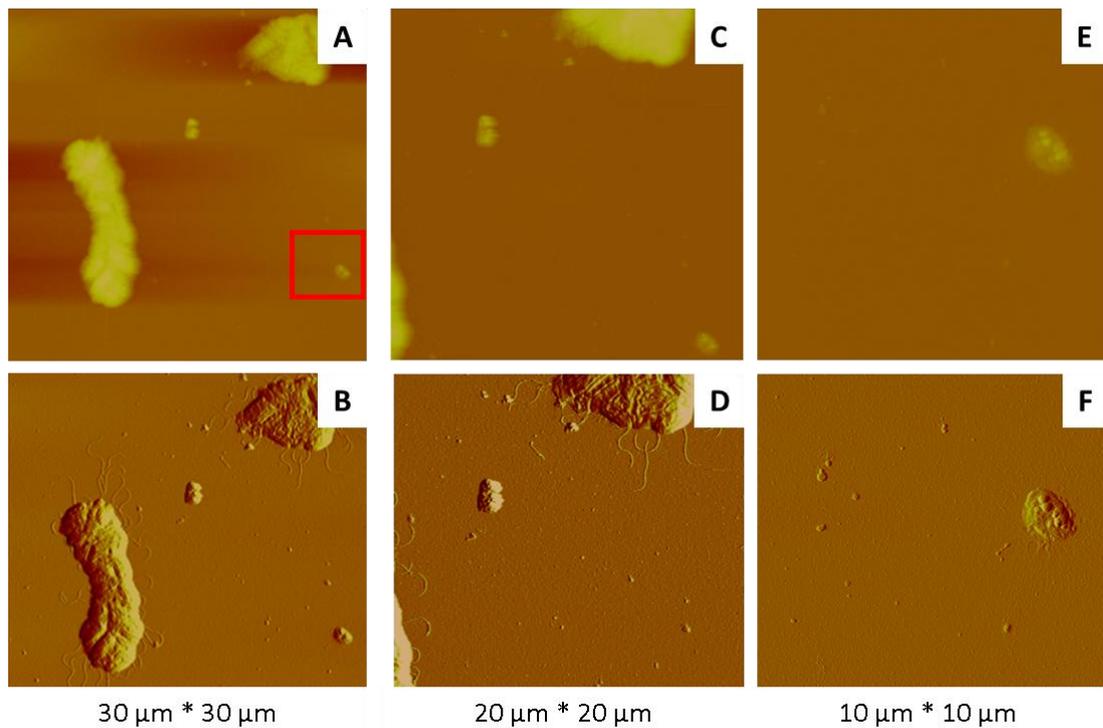


Figure III-11 : Effet de la durée d'incubation sur la population bactérienne agrégée, un zoom out pour montrer la population bactérienne (A,B,C,D) et un zoom in (E,F) pour montrer les bactéries isolées de *P. fluorescens*. Après 24h d'incubation (milieu LB, 28 °C), image prise par AFM en mode tapping. Images de hauteur ou topographiques 2D (A, C, E) et d'amplitude (B, D, F). L'échelle de hauteur maximale est de 750 nm.

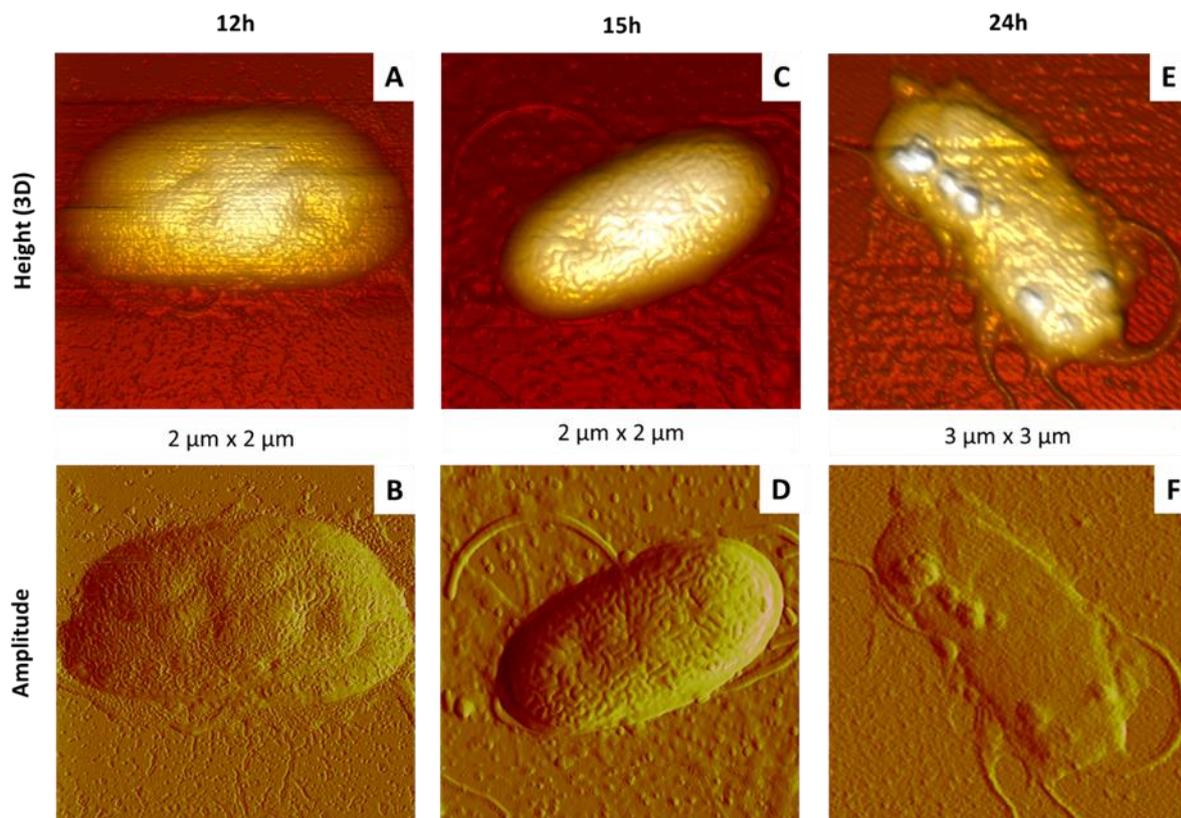


Figure III-12 : Effet de la durée d'incubation sur la morphologie des bactéries isolées de *P. fluorescens* dans le cas d'un dépôt simple. Les bactéries ont été cultivées en milieu LB à une température de 28 ° C et pendant différents temps d'incubation : 12h (A, B); 15h (C, D) et 24h (E, F). Images AFM obtenues en mode tapping à l'air: images de hauteur ou topographiques 3D (A, C, E) et images d'amplitude ou de signal d'erreur (B, D, F). L'échelle de hauteur maximale est de 750 nm.

Dans le cas d'un dépôt bactérien obtenu après une période de culture de 24 heures, des colonies sont observées avec des bactéries qui semblent être dégradées (Fig.III-10 E-F). Elles sont effondrées, semblent creuses et vidées d'une grande partie de leur contenu cellulaire, voire même lysées. Des observations similaires peuvent être effectuées dans le cas de bactéries individuelles (Fig. III-12 E-F). Dans le cas de la cellule présentée sur cette figure, la hauteur cellulaire a diminué d'un facteur 4 par rapport à une cellule saine³. On peut aussi noter la présence de nodules et un dépôt autour d'elle qui pourrait être une partie du contenu cellulaire. En ce qui concerne les cultures obtenues après une période d'incubation de 15 h, le dépôt bactérien est bien organisé (Fig.III-10 C-D) montrant une structure « hexagonale » des cellules en raison de sa compacité, signe d'un état physiologique correct des bactéries (Mathélié - Guinlet, 2017). Les cellules de *P. fluorescens*, situées en bord du dépôt ont des contours

³ **Taille des cellules bactériennes (FigIII-12) :** 12h (Longueur= 1,7μm; largeur= 1μm; hauteur=165nm) ; 15h (Longueur= 1,6μm; largeur= 0,8μm; hauteur=230nm) et 24h (Longueur= 2,5μm; largeur = 1,2μm; hauteur=50nm) ; Nodules/agrégats (diamètre_{max} =200nm ; hauteur_{max}=50nm).

réguliers et arrondis et présentent des invaginations sur leur surface bactérienne. Les figures III-12 C-D montrent une cellule isolée dont les caractéristiques sont cohérentes avec celles observées sur le dépôt dense. Enfin la structuration membranaire de *P. fluorescens* rappelle celle déjà observée pour *E. coli* (elle sera décrite un peu plus loin).

Nos résultats rejoignent les mesures effectuées sur la souche de *Pseudomonas fluorescens* ATCC13525 (Meler et al., 2018 ; Haddad et al., 2021; Islam et al., 2021). Les travaux correspondants ont montré que la croissance bactérienne est optimale pour une durée d'incubation allant jusqu'à 15 heures de culture. Mais dès que cette durée est dépassée, les auteurs observent un retard de croissance.

Par conséquent, et pour la suite de ce travail, nous retenons une période d'incubation pour la croissance en milieu gélosé de 15 heures à une température de 28 °C.

2.5 Influence du milieu de culture sur la croissance de *P. fluorescens*

Il est bien connu que les espèces du genre *Pseudomonas* ont de grandes capacités d'adaptation qui leur permettent de se développer dans différents milieux (eau, sol, etc.) et de s'adapter rapidement, y compris dans des conditions de vie difficiles (par exemple, en présence de xénobiotiques, d'antibiotiques, ...) (Raja et al., 2006; Chellaiah, 2018; Wu et al., 2020). D'autre part, et d'un point de vue nutritionnel, ces bactéries sont peu exigeantes et peuvent même se passer de facteurs de croissance pour la plupart d'entre elles (Fujita et al., 1992; Palleroni, 2010). Dans la plupart des études menées sur le genre *Pseudomonas*, les bactéries sont le plus souvent cultivées dans un bouillon nutritif, le milieu *Lysogeny broth* (LB) (Raja et al., 2006; Chellaiah, 2018; Raja et Selvam, 2009) mais ce n'est pas le seul milieu utilisé. On peut également trouver des travaux dans lesquels le milieu Mueller-Hinton (MH) est privilégié, comme ceux de (Pollock et al., 1978; Fujita et al., 1992).

Par conséquent, et afin d'optimiser notre protocole en identifiant le milieu de culture le plus adapté pour *P. fluorescens*, nous avons choisi de tester les deux milieux déjà mentionnés ci-dessus, (i) LB, (ii) MH, ainsi qu'un troisième milieu, (iii) le milieu MH ajusté en cations (MH⁺). De plus, nous avons mené cette étude à travers deux générations successives : (i) la culture stock (mère) et (ii) la culture intermédiaire (fille).

Les résultats les plus représentatifs sont présentés sur la Figure III-13 pour la culture mère et sur la Figure III-14 pour la culture intermédiaire.

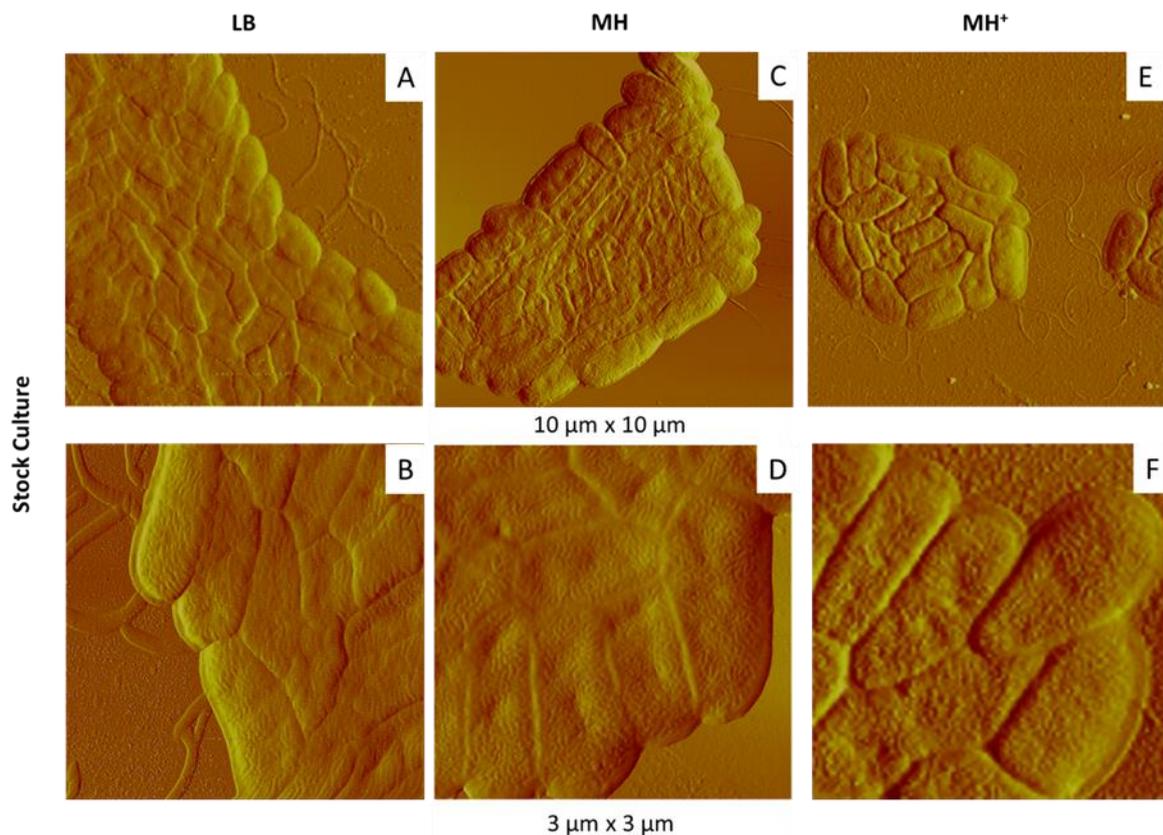


Figure III-13 : Effet du milieu de culture sur la morphologie de la bactérie *P. fluorescens* (culture mère) dans le cas d'un dépôt simple. Les bactéries ont été cultivées à une température de 28°C pendant une durée de 15h dans 3 milieux différents : LB (A,B) ; MH (C,D) et MH⁺ (E,F). Images AFM d'amplitude obtenues en mode tapping à l'air.

Dans le cas de la culture stock (1^{ère} génération) et pour les 3 milieux, on observe la présence de colonies bactériennes homogènes, plus ou moins denses selon les zones sondées (Fig. III-13 A; Fig. III-13 C; Fig. III-13 E). Les cellules ont des formes allongées et sont bien collées les unes aux autres jusqu'à former la structure « hexagonale » et donc compacte déjà décrite, notamment dans le cas du milieu MH (Fig. III-13 C). D'autre part, un grand nombre de cellules présentent des invaginations et ont une structuration membranaire comme observé précédemment. Ces observations semblent indiquer globalement un état physiologique correct des bactéries issues de la culture stock quel que soit le milieu⁴. Mais, à ce stade de l'étude, il est difficile de décider lequel de ces trois milieux est le meilleur uniquement à partir de cette culture mère. En revanche, les résultats obtenus à partir de dépôts réalisés sur des cultures de 2^{ème} génération (cultures intermédiaires) ne laissent aucun doute car ils montrent des différences nettes entre les trois milieux de culture (Fig. III-14).

⁴ Les dimensions moyennes des cellules bactériennes des cultures stock pour les trois milieux sont respectivement : **LB** (Longueur= 1,6µm ; largeur= 0,8µm; hauteur =155nm) ; **MH** (Longueur= 1,6µm; largeur= 0,8µm; hauteur=145nm) ; **MH⁺** (Longueur= 1,8µm; largeur= 0,7µm; hauteur =150nm).

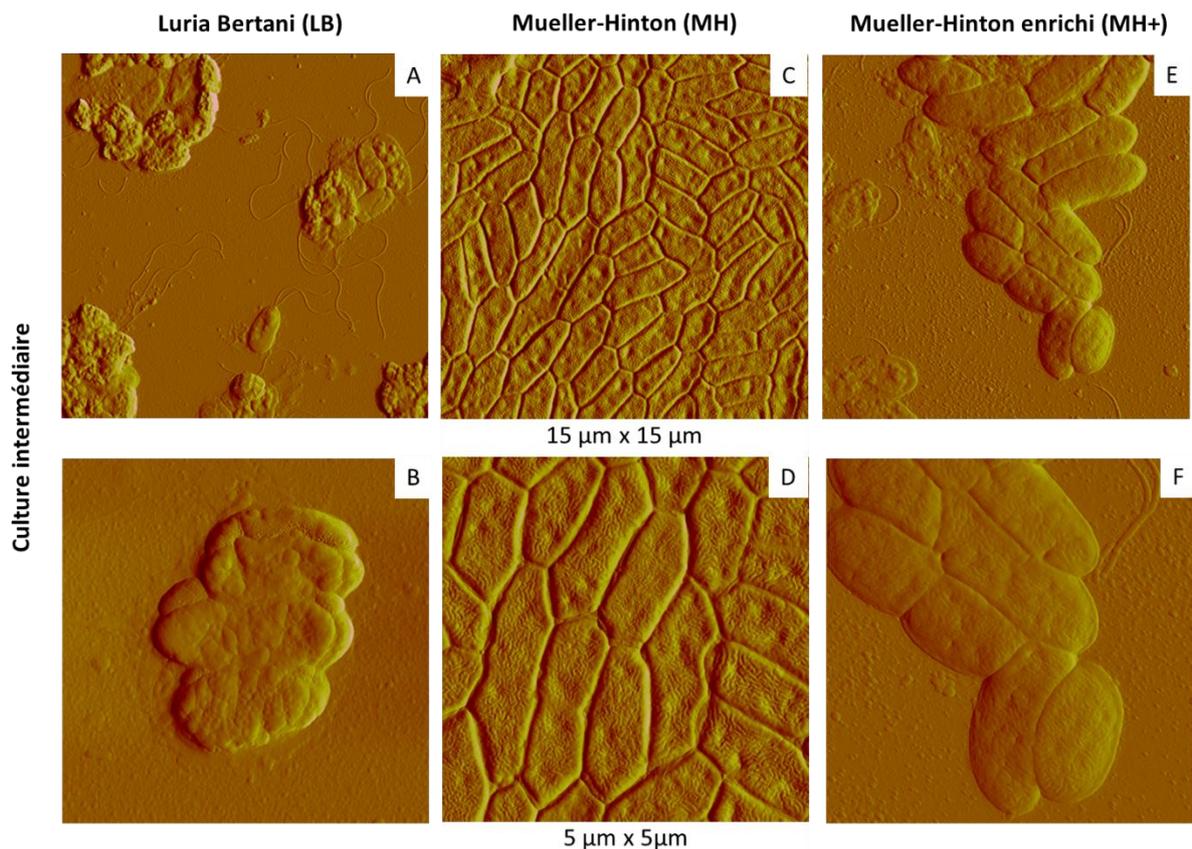


Figure III-14 : Effet du milieu de culture sur la morphologie de la bactérie *P. fluorescens* (culture intermédiaire) dans le cas d'un dépôt simple. Les bactéries ont été cultivées à 28 °C, pendant 15 heures, dans 3 milieux différents : LB (A, B); MH (C, D) et MH⁺ (E, F). Images AFM d'amplitude obtenues en mode tapping à l'air.

On peut déduire des résultats obtenus que le milieu le moins bien approprié est le milieu LB bien qu'il s'agisse d'un milieu de culture largement utilisé (figures III-14 A-B). Sur la figure III-14 A, quasiment toutes les bactéries sont dégradées, certaines cellules sont presque vidées de leur contenu laissant apparaître, parfois, quelques nodules / agrégats au niveau de la membrane cellulaire. Dans d'autres zones de l'échantillon, il y a des cellules complètement effondrées voire même lysées (figure III-14 B).

Dans le cas du milieu MH⁺, la population bactérienne est hétérogène (Fig. III-14 E) avec la coexistence de bactéries saines de différentes formes et tailles ainsi que des bactéries lysées.

En revanche, dans le cas du milieu MH, la 2^{ème} génération (culture intermédiaire) semble se porter aussi bien que la 1^{ère} génération (culture stock). L'organisation du dépôt dense est régulière, la morphologie des bactéries est celle attendue et la structuration de la membrane externe est celle observées chez des cellules saines.

Les résultats de plusieurs autres travaux concordent avec les nôtres (Washington et al., 1978 ; Pollock et al., 1978; Kenny et al., 1980). En effet, ces auteurs ont travaillé sur l'ajustement du

milieu de culture en magnésium et calcium et ont montré que le milieu MH était le plus adapté dans le cadre d'études de résistance des bactéries (*Pseudomonas*) aux antibiotiques et aux métaux lourds.

Par conséquent, et pour la suite de ce travail, nous retenons le milieu de culture MH, une durée d'incubation de 15h et une température de 28 °C.

3. Caractérisations morphologiques de cellules *Pseudomonas fluorescens*

3.1. Morphologie et comportement des bactéries

Une fois les protocoles de culture optimisés, nous avons entrepris de préciser. Les caractéristiques morphologiques des cellules de *Pseudomonas fluorescens*. Le dépôt bactérien est réalisé, dans un premier temps, sur un substrat de mica nu selon deux méthodes différentes : dépôt simple (déjà utilisé dans les paragraphes précédents) et dépôt par spin-coating. Les résultats les plus représentatifs sont présentés sur les figures III-15 et III-16.

Dans le cas d'un dépôt simple, la population bactérienne est dense et très compacte (Fig. III-15 A-C). Les cellules sont collées les unes aux autres et il en résulte une organisation de type « hexagonale » (figures III-15 B-C). Le dépôt effectué par spin-coating est presque similaire au simple (Fig. III-5 E-H), excepté que les cellules sont légèrement espacées (Fig. III-15 F-H). Cette différence entre les deux dépôts pourrait être due au rinçage de l'échantillon qui se fait par aspiration du solvant (suivi d'une évaporation) ce qui favoriserait l'agrégation des bactéries dans le cas d'un simple dépôt.

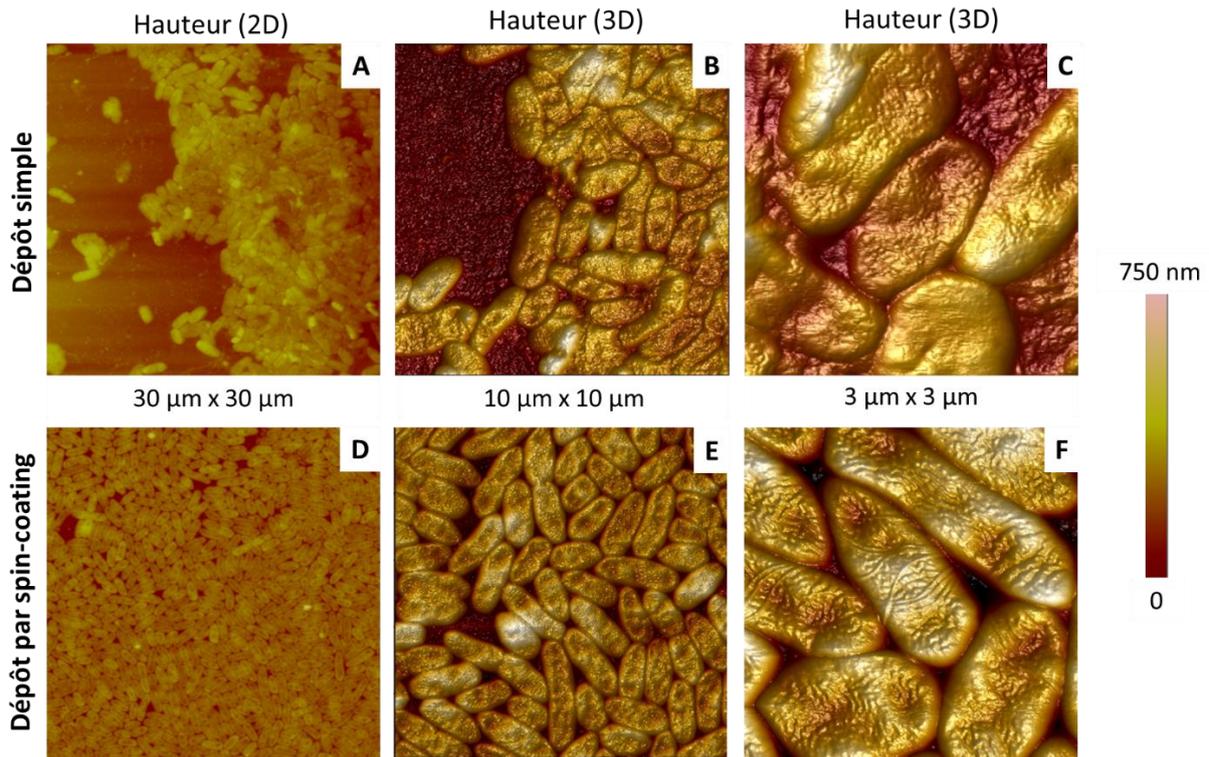


Figure III-15 : Dépôts bactériens denses réalisés à partir de cultures réalisées dans les conditions optimisées (MH, 15 h, 28°C) sur un substrat de mica nu par dépôt simple (A, B, C) et par spin-coating (D, E, F). Les images AFM ont été obtenues en mode tapping à l'air.

Dans le cas d'un dépôt réalisé par spin-coating, l'essentiel du solvant est expulsé lors de la rotation de l'échantillon, et donc le positionnement des bactéries sur le substrat ne change pas.

On peut observer, en général et pour tous les dépôts effectués, la cohabitation sur un même substrat de cellules de tailles différentes qu'elles soient individuelles ou agrégées (Fig.III-15 et Fig.III-16), ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs de (Auerbach et al., 2000; Li et al. ., 2007; Raja et al., 2006). On peut par exemple trouver des cellules deux fois plus longues que la population bactérienne moyenne ainsi que des cellules en division (Fig. III-15 et Fig. III-16). Toutes les observations mettent en évidence l'hétérogénéité de ces dépôts avec la coexistence de cellules de niveaux de maturité différents, qu'elles soient agrégées ou individuelles (Fig. III-15; III-16).

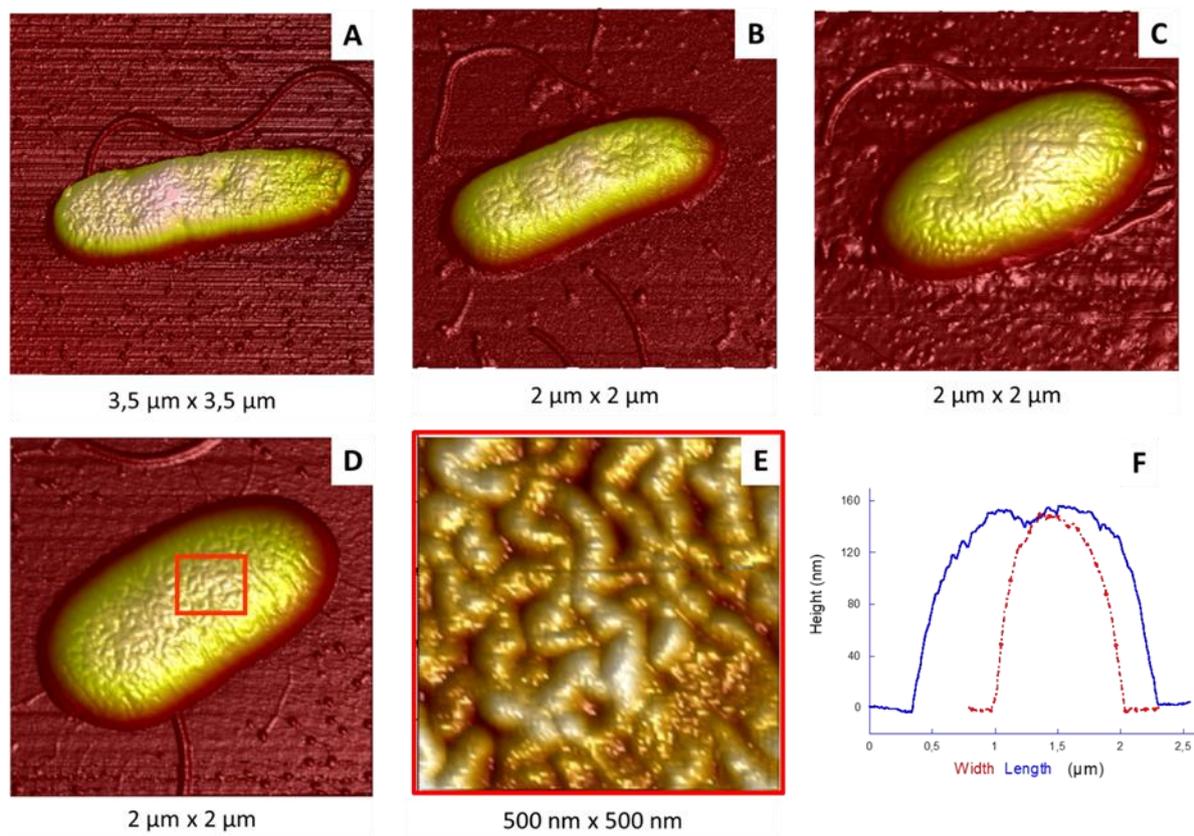


Figure III-16 : Analyse morphologique de cellules saines de *P. fluorescens*, dépôts à partir de cultures réalisées dans les conditions optimisées (MH, 15 h, 28°C): images topographiques 3D de cellules individuelles (A-D) ; Zoom sur l'image de phase de la cellule D – carré rouge (E) ; profil en hauteur de la cellule D (F). Les images AFM ont été obtenues à l'air avec le mode tapping. L'échelle de hauteur maximale est de 750 nm et l'échelle de phase est de 90°.

Pour déterminer les caractéristiques morphologiques représentatives de la population de *Pseudomonas fluorescens*, nous avons analysé plus d'une centaine de cellules saines provenant de différents échantillons. Nos observations sont les suivantes :

- L'étude AFM des bactéries *P. fluorescens* isolées a montré que les flagelles restent le plus souvent attachées à la cellule (Fig. III-9 à Fig. III-12; Fig. III-16) et qu'ils peuvent être très nombreux, nos résultats sont en accord avec ceux de (Díaz et al., 2010; Allen et al., 2018). En revanche, dans le cas d'études précédentes consacrées à *E. coli* (Mathélié-Guinlet, 2017) utilisant approximativement le même protocole, les cellules apparaissaient le plus souvent dépourvues de leurs flagelles qu'elles perdaient en solution ou lors du dépôt. On retrouvait, par la suite, ces flagelles dispersés sur la surface du substrat sur lequel le dépôt avait été effectué.

- Dans le cas des cellules individuelles (Fig. III-16), *P. fluorescens* peut apparaître sous des formes plus ou moins variées⁵, certaines cellules étant allongées et plus ou moins étroites (Fig. III-16 A et B), d'autres plutôt ovales et arrondies (Fig. III-16 C et III-16 D). Les dimensions des bactéries peuvent être déduites des profils de hauteur via des sections réalisées suivant la largeur et la longueur de la cellule comme illustré sur la figure III-9 F. Les valeurs obtenues sont présentées sur la Figure III-17 et les tailles moyennes sont présentées dans le Tableau III-1. Nos résultats montrent que l'état d'agrégation des bactéries peut influencer leurs dimensions car on peut supposer que dans le cas de cellules saines, le volume cellulaire ne change pas selon qu'elles sont agrégées ou non. Par conséquent, et comme observé (Fig. III-17 et tableau III-1), les cellules agrégées et comprimées sont plus courtes (et / ou moins larges) et ont donc des hauteurs supérieures à celles des cellules individuelles comme cela a été observé chez *E. coli* (Mathélié-Guinlet, 2017).

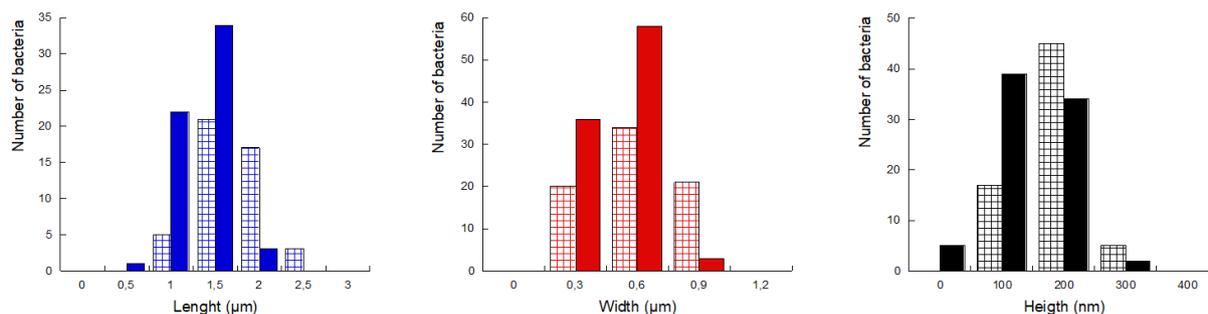


Figure III-17 : Dimensions moyennes des cellules : longueur (bleu), largeur (rouge) et hauteur (noir). Ces statistiques sont réalisées sur 120 cellules agrégées (barres pleines) et 40 cellules isolées (barres hachurées).

Tableau III-1 : Dimensions moyennes des cellules : statistiques réalisées sur 120 cellules agrégées et 40 cellules isolées. Les dimensions des cellules isolées sont en accord avec plusieurs études.

Dimensions	Bactéries agrégées	Bactéries isolées
Longueur (µm)	1,8 ± 0,5	2,0 ± 0,6
Largeur (µm)	0,6 ± 0,2	0,7 ± 0,4
Hauteur (nm)	250 ± 100	200± 100

⁵ **Taille de cellule :** Cellule A (Longueur= 1,52µm; largeur= 0,51 µm; hauteur= 182 nm) ; Cellule B (Longueur= 1,62µm ; largeur= 0,82µm ; hauteur=185nm) ; Cellule C (Longueur= 1,62µm ; largeur= 0,82µm ; hauteur=229nm) ; Cellule D (Longueur= 1,78µm; largeur= 0,91µm; hauteur=151nm).

3.2 Modification de la morphologie bactérienne, invaginations

Une des principales caractéristiques morphologiques des bactéries *Pseudomonas fluorescens* est également la présence d'invaginations au niveau de la membrane cytoplasmique externe qui se présentent sous forme de « creux » plus ou moins circulaires (Fig. III-16). Ces invaginations ont été observées pour tous les dépôts effectués et pour toutes les cellules observées à l'exception de quelques-unes, très rares (Fig. III-16 D). Globalement :

- Les invaginations sont situées, le plus souvent, sur l'axe médian de la bactérie dans l'axe longitudinal, et leur nombre peut varier de 1 à 5 maximum par cellule.
- Sur la base des profils réalisés à partir des images AFM, on peut constater que les invaginations ont une profondeur allant de 5 à 70 nm, un diamètre moyen de 240 ± 90 nm et des distances entre leurs centres de l'ordre de 500 nm.

De telles invaginations ont déjà été observées chez d'autres bactéries (gram-négatives) comme par exemple *Pseudomonas putida* (Auerbach et al., 2000) et *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 (Kamaeva et al., 2014). Dans le cas de *Pseudomonas putida*, tout comme pour *P. fluorescens*, les invaginations sont peu nombreuses et leur profondeur varie de 10 à 60 nm tandis que chez *Chromobacterium violaceum*, elles sont très nombreuses (plus de dix par cellule) avec une profondeur moyenne de l'ordre de 30 nm. Kamaeva et al. (2014) ont montré que les invaginations sont dues à un stress bactérien et représentent un phénomène d'auto-défense des bactéries qui communiquent entre elles par Quorum-Sensing (QS). En effet, le QS permet aux bactéries de mutualiser leurs efforts de survie en synchronisant la régulation des gènes impliqués notamment dans la virulence, la résistance aux antimicrobiens ou la formation de biofilms. De plus, ces mêmes auteurs ont démontré la disparition des invaginations chez *Chromobacterium violaceum* en l'absence de C₆-HSL (un isomère des AHL - Acyl Homoserine Lactones), une protéine impliquée dans le QS. Cette étude démontre donc un lien entre la présence d'invaginations et le procédé de QS chez cette bactérie, suggérant qu'il pourrait y avoir un lien similaire dans le cas de *P. fluorescens*. Dans le même ordre d'idée, Kang et al. (2021) ont montré, par imagerie MEB et TEM, une morphologie irrégulière et une inhomogénéité sur la surface externe comme la présence de quelques pores lorsque *P. fluorescens* est soumise à un stress causé par l'acide lactobionique aux propriétés antibactériennes. Un stress d'une autre nature pourrait donc expliquer la présence de ces invaginations dans une majorité de dépôts bactériens de *P. fluorescens* que nous avons réalisés dans cette étude.

3.3. Structuration membranaire

Une autre caractéristique de *P. fluorescens* est la structuration assez particulière de sa surface membranaire (Fig. III-18 D et III-18 E). Le contraste topographique observé révèle des ondulations ou « ripples », sortes de tubes plus ou moins sinueux selon les cellules sondées (Fig. 18E). Sur l'image de la Fig. 18E les zones claires correspondent aux tubes (ou ondulations) et les zones sombres aux rainures (jonctions entre deux tubes). La largeur moyenne de ces tubes est de l'ordre de 55 ± 6 nm et la hauteur maximale correspondante est d'environ 10 nm. Cette structuration membranaire est également visible sur les images de phase (Fig. III- 18) avec la même alternance de zones claires (ondulations) et sombres (rainures). Un tel contraste, qu'il soit topographique ou de phase, a déjà été observé dans une étude précédente sur la bactérie à Gram négatif, *E. coli* (Mathélié-Guinlet, 2017). Il est proposé dans cette étude que ce contraste est lié à une hétérogénéité de la surface bactérienne et à la coexistence de nanodomains membranaires aux propriétés mécaniques différentes des espaces inter-domaines. La phase associée aux ondulations (zones claires) indique que ces ondulations sont probablement constituées de molécules bien organisées, ce qui les rend relativement rigides (Nony et al., 2001; Mathélié-Guinlet, 2017). Dans le cas des zones creuses (contraste de phase sombre), l'organisation moléculaire serait plus « souple », ces zones étant constitués de molécules fluides et / ou relativement désorganisées (Mathélié-Guinlet et al., 2017). La membrane externe de ces bactéries étant composée à 75% de lipopolysaccharides (LPS), on peut supposer que ces molécules sont impliquées dans cette structuration membranaire en ondulations (Wilkinson, 1983; Dowhan, 1995; Gerald et al., 2007; Ruhel et al. ., 2015; Mathélié-Guinlet, 2017). Par conséquent, nous nous appuyons sur ces interprétations pour décrire et expliquer nos résultats (topographiques et de phase) obtenus avec *P. fluorescens*.

Comme illustré sur la figure III-18, on peut remarquer qu'il existe différentes organisations de ces structures selon les cellules sondées dans un dépôt ou même selon différentes zones d'une même cellule. Par exemple, les ondulations peuvent être sinueuses, courtes et leur orientation aléatoire (Fig. III-18 A-C) tandis que dans d'autres cellules les ondulations sont longues, plus ou moins organisées, certaines d'entre elles étant même alignées (Fig. III-18 D-F). La longueur des ondulations peut largement dépasser la centaine de nanomètres pour certaines bactéries et même, parfois, approcher le micromètre, en particulier dans le cas de cellules agrégées (Fig III-18 E et F).

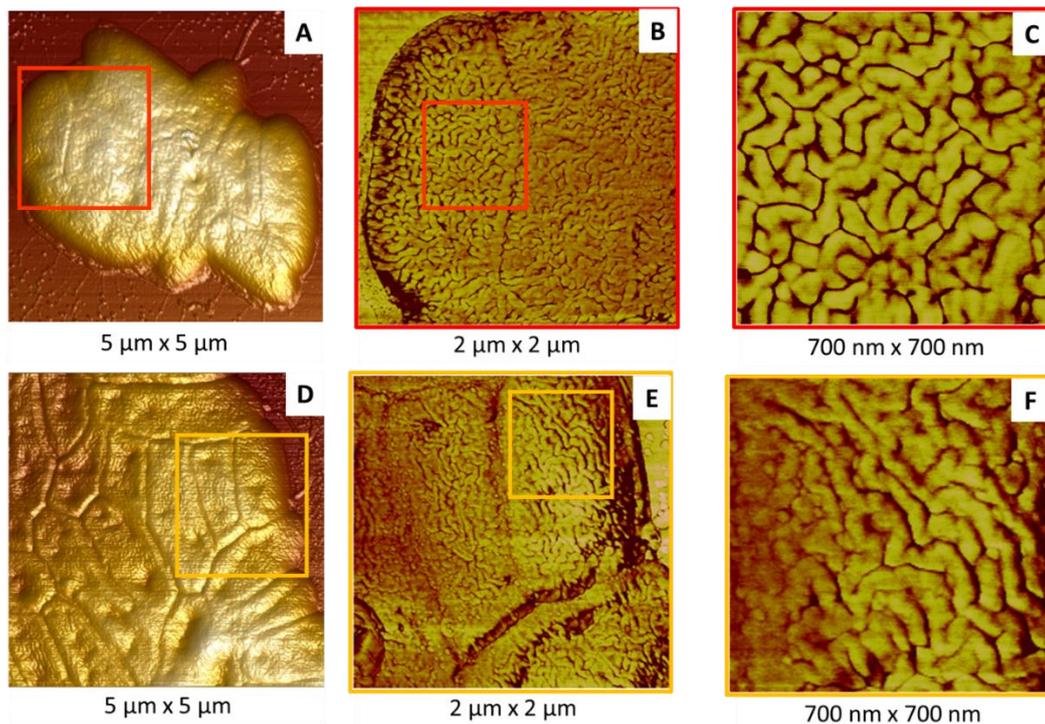


Figure III-18 : Caractéristiques morphologiques et membranaires des cellules saines de *P. fluorescens*, dépôts à partir de cultures réalisées dans les conditions optimisées (MH, 15 h, 28°C); Images topographiques 3D de cellules agrégées (A et D) ; image de phase correspondant aux carrés rouge (B) et orange (E) ; images de phase agrandies (C, D) avec le même code couleur. Les images AFM ont été obtenues à l'air avec le mode tapping. L'échelle de hauteur maximale est de 750 nm et l'échelle de phase est de 90°.

La Fig. III-19 montre un agrégat de 3 bactéries assez représentatif d'un grand nombre de cellules issues des dépôts étudiés⁶. Deux bactéries de cet agrégat sont collées l'une à l'autre (cellules 1 et 2) et la 3^{ème} frôle à peine la cellule 2. On constate, tout d'abord et à partir de l'image topographique (Fig. III-19 A), que ces cellules sont de formes allongées, ont des volumes différents et que chacune d'elles a deux invaginations à sa surface. Ensuite, l'image de phase correspondante montre des structures membranaires très différentes (figure III-19 B). La cellule 3, celle aux contours réguliers, est la moins volumineuse (moins haute et moins large) et présente une structure membranaire relativement organisée, avec des ondulations plutôt segmentées (Fig. III-19 B). Cette structuration est clairement visible sur les images « zoomées » (Fig. III-19 C). En revanche, la cellule 1 montre un comportement complètement différent de celui de la cellule 3. En effet, les « zooms » effectués sur l'image de phase démontrent l'hétérogénéité de la structuration de la membrane avec la coexistence d'ondulations (longues

⁶ **Dimensions des cellules de la figure III-19** : Cellule 1 (Hauteur = 170 nm ; Largeur = 0,8 μm ; Longueur = 1,65 μm) ; Cellule 2 (hauteur = 80 nm ; largeur = 0,5 μm ; longueur = 1,3 μm) ; Cellule 3 (hauteur = 75 nm ; largeur = 0,5 μm ; longueur = 1,25 μm).

ou courtes et plus ou moins organisées) aux bords de l'invagination et des « agrégats » en son centre, dans la zone la plus profonde (Fig. III-19 E). Il en est de même pour une autre zone de la même cellule où la structuration en agrégats est dominante (Fig. III-19 D).

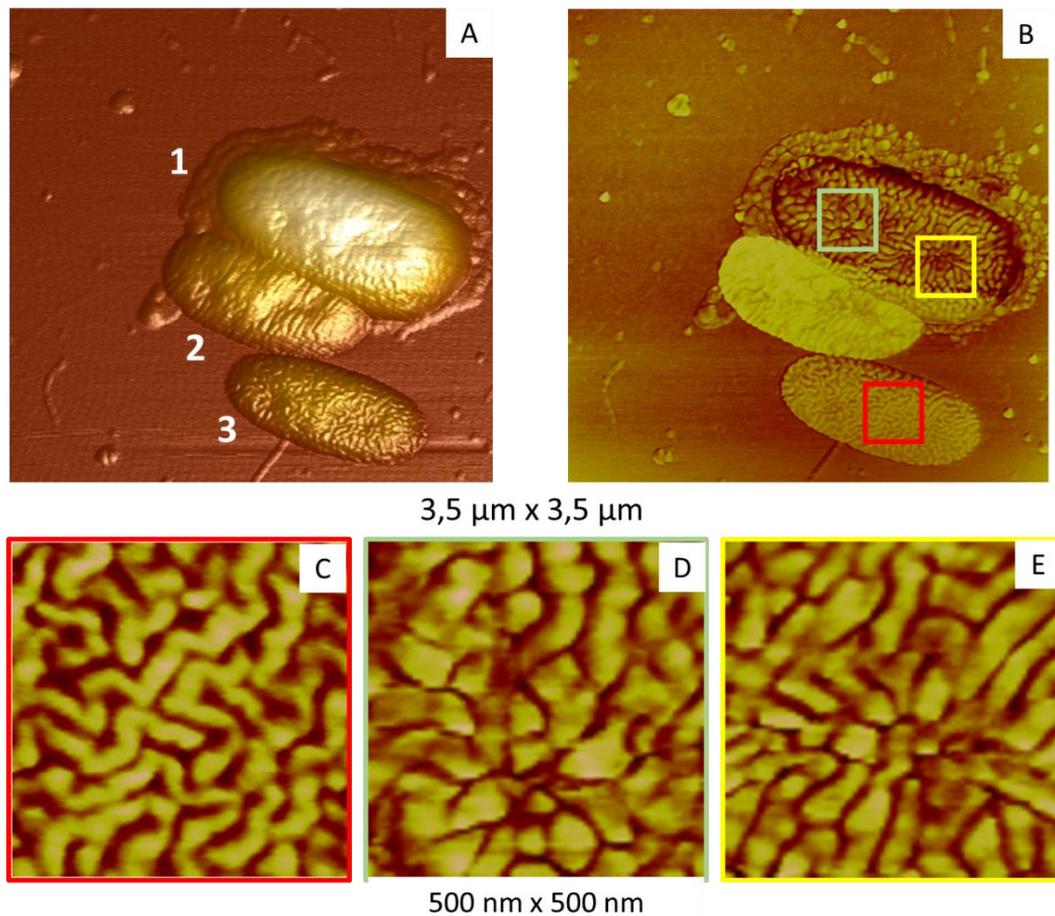


Figure III-19 : Caractéristiques morphologiques et membranaires d'un agrégat cellulaire, dépôts de *P. fluorescens* à partir de cultures réalisées dans les conditions optimisées (MH, 15 h, 28°C); Les images AFM ont été obtenues à l'air avec le mode tapping. L'échelle de hauteur maximale est de 750 nm et l'échelle de phase est de 90°. Images topographiques 3D des 3 cellules (A) ; images de phase des 3 cellules (B) ; Images de phase zoomées sur les 3 cellules : cellule 1 (C) ; cellule 2 (D) et cellule 3 (E).

De plus, l'image de phase (Fig. III-19 B), montre une nette différence de contraste entre les cellules 1 et 3, celle de la cellule 1 (contraste de phase sombre) correspond à une valeur de phase inférieure à celle de la cellule 3 (contraste de phase plus clair). Une telle différence de contraste est peut-être liée à une hétérogénéité des propriétés mécaniques locales de ces deux cellules (module de Young et viscoélasticité), la cellule 1 étant plus molle que la cellule 3 (Nony et al., 2001; Mathelié-Guinlet et al., 2017). Enfin, on peut constater que la cellule 1 est entourée d'un grand nombre de vésicules (Fig. III-19 B) qu'elle a probablement excrétées en raison d'un état de stress. Ces observations nous incitent à supposer une corrélation possible entre la

structure membranaire modifiée au niveau des invaginations et l'état de santé dégradé des bactéries concernées.

La Fig. III-20 montre trois autres cellules présentant des invaginations et dont les morphologies respectives sont similaires. La première bactérie a une forme ovale, est bien bombée et n'a pas d'invagination à sa surface (Fig. III-20 A). La deuxième bactérie a une invagination peu profonde (15 nm) située au centre de la cellule (Fig. III-20 C) tandis que la troisième a trois invaginations, dont deux sont un peu plus profondes. L'espacement entre les invaginations est d'environ 500 nm et leur profondeur maximale est d'environ 25 nm. A priori, ces trois bactéries pourraient être considérées comme ayant des morphologies presque similaires (formes plus ou moins ovales, dimensions similaires). Cependant, les images de phase zoomées correspondantes montrent une différence entre ces 3 cellules⁷ du point de vue de la structuration de la membrane (Fig. III-20 B;D;F). Par exemple, les ondulations dans le cas de la 1^{ère} cellule, dépourvue d'invagination, sont plus longues et relativement organisées (Fig. III-20 A-B; Fig. III-16 D). On observe par contre une modification de la structuration membranaire au niveau des invaginations des deux autres cellules, suggérant que les ondulations se désorganisent et se raccourcissent pour tendre vers des « agrégats » au niveau des invaginations. Le diamètre de ces « agrégats » est du même ordre de grandeur que la largeur des ondulations (une cinquantaine de nanomètres) et la hauteur mesurée (contraste entre zones claires et sombres) varie entre 4 et 10 nm. Pour la cellule ne présentant qu'une seule invagination, on peut constater la coexistence de structures différentes selon que la zone considérée est située à l'intérieur de l'invagination, à proximité ou complètement à l'extérieur. En effet, quand on se rapproche des invaginations, les ondulations segmentées se croisent, se raccourcissent de plus en plus et finissent par se déformer sous la forme des agrégats mentionnés.

⁷ **Taille des cellules (Fig III-20) :** Cellule A (Hauteur = 154 nm ; Largeur = 0,96 μ m ; Longueur = 1,81 μ m) ; Cellule C (hauteur = 148 nm ; largeur = 1,66 μ m ; longueur = 1,70 μ m) ; Cellule E (hauteur = 154 nm ; largeur = 0,82 μ m ; longueur = 1,67 μ m) ; **Caractéristiques de l'invagination : profondeur (d) et diamètre (ϕ).** Cellule A (d = 15 nm ; ϕ = 280 nm) ; Cellule C (d= 45 nm ; ϕ = 190 nm) ; (d= 20 nm ; ϕ = 230 nm) ; (d= 35 nm ; ϕ = 240 nm) ; Cellule E (d= 25 nm ; ϕ = 210 nm) ; (d= 20 nm ; ϕ = 250 nm).

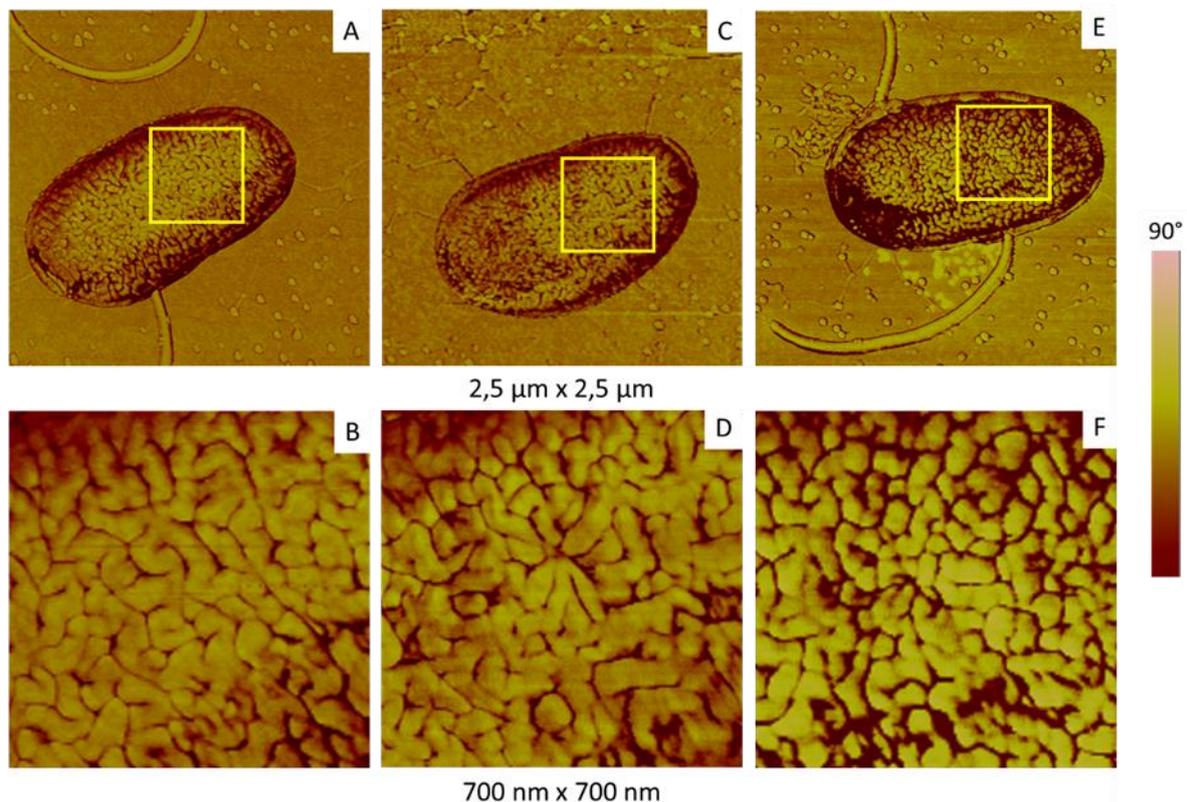


Figure III-20 : Des cellules bactériennes individuelles ont démontré la présence (ou non) d'invaginations ainsi qu'une structure membranaire bactérienne différente, dépôts à partir de cultures réalisées dans les conditions optimisées (MH, 15 h, 28°C). Les images AFM ont été obtenues à l'air avec le mode tapping.

Une telle évolution dans la structuration membranaire (des ondulations vers des agrégats quasi-sphériques) a également été observée chez *E. coli* (Mathélié-Guinlet, 2017). Elle a été attribuée à la réorganisation de la membrane, éventuellement due à la restructuration des molécules de LPS sous l'effet d'un stress, par exemple à la suite du vieillissement cellulaire ou en lien avec la toxicité cellulaire après l'interaction de bactéries avec des nanoparticules ou autre xénobiotiques. Dans cette étude sur *P. fluorescens*, l'évolution des ondulations à des agrégats davantage sphériques semble être liée aux invaginations (présence ou non, nombre, taille, etc.). Par conséquent, et si l'on se fonde sur les résultats obtenus sur *E. coli* et que l'on transpose à *P. fluorescens* ce raisonnement et les interprétations effectuées, on peut supposer que l'apparition des invaginations, voire leur nombre et leurs profondeurs, pourraient être un signe du stress de la cellule et de la détérioration de son état de santé.

4. Conclusion

Les travaux présentés dans cette partie de la thèse ont porté sur l'étude morphologique par AFM de la bactérie *P. fluorescens*. Nous avons, tout d'abord, étudié l'impact des modifications des conditions de culture de la population bactérienne. Les paramètres physico-chimiques validés pour la culture de cette bactérie sont : une température d'incubation de 28 ° C pendant une durée de 15 heures dans le milieu de culture MH, Nous avons également optimisé les conditions des dépôts. L'étude morphologique montre des cellules de *Pseudomonas fluorescens* sous forme de bâtonnets présentant, le plus souvent, des invaginations de la membrane cytoplasmique externe plus ou moins profondes et une structuration membranaire assez particulière, sous la forme d'ondulations attribuées aux LPS. Une telle structuration a déjà été observée chez les bactéries à Gram négatif ainsi que dans des travaux portant sur *E. coli* menés précédemment dans l'équipe. D'autre part, notre étude suggère une corrélation entre l'évolution de la structure membranaire de *P. fluorescens* et son état physiologique global. Les ondulations sont observées en l'absence d'invaginations dans les cellules qui sont probablement dans un état métabolique actif, tandis que des agrégats davantage sphériques semblent liés à la présence de plusieurs invaginations dans une cellule moins actives. Des structurations intermédiaires, entre ondulations et agrégats sphériques, ont été observées et semblent liées au nombre d'invaginations ainsi qu'à leurs profondeurs.

5. Références

- Achouri, F., Said, M.B., Wahab, M.A., Bousselmi, L., Corbel, S., Schneider, R., Ghrabi, A., 2020. Effect of photocatalysis (TiO₂/UVA) on the inactivation and inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors expression. *Environ. Technol.* 0, 1–10. <https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1751729>
- Allen, A., Habimana, O., Casey, E., 2018. The effects of extrinsic factors on the structural and mechanical properties of *Pseudomonas fluorescens* biofilms: A combined study of nutrient concentrations and shear conditions. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 165, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.02.035>
- Aponte, A., Castillo, O., Cabrera, G., Pernia, M., Hernandez, Y., 2017. Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum* sp. association enhances growth of *Lactuca sativa* L. under tropical conditions. *J. Cent. Eur. Agric.* <https://doi.org/10.5513/jcea.v18i2.5362>
- Auerbach, I.D., Sorensen, C., Hansma, H.G., Holden, P.A., 2000. Physical Morphology and Surface Properties of Unsaturated *Pseudomonas putida* Biofilms. *J. Bacteriol.* 182, 3809–3815. <https://doi.org/10.1128/JB.182.13.3809-3815.2000>
- Baniasadi, M., Xu, Z., Gandee, L., Du, Y., Lu, H., Zimmern, P., Minary-Jolandan, M., 2014. Nano indentation of *Pseudomonas aeruginosa* bacterial biofilm using atomic force microscopy. *Mater. Res. Express* 1, 045411. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/1/4/045411>
- Baranski, R., Klocke, E., Nothnagel, T., 2007. Enhancing resistance of transgenic carrot to fungal pathogens by the expression of *Pseudomonas fluorescens* microbial factor 3 (MF3) gene. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 71, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2007.12.002>
- Ben-David, A., Davidson, C.E., 2014. Estimation method for serial dilution experiments. *J. Microbiol. Methods* 107, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.023>
- Bergey, D.H., Holt, J.G., 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijffes, A.H.M., Lamers, G.E.M., Chin-A-Woeng, T.F.C., Lugtenberg, B.J.J., Bloemberg, G.V., 2003. Interactions in the Tomato Rhizosphere of Two *Pseudomonas* Biocontrol Strains with the Phytopathogenic *Fungus Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis-lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 16, 983–993. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.11.983>
- Cai, Y., King, R.B., Law, W., McInerney, D.M., 2019. Which comes first? Modeling the relationships among future goals, metacognitive strategies and academic achievement using multilevel cross-lagged SEM. *Learn. Individ. Differ.* 74, 101750. <https://doi.org/10.1016/j.lindif.2019.06.004>
- Capdevila, S., Martínez-Granero, F.M., Sánchez-Contreras, M., Rivilla, R., Martín, M., 2004. Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 3889–3897. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27362-0>
- Chellaiah, E.R., 2018. Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Appl. Water Sci.* 8, 154. <https://doi.org/10.1007/s13201-018-0796-5>
- Cox, C.D., Rinehart, K.L., Moore, M.L., Cook, J.C., 1981. Pyochelin: novel structure of an iron-chelating growth promoter for *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 4256–4260. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.7.4256>
- Cunrath, O., 2015. Métallome et homéostasie du fer chez *Pseudomonas aeruginosa* : rôle des sidérophores pyochéline et pyoverdine (phdthesis). Université de Strasbourg.
- Demange, P., Wendenbaum, S., Linget, C., Mertz, C., Cung, M.T., Dell, A., Abdallah, M.A., 2020. Bacterial siderophores: structure and NMR assignment of pyoverdins Pa, siderophores of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692. *Biol. Met.* 3, 155–170.

- Díaz, C., Salvarezza, R.C., Fernández Lorenzo de Mele, M.A., Schilardi, P.L., 2010. Organization of *Pseudomonas fluorescens* on Chemically Different Nano/Microstructured Surfaces. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2, 2530–2539. <https://doi.org/10.1021/am100313z>
- Dowhan, W., 1995. Role of phospholipids in *Escherichia coli* cell function, in: Tartakoff, A.M., Dalbey, R.E. (Eds.), *Advances in Cellular and Molecular Biology of Membranes and Organelles, Protein Export and Membrane Biogenesis*. JAI, pp. 189–217. [https://doi.org/10.1016/S1874-5172\(06\)80013-1](https://doi.org/10.1016/S1874-5172(06)80013-1)
- Dufrêne, Y.F., 2001. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron* 32, 153–165. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00106-7](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00106-7)
- Fernandez, M., Godino, A., Príncipe, A., Morales, G.M., Fischer, S., 2017. Effect of a *Pseudomonas fluorescens* tailocin against phytopathogenic *Xanthomonas* observed by atomic force microscopy. *J. Biotechnol.* 256, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.002>
- Fujita, S., Tonohata, A., Matsuoka, T., Okado, N., Hashimoto, T., 1992. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by using a disk of phenanthroline and 9-chloro-9-[4-(diethylamino) phenyl]-9,10-dihydro-10-phenylacridine hydrochloride and by cell agglutination testing with monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 30, 2728–2729. <https://doi.org/10.1128/JCM.30.10.2728-2729.1992>
- Gamalero, E., Trotta, A., Massa, N., Copetta, A., Martinotti, M.G., Berta, G., 2004. Impact of two fluorescent pseudomonads and an *Arbuscular mycorrhizal fungus* on tomato plant growth, root architecture and *P acquisition*. *Mycorrhiza* 14, 185–192. <https://doi.org/10.1007/s00572-003-0256-3>
- Gammoudi, I., 2012. Biocapteur à base de bactéries pour le contrôle environnemental (phdthesis). Université Sciences et Technologies - Bordeaux I.
- Gammoudi, I., Faye, N.R., Moroté, F., Moynet, D., Grauby-Heywang, C., Cohen-Bouhacina, T., 2013. Characterization of Silica Nanoparticles in Interaction with *Escherichia coli* Bacteria 7.
- Gammoudi, I., Mathelie-guinlet, M., Morote, F., Beven, L., Moynet, D., Grauby-heywang, C., Cohen-bouhacina, T., 2016. Morphological and nanostructural surface changes in *Escherichia coli* over time, monitored by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 141, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.006>
- Gammoudi, I., Raimbault, V., Tarbague, H., Moroté, F., Grauby-Heywang, C., Othmane, A., Kalfat, R., Moynet, D., Rebière, D., Dejous, C., Cohen-Bouhacina, T., 2014. Enhanced bio-inspired microsensor based on microfluidic/bacteria/love wave hybrid structure for continuous control of heavy metals toxicity in liquid medium. *Sens. Actuators B Chem.* 198, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.104>
- Garbeva, P., van Veen, J.A., van Elsas, J.D., 2004. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 47, 51–64. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00234-4](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00234-4)
- Gerald B, P., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. *Int. J. Med. Microbiol., Special issue: Lipopolysaccharide* 297, 277–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.012>
- Goldman, E., Green, L.H., 2015. *Practical Handbook of Microbiology*. CRC Press.
- Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G.L.A., Graumann, P.L., Schalk, I.J., 2007. Real Time Fluorescent Resonance Energy Transfer Visualization of Ferric Pyoverdine Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* a role for ferrous iron. *J. Biol. Chem.* 282, 2987–2995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609238200>
- Haddad, S., Elliot, M., Savard, T., Deschênes, L., Smith, T., Ells, T., 2021. Variations in biofilms harbouring *Listeria monocytogenes* in dual and triplex cultures with *Pseudomonas fluorescens*

- and *Lactobacillus plantarum* produced under a model system of simulated meat processing conditions, and their resistance to benzalkonium chloride. *Food Control* 123, 107720. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107720>
- Hoegy, F., Celia, H., Mislin, G.L., Vincent, M., Gallay, J., Schalk, I.J., 2005. Binding of Iron-free Siderophore, a Common Feature of Siderophore Outer Membrane Transporters of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 280, 20222–20230. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500776200>
- Hoegy, F., Lee, X., Noel, S., Rognan, D., Mislin, G.L.A., Reimann, C., Schalk, I.J., 2009. Stereospecificity of the Siderophore Pyochelin Outer Membrane Transporters in Fluorescent *Pseudomonads*. *J. Biol. Chem.* 284, 14949–14957. <https://doi.org/10.1074/jbc.M900606200>
- Höfte, M., Bakker, P.A.H.M., 2007. Competition for Iron and Induced Systemic Resistance by Siderophores of Plant Growth Promoting Rhizobacteria, in: *Varma, A., Chincholkar, S.B. (Eds.), Microbial Siderophores, Soil Biology.* Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 121–133. https://doi.org/10.1007/978-3-540-71160-5_6
- Islam, M.A., Hassen, W.M., Tayabali, A.F., Dubowski, J.J., 2021. Short Ligand, Cysteine-Modified Warnericin RK Antimicrobial Peptides Favor Highly Sensitive Detection of *Legionella pneumophila*. *ACS Omega* 6, 1299–1308. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04753>
- Kamaeva, A.A., Vasilchenko, A.S., Deryabin, D.G., 2014. Atomic Force Microscopy Reveals a Morphological Differentiation of *Chromobacterium violaceum* Cells Associated with Biofilm Development and Directed by N-Hexanoyl-L-Homoserine Lactone. *PLOS ONE* 9, e103741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103741>
- Kang, J.Y., Llewellyn, E., Chen, J., Olinares, P.D.B., Brewer, J., Chait, B.T., Campbell, E.A., Darst, S.A., 2021. Structural basis for transcription complex disruption by the Mfd translocase. *eLife* 10, e62117. <https://doi.org/10.7554/eLife.62117>
- Kenny, M.A., Pollock, H.M., Minshew, B.H., Casillas, E., Schoenknecht, F.D., 1980. Cation Components of Mueller-Hinton Agar Affecting Testing of *Pseudomonas aeruginosa* Susceptibility to Gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17, 55–62. <https://doi.org/10.1128/AAC.17.1.55>
- Latour, X., Lemanceau, P., 1997. Carbon and energy metabolism of oxidase-positive saprophytic fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie* 9–10, 427–443.
- Lemanceau, P., 1992. Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas spp fluorescents*. *Agronomie* 12, 413–437. <https://doi.org/10.1051/agro:19920601>
- Li, M., Cha, D.J., Lai, Y., Villaruz, A.E., Sturdevant, D.E., Otto, M., 2007. The antimicrobial peptide-sensing system aps of *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* 66, 1136–1147. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05986.x>
- Lopez, A.Y.C., 2018. Role of pyoverdine and pyochelin siderophores in the homeostasis of biological metals different than iron in *Pseudomonas aeruginosa* (phdthesis). Université de Strasbourg.
- Mathélié-Guinlet, M., 2017. Etude de l'interaction nanoparticules-bactéries : application à l'élaboration d'un biocapteur (phdthesis). Université de Bordeaux.
- Mathélié-Guinlet, M., Gammoudi, I., Beven, L., Moroté, F., Delville, M.-H., Grauby-Heywang, C., Cohen-Bouhacina, T., 2016. Silica Nanoparticles Assisted Electrochemical Biosensor for the Detection and Degradation of *Escherichia Coli* Bacteria. *Procedia Eng., Proceedings of the 30th anniversary Eurosensors Conference – Eurosensors 2016, 4-7. September 2016, Budapest, Hungary* 168, 1048–1051. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.11.337>
- Mathélié-Guinlet, M., Grauby-Heywang, C., Martin, A., Février, H., Moroté, F., Vilquin, A., Béven, L., Delville, M.-H., Cohen-Bouhacina, T., 2018. Detrimental impact of silica nanoparticles on the nanomechanical properties of *Escherichia coli*, studied by AFM. *J. Colloid Interface Sci.* 529, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.098>

- Meler, M.J., Subasinghe, R.M., Beaudette, L.A., 2018. Draft Genome Sequence of the Industrially Significant Bacterium *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. *Microbiol. Resour. Announc.* 7. <https://doi.org/10.1128/MRA.01368-18>
- Meyer, J.-M., 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* 174, 135–142. <https://doi.org/10.1007/s002030000188>
- Mislin, G.L.A., Hoegy, F., Cobessi, D., Poole, K., Rognan, D., Schalk, I.J., 2006. Binding Properties of Pyochelin and Structurally Related Molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 357, 1437–1448. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.080>
- Mitik-Dineva, N., Wang, J., Mocanasi, R.C., Stoddart, P.R., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2008. Impact of nano-topography on bacterial attachment. *Biotechnol. J.* 3, 536–544. <https://doi.org/10.1002/biot.200700244>
- Nanjo, H., Nony, L., Yoneya, M., Aimé, J.P., 2003. Simulation of section curve by phase constant dynamic mode atomic force microscopy in non-contact situation. *Appl. Surf. Sci.*, 5th International Conference on non-contact AFM in Montreal, Canada 210, 49–53. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)01478-2](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)01478-2)
- Nony, L., Boisgard, R., Aimé, J.-P., 2001. DNA Properties Investigated by Dynamic Force Microscopy. *Biomacromolecules* 2, 827–835. <https://doi.org/10.1021/bm0100209>
- O’Sullivan, D.J., O’Gara, F., 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas spp.* involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 56, 662–676.
- Palleroni, N.J., 2010. The *Pseudomonas* Story. *Environ. Microbiol.* 12, 1377–1383. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x>
- Pollock, H.M., Minshew, B.H., Kenny, M.A., Schoenknicht, F.D., 1978. Effect of Different Lots of Mueller-Hinton Agar on the Interpretation of the Gentamicin Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14, 360–367.
- Raja, C.E., Anbazhagan, K., Selvam, G.S., 2006. Isolation and Characterization of A Metal-resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Strain. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 577–585. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9074-4>
- Raja, C.E., Selvam, G.S., 2009. Plasmid profile and curing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* as metal resistant. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 6, 259–266. <https://doi.org/10.1007/BF03327630>
- Ravel, J., Cornelis, P., 2003. Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol.* 11, 195–200. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00076-3)
- Ruhal, R., Antti, H., Rzhepishevskaya, O., Boulanger, N., Barbero, D.R., Wai, S.N., Uhlin, B.E., Ramstedt, M., 2015. A multivariate approach to correlate bacterial surface properties to biofilm formation by lipopolysaccharide mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 127, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.01.030>
- Schalk, I.J., 2008. Metal trafficking via siderophores in Gram-negative bacteria: Specificities and characteristics of the pyoverdine pathway. *J. Inorg. Biochem.*, 13th International Conference on Biological Inorganic Chemistry 102, 1159–1169. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.11.017>
- Schalk, I.J., Abdallah, M.A., Pattus, F., 2002. Recycling of Pyoverdine on the FpvA Receptor after Ferric Pyoverdine Uptake and Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 41, 1663–1671. <https://doi.org/10.1021/bi0157767>
- Schalk, I.J., Hennard, C., Dugave, C., Poole, K., Abdallah, M.A., Pattus, F., 2001. Iron-free pyoverdine binds to its outer membrane receptor FpvA in *Pseudomonas aeruginosa*: a new mechanism for membrane iron transport. *Mol. Microbiol.* 39, 351–361. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02207.x>

- Simon, A., Durrieu, M.-C., 2006. Strategies and results of atomic force microscopy in the study of cellular adhesion. *Micron* 37, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2005.06.006>
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M., Rainey, P.B., 2003. Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* 50, 15–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03670.x>
- Suarez, S., Ferroni, A., Lotz, A., Jolley, K.A., Guérin, P., Leto, J., Dauphin, B., Jamet, A., Maiden, M.C.J., Nassif, X., Armengaud, J., 2013. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *J. Microbiol. Methods* 94, 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.07.021>
- Tomer, A., Sigh, R., Prasad, D., Singh, S., 2021. *Pseudomonas fluorescens* on the growth of paddy.
- Umeda, M., Nakamura, K., Ueha, S., 1997. Energy Storage Characteristics of a Piezo-Generator using Impact Induced Vibration. *Jpn. J. Appl. Phys.* 36, 3146. <https://doi.org/10.1143/JJAP.36.3146>
- Wang, Q., Yang, Q., Wu, W., 2020. Progress on Structured Biosensors for Monitoring Aflatoxin B1 From Biofilms: A Review. *Front. Microbiol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00408>
- Washington, J.A., II, Snyder, R.J., Kohner, P.C., Wiltse, C.G., Ilstrup, D.M., McCall, J.T., 1978. Effect of Cation Content of Agar on the Activity of Gentamicin, Tobramycin, and Amikacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 137, 103–111. <https://doi.org/10.1093/infdis/137.2.103>
- Wilkinson, S.G., 1983. Composition and Structure of Lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 5, S941–S949. https://doi.org/10.1093/clinids/5.Supplement_5.S941
- Wu, B., He, T., Wang, Z., Qiao, S., Wang, Y., Xu, F., Xu, H., 2020. Insight into the mechanisms of plant growth promoting strain SNB6 on enhancing the phytoextraction in cadmium contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 385, 121587. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121587>
- Yuan, S.J., Pehkonen, S.O., 2009. AFM study of microbial colonization and its deleterious effect on 304 stainless steel by *Pseudomonas NCIMB 2021* and *Desulfovibrio desulfuricans* in simulated seawater. *Corros. Sci.* 51, 1372–1385. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2009.03.037>

Chapitre IV – Fixation de *Pseudomonas fluorescens* sur des substrats solides et caractérisation par AFM à l'air et en milieu liquide

Plan du chapitre IV

Chapitre IV – Fixation de <i>Pseudomonas fluorescens</i> sur des substrats solides et caractérisation par AFM à l'air et en milieu liquide	209
1. Introduction.....	211
2. Immobilisation de <i>P. fluorescens</i> sur substrats fonctionnalisés	212
2.1 Caractérisation de <i>P. fluorescens</i> immobilisée sur une surface fonctionnalisée	213
2.2 Test de l'efficacité de l'immobilisation de <i>P. fluorescens</i> sur une surface fonctionnalisée	218
2.2.1 Effet du rinçage	218
2.2.2 Caractérisation par AFM en milieu liquide d'un dépôt de <i>P. fluorescens</i> sur les substrats fonctionnalisés	220
2.2.3 Caractéristiques morphologiques de <i>P. fluorescens</i> in vitro	223
3. Fixation de <i>Pseudomonas fluorescens</i> au glutaraldéhyde	224
3.1 Caractérisation par MEB d'un dépôt bactérien de <i>P. fluorescens</i> fixé	225
3.2 Effet de l'éthanol dans le processus de fixation de <i>P. fluorescens</i> au glutaraldéhyde...	227
3.3 Caractérisation par AFM de <i>P. fluorescens</i> fixée au glutaraldéhyde en absence d'éthanol	229
3.4 Analyse comparative des caractéristiques morphologiques de <i>P. fluorescens</i>	233
4. Conclusion	236
5. Annexes.....	237
6. Références.....	239

1. Introduction

La préparation des échantillons biologiques (cellules, bactéries, membrane cellulaire, ...) pour des caractérisations microscopiques par l'AFM et la MEB, sans les endommager ou les dénaturer est une étape clé. Par exemple, dans le cas du MEB, il est nécessaire de procéder à une fixation (enrobage) de l'objet biologique à l'aide d'un aldéhyde. Pour une caractérisation AFM, c'est le substrat qui doit être fonctionnalisé de manière appropriée à l'objet biologique observé, afin qu'il soit suffisamment immobilisé pour éviter tout décrochage de la surface sous l'action de la sonde AFM lors du balayage. Par conséquent, il est important que cette fonctionnalisation soit optimisée afin que les propriétés physico-chimiques de l'objet biologique immobilisé ne soient pas affectées suite à son interaction avec la surface du substrat et qu'il ne soit déformé, voire même dénaturé.

Par conséquent, nous nous proposons dans ce chapitre de tester deux méthodes de fixation de *P. fluorescens* à la surface de substrats solides : fonctionnalisation des substrats et/ou enrobage des bactéries. La caractérisation de ces traitements, leur reproductibilité et efficacité seront testées à l'air (par MO, MEB et AFM) ainsi qu'en milieu liquide (par MO et AFM). Une étude comparative avec les résultats de la littérature s'avère naturellement nécessaire, mais on trouve très peu de travaux portant sur les propriétés morphologiques de cette espèce bactérienne, *P. fluorescens*, qui pourraient nous servir de référence dans notre étude. Nous avons alors suivi l'évolution morphologique de *P. fluorescens* fixée à des substrats selon différentes méthodes et, pour compenser le manque de résultats dans la littérature, nous l'avons comparée à une autre souche bactérienne, *E. coli*, qui, elle, a été très largement étudiée. D'autre part, et pour simplifier la présentation et la discussion des résultats que nous avons obtenus pour *P. fluorescens*, nos autres données, celles portant sur *E. coli*, sont reportées en annexe.

2. Immobilisation de *P. fluorescens* sur substrats fonctionnalisés

L'observation à l'air d'objets par AFM est, le plus souvent, facilement réalisable et ne nécessite aucun protocole de préparation préalable. En revanche, pour caractériser par AFM des cellules, incluant les bactéries, dans des conditions physiologiques (donc en milieu liquide) et avoir des données fiables et reproductibles, il est nécessaire de les immobiliser sur le substrat, et dans la mesure du possible, sans les dénaturer ou les endommager¹.

De nombreux substrats de référence sont utilisés pour les applications biologiques à cause de leur faible rugosité de surface dont le verre et le mica. En plus d'une rugosité faible, les surfaces respectives de ces substrats sont le plus souvent chargées positivement ce qui permet aux entités biologiques, qui sont globalement chargées négativement, de s'adsorber plus facilement, généralement par physisorption grâce aux ions présents dans les solutions tampons utilisés (Müller et al., 1997; Lyubchenko et al., 2011; Ikai, 1996). D'autre part, pour améliorer l'adhésion cellulaire sur ces substrats, plusieurs méthodes de fonctionnalisation ont été développées et se sont révélées très efficaces pour la plupart d'entre elles. On peut citer, par exemple, les brosses de polymères (Kasas and Ikai, 1995; Bolshakova et al., 2001 ; Doktycz et al., 2003; Rühle, 2004), les dépôts de poly-L-lysine (PLL) (Méndez-Vilas et al., 2008 ; Louise Meyer et al., 2010 ; Colville et al., 2010 ; Huang et al., 2014), de poly(éthylène imine) (PEI) ou encore de multicouches de polyélectrolytes (PEM) (Ballauff, 2004; Konradi et al., 2004; Gammoudi et al., 2014; Mathelié-Guinlet et al., 2016; Gammoudi et al., 2020).

Il est aussi possible de moduler les propriétés des surfaces en faisant varier la nature des molécules utilisées ce qui peut induire des réactions qui peuvent différer selon l'espèce bactérienne déposée, allant de l'aide à la viabilité (cytophilie) jusqu'à sa nuisance (cytophobie) (van Loosdrecht et al., 1989; Oh et al., 2018; Leonard et al., 2019). Les applications visées par ces traitements sont diversifiées, comme l'immobilisation des cellules (Doktycz et al., 2003; Mathelié-Guinlet et al., 2019; Gammoudi et al., 2020), l'amélioration de l'immunodétection (Borthwick et al., 2005; Amann and Fuchs, 2008; Ribeiro et al., 2017), ou au contraire l'inhibition de la bio-adhésion (Xu et al., 2017; Keskin et al., 2019), etc.

Nous avons alors choisi de fonctionnaliser les deux substrats de référence, le mica et le verre, selon les deux méthodes suivantes :

¹ L'endommagement des bactéries par la sonde AFM peut provenir des forces verticales appliquées par celles-ci et/ou des forces latérales générées par le balayage du micro-levier supportant la pointe AFM.

- (i) Le mica recouvert d'un revêtement constitué de PEM de type [PAH-(PSS-PAH)₃] construites selon la méthode dite couche par couche (ou *en anglais, LbL, Layer by Layer*) qui a déjà montré son efficacité dans le cas de nombreuses bactéries dont *E. coli*. Les conditions utilisées pour l'élaboration de tels échantillons sont décrites dans la partie Matériel et Méthodes (chapitre II).
- (ii) Le verre prétraité avec de la PLL, méthode également très largement utilisée (lames commerciales).

Ensuite, et afin de vérifier le degré d'efficacité du traitement effectué, nous nous proposons de réaliser une étude comparative en utilisant deux souches bactériennes² :

- *P. fluorescens*, la bactérie qui fait l'objet de la présente étude ;
- *E. coli*, comme souche de référence car elle est très bien connue et beaucoup de travaux lui ont été dédiés (Bolshakova et al., 2001 ; Li et al., 2007 ; Mitik-Dineva et al., 2009 ; Colville et al., 2010 ; Yuan et al., 2017) dont ceux de notre groupe de recherche (Gammoudi, 2012; Gammoudi et al., 2014; Mathélié-Guinlet et al., 2017; Mathélié-Guinlet, 2017; Mathélié-Guinlet et al., 2018).

La caractérisation des dépôts bactériens a été réalisée par MO et AFM aussi bien dans des conditions d'air ambiant qu'en milieu liquide (eau ultra pure).

2.1 Caractérisation de *P. fluorescens* immobilisée sur une surface fonctionnalisée

Les résultats de *P. fluorescens*³ obtenus à l'air sur les surfaces fonctionnalisées⁴ (mica/PEM et verre/PLL) sont montrés dans les figures suivantes (Figures IV-1, IV-2 et IV-3).

² Le protocole expérimental de culture utilisé pour chacune des deux souches bactériennes, *P. fluorescens* et *E. coli*, est détaillé dans le chapitre II (Matériels et Méthodes).

³ Des expériences effectuées à l'air sur *E. coli* ont donné des résultats similaires à ceux obtenus avec *P. fluorescens* (voir figures IV-A1 et A2), ainsi qu'à ceux obtenus dans le cadre de travaux antérieures issus de notre groupe de recherche (Mathélié-Guinlet, 2017, Mathélié-Guinlet et al, 2018; Gammoudi et al, 2020).

⁴ Les données obtenues sur des surfaces non fonctionnalisées sont présentées dans le chapitre III (voir figures III-10 et III-15).

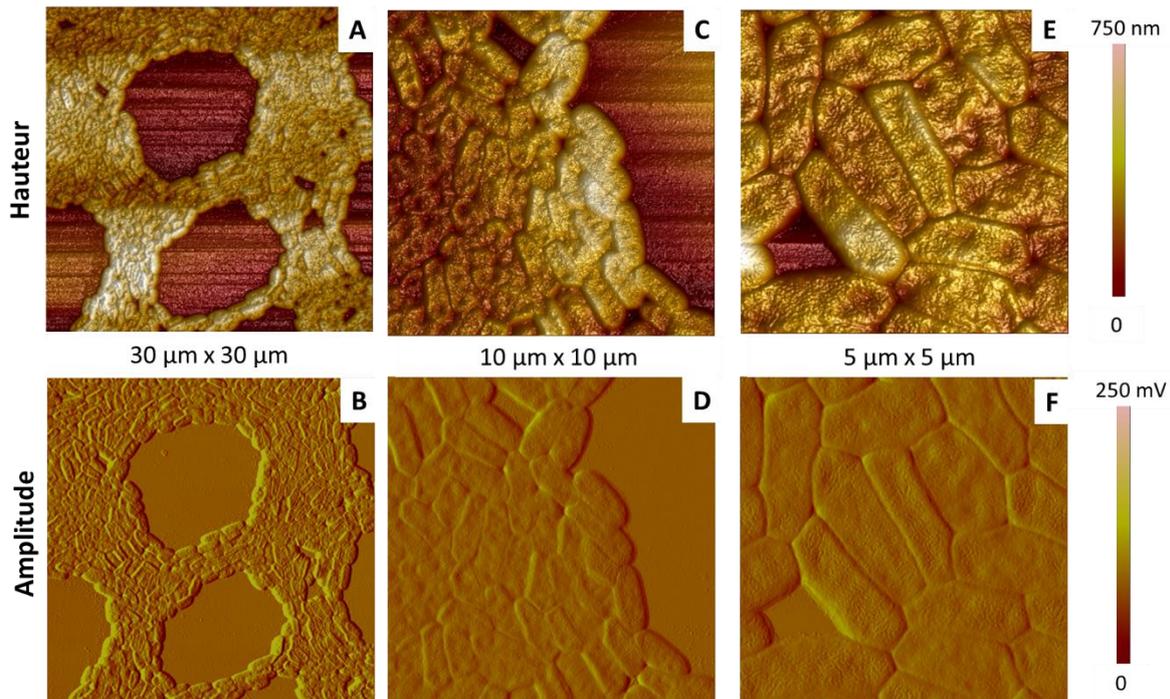


Figure IV-1 : Dépôts de *P. fluorescens* réalisés sur un substrat de verre/PLL. Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air : images de hauteur – topographie 3D (A, C, E) et d'amplitude (B, D, F).

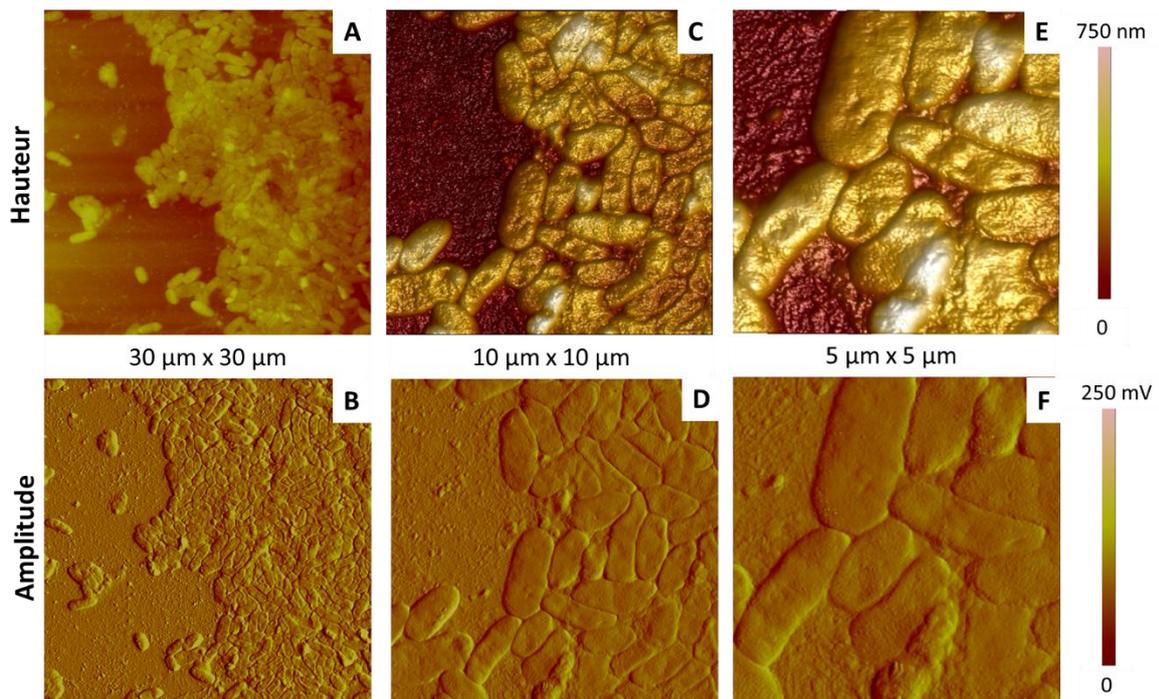


Figure IV-2 : Dépôts de *P. fluorescens* réalisés sur un substrat de mica/PEM. Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air : images de hauteur – topographie 3D (A, C, E) et d'amplitude (B, D, F).

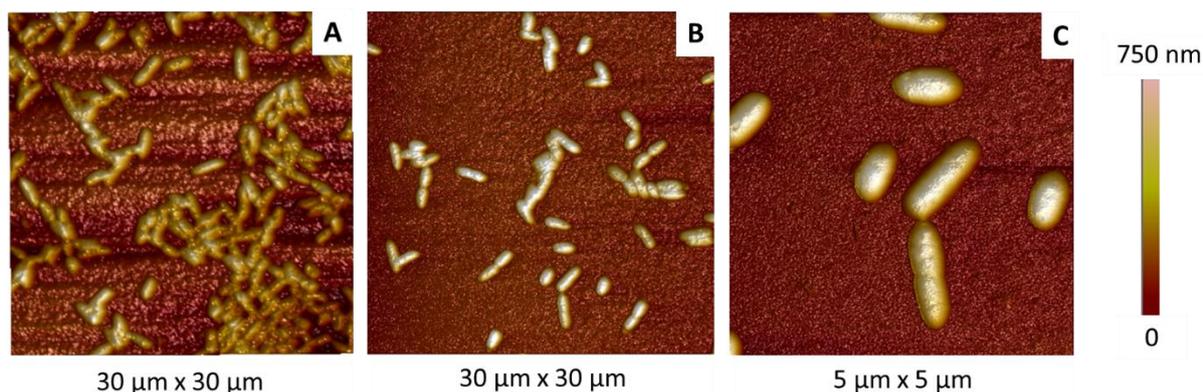


Figure IV- 3 : Différentes zones d'un dépôt de *P. fluorescens* effectué sur une surface de mica fonctionnalisée avec du PEM. Images AFM (hauteur – topographie 3D) obtenues en mode Tapping à l'air.

Les premières observations que l'on peut faire sont résumées ci-dessous :

- L'organisation des dépôts bactériens semble, globalement, ne pas dépendre de la nature du traitement effectué (mica/PEM ou verre/PLL), tout au moins à une échelle macroscopique. On observe en effet dans les deux cas, des bactéries agrégées formant des dépôts plus ou moins denses selon les zones sondées.
- On peut, néanmoins, constater quelques légères différences selon les deux traitements effectués. Dans le cas d'une fonctionnalisation verre/PLL, les bactéries sont tellement collées les unes aux autres qu'elles sont comprimées ce qui leur confère une forme géométrique « hexagonale » (Fig. IV-1). En revanche, dans le cas mica/PEM, les bactéries sont espacées les unes des autres laissant apparaître des interstices plus ou moins grands. Par conséquent, comme ces bactéries sont beaucoup moins contraintes, elles peuvent adopter des formes aux contours plus arrondis (Fig. IV-2). De plus, en présence de mica/PEM, on observe la présence de nombreux agglomérats de bactéries, déjà signalés, mais aussi des cellules individuelles dispersées et positionnées de façon aléatoire sur la surface du substrat (Fig. IV-3).
- Enfin, l'analyse de la structuration membranaire⁵ des bactéries dans les différents dépôts ne montre aucune évolution, que le substrat correspondant soit traité ou pas. Ainsi, le traitement de surface semble n'avoir aucune incidence visible sur l'état de santé de la

⁵ D'autre part, la structure membranaire atypique de *P. fluorescens* (cellules saines ou fatiguées) est bien décrite dans le chapitre III paragraphe (3.3). Voir les résultats correspondants figure III-19 et III-20.

population bactérienne sondée. L'ensemble de ces bactéries ont quasiment la même forme cylindrique⁶ que celle observée sur les substrats non traités (mica et verre).

D'autre part, l'étalement plus ou moins important d'une bactérie sur un substrat est supposé dépendre de :

- (i) la nature de l'interaction entre la cellule et la surface (selon le traitement effectué) ;
- (ii) de l'état de préservation de la morphologie bactérienne selon qu'elle soit saine, affaiblie, etc.

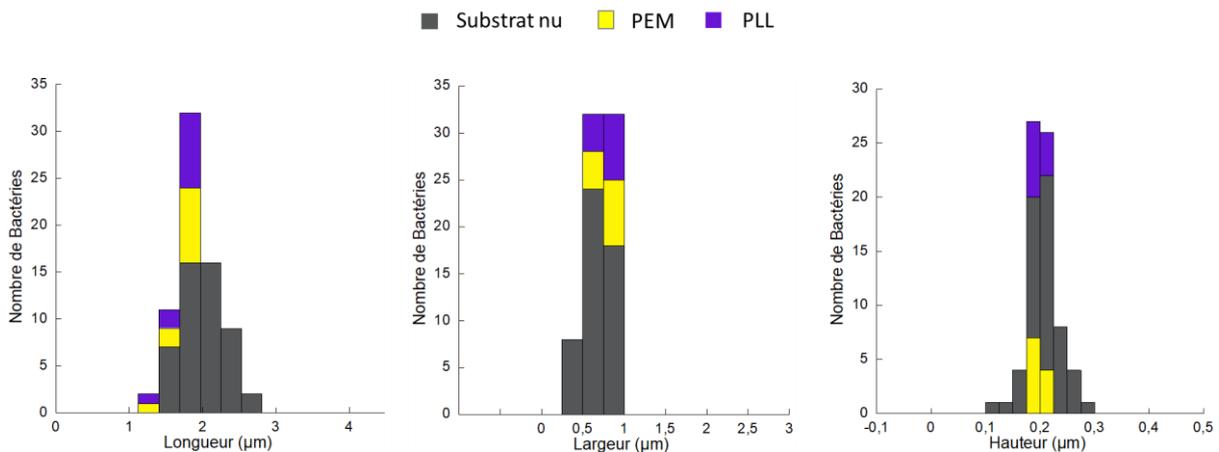


Figure IV-4 : Histogrammes des dimensions des cellules de *P. fluorescens* en fonction de la nature du substrat sur lequel elles sont déposées (mica ; mica/PEM et verre/PLL) obtenues à partir des images topographiques effectuées à l'air. Ces statistiques sont réalisées sur plusieurs cellules : mica (50), mica/PEM (10) et verre/PLL (10).

Les caractéristiques morphologiques correspondantes (longueur « L », largeur « l » et hauteur « H ») ont été mesurées, comparées à celles des dépôts sur substrats non fonctionnalisés et reportées sur la Figure IV-4. Même si on ne peut dégager aucune tendance de façon très claire, on peut, néanmoins, extraire quelques propriétés intéressantes à partir de ces données.

En effet, lorsque le dépôt est effectué sur une surface fonctionnalisée (PEM ou PLL), les dimensions des cellules (longueur, largeur et hauteur) sont plus homogènes et varient peu. En revanche, et dans le cas le cas d'un dépôt sur un substrat nu les caractéristiques morphologiques des bactéries sont très hétérogènes (Fig. IV-4).

D'autre part, et pour approfondir l'analyse de nos données, nous nous sommes intéressés à un autre paramètre, le rapport l/H et l'avons utilisé comme un des critères qui pourrait refléter la

⁶ On peut aussi trouver une forme bactérienne hexagonale notamment quand le dépôt est très dense et compact.

(plus ou moins) préservation de la forme des cellules bactériennes après fixation sur un substrat (Fig. IV-5). En effet, certaines bactéries sont connues pour être plutôt aplaties et d'autres plutôt cylindriques mais le problème est qu'on ne sait rien sur la morphologie de *P. fluorescens* déposée sur un substrat. Par conséquent, la morphologie qui se rapprocherait le plus de celle de la forme bactérienne planctonique devrait correspondre à un rapport l/H le plus élevé possible (Chao and Zhang, 2011; Liu et al., 2012). Par conséquent, un rapport l/H proche de 1 suggère une meilleure préservation de la forme bactérienne. Inversement, un rapport plus faible pourrait correspondre à un étalement fort de la bactérie sur le substrat.

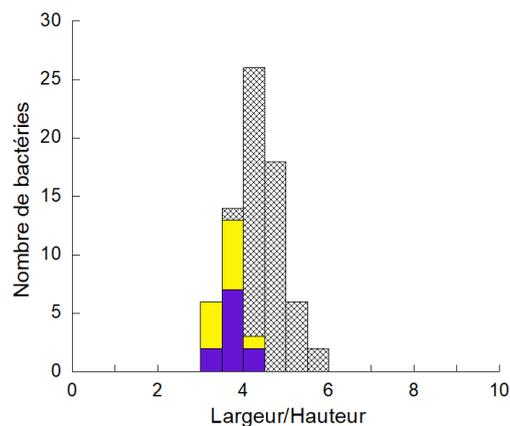


Figure IV-5 : Rapport largeur/hauteur (l/H) des bactéries *P. fluorescens* en fonction de la nature du substrat : mica nu (motif gris hachuré) et substrats fonctionnalisés, mica/PEM (motif plein jaune) et verre/PLL (motif plein violet). Ces statistiques sont réalisées sur plusieurs cellules : verre/PLL (10) ; mica/PEM (10) et mica nu (50).

Les principales constatations extraites du graphe de la figure IV-5 sont les suivantes :

- Le rapport l/H est un peu plus faible dans le cas des substrats traités. Ce résultat nous paraît logique car on peut s'attendre à avoir une meilleure interaction entre les bactéries et un substrat fonctionnalisé imposant des contraintes aux cellules et induisant des modifications morphologiques sans pour autant impacter de façon significative leur état de santé. Cela est d'ailleurs bien visible sur les images de phase qui montrent la structuration membranaire observée habituellement dans le cas de bactéries saines et non stressées⁷.
- D'autre part, les distributions du rapport l/H sont sensiblement les mêmes pour les deux types de traitement (mica/PEM et verre/PLL), ce qui peut indiquer que l'affinité du même ordre de grandeur entre *P. fluorescens* et les surfaces de ces substrats.

⁷ Voir le chapitre III (partie morpho – paragraphes 3.3) ainsi que les Figures III-19 et III-20 du chapitre III.

Nous pouvons déduire, à partir de l'analyse de ces données, que les traitements de surface effectués ne dénaturent pas *P. fluorescens*. Il nous reste maintenant à vérifier l'efficacité du traitement effectué et donc le bon attachement du dépôt bactérien sur les substrats fonctionnalisés.

2.2 Test de l'efficacité de l'immobilisation de *P. fluorescens* sur une surface fonctionnalisée

2.2.1 Effet du rinçage

Nous avons effectué un test qualitatif de l'efficacité de l'immobilisation bactérienne sur les substrats traités. Pour ce faire, une goutte de 20 µl de suspension bactérienne est étalée sur le substrat considéré puis séchée 30 min. Le rinçage s'effectue à l'eau ultra pure en deux temps et de deux manières différentes : le premier rinçage est doux⁸ et rapide, le second est long et intense⁹. Les échantillons sont ensuite observés par MO.

Les Figures IV-6 et IV-7 montrent les résultats les plus représentatifs obtenus avec les dépôts de *P. fluorescens* sur différents substrats, non fonctionnalisés (verre et mica nus) et fonctionnalisés (verre/PLL et mica/ PEM).

Avant rinçage, dans le cas des substrats non fonctionnalisés, le dépôt bactérien est relativement dense (Fig. IV-6, images A et D) et aucune organisation particulière n'est observée. Dès le premier rinçage, même s'il est doux (Fig. IV-6, images B et E), la couverture du substrat par la population bactérienne se réduit, les cellules détachées étant probablement celles qui étaient le moins bien fixées. Le détachement des cellules se poursuit lors du second rinçage, beaucoup plus intense (Fig. IV-6, images C et F). On peut aussi remarquer la différence d'adhésion bactérienne sur les deux substrats de référence, la population bactérienne après les deux rinçages étant plus importante sur le mica (Fig. IV-6, images C et F).

⁸ Le rinçage doux est réalisé à l'aide d'une micropipette, avec le dépôt d'une goutte d'eau ultra pure sur le substrat puis sa ré-aspiration après 10 secondes. L'opération est répétée à plusieurs reprises de 5 à 10 fois par échantillon, afin d'éliminer les bactéries non adhérentes au substrat.

⁹ Le rinçage énergétique est réalisé à l'aide d'une pissette, en appliquant une forte pression. On peut alors supposer que le jet d'eau permet d'éliminer les bactéries pourtant bien fixées au substrat. De la même manière, le rinçage est effectué à plusieurs reprises, entre 5 à 10 fois par échantillon.

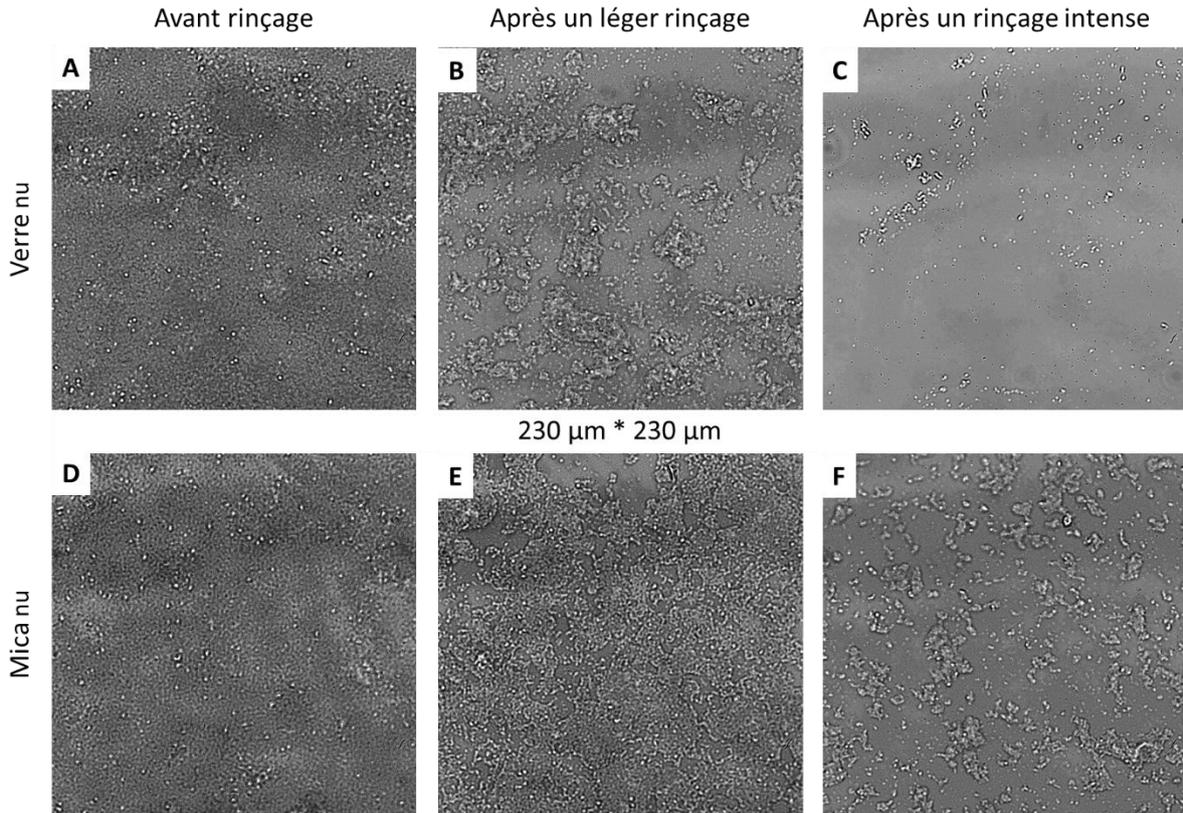


Figure IV-6 : Effet du rinçage sur l'attachement de dépôts de *P. fluorescens* effectués sur différents substrats de référence (non fonctionnalisés). Images de MO.

Dans le cas des surfaces fonctionnalisées, la densité initiale du dépôt de *P. fluorescens* ainsi que son organisation en réseau (Fig. V-7A) évoluent légèrement à la suite des deux rinçages successifs, le doux (Fig. V-7B) puis le plus intense (Fig. V-7C). Une fois que les cellules les moins bien fixées sont complètement détachées, et bien que le dépôt bactérien soit moins dense qu'avant le rinçage, la surface est toujours recouverte par les bactéries (un taux de 50% voire même plus) et le caractère en réseau du dépôt est aussi maintenu, ce qui suggère que le traitement de surface effectué est efficace (Fig. V-7B et V-7E) et que la bonne adhésion du dépôt bactérien est vérifiée.

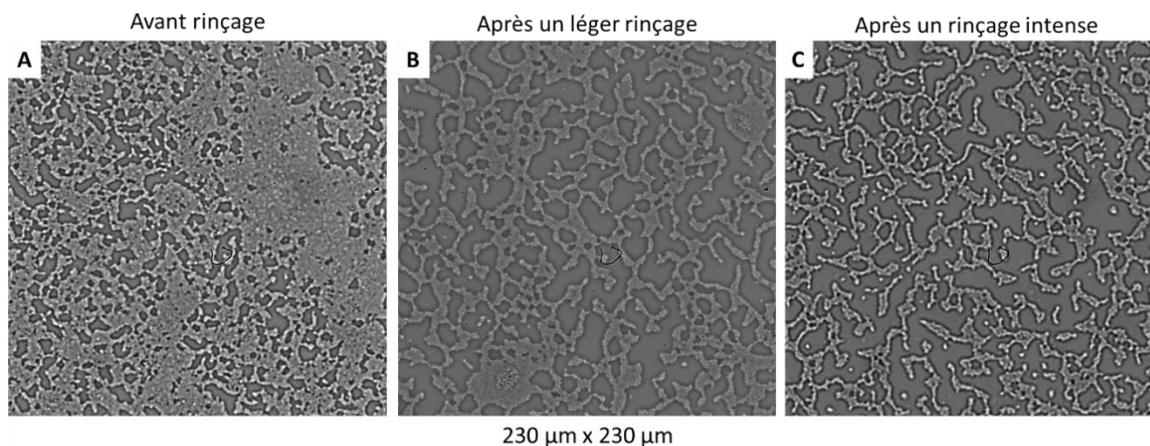


Figure IV-7 : Effet du rinçage sur l'attachement de dépôts de *P. fluorescens* effectués sur un substrat verre/PLL¹⁰. Images de MO.

Des observations similaires ont été effectuées dans le cas des dépôts bactériens de la souche *E. coli* (Fig. IV-A1 et A2) (Gammoudi et al., 2016; Mathelié-Guinlet, 2017; Gammoudi et al., 2020).

Par conséquent, les deux traitements de surface effectués semblent être efficaces pour l'immobilisation de *E. coli* mais aussi de *P. fluorescens*.

2.2.2 Caractérisation par AFM en milieu liquide d'un dépôt de *P. fluorescens* sur les substrats fonctionnalisés

Pour bien caractériser des dépôts bactériens par AFM en milieu liquide, il faut que la solution dans laquelle baigne la sonde AFM ne soit pas polluée. Autrement dit, il faut éviter que certaines cellules ne se détachent de la surface et ne viennent se coller à la pointe. La pollution de la pointe AFM peut modifier la nature de l'interaction entre la sonde et l'échantillon analysé et donc induire une dégradation des conditions d'imagerie et une altération des mesures effectuées. Par conséquent, plusieurs rinçages intensifs seront nécessaires. D'autre part, pour éviter la déformation des cellules par la pointe AFM et garantir l'obtention d'images exploitables représentatives du dépôt étudié, la force appliquée par la pointe AFM sur les bactéries doit être minimisée¹¹.

Nous commençons, tout d'abord, par sélectionner par MO des zones d'intérêt du dépôt bactérien (choisies aléatoirement) (Fig. IV-8A, cadres rouge et violet) qui seront, ensuite, imagées par AFM (Fig. IV-8B et Fig. IV-8C). Le fait de réussir à imager le dépôt bactérien sans

¹⁰ Des expériences similaires ont été effectuées sur le substrat fonctionnalisé mica/PEM.

¹¹ Les conditions dans lesquelles sont effectuées ces mesures sont détaillées dans le chapitre II (Matériels et Méthodes).

déplacer la totalité des cellules est encourageant et montre que la fonctionnalisation du substrat a une certaine efficacité d'autant plus que le dépôt résiste malgré plusieurs balayages¹² de la pointe.

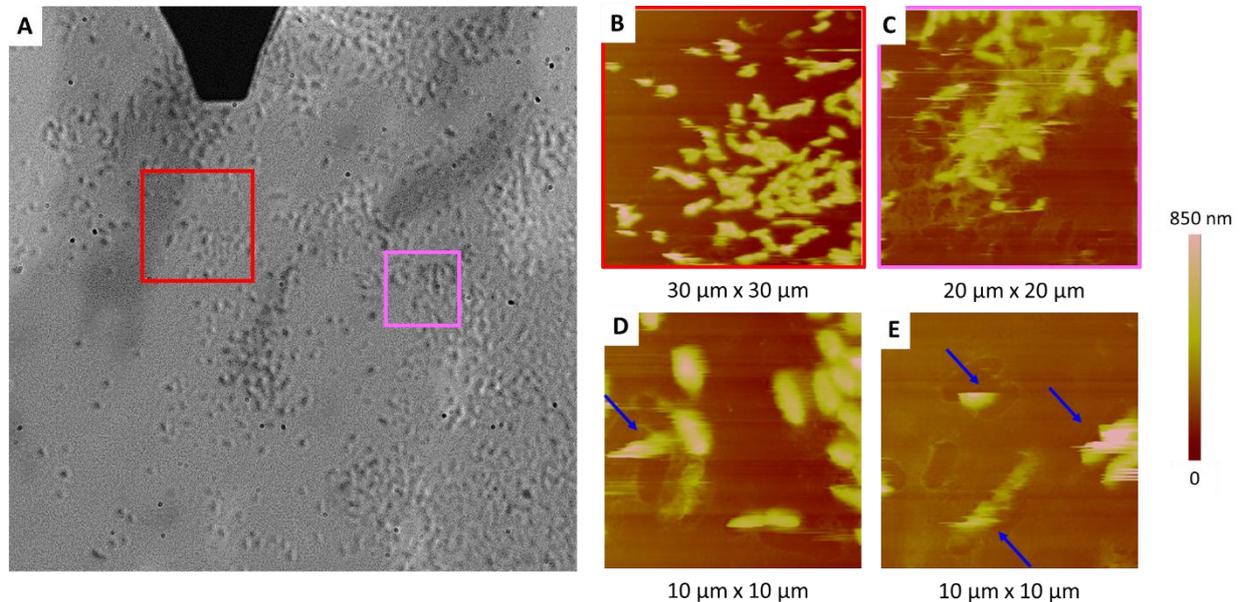


Figure IV-8 : Dépôt de *P. fluorescens* sur un substrat fonctionnalisé (mica/PEM) observé en milieu liquide. (A) Image de microscopie optique et (B, C, D, E) images AFM de hauteur (Topographie 2D) obtenues en mode contact. Flèches bleues (bactérie déplacées ou détachée).

D'autre part, les images AFM obtenues en milieu liquide sont souvent moins nettes que celles obtenues à l'air. On observe aussi parfois des trainées sur différentes cellules suite au passage de la sonde AFM qui peut les déformer, les faire bouger voire même les déplacer et les détacher (voir flèches sur la Fig. IV-8, images D et E). On peut d'ailleurs apercevoir, à différents endroits de l'échantillon, des empreintes laissées par des bactéries qui se sont détachées de la surface (Fig. IV-8, images C à E).

Dans ce contexte, pour vérifier l'effet du mouvement de la pointe sur le décollement potentiel des cellules, nous avons suivi le même lot de bactéries (immobilisées sur du mica/PEM) en effectuant des balayages successifs¹³ (Fig. IV-9). On aperçoit, à la suite du premier balayage de la zone (Fig. IV-9, images A et E), des trainées témoignant du mouvement des bactéries

¹² Le mouvement (balayage) de la pointe AFM met en jeu des forces hydrodynamiques (latérales) suffisamment importantes pour faire bouger les bactéries voire même les détacher quand elles sont peu adhérentes à la surface du substrat.

¹³ Afin de ne pas perturber cette expérience en introduisant une contrainte supplémentaire qui viendrait fausser les mesures, la force exercée par la pointe est la plus faible possible.

concernées causés par le passage de la pointe AFM. On constate que certaines bactéries, comme la N°2, commencent à se décoller du substrat dès le premier passage de la sonde AFM (1^{ère} image enregistrée) (Fig. IV-9A). Cela se confirme lors des passages suivants (Fig. IV-9, images B et E) puisque non seulement cette bactérie N°2 s'est complètement décollée mais d'autres font de même (bactéries N° 5 à 8). Par ailleurs, bien que la cellule N°1 soit restée attachée à la surface plus longtemps que les autres, elle finit tout de même par se décoller pour ne laisser place qu'à son empreinte très visible sur l'image zoomée (Fig. IV-9, images D et H). Des résultats similaires ont été obtenus avec les dépôts bactériens de *P. fluorescens* effectués sur le verre/PLL.

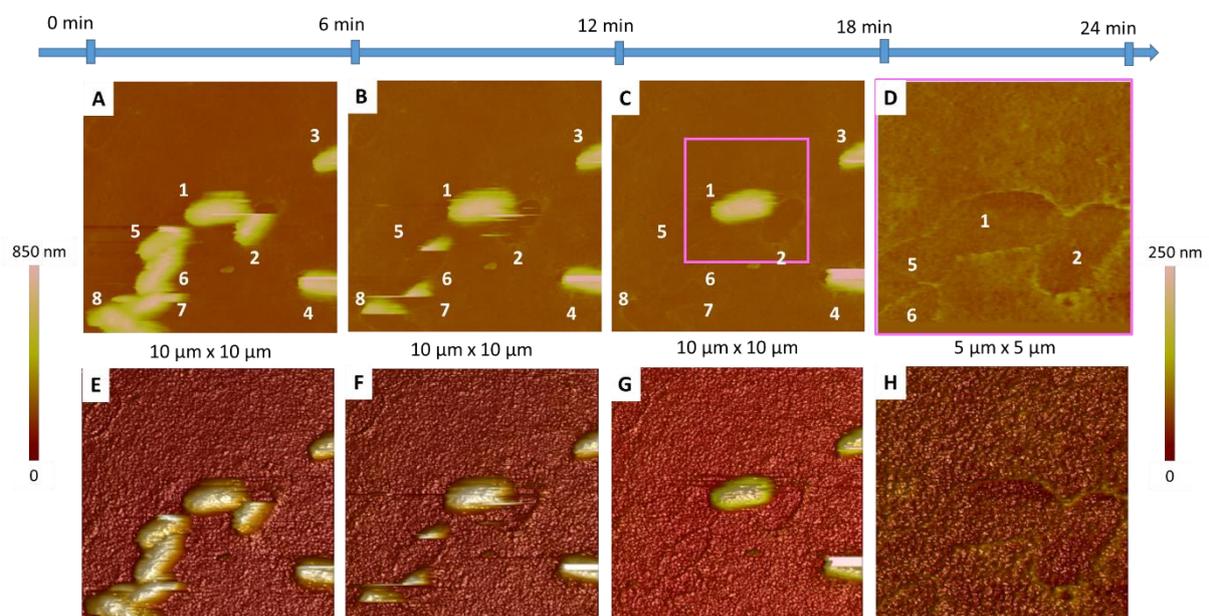


Figure IV-9: Suivi, en milieu liquide, de l'adhésion d'une population bactérienne de *P. fluorescens* déposée sur du mica/PEM. Images AFM de hauteur obtenues en mode contact. (A, B, C, D) topographie 2D ; (E, F, G, H) topographie 3D. La durée séparant l'enregistrement de deux séquences successives est de 6 min.

L'ensemble de nos résultats montrent que la fonctionnalisation des substrats (mica/PEM ou verre/PLL) favorise effectivement l'immobilisation de *P. fluorescens* ce qui permet sa caractérisation en milieu liquide et sur un temps relativement long puisque nous avons réussi à effectuer plusieurs balayages sur les mêmes zones avant que des cellules ne se décollent. Néanmoins, on constate que l'adhésion de *P. fluorescens* se fait avec une intensité variable contrairement à celle de *E. coli*¹⁴ qui était systématiquement beaucoup plus efficace. En effet,

¹⁴ Ces résultats sont en bon accord avec des études précédentes portant sur *E. coli* et d'autres espèces bactériennes aussi bien Gram- que Gram+ (Gammoudi, 2012; Gammoudi et al., 2013, 2014, 2020; Mathélié-Guinlet, 2017b; Mathélié-Guinlet et al., 2017).

les dépôts de *E. coli* sont le plus souvent beaucoup plus stables en milieu liquide malgré de nombreux passages de la sonde AFM, sans déformer et/ou détacher les cellules. Comme les deux souches, *P. fluorescens* et *E. coli*, sont toutes les deux de type Gram- avec des enveloppes bactériennes chargées négativement, on aurait pu s'attendre à ce que leur adhésion sur un substrat chargé positivement (mica/PEM) soit équivalente, mais ce n'est pas ce que nous observons. Une des explications potentielles pourrait être la différence très probable au niveau des enveloppes bactériennes des deux souches, *P. fluorescens* et *E. coli*, en particulier au niveau des LPS qui n'ont pas la même structure biochimique (Farhana and Khan, 2021).

2.2.3 Caractéristiques morphologiques de *P. fluorescens* in vitro

Les données morphologiques (longueur, largeur, hauteur) des bactéries *P. fluorescens* extraites des images topographiques effectuées en milieu liquide sont reportées sur les figures IV-10 et IV-11 et sont comparées à celles obtenues à l'air.

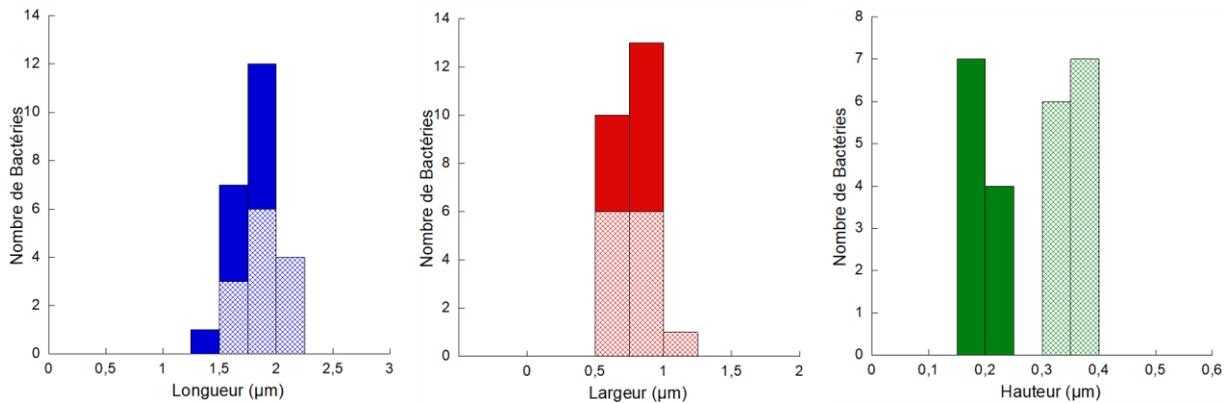


Figure IV-10 : Evolution des dimensions (longueur, largeur, hauteur) des bactéries *P. fluorescens* déposées sur un substrat fonctionnalisé (mica/PEM) à l'air (motif plein) et en milieu liquide (motif hachuré). Ces statistiques sont réalisées sur plusieurs bactéries : (10) à l'air et (10) en milieu liquide.

D'après ces données, l'augmentation du volume cellulaire provient essentiellement à l'augmentation relativement importante de la hauteur de la bactérie, de quasiment un facteur deux, pour atteindre parfois la valeur de 380 nm alors que la hauteur maximale obtenue à l'air ne dépasse pas les 220 nm. Une telle augmentation entre les hauteurs mesurées à l'air et en milieu liquide a aussi été observée chez de nombreuses souches bactériennes comme *E. coli* et *P. putida* (Huang et al., 2014; Buwitt-Beckmann et al., 2006; Bolshakova et al., 2001; Doktycz et al., 2003; Mathelié-Guinlet et al., 2018). Il arrive même parfois que le rapport de hauteur soit encore plus important, comme dans le cas des cyanobactéries qui ont une hauteur moyenne de l'ordre de 300 nm quand elles sont imagées par AFM dans une atmosphère gazeuse alors qu'en milieu physiologique cette hauteur atteint des valeurs relativement importantes comprises entre

1 et 1,5 μm (Dhahri, 2013). Cette variation de hauteur résulte, quand la cellule est à l'air, de la perte d'une quantité importante de l'eau¹⁵ contenue dans le corps cellulaire et non à la lyse cellulaire puisque le matériel intracellulaire n'est pas présent sur la surface autour de la bactérie (Buwitt-Beckmann et al., 2006). D'autre part, cet effondrement de la cellule lors de sa déshydratation est causé par une rigidité insuffisante de la paroi cellulaire bactérienne qui ne lui permet pas de conserver sa forme lorsqu'elle se vide d'une partie importante de son eau (Buwitt-Beckmann et al., 2006; Doktycz et al., 2003; Huang et al., 2014).

3. Fixation de *Pseudomonas fluorescens* au glutaraldéhyde

Il existe d'autres modes de fixation des dépôts bactériens sur les substrats que la fonctionnalisation de leurs surfaces. Ces méthodes de fixation peuvent être classées en deux groupes : les fixations additives (ou de réticulation) et dénaturantes (ou précipitantes). Les solutions de fixation additive contiennent divers aldéhydes et peuvent créer des liaisons chimiques covalentes tout en préservant la structure naturelle des protéines (Meade et al., 2010). La seconde catégorie repose sur la dénaturation¹⁶ des protéines en réduisant leur solubilité et/ou en perturbant les interactions hydrophobes entre autres (St-Laurent et al., 2006).

Le glutaraldéhyde (un aldéhyde) est l'un des fixateurs les plus utilisés dans la préparation d'échantillons biologiques notamment pour les caractérisations par MEB (Wang et al., 2002; Morono et al., 2004; Fratesi et al., 2004; Chao and Zhang, 2011; B. Y. Liu et al., 2012; Vikram et al., 2015). Comme il s'agit d'un fixateur chimique, on s'attend bien évidemment à voir apparaître des modifications de la structure de la paroi cellulaire, de la forme des bactéries, etc.

D'autre part, les alcools (tels que l'éthanol) ou l'acétone sont couramment utilisés comme techniques de déshydratation pour purger l'eau d'un échantillon avant le séchage à l'air (Murakami, 1973; Fratesi et al., 2004). L'objectif est de réduire les forces de tension superficielle destructrices qui se produisent à l'interface air-eau pendant la phase de séchage (Anderson, 1951; Cohen, 1979; Fratesi et al., 2004). Pour améliorer les performances de fixation, les alcools sont souvent combinés à d'autres produits chimiques, potentiellement dénaturants (Moloney et al., 2004).

¹⁵ L'eau représente environ 70% du contenu cellulaire.

¹⁶ Dans la fixation dénaturante, l'eau des différents constituants cellulaires est éliminée. La structure tertiaire des protéines est modifiée et les sites enzymatiques sont inactivés, mais les sites antigéniques sont conservés. L'acétone-méthanol est un exemple de méthode de fixation (Pearse, 1980; Suthipintawong et al., 1996).

Nous nous proposons dans ce travail de coupler deux techniques de caractérisation, le MEB et l'AFM, pour :

- (i) Évaluer les effets de la fixation au glutaraldéhyde sur l'espèce *P. fluorescens* ;
- (ii) Tester l'efficacité de cette fixation sur l'adhésion du dépôt bactérien sur un substrat non fonctionnalisé (verre et mica).

3.1 Caractérisation par MEB d'un dépôt bactérien de *P. fluorescens* fixé

La Figure IV-11 présente les images MEB des dépôts de *P. fluorescens* effectués sur un substrat de verre. Le protocole correspondant est décrit dans le Chapitre II.

La première observation que l'on peut faire est que ces résultats sont similaires à ceux obtenus précédemment, notamment par AFM, que le substrat soit fonctionnalisé ou pas. En effet, le dépôt bactérien relativement dense met en évidence une organisation en réseau (Fig. IV-11, images A et B) déjà observée par AFM y compris quand les cellules ne subissent aucun traitement (voir chapitre III, Fig. III-5 et III-10). Or, les travaux de (Seghir et al., 2015) montrent que la population bactérienne produite ainsi que sa structuration dépendent de plusieurs paramètres : la nature des souches considérées, la composition du milieu de culture utilisé et aussi la nature de la surface du support utilisé.

Ensuite, nous pouvons noter que l'agencement de certains agrégats bactériens est « orienté », les cellules étant situées le plus souvent soit « côte à côte » soit « alignées en tête à queue ». Or, il est bien connu qu'en plus des interactions cellules-surface du substrat, les interactions cellule-cellule sont aussi des caractéristiques majeures des modes de vie bactériens et qu'elles peuvent affecter la physiologie, la viabilité et l'activité métabolique des cellules (Potthoff et al., 2015). On sait aussi que la fixation des bactéries à différentes surfaces implique des mécanismes complexes mettant en jeu des interactions physico-chimiques différentes qui entraînent soit l'attraction des bactéries entre elles soit leur répulsion (Teughels et al., 2006). Il est d'ailleurs bien connu que la composition chimique de la surface joue un rôle dans la formation du dépôt bactérien (Auschill et al., 2002). On peut citer par exemple les travaux de (Luo et al., 2010), qui mettent en évidence le fait que l'interaction avec une surface hydrophile permet de maintenir la membrane externe de la cellule relativement "rigide" tandis que l'interaction avec une surface hydrophobe ramollit l'enveloppe bactérienne. De telles observations nous aident à expliquer, en partie, les différents positionnements et agencements des bactéries que nous avons obtenues.

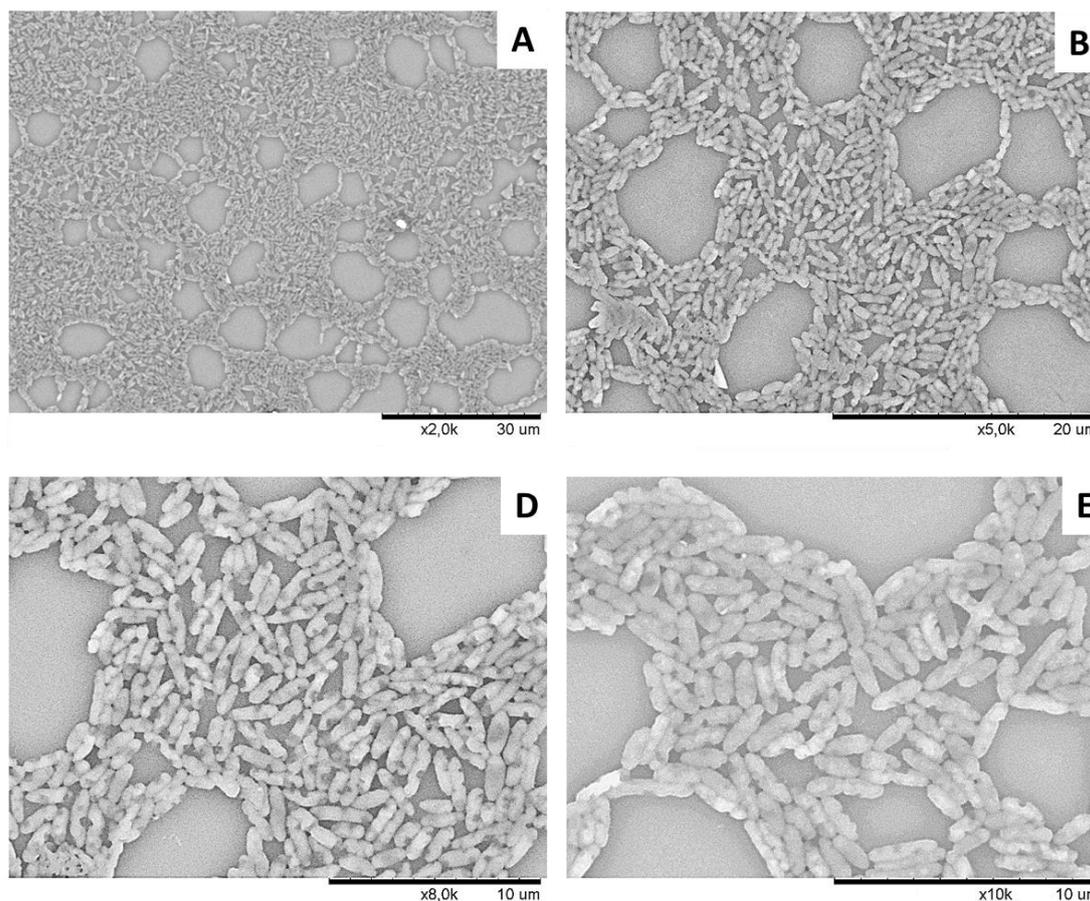


Figure IV-11 : Images MEB d'un dépôt bactérien de *P. fluorescens* fixé au glutaraldéhyde sur un substrat de verre.

D'autre part, bien que la forme en bâtonnet des bactéries soit conservée, on peut néanmoins constater une morphologie bactérienne assez atypique et très irrégulière (Fig. IV-11 ; images E et D). On aperçoit, en effet, chez de nombreuses cellules, une paroi bactérienne présentant des invaginations tellement profondes que les bactéries semblent apparaître comme percées, ce qui laisse supposer que le traitement effectué a probablement altéré leurs parois cellulaires. Cependant, ces dommages ne semblent pas être suffisamment importants pour provoquer la lyse cellulaire puisque, non seulement, ces bactéries ne se sont pas vidées de leur contenu mais, en plus, leur forme globale est toujours maintenue.

Ces changements morphologiques se sont produits lors d'une des étapes du traitement au glutaraldéhyde. Or le protocole que nous avons suivi nécessite l'utilisation de l'éthanol notamment dans l'étape de préparation pour le séchage. Alors, pour vérifier le rôle de l'éthanol sur les dommages observés, nous avons comparé deux traitements au glutaraldéhyde : l'un avec éthanol et l'autre sans cet alcool. Cependant, comme la caractérisation par MEB nécessite obligatoirement un traitement des échantillons à l'éthanol, cette étude comparative ne peut se

faire par MEB. Par conséquent, les caractérisations qui vont suivre sont réalisées uniquement par MO et par AFM.

3.2 Effet de l'éthanol dans le processus de fixation de *P. fluorescens* au glutaraldéhyde

La caractérisation s'est effectuée, dans un premier temps, par MO. Outre le fait que cela nous permet de vérifier que le dépôt est fixé au substrat, on peut aussi avoir une vision plus globale de son organisation. Les résultats correspondants sont reportés dans la figure IV-12.

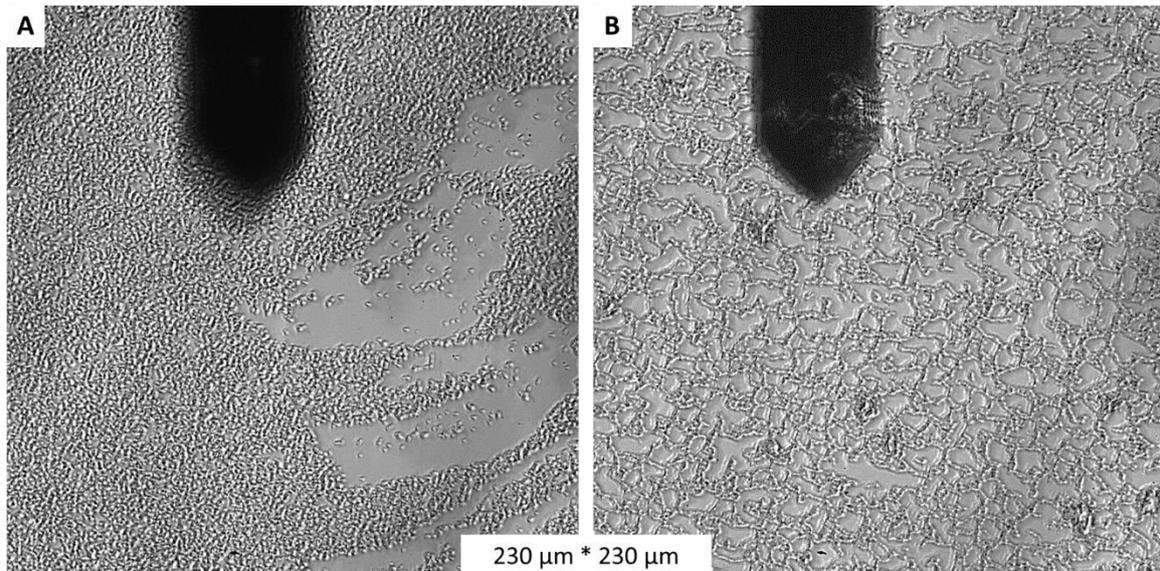


Figure IV-12 : Images de MO d'un dépôt bactérien de *P. fluorescens* déposé sur un substrat de verre après fixation au glutaraldéhyde (A) sans éthanol et (B) en présence d'éthanol.

Nos résultats montrent que la présence de l'éthanol dans le traitement au glutaraldéhyde induit une modification de l'organisation du dépôt bactérien, tout au moins à une échelle macroscopique. En effet, dans le cas d'une fixation au glutaraldéhyde sans éthanol (Fig. IV-12A), le dépôt bactérien ne présente aucune organisation particulière et la répartition des zones denses du dépôt à plus ou moins denses semble aléatoire. En revanche, dans le cas du traitement avec éthanol (Fig. IV-12B), on retrouve une organisation du dépôt bactérien en réseau tout comme dans le cas des bactéries non traitées au glutaraldéhyde.

L'analyse de ces mêmes échantillons par AFM (Fig. IV-13 et IV-14) permet d'effectuer les mêmes observations que celles obtenues par MEB quand la fixation se fait au glutaraldéhyde en présence d'éthanol (Fig. IV-13).

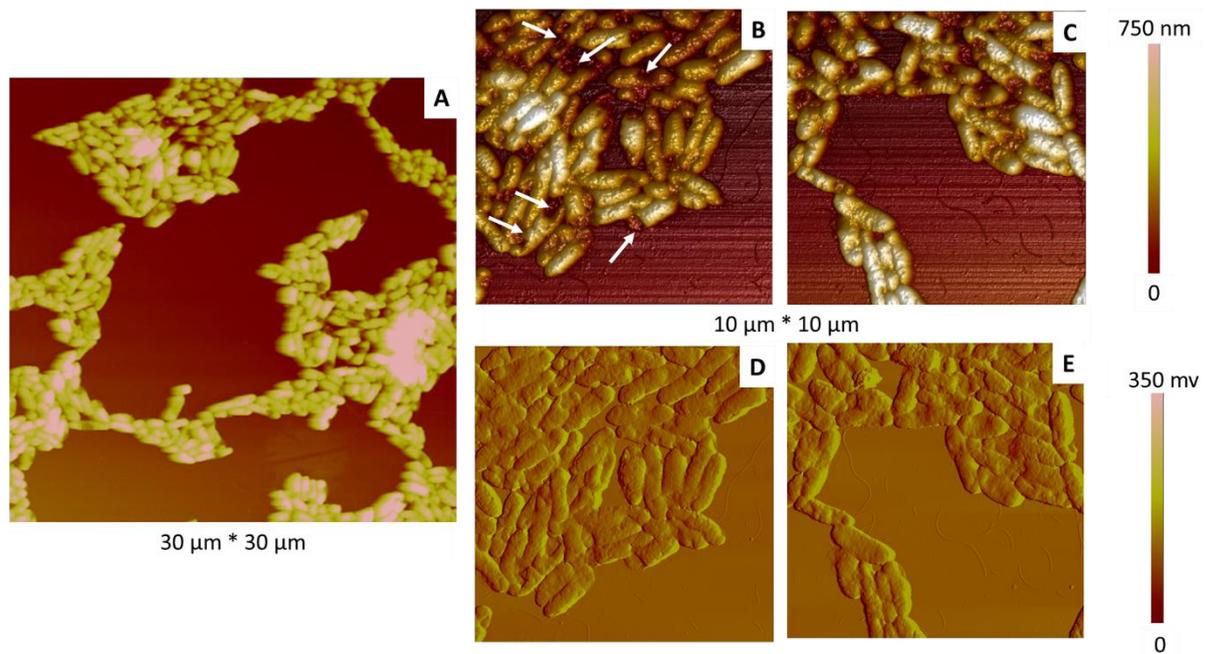


Figure IV-13 : Dépôt bactérien de *P. fluorescens* déposé sur le mica après fixation au glutaraldéhyde avec éthanol. Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air. (A) Topographie 2D ; (B, C) topographie 3D ; (D, E) images d'amplitude. Fleches blanches (parfois bactérienne altérée).

La présence de l'éthanol dans le traitement au glutaraldéhyde semble mieux préserver la morphologie cellulaire puisque les cellules sont plus volumineuses (Fig. IV-13) et bien que la paroi cellulaire soit (parfois) altérée, les dégâts sont moins importants (voir flèches blanches - Fig. IV-13 et Fig. IV-14). L'absence d'éthanol dans le processus de fixation pourrait être liée à l'important rétrécissement des bactéries, aux altérations de la forme bactérienne qui sont très prononcées ainsi qu'à la modification de la structure membranaire. On peut même trouver, des cellules qui commencent à se vider de leur contenu et d'autres qui le sont complètement, ce qui correspond clairement à une lyse cellulaire (voir flèches bleues - Fig. IV-14).

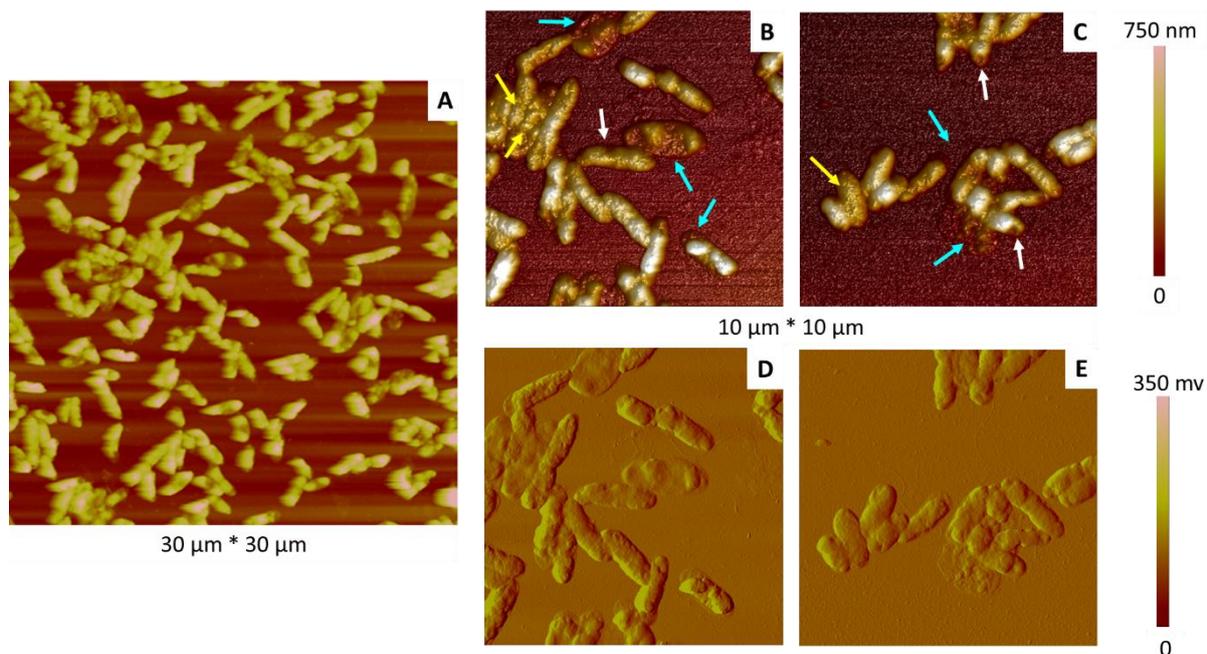


Figure IV-14 : Dépôt bactérien de *P. fluorescens* déposé sur le mica après fixation au glutaraldéhyde sans éthanol. Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air. (A) Topographie 2D ; (B, C) topographie 3D ; (D, E) images d'amplitude.

Finalement, l'ensemble de nos résultats montrent que les dommages cellulaires sont moins nombreux quand la fixation se fait en présence d'éthanol. Par conséquent, l'éthanol peut être considéré comme un élément important dans le processus de fixation puisqu'il remplace l'eau enfermée dans les bactéries tout en réduisant les forces de tension superficielle qui se produisent à l'interface air-eau pendant le séchage à l'air et peuvent s'avérer destructrices comme observé dans notre étude ainsi que dans le cadre d'autres travaux (Chao and Zhang, 2011; Fratesi et al., 2004; Y. Liu et al., 2012).

Pour la suite, et dans l'objectif de vérifier l'effet « potentiellement toxique » du glutaraldéhyde seul, nos échantillons seront traités au glutaraldéhyde sans la présence d'éthanol.

3.3 Caractérisation par AFM de *P. fluorescens* fixée au glutaraldéhyde en absence d'éthanol

Nous avons alors testé des populations bactériennes fixées au glutaraldéhyde (en absence d'éthanol) et déposées sur du mica¹⁷.

¹⁷ D'autres dépôts ont été fixés sur du verre.

Les résultats issus des nombreuses expériences effectuées sont reproductibles et nous ont permis de compléter notre compréhension de l'étude initiée précédemment. Les résultats les plus représentatifs sont présentés dans les Figures IV-15 et IV-16.

Dans le cas de la Figure IV-15 (images A et D), le dépôt bactérien obtenu est relativement dense, et on peut observer (parfois) des multicouches (voir les flèches roses, Fig. IV-15A). Les bactéries ont une forme cylindrique et elles sont en majorité plus longues que celles des dépôts non traités au glutaraldéhyde. D'autre part, la paroi membranaire correspondante est relativement lisse et ne présente pas la structuration membranaire « *en ripples* » qu'ont les bactéries non traitées au glutaraldéhyde (Fig. IV-15, images A et D & Fig. IV-16, images A et D).

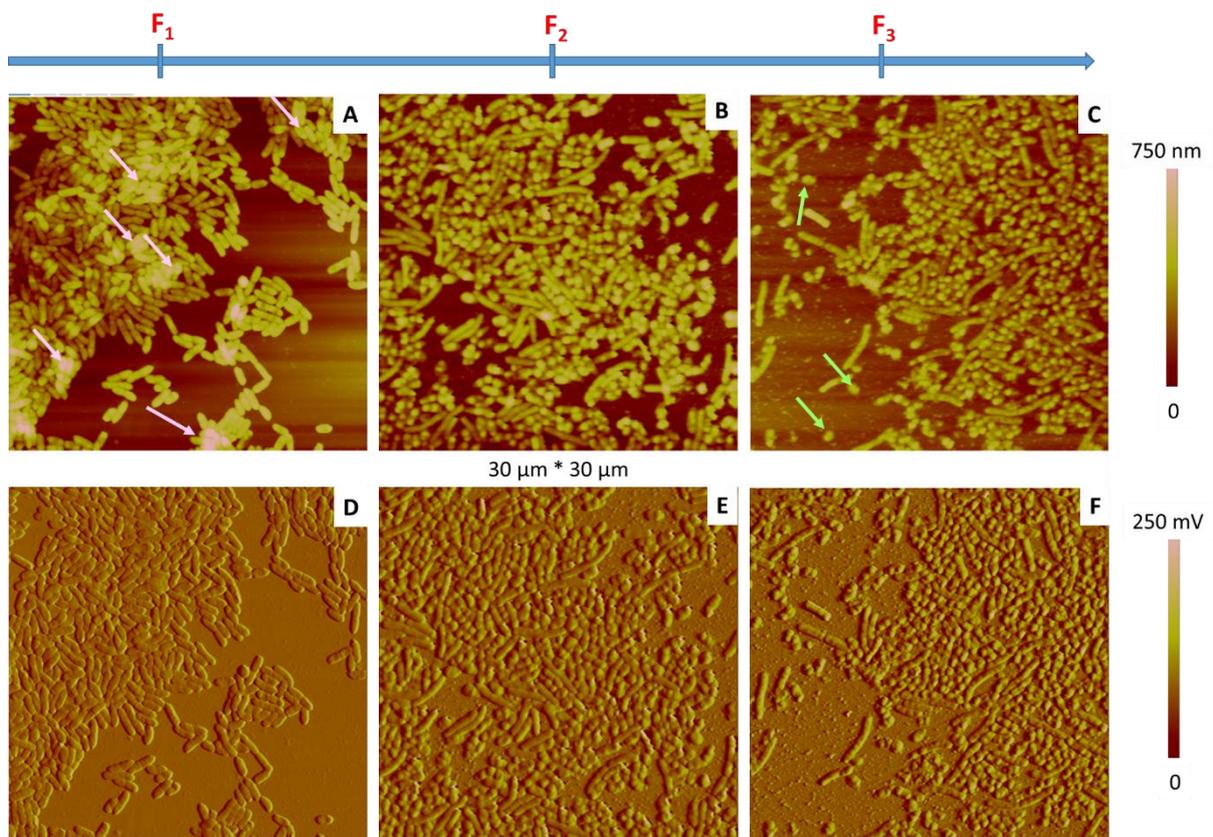


Figure IV-15 : Trois dépôts différents de *P. fluorescens* fixés au glutaraldéhyde (sans éthanol) et déposés sur une surface de mica nue. Les images AFM sont effectués en mode contact à l'air avec des forces F appliquées différentes, respectivement F_1 (A, D) ; F_2 (B, E) et F_3 (C, F) telles que $F_3 > F_2 > F_1$. (A, B, C) images de hauteur – topographie 2D ; (D, E, F) images de déflexion.

En revanche, pour un grand nombre de dépôts, les bactéries ont une morphologie particulière beaucoup plus sphérique, comme si le contenu cellulaire des bactéries s'était fragmenté en particules sphériques recouvertes par une membrane bactérienne. Cette morphologie atypique pourrait être liée à la présence de nombreuses invaginations relativement profondes qui

confèreraient à la bactérie cette morphologie fragmentée et/ou plus simplement, à une altération de la paroi bactérienne (Fig. IV-15, images B-C et E-F).

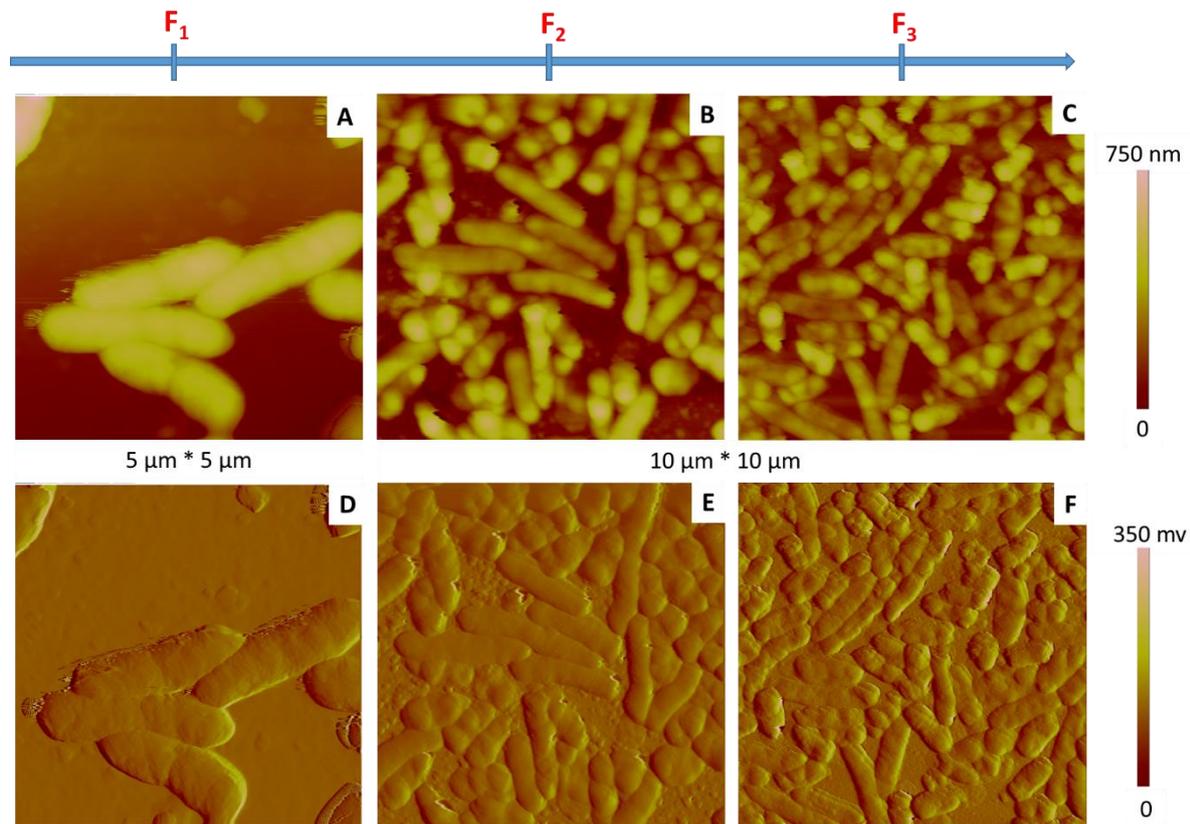


Figure IV-16 : Trois dépôts différents de *P. fluorescens* fixés au glutaraldéhyde (sans éthanol) et déposés sur une surface de mica nue. Les images AFM sont effectuées en mode contact à l'air avec des forces F appliquées différentes, respectivement F_1 (A, D) ; F_2 (B, E) et F_3 (C, F) telles que $F_3 > F_2 > F_1$. (A, B, C) image de hauteur - Topographie 2D ; (D, E, F) image de déflexion.

D'autre part, comme ces images sont obtenues en mode contact, la force¹⁸ F , appliquée par la sonde AFM, lors du balayage de la surface du dépôt peut donner différents contrastes topographiques en révélant d'une manière, (plus ou moins) prononcée, les sous-structures/composantes du corps cellulaire de ces bactéries. Par exemple, avec une force appliquée faible on pourrait obtenir une morphologie bactérienne d'une part relativement moins contrainte et donc plus volumineuse, mais également paraissant moins « fragmentée » dans le sens où on observerait moins en détails les structures sous-jacentes. C'est d'ailleurs ce qu'on observe lorsqu'on applique la force (F_1) (images A et D des figures IV-15 et IV-16. En revanche, dans le cas d'une force appliquée plus importante, la pointe AFM indente le corps

¹⁸ L'effet de la force appliquée par la sonde AFM sur le contraste topographique est décrit dans le chapitre II.

cellulaire et la morphologie bactérienne obtenue est plus irrégulière et peut présenter des corrugations¹⁹. C'est ce qu'on observe quand la force appliquée est la plus forte (F_3). Les images E-F des figures IV-15 et IV-16 révèlent, en effet, de nombreuses sous-structures. C'est ce qu'on observe quand la force appliquée est la plus forte (F_3). Les images E-F des figures IV-15 et IV-16 révèlent, en effet, de nombreuses sous-structures cellulaires en nombre variable indiquées par des flèches vertes (Fig. IV-15C). Enfin, dans le cas d'une force appliquée moyenne F_2 ($F_3 > F_2 > F_1$), on peut observer des situations intermédiaires entre les deux cas précédents (voir les images B et E des figures IV-15 et IV-16).

L'ensemble de nos résultats mettent bien en évidence les aspects dénaturants et/ou effets toxiques du glutaraldéhyde sur la bactérie *P. fluorescens* notamment y compris lorsqu'il est utilisé sans éthanol. Ces observations sont cohérentes avec celles obtenues dans le cadre de nombreux autres travaux comme ceux de (Lomas et al., 2003; Chao and Zhang, 2011; B. Y. Liu et al., 2012).

Finalement, pour vérifier l'efficacité de l'adhésion au substrat lorsque la population bactérienne a été traitée au glutaraldéhyde, nous avons poursuivi la caractérisation de ces mêmes échantillons par AFM en milieu liquide (Fig. IV-17).

¹⁹ Corrugations : des ondulations au niveau de la surface.

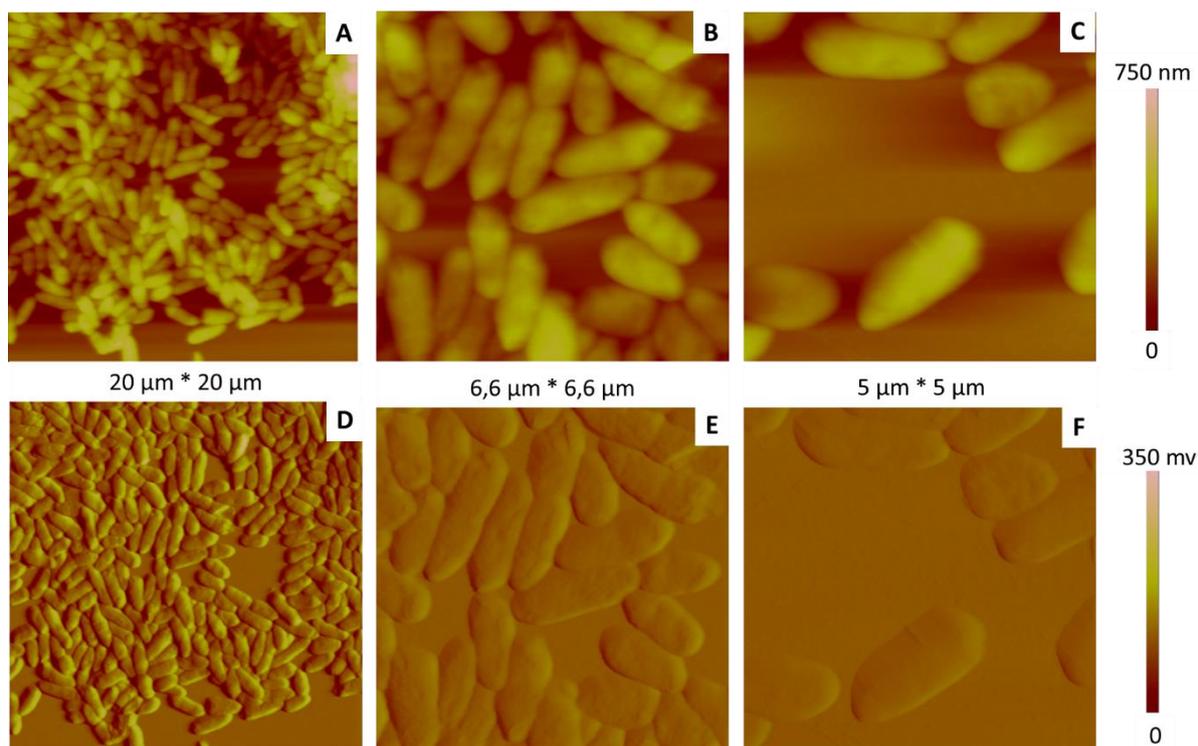


Figure IV-17 : Dépôts de *P. fluorescens* fixées au glutaraldéhyde (sans éthanol) déposés sur une surface de mica nue. Les images AFM sont effectuées en mode contact en milieu liquide ; (A, B, C) images de hauteur 2D ; (D, E, F) images de déflexion.

Les dépôts sont stables et les bactéries restent attachées au substrat malgré les nombreux passages de la pointe AFM, ce qui montre l'efficacité du traitement. D'autre part, les images topographiques correspondantes ne sont pas floues contrairement au cas des bactéries non traitées par le glutaraldéhyde, et elles sont même beaucoup mieux résolues. Cela peut être expliqué, entre autres, par l'amélioration de la rigidité cellulaire après la fixation des bactéries par le glutaraldéhyde²⁰. Ces observations rejoignent celles de nombreux travaux portant sur d'autres cellules (Wang et al., 2002; Moloney et al., 2004; Chao and Zhang, 2011; B. Y. Liu et al., 2012) et mettent bien en évidence l'efficacité de la fixation de *P. fluorescens*.

3.4 Analyse comparative des caractéristiques morphologiques de *P. fluorescens*

Ensuite, pour obtenir une description un peu plus quantitative des résultats obtenus avec cette méthode de fixation, les paramètres morphologiques des bactéries des dépôts correspondants ont été mesurés.

²⁰ Des courbes de force ont été effectuées sur les différents dépôts réalisés en milieu liquide : *P. fluorescens* déposée sur un substrat fonctionnalisé et *P. fluorescens* fixée au glutaraldéhyde. Le résultat de ces expériences montre que le module élastique de *P. fluorescens* en milieu liquide est plus élevé quand elle est fixée au glutaraldéhyde ce qui signifie qu'elle apparaît plus rigide.

Les échantillons sondés sont les dépôts bactériens fixés au glutaraldéhyde et imagés par AFM à l'air et en milieu liquide et les mesures déduites sont reportées sur la figure IV-18. Ces résultats confirment bien les observations effectuées précédemment.

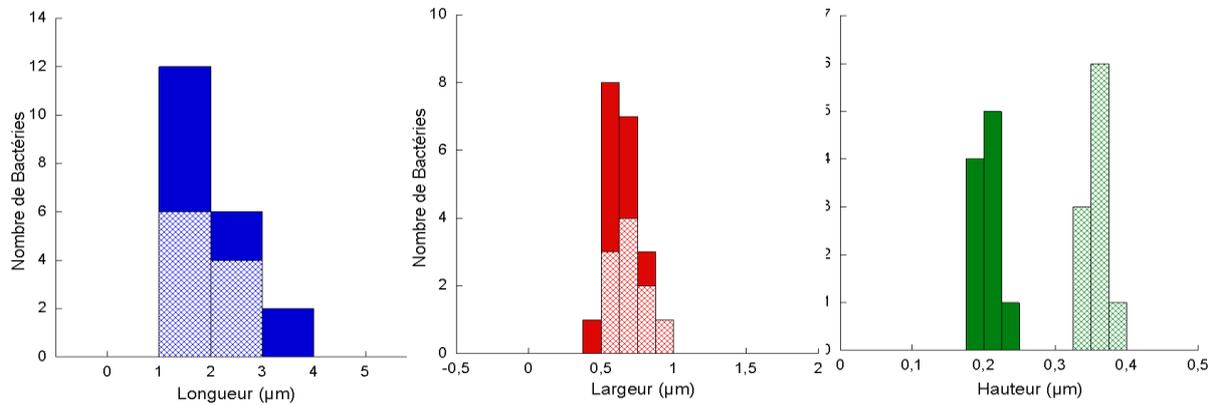


Figure IV-18 : Evolution des dimensions (longueur, largeur, hauteur) des bactéries *P. fluorescens* fixées par le glutaraldéhyde (sans éthanol) observées à l'air (motif plein) et en milieu liquide (motif hachuré). Ces statistiques sont réalisées sur plusieurs bactéries : (10) à l'air et (10) en milieu liquide.

Ces données mettent bien en évidence que le changement de milieu (air versus eau) induit des changements morphologiques en termes de hauteur de *P. fluorescens* y compris quand elle est traitée au glutaraldéhyde (Fig. IV-18). Une augmentation du volume cellulaire en découle. D'autre part, le fait que ces bactéries fixées au glutaraldéhyde aient pu absorber une quantité d'eau suffisante pour retrouver leur volume cellulaire²¹ laisse supposer qu'elles sont probablement « encore en vie » ou que cela soit plutôt un phénomène physico-chimique pur de diffusion de l'eau.

Comme précédemment, nous nous sommes ensuite intéressés au rapport l/H . Nous avons alors effectué une étude comparative entre les dépôts bactériens traités ou pas au glutaraldéhyde et quand ils sont imagés à l'air et en milieu liquide. Ces données sont reportées dans la figure IV-19.

²¹ C'est quasiment le volume que les bactéries ont en milieu physiologique

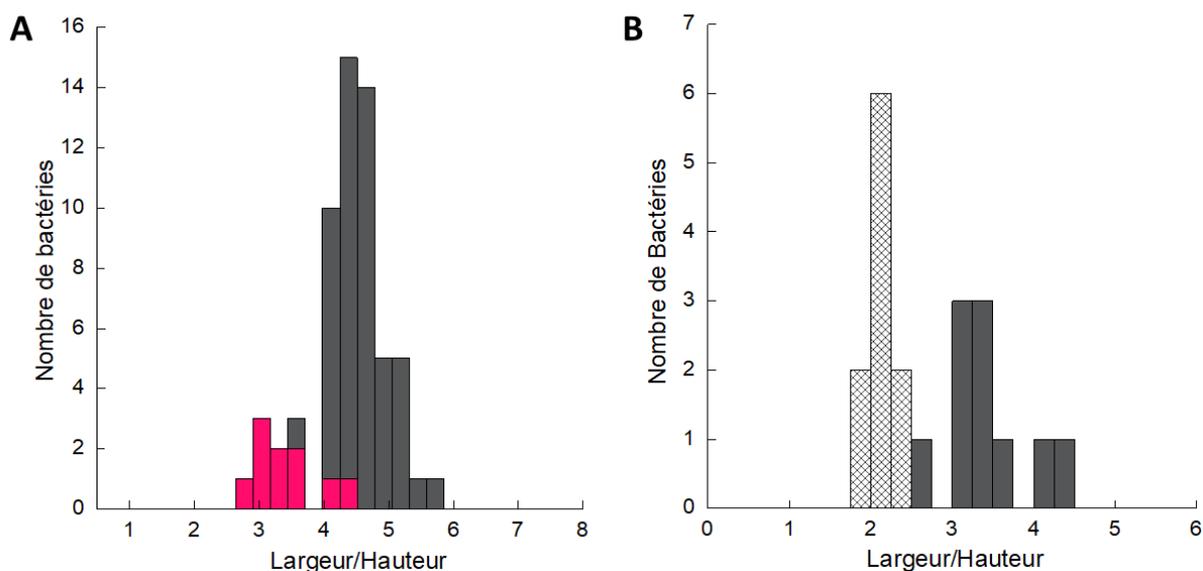


Figure IV-19 : Rapport largeur/hauteur (L/H) des bactéries *P. fluorescens* fixées au glutaraldéhyde (sans éthanol) observées (■) à l'air et (⊗) en milieu liquide ainsi que celles (■) non traitées au glutaraldéhyde et imagées à l'air. Ces statistiques sont réalisées sur plusieurs bactéries : (10) à l'air et (10) en milieu liquide pour les bactéries traitées au glutaraldéhyde et (50) non traitées.

Nous observons un rapport L/H nettement plus grand dans le cas des cellules bactériennes traitées au glutaraldéhyde (Fig. IV-19A). Cela peut être attribué à l'augmentation de la rigidité cellulaire induite par la fixation au glutaraldéhyde qui fige la forme bactérienne. Par conséquent, les bactéries auraient moins tendance à s'étendre sur le substrat (Chao and Zhang, 2011; Wang et al., 2002).

Ensuite, une fois immergée dans un liquide (dans notre cas, l'eau ; Fig. IV-19B), la bactérie absorberait une quantité d'eau suffisante qui dilaterait son corps cellulaire et lui permettrait de retrouver un volume proche de celui qu'elle pourrait avoir en solution (milieu physiologique et sans contrainte de substrat).

Pour résumer, notre étude par AFM a bien montré que la procédure de fixation au glutaraldéhyde est efficace puisqu'elle permet un attachement efficace des bactéries à la surface d'un substrat non fonctionnalisé. D'autre part, ce type de traitement peut modifier de façon significative la morphologie bactérienne.

4. Conclusion

Nous avons testé deux approches d'immobilisation de *P. fluorescens* afin de pouvoir compléter la caractérisation morphologique soit par AFM soit par MEB. Ainsi, les dépôts bactériens observés par AFM ont été déposés sur des substrats solides que nous avons fonctionnalisés (mica avec PEM et verre avec PLL). Dans le cas du MEB, la fixation (ou traitement) se fait après avoir enrobé les bactéries au glutaraldéhyde. Ensuite, pour vérifier l'efficacité de l'attachement du dépôt bactérien, l'étude s'est effectuée par AFM en milieu physiologique.

Nos résultats ont montré l'efficacité de la fonctionnalisation des substrats (PEM ou PLL) puisque la population bactérienne est restée attachée à leur surface malgré les nombreux rinçages ce qui a permis d'effectuer la caractérisation par AFM en milieu physiologique. Néanmoins, pour certains dépôts, les cellules bactériennes ont tout de même été perturbées suite aux forces exercées par la sonde AFM et ont fini parfois par se détacher.

D'autre part, l'étude comparative que nous avons effectuée avec les deux souches bactériennes (*P. fluorescens* et *E. coli*) a bien montré que ces substrats fonctionnalisés sont beaucoup plus adaptés à *E. coli* dont l'attachement est plus fort. Cela est peut-être dû à une différence de l'enveloppe bactérienne entre ces deux souches, notamment à la différence de nature des molécules de LPS qui constituent la membrane bactérienne (architecture, charge, ...) ce qui pourrait induire une interaction différente avec le substrat. Ces hypothèses méritent de faire l'objet d'une vérification dans le cadre d'une étude ultérieure.

Le deuxième mode de fixation, celui du traitement de *P. fluorescens* au glutaraldéhyde a, lui aussi, fait l'objet d'une étude comparative en utilisant deux techniques de caractérisation, le MEB et l'AFM. L'ensemble de nos résultats montrent que ce traitement (en présence d'éthanol ou pas) n'est pas sans conséquence sur *P. fluorescens* puisqu'il modifie sa morphologie (taille, absence de structuration membranaire, ...). En effet, certaines cellules présentent des invaginations plus ou moins importantes, faisant paraître les bactéries comme fragmentées et, pire encore, d'autres bactéries se sont (partiellement et parfois complètement) vidées de leur contenu cellulaire (lyse cellulaire). Le glutaraldéhyde semble avoir un effet toxique chez *P. fluorescens* sans pour autant provoquer la lyse et la question que l'on pourrait se poser porte sur la réversibilité ou irréversibilité de ce processus. Cette question à laquelle nous avons commencé de répondre dans cette étude mérite d'être approfondie via des travaux ultérieurs et plus poussés.

5. Annexes

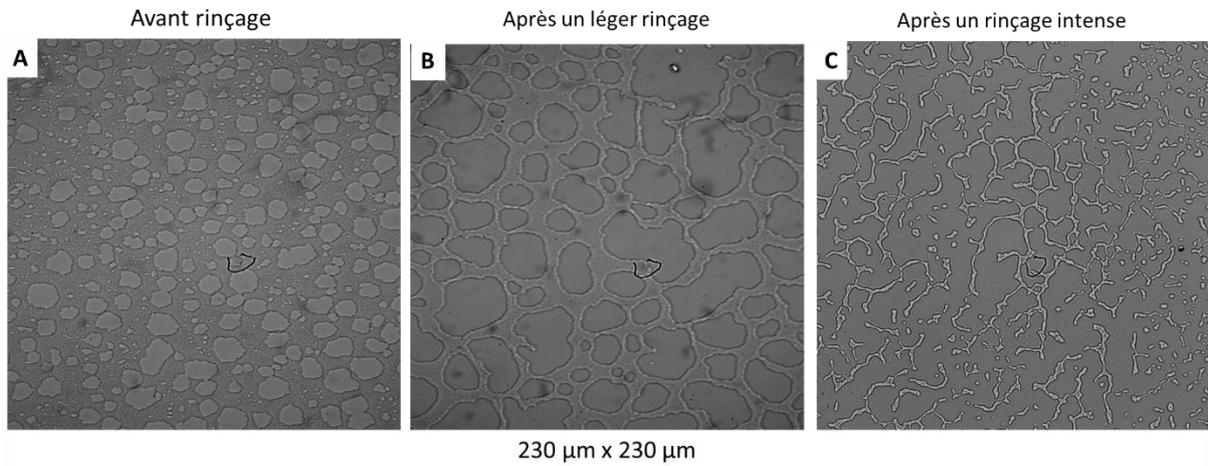


Figure IV-A1 : Effet du rinçage sur l'attachement d'un dépôt bactérien de *E. coli* effectué sur un substrat de référence (verre). Images de MO.

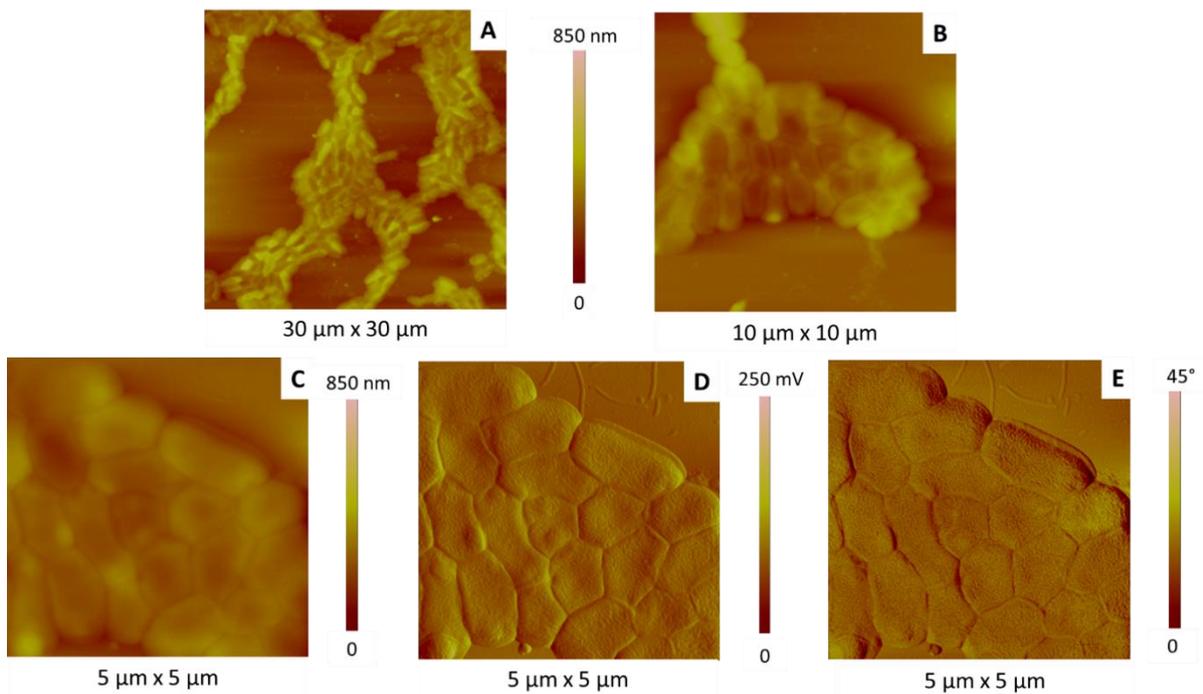


Figure IV-A2 : Dépôts bactériens denses de *E. coli* réalisés sur un substrat de verre/PLL. Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air : Images de hauteur - topographie 2D (A, B, C) et images d'amplitude (D, E).

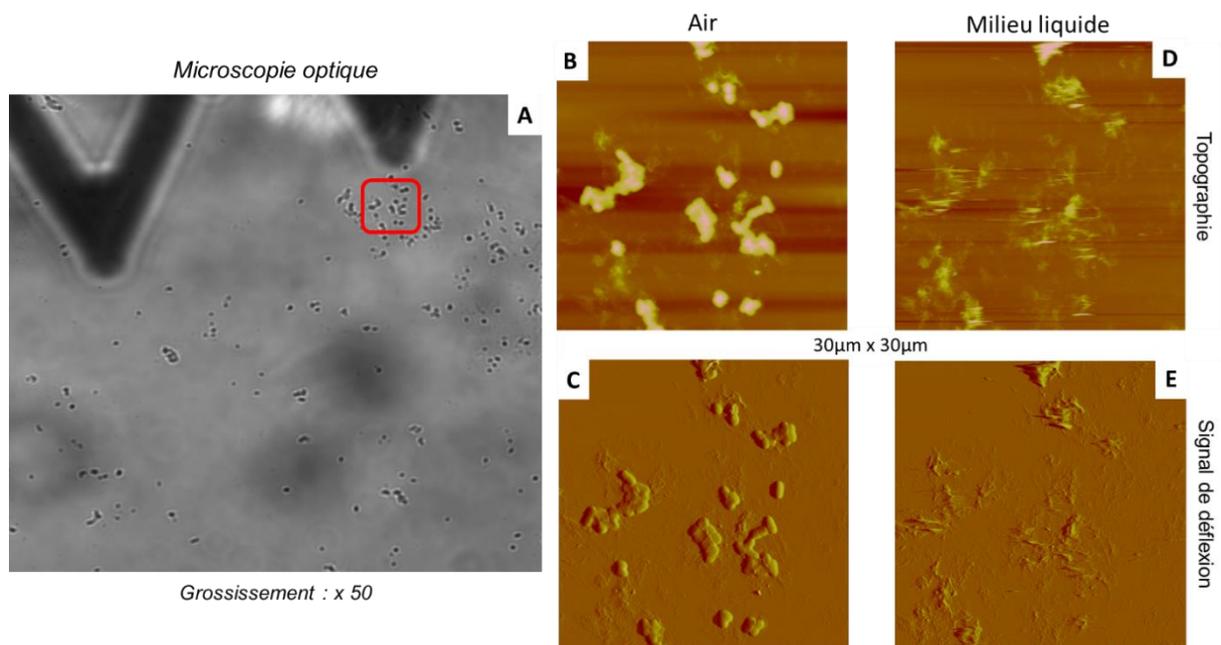


Figure IV-A3 : Dépôt de *E. coli* effectué sur un substrat non fonctionnalisé (mica nu) et observé à l'air (B, C) et en milieu liquide (D, E). Image de MO (A) et images AFM (B, C, D, E) obtenues en mode contact. (B, D) Images de hauteur (750 nm) - topographie 2D ; (C, E) Images d'amplitude.

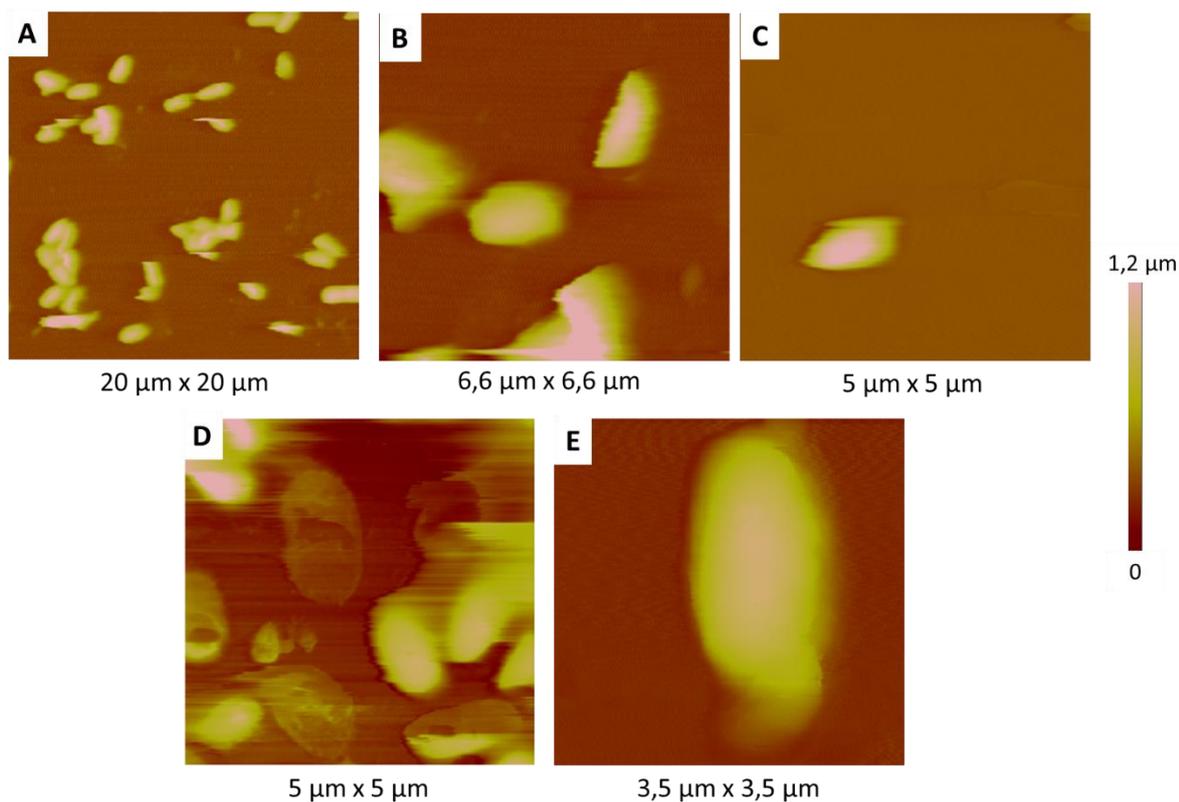


Figure IV-A4 : Dépôt de *E. coli* effectué sur un substrat fonctionnalisé au polyéthylène imine (PEI) et observé par AFM en mode contact et en milieu liquide. (A-E) Images AFM de hauteur - topographie 2D.

6. Références

- Amann, R., Fuchs, B.M., 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 339–348. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1888>
- Anderson, T.F., 1951. Techniques for the Preservation of Three-Dimensional Structure in Preparing Specimens for the Electron Microscope*. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 13, 130–134. <https://doi.org/10.1111/j.2164-0947.1951.tb01007.x>
- Auschill, T.M., Arweiler, N.B., Brex, M., Reich, E., Sculean, A., Netuschil, L., 2002. The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur. J. Oral Sci.* 110, 48–53. <https://doi.org/10.1046/j.0909-8836.2001.101160.x>
- Ballauff, M., 2004. Spherical Polyelectrolyte Brushes, in: *Polymer Brushes*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 231–248. <https://doi.org/10.1002/3527603824.ch12>
- Bolshakova, A.V., Kiselyova, O.I., Filonov, A.S., Frolova, O.Y., Lyubchenko, Y.L., Yaminsky, I.V., 2001. Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicroscopy, Proceedings of the second International Conference on Scanning* 86, 121–128. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(00\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(00)00075-9)
- Borthwick, K.A.J., Love, T.E., McDonnell, M.B., Coakley, W.T., 2005. Improvement of immunodetection of bacterial spore antigen by ultrasonic cavitation. *Anal. Chem.* 77, 7242–7245. <https://doi.org/10.1021/ac050576c>
- Buwitt-Beckmann, U., Heine, H., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Brock, R., Akira, S., Ulmer, A.J., 2006. TLR1- and TLR6-independent Recognition of Bacterial Lipopeptides *. *J. Biol. Chem.* 281, 9049–9057. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512525200>
- Chao, Y., Zhang, T., 2011. Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 381–392. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3551-5>
- Cohen, A.L., 1979. *Critical Point Drying of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy* | Springer Nature Experiments.
- Colville, K., Tompkins, N., Rutenberg, A.D., Jericho, M.H., 2010. Effects of Poly(l-lysine) Substrates on Attached *Escherichia coli* Bacteria. *Langmuir* 26, 2639–2644. <https://doi.org/10.1021/la902826n>
- Dhahri, S., 2013. Analyse topographique, mécanique et électrochimique à l'échelle sub-micrométrique de processus pilotes par les bactéries : Utilisation combinée de techniques de microscopie à sonde locale AFM - Microscopie à force atomique - et SECM - Microscopie électrochimique (These de doctorat). Montpellier 2.
- Doktycz, M.J., Sullivan, C.J., Hoyt, P.R., Pelletier, D.A., Wu, S., Allison, D.P., 2003. AFM imaging of bacteria in liquid media immobilized on gelatin coated mica surfaces. *Ultramicroscopy, Proceedings of the Fourth International Conference on Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures* 97, 209–216. [https://doi.org/10.1016/S0304-3991\(03\)00045-7](https://doi.org/10.1016/S0304-3991(03)00045-7)
- Farhana, A., Khan, Y.S., 2021. Biochemistry, Lipopolysaccharide, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Fratesi, S.E., Lynch, F.L., Kirkland, B.L., Brown, L.R., 2004. Effects of SEM Preparation Techniques on the Appearance of Bacteria and Biofilms in the Carter Sandstone. *J. Sediment. Res.* 74, 858–867. <https://doi.org/10.1306/042604740858>
- Gammoudi, I., 2012. Biocapteur à base de bactéries pour le contrôle environnemental (phdthesis). Université Sciences et Technologies - Bordeaux I.
- Gammoudi, I., Faye, N.R., Moroté, F., Moynet, D., Grauby-Heywang, C., Cohen-Bouhacina, T., 2013. Characterization of Silica Nanoparticles in Interaction with *Escherichia coli* Bacteria 7.

- Gammoudi, I., Mathelié-Guinlet, M., Benabdallah, Z., Moroté, F., Kahli, H., Beven, L., Kalfat, R., Othmane, A., Delville, M.H., Grauby-Heywang, C., Dejous, C., Cohen-Bouhacina, T., 2020. Revisiting of the physico-chemical properties of polyelectrolyte multilayers for a fine tuning of the immobilization of bacteria or nanoparticles. *Thin Solid Films* 713, 138345. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2020.138345>
- Gammoudi, I., Mathelie-guinlet, M., Morote, F., Beven, L., Moynet, D., Grauby-heywang, C., Cohen-bouhacina, T., 2016. Morphological and nanostructural surface changes in *Escherichia coli* over time, monitored by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 141, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.006>
- Gammoudi, I., Raimbault, V., Tarbague, H., Moroté, F., Grauby-Heywang, C., Othmane, A., Kalfat, R., Moynet, D., Rebière, D., Dejous, C., Cohen-Bouhacina, T., 2014. Enhanced bio-inspired microsensor based on microfluidic/bacteria/love wave hybrid structure for continuous control of heavy metals toxicity in liquid medium. *Sens. Actuators B Chem.* 198, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.01.104>
- Huang, B., Jia, N., Chen, L., Tan, L., Yao, S., 2014. Electrochemical Impedance Spectroscopy Study on Polymerization of L-Lysine on Electrode Surface and Its Application for Immobilization and Detection of Suspension Cells. *Anal. Chem.* 86, 6940–6947. <https://doi.org/10.1021/ac500753f>
- Ikai, A., 1996. STM and AFM of bio/organic molecules and structures. *Surf. Sci. Rep.* 26, 261–332. [https://doi.org/10.1016/S0167-5729\(97\)80003-9](https://doi.org/10.1016/S0167-5729(97)80003-9)
- Kasas, S., Ikai, A., 1995. A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. *Biophys. J.* 68, 1678–1680. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(95\)80344-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(95)80344-9)
- Keskin, D., Mergel, O., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., van Rijn, P., 2019. Inhibiting Bacterial Adhesion by Mechanically Modulated Microgel Coatings. *Biomacromolecules* 20, 243–253. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b01378>
- Konradi, R., Zhang, H., Biesalski, M., Rühle, J., 2004. Weak Polyelectrolyte Brushes: Complex Formation and Multilayer Build-up with Oppositely Charged Polyelectrolytes, in: *Polymer Brushes*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 249–272. <https://doi.org/10.1002/3527603824.ch13>
- Leonard, H., Holtzman, L., Haimov, Y., Weizman, D., Halachmi, S., Kashi, Y., Segal, E., 2019. Sticky Situations: Bacterial Attachment Deciphered by Interferometry of Silicon Microstructures.
- Li, A., Lee, P.Y., Ho, B., Ding, J.L., Lim, C.T., 2007. Atomic force microscopy study of the antimicrobial action of Sushi peptides on Gram negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1768, 411–418. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.12.010>
- Liu, B.Y., Zhang, G.M., Li, X.L., Chen, H., 2012. Effect of glutaraldehyde fixation on bacterial cells observed by atomic force microscopy. *Scanning* 34, 6–11. <https://doi.org/10.1002/sca.20269>
- Liu, Y., Wang, Z., Qu, Y., Lei, Y., Peng, Y., Zhang, P., Liu, J., Jiang, W., Bai, Y., 2012. Effect of liquids on AFM imaging, in: *2012 International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale (3M-NANO)*. Presented at the 2012 International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale (3M-NANO), pp. 14–17. <https://doi.org/10.1109/3M-NANO.2012.6473002>
- Lomas, R.J., Cruse-Sawyer, J.E., Simpson, C., Ingham, E., Bojar, R., Kearney, J.N., 2003. Assessment of the biological properties of human split skin allografts disinfected with peracetic acid and preserved in glycerol. *Burns* 29, 515–525. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(03\)00137-2](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(03)00137-2)
- Louise Meyer, R., Zhou, X., Tang, L., Arpanaei, A., Kingshott, P., Besenbacher, F., 2010. Immobilisation of living bacteria for AFM imaging under physiological conditions. *Ultramicroscopy* 110, 1349–1357. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2010.06.010>
- Luo, X., Berlin, D., Betz, J., Payne, G., Bentley, W., Rubloff, G., 2010. In situ generation of pH gradients in microfluidic devices for biofabrication of freestanding, semi-permeable chitosan membranes. *Lab. Chip* 10, 59–65. <https://doi.org/10.1039/b916548g>

- Lyubchenko, Y.L., Shlyakhtenko, L.S., Ando, T., 2011. Imaging of nucleic acids with atomic force microscopy. *Methods, RNA Nanotechnology* 54, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.02.001>
- Mathelié-Guinlet, M., 2017. Etude de l'interaction nanoparticules-bactéries : application à l'élaboration d'un biocapteur (phdthesis). Université de Bordeaux.
- Mathelié-Guinlet, M., Béven, L., Moroté, F., Moynet, D., Grauby-Heywang, C., Gammoudi, I., Delville, M.-H., Cohen-Bouhacina, T., 2017. Probing the threshold of membrane damage and cytotoxicity effects induced by silica nanoparticles in *Escherichia coli* bacteria. *Adv. Colloid Interface Sci.* 245, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.012>
- Mathelié-Guinlet, M., Cohen-Bouhacina, T., Gammoudi, I., Martin, A., Béven, L., Delville, M.-H., Grauby-Heywang, C., 2019. Silica nanoparticles-assisted electrochemical biosensor for the rapid, sensitive and specific detection of *Escherichia coli*. *Sens. Actuators B Chem.* 292, 314–320. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.144>
- Mathelié-Guinlet, M., Gammoudi, I., Beven, L., Moroté, F., Delville, M.-H., Grauby-Heywang, C., Cohen-Bouhacina, T., 2016. Silica Nanoparticles Assisted Electrochemical Biosensor for the Detection and Degradation of *Escherichia Coli* Bacteria. *Procedia Eng., Proceedings of the 30th anniversary Eurosensors Conference – Eurosensors 2016, 4-7. September 2016, Budapest, Hungary* 168, 1048–1051. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2016.11.337>
- Mathelié-Guinlet, M., Grauby-Heywang, C., Martin, A., Février, H., Moroté, F., Vilquin, A., Béven, L., Delville, M.-H., Cohen-Bouhacina, T., 2018. Detrimental impact of silica nanoparticles on the nanomechanical properties of *Escherichia coli*, studied by AFM. *J. Colloid Interface Sci.* 529, 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.05.098>
- Meade, A.D., Clarke, C., Draux, F., Sockalingum, G.D., Manfait, M., Lyng, F.M., Byrne, H.J., 2010. Studies of chemical fixation effects in human cell lines using Raman microspectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1781–1791. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3411-7>
- Méndez-Vilas, A., Gallardo-Moreno, A.M., Calzado-Montero, R., González-Martín, M.L., 2008. AFM probing in aqueous environment of *Staphylococcus epidermidis* cells naturally immobilised on glass: Physico-chemistry behind the successful immobilisation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 63, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.11.011>
- Mitik-Dineva, N., Wang, J., Truong, V.K., Stoddart, P., Malherbe, F., Crawford, R.J., Ivanova, E.P., 2009. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* Attachment Patterns on Glass Surfaces with Nanoscale Roughness. *Curr. Microbiol.* 58, 268–273. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9320-8>
- Moloney, M., McDonnell, L., O'Shea, H., 2004. Atomic force microscopy of BHK-21 cells: an investigation of cell fixation techniques. *Ultramicroscopy, Proceedings of the Fifth International Conference on Scanning Probe Microscopy, Sensors and Nanostructures* 100, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2003.12.010>
- Morono, Y., Takano, S., Miyanaga, K., Tanji, Y., Unno, H., Hori, K., 2004. Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate. *Biotechnol. Lett.* 26, 379–383. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000018255.89810.1a>
- Müller, F., Arand, M., Frank, H., Seidel, A., Hinz, W., Winkler, L., Hänel, K., Blée, E., Beetham, J.K., Hammock, B.D., Oesch, F., 1997. Visualization of a Covalent Intermediate between Microsomal Epoxide Hydrolase, but not Cholesterol Epoxide Hydrolase, and their Substrates. *Eur. J. Biochem.* 245, 490–496. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00490.x>
- Murakami, T., 1973. A Metal Impregnation Method of Biological Specimens for Scanning Electron Microscopy. *Arch. Histol. Jpn.* 35, 323–326. <https://doi.org/10.1679/aohc1950.35.323>
- Nayebzadeh, A., 2007. The Effect of Work Practices on Personal Exposure to Glutaraldehyde among Health Care Workers. *Ind. Health* 45, 289–295. <https://doi.org/10.2486/indhealth.45.289>

- Oh, J.K., Yegin, Y., Yang, F., Zhang, M., Li, J., Huang, S., Verkhoturov, S.V., Schweikert, E.A., Perez-Lewis, K., Scholar, E.A., Taylor, T.M., Castillo, A., Cisneros-Zevallos, L., Min, Y., Akbulut, M., 2018. The influence of surface chemistry on the kinetics and thermodynamics of bacterial adhesion. *Sci. Rep.* 8, 17247. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35343-1>
- Pearse, A.G.E., 1980. The chemistry and practice of fixation. *Histochem. Theor. Appl. Prep. Opt. Technol.* 1, 97–158.
- Potthoff, E., Ossola, D., Zambelli, T., Vorholt, J.A., 2015. Bacterial adhesion force quantification by fluidic force microscopy. *Nanoscale* 7, 4070–4079. <https://doi.org/10.1039/C4NR06495J>
- Priester, J.H., Horst, A.M., Van De Werfhorst, L.C., Saleta, J.L., Mertes, L.A.K., Holden, P.A., 2007. Enhanced visualization of microbial biofilms by staining and environmental scanning electron microscopy. *J. Microbiol. Methods* 68, 577–587. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.10.018>
- Ribeiro, C.W., Baldacci-Cresp, F., Pierre, O., Larousse, M., Benyamina, S., Lambert, A., Hopkins, J., Castella, C., Cazareth, J., Alloing, G., Boncompagni, E., Couturier, J., Mergaert, P., Gamas, P., Rouhier, N., Montrichard, F., Frendo, P., 2017. Regulation of Differentiation of Nitrogen-Fixing Bacteria by Microsymbiont Targeting of Plant Thioredoxin s1. *Curr. Biol.* 27, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.013>
- Rühe, J., 2004. Polymer Brushes: On the Way to Tailor-Made Surfaces, in: *Polymer Brushes*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 1–31. <https://doi.org/10.1002/3527603824.ch0>
- Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Sari-Belkharroubi, L., Anselme-Bertrand, I., 2015. Évaluation du potentiel de formation de biofilms mixtes entre *Candida albicans* et quelques espèces bactériennes isolées de cathéters vasculaires périphériques au CHU de Tlemcen. Première étude en Algérie. *J. Mycol. Médicale* 25, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.03.001>
- Slezak, P., Klang, A., Ferguson, J., Monforte, X., Schmidt, P., Bauder, B., Url, A., Osuchowski, M., Redl, H., Spazierer, D., Gulle, H., 2020. Tissue reactions to polyethylene glycol and glutaraldehyde-based surgical sealants in a rabbit aorta model. *J. Biomater. Appl.* 34, 1330–1340. <https://doi.org/10.1177/0885328219900078>
- St-Laurent, J., Boulay, M.-E., Prince, P., Bissonnette, E., Boulet, L.-P., 2006. Comparison of cell fixation methods of induced sputum specimens: An immunocytochemical analysis. *J. Immunol. Methods* 308, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.09.019>
- Suthipintawong, C., Leong, A.S.-Y., Vinyuvat, S., 1996. Immunostaining of cell preparations: A comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn. Cytopathol.* 15, 167–174. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0339\(199608\)15:2<167::AID-DC17>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0339(199608)15:2<167::AID-DC17>3.0.CO;2-F)
- Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I., Quirynen, M., 2006. Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin. Oral Implants Res.* 17, 68–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01353.x>
- van Loosdrecht, M.C.M., Lyklema, J., Norde, W., Zehnder, A.J.B., 1989. Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microb. Ecol.* 17, 1–15. <https://doi.org/10.1007/BF02025589>
- Vikram, A., Bomberger, J.M., Bibby, K.J., 2015. Efflux as a Glutaraldehyde Resistance Mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3433–3440. <https://doi.org/10.1128/AAC.05152-14>
- Wang, H., Bash, R., Yodh, J.G., Hager, G.L., Lohr, D., Lindsay, S.M., 2002. Glutaraldehyde Modified Mica: A New Surface for Atomic Force Microscopy of Chromatin. *Biophys. J.* 83, 3619–3625. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75362-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75362-9)
- Xu, L.-C., Wo, Y., Meyerhoff, M.E., Siedlecki, C.A., 2017. Inhibition of Bacterial Adhesion and Biofilm Formation by Dual Functional Textured and Nitric Oxide Releasing Surfaces. *Acta Biomater.* 51, 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.030>

Yuan, Y., Hays, M.P., Hardwidge, P.R., Kim, J., 2017. Surface characteristics influencing bacterial adhesion to polymeric substrates. *RSC Adv.* 7, 14254–14261. <https://doi.org/10.1039/C7RA01571B>

Chapitre V – Interaction de *P. fluorescens* et *E. coli* avec le cadmium

Plan du chapitre V

Chapitre V – Interaction de <i>P. fluorescens</i> et <i>E. coli</i> avec le cadmium	244
1. Introduction.....	246
2. Etude de la croissance bactérienne en présence de cadmium	247
2.1 Détermination de la CMI.....	247
2.2 CMI du cadmium vis-à-vis de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	248
3. Caractérisation morphologique par AFM de <i>P. fluorescens</i> exposée au cadmium.....	250
3.1 Préparation des dépôts bactériens	250
3.2 Résistance de <i>P. fluorescens</i> au cadmium.....	251
3.3 Effet toxique du cadmium chez <i>E. coli</i>	255
4. Etude morphologique de <i>P. fluorescens</i> couplée à une analyse chimique par MEB-EDX	259
4.1 Caractéristiques morphologiques complémentaires de <i>P. fluorescens</i> par MEB	259
4.2 Analyse de la composition chimique du dépôt de <i>P. fluorescens</i> par MEB-EDX ..	263
5. Synthèse des principaux résultats et discussion	267
6. Conclusion	271
7. Annexes du chapitre V	272
8. Références.....	276

1. Introduction

La contamination de l'environnement par les métaux lourds est une préoccupation mondiale majeure en raison de leur forte toxicité (Hernández et al., 1999; Ceribasi and Yetis, 2001). L'un des métaux lourds connu pour être un contaminant environnemental répandu est le cadmium (Cd). C'est un élément hautement toxique pour les organismes même à très faibles doses et considéré comme cancérigène. Plusieurs études ont montré que sa présence endommage les cellules saines par plusieurs voies (Banjerdkij et al., 2005; Hussain et al., 1987; Filipović et al., 2018).

Cette pollution alarmante par le cadmium a attiré l'attention de nombreux chercheurs et les a incités à trouver des méthodes de dépollution efficaces et écologiques dont la bioremédiation qui présente divers avantages, une faible consommation d'énergie, le respect de l'environnement et un faible coût. Les micro-organismes constituent de très bons candidats car très efficaces pour effectuer la biotransformation notamment ceux qui peuvent adsorber le cadmium sur leur surface cellulaire (Watcharamusik and Benjaphorn, 2008; Deb et al., 2013). Parmi eux, on trouve les algues et les bactéries du sol qui jouent un rôle important dans la détoxification des métaux lourds dont le cadmium (Singh et al., 2010; Deb et al., 2013; Gupta and Diwan, 2017).

Dans ce contexte, plusieurs études ont été consacrées à la compréhension des différents mécanismes de résistance¹ des bactéries dont celles du genre *Pseudomonas* bien connues pour leurs propriétés de résistance aux métaux lourds et comme candidates prometteuses pour la biorestauration, comme par exemple les souches de *P. stutzeri* et *P. aeruginosa* (Singh et al., 2010; Deb et al., 2013; Halder and Basu, 2016; Izrael-Živković et al., 2018). L'interaction entre de telles bactéries et les ions métalliques peut se produire par différents mécanismes comme l'absorption, l'oxydation, l'adsorption, la réduction et la méthylation (Bauda, 1986; Haferburg and Kothe, 2007; Bauda and Block, 2008). D'autre part, bien que certains travaux aient déjà porté sur la résistance au cadmium de la souche *Pseudomonas fluorescens* (Bauda and Block, 2008; Yu et al., 2011; Aponte et al., 2017; Haddad et al., 2021), à notre connaissance très peu de travaux ont abordé l'évolution morphologique de la population bactérienne quand elle est exposée au cadmium et aucun d'entre eux n'a inclus d'études comparatives en utilisant plusieurs techniques de microscopies de haute résolution telles que l'AFM et le MEB-EDX.

¹ Pour les microorganismes, (Gadd, 2000) définit la tolérance comme la capacité à faire face à la toxicité des métaux au moyen des propriétés intrinsèques des organismes. En parallèle, il décrit la résistance comme la capacité à survivre aux métaux toxiques par des mécanismes de détoxification en réponse directe à la présence de métaux dans l'environnement.

Par conséquent, dans ce dernier chapitre, nous avons initié une étude préliminaire sur l'interaction avec le cadmium de deux souches bactériennes à Gram négatif, *E. coli* et *P. fluorescens*.

Nous avons commencé par évaluer la concentration minimale inhibitrice (CMI) du cadmium chez *E. coli* et *P. fluorescens* sur une durée de 24h. Ensuite, nous avons caractérisé les dépôts bactériens correspondants par différentes techniques microscopiques (MO, AFM, MEB et MEB-EDX) avec comme objectif d'étudier la résistance et/ou la sensibilité de ces deux souches bactériennes quand elles sont exposées au cadmium en suivant leur évolution morphologique.

2. Etude de la croissance bactérienne en présence de cadmium

2.1 Détermination de la CMI

La CMI² est déterminée en incubant *P. fluorescens* en milieu de culture MH et en présence de concentrations croissantes de cadmium (CdCl_2) selon deux méthodes de dilutions standardisées (micro dilution et dilution en milieu gélosé). La lecture de la CMI s'effectue de deux manières différentes :

- **Lecture « visuelle »** : cette lecture se fait dans le cas de la méthode de dilution solide et consiste à incorporer le cadmium (à une concentration donnée) dans les boîtes de Pétri contenant des cultures bactériennes de *P. fluorescens*³. On peut observer ensuite : (i) l'évolution de la croissance de la population bactérienneensemencée sur ces boîtes et formant des colonies, (ii) l'émission de fluorescence⁴ correspondante. La CMI correspond à la concentration de cadmium pour laquelle la croissance et la fluorescence commencent à diminuer (Figure V.1).
- **Lecture par spectroscopie UV** : il s'agit de mesurer la turbidité (Standard Mc Farland) des différentes cultures bactériennes saines et traitées avec différentes doses de cadmium. Chaque tube contient une même quantité connue de bactéries, et on y ajoute des quantités croissantes de CdCl_2 . Quand le tube devient trouble c'est qu'il y eu multiplication des cellules. En revanche, lorsque la multiplication est ralentie, la

² La CMI est désignée comme étant la concentration du xénobiotique la plus faible qui inhibe la croissance de colonies cellulaires sur le milieu de culture (Nies, 1999). Chaque souche bactérienne a sa propre valeur de CMI dépendant de ses résistances naturelles et/ou acquises pour le xénobiotique testé.

³ Le protocole utilisé est celui décrit dans le chapitre II (incubation dans une étuve à 28°C durant 15h).

⁴ L'intensité de fluorescence est importante quand la population bactérienne est saine et dense. Cette fluorescence commence à décroître quand la densité bactérienne décroît (longueur d'onde d'émission $\gamma = 515\text{nm}$).

turbidité décroît. Par conséquent, le premier tube non turbide indiquera la CMI (Figure V.2).

2.2 CMI du cadmium vis-à-vis de *Pseudomonas fluorescens*

La solution de cadmium utilisée est préparée en dissolvant du chlorure de cadmium ($\text{CdCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$) dans de l'eau ultra pure (*Milli-Q*). Elle est ensuite stérilisée. Les dilutions de cadmium sont incorporées dans des géloses de Mueller Hinton (MH) maintenues en surfusion qui sont, ensuite, coulées en boîte de Pétri. Chaque boîte contient une concentration⁵ de cadmium différente comprise entre 0,1 et 10 g/l de CdCl_2 . La surface de la gélose estensemencée par des stries à partir de suspensions de $\text{DO} = 0,3$ et incubées durant 15h. Dans ce cas, la lecture de la CMI se fait visuellement (Fig. V-1).

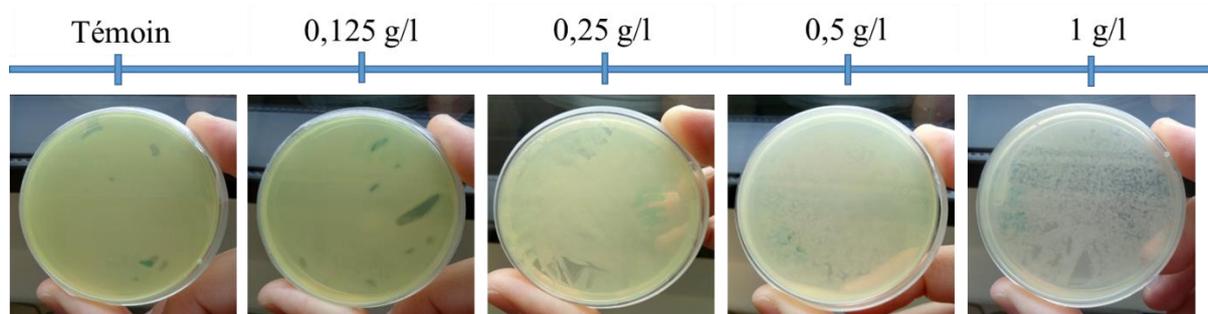


Figure V-1 : Détermination de la CMI de la souche bactérienne *P. fluorescens* sur milieu nutritif gélosé (MH) en présence de concentrations croissantes de cadmium (0,1 et 1g/l de CdCl_2).

Les résultats de la figure V-1 mettent en évidence une croissance visible à l'échelle macroscopique en milieu solide de *P. fluorescens* malgré une exposition à des concentrations en cadmium de plus en plus importantes. On peut cependant observer un effet sur le développement de colonies bactériennes à partir de la concentration de 0,25 g/l et jusqu'à 1 g/l. D'autre part, la fluorescence du dépôt bactérien relativement importante dans l'échantillon témoin (en absence de cadmium), s'atténue au fur et à mesure que la concentration de cadmium augmente. Dans ces conditions et d'un point de vue qualitatif, la CMI de *P. fluorescens* est supérieure à 1 g/l.

Les résultats obtenus avec la 2^{ème} méthode (mesure de turbidité) sont reportés sur la figure V-2. L'analyse que l'on peut en faire rejoint celle obtenue avec la 1^{ère} méthode.

⁵ Des expériences complémentaires ont été effectuées avec une concentration supplémentaire de 10 g/l. Voir données supplémentaires en annexe, Fig. V A-1.

On constate que la croissance de *P. fluorescens* est maintenue malgré la présence du cadmium. La chute significative de la biomasse se fait à partir d'une concentration de cadmium de 0,25 g/l (point de *ralentissement de la croissance*).

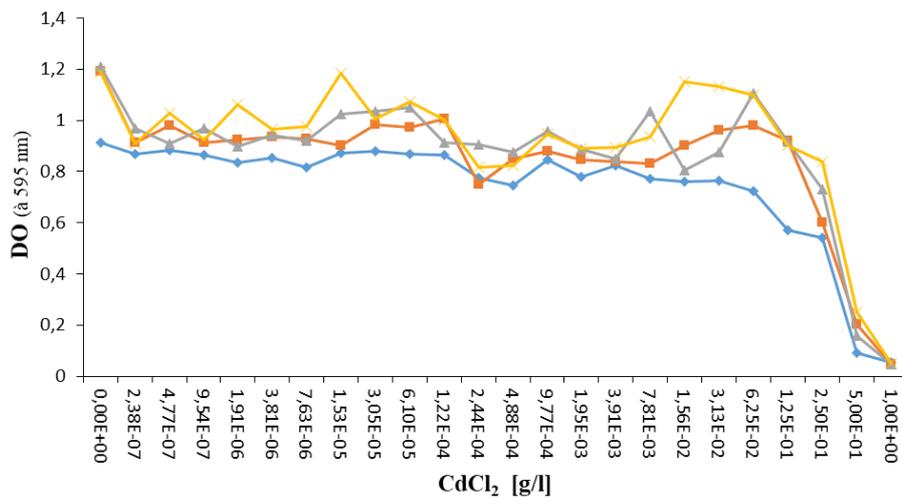


Figure V-2 : Courbes de croissance (DO en fonction de la concentration en cadmium) des cellules bactériennes *P. fluorescens* en milieu MH. Le cadmium est ajouté dans les solutions au début de l'expérimentation et le suivi s'effectue durant 24h. 4 lots indépendants de populations bactériennes ont été testés.

A partir de cette courbe, la **CMI** du cadmium vis-à-vis de la croissance de *P. fluorescens* peut-être fixée à 1 g/l.

Ces observations rejoignent celles effectuées dans de nombreux travaux qui ont montré que le cadmium peut causer des dommages oxydatifs aux microorganismes, ce qui entraîne une diminution de l'activité cellulaire, une réduction du taux de croissance ainsi que celle de la densité cellulaire en raison de la mort de certaines d'entre elles (Bauda and Block, 2008; Shamim and Rehman, 2012; Gupta et al., 2012; Halder and Basu, 2016).

D'autre part, l'obtention d'une valeur de CMI relativement élevée chez *P. fluorescens* suggère une certaine adaptabilité de cette espèce bactérienne à un environnement contenant du cadmium concentré. Cette résistance au cadmium a d'ailleurs déjà été rapportée pour plusieurs souches bactériennes (Foster, 1983). Par exemple, (Halder and Basu, 2016) ont montré que lorsque l'espèce *Pseudomonas stutzeri* est cultivée en présence d'une concentration croissante de cadmium, elle peut accumuler le métal jusqu'à 400 mg/l. Ensuite, après une incubation prolongée de 48 à 72 heures, l'adaptation au stress de *P. stutzeri* lui permet de tolérer une concentration de cadmium plus élevée (800 mg/l) et de croître en montrant plus de 50 % de croissance relative (Halder and Basu, 2016).

Dans les travaux qui vont suivre, pour tester la résistance de *P. fluorescens* au cadmium, nous avons suivi l'évolution de ses caractéristiques morphologiques suite à son exposition à ce xénobiotique, à deux temps différents (le jour même puis 24h après).

3. Caractérisation morphologique par AFM de *P. fluorescens* exposée au cadmium

3.1 Préparation des dépôts bactériens

Les échantillons testés pour chacune de ces souches sont les suivants :

- (i) « *P. fluorescens* sans Cd – témoin » : les bactéries non traitées au cadmium ;
- (ii) « *P. fluorescens* - Cd 2h » : les bactéries sont exposées au cadmium (1 g/l) durant 2h ;
- (iii) « *P. fluorescens* - Cd 24h » : les bactéries sont exposées au cadmium durant 2h (1 g/l) puis réensemencées sans cadmium et incubées durant 24h.

L'analyse effectuée par microscopie optique permet d'évaluer rapidement la qualité du dépôt réalisé et de pouvoir faire une première comparaison entre les trois échantillons étudiés.

Les résultats correspondants sont reportés sur la figure V-3.

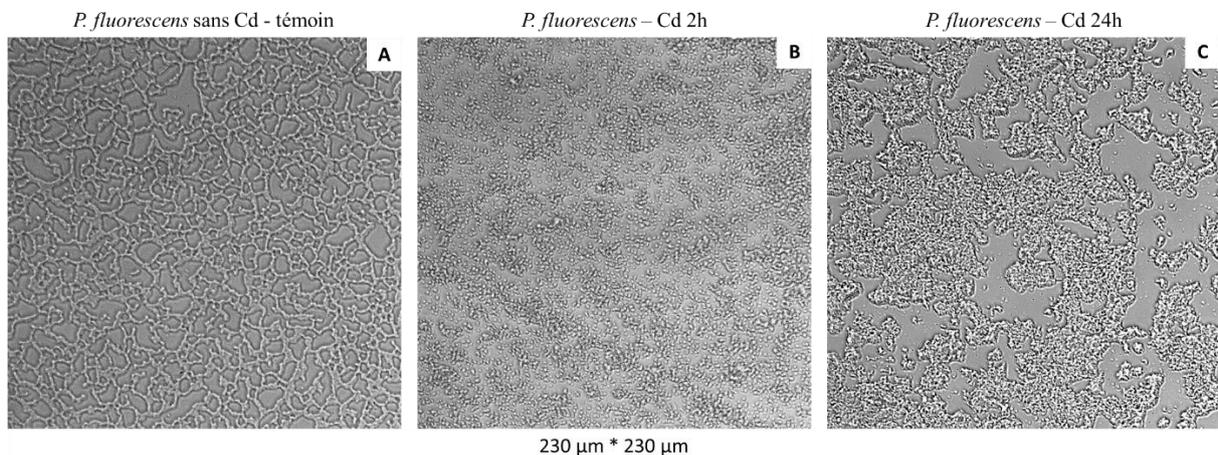


Figure V-3 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* effectués sur du verre/PLL et observés par microscopie optique. (A) *P. fluorescens* sans Cd – témoin ; (B) *P. fluorescens* - Cd 2h ; (C) *P. fluorescens* - Cd 24h.

Malgré une exposition des bactéries au cadmium, la densité des 2 dépôts, « *P. fluorescens* - Cd 2h » et « *P. fluorescens* - Cd 24h », sont similaires à celle du témoin. En revanche, l'organisation, très caractéristique de l'échantillon témoin avec des bactéries proches et formant un réseau, n'est plus conservée quand les bactéries sont exposées au cadmium.

3.2 Résistance de *P. fluorescens* au cadmium

Nous avons poursuivi cette étude avec une caractérisation par AFM de dépôts bactériens effectués sur des substrats de verre/PLL. Les deux premiers dépôts étudiés sont le témoin et celui exposé au cadmium pendant 2h. Les résultats correspondants sont reportés sur les figures V-4 et V-5.

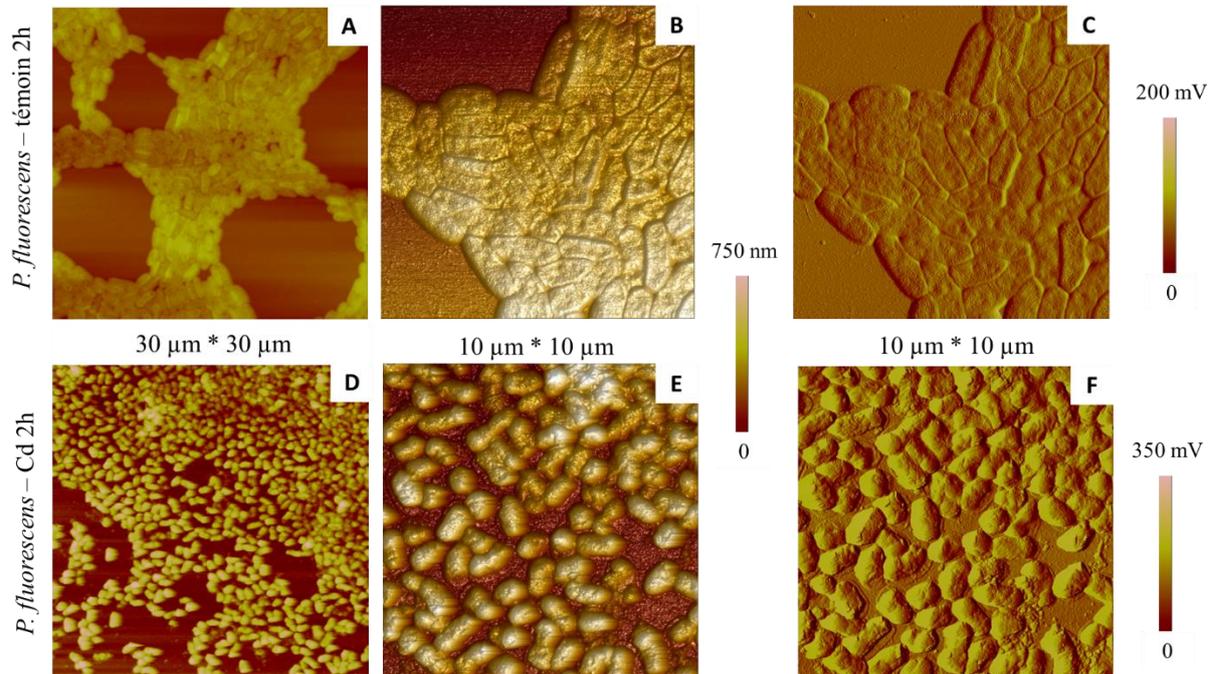


Figure V-4 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* sur du verre/PLL ; (A- C) *P. fluorescens* sans Cd – témoin ; (D- F) *P. fluorescens* - Cd 2h . Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air : (A, B, D, E) images de hauteur-topographie (A, D) 2D et (B, E) 3D et (C, F) images d'amplitude.

Comme observé précédemment, en l'absence de cadmium, le dépôt bactérien est dense et est organisé en réseau. Les bactéries sont collées les unes aux autres ce qui leur confère, le plus souvent, une forme « hexagonale » (Fig. V-4 ; images A, B et C). En revanche, aucune organisation particulière du dépôt n'est observée lorsque *P. fluorescens* est exposée au cadmium, les bactéries semblent être isolées (Fig. V-4 ; images D, E et F).

De plus, l'interaction de *P. fluorescens* avec le cadmium semble avoir induit des changements morphologiques (Fig. V-4 et V-5) : les bactéries sont pluri-formes, parfois quasi-sphériques avec des contours plus ou moins réguliers (Fig. V-4 ; images D-F) et (Fig. V-5 ; images D ; G ; F et I). Leur dimension a, elle aussi, évolué. En effet, les cellules exposées au cadmium sont moins longues (réduction d'un facteur deux environ) et plus hautes (augmentation d'un facteur

deux environ) que celles de l'échantillon témoin, les variations de la largeur étant quant à elles très peu significatives (Fig. V-5 ; images D et G).

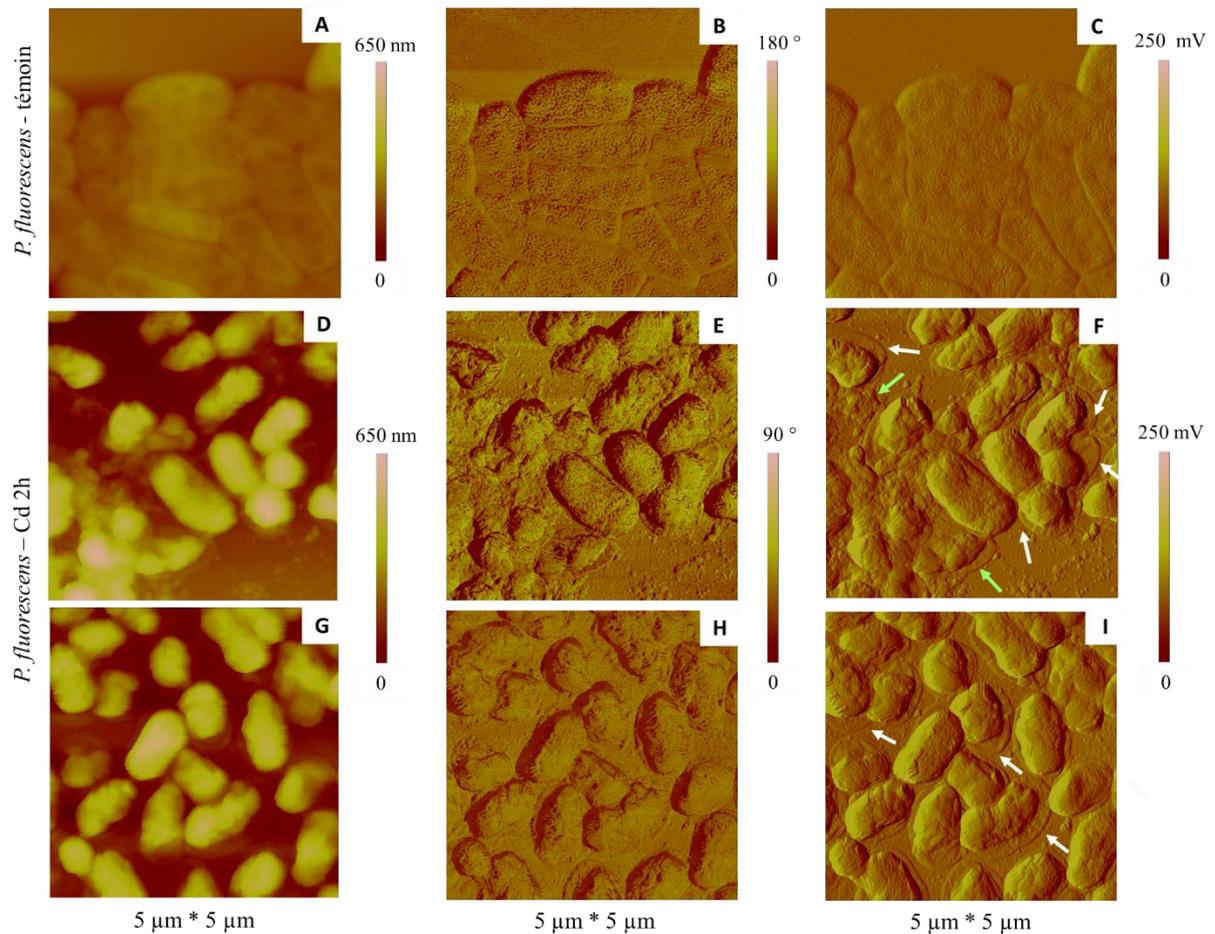


Figure V-5 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* sur du verre/PLL ; (A-C) *P. fluorescens* sans Cd – témoin ; (D-I) *P. fluorescens* - Cd 2h. Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air : (A, D, G) Images de hauteur – topographie 3D ; (B, E, H) Images de phase et (C, F, I) Images d'amplitude. Les flèches blanches et vertes indiquent les zones affaissées de la membrane bactérienne et des bactéries affaissées plus globalement, respectivement.

D'autre part, dans le cas du dépôt ayant été exposé au cadmium, les cellules sont entourées de zones complètement affaissées et lisses, contrairement au reste du corps cellulaire. Il s'agit probablement d'une partie de l'enveloppe bactérienne, comme l'indiquent les images d'amplitude (flèches blanches, Fig. V-4 ; images F et J). De telles morphologies ont déjà été observées chez des cellules très affaiblies notamment chez *B. vulgaris* et *E. coli* exposées à des nanoparticules de silice (Mathélié-Guinlet, 2017; Mathélié-Guinlet et al., 2017) ainsi que chez *P. fluorescens* quand les conditions de culture ne sont pas optimisées (chapitre III). Ce même dépôt contient des bactéries encore plus affaissées voire même vidées (partiellement ou complètement) de leur contenu (flèches vertes, Fig. V-4 ; images F et I). On peut aussi observer,

dispersées sur la surface et à proximité de certaines cellules, des structures vésiculaires rappelant les exo-vésicules, signe d'un stress bactérien, ainsi que des résidus cellulaires, probablement ceux de bactéries mortes (Fig. V-4E-F et V-5E-F).

Par contre, le cadmium ne semble pas, a priori, affecter la structuration de la surface⁶ en « ripples » de *P. fluorescens* en dehors des zones affaissées (Fig. V-5, images B, E et H), ce qui laisse supposer que cette population bactérienne n'est que partiellement affectée, et cela, malgré les changements assez nets mentionnés ci-dessus. L'ensemble de ces caractéristiques significativement différentes de celles des bactéries saines suggèrent une perturbation profonde du fonctionnement de ces bactéries (Capdevila et al., 2004; Spiers et al., 2003; Qureshi et al., 2018; Grzeszczuk et al., 2020). Il a été montré par exemple que la fixation du cadmium aux groupements thiols peut entraîner la dénaturation de certaines protéines, que cet ion est capable de perturber le métabolisme du calcium et du zinc, et qu'il provoque la dégradation de la membrane (Desaunay, 2012).

Les échantillons « *P. fluorescens* - Cd 24h » nous permettent d'observer les effets à plus long terme. Les dépôts bactériens obtenus sont aussi denses que ceux des populations témoin incubées dans les mêmes conditions de temps mais sans cadmium (Fig. V-6 et V-7) ce qui témoigne d'une bonne reprise de la croissance bactérienne malgré une exposition au cadmium. Il en est de même pour l'agencement des bactéries dont un grand nombre sont proches entre elles mais, sans pour autant, former un réseau « hexagonal » comme dans le cas d'un dépôt très compact.

D'un point de vue morphologique, la plupart de ces bactéries n'ont pas « récupéré » leur morphologie initiale puisqu'environ les deux tiers du corps cellulaire semblent intacts, le tiers restant étant complètement affaissé, jusqu'à ne laisser apparaître (quasiment) que l'enveloppe bactérienne. C'est le cas, par exemple, des bactéries N°2 à 5 (Fig. V-6E) et N°6-9 (Fig. V-7F et V-7I). Cependant, quelques bactéries reprennent une forme un peu plus allongée et on voit réapparaître sur certaines les invaginations très caractéristiques de la morphologie de *P. fluorescens* avant traitement (bactérie N°1, Fig. V-6E). De plus, on ne trouve pas de trace (ou

⁶ Pour rappel, la façon dont la membrane bactérienne est structurée, notamment dans le cas des bactéries Gram-, peut nous renseigner sur l'état de santé (saine, affaiblie ou très malade) de ces dernières et nous indiquer la présence ou pas d'un stress potentiel (au cadmium dans notre cas). Une structuration membranaire en « ripples » est celle qu'on trouve chez des bactéries saines. Au fur et à mesure que la bactérie s'affaiblit, les LPS se réorganisent et confèrent à la membrane bactérienne une structuration en agrégats. Voir chapitre III et (Gammoudi et al., 2016; Mathelié-Guinlet et al., 2017)

très peu) de débris cellulaires sur la surface du substrat (significatifs d'une lyse), contrairement au dépôt précédent.

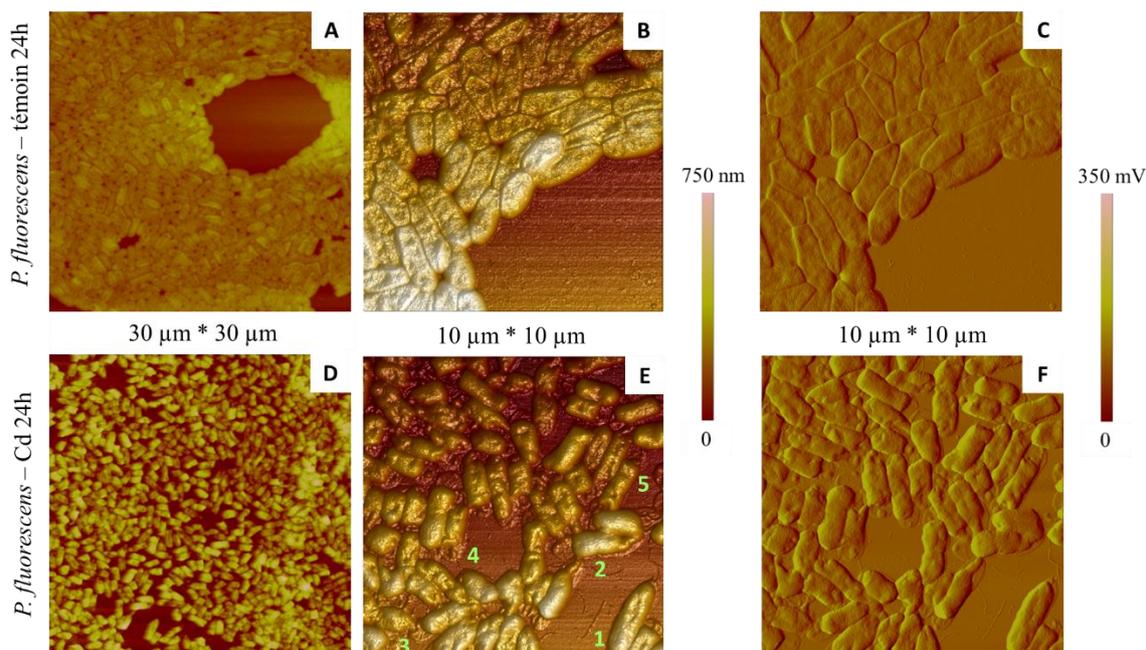


Figure V-6 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* déposées sur du verre/PLL ; (A-C) *P. fluorescens* sans Cd – témoin ; (D-F) *P. fluorescens* - Cd 24h . Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air : (A, B, D, E) Images de hauteur ; (A, D) Topographie 2D et (B, E) 3D et (C, F) Images d'amplitude.

Les images de phase (Fig. V-7 ; images E et H) confirment que les bactéries « *P. fluorescens* – Cd 24h » ne sont pas complètement affaiblies puisque la structuration membranaire en « ripples » qui caractérise les bactéries de *P. fluorescens* saines est toujours présente (Fig. V-7B).

Pour résumer, l'ensemble de ces données montre que l'exposition de la population bactérienne au cadmium pendant une durée de 2h impacte de façon significative la morphologie bactérienne, le dépôt obtenu étant hétérogène et les dimensions bactériennes étant modifiées. On note par ailleurs que ces bactéries sont plus rigides⁷. Des signes de stress (présence d'exovésicules) sont relevés, ainsi que des cellules lysées. Cependant, il apparaît que *P. fluorescens* présente tout de même une certaine résistance vis-à-vis du cadmium.

D'autre part, le réensemencement et l'incubation en absence de cadmium de *P. fluorescens* pendant 24h permet à cette population bactérienne de retrouver progressivement ses

⁷ Pour évaluer le module élastique des bactéries et évaluer leurs propriétés mécaniques (rigidité cellulaire, viscoélasticité, ...), des mesures de force ont été effectuées sur ces bactéries. Données non montrées ici.

caractéristiques morphologiques et membranaires d'avant le traitement au cadmium, ce qui renforce l'hypothèse de la bonne capacité de cette souche bactérienne à survivre, malgré une exposition temporaire à ces conditions hostiles, tout au moins à une concentration en cadmium de 1 g/l, dose qui d'après (Ferianc et al., 2021; Gammoudi, 2012) est létale pour *E. coli*.

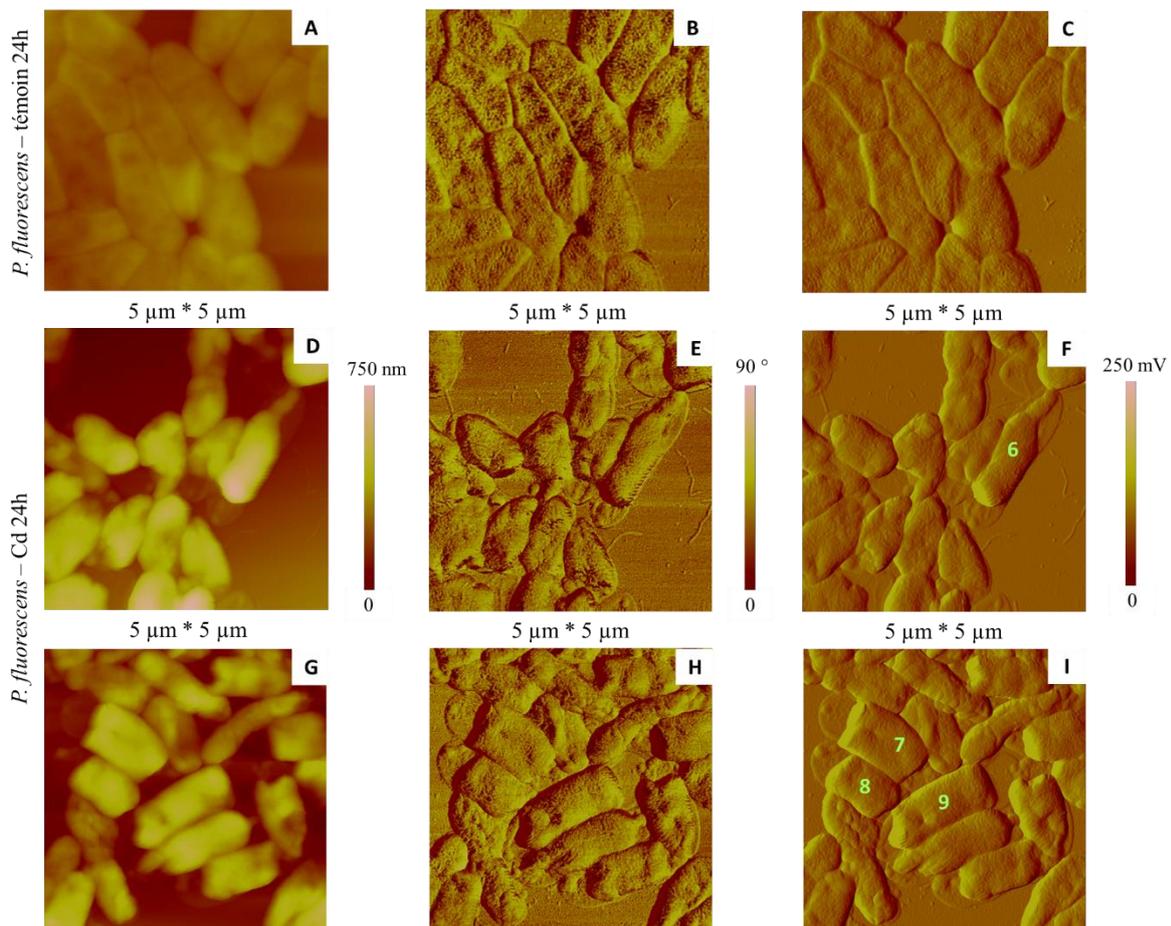


Figure V-7 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* déposés sur du verre/PLL ; (A-C) *P. fluorescens* sans Cd – témoin incubées pendant 24h ; (D-I) *P. fluorescens* - Cd 24h . Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air : (A, D, G) Images de hauteur – topographie 3D ; (B, E, H) Images de phase et (C, F, I) Images d'amplitude.

Nous avons alors entrepris d'effectuer une étude comparative entre ces deux souches bactériennes, *E. coli* et *P. fluorescens*.

3.3 Effet toxique du cadmium chez *E. coli*

Tout comme dans l'étude consacrée à *P. fluorescens* et suivant le même protocole, nous avons tout d'abord suivi pendant 24h l'évolution de la croissance de la population bactérienne de *E. coli* exposée à une large gamme de concentrations de cadmium (1 à 10 g/l). La CMI observée est similaire pour les deux souches bactériennes et correspond à 1g/l (Voir annexe, Fig. V-A3).

Nous avons également suivi l'évolution de *E. coli* dans le temps de la même manière par AFM. Les figures V-8 et V-9 montrent les images AFM caractéristiques des bactéries *E. coli sans Cd* – témoin et *E. coli - Cd 2h* (mêmes significations que précédemment).

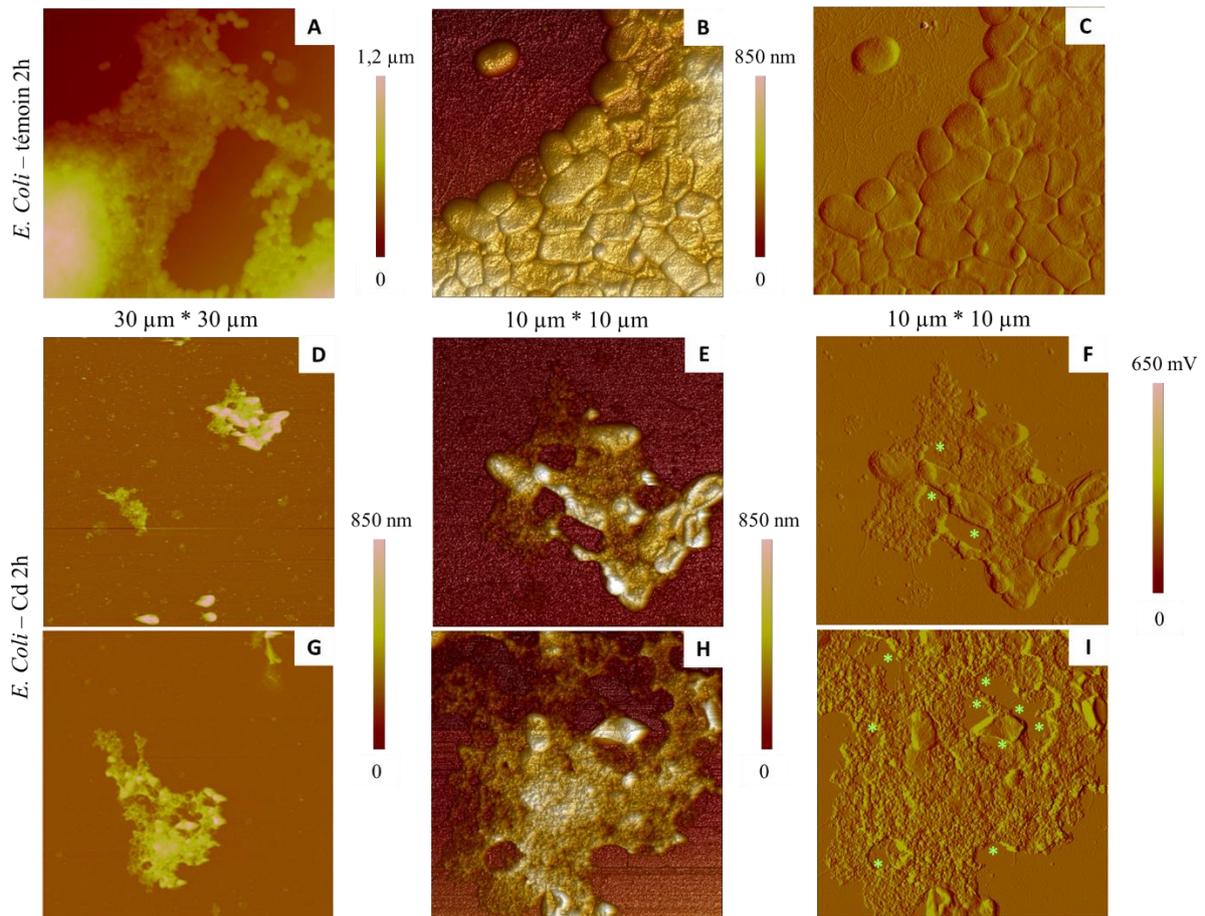


Figure V-8 : Dépôts bactériens de *E. coli* sur du verre/PLL ; (A-C) *E. coli sans Cd* – témoin ; (D-I) *E. coli - Cd 2h*. Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air : (A, D, G) images de hauteur – topographie 3D ; (B, E, H) images de phase et (C, F, I) images d'amplitude. Les étoiles montrent des zones correspondant à des empreintes laissées par des cellules détachées.

On constate, tout d'abord, que le dépôt bactérien non exposé au cadmium est dense (images A-C des Fig. V-8 et Fig. V-9). La forme des bactéries *E. coli* est « hexagonale » notamment dans les zones où le dépôt est compact (bactéries collées les unes aux autres), celles des cellules isolées et/ou en bordure du dépôt étant plus arrondie. Enfin, l'ensemble de ces cellules ont une structuration membranaire en « ripples », bien visible sur l'image de phase⁸ et, qui est signe

⁸ Pour rappel, l'hétérogénéité des propriétés mécaniques d'un système biologique (cellule, bactérie, protéine, etc.) peut être révélée par une variation de contraste sur les images de phase. Cette hétérogénéité peut correspondre à des propriétés physico-chimiques différentes de la surface des systèmes sondés (propriétés visco-élastiques différentes, charges différentes, modules élastiques différents, ...).

d'un bon état physiologique (Fig. V-9B) (Mathélié-Guinlet, 2017; Mathélié-Guinlet et al., 2017).

L'exposition de la population bactérienne au cadmium (échantillons « *E. coli* – Cd 2h ») induit des changements très importants (Fig. V-8 et V-9). Tout d'abord, l'échantillon est très peu dense, avec très peu de bactéries et beaucoup de zones présentant des agrégats (matière granulaire et rugueuse). On n'observe pas, non plus, la forme hexagonale ou plus arrondie qui caractérise les bactéries saines prises dans un dépôt compact ou individuelles. De plus, on aperçoit des empreintes cellulaires laissées par des cellules qui se sont détachées, probablement affaiblies voire mortes⁹ (voir « * » sur la Fig. V-8 ; images F et I).

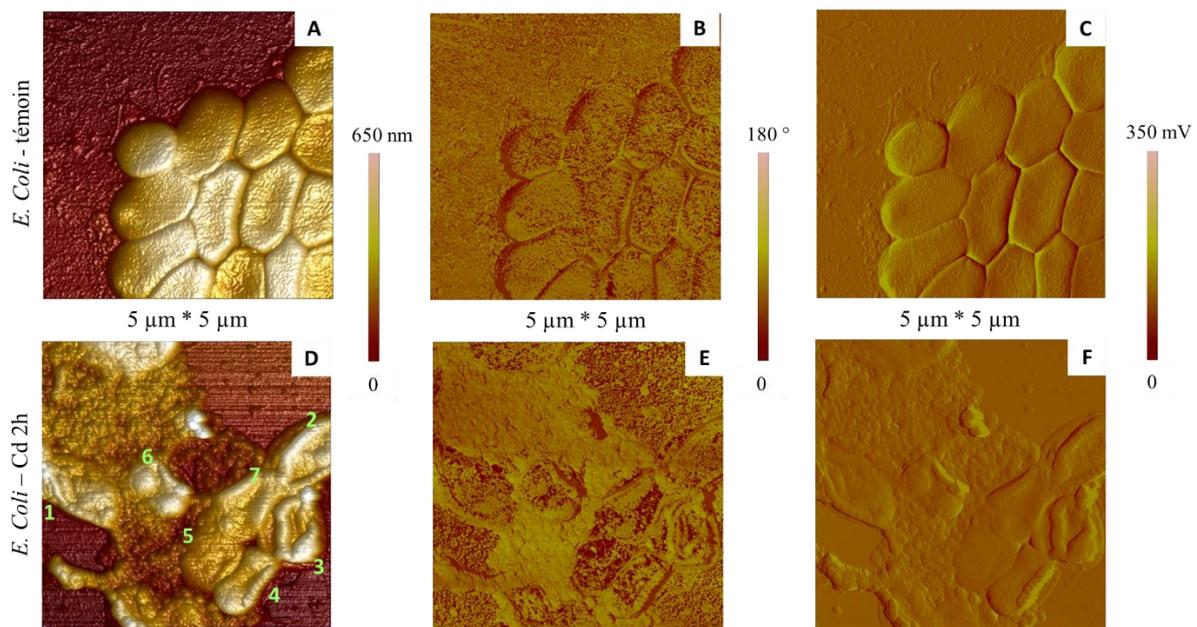


Figure V-9 : Dépôts bactériens de *E. coli* déposées sur du verre/PLL ; (A-C) *E. coli* sans Cd – témoin ; (D-F) *E. coli* - Cd 2h . Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air : (A, D) images de hauteur – topographie 3D ; (B, E) images de phase et (C, F) images d'amplitude.

D'autre part, les rares bactéries encore fixées à la surface du substrat sont le plus souvent affaissées comme si elles s'étaient déshydratées et/ou vidées d'une partie de leur contenu pour ne laisser place qu'à une membrane cellulaire ne recouvrant (probablement) qu'un gel cytoplasmique (voir bactéries N° 1 à 7 ; Fig. V-9D). Cela est confirmé par les images de phase correspondantes (Fig. V-9E) qui ne présentent pas la structuration membranaire en « ripples » et dont le contraste est quasiment uniforme et plus sombre que celui des autres zones du dépôt

⁹ De telles observations ont pu être effectuées dans des travaux précédents quand les cellules sont affaiblies et en phase de lyse. (Gammoudi, 2012; Gammoudi et al., 2016; Mathélié-Guinlet, 2017; Mathélié-Guinlet et al., 2017)

(par exemple, celui de la bactérie N°5) ou des bactéries saines (Fig. V-9B). Un tel contraste de phase¹⁰ (sombre et parfois uniforme) nous indique que ces bactéries sont plus molles (plus viscoélastiques) que les cellules saines qui sont connues pour être plus rigides¹¹.

Comme précédemment, nous avons également observé la population sur un temps plus long. La figure V-10 représente des images caractéristiques de dépôts « *E. coli* - Cd 24h ».

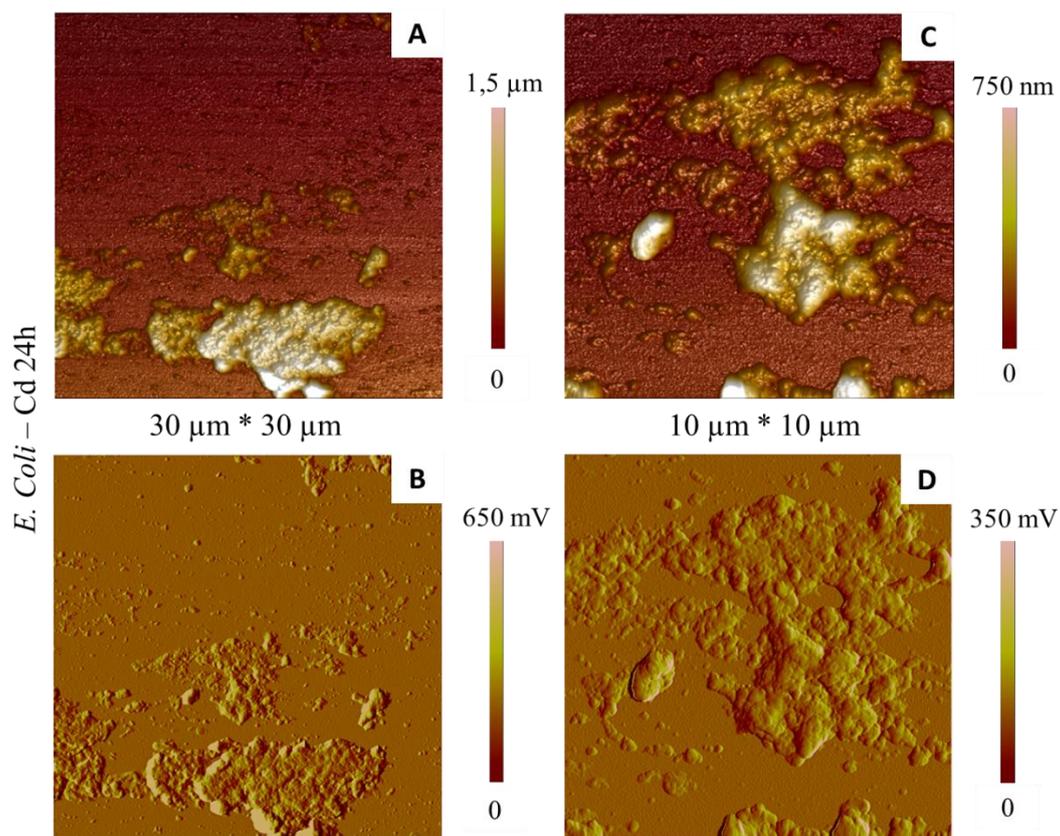


Figure V-10 : Dépôts bactériens de *E. coli* déposées sur du verre/PLL ; (A-D) *E. coli* - Cd 24h . Images AFM obtenues en mode Tapping à l'air : (A, C) images de hauteur – topographie 3D et (B, D) images d'amplitude.

Les dépôts, très peu denses, contiennent quelques rares bactéries dont la morphologie laisse supposer qu'elles sont dans un état physiologique dégradé. Cependant, la plus grande partie des surfaces observées est constitué de débris cellulaires formant localement des « particules » nanométriques quasi-sphériques (exovésicules, débris de membrane, contenu intracellulaire

¹⁰ Les zones de l'échantillon dont la couleur de phase est sombre (valeur de phase plus faible) sont plus molles ou plus viscoélastiques que celles qui ont un contraste clair (correspondant à une valeur de plus élevée) et donc qui sont plus dures ou mieux organisées.

¹¹ Pour évaluer le module élastique des bactéries et évaluer les propriétés mécaniques (rigidité cellulaire, viscoélasticité, ...), des mesures de force ont été effectuées sur ces bactéries. Données non montrées ici.

...). Ces résultats montrent clairement que la régénération de la population bactérienne de *E. coli* n'a pas pu se faire même après un réensemencement et une incubation de 24h en l'absence de cadmium. Par conséquent, elle démontre également la différence de comportement des deux bactéries testées en présence de cadmium : effet toxique du cadmium sur *E. coli* et résistance/adaptabilité de certaines cellules de *P. fluorescens* à ce xénobiotique.

Afin de compléter ce travail, nous avons poursuivi la caractérisation morphologique de *P. fluorescens* en utilisant la technique MEB suivie d'une analyse chimique avec le MEB-EDX haute résolution.

4. Etude morphologique de *P. fluorescens* couplée à une analyse chimique par MEB-EDX

4.1 Caractéristiques morphologiques complémentaires de *P. fluorescens* par MEB

Pour rappel, contrairement aux échantillons observés par MO et AFM, les populations bactériennes analysées par MEB nécessitent une fixation au glutaraldéhyde en présence d'éthanol et les dépôts sont effectués sur des lamelles de verre non traitées.

Les résultats les plus représentatifs sont reportés sur les figures V-11 et V-12.

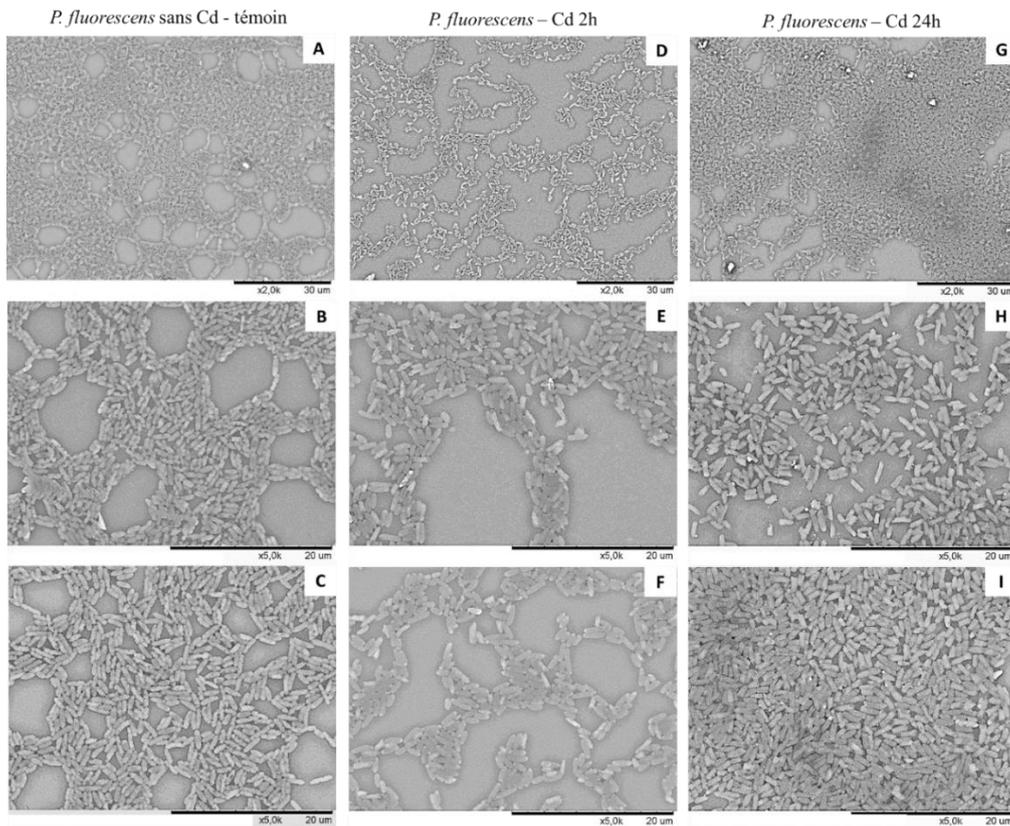


Figure V-11 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* effectués sur des lamelles de verre et observés par MEB. (A, B, C) *P. fluorescens* sans Cd – témoin ; (D, E, F) *P. fluorescens* - Cd 2h ; (G, H, I) *P. fluorescens* - Cd 24h.

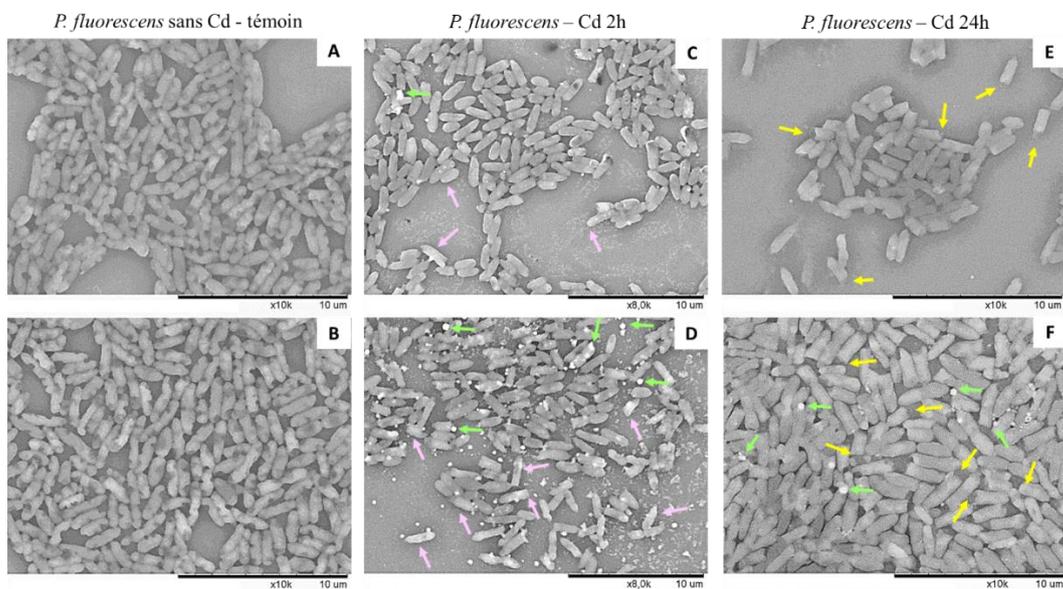


Figure V-12 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* effectués sur des lamelles de verre et observés par MEB. (A, B, C) *P. fluorescens* sans Cd – témoin ; (D, E, F) *P. fluorescens* - Cd 2h ; (G, H, I) *P. fluorescens* - Cd 24h. agrégats sphérique (flèches vertes), bactéries recouvertes d'agrégats (flèches roses), résidus bactériens (flèches jaunes).

Les principales observations que l'on peut faire sont listées ci-dessous :

- La population bactérienne « *P. fluorescens* - Cd 2h » est moins dense que celles du témoin et de l'échantillon « *P. fluorescens* - Cd 24h ». On ne retrouve pas l'organisation en réseau très caractéristique du dépôt témoin (Fig. V-11A-B) et l'agencement « relativement ordonné » des bactéries ne semble pas avoir été affectée par le cadmium (Fig. V-11 et Fig. V-12).
- On ne peut que rappeler l'effet délétère très bien visible du glutaraldéhyde¹² sur la morphologie bactérienne, en particulier chez le témoin (Fig. V-12A-B). Comme indiqué précédemment (chapitre IV), cette morphologie atypique est liée probablement aux invaginations qui sont beaucoup plus profondes que celles présentes chez les cellules non fixées au glutaraldéhyde.
- Les bactéries « *P. fluorescens* – Cd 2h » apparaissent comme davantage bombées que les cellules témoin et ne présentent plus les profondes invaginations mentionnées ci-dessus. Elles sont également raccourcies.
- Le dépôt « *P. fluorescens* – Cd 2h » contient de nombreux débris cellulaires (Fig. V-12 ; images C et D) ainsi que des agrégats plus ou moins sphériques dont le contraste MEB est plus clair (voir flèches vertes, Fig. V12).
- On peut aussi y trouver des bactéries avec le même contraste clair comme si elles étaient recouvertes par cette même matière (flèches roses, Fig. V12). Cette couverture est parfois totale mais le plus souvent partielle (sur un bord, au milieu de la cellule ou au niveau des contours).
- On retrouve dans les échantillons « *P. fluorescens* – Cd 24h », des bactéries en bâtonnets allongés et bombés. D'autre part, comme observé par AFM, le corps cellulaire de certaines bactéries a disparu ne laissant place qu'à la membrane bactérienne (voir les flèches jaunes, Fig. V-12 ; images E et F).

On peut s'interroger sur la nature des éléments apparaissant avec un contraste clair sur les images. Compte-tenu de leur localisation proche des cellules, il s'agit sans doute de débris et agrégats potentiellement constitués :

¹² Une première caractérisation des bactéries traitées au glutaraldéhyde mais non exposées au cadmium est abordée dans le chapitre IV. L'étude a été effectuée par AFM et par MEB.

1. de la matière excrétée par les bactéries à la suite du stress au cadmium (exo-vésicules, EPS¹³, ...),
2. De cristaux ayant précipité, qui pourraient être issus des solutions utilisées lors de la préparation du dépôt bactérien (milieu nutritif, solution de cadmium) ou de certains éléments excrétés par les bactéries lors des échanges entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule (Na⁺, Ca²⁺, ...).
3. D'un mélange des deux (matière excrétée bactérienne et cristaux), formant une sorte de complexe.

La présence de cette matière dans les dépôts pourrait s'expliquer, entre autres, par un rinçage insuffisant. Or, il se trouve que tous nos échantillons, *P. fluorescens sans Cd – témoin*, *P. fluorescens – Cd 2h* et *P. fluorescens – Cd 24h* ont subi le même rinçage, relativement intense. Malgré cela, seuls les dépôts « *P. fluorescens – Cd 2h* » sont couverts par un nombre très important de ces particules. Cette matière se présente sous forme d'agrégats (plus ou moins grands) fixés aux cellules et sur la surface du substrat et/ou sous forme de particules fines recouvrant certaines bactéries.

En comparant les résultats MEB et AFM, on ne peut que converger vers l'hypothèse 3, à savoir que lorsque *P. fluorescens* est exposée au cadmium, le dépôt correspondant peut contenir des sécrétions¹⁴ bactériennes mélangées à des résidus (sous forme de cristaux) issus des produits utilisés lors de la préparation du dépôt ou tout simplement des produits excrétés par les bactéries.

Afin de vérifier ces hypothèses nous avons finalement réalisé une étude préliminaire dans laquelle nous avons tenté d'analyser le contenu chimique des deux dépôts bactériens, le témoin et celui exposée au cadmium pendant 2h.

¹³ EPS : Exopolysaccharides

¹⁴ Pour rappel, ces sécrétions bactériennes peuvent être soit des exo vésicules résultant du stress au cadmium et/ou des débris cellulaires suite à la lyse de certaines bactéries.

4.2 Analyse de la composition chimique du dépôt de *P. fluorescens* par MEB-EDX

Cette étude a été réalisée à l'aide d'un MEB¹⁵ à haute résolution couplé à une analyse par Energie Dispersive de rayons X (EDX)¹⁶. Le couplage de ces deux techniques permet de produire :

- (i) Des images tridimensionnelles de la surface des échantillons avec une résolution pouvant même atteindre quelques nm et une très grande profondeur de champ.
- (ii) Des images contenant des informations qualitatives sur les variations¹⁷ de la composition chimique de la surface de l'échantillon. Cette microanalyse peut aussi être quantitative, localisée ou globale.

Les résultats obtenus sont reportés sur les figures V-13 et V-14.

¹⁵ Les images MEB sont obtenues à partir d'émissions électroniques de surface (électrons secondaires et électrons rétrodiffusés). Différents contrastes peuvent être observés, apportant des informations très variées sur l'échantillon, essentiellement sur son relief (contraste topographique). D'autres contrastes peuvent également selon les cas être observés, en particulier des contrastes chimiques (présence et distribution des éléments chimiques) et cristallins (structure cristallographique et texture) (<https://www.techniques-ingenieur.fr>).

¹⁶ Ce MEB (Hitachi S4500) à effet de champ produit des images tridimensionnelles de la surface des échantillons avec une résolution pouvant atteindre quelques nm et une très grande profondeur de champ. Il permet également une microanalyse chimique élémentaire de la surface de l'objet par la méthode EDX (Energy Dispersive X-ray).

¹⁷ Il s'agit d'identifier les éléments présents dans l'échantillon, une zone cible riche en un élément lourd apparaissant plus claire sur l'image qu'une zone contenant un élément plus léger.

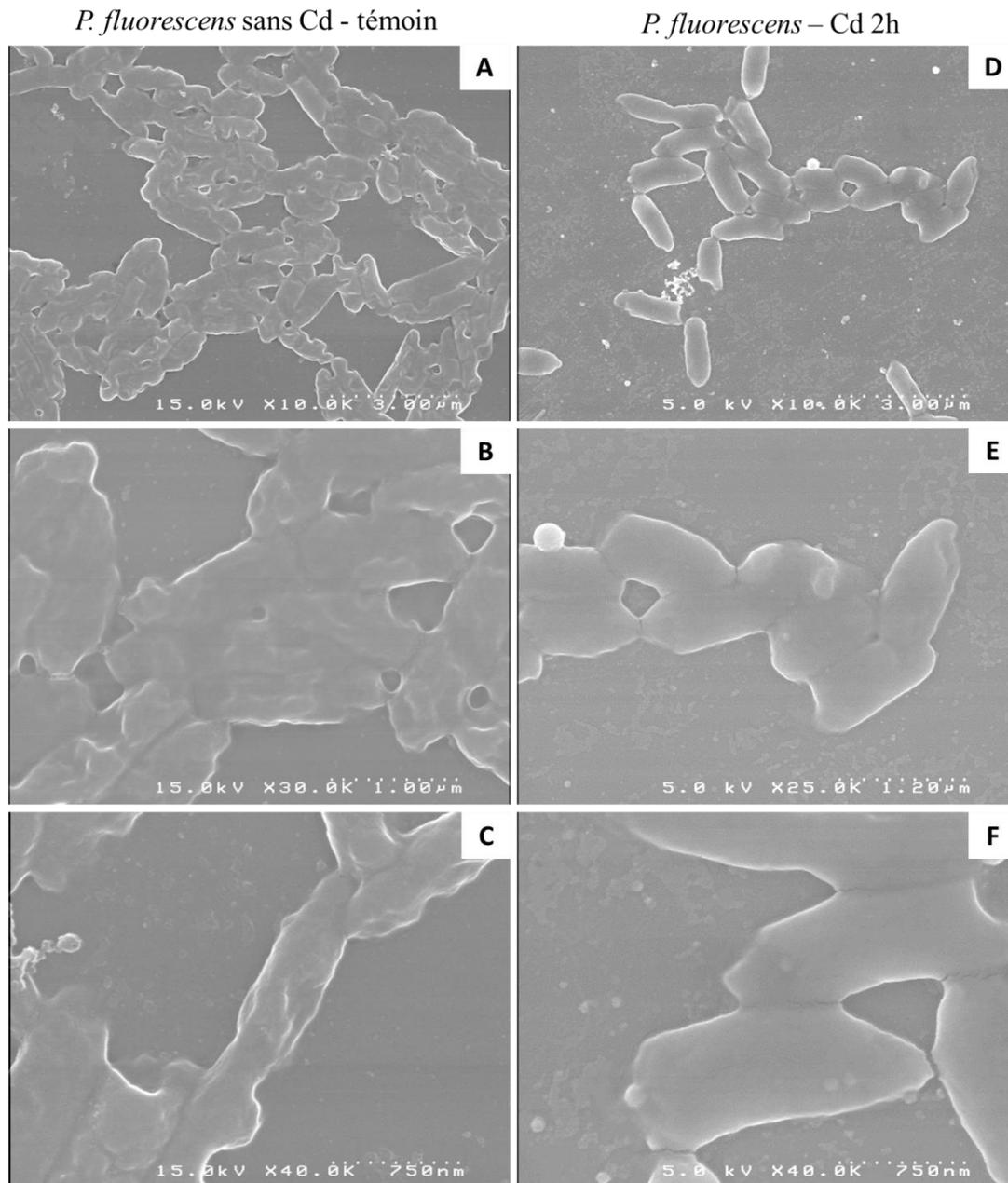


Figure V-13 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* effectués sur des lamelles de verre et observés par MEB-EDX. (A, B, C) *P. fluorescens* sans Cd – témoin ; (D, E, F) *P. fluorescens* - Cd 2h.

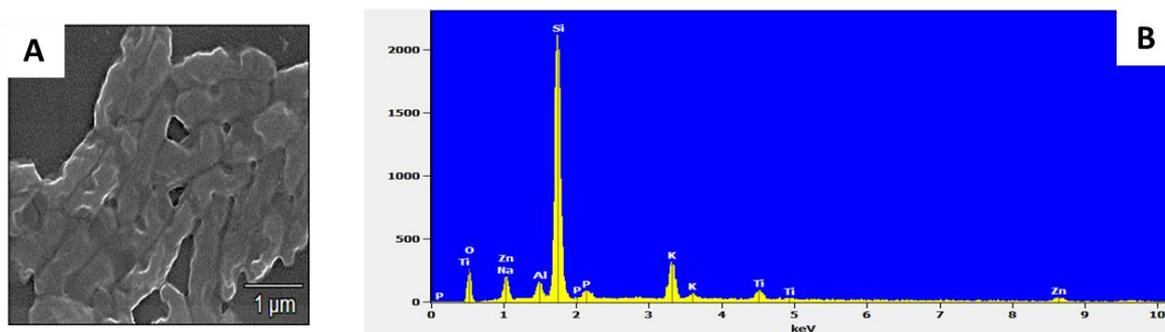
Les images MEB confirment les observations réalisées par AFM en montrant une surface bactérienne rugueuse dans les échantillons témoins, et plus lisse dans les échantillons « *P. fluorescens* – Cd 2h ». Le MEB confirme également que les cellules traitées au cadmium sont gonflées et plus courtes. On peut aussi trouver des agrégats répartis globalement à la surface de l'échantillon et/ou fixés aux bactéries. De plus, le contraste MEB de ces agrégats est plus clair (apparaissant en blanc sur les images) que celui des bactéries (apparaissant en gris) ce qui suggère que la matière correspondante contient des éléments chimiques plus lourds que ceux présents dans la bactérie.

Nous avons alors essayé d'analyser la composition chimique de ces dépôts. Les résultats obtenus sont reportés sur la figure V-14 montrant les images MEB et leur analyse en termes de spectres¹⁸ EDX correspondants. Cette analyse permet de faire les observations ci-dessous :

- Divers éléments sont présents chez les deux types d'échantillon en quantités variant peu d'un spectre à l'autre. Il s'agit d'éléments présents dans les milieux de culture et/ou faisant partie des composants de la surface cellulaire (potassium, phosphore).
- Logiquement, le chlore et le cadmium sont détectés dans les dépôts « *P. fluorescens* – *Cd 2h* » (issus du sel utilisé, CdCl₂) et absents des dépôts témoin. Mais :
 - **Le cadmium** (Fig. V-14F) est présent uniquement dans les zones contenant les précipités (agrégats blancs, Fig. V-14E).
 - **Le chlore** est présent dans différentes zones du dépôt (Fig. V-14D et V-14F) que celles-ci soient pourvues ou pas de précipités (Fig. V-14C et V-14E).
- **Le sodium** est présent chez les deux échantillons sondés, le témoin et « *P. fluorescens* – *Cd 2h* » (Fig. V-14 ; spectres B, D et F). La quantité de sodium est cependant relativement plus importante en présence de cadmium.
- D'autre part, quand on compare la localisation du sodium et du chlore sur la surface du dépôt (Figure annexe V-A4 images EDX), on constate que :
 - **Le chlore** est très présent à la surface des bactéries ;
 - **Le sodium** est majoritairement présent au niveau des précipités y compris les débris cellulaires.
- Une comparaison entre les différents spectres montre que l'apparition du pic du **cadmium** s'accompagne de l'atténuation des pics du **sodium** et du **chlore**.

¹⁸ Ces spectres sont obtenus à partir des cartographies chimiques enregistrées par EDX (voir Fig. V-A4).

P. fluorescens - Témoin



P. fluorescens – Cd 2h

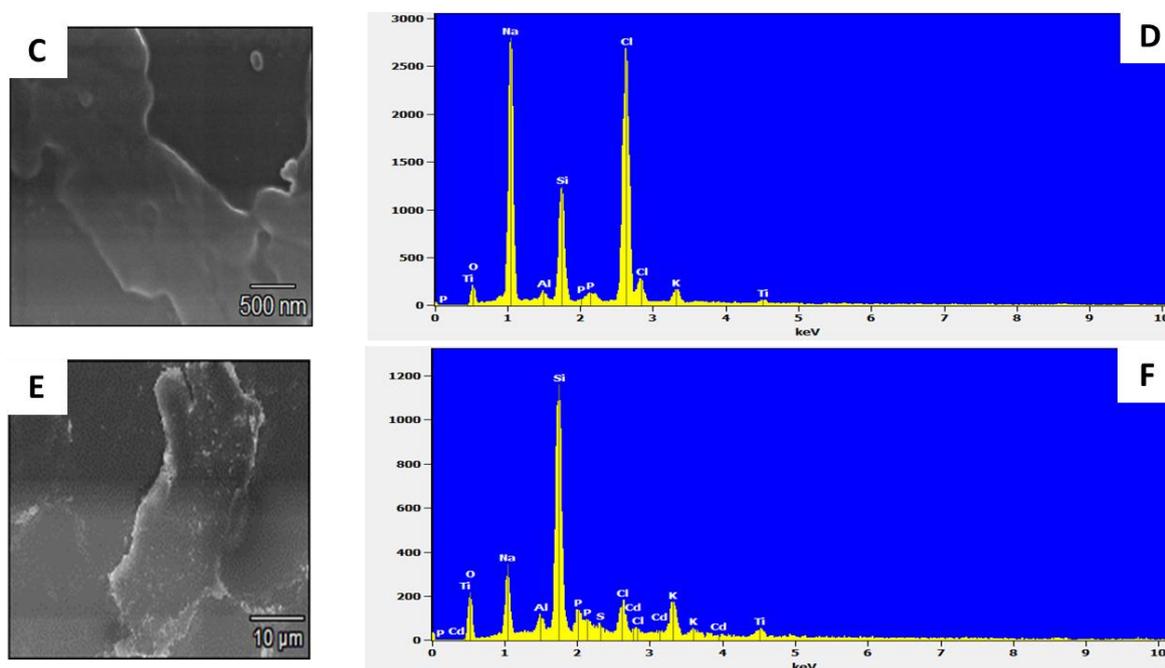


Figure V-14 : Dépôts bactériens de *P. fluorescens* effectués sur des lamelles de verre et observés par MEB-EDX. (A, C, E) images MEB ; (B, D, F) spectres EDX ; (A, B) *P. fluorescens* sans Cd – témoin ; (C-F) *P. fluorescens* - Cd 2h.

Ces résultats nous amènent à effectuer l'analyse suivante concernant la surface des bactéries (en absence d'agrégat) :

- La concentration élevée de chlore et l'absence de cadmium suggèrent que le chlore ne pénètre pas dans les cellules contrairement au cadmium.
- La quantité de sodium augmente lorsque l'échantillon est exposé au cadmium (Fig. V-14D ; Fig. V-14F), ce qui suggère que le sodium est excrété par les cellules traitées au cadmium contrairement aux cellules témoins.

Une hypothèse expliquant nos observations consiste en un effet du traitement du cadmium sur l'équilibre ionique entre intérieur et extérieur de la bactérie (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , Cd^{2+} ...).

D'après plusieurs études, il est tout à fait possible que le cation exogène Cd^{2+} remplace un autre élément, potentiellement, entre autres, le Na^+ , qui lui sera libéré à l'extérieur de la bactérie (Kuroki et al., 1989; da Silva and Reinach, 1991; Huheey et al., 1993; Skelton et al., 1994; Ikura, 1996; Pidcock and Moore, 2001; Chakravarty and Banerjee, 2012)

5. Synthèse des principaux résultats et discussion

Les principaux résultats obtenus dans cette étude sont résumés ci-dessous et confrontés à des travaux antérieurs :

- Pour vérifier la résistance de *P. fluorescens* au cadmium, nous avons choisi de suivre l'évolution de ses caractéristiques morphologiques avant et après exposition au cadmium ainsi qu'après une incubation prolongée de 24h. Nous avons suivi le même protocole pour la bactérie *E. coli*.
- L'exposition de la bactérie *P. fluorescens* au cadmium entraîne des changements morphologiques et en dimensions, et provoque un stress chez cette bactérie visible à la présence de débris. Cependant, cette bactérie est capable de résister à ce stress et elle peut proliférer à nouveau quand l'exposition au cadmium est stoppée et que la bactérie est ré-ensemencée sur un milieu exempt de cadmium. Au contraire, le cadmium s'avère toxique pour *E. coli*, sans « redémarrage » après ré-ensemencement.
- Dans les deux cas, le cadmium induit une diminution de l'activité cellulaire et une réduction du taux de croissance, ce dernier étant probablement lié à la mort de certaines cellules (Shamim and Rehman, 2012; Gupta et al., 2012; Halder and Basu, 2016).

D'autre part, la valeur relativement élevée de la CMI que nous avons obtenue chez *P. fluorescens* peut traduire une certaine adaptabilité de sa part à un environnement hostile tel que celui contenant du cadmium, comme cela a pu être observé chez d'autres espèces (Foster, 1983; Halder and Basu, 2016). En effet, les organismes sont souvent endommagés ou ont des difficultés à se développer dans un environnement contaminé au cadmium en raison de son extrême toxicité. Mais certains micro-organismes ayant survécu à la pollution au cadmium pourraient avoir développé un mécanisme leur permettant de lui résister et de le tolérer (Abdel -Aty et al., 2013). Il a, par exemple, été montré que la souche *Pseudomonas stutzeri* cultivée en présence d'une concentration croissante de cadmium peut accumuler ce xénobiotique jusqu'à un certain niveau (400 $\mu g/ml$) (Halder and Basu, 2016). Nos résultats montrent que *P. fluorescens* peut

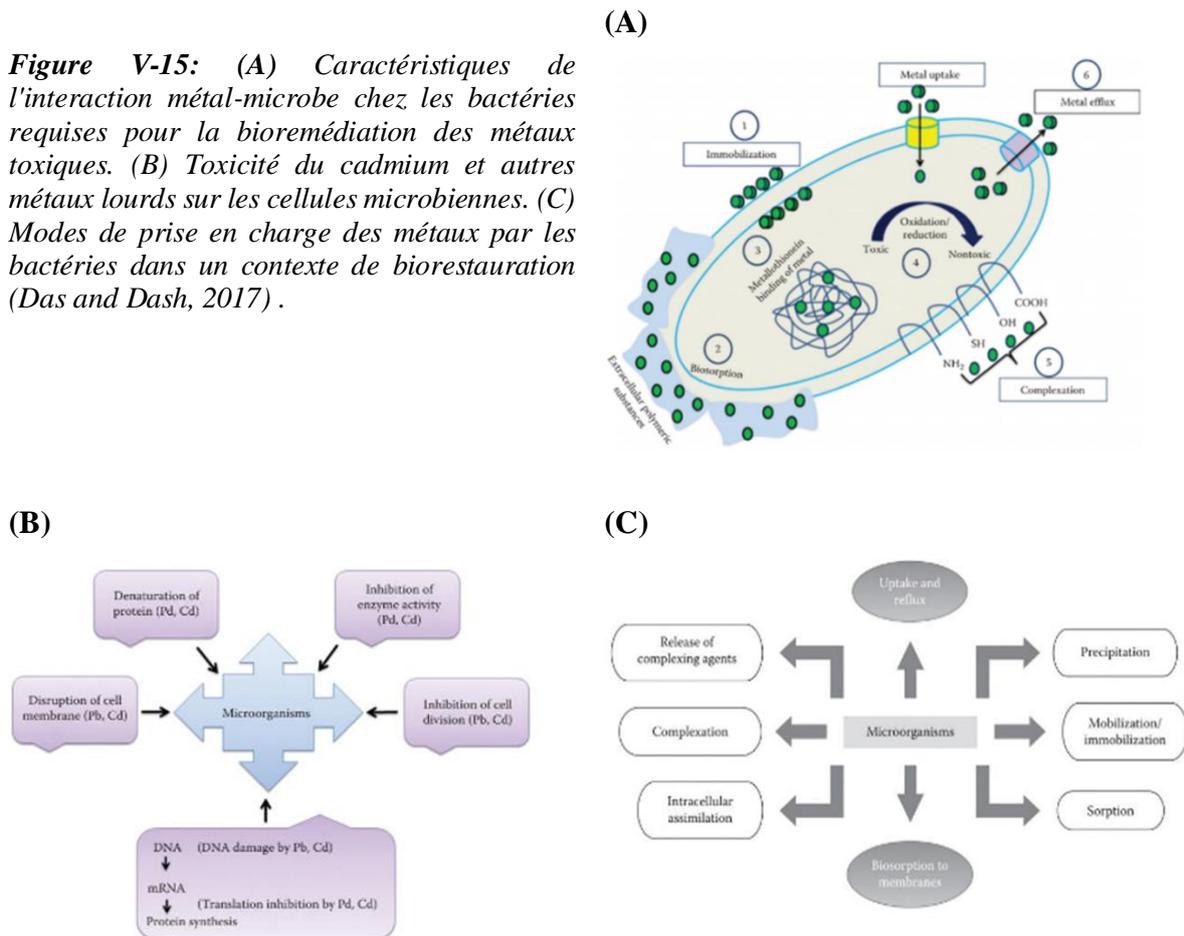
s'acclimater au stress métallique et est capable de croître comme cela a été observé aussi chez d'autres souches bactériennes (Halder and Basu, 2016).

- Les changements morphologiques observés chez *P. fluorescens* en présence de cadmium ne sont pas isolés. Des changements ont également été observés chez d'autres cellules comme, par exemple, les bactéries phototrophes lorsqu'elles interagissent avec des oxy-anions métalloïdes comme le chromate, le sélénate, l'arséniate, etc. (Nepple et al., 1999; Chakravarty and Banerjee, 2012). Il en est de même pour *Pseudomonas putida* et *Enterobacter sp* lorsqu'elles sont exposées à des composés organiques toxiques (Neumann et al., 2005) ainsi que pour *P. putida* dont la morphologie cellulaire est réduite en bâtonnets courts et minces en présence de sels de cadmium et de nickel dans le milieu de croissance (Chakravarty and Banerjee, 2012). Cette diminution relative de la surface cellulaire est interprétée comme un mécanisme efficace des cellules pour réduire l'effet toxique des facteurs de stress environnementaux, simplement en réduisant la surface cellulaire par rapport au volume entier (Neumann et al., 2005).
- Concernant plus spécifiquement *E. coli*, bien qu'on retrouve la même CMI (1 g/l de CdCl_2) que dans le cas de *P. fluorescens*, cette dose est considérée comme létale pour *E. coli* selon les travaux de (Ferianc et al., 2021; Gammoudi, 2012). Cette hypothèse est d'ailleurs confirmée par l'étude morphologique que nous avons effectuée, le dépôt bactérien correspondant ne contenant principalement que des bactéries affaiblies et une grande quantité de résidus résultant de la lyse cellulaire. En revanche, cette même dose est bien tolérée par *P. fluorescens*. D'ailleurs, d'après (Yakoubi et al., 2018), cette différence, à savoir toxicité pour l'une et résistance pour l'autre, est due à des métabolismes énergétiques et à un large éventail de processus biochimiques et moléculaires différents chez ces bactéries des deux souches bactériennes.
- Pour clôturer cette étude, nous avons effectué une caractérisation morphologique par MEB couplée à une analyse chimique par EDX. Tout d'abord, les résultats MEB ont confirmé ceux obtenus précédemment par AFM. Ensuite, l'analyse chimique a bien mis en évidence la présence du cadmium qu'on trouve, le plus souvent, à la surface du dépôt bactérien, et plus particulièrement, au niveau de complexes « cristaux/sécrétions bactériennes/débris cellulaires ». De plus, la présence d'une quantité assez importante de chlore est un marqueur indirect de la présence du cadmium, qui n'est certes pas visible sur le spectre car il est internalisé par les bactéries. D'autre part, la présence du cadmium peut provoquer des échanges ioniques entre l'intérieur de la cellule et le milieu extérieur (Na^+ et autres ...) et/ou être responsable du stress à l'origine d'exo-vésicules

voire même, parfois (mais c'est plus rare que chez *E. coli*), de la lyse cellulaire expliquant la présence de débris cellulaires.

Enfin, nos résultats sont compatibles avec d'autres résultats déjà parus dans la littérature sur les mécanismes d'absorption des métaux lourds et de résistance chez les bactéries (Brown and Lester, 1982; Bauda, 1986; Banjerdki et al., 2005; Bauda and Block, 2008). Par exemple, d'après (Bauda, 1986), le cadmium en solution peut être adsorbé à la périphérie cellulaire et pénétrer dans la cellule bactérienne.

Figure V-15: (A) Caractéristiques de l'interaction métal-microbe chez les bactéries requises pour la bioremédiation des métaux toxiques. (B) Toxicité du cadmium et autres métaux lourds sur les cellules microbiennes. (C) Modes de prise en charge des métaux par les bactéries dans un contexte de biorestauration (Das and Dash, 2017).



Le métal est susceptible d'être piégé au niveau de toutes les structures bactériennes puisque la plupart des molécules biologiques comme les protéines, les phospholipides et les acides nucléiques sont capables de le complexer (Fig. V15-A). Le métal peut aussi former des complexes inorganiques insolubles, être transformé et être expulsé de la cellule, tous ces mécanismes entraînant une diminution ou une augmentation de la toxicité (Bauda, 1986).

Pour conclure, notre étude nous a permis de confirmer l'effet toxique du cadmium vis-à-vis de *E. coli* et de démontrer la plus grande résistance de *P. fluorescens* vis-à-vis de ce xénobiotique (selon divers mécanismes potentiels décrits Fig. V15-B et C).

6. Conclusion

Nous avons initié dans ce chapitre l'étude de l'interaction du cadmium avec deux souches bactériennes, *P. fluorescens* et *E. coli*, en suivant leur évolution morphologique par plusieurs techniques.

Bien que nous ayons obtenu la même CMI pour les deux souches bactériennes, cette dose (1 g/l) s'est avérée létale pour *E. coli* car l'étude morphologique effectuée par AFM n'a pas révélé la présence de bactéries saines dans le dépôt correspondant mais uniquement des débris résultant de la lyse cellulaire. Les résultats sont différents avec *P. fluorescens* dont l'exposition au cadmium fait évoluer ses caractéristiques (taille, forme, ...) tout en induisant un stress dont une des preuves est la présence d'exo-vésicules. Cependant on n'observe pas (ou peu) de lyse cellulaire. Enfin, le réensemencement de ces deux souches puis l'incubation pendant 24h confirme les résultats obtenus, à savoir la lyse de *E. coli* et la régénération de *P. fluorescens* qui retrouve progressivement ses caractéristiques morphologiques et membranaires d'avant le traitement au cadmium. Ces résultats montrent que *P. fluorescens* peut non seulement résister au stress métallique et se développer ensuite dès que les conditions extérieures redeviennent favorables.

Les caractérisations de *P. fluorescens* par MEB ont confirmé les résultats obtenus par AFM et ont, ensuite, été complétés par une analyse par MEB-EDX afin d'identifier les éléments chimiques présents dans divers dépôts bactériens traités ou pas au cadmium. La présence de cadmium a pu être détectée soit directement quand il est présent à la surface du dépôt bactérien (fixé soit à la surface bactérienne soit aux exo vésicules et débris cellulaires), soit indirectement car internalisé dans les cellules. Dans ce cas, c'est le chlore (un des éléments du sel CdCl_2) qui témoigne de sa présence.

Pour conclure, cette étude nous a permis de confirmer l'effet toxique du cadmium sur *E. coli* et de démontrer la résistance et l'adaptabilité de *P. fluorescens* à ce xénobiotique, ce qui nous amène à suggérer qu'il s'agit d'une espèce potentielle pour la biorestauration du cadmium.

7. Annexes du chapitre V

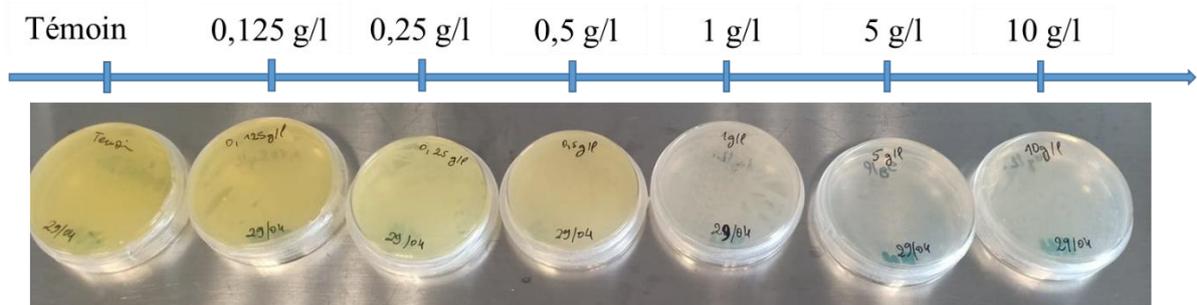


Figure V-A1 : Détermination de la CMI de la souche bactérienne *P. fluorescens* sur milieu nutritif gélosé (MH). Concentrations de cadmium utilisées comprises entre 0,1 et 10 g/l.

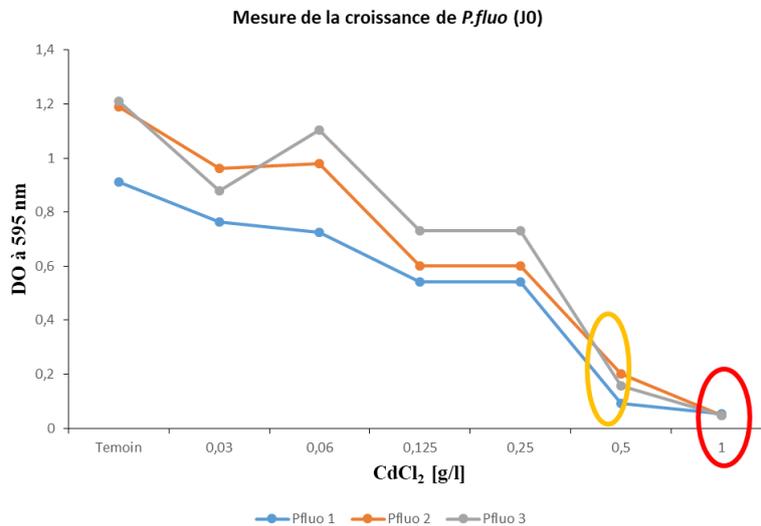


Figure V-A2 : courbe de croissance des cellules bactériennes de *P. fluorescens* en milieu liquide, DO en fonction de la concentration en cadmium. Le suivi a été effectué durant 24h. Dans les échantillons traités, le cadmium a été ajouté au début de l'expérimentation.

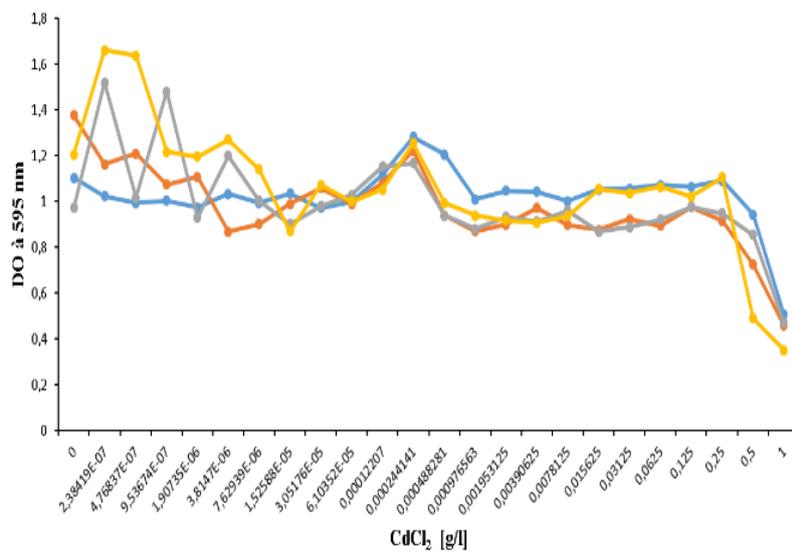


Figure V-A 3 : courbe de croissance des cellules bactériennes *E. coli* en présence et en absence de cadmium suivi durant 24h. Dans les échantillons traités, le cadmium a été rajouté au début de l'expérimentation.

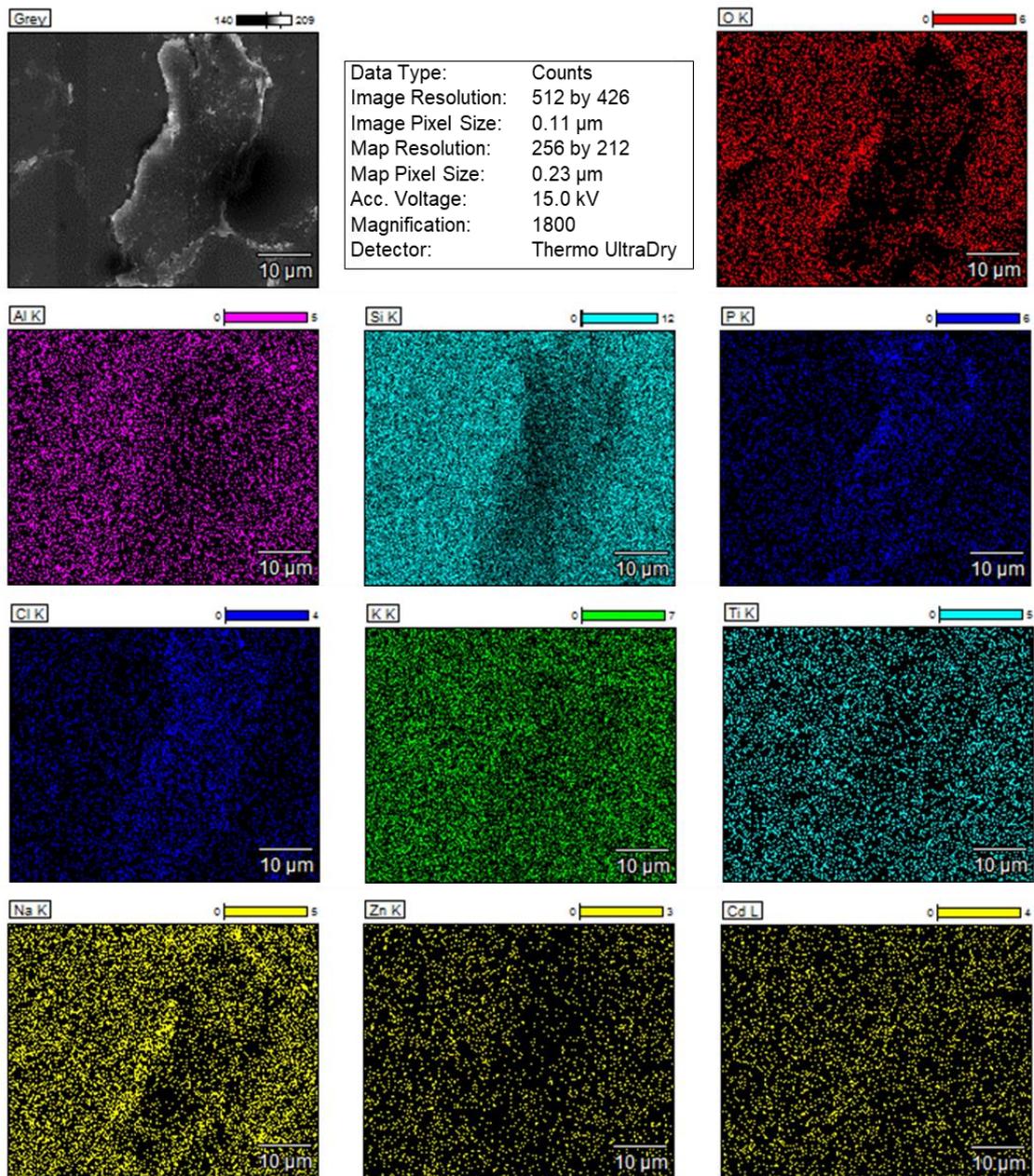


Figure V-A 4 : Microanalyse chimique élémentaire de la surface d'un dépôt bactérien de *P. fluorescens* préalablement traité au cadmium (2h d'exposition au cd), images prises par MEB-EDX.

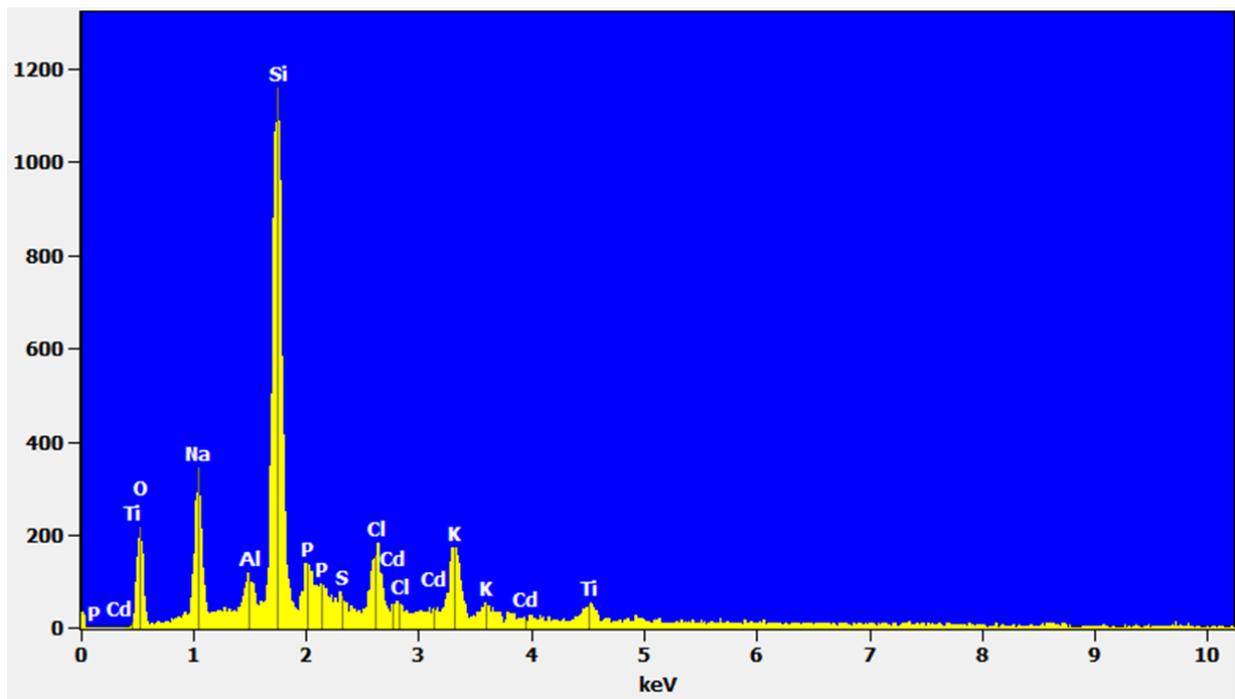


Figure V-A 5 : Microanalyse élémentaire quantitative de la surface d'un dépôt bactérien de P. fluorescens préalablement traité au cadmium (2h d'exposition au Cd). Spectre par MEB-EDX.

8. Références

- Abdel -Aty, A.M., Ammar, N.S., Abdel Ghafar, H.H., Ali, R.K., 2013. Biosorption of cadmium and lead from aqueous solution by fresh water alga *Anabaena sphaerica* biomass. *J. Adv. Res.* 4, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2012.07.004>
- Aponte, A., Castillo, O., Cabrera, G., Pernia, M., Hernandez, Y., 2017. Rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum* sp. association enhances growth of *Lactuca sativa* L. under tropical conditions. *J. Cent. Eur. Agric.* 18, 424–440. <https://doi.org/10.5513/JCEA01/18.2.1916>
- Banjerdkij, P., Vattanaviboon, P., Mongkolsuk, S., 2005. Exposure to Cadmium Elevates Expression of Genes in the OxyR and OhrR Regulons and Induces Cross-Resistance to Peroxide Killing Treatment in *Xanthomonas campestris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1843–1849. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1843-1849.2005>
- Bauda, P., 1986. Accumulation et toxicité du cadmium chez les bactéries Gram négatives : rôle des enveloppes bactériennes (These de doctorat). Metz.
- Bauda, P., Block, J.C., 2008. Cadmium biosorption and toxicity to laboratory - grown bacteria. *Environ. Technol.* <https://doi.org/10.1080/09593338509384363>
- Brown, M.J., Lester, J.N., 1982. Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge—I. Effects of metal concentration. *Water Res.* 16, 1539–1548. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(82\)90206-8](https://doi.org/10.1016/0043-1354(82)90206-8)
- Capdevila, S., Martínez-Granero, F.M., Sánchez-Contreras, M., Rivilla, R., Martín, M., 2004. Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 3889–3897. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27362-0>
- Ceribasi, I.H., Yetis, U., 2001. Biosorption of Ni(ii) and Pb(ii) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system – kinetics. *Water SA* 27, 15–20. <https://doi.org/10.4314/wsa.v27i1.5004>
- Chakravarty, R., Banerjee, P.C., 2012. Mechanism of cadmium binding on the cell wall of an acidophilic bacterium. *Bioresour. Technol.* 108, 176–183. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.12.100>
- da Silva, A.C.R., Reinach, F.C., 1991. Calcium binding induces conformational changes in muscle regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 16, 53–57. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90024-P](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90024-P)
- Das, S., Dash, H.R., 2017. *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation*. CRC Press.
- Deb, S., Ahmed, S.F., Basu, M., 2013. Metal Accumulation in Cell Wall: A Possible Mechanism of Cadmium Resistance by *Pseudomonas stutzeri*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 323–328. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0933-z>
- Desaunay, T., 2012. Approche théorique et expérimentale pour la conception de nouveaux catalyseurs à base de CeO₂ pour l'anode des piles à combustible (These de doctorat). Paris 6.
- Ferianc, P., Farewell, A., Nyström, T. 1998, 2021. The cadmium-stress stimulon of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 144, 1045–1050. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-4-1045>
- Filipović, L., Romić, M., Romić, D., Filipović, V., Ondrašek, G., 2018. Organic matter and salinity modify cadmium soil (phyto)availability. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147, 824–831. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.041>
- Foster, T.J., 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Rev.* 47, 361–409.
- Gadd, G.M., 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 271–279. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00095-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00095-1)

- Gammoudi, I., 2012. Biocapteur à base de bactéries pour le contrôle environnemental (phdthesis). Université Sciences et Technologies - Bordeaux I.
- Gammoudi, I., Mathelie-guinlet, M., Morote, F., Beven, L., Moynet, D., Grauby-heywang, C., Cohen-bouhacina, T., 2016. Morphological and nanostructural surface changes in *Escherichia coli* over time, monitored by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 141, 355–364. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.006>
- Grzeszczuk, Z., Rosillo, A., Owens, Ó., Bhattacharjee, S., 2020. Atomic Force Microscopy (AFM) As a Surface Mapping Tool in Microorganisms Resistant Toward Antimicrobials: A Mini-Review. *Front. Pharmacol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.517165>
- Gupta, K., Chatterjee, C., Gupta, B., 2012. Isolation and characterization of heavy metal tolerant Gram-positive bacteria with bioremedial properties from municipal waste rich soil of Kestopur canal (Kolkata), West Bengal, India. *Biologia (Bratisl.)* 67, 827–836. <https://doi.org/10.2478/s11756-012-0099-5>
- Gupta, P., Diwan, B., 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnol. Rep.* 13, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.12.006>
- Haddad, S., Elliot, M., Savard, T., Deschênes, L., Smith, T., Ells, T., 2021. Variations in biofilms harbouring *Listeria monocytogenes* in dual and triplex cultures with *Pseudomonas fluorescens* and *Lactobacillus plantarum* produced under a model system of simulated meat processing conditions, and their resistance to benzalkonium chloride. *Food Control* 123, 107720. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107720>
- Haferburg, G., Kothe, E., 2007. Microbes and metals: interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* 47, 453–467. <https://doi.org/10.1002/jobm.200700275>
- Halder, D., Basu, M., 2016. Role of *Pseudomonas stutzeri* MTCC101 in Cadmium Bioremediation. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 5, 139–148. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2016.502.016>
- Hernández, L.M., Gómara, B., Fernández, M., Jiménez, B., González, M.J., Baos, R., Hiraldo, F., Ferrer, M., Benito, V., Suñer, M.A., Devesa, V., Muñoz, O., Montoro, R., 1999. Accumulation of heavy metals and As in wetland birds in the area around Doñana National Park affected by the Aznalcollar toxic spill. *Sci. Total Environ.* 242, 293–308. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00397-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00397-6)
- Huheey, J.E., Keiter, E.A., Keiter, R.L., 1993. Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity. HarperCollins College Publishers, New York, NY.
- Hussain, T., Shukla, G.S., Chandra, S.V., 1987. Effects of Cadmium on Superoxide Dismutase and Lipid Peroxidation in Liver and Kidney of Growing Rats: In Vivo and In Vitro Studies. *Pharmacol. Toxicol.* 60, 355–358. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1987.tb01526.x>
- Ikura, M., 1996. Calcium binding and conformational response in EF.hand proteins 4.
- Izrael-Živković, L., Rikalović, M., Gojgić-Cvijović, G., Kazazić, S., Vrvic, M., Brčeski, I., Beškoski, V., Lončarević, B., Gopčević, K., Karadžić, I., 2018. Cadmium specific proteomic responses of a highly resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *RSC Adv.* 8, 10549–10560. <https://doi.org/10.1039/C8RA00371H>
- Kuroki, R., Taniyama, Y., Seko, C., Nakamura, H., Kikuchi, M., Ikehara, M., 1989. Design and creation of a Ca²⁺ binding site in human lysozyme to enhance structural stability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 6903–6907. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.18.6903>
- Mathelié-Guinlet, M., 2017. Etude de l'interaction nanoparticules-bactéries : application à l'élaboration d'un biocapteur (These de doctorat). Bordeaux.
- Mathelié-Guinlet, M., Béven, L., Moroté, F., Moynet, D., Grauby-Heywang, C., Gammoudi, I., Delville, M.-H., Cohen-Bouhacina, T., 2017. Probing the threshold of membrane damage and

- cytotoxicity effects induced by silica nanoparticles in *Escherichia coli* bacteria. *Adv. Colloid Interface Sci.* 245, 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.04.012>
- Nepple, B.B., Flynn, I., Bachofen, R., 1999. Morphological changes in phototrophic bacteria induced by metalloids oxyanions. *Microbiol. Res.* 154, 191–198. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(99\)80014-7](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(99)80014-7)
- Neumann, G., Veeranagouda, Y., Karegoudar, T.B., Sahin, Ö., Mäusezahl, I., Kabelitz, N., Kappelmeyer, U., Heipieper, H.J., 2005. Cells of *Pseudomonas putida* and *Enterobacter* sp. adapt to toxic organic compounds by increasing their size. *Extremophiles* 9, 163–168. <https://doi.org/10.1007/s00792-005-0431-x>
- Nies, D.H., 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 730–750. <https://doi.org/10.1007/s002530051457>
- Pidcock, E., Moore, G.R., 2001. Structural characteristics of protein binding sites for calcium and lanthanide ions. *JBIC J. Biol. Inorg. Chem.* 6, 479–489. <https://doi.org/10.1007/s007750100214>
- Qureshi, M.K., Munir, S., Shahzad, A., Rasul, S., Nouman, W., Aslam, K., 2018. Role of Reactive Oxygen Species and Contribution of New Players in Defense Mechanism under Drought Stress in Rice. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0640>
- Shamim, S. (Punjab U., Rehman, A. (Punjab U., 2012. Cadmium resistance and accumulation potential of *Klebsiella pneumoniae* strain CBL-1 isolated from industrial wastewater. *Pak. J. Zool. Pak.*
- Singh, R., Chadetrik, R., Kumar, R., Bishnoi, K., Bhatia, D., Kumar, A., Bishnoi, N.R., Singh, N., 2010. Biosorption optimization of lead(II), cadmium(II) and copper(II) using response surface methodology and applicability in isotherms and thermodynamics modeling. *J. Hazard. Mater.* 174, 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.09.097>
- Skelton, N.J., Kördel, J., Akke, M., Forsén, S., Chazin, W.J., 1994. Signal transduction versus buffering activity in Ca^{2+} -binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* 1, 239–245. <https://doi.org/10.1038/nsb0494-239>
- Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M., Rainey, P.B., 2003. Biofilm formation at the air–liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol. Microbiol.* 50, 15–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03670.x>
- Watcharamusik, A., Benjaphorn, P., 2008. The Role of Exopolymers in Protection of *Ralstonia* sp., a Cadmium-resistant Bacterium, from Cadmium Toxicity. *EnvironmentAsia* 1. <https://doi.org/10.14456/ea.2008.12>
- Yakoubi, L., Benmalek, Y., Benayad, T., Fardeau, M.-L., 2018. Caractérisation des bactéries cadmium-résistantes isolées de sols pollués en Algérie et évaluation de l'élimination du cadmium en utilisant des cellules libres ou immobilisées [WWW Document]. URL <http://hdl.handle.net/2042/68139>
- Yu, C.L., Lu, Z.P., Ge, F.Z., Zhao, E.L., 2011. Biosorption of Cadmium onto *Pseudomonas fluorescens*: Application of Isotherm and Kinetic Models. *Adv. Mater. Res.* 171–172, 49–52. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.171-172.49>

Conclusion 2

L'étude que nous avons abordée dans la deuxième partie de ma thèse consistait à déterminer les caractéristiques morphologiques de *P. fluorescens* avec une haute résolution puis à utiliser ces paramètres comme un marqueur permettant le suivi et l'évaluation de l'état de *P. fluorescens* (saine, affaiblie, sous stress ou en phase de lyse cellulaire, etc...) quand elle est exposée au cadmium.

Comme peu d'études abordent une telle problématique, en particulier concernant *P. fluorescens*, nous avons été amenés à utiliser une approche « pas-à-pas » et comparative :

- En définissant les conditions optimales de culture de cette bactérie ;
- En utilisant plusieurs techniques de microscopie de différentes résolutions (MO, AFM et MEB-EDX) ;
- En étudiant l'impact des traitements imposés par certaines de ces méthodes ;
- En comparant les résultats obtenus selon les conditions imposées à la bactérie (absence ou présence de cadmium) ;
- En étudiant en parallèle une autre souche Gram négative *E. coli*, elle largement étudiée et pour laquelle le cadmium a un effet inhibiteur.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle étude est menée sur *P. fluorescens*.

Nous avons ainsi montré les points suivants :

- Les conditions de culture optimisées impliquent l'utilisation du milieu de culture (MH), à une température de 28°C et sur une durée de 15h d'incubation. Notons que le milieu MH n'est cependant pas le plus répandu dans la littérature pour cette bactérie.
- Nous avons utilisé deux modes d'immobilisation de la population bactérienne sur des substrats solides : fonctionnalisation du substrat et fixation des bactéries au glutaraldéhyde. L'efficacité de ces traitements et, par conséquent, celle de l'adhésion cellulaire aux substrats a été vérifiée par AFM « en milieu liquide ». Nos résultats montrent que les deux méthodes de fonctionnalisation du substrat (PEM ou PLL) sont efficaces pour les deux souches bactériennes (*P. fluorescens* et *E. coli*) mais apparaissent beaucoup plus adaptées pour *E. coli* dont l'attachement à la surface du substrat est plus fort. D'autre part, bien que la fixation au glutaraldéhyde semble

efficace, nos résultats montrent que ce traitement n'est pas sans conséquence sur les caractéristiques morphologiques de *P. fluorescens*.

- L'étude effectuée par AFM montre que les cellules planctoniques saines de *P. fluorescens* ont une forme en bâtonnets allongés, une membrane externe dont la structuration en « *ripples* » est attribuée à une organisation particulière des LPS (comme dans le cas d'*E. coli*) et une enveloppe bactérienne pourvue d'invaginations très caractéristiques de cette espèce. Nos résultats montrent que l'évolution de ces invaginations (augmentation de leur nombre et/ou profondeur) est corrélée à celle de la structuration membranaire (« *ripples* » versus « agrégats plus ou moins sphériques ») et dépendrait de l'évolution de l'état de la bactérie (saine, affaiblie ou en phase de lyse cellulaire).
- En présence de cadmium : la CMI (1g/l) que nous avons déterminée est identique chez les deux souches bactériennes mais elle s'est avérée létale pour *E. coli*. En effet, d'après l'analyse morphologique par AFM, le dépôt bactérien correspondant est constitué principalement de débris résultant de la lyse cellulaire. Quant à *P. fluorescens* son exposition au cadmium a, certes, fait évoluer ses caractéristiques morphologiques (forme, taille, ...) mais on n'observe pas (ou peu) de lyse cellulaire. En revanche, le cadmium provoque chez *P. fluorescens* un stress dont la manifestation est la présence dans le dépôt bactérien d'exo vésicules ou même encore l'affaissement en périphérie des cellules. Le réensemencement de ces deux souches sur une durée de 24h dans leurs milieux de culture respectifs confirme ce constat, à savoir la lyse de *E. coli* et le « redémarrage » de *P. fluorescens* qui retrouve progressivement ses caractéristiques, d'avant le traitement au cadmium, aussi bien morphologiques que membranaires. Ces résultats suggèrent que *P. fluorescens* peut non seulement s'acclimater au stress induit par la présence du métal mais aussi que cette souche est capable de croître et se développer dans des conditions hostiles. L'étude complémentaire effectuée par MEB sur *P. fluorescens*, couplée à une analyse chimique MEB-EDX, a permis de détecter le cadmium dans certaines zones du dépôt bactérien, fixé à la surface bactérienne, aux exo vésicules et/ou sur les débris cellulaires. L'absence du cadmium (qui pourrait correspondre à son internalisation par les bactéries) à la surface du dépôt est probablement corrélée à la présence du chlore puisque cet élément provient du sel de cadmium utilisé (CdCl_2).

Pour conclure, la grande majorité de ces résultats, innovants (en particulier chez *P. fluorescens*), nous ont permis de confirmer l'effet toxique du cadmium sur *E. coli* et, en parallèle, l'adaptabilité de *P. fluorescens*, ce qui nous amène à suggérer que c'est une espèce potentielle pour la biorestauration du cadmium.

De tels résultats sont très encourageants, et nous incitent à poursuivre l'étude, notamment en approfondissant le couplage des analyses chimiques aux caractéristiques morphologiques en faisant évoluer certains paramètres tels que des temps d'exposition au cadmium plus longs (4h, 6h, 8h et 12h) et des durées de réensemencement plus longues également (48h et 7 jours). Une autre étude pourrait être entreprise sur des biofilms de *P. fluorescens* afin de tester l'effet du cadmium dans des conditions où la population bactérienne est plus dense et bénéficie d'une organisation plus compacte, paramètres qui pourraient également jouer sur le niveau de résistance de ces bactéries.

*Conclusion générale et
Perspectives*

Conclusion générale et Perspectives

Nous avons abordé dans ce travail de thèse deux études distinctes ayant pour objectif commun, et dans un futur proche, le développement de procédés de phytoremédiation assistés par des bactéries dans le but de dépolluer les sols contaminés par des éléments traces métalliques.

La 1^{ère} étude que nous avons réalisée concerne l'évaluation de l'accumulation du cadmium (Cd) chez trois espèces de plantes halophytes du genre *Atriplex* (*A. halimus*, *A. canescens* et *A. nummularia*). Nos résultats ont apporté de nouveaux éléments concernant ces plantes, dont les plus importants sont les suivants :

- Les deux espèces *A. canescens* et *A. nummularia* révèlent une grande capacité d'hyper-accumulation du Cd qui semble s'amplifier en présence du sel ;
- Les trois plantes *Atriplex*
 - Possèdent une limite d'accumulation de Cd en présence de sel ;
 - Ont la capacité d'excréter l'excès de Cd à la surface de leurs feuilles.

La 2^{ème} partie de ma thèse a été consacrée à l'étude de la souche *P. fluorescens* (ATCC 13525) et à son interaction avec le cadmium. Une fois les conditions de croissance de *P. fluorescens* optimisées (à 28°C, en milieu MH pendant 15h) et l'attachement cellulaire à des substrats réalisé et vérifié (substrats fonctionnalisés et fixation au glutaraldéhyde), nous avons pu caractériser cette bactérie par AFM à l'air et en milieu liquide. Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- Les cellules planctoniques saines de *P. fluorescens* ont une forme en bâtonnets allongés. Elles possèdent une membrane externe structurée en inter-domaines sous forme d'ondulations et une enveloppe bactérienne pourvue d'invaginations très caractéristiques des bactéries Gram⁻.
- L'état de la bactérie (saine ou affaiblie) influence l'ensemble de ces caractéristiques (forme, dimension, invaginations et structuration membranaire).
- Si la bactérie est exposée au Cd, la CMI est du même ordre de grandeur que celle observée pour *E. coli* (1 g/l) mais on n'observe pas de lyse cellulaire alors que cette dose s'avère létale pour *E. coli*.
- D'autre part, l'étude complémentaire effectuée par MEB sur *P. fluorescens* et couplée à une analyse chimique EDX permet de détecter la présence du Cd et de le localiser dans certaines zones du dépôt bactérien (surface bactérienne, exo vésicules et/ou sur

débris cellulaires). Ces résultats sont nouveaux (en particulier dans le cas de *P. fluorescens*) et nous permettent de confirmer l'effet toxique du Cd sur *E. coli* et, en parallèle, l'adaptabilité de *P. fluorescens*. Cette dernière nous amène finalement à suggérer que c'est une espèce potentielle pour la biorestauration du Cd. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle étude effectuée sur *P. fluorescens* utilise le paramètre morphologique comme « un marqueur » permettant de renseigner sur son état, en particulier dans le cadre d'une interaction avec le Cd.

A ce stade, l'ensemble de nos résultats laissent déjà entrevoir l'utilisation des espèces étudiées (plantes *Atriplex* et bactéries *P. fluorescens*) dans les programmes de phytoremédiation des sols. Il est possible, dès lors, d'élargir le spectre de notre étude, réalisée en grande partie *in vitro* et de le transposer à une situation *in vivo* en (i) re-végétalisant rapidement les zones encore dépourvues de végétation et (ii) en ciblant de nouveaux sites pollués. D'ailleurs, cette stratégie est considérée comme étant l'une des mieux adaptées notamment quand les volumes contaminés sont importants (cas des sols) et quand d'autres stratégies de dépollution sont difficiles à mettre en œuvre ou trop coûteuses. En effet, un des avantages de la phytoremédiation est de permettre de stabiliser les polluants de façon à limiter la production de poussières nocives par les phénomènes d'érosion.

Plusieurs axes se dessinent en termes de perspectives :

- Une suite logique de cette étude consisterait à orienter les recherches vers des mécanismes complémentaires de la résistance aux métaux lourds chez ces plantes *Atriplex* comme, par exemple, les phénomènes de chélation intracellulaire. Il serait également intéressant de procéder aux premiers tests de colonisation des racines de plantes *Atriplex* par *P. fluorescens* en conditions réelles, puis de réaliser un suivi de la dépollution d'un site après re-végétalisation par cette association plante-bactérie en contrôlant périodiquement les paramètres de mobilité des métaux lourds.
- En parallèle, la poursuite naturelle de l'étude que nous avons effectuée sur les cellules planctoniques de *P. fluorescens*, est l'étude de l'effet du Cd sur les biofilms correspondants afin de sonder l'effet du Cd sur une population bactérienne beaucoup plus dense, possédant une meilleure organisation communautaire et donc potentiellement plus résistante au stress induit par le métal. Une telle étude a d'ailleurs déjà été initiée dans le cadre d'une thèse Franco-Algérienne en cours. Il serait aussi intéressant d'utiliser des techniques complémentaires qui permettraient d'approfondir

et de mieux comprendre les différents mécanismes intervenant au niveau subcellulaire et moléculaire en présence du Cd.

- Enfin, en parallèle de ces études fondamentales, nous pourrions mettre à profit notre expérience issue de travaux antérieurs dans l'équipe sur la conception de biocapteurs. Nous avons en effet démontré qu'il est possible de détecter des traces de Cd en suivant le stress bactérien.

MA PRODUCTION SCIENTIFIQUE (2016-2021)

Communication internationale (9)

1-Kahli H., Amamra R, Yahyaoui A, Djebbar M Réda, Berrebah H. **Evaluation de la toxicité d'un xénobiotique (dioxyde de titane) sur un organisme animal bio-accumulateur /bio-indicateur : *helix aspersa*.** 6^{ème} colloque international de science et environnement, du 21 au 23 mars 2016 (prix de la meilleure communication affichée)

2-Yahyaoui A, Djebbar M Réda, Alayat A, Kahli H, Berrebah H. Toxicité potentiel d'un élément trace métallique sur un modèle biologique animal bio-accumulateur /bio-indicateur de pollution : *helixaspersa*. 6^{ème} colloque international de science et environnement, du 21 au 23 mars 2016(communiqué affiché)

3-Khene L, Berrebah H, Djebbar M Réda, Djekoun M, Benamara M, Yahyaoui A, Kahli H. Ecotoxicological impact of refinery emission on biological indicator organisms: *helixaspersa*. 6^{ème} colloque international de science et environnement, du 21 au 23 mars 2016(communiqué affiché)

4- Sbartai H, Sbartai I, Kahli H, Lagroum Y, Amiri A. Effects of heavy metal (cd), systemic fungicide (curzate) and their mixture cd /curzate on the antioxidant system of durum wheat (*triticum durum* desf. Var. Simeto).6th echems chemistry sevilla 2016. (Communication affichée).

5- Kahli H, Sbartai H, Sbartai I, Bouhacina-Cohen T. Détermination de la tolérance de trois espèces halophytes du genre *atriplex*, utilisées pour la réhabilitation des sols contaminés par le cadmium. 4th international congress of plants biodiversity, Marrakech, Maroc .2017 (Communication orale).

6- Kahli H, Debez N, Ben Abdallah Z, Béven L, Moroté F, Grauby-Heywang C, Sbartai H, Cohen-Bouhacina T. Electrochemical and microscopic characterization of the interaction of certain metallic trace elements with bacteria. European advances materials congress; Stockholm, Suède. (Communication affichée).

7- Kahli H, Debez N, Béven L, Moroté F, Grauby-Heywang C, Sbartai H, Cohen-Bouhacina T. 20^{ième} édition du forum des microscopies à sonde locale. Montpellier, France (participation).

8- Kahli H, Béven L, Moroté F, Grauby-Heywang C, Sbartai H, Cohen-Bouhacina T. Etude par microscopie à force atomique d'une bactérie tellurique « *pseudomonas fluorescens* » utilisée dans la bioremédiation des sols contaminés par des xénobiotiques.15^{ème} colloque de la société française de microscopie (sfmu). Bordeaux, France. (Communication affichée).

9- Kahli H, Debez N, Béven L, Moroté F, Grauby-Heywang C, Sbartai H, Cohen-Bouhacina T. Atomic force microscopy study of telluric bacteria "*Pseudomonas fluorescens*" used in the bioremediation of soils contaminated with xenobiotics. 2nd international symposium on

biodiversity research (virtual) held on november 18 - 20, 2020 in Rize, Turkey. (**Communication affichée**).

10- **Kahli H**, Debez N, Béven L, Gammoudi I, Moroté F, Grauby-Heywang C, Sbartai H, Cohen-Bouhacina T. **Morphological and nanomechanical characterization by atomic force microscopy of a bio-depollutant of natural environments, the bacterium "Pseudomonas fluorescens»**. SFB-GEM MEETING 2021BIOPHYSICS OF MEMBRANES AND BEYOND 27th- 30th September 2021, Online. (**Communication affichée**).

11- **Kahli H**, Debez N, Béven L, Gammoudi I, Moroté F, Grauby-Heywang C, Sbartai H, Cohen-Bouhacina T. **Morphological and nanomechanical characterization by atomic force microscopy of Pseudomonas fluorescens bacterium, a bio-depollutant of natural environments**. GULLIVER travel 21th- 24th September 2021, LOMA, CRPP. (**Communication affichée**).

Publication RICL (8)

1- Zouainia S, Djebbar M Réda, Sbartai H, Cherait A, Khene L, **Kahli H**, Berrebah H.,2016 **Toxicological impact assesement of cadmium on aquatic macrophte: *Elodea canadensis***, studia universitatis vasile goldis vol 26, iss 3.

2- Yahyaoui A, Djebbar M Reda, Khene L, Bouarroudj T, **Kahli H**, Bourayou C. 2017 **Assessment of exposure wheat triticum aestivuml. to zinc oxide nanoparticles (ZnO): evaluation of oxidative damage**, Studia Universitatis vasile Goldis vol 27, iss 4.

3- Khene L, Berrebah H, Yahyaoui A, Bouarroudj T, Zouainia S, **Kahli H**, Bourayou C. 2017 **Biomarkers of oxidative stress,lipid peroxidation and ros production induced by tio2 microparticles on snails *Helix aspersa***, Studia Universitatis vasile Goldis vol 27,iss 2.

4- Bourayou C, Berrebah H, Djekoun M, Bouarroudj T, Yahyaoui A, Khene L, **Kahli H**, Djebbar M Réda. 2019 **Growth inhibition and oxidative stress in the freshwater *Ciliate parameciumsp* exposed to copper oxide nanoparticles**, Studia Universitatis vasile Goldis vol 29,iss 2.

5- Gammoudi I, MathéliéGuinlet M, Benabdallah Z, Moroté F, **Kahli H**, Beven L, Kalfate R, Othman A, Delville MH, Grauby-Heywang C, Dejous C, Cohen-Bouhacina T.,2020. **Revisiting of the physico-chemical properties of polyelectrolyte multilayers for a fine tuning of the immobilization of bacteria or nanoparticles**. Thin Solid Films, vol713,138345.

6- **Kahli H**, Sbartai H, Cohen-Bouhacina T, Bourguignon J., 2020. **Characterization of cadmium accumulation and phytoextraction in three species of the genus *Atriplex* (*canescens*, *halimus* and *nummularia*) in the presence or absence of salt**. Plant Physiology and Biochemistry, vol 06,027.

7- Kahli H, Beven L, Grauby-Heywang C, Squarcia L, Debez N, Gammoudi I, Morote F, Sbartai H, Cohen-Bouhacina T., 2022. Morphological and structural study of a telluric bacterium *Pseudomonas fluorescens* used in the bioremediation of soils. (en cours de soumission).

8- Kahli H, Grauby-Heywang C, Beven L, Delors B, Morote F, Sbartai H, Gammoudi I, Cohen-Bouhacina T., 2022. Evaluation by AFM and SEM cadmium bacterial interaction via a morphological study: resistance in *Pseudomonas fluorescens* and toxicity in *Escherichia coli*. (en cours de redaction).