

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Science de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

N° d'ordre : 42 / DS / 2020
N° de série : 02 / BIC / 2020



Thèse de Doctorat
Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat en Sciences
Option : Biochimie-Microbiologie appliquée

Par :

KASSA LAOUAR Mounia épouse CHOUIKH

Intitulé:

Étude des mécanismes de résistance de bactéries endophytes isolées à partir des racines d'*Hedysarum pallidum* et de *Lygeum spartum* poussant sur des déblais de mine d'antimoine.

Soutenue : Le 09/ 07/ 2020

Membres du jury :

Président :	Pr. AMMEDAH. S.	Université des Frères Mentouri Constantine1
Directrice :	Pr. MECHAKRA. A.	Université des Frères Mentouri Constantine1
Co-Directrice	Pr. RACHED O.	ENSB Constantine.
Examineurs :	MCA. BANI M.	ENSB Constantine
	Pr. ARHAB R.	Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi
	Pr. AFRI-MEHENNAOUI F.Z.	Université des Frères Mentouri Constantine1

Année universitaire 2019/2020

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes chers parents et mes chers beaux-parents, pour leur amour et leurs encouragements. Je voudrais leur exprimer ma reconnaissance et ma profonde affection.

Ma profonde reconnaissance à mon cher époux pour son soutien sans faille, sa grande indulgence, sa compréhension et surtout sa contribution dans le partage du stress de la recherche, qui m'ont été précieux pour accomplir ce travail; sans oublier mes deux poussins qui ont supporté mon absence depuis leur naissance et je leur dis " pardonnez-moi mes adorables".

Remerciements

Au terme de ce parcours aussi passionnant qu'escarpé et avant d'exposer le fruit de plusieurs années d'efforts, il m'est particulièrement agréable, en ces quelques lignes, de remercier et d'exprimer ma reconnaissance envers tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à sa réalisation.

Tout d'abord je remercie Dieu notre créateur, pour la volonté, la santé et la patience qu'il m'a donné durant toutes ces années d'étude, afin que je puisse en arriver là.

A l'issue de ce travail de recherche, je tiens tout d'abord à remercier **Mme. MECHAKRA-MAZA A.**, Professeur à l'Université des frères Mentouri, Constantine 1, qui a assuré la direction de ce travail de thèse avec beaucoup d'attention et de soin. Je la remercie particulièrement pour son soutien permanent, sa gentillesse, son appui moral, ses qualités humaines et scientifiques et sa patience tout au long de ce parcours.

Je remercie chaleureusement **Mme. RACHED-MOSBAH O.**, Professeur à l'École Nationale Supérieure de Biotechnologie de Constantine(ENSB), pour avoir co-dirigé ce travail, en particulier pour sa disponibilité exceptionnelle, sa bienveillance, et d'avoir prêté un intérêt constant au sujet de la thèse, j'ai pu acquérir avec elle les connaissances indispensables pour réaliser des recherches avec rigueur dans les années à venir. Je lui dois beaucoup pour le contenu du travail présenté, pour ses critiques constructives et son aide face aux différentes entraves rencontrées.

J'adresse également mes vifs remerciements à **Mme. RODRIGUE A.**, directrice de l'équipe des métaux et bactéries du laboratoire Microbiologie, Adaptation et Pathogénie (MAP) de Lyon-France, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et avoir supervisé utilement durant le stage que j'ai effectué sous son égide en matière de biologie moléculaire.

Je souhaite remercier aussi **Mme. AMMEDAH S.**, professeur à l'Université des frères Mentouri Constantine 1, pour l'honneur qu'elle me fait en daignant présider ce jury.

Je témoigne également ma reconnaissance à Mme. **MEHANNAOUI F.Z.**, Professeur à l'Université des frères Mentouri, Constantine 1, pour avoir acceptée d'examiner mon travail.

Je remercie aussi **Mr. ARHAB R.**, Professeur à l'Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi, d'avoir bien voulu accepter d'examiner ma thèse.

Je remercie aussi **Mr. BANI M.**, Maître de conférence à l'École Nationale Supérieure de Biotechnologie de Constantine (ENSB), pour l'intérêt apporté à mon travail en ayant accepté de l'examiner.

J'exprime toute ma gratitude à **Mme. BENTELLIS-MOSBAH A.**, Maître de conférence à l'École Nationale Supérieure de Biotechnologie de Constantine (ENSB), pour l'aide très précieuse qu'elle a apporté dans le traitement statistique des données.

Mes sincères remerciements sont exprimés agréablement à **Mme. MOSBAH F.** qui a suivi ma thèse durant toute la période de sa réalisation. C'est une seconde maman pour tous les doctorants et les masterants du laboratoire, et qui était toujours prête à rendre service. Je n'oublierai jamais ses bras qui étaient toujours ouverts à chaque fois que j'ai traversé des moments difficiles.

J'adresse un grand merci à **Mme. ROUABEH L.**, Professeur à l'Université des frères Mentouri, Constantine 1, pour sa confiance et sa motivation.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent également à mes collègues et mes amis du Laboratoire de Biologie et Environnement (LBE) de Constantine, en particulier Wissem, Sara, Hichem.

Enfin, à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin à ce travail et à tous ceux qui ont bien voulu honorer de leur présence cette présentation, veuillez recevoir mes sincères remerciements.

Table des matières

Table des matières	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1

Premier chapitre : Synthèse bibliographique

1 Métaux lourds	4
1.1 Définition.....	4
1.2 Contamination des sols par les métaux lourds	5
1.2.1 Origine naturelle.....	5
1.2.2 Origine anthropique.....	6
1.3 Toxicité des métaux lourds	7
1.4 Biodisponibilité des métaux lourds dans le sol	7
1.4.1 Facteurs abiotiques	8
1.4.1.1 pH	8
1.4.1.2 Potentiel d'oxydo-réduction (Eh)	9
1.4.1.3 Teneur en argile et capacité d'échanges cationiques (CEC)	9
1.4.1.4 Température.....	10
1.4.1.5 Matière organique (MO)	10
1.4.2 Facteurs biotiques	10
1.4.2.1 Solubilisation.....	11
1.4.2.2 Insolubilisation	11
1.4.2.3 Volatilisation	11
1.5 Caractéristiques générales des métalloïdes étudiés	12
1.5.1 Antimoine	12
1.5.1.1 Généralités et sources.....	12
1.5.1.2 Spéciation.....	13
1.5.2 Arsenic.....	13
1.5.2.1 Généralités et sources.....	13
1.5.2.2 Spéciation.....	14
2 Bactéries endophytes	15
2.1 Définition.....	15
2.2 Diversité des bactéries endophytes.....	15
2.3 Infection de la plante hôte par les bactéries endophytes.....	16
2.4 Interaction endophytes – plante hôte.....	16
2.4.1 Bioprotection des plantes.....	16
2.4.2 Fixation d'azote.....	17
2.4.3 Production de phytohormones.....	17
2.4.4 Solubilisation du phosphore.....	17
2.4.5 Production de biofilm	18
2.4.6 Production d'ACC désaminase	18
3 Interaction bactéries - métaux lourds	18
3.1 Tolérance aux métaux.....	18
3.2 Résistance aux métaux	19
3.3 Stratégies de défense bactérienne contre les métaux lourds	19
3.3.1 Réduction de l'absorption du métal.....	20
3.3.2 Séquestration extracellulaire et intracellulaire du métal	20
3.3.3 Détoxification enzymatique des métaux	21
3.3.4 Transport des métaux par efflux actif.....	21
3.3.5 Production de sidérophores	22
3.4 Déterminants génétiques de la résistance bactérienne aux métaux lourds.....	22

3.5	Corrélation de la résistance aux antibiotiques et aux métaux	23
3.6	Effets des métaux lourds sur les microorganismes du sol	24
4	Réponse des bactéries au stress métallique	24
4.1	Définition du stress oxydatif	24
4.2	Génération d'un stress oxydatif	25
4.3	Principales cibles biologiques des ROS	26
4.3.1	Lipides	26
4.3.2	ADN	27
4.3.3	Protéines	28
4.4	Mécanisme antioxydant et détoxification des ROS	29
4.4.1	Système antioxydant enzymatique	29
4.4.1.1	Superoxyde dismutase (SOD, EC1.15.1.1)	30
4.4.1.2	Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	32
4.4.1.3	Catalase-peroxydases (POX, EC 1.11.1.6. et 1.11.1.7)	33
4.4.1.4	Peroxydases	34
4.4.2	Système antioxydants non-enzymatiques	35
4.4.2.1	Proline	35
4.4.2.2	Acide ascorbique	36
4.4.2.3	Glutathion	36

Deuxième chapitre : Matériel et méthodes

1	Objectif du travail	37
2	Caractéristiques de la zone d'étude	37
3	Caractéristiques des plantes étudiées	39
3.1	<i>Hedysarum pallidum</i>	39
3.2	<i>Lygeum spartum</i>	39
4	Échantillonnage des plantes	40
5	Mise en évidence des bactéries endophytes	40
6	Fréquence de colonisation (FC)	41
7	Biodiversité des endophytes	42
7.1	Purification des isolats	42
7.2	Description morphologique	42
7.3	Test de Gram	42
7.4	Type respiratoire	43
7.5	Type de métabolisme du glucose (test OF)	43
7.6	Test de l'oxydase	43
7.7	Identification biochimique à l'aide des galeries API®	43
8	Impact de l'antimoine et de l'arsenic sur les bactéries endophytes	44
8.1	Préparation de l'inoculum	44
8.2	Tests de toxicité <i>in vitro</i>	45
8.2.1	Sur milieu solide	45
8.2.2	Sur milieu liquide	45
9	Identification moléculaire des bactéries résistantes à l'antimoine et à l'arsenic	45
9.1	Extraction de l'ADN génomique	45
9.2	Amplification du gène correspondant à l'ARN 16S	46
9.2.1	Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR)	46
9.2.2	Optimisation de la PCR avec la Prim STAR polymérase	46
9.2.3	Vérification des amplifiats par électrophorèse	46
9.2.4	Séquençage et analyse des séquences	47
10	Étude du stress oxydatif des bactéries endophytes résistantes	47
10.1	Préparation de la biomasse bactérienne	47
10.2	Changement de pH	48
10.3	Estimation de la croissance	48
10.4	Détermination du H ₂ O ₂ intracellulaire	48

10.5	Détermination de la proline intracellulaire	48
10.6	Préparation de l'extrait enzymatique.....	49
10.6.1	Détermination du malonyldialdéhyde (MDA)	49
10.6.2	Activités enzymatiques antioxydantes	49
10.6.2.1	Catalase	49
10.6.2.2	Peroxydase	49
10.6.2.3	Ascorbate peroxydase	50
10.6.2.4	Superoxyde dismutase.....	50
10.6.2.5	Dosage des protéines.....	50
10.7	Étude statistique	50
11	Formation de biofilms par les bactéries endophytes résistantes	51
12	Détermination du seuil de toxicité de quelques métaux	51
12.1	Sur milieu solide	51
12.2	Sur milieu liquide.....	51
13	Tests de résistance aux antibiotiques	51
14	Étude moléculaire de la résistance aux métalloïdes	52
14.1	Extraction de l'ADN plasmidique des endophytes résistante	52
14.1.1	Principe	52
14.1.2	Protocole	52
14.2	Quantification de l'ADN	52
14.3	Transformation bactérienne	53
14.3.1	Transformation par l'ADN plasmidique	53
14.3.2	Transformation par l'ADN génomique.....	53
14.3.2.1	Vecteur et souche sauvage	54
14.3.2.2	Digestion par les endonucléases de restriction	54
14.3.2.3	Ligation de l'ADN.....	55
14.3.2.4	Electroporation	55
14.3.2.5	Criblage de la banque.....	56

Troisième partie : Résultats et discussion

1	Choix des plantes	57
2	Mise en évidence des endophytes bactériens	58
3	Biodiversité des endophytes bactériens	62
3.1	Purification des isolats.....	63
3.2	Caractérisation des isolats.....	63
3.2.1	Description morphologique des colonies	64
3.2.2	Coloration de Gram.....	64
3.2.2.1	Composition biochimique des parois cellulaires	64
3.2.2.2	Répartition des isolats selon la morphologie.....	65
3.2.3	Identification biochimique en utilisant les galeries API®.....	66
4	Détermination des niveaux de résistance des isolats vis-à-vis du Sb et d'As	71
4.1	Choix du milieu de culture.....	71
4.2	Seuil de tolérance aux métalloïdes étudiés	72
4.2.1	Résistance des endophytes à l'antimoine	73
4.2.2	Résistance des endophytes à l'arsenic.....	74
5	Identification des souches résistantes	76
5.1	Caractérisation phénotypique.....	76
5.2	Caractérisation moléculaire.....	78
6	Étude du stress oxydatif induit par les métalloïdes chez les endophytes résistants	83
6.1	Effet des métalloïdes sur le pH du milieu de culture.....	83
6.2	Effet des métalloïdes sur la croissance bactérienne.....	84

6.3	Effet des métalloïdes sur la teneur intracellulaire en peroxyde d'hydrogène	86
6.4	Effet des métalloïdes sur la peroxydation lipidique	89
6.5	Effet des métalloïdes sur la production de la proline.....	91
6.6	Effet des métalloïdes sur les activités des enzymes antioxydantes	94
6.6.1	Catalase (CAT)	95
6.6.2	Peroxydase (POD).....	96
6.6.3	Ascorbate peroxydase (APX)	98
6.6.4	Superoxyde dismutase (SOD).....	101
7	Effet de l'antimoine et de l'arsenic sur la morphologie cellulaire	104
8	Formation de biofilm par <i>S. marcescens</i>	106
9	Seuil de tolérance des deux souches de <i>S. marcescens</i> à quelques métaux	108
10	Résistance des deux souches de <i>S. marcescens</i> à quelques antibiotiques	112
11	Relation entre la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds	114
12	Étude moléculaire de la résistance de <i>S. marcescens</i> à l'antimoine et à l'arsenic	115
12.1	Recherche de plasmides.....	116
12.2	Transformation par l'ADN plasmidique de <i>S. marcescens</i>	117
12.3	Transformation par l'ADN génomique de <i>S. marcescens</i>	119
12.4	Criblage de la banque génomique	122
	Conclusion	125
	Références bibliographiques	128
	Annexes	
	Résumé	
	Abstract	
	ملخص	
	Publication	

Liste des abréviations

16S rRNA gene : Gène codant les ARN ribosomiaux 16S

Abs : Absorbance

ACC : Aminocyclopropane-1-carboxylate

AIA : Acide indole-3-acétique

ANOVA : Analyse de la variance

APX : Ascorbate peroxydase

As : Arsenic

BET : Bromure d'éthidium

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

BSA : Bovine sérum albumine

CAT : Catalase

CDF : Cation Diffusion Facilitators

CEC : Capacité d'échange cationique

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

EC : Enzyme commission

EDTA : Acide EthylèneDiamineTétraAcétique

Eh : Potentiel d'oxydo-réduction

EPS : Exopolysaccharidique

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

ETM : Eléments traces métalliques

EUCD : European Union Council Directive

FC : Fréquence de colonisation

FI : Fréquence d'isolement d'un individu

GSH : Glutathion réduit

HNE : 4-hydroxynonéal

INSA : Institut national des sciences appliquées

IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

MDA : Malonyldialdehyde

MFS : Major Facilitator Superfamily

MEGA : Molecular Evolutionary Genetic Analysis

MO : Matière organique

NCBI : National Center for Biotechnology Information

O.M.S : Organisation mondiale de la santé

p : Probabilité

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (de l'anglais Polymerase Chain Reaction)

PEG : Polyéthylène glycol

PGPR : Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria

POD : Peroxydase

pUC : Plasmide of university of California

r : Corrélacion entre les variables

RND : Resistance-Nodulation-Cell Division

ROS: Reactive oxygen species

Sb : Antimoine

SEM : Somme des Erreurs Moyenne

SOD: Superoxyde dismutase

TAE : Tris-Acétate-EDTA

TBA : Acide thiobarbiturique

Th : Température d'hybridation

TSS : Transformation Storage Solution

Liste des figures

- Figure 1** : Origine des métaux lourds dans le sol.
- Figure 2** : Biodisponibilité des ETMs dans le sol.
- Figure 3** : Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds.
- Figure 4** : Tableau périodique.
- Figure 5** : Mécanismes de résistance bactérienne aux métaux.
- Figure 6** : Schéma de la balance entre les ERO et les antioxydants.
- Figure 7** : Etapes de réduction monoélectronique du dioxygène.
- Figure 8** : Différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène.
- Figure 9** : Processus de la peroxydation lipidique.
- Figure 10** : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.
- Figure 11** : Quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.
- Figure 12** : Mode d'action des enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques.
- Figure 13** : Localisation géographique du terrain d'étude.
- Figure 14** : Photos d'*Hedysarum pallidum* (A) et de *Lygeum spartum* (B) prises lors des prélèvements des échantillons dans la zone d'étude.
- Figure 15** : Carte de restriction du plasmide pUC 18.
- Figure 16** : Développement de colonies bactériennes endophytes à partir des racines d'*H. pallidum* (A) et de *L. spartum* (B) sur GN additionnée d'un antifongique et (C) représente la boîte contrôle.
- Figure 17** : Fréquence de colonisation (%) des bactéries endophytes chez *H. pallidum* et *L. spartum*.
- Figure 18** : Distribution des bactéries endophytes selon leur Gram.
- Figure 19** : Distribution des bactéries endophytes selon leur morphologie et leur Gram.
- Figure 20** : Composition de la flore bactérienne endophyte des racines d'*H. pallidum* et de *L. spartum*.
- Figure 21** : Abondance de bactéries endophytes résistantes à différentes concentrations d'antimoine (Sb) et d'arsenic (As), isolées des racines d'*H. pallidum* (H) et *L. spartum* (L).
- Figure 22** : Photos de la souche H6R1B Mc résistante à l'antimoine (A) et de la souche L6R2B Mc résistante à l'arsenic (B) sur la gélose Mac Conckey.
- Figure 23** : Observation microscopique (G x 100) de la souche H6R1B Mc (A) et de la souche L6R2B Mc (B), après coloration de Gram.
- Figure 24** : Résultat du type respiratoire (VF) et de la voie de métabolisme glucidique (HL) de la souche H6R1B Mc (A) et de la souche L6R2B Mc (B).
- Figure 25** : Résultats des tests biochimiques sur des Galeries API 20E de la souche H6R1B Mc (A) et de la souche L6R2B Mc (B)
- Figure 26** : Représentation schématique du gène codant pour l'ARNr 16S.
- Figure 27** : Profil électrophorétique, sur le gel d'agarose 0,8 %, de l'ADN génomique des bactéries endophytes monorésistantes à l'antimoine et à l'arsenic.

- Figure 28** : Produits d'amplification du gène 16S ribosomique des bactéries, monorésistantes à l'antimoine et à l'arsenic, sur le gel d'agarose 0,8 %.
- Figure 29** : Arbre phylogénétique selon la méthode de *p*-distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences d'ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega version 7.
- Figure 30** : Taux de croissance de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture.
- Figure 31** : Teneur intracellulaire en H₂O₂ dans la biomasse fraîche (BF) de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture.
- Figure 32** : Teneur intracellulaire en MDA dans la biomasse de *S.marcescens* (Sb) et de *S.marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture.
- Figure 33** : Teneur intracellulaire en proline dans la biomasse fraîche (BF) de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture.
- Figure 34** : Variation de l'activité de la CAT de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture.
- Figure 35** : Variation de l'activité de la POD de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture.
- Figure 36** : Variation de l'activité de l'APX de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture
- Figure 37** : Variation de l'activité de la SOD de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture.
- Figure 38** : Mode de regroupement de *S. marcescens* (Sb) en absence et en présence d'antimoine (**A et A'**) et de *S. marcescens* (As) en absence et en présence d'arsenic (**B et B'**) (G x100).
- Figure 39** : Etude de formation de biofilm par *S. marcescens* et *E. coli* W3110 sur une plaque de polystyrène après 24 h (**A**) et 48 h (**B**) d'incubation sur M63G, LB modifié et LB
- Figure 40** : Zones d'inhibition de la croissance de *S. marcescens* (Sb), de *S. marcescens* (As) et d'*E. coli* W3110, en présence de Cu, de Cd, de Ni, de Hg, de Co et de Pb.
- Figure 41** : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition de la croissance de *S. marcescens* (Sb), de *S. marcescens* (As) et d'*E. coli* W3110 (W), en présence de Cu, de Cd, de Ni, de Hg, de Co et de Pb.
- Figure 42** : Profil de croissances de *S. marcescens* (Sb), de *S. marcescens* (As) et d'*E. coli* W3110 (W), en présence de concentrations graduelles de Ni et de Co.
- Figure 43** : Zones d'inhibition de la croissance de *S. marcescens* (Sb) (**A**), de *S. marcescens* (As) (**B**) et d'*E. coli* W3110 (**C**), en présence du chloramphénicol (2 ng/mL) (**1**), de l'ampicilline (10 ng/mL) (**2**) et de la kanamycine (5 ng/mL) (**3**).
- Figure 44** : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition de la croissance de *S. marcescens* (Sb), de *S. marcescens* (As) et d'*E. coli* W3110 (W), en présence du chloramphénicol (2 ng/mL) (**Cm**), de l'ampicilline (10 ng/mL) (**Amp**) et de la kanamycine (5 ng/mL) (**Kan**).
- Figure 45** : Profil électrophorétique du plasmide des deux endophytes *S. marcescens* sur le gel d'agarose 0,8 %.
- Figure 46** : Profil de croissances d'*E. coli* W3110 (W) et les transformants par le plasmide de *S. marcescens* Sb (**Trans Sb**) en présence de 3 mM de Ni et 1 mM de Co sur le milieu M63G.

Figure 47 : Digestion de l'ADN génomique de *S. marcescens* (Sb) par *Sau3A*.

Figure 48 : Digestion du plasmide pUC18 par *BamHI*.

Figure 49 : Résultats de la transformation d'*E. coli* Top ten par l'ADN génomique de *S. marcescens* (Sb) en utilisant le plasmide pUC18 comme vecteur.

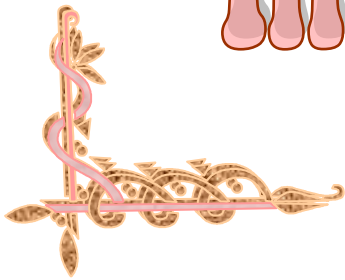
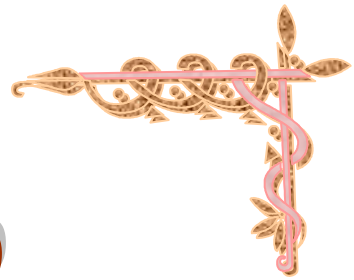
Figure 50 : Criblage de la génothèque de l'endophyte *S. marcescens* (Sb) sur le milieu LB modifié solide supplémenté par 400 mM de Sb.

Figure 51 : Taux de croissance du clone 44, de *S. marcescens* (Sb) et d'*E. coli* W3110 (W) en présence de concentrations graduelles en Sb dans le milieu LB modifié liquide

Liste des tableaux

- Tableau 1 :** Sources industrielles et agricoles des métaux présents dans l'environnement.
- Tableau 2 :** Résultats d'isolement et la fréquence de colonisation (FC) (%) des endophytes bactériens d'*H. pallidum* et de *L. spartum*.
- Tableau 3 :** Composition générale de la flore bactérienne endophyte et fréquence d'individu (%) des endophytes bactériens chez *H. pallidum* et *L. spartum*.
- Tableau 4 :** Affiliation phylogénétique des endophytes H6R1B Mc et L6R2B Mc.
- Tableau 5 :** Valeurs du pH du milieu de culture avant et après 24 h d'incubation de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) dans le milieu LB modifié, en présence de concentrations graduelles en Sb et en As
- Tableau 6.** Coefficients de corrélation de *Pearson* entre les concentrations de l'antimoine (Sb) dans le milieu de culture et entre tous les biomarqueurs analysés
- Tableau 7 :** Coefficients de corrélation de *Pearson* entre les concentrations de l'arsenic (As) dans le milieu de culture et entre tous les biomarqueurs analysés
- Tableau 8 :** Coefficients de corrélation de *Pearson* entre les concentrations de l'antimoine (Sb), sauf 30 mM, dans le milieu de culture et entre tous les biomarqueurs analysés
- Tableau 9 :** Coefficients de corrélation de *Pearson* entre les concentrations de l'arsenic, sauf 20 mM, dans le milieu de culture et entre tous les biomarqueurs analysés

Introduction



Introduction

La distribution des métaux lourds et des métalloïdes dans la biosphère est gouvernée par de nombreux phénomènes naturels, ainsi que des activités anthropiques. À la différence de plusieurs autres polluants, les métaux ne sont pas biodégradables et de ce fait, ils persistent dans l'environnement et peuvent s'accumuler dans la chaîne trophique ; ce qui constitue une menace à long terme pour l'homme, la faune et la flore (Das et *al.*, 2014).

La toxicité potentielle des teneurs excessives en métaux lourds et métalloïdes, présents dans les déblais miniers, provoque des perturbations dans les écosystèmes naturels et réduit la diversité végétale. En revanche, certaines espèces végétales, selon les caractéristiques physicochimiques des sols, la nature des métaux, leur concentration et leur spéciation, ont développé des mécanismes particuliers pour s'adapter à la présence de ces contaminants. Certaines plantes, dites excluantes, arrivent à éviter l'absorption des métaux présents dans le sol et empêchent leur translocation vers les parties aériennes (Rascio et Navari-Izzo, 2011). D'autres plantes sont appelées accumulatrices, car elles sont capables d'absorber et d'accumuler des quantités excessives en métaux dans leurs tissus sans présenter de symptômes de phytotoxicité (Ross et Kaye, 1994).

En réponse au problème de la contamination de l'environnement par les métaux lourds, des méthodes physiques et chimiques ont été mises au point pour la détoxification des sites pollués. Néanmoins, l'application de ces méthodes est onéreuse, inefficace et laisse en général les sols stériles. La phytoremédiation est une alternative à ces approches, elle utilise des plantes pour la détoxification des sols métallifères. Bien que peu coûteuse, la phytoremédiation peut prendre une longue durée pour la décontamination des sols (Xiao et *al.*, 2010). C'est pourquoi, le recours à la bioremédiation serait la solution. C'est une alternative de restauration écologique la plus rentable et durable. Elle consiste à l'utilisation à la fois les plantes et la microflore, rhizosphérique et/ou endophytique, tolérante aux métaux (Igiri et *al.*, 2018).

Les endophytes bactériens sont des microorganismes ubiquitaires qui colonisent les tissus internes d'une plante sans lui causer de dommage apparent et symptomatique. Ils vivent en association à bénéfices réciproques, dont l'apport de nutriments à la plante, l'échange de quelques substances et la protection physique des microorganismes définissent la symbiose établie entre l'endophyte et son hôte (Zhao et *al.*, 2016 ; Qin et *al.*, 2017).

Au cours des dernières années, les bactéries endophytes isolées des plantes adaptées aux sites miniers ont attiré l'attention pour une éventuelle utilisation pour la bioremédiation, car elles possèdent des potentialités très importantes de résistance aux métaux lourds. En outre, ces microorganismes peuvent utiliser certains métaux lourds pour assurer leurs besoins énergétiques et leur croissance ; ce qui diminue leur concentration dans le sol et confère à la plante, par la suite, une meilleure adaptation au stress métallique (Ahmad et *al.*, 2018 ; Tiwari et Lata, 2018). Par conséquent, les endophytes bactériens peuvent atténuer la toxicité des métaux lourds et aider les plantes à les accumuler sans augmenter la phytotoxicité, ce qui améliore la bioremédiation.

L'exposition des bactéries à des concentrations élevées en métaux lourds ou métalloïdes a pour conséquence une surproduction d'espèces réactives oxygénées (ERO). Cela induit la production d'enzymes antioxydantes telles que la catalase (CAT), la peroxydase (POD), l'ascorbate peroxydase (APX) et la superoxyde dismutase (SOD) ainsi que des composés non enzymatiques tels que la proline, qui permettent une adaptation des bactéries aux stress métallique (Sanaa et *al.*, 2013). La mesure de ces antioxydants permet de mettre en évidence le degré d'adaptation des bactéries aux métaux lourds ou métalloïdes et donc leur possible utilisation dans la bioremédiation des sols contaminés. Il est également rapporté que l'adaptation de ces bactéries aux teneurs excessives en métaux lourds se serait traduite par l'expression d'un ou de plusieurs gènes plasmidiques ou chromosomiques (Mukherjee et *al.*, 2018 ; Uhrynowski et *al.*, 2019).

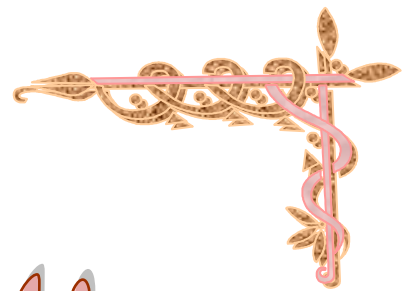
Une étude antérieure a mis en évidence des niveaux très élevés en antimoine dans les sols qui entourent les déblais d'une ancienne mine du Nord-est algérien, ce qui a entraîné des modifications de la végétation spontanée et la survie de certaines plantes résistantes (Rached-Mosbah et Gardou, 1988). C'est le cas d'*Hedysarum pallidum* Desf., une Fabaceae qui concentre jusqu'à 182 mg/kg d'antimoine (Sb) dans ses parties racinaires, et de *Lygeum spartum* L., une Poaceae qui prélève une quantité d'arsenic (As) dépassant 611 mg/kg (Benhamdi et *al.*, 2014). Selon les derniers auteurs, l'adaptation de ces plantes à des concentrations élevées en Sb et As s'est traduite par l'activation des enzymes antioxydantes telles que la GST, la CAT, la SOD, l'APX et la POD.

De tels résultats nous ont amené à explorer la flore bactérienne endophytique racinaire d'*H. pallidum* Desf. et de *L. spartum* L., avec deux objectifs. Le premier pour étudier la biodiversité de cette microflore endogène et la sélection des bactéries endophytes tolérantes à

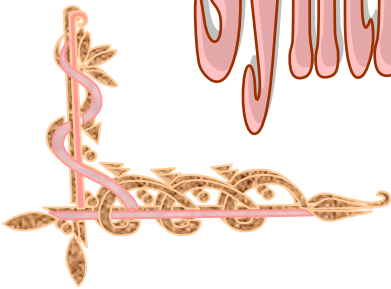
de fortes teneurs en antimoine et en arsenic et le deuxième pour étudier leurs mécanismes : biochimique, physiologique et moléculaire de résistance vis-à-vis du stress induit par les métalloïdes. Pour cela, ce travail a été réalisé comme suit :

- la constitution d'une collection de bactéries endophytes isolées à partir des racines d'*H. pallidum* et de *L. spartum*,
- l'identification de ces bactéries en se basant sur les caractères phénotypiques,
- la mise en évidence d'une ou des bactéries endophytes les plus tolérantes à l'antimoine et à l'arsenic par la détermination de leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI), puis leur caractérisation moléculaire *via* l'analyse du gène d'ARNr 16S,
- l'étude de l'impact des métalloïdes sur la production d'espèces réactives oxygénées, telles que H₂O₂, la peroxydation lipidique par la détermination de la teneur en MDA, le mécanisme antioxydant par la mesure des teneurs intracellulaire de la proline et les activités de la CAT, de la POD, de l'APX et de la SOD,
- l'étude de la multirésistance des bactéries sélectionnées vis-à-vis d'une gamme de métaux lourds et d'antibiotiques,
- l'étude physiologique et moléculaire des mécanismes de résistance en réponse à la présence d'antimoine et d'arsenic dans le milieu de culture.

La thèse est structurée en trois chapitres. Le premier synthétise les données bibliographiques sur les métaux lourds, les endophytes bactériens, la résistance des bactéries aux métaux lourds, le stress oxydatif et sa relation avec les métaux lourds. Le deuxième est consacré à la présentation du site d'étude, des caractéristiques du matériel biologique utilisé ainsi que la description des méthodes suivies. Le troisième présente les résultats et discussion. Le travail se termine par une conclusion générale et des perspectives.



Synthèse Bibliographique



1 Métaux lourds

1.1 Définition

La définition des métaux lourds varie d'un auteur à un autre. Dans la plupart des cas, ce terme est utilisé pour recouvrir des éléments ayant des propriétés métalliques (malléabilité, dureté, conductivité de chaleur et d'électricité, densité, stabilité des cations, spécificité de ligand...) et un numéro atomique supérieur à 20 (Raskin et *al.*, 1994).

D'un point de vue physique, les métaux lourds regroupent les éléments métalliques naturels, métaux ou métalloïdes, caractérisés par une masse volumique supérieure à 5g/cm^3 et ayant un numéro atomique élevé, en général supérieur à celui du Sodium (Na) ($Z=11$). (Adriano, 2001 ; Miquel, 2001).

D'un point de vue chimique, les métaux lourds peuvent former des cations de charge variable grâce à leur caractère électropositif qui leur confère la faculté de perdre facilement un ou plusieurs électrons ; il en résulte l'existence de plusieurs degrés d'oxydation (Benedetto, 1997).

D'un point de vue biologique, et en fonction de leurs effets physiologiques et toxiques, on distingue deux types de métaux :

- Les métaux essentiels ou oligo-éléments : ils sont indispensables pour de nombreux processus physiologiques, biochimiques et métaboliques. Ils servent comme cofacteurs enzymatiques, micronutriments, régulateurs de la pression osmotique et stabilisateurs des molécules (Shahid et *al.*, 2015 ; Fashola et *al.*, 2016). Ils sont présents dans la cellule à l'état de trace. Cependant, ils peuvent s'avérer toxiques lorsque leur concentration dépasse un certain seuil (Ayangbenro et Babalola, 2017). On cite comme exemple : le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le cobalt (Co), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le nickel (Ni), le chrome (Cr), le vanadium (V), le molybdène (Mo), le sélénium (Se).....
- Les métaux toxiques : ils ont un caractère polluant avec des effets toxiques pour les organismes vivants, même à faible concentration, comme le mercure (Hg), le plomb (Pb), le cadmium (Cd), l'arsenic (As) et l'antimoine (Sb) (Igiri et *al.*, 2018 ; Tiwari et Lata, 2018).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), on désigne sous le nom de métaux lourds, l'ensemble des éléments présentant un caractère toxique pour la santé humaine et l'environnement (Verginie, 2001). Une telle classification est d'ailleurs souvent discutée, car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement lourds, c'est le cas du zinc ; tandis que d'autres ne sont pas des métaux comme l'arsenic par exemple. Pour ces raisons, la plupart des scientifiques préfèrent la dénomination "Eléments en Traces Métalliques" (ETMs). Cette appellation est communément utilisée pour désigner les éléments métalliques présents en très faibles concentrations (traces) dans l'environnement. À l'état naturel, les ETMs sont des micropolluants capables d'entraîner des nuisances. Leur toxicité se développe par bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire (Miquel, 2001).

1.2 Contamination des sols par les métaux lourds

Les polluants présents dans l'environnement peuvent résulter de processus naturels ou de différentes activités anthropogènes (**Figure 1**).

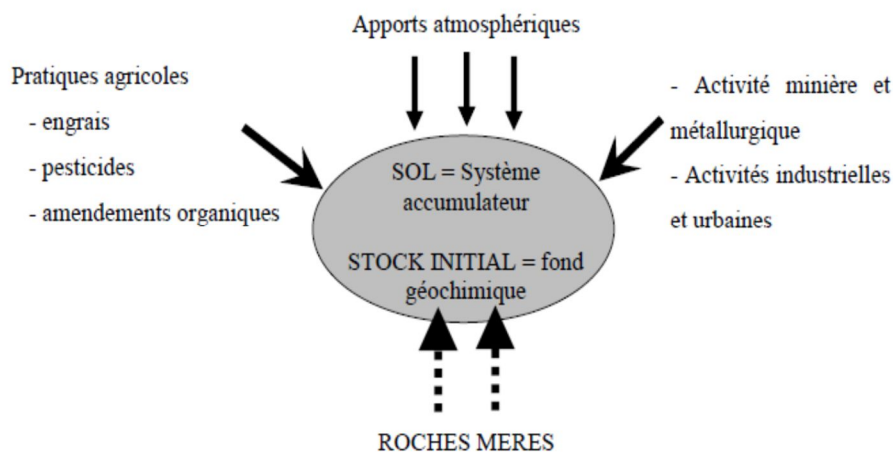


Figure 1 : Origine des métaux lourds dans le sol (Robert et Juste, 1999).

1.2.1 Origine naturelle

Les métaux sont naturellement présents dans la croûte terrestre. Ils sont, généralement, présents à de faibles teneurs dans les sols, les sédiments, les eaux de surface et les organismes vivants pour constituer le fond pédogéochimique (Ayangbenro et Babalola, 2017). Ce dernier est défini comme la teneur naturelle en éléments traces dans un sol en absence de tout processus d'apport ou d'exportation vers ou hors d'un site considéré (Callender, 2003).

1.2.2 Origine anthropique

Les différentes activités humaines sont responsables de l'augmentation des flux de métaux vers le sol, provoquant plusieurs types de pollutions (**Tableau 1**).

Tableau 1: Sources industrielles et agricoles des métaux présents dans l'environnement (Biney et *al.*, 1994).

Utilisations	Métaux
Batteries et autres appareils électriques	Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Ni,
Pigments et peintures	Ti, Cd, Hg, Pb, Zn, Mn, Sn, Cr, Al, As, Cu, Fe
Alliages et soudures	Cd, As, Pb, Zn, Mn, Sn, Ni, Cu
Biocides (pesticides, herbicides, conservateurs)	As, Hg, Pb, Cu, Sn, Zn, Mn
Agents de catalyse	Ni, Hg, Pb, Cu, Sn
Verre	As, Sn, Mn
Engrais	Cd, Hg, Pb, Al, As, Cr, Cu, Mn, Ni, Zn
Matières plastiques	Cd, Pb
Produits dentaires et cosmétiques	Sn, Hg
Textiles	Cr, Fe, Al
Raffineries	Ni, V, Pb, Fe, Mn, Zn
Carburants	Ni, Hg, Cu, Fe, Mn, Pb, Cd

- Certaines pratiques agricoles sont à l'origine d'une haute concentration en métaux lourds dans le sol. Les engrais, les insecticides, les fongicides, les boues résiduelles urbaines ou de composts destinés à améliorer les propriétés physicochimiques du sol sont souvent riches en métaux lourds (Robert et Juste, 1999 ; Alloway, 1995).
- La pollution atmosphérique résulte des activités industrielles et urbaines telles que l'industrie extractive et métallurgique, les pratiques liées à l'incinération, l'utilisation des énergies fossiles, l'essence au plomb, etc. Les métaux lourds issus de ce type de pollution se dispersent dans les hautes couches de l'atmosphère et retombent ailleurs, après un transport sur de très longues distances (Alloway, 1995).
- La pollution minière semble la principale source de métaux lourds dans l'environnement. Les déchets miniers, les fonderies métallurgiques et les terrils industriels provoquent une pollution liée principalement au zinc, au plomb et au cadmium (Leblanc et *al.*, 2000 ; Adler et *al.*, 2007).

1.3 Toxicité des métaux lourds

La toxicité des ions métalliques lourds dépend de leur nature, de la spéciation, de la dose et de la durée de leur exposition (Babich et Stotzky, 1980). Ces ions sont capables d'établir des complexes stables avec les macromolécules cellulaires, ce qui peut altérer ces structures (Baath, 1992). La toxicité des métaux relève de divers mécanismes :

- Altération des membranes cellulaires en modifiant leur perméabilité et en entraînant souvent un efflux d'ions et une dépolarisation de la membrane plasmique (Rodriguez et *al.*, 2006).
- Inhibition des activités enzymatiques par fixation des cations métalliques sur les acides aminés du site actif, comme la cystéine, le glutamate ou l'aspartate. Un excès d'ions métalliques peut aussi entrer en compétition avec un autre ion nécessaire à l'activité d'une enzyme et localisé dans son site actif (As, Sb, Se, W, F). Certains ions ont une structure proche du phosphate ou de l'ADP / ATP et ils peuvent inhiber les ATPases, c'est le cas du vanadate (Nies, 1999) ou des ions d'autres métaux comme : Al, Be, Sc, Y, Zr (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).
- Fixation des cations métalliques sur les groupements phosphates des acides nucléiques, peut empêcher la transcription ou la traduction des gènes (Hengstler et *al.*, 2003). Les ions métalliques peuvent également perturber le fonctionnement de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN. Par exemple, les ions Co^{2+} ou Cd^{2+} peuvent se substituer aux ions Zn^{2+} notamment présents dans certaines enzymes de réparation de l'ADN ou certains facteurs de transcription (Koedrith et Seo, 2011).
- Génération de stress oxydatif par formation de radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'ion Superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}) qui peuvent endommager l'ADN, les protéines ou encore les acides gras insaturés de la membrane cellulaire, ce qui conduit à une perturbation du fonctionnement cellulaire (Monchy, 2007 ; Appenroth, 2010).

1.4 Biodisponibilité des métaux lourds dans le sol

Les ions métalliques du sol peuvent exister sous forme d'ions libres ou liés à des particules de sol (**Figure 2**). Cependant, les risques ne résultent pas seulement de concentrations totales dans les sols pollués, mais principalement de la fraction libre, c'est-à-dire biodisponible (Adriano, 2001).

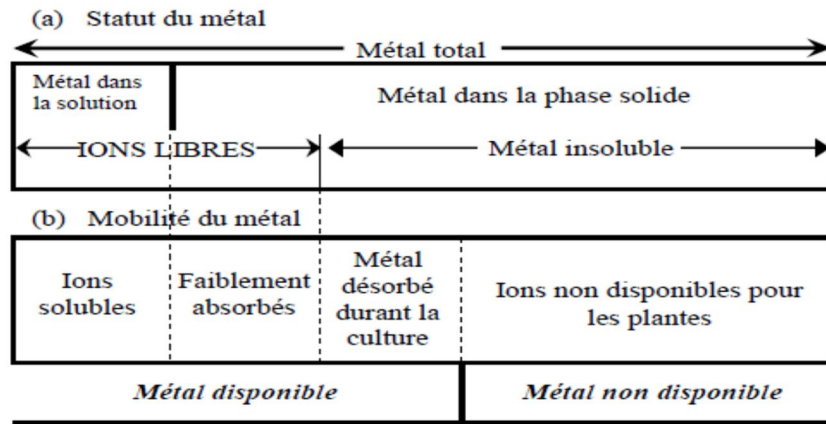


Figure 2 : Biodisponibilité des ETMs dans le sol (Huynh, 2009).

La biodisponibilité des métaux dans les sols est régie par plusieurs facteurs, abiotiques et biotiques, du sol (Qu et *al.*, 2017) (Figure 3).

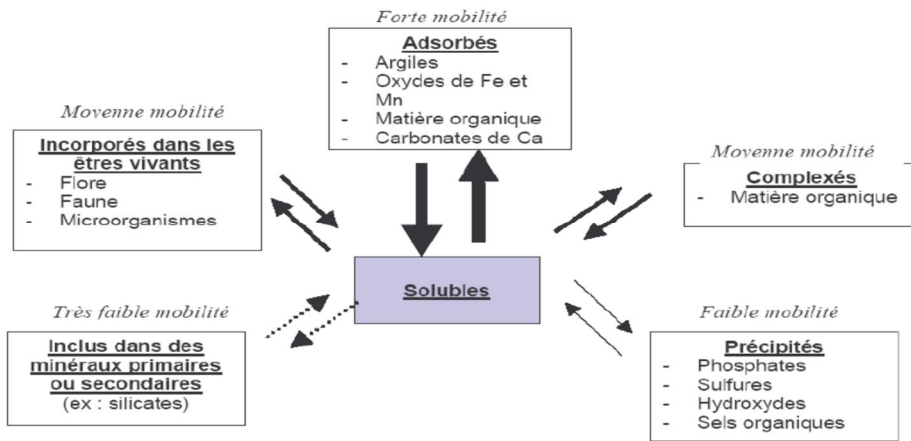


Figure 3 : Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds. La taille des flèches reflète leur mobilité (Juste, 1995).

1.4.1 Facteurs abiotiques

1.4.1.1 pH

Le pH est un facteur capital pour la solubilité et la spéciation du métal et donc de sa toxicité dans le sol. Un pH acide entraîne la désorption des cations, l'adsorption des anions et donc la mise en solution des sels métalliques (Igiri et *al.*, 2018). Car aux concentrations élevées en ions hydrogène, la surface de l'adsorbant est chargée positivement, réduisant ainsi l'attraction entre l'adsorbant et les cations métalliques. Par conséquent, les métaux lourds deviennent plus biodisponibles, ce qui augmente leur toxicité pour les microorganismes et les plantes (Ayangbenro et Babalola, 2017). Naturellement, l'acidification du sol est due à la respiration végétale et microbienne, et l'oxydation des sulfures, ce qui peut influencer la disponibilité des métaux (Giller et *al.*, 1998).

1.4.1.2 Potentiel d'oxydo-réduction (Eh)

Le potentiel d'oxydo-réduction (Eh) est une mesure de la disponibilité en électrons dans un milieu. Des valeurs d'Eh positives indiquent un environnement oxydant, et des valeurs d'Eh négatives indiquent un environnement réducteur. Le potentiel redox dépend des conditions d'oxydo-réduction du sol, notamment le pH, ce qui peut influencer la mobilité d'un élément en modifiant l'équilibre dissolution/précipitation par :

- Changement du degré d'oxydation de l'élément,
- changement du degré d'oxydation des ligands fixant le métal,
- formation ou dissolution de phases porteuses de l'élément (ex : hydroxyde) (Alloway, 1995 ; Blanchard, 2000)

La biodisponibilité des métaux est directement influencée par le potentiel redox du milieu. Ainsi, une baisse du potentiel redox se traduit généralement par la dissolution des (hydro) oxydes et entraîne une augmentation de la concentration des métaux liés, ce qui diminue la mobilité des éléments métalliques (Sposito, 1984).

Par ailleurs, le degré d'oxydation des éléments se complexant avec le métal modifie indirectement la solubilité des métaux lourds. Par exemple, en conditions réductrices, les sulfates sont réduits en sulfure et piègent les éléments métalliques chalcophiles tels que Fe, Zn, Pb et Cd (Chaignon, 2001 et Deneux-Mustin et *al.*, 2003). Dans ces mêmes conditions, la dissolution des oxy-hydroxydes est favorisée, provoquant de manière opposée la solubilisation des métaux associés (Chaignon, 2001).

1.4.1.3 Teneur en argile et capacité d'échanges cationiques (CEC)

Les argiles sont caractérisées par une surface chargée négativement. Cette électronégativité les rend capables d'établir des liaisons électrostatiques avec toute entité chargée positivement, notamment les cations métalliques. Ces liaisons sont réversibles et les cations fixés sont échangeables ; ils peuvent être remplacés par d'autres cations présents dans le sol (Eslinger et Peaver, 1988).

La capacité d'échange cationique (CEC) mesure la capacité d'une argile à échanger des cations. Celle-ci est une caractéristique importante de chaque argile, car elle conditionne grandement la biodisponibilité d'un métal dans le sol (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

1.4.1.4 Température

La température du sol dépend en premier lieu du climat, mais elle est également liée à l'activité biologique du sol. Elle a un impact direct sur la mobilité des éléments métalliques, en déplaçant l'équilibre dissolution/précipitation, et un impact indirect en modifiant la teneur en eau du sol, le pH (la solubilisation de CO₂ et des carbonates solides) ou le potentiel redox (Eh) (la solubilité de l'O₂) (Bandowe et *al.*, 2014).

1.4.1.5 Matière organique (MO)

La matière organique désigne différents types de composés carbonés et azotés. Elle est principalement issue de l'activité biologique de la biomasse en activité (microflore du sol, faune épilithique, animaux fouisseurs et rhizosphère des végétaux supérieurs) et de son produit de décomposition (débris de végétaux et d'animaux à divers stades de décomposition d'humus), mais peut également avoir une origine anthropique : composts, boues, pesticides, hydrocarbures.

La fraction vivante du sol influence la biodisponibilité des métaux, car cette fraction participe largement aux modifications du pH et au potentiel d'oxydo-réduction par ses activités métaboliques (Olaniran et *al.*, 2013). Les produits finaux de la décomposition biologique des organismes morts (les substances humiques, les acides organiques, les acides aminés, les protéines, les peptides, les lipides ou encore les cires) peuvent altérer les paramètres physicochimiques du sol, ce qui modifie la mobilité des éléments métalliques (Kabata-Pendias et Pendias, 2001). De plus, ces produits métaboliques sont des composés chimiquement réactifs, car ils présentent de nombreux groupements fonctionnels tels que les carboxyle, carbonyle, hydroxyle, amine et le sulfhydryle, ainsi que des composés aromatiques. Ces groupements fonctionnels peuvent interagir avec les métaux lourds pour former des complexes ou des chélates qui sont souvent très stables (Campbell et *al.*, 2002).

1.4.2 Facteurs biotiques

L'activité biologique est le seul facteur biotique caractéristique du sol. Elle est constituée d'une flore variée (macro, mezo et microbiotes), de la faune et de la végétation. La multiplicité des actions et des interactions de ces organismes rend difficile la compréhension des phénomènes biologiques jouant sur la solubilité des éléments traces métalliques dans les sols (Kabata-Pendias, 2004).

Par leur action sur les composés organiques et inorganiques du sol, les microorganismes ont une influence directe ou indirecte sur la spéciation des métaux et leur biodisponibilité. Les activités métaboliques de cette microflore influencent énormément la mobilité des métaux lourds du sol par solubilisation, insolubilisation et volatilisation (Jacobs et Waite, 2004).

1.4.2.1 Solubilisation

Elle résulte de la production de composés acides tels que les acides carboxyliques, phénoliques, aliphatiques, nitriques et sulfuriques ainsi les sidérophores (Hider et Kong, 2010). Ces derniers sont des exsudats libérés dans la rhizosphère par les racines des végétaux, des champignons et par les bactéries ; ce sont des chélateurs très puissants, capables de complexer des métaux et de favoriser la mobilité du fer, du manganèse, du cuivre, du plomb et du zinc (Chaignon, 2001).

L'oxydation des formes réduites du fer et du soufre par certaines bactéries chimiolithotrophes (*Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Galionella*,) conduit à la production d'acide sulfurique ; ce qui permet la dissolution des silicates, des phosphates, des oxydes et des sulfures en libérant ainsi leurs contenus en éléments traces métalliques (Ghiorse, 1984 ; Sand et Gehrke, 2006)

1.4.2.2 Insolubilisation

C'est le phénomène opposé au précédent, dans lequel on remarque une diminution de l'adsorption de certains métaux par la matière vivante. La sécrétion dans la rhizosphère de certains acides organiques de faible poids moléculaire, tels que les acides oxalique, citrique ou fumarique, qui interviennent dans la complexation intracellulaire d'éléments nutritifs, limitera la biodisponibilité des ions métalliques par la complexation extracellulaire (Chen et *al.*, 2003 ; Huynh, 2009).

1.4.2.3 Volatilisation

Ce phénomène implique la modification du degré d'oxydation de l'espèce métallique par certains microorganismes. La réaction de la biométhylation permet le transfert de groupements méthyl directement aux ions métalliques (Ferret, 2012). Cette réaction augmente la toxicité des métaux par augmentation de leur hydrophobicité et par conséquent leur perméabilité à travers la membrane cellulaire. La biométhylation du mercure, du plomb,

d'étain, d'arsenic, d'antimoine et du sélénium a été rapportée chez plusieurs bactéries, permettant ainsi leur volatilisation dans l'atmosphère (Ferret, 2012 ; Igiri et *al.*, 2018).

1.5 Caractéristiques générales des métalloïdes étudiés

1.5.1 Antimoine

1.5.1.1 Généralités et sources

L'antimoine est un élément chimique de symbole Sb qui dérive de son nom latin Stibium. C'est un métalloïde appartenant au groupe VA de la classification périodique des éléments de Mendeleïev (**Figure 4**). Il fait partie de la famille des Pnictogène, de masse atomique 121,760 g/mol, de numéro atomique 51 et d'une densité de 6,68 g/cm³. C'est un élément de transition (semi métallique) dont les propriétés physicochimiques sont intermédiaires entre celles des métaux et celles des non métaux (Jana, 2009).

L'antimoine est peu abondant dans la croûte terrestre, c'est le 65^{ème} élément constitutif de l'écorce terrestre, à raison de 0,2 ppm en moyenne (Hamilton, 2000). Mais cette concentration varie grandement selon le type de roches, le degré d'évolution, les teneurs en argile et surtout les teneurs en humus (Aubert et Pinta, 1977). L'antimoine se trouve à l'état natif pur ou mêlé à des cristaux mixtes avec l'arsenic ou encore sous forme d'oxydes ou de sulfures. Les minéraux principaux sont la stibine ou antimonite, Sb₂S₃, et la valentinite, Sb₂O₃ (Carlin, 2000). L'antimoine dans le sol provient essentiellement de la roche mère. Sa redistribution dans la biosphère est gouvernée par les éruptions volcaniques, les embruns et les feux de forêt (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

Les exploitations de ce métalloïde et ses composés inorganiques sont diversifiés : c'est un composant fréquent des alliages de fils, auxquels il confère plus de dureté et de résistance à la corrosion. Il est utilisé pour la production de semi-conducteurs, de détecteurs à infrarouges. Il est employé dans les industries de céramique et de plastique et il est largement présent en matériaux en tant qu'ignifugeant (anti-feu). Certains composés organiques d'antimoine sont employés même comme médicaments antiparasitaires (Carlin, 2000 ; Bentley et Chasteen, 2002).

Les sources anthropologiques d'antimoine sont liées à ces industries ainsi qu'aux activités minières et au trafic automobile, qui peuvent enrichir le sol par ce métalloïde. Les concentrations des zones non influencées par des rejets d'origine anthropique sont inférieures

à 0,1 ng/m et peuvent atteindre plusieurs ng.m⁻³ sous l'influence de rejets, dans des zones industrialisées (Filella et *al.*, 2007).

1.5.1.2 Spéciation

L'antimoine possède quatre degrés d'oxydation : -III (anion antimoniure), 0 (forme élémentaire), +III (cation trivalent ou antimonite) et +V (la forme la plus oxydée ou antimonate) dont la forme Sb III⁺ est la plus toxique (Mubarak et *al.*, 2015). Son caractère intermédiaire se traduit par une faible tendance à donner des composés de degré d'oxydation (-III), représentés essentiellement par des dérivés organiques, tandis que les composés (+III), très stables, sont les plus nombreux. Cependant, la stabilité de la forme (+V) est plus faible que celle de l'arsenic (Mubarak *al.*, 2015).

1.5.2 Arsenic

1.5.2.1 Généralités et sources

Son nom vient du latin *arsenicum*, tiré du grec *arsenikon* « qui dompte le mâle » en raison de sa forte toxicité. C'est un élément de transition dont les propriétés physico-chimiques sont intermédiaires entre celles des métaux et celles des non-métaux : en solution, l'arsenic se rapproche des métalloïdes puisqu'il forme des anions. En revanche, sa conductivité électronique et thermique le rapproche des métaux (Mubarak et *al.*, 2015).

L'arsenic est un élément chimique de symbole As. C'est un métalloïde appartenant au groupe VA de la classification périodique des éléments de Mendeleïev (**Figure 4**), il contient également l'azote (N), le phosphore (P), l'antimoine (Sb) et le bismuth (Bi). Il fait partie de la famille des Pnictogène, de masse atomique 74,92 g/mol, de numéro atomique 33 et d'une densité de 5,72 g/cm (Rensing et Rosen., 2009).

L'arsenic peut se retrouver dans l'environnement par divers processus naturels et anthropiques. Le volcanisme est le principal apport naturel ; l'altération des roches renfermant l'arsenic, les sources thermales, les eaux souterraines et la volatilisation par les microorganismes constituent d'autres apports naturels d'arsenic dans l'environnement (Smedley et Kinniburgh, 2002 ; Tiwari et Lata, 2018).

Les mines et autres processus de combustion participent à 90 % des rejets d'arsenic dans l'atmosphère (Dictor et *al.*, 2004). L'industrie métallurgique du cuivre, du plomb, du

zinc et de l'or rejettent des quantités notables d'arsenic dans l'environnement. L'arsenic entre dans la constitution de certains herbicides, insecticides, peintures, fabrication de verre ou de cristal. Il sert d'additif au mélange plomb-antimoine des électrodes des accumulateurs. Il est, depuis peu, utilisé dans les imprimantes lasers, les photocopieuses et les fax (Neumann et al., 2010 ; Tiwari et Lata, 2018). Les rejets de toutes ces industries contribuent largement à la dispersion de l'arsenic dans l'environnement.

1.5.2.2 Spéciation

La spéciation de l'arsenic et celle de l'antimoine sont très proches. La configuration électronique de l'arsenic induit quatre degrés d'oxydation possibles : arsenate As (+V), arsenite As (+III), arsenic élémentaire As (0) et l'arsénide As (-III). (Onishi, 1969), dont les deux premières formes sont les plus répandues dans l'environnement (Verma et al., 2017). La connaissance de la spéciation de l'arsenic permet de mieux mesurer son risque environnemental, car la nature de l'espèce affecte la biodisponibilité, la toxicologie et la mobilité de l'arsenic (Smedley et Kinniburgh, 2002 ; Callender, 2003). D'ailleurs, Verma et al. (2017) ont rapporté que la forme trivalent (As III) est plus toxique que la forme pentavalent (As V).

Les composés de l'arsenic rencontrés dans l'environnement correspondent principalement à des espèces inorganiques présentant les deux degrés d'oxydation arséniate As (V) et arsénites As (III). Ils sont solides, liquides voire gazeux (Callender, 2003).

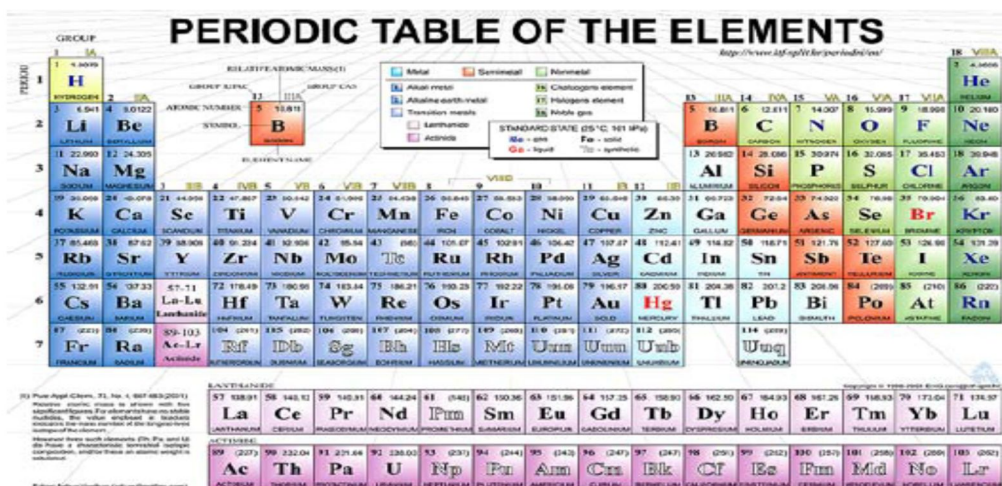


Figure 4 : Tableau périodique : les éléments métalliques sont en bleu, les métalloïdes sont des éléments orange et les non métalliques sont en vert. (http://blogs.4j.lane.edu/taylor_k/2010/06/01/metalsthis-week-in-science-june-1-june-4/)

2. Bactéries endophytes

2.1 Définition

L'origine étymologique du mot endophyte provient du grec, « *endo* » qui signifie dedans et « *phyton* » qui désigne plante (Staniek et *al.*, 2008). Ce terme décrit donc tout organisme survivant dans les tissus des plantes. Le concept d'endophyte est introduit à l'origine par Bary (1866), il se réfère à tous les organismes qui se reproduisent à l'intérieur des tissus des végétaux, contrairement aux épiphytes qui vivent à la surface des plantes. En 1986, Carroll a défini les endophytes comme des mutualistes qui colonisent les parties aériennes de tissus vivants dans les plantes sans causer de maladies. Petrini (1991) a proposé un élargissement de la définition de Carroll pour y inclure tout microorganisme susceptible, durant une période de son cycle de vie, de coloniser et survivre à l'intérieur des tissus d'une plante sans lui causer de dommage apparent et symptomatique. En d'autres termes, ces microorganismes ne sont pas pathogènes pour la plante.

2.2 Diversité des bactéries endophytes

Les bactéries endophytes sont omniprésentes chez la plupart des espèces végétales d'une façon, latente ou active ; soit localement ou généralisé dans tous les tissus des végétaux (Hallmann et *al.*, 1997). Elles sont isolées à partir des plantes diversifiées et chaque hôte peut comprendre plusieurs genres et espèces bactériennes. Grâce aux signaux spécifiques, les plantes exercent une pression sélective qui tend généralement à réduire la diversité microbienne et à favoriser des souches particulières. En outre, la compétition entre les microorganismes pour les nutriments et la colonisation des sites, la production des antibiotiques et des bactériocines, contribuent à modifier la dynamique microbienne dans les tissus (Bertrand et *al.*, 2000 ; Ann et *al.*, 2003).

Des études biochimiques et moléculaires ont révélé une grande diversité des bactéries endophytes parmi lesquelles de nombreux genres sont retrouvés, tels que *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* et *Rhizobium*. Ces bactéries sont capables de coloniser une grande variété d'espèces végétales (blé, riz, maïs, luzerne, soja, carotte, bananier, ...) (Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006).

2.3 Infection de la plante hôte par les bactéries endophytes

En général, les bactéries endophytes sont originaires des communautés bactériennes épiphytes, de rhizosphères ou de phyllosphères (Compant et *al.*, 2008), aussi bien que de graines ou de matériels de propagation infectés d'endophytes (Compant et *al.*, 2011). Ces microorganismes sont capables de pénétrer à l'intérieur des plantes à travers des ouvertures naturelles (comme les stomates, les lenticelles et les racines) ou des blessures (West et *al.*, 2010). En plus, ils produisent des hydrolyases extracellulaires, telles les cellulases, les lipases, les estérases et les protéinases, pour faciliter leur invasion dans leurs hôtes et atteindre l'apoplasme ou le symplasme où ils résident (Araujo et *al.*, 2002).

2.4 Interaction endophytes – plante hôte

Les relations entre les endophytes et leur hôte sont complexes et varient d'un endophyte à l'autre et d'un hôte à l'autre ; elles sont considérées comme un continuum (Zabalgogeoazcoa, 2008 ; Qin et *al.*, 2017). Les bactéries endophytes établissent différentes relations de symbiose, de mutualité, de commensalité ou trophobiotique avec la plante hôte. Plusieurs études ont rapporté, d'une part, l'implication de ces microorganismes dans l'augmentation de la tolérance de leur hôte aux stress métalliques et l'amélioration de leur croissance par fixation de l'azote, résistance aux pathogènes, production de régulateurs de croissance essentiels pour l'absorption des nutriments et eau par la plante (Ryan et *al.*, 2008 ; Zhao et *al.*, 2016 ; Qin et *al.*, 2017).

D'autre part, les bactéries endophytes dépendent de nutriments offerts par les plantes. Par conséquent tout paramètre affectant le statut nutritionnel des plantes peut affecter la communauté endophyte (Hallmann et *al.*, 1997 ; Araujo et *al.*, 2002). Tous ces phénomènes indiquent le rôle clé joué par les endophytes dans l'adaptation de leurs hôtes aux changements environnementaux (Ma et *al.*, 2013 ; Walker, 2013). En effet, les deux organismes synthétisent des métabolites secondaires dont leurs rôles restent mal élucidés (Ahmad et *al.*, 2018).

2.4.1 Bioprotection des plantes

Les bactéries endophytes colonisent l'intérieur des plantes pour améliorer leur croissance par la synthèse de métabolites secondaires qui réduisent les impacts négatifs des insectes, des herbivores et même d'autres microorganismes pathogènes (Strobel, 2003 ; Gao

et *al.*, 2015 ; Rijavec et Lapanje, 2016). De plus, elles entrent en compétition avec ces derniers en limitant leur approvisionnement en éléments nutritifs. D'autres composés bioactifs, tels que les terpènes, diterpènes, les amines et les amides sont également des métabolites très fréquents générés par les endophytes et qui sont très toxiques pour les insectes (Tan et Zou, 2001 ; Verma et *al.*, 2008).

2.4.2 Fixation d'azote

Certaines plantes non-légumineuses peuvent être colonisées par des bactéries endophytes fixatrices d'azote. Car ce processus existe également chez certaines plantes non-légumineuses, mais avec un taux plus faible ; en particulier chez la canne à sucre, le riz et le maïs. Ces bactéries, appelées PGPR (Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria), forment habituellement une classe différente des rhizobactéries des légumineuses (James, 2000 ; Madhaiyan, 2015). Parmi les PGPR, de nombreux genres sont recensés tels que *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* et *Serratia* (Chen et *al.*, 2013 ; Lin et *al.*, 2015, Yan et *al.*, 2018).

2.4.3 Production de phytohormones

Les bactéries endophytes sont la source d'une large gamme de phytohormones telles que l'auxine (acide indole-3-acétique ou AIA), l'éthylène et les gibbérellines (Xiao et *al.*, 2017 ; Etminani et Harighi, 2018 ; Yan et *al.*, 2018). Elles peuvent produire plus de 60 fois la quantité synthétisée par la plante hôte elle-même. Ces hormones jouent un rôle essentiel dans la stimulation de la germination, de la croissance et de la reproduction de la plante hôte, tout en la protégeant des stress biotique ou abiotique (Ahmad et *al.*, 2018).

2.4.4 Solubilisation du phosphore

Le phosphore est un élément majeur, essentiel à la croissance et au développement de la plante. En présence de PGPR, le phosphore insoluble peut être rendu biodisponible à travers des réactions d'acidification, de chélation ou de libération d'acides organiques (Chung et *al.*, 2005 ; Yan et *al.*, 2018) ou encore en les minéralisant et ceci par sécrétion de phosphatases (Gyaneshwar et *al.*, 2001 ; Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006). Une augmentation de la biodisponibilité du phosphore pour la plante, et ainsi une augmentation de la biomasse a été décrite par Kuan et *al.* (2016) par l'intermédiaire de l'endophyte *Bacillus pumilus* S1r1.

2.4.5 Production de biofilm

La majorité des bactéries favorise un mode de vie à l'état fixé aux surfaces sous forme de biofilm (Hall-Stoodley et *al.*, 2004). Il a été démontré que la majorité des *Pseudomonades* associées aux racines favorisait la croissance de la plante hôte, formant majoritairement des biofilms autour des racines (Lugtenberg et *al.*, 2001 ; Ramey et *al.*, 2004). Néanmoins, le rôle exact du biofilm dans ces interactions est peu documenté.

2.4.6 Production d'ACC désaminase

Une caractéristique souvent associée aux bactéries endophytes est la production d'aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) désaminase. Cette enzyme transforme l'ACC (précurseur de l'éthylène) en ammoniac et 2-oxobutanoate. Il a été suggéré que l'ACC désaminase augmente la croissance et le développement des plantes dans des conditions stressantes en diminuant les niveaux d'éthylène (Madhaiyan, 2015 ; Yan et *al.*, 2018).

3 Interaction bactéries - métaux lourds

3.1 Tolérance aux métaux

La tolérance à un métal peut être définie comme la capacité d'une bactérie de faire face à des conditions de stress métallique, au moyen des propriétés intrinsèques pour diminuer la toxicité de cet élément (Gadd, 2009). D'un point de vue physiologique, la tolérance aux métaux lourds correspond à l'ensemble des mécanismes d'homéostasie des métaux (transport, chélation, séquestration) permettant de maintenir la concentration des métaux essentiels dans les limites physiologiques et à minimiser les effets délétères des métaux non essentiels. Elle est présente chez tous les organismes qui supportent des expositions excessives en métaux lourds (Clemens et *al.*, 2002 ; Pereira et *al.*, 2006).

La tolérance aux métaux lourds est souvent évaluée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) du métal pour un microorganisme donné ; c'est la plus faible concentration en métal qui inhibe la croissance de ce microorganisme (Singh et *al.*, 2010).

3.2 Résistance aux métaux

Selon la littérature scientifique, le terme "résistance" se rapporte à la croissance ou à la survie d'un microorganisme en présence de certaines concentrations en métaux lourds. De plus, le Conseil de la Recherche National du Canada a défini globalement la résistance comme la capacité d'un organisme à diminuer sa réponse face à un composé chimique relatif auquel il a été exposé précédemment (Wright et Welbourn. 2002 ; Soussou, 2013). Ce caractère est réservé spécifiquement aux microorganismes qui possèdent, pour leur survie dans ces conditions, un des mécanismes de détoxification.

3.3 Stratégies de défense bactérienne contre les métaux lourds

Selon Zubair *et al.* (2016), les bactéries ont développé différents systèmes de résistance ou de tolérance pour faire face à des concentrations toxiques des métaux à savoir : la réduction du transport des métaux à travers la membrane cytoplasmique ; la séquestration extra et intracellulaire des métaux ; la détoxification enzymatique des métaux, le transport actif des métaux par efflux et la production de sidérophores (Figure 5).

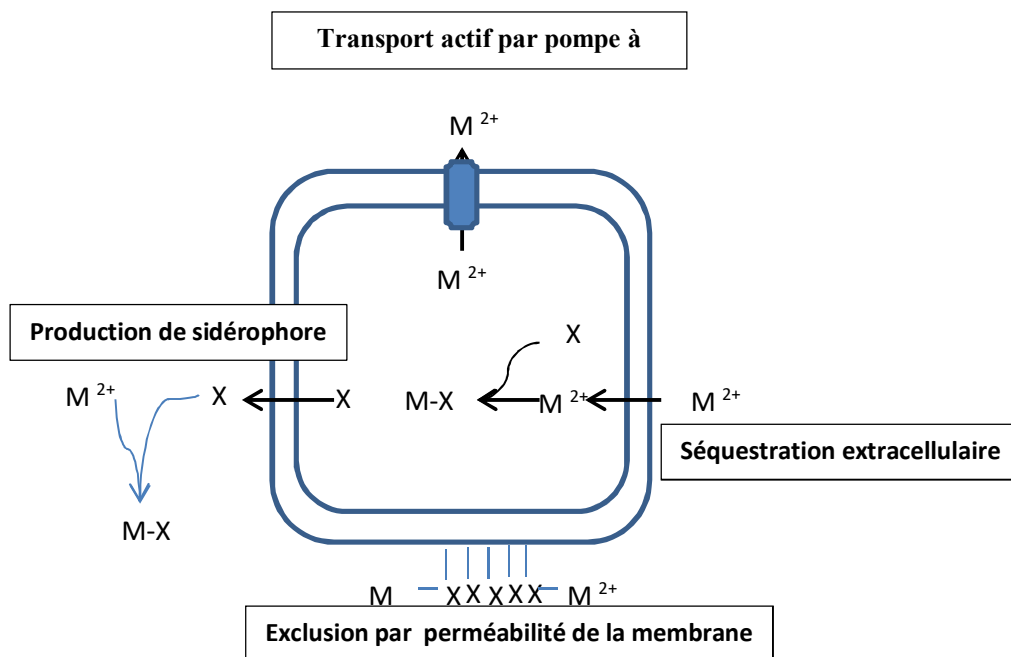


Figure 5: Mécanismes de résistance bactérienne aux métaux. X correspond aux constituants cellulaires interagissant avec les cations métalliques, et M aux cations métalliques (Haferburg et Kothe, 2007).

3.3.1 Réduction de l'absorption du métal

La paroi cellulaire, la membrane plasmique ou la capsule empêchent la pénétration des ions métalliques dans la cellule bactérienne. Cependant, l'acquisition d'un métal soluble par une bactérie est assurée par des protéines membranaires, dédiées, appelées les porines. C'est un transport passif qui offre un passage aux métaux dans le sens du gradient électrochimique. Ce mécanisme de transport est non spécifique et rapide. Les bactéries limitent l'entrée des métaux par diminution de la production des porines, ce qui aura un impact sur l'accumulation intracellulaire des ions métalliques (Bruins et *al.*, 2000). Les travaux de Li et *al.* (1997) ont montré que les mutants d'*E. coli* dépourvus de porines présentent de faibles niveaux d'accumulation d'ions d'argent à l'intérieur de la cellule.

3.3.2 Séquestration extracellulaire et intracellulaire du métal

La séquestration extracellulaire est l'accumulation des ions métalliques à l'extérieur de la cellule bactérienne sous forme insoluble dans le périplasme (Igiri et *al.*, 2018). Les bactéries peuvent adsorber les ions métalliques grâce aux groupes ionisables de la paroi cellulaire ou de la capsule (groupe carboxyle, amino, phosphate et hydroxyle). C'est un processus passif, car les cellules bactériennes mortes sont également capables de lier ces ions métalliques (Taniguchi et *al.*, 2000 ; Pardo et *al.*, 2003).

De plus, certaines bactéries sont capables de former naturellement une couche d'exopolysaccharidique (EPS) qui chélate certains ions métalliques, ce qui empêche ces derniers de pénétrer dans le cytoplasme et d'interagir avec les composés cellulaires vitaux (Iyer et *al.*, 2005 ; Bhaskar et Bhosle, 2006). Ce mécanisme augmente significativement la résistance des bactéries à ces ions. Il était observé chez *Pseudomonas syringae* productrice de protéines périplasmiques inductibles par le cuivre et capables de fixer ce métal dans les colonies microbiennes (Cha et Cooksey, 1991). Thelwell et *al.* (1998) ont montré l'accumulation du zinc dans le périplasme de la souche *Synechocystis* PCC 6803 après son élimination du cytoplasme par un système d'efflux.

Un autre exemple de séquestration extracellulaire est la précipitation des métaux sous forme de complexes insolubles. Des sous-produits du métabolisme microbien tels que le sulfure d'hydrogène (H₂S) produit par les bactéries sulfato-réductrices, *Klebsiella planticola* (Sharma et *al.*, 2000) et *P. aeruginosa* (Wang et *al.*, 2002), ou encore le phosphate produit par

Citrobacter (Luptakova et Kusnierova, 2005) et *Vibrio harveyi* (Mire et al., 2004) entraînent la précipitation de quelques cations métalliques.

Chez d'autres bactéries, particulièrement à Gram-négatif, la séquestration des métaux s'effectue au sein du cytoplasme par les métallothionéines et le glutathion. Ce sont de petites protéines cytoplasmiques riches en cystéines qui chélatent les ions métalliques au niveau des groupements sulfhydryle (-SH) en les rendant inoffensifs et évitant l'exposition des composants cellulaires essentiels à ces ions toxiques (Haferburg et Kothe, 2007 ; Igiri et al., 2018). La séquestration intracellulaire du cadmium, du cuivre et du zinc a été mise en évidence chez *P. putida* par des petites protéines riches en cystéine (Higham et al., 1986). Ce même mécanisme a été élucidé chez *Rhizobium leguminosarum* qui utilise le glutathion pour la séquestration intracellulaire du cadmium (Lima et al., 2006)

3.3.3 Détoxification enzymatique des métaux

C'est une autre voie de résistance qui convertit un ion métallique très toxique en une forme moins ou non toxique, en impliquant différentes enzymes (Jyoti et Harsh, 2014). Ces transformations enzymatiques incluent la réduction, l'oxydation et la méthylation des composés (Silver et Phung, 2005a). L'exemple le plus connu est celui de la résistance au mercure dont les produits des gènes *mer* réduisent le Hg (II) en Hg (0) volatile (Misra, 1993). De plus, l'étude de Battaglia-Brunet et al. (2006) a montré que l'oxydation d'As (III), forme très toxique et très soluble, en As (V) diminue considérablement la toxicité de ce métalloïde.

La réduction est la réaction la plus adoptée par les bactéries qui utilisent les métaux et les métalloïdes comme un donneur ou un accepteur d'électrons à des fins énergétiques. Dans leur forme oxydée, les métaux peuvent être un accepteur final d'électrons pendant la respiration bactérienne anaérobie. La réduction de l'ion métallique généré par la suite, est une forme moins toxique (Barkay et al., 2003 ; Viti et al., 2003).

3.3.4 Transport des métaux par efflux actif

Les systèmes d'efflux impliquent trois familles de protéines membranaires : **CDF** (Cation Diffusion Facilitators), **RND** (Resistance-Nodulation-Cell Division) et **MFS** (Major Facilitator Superfamily). Elles sont très spécifiques et exportent les métaux toxiques du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule par un transport actif ; ce qui permet de réduire leur accumulation cytoplasmique (Nies, 2003). Deux types de transporteurs sont impliqués :

soit des transporteurs primaires pour lesquels le transport est directement couplé à l'hydrolyse de l'ATP (ABC-transporter, ATPase), soit des transporteurs secondaires qui utilisent un gradient électrochimique d'un autre soluté (Bruins et *al.*, 2000).

3.3.5 Production de sidérophores

Une souche productrice de sidérophore apparaît plus résistante aux métaux qu'une souche non productrice (Qin et *al.*, 2014). En effet, la fixation du métal sur ces molécules diminue la concentration de sa forme libre, ce qui affecte sa diffusion dans la bactérie et ainsi sa toxicité (Hannauer et *al.*, 2012). Si les bactéries utilisent leur propre sidérophore, elles sont dites sidérophores endogènes, si elles utilisent ceux qui sont synthétisés par d'autres organismes, elles sont dites sidérophores exogènes (Poole et McKay, 2003).

3.4 Déterminants génétiques de la résistance bactérienne aux métaux lourds

Selon la littérature, les déterminants génétiques à l'origine des résistances aux métaux lourds peuvent être portés soit par le chromosome, entraînant une résistance intrinsèque, soit par un élément génétique mobile, plasmide ou transposon entraînant une résistance acquise par un transfert de gène ou une mutation spontanée (Silver et Phung, 2005b).

Les déterminants génétiques de la résistance aux métaux ont été découverts pour la première fois sur des plasmides ou des transposons, car il était plus facile d'extraire et d'étudier des gènes plasmidiques (Summers et Silver, 1972). Néanmoins, plusieurs gènes chromosomiques de résistances aux métaux lourds ont été mis en évidence chez plusieurs genres bactériens (Silver, 1996). De plus, le séquençage du génome de nombreuses bactéries a permis de mettre en évidence de plus en plus de gènes chromosomiques de résistance aux ions métalliques (Muller, 2004). D'autres travaux ont même permis de localiser ces gènes sur les plasmides et les chromosomes de la même espèce bactérienne (Bruins et *al.*, 2000 ; Cervantes et *al.*, 2001).

Le système de tolérance aux métaux le mieux connu est celui de l'opéron *mer* qui code la mercurique réductase. Cette dernière permet la réduction des cations Hg (II) en forme élémentaire Hg (0) volatile, et qui diffuse à travers la membrane cellulaire. Cet opéron présente une structure similaire dans divers groupes de bactéries. Il est fréquemment retrouvé sur des éléments génétiques mobiles comme les transposons et les plasmides (Reniero et *al.*,

1998). En revanche, d'autres études ont mis en évidence la présence de plasmides portant l'opéron *mer* chez certaines souches bactériennes (Narita et al., 2003).

Parmi les systèmes de détoxification identifiés, citons l'opéron *ars* impliqué dans la tolérance des bactéries à l'arsénate (As V) par sa réduction en arsénite (As III) qui est ensuite expulsé hors de la cellule (Silver, 1996). Cet opéron est porté sur le chromosome d'*E. coli* et sur son plasmide où ces deux déterminant génétiques possèdent une structure très similaire (Mukhopadhyay et al., 2002).

Chez *P. aeruginosa*, Hassan et al. (2008) ont mis en évidence l'implication de la pompe à efflux CzcCBA dans la résistance au cadmium, zinc et cobalt chez cette souche. Ces auteurs ont rapporté que les gènes impliqués sont chromosomiques. Le séquençage du génome de *Ralstonia metallidurans* a mis en évidence plusieurs opérons impliqués dans sa multirésistance aux métaux ; tels que l'opérons *mer* plasmidique, impliqué dans la résistance au mercure (Mergeay et al., 2003) ou encore l'opérons *czc* porté par un autre plasmide et impliqué dans la résistance au cadmium, zinc, et cobalt (Große et al., 2004).

3.5 Corrélation de la résistance aux antibiotiques et aux métaux

La résistance aux métaux codée par des gènes plasmidiques pourrait conduire au développement d'une résistance à plusieurs agents toxiques (Summers, 2002). Un bon exemple de ce phénomène est la corrélation positive entre la résistance aux métaux et la résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Sabry et al., 1997). Cette résistance croisée pourrait s'expliquer par la co-occurrence de gènes sur le même élément génétique (plasmide ou transposon). L'association de l'opéron *mer* et des gènes de tolérance aux antibiotiques a été observée par Zscheck et Murray (1990) chez *Enterococcus faecalis* et par Wireman et al. (1997) chez d'autres bactéries Gram négatif.

Un phénomène de co-régulation été décrit également chez *P. aeruginosa* résistante au zinc. La présence de ce métal a entraîné une augmentation de sa résistance aux carbapénèmes liée à la répression de la porine OprD qui permet l'entrée de l'antibiotique dans la cellule bactérienne (Conejo et al., 2003). En effet, en présence de zinc ou de cadmium, ce système augmente l'expression de la pompe à efflux CzcCBA à l'origine de l'efflux du zinc, cadmium et cobalt et va également réprimer l'expression de la porine OprD, diminuant l'entrée de l'imipénème, de la famille carbapénèmes, dans la bactérie (Perron et al., 2004). Ce même

système de régulation induit la pompe à efflux permettant la résistance au cuivre et réprimant l'expression des porine OprD (Caille et *al.*, 2007). Récemment, Manasi et Rajesh (2016) ont pu isoler la souche *Halomonas* BVR des effluents d'industrie électronique. Cette souche était résistante à des niveaux élevés en cadmium, plomb, zinc et à divers antibiotiques. Cette étude a prouvé que les déterminants génétiques de cette résistance étaient portés par un seul plasmide.

3.6 Effets des métaux lourds sur les microorganismes du sol

Les éléments métalliques affectent la croissance, la morphologie et le métabolisme des bactéries telluriques par des altérations de la structure de la membrane cellulaire et celles des protéines et des acides nucléiques. Ces altérations mènent à modifier la densité, la taille, la structure de la communauté et l'activité enzymatique des bactéries (Etesami, 2018). En effet, les bactéries sensibles présentes dans le sol peuvent complètement disparaître sous l'effet de la toxicité métallique. Cependant, les souches résistantes peuvent être stimulées par ces métaux (Ahemad et Khan, 2012).

Comme exemple, nous pouvons citer l'inhibition de l'activité déshydrogénase lors d'une contamination par un métal. Une telle réduction peut avoir des répercussions néfastes et significatives sur l'ensemble de l'écosystème du sol, avec une réduction de la décomposition de la matière organique et la perturbation des cycles des éléments (Kelly et *al.*, 2001).

4 Réponse des bactéries au stress métallique

L'exposition des bactéries à certains métaux lourds provoque l'apparition d'un stress oxydatif caractérisé par une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (*reactive oxygen species* : ROS) (Valko et *al.*, 2005). Car ces éléments toxiques donnent naissance à la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyl (OH^{\cdot}) qui perturbent l'homéostasie rédox de la cellule (Shahid et *al.*, 2015)

4.1 Définition du stress oxydatif

Le terme de stress oxydatif peut être défini comme l'ensemble des conditions, biotiques ou abiotiques, qui provoquent une perturbation de la balance redox en faveur des ROS, suite soit à une surproduction de ces derniers, soit à une diminution des capacités du système antioxydant, soit par les deux mécanismes combinés (**Figure 6**). Ce déséquilibre bouleverse le

métabolisme cellulaire et conduit éventuellement à une inhibition de la croissance voire des dommages potentiels de la cellule (Booth *et al.*, 2002).

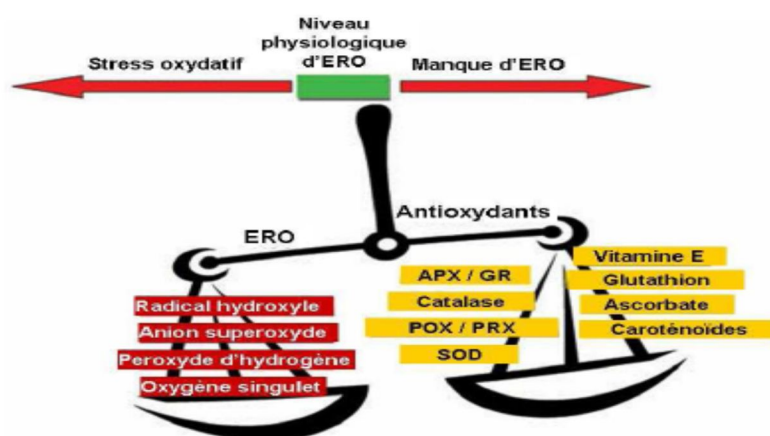


Figure 6 : Schéma de la balance entre les ERO et les antioxydants (Pourrut, 2008)

4.2 Génération d'un stress oxydatif

Les radicaux libres sont des espèces chimiques, atomiques ou moléculaires, neutres ou chargées. Ils présentent dans leur orbite externe un ou plusieurs électron(s) non apparié(s) dit(s) célibataire(s). La génération d'espèces réactives de l'oxygène résulte de la réduction mono-électronique successive du dioxygène (O_2) aboutissant à la formation d'eau (Imlay, 2008) (Figure 7).

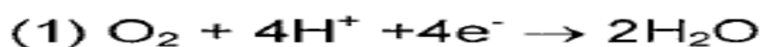
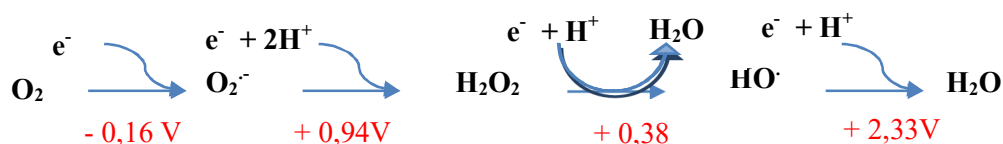


Figure 7 : Etapes de réduction monoélectronique du dioxygène (Imlay, 2008)

L'oxygène est une molécule stable ; lorsqu'il oxyde un autre atome ou une autre molécule, il accepte deux électrons afin de les appairer avec l'un de ses deux électrons célibataires. Ce mécanisme donne naissance à des composés instables. C'est une conséquence inévitable du métabolisme de l'oxygène ; elle fait partie du métabolisme cellulaire basal afin d'obtenir de l'énergie.

Il existe des radicaux qui dérivent de l'oxygène par des réductions monoélectroniques, tels que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), les

peroxydes (ROO^\bullet) ou les alkoxydes (RO^\bullet). D'autres espèces dérivées de l'oxygène, dites espèces actives non radicalaires de l'oxygène, comme l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'ozone (O_3). Elles sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs d'autres radicaux (Sharma *et al.*, 2012).

4.3 Principales cibles biologiques des ROS

Les ROS peuvent réagir avec la plupart des biomolécules présentant des doubles liaisons comme les acides gras insaturés, les protéines et l'ADN (**Figure 8**). Ils arrachent des électrons, entraînant d'importantes modifications de leurs propriétés physicochimiques aux conséquences néfastes pour l'intégrité de la cellule, et conduisant parfois à sa mort (Ding *et al.*, 2008 ; Sharma *et al.*, 2012).

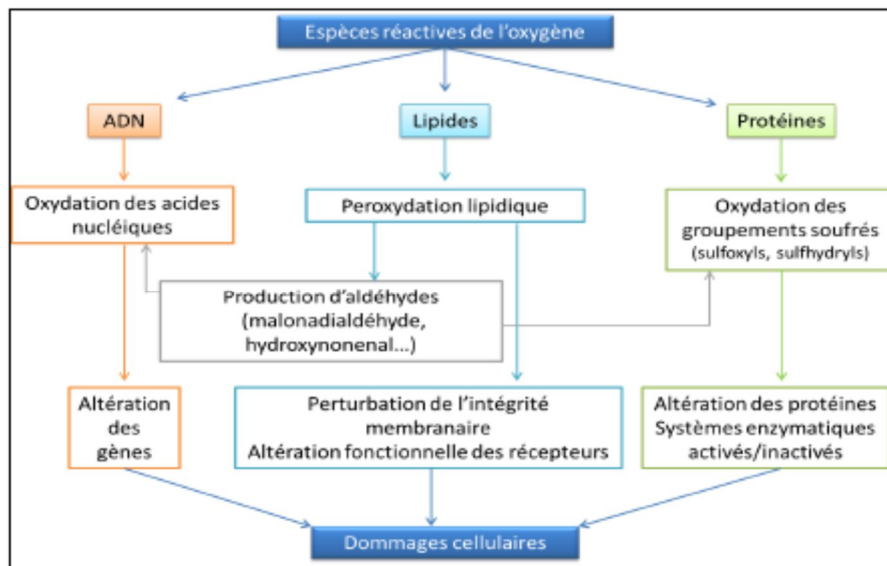


Figure 8 : Différentes cibles des espèces réactives de l'oxygène (Monteil *et al.*, 2004)

4.3.1 Lipides

Les chaînes des acides gras polyinsaturés membranaires sont les cibles majeures des radicaux libres (l'oxygène singulet et les radicaux hydroxydes). Cette attaque radicalaire déclenche une cascade de réactions appelée lipoperoxydation ou peroxydation membranaire (**Figure 9**) ; au cours de laquelle les acides gras polyinsaturés entrant dans la composition des phospholipides membranaires sont oxydés ; ce qui provoque éventuellement des modifications de la fluidité membranaire (Humpries et Sweda, 1998).

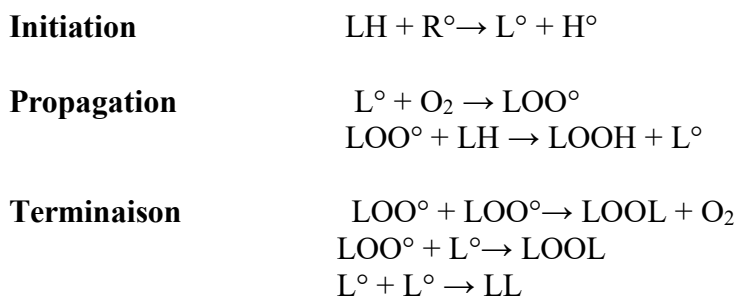


Figure 9 : Processus de la peroxydation lipidique
(LH : lipide insaturé et L° : lipide radicalaire) (Spiteller, 1998)

Initialement, une espèce radicalaire R° (particulièrement le HO°) est capable d'arracher un proton sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (LH) ; il en résulte un lipide radicalaire (L°). Pendant la phase de propagation, ce lipide radicalaire réagit avec une molécule d'oxygène pour former un lipide radicalaire peroxydé (LOO°) suffisamment réactif pour arracher un proton à un autre acide gras LH adjacent pour donner des hydroperoxydes (LOOH), produits primaires de l'oxydation des acides gras insaturés, et un nouveau radical peroxyde (L°). En phase de terminaison, les peroxydes générés seront neutralisés en réagissant ensemble ou continueront à s'oxyder et à se fragmenter en aldéhydes (Blokhina et *al.*, 2003).

Contrairement aux radicaux libres réactifs, les aldéhydes ont une durée de vie plus longue. Ils diffusent à l'intérieur et hors de la cellule et ils atteignent des cibles éloignées de leur site de formation (les protéines, l'ADN et les phospholipides), ce qui contribue à la toxicité de la peroxydation lipidique. Parmi ces différents aldéhydes, on retrouve le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonéal (HNE) (Esterbauer et *al.*, 1991 ; Cabiscol et *al.*, 2000).

4.3.2 ADN

Les espèces réactives de l'oxygène sont capables d'attaquer à la fois les bases puriques ou pyrimidiques et le désoxyribose (Sies et Menck, 1992 ; Sies, 1993). L'ensemble de ces modifications peut conduire à de nombreuses lésions de l'ADN, et donc des délétions et des mutations de l'ADN (Roldan et Ariza, 2009), une répression ou/et une surexpression de certains gènes (Ding et Ong, 2003 ; Waisberg et *al.*, 2003) (**Figure 10**). Le changement de l'information génétique pourra, par conséquent, à l'origine des protéines non-fonctionnelles dans la cellule endommagée, mais aussi dans toute sa descendance.

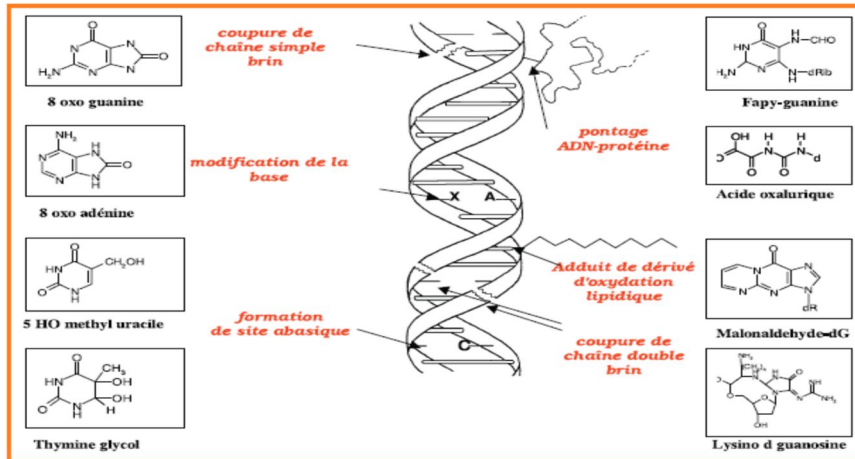


Figure 10 : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003)

Le groupement OH^\bullet est le radical le plus réactif avec les bases et les sucres de l'ADN (Evans et *al.*, 2004) ; alors que l'oxygène singulet réagit avec la guanine pour la convertir en thymine (Ribeiro et *al.*, 1994). Au contraire, le peroxyde d'hydrogène et le superoxyde ne semblent pas avoir d'effet sur l'ADN (Möller et *al.*, 2007).

4.3.3 Protéines

Les acides aminés soufrés (la méthionine, la cystéine) et les acides aminés aromatiques (le tryptophane, la tyrosine) ainsi que la proline et l'histidine sont les plus réactifs avec les ROS (Möller et *al.*, 2007) (**Figure 11**).

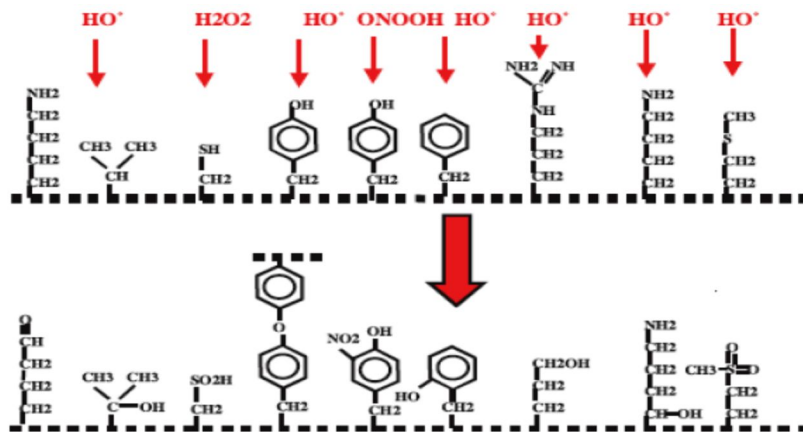


Figure 11 : Quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003)

L'attaque radicalaire d'un de ces acides aminés peut ainsi causer de multiples dégâts d'oxydation, y compris l'oxydation des groupes sulfhydryles, la réduction des ponts disulfures, l'oxydation des acides aminés à proximité de sites de liaison avec un métal, la modification de groupes prosthétiques et la fragmentation des chaînes peptidiques. Ces

modifications sont à l'origine de la perte de la fonction membranaire, le blocage de la réplication de l'ADN et l'activation ou la désactivation de plusieurs enzymes (Cabiscol et *al.*, 2000).

4.4 Mécanisme antioxydant et détoxification des ROS

Pour éviter toutes les conséquences néfastes des ROS, toute cellule doit contrôler leur quantité par un système antioxydant. Le terme "antioxydant" est utilisé pour caractériser des substances ou des composés de nature diverse, capables de lutter ou de contrôler l'accumulation des radicaux libres dans la cellule. Cette propriété leur permet d'agir en tant que moyen de défense contre les dérivés actifs de l'oxygène (Halliwell et Whitemen, 2004).

Plusieurs études ont mis en évidence des mécanismes de protection chez les bactéries contre les effets délétères des radicaux libres, ce qui permet leur survie et leur croissance lors d'un stress environnemental. Ces systèmes antioxydants sont multiples et peuvent être enzymatiques ou non enzymatiques. Ils comprennent plusieurs lignes de défenses qui visent à empêcher la formation des ROS, les neutraliser en espèces moins toxiques quand ils sont déjà formés, prévenir ou réparer les lésions induites par les ROS et/ou éliminer les cibles biologiques endommagées par ces espèces actives (Cabiscol et *al.*, 2000).

4.4.1 Système antioxydant enzymatique

L'accumulation de ROS intracellulaires en situation de stress déclenche des mécanismes de défense sur la base de réactions enzymatiques (Hu et *al.*, 2005). Ces enzymes antioxydantes sont essentielles au maintien de l'homéostasie redox, car elles éliminent les ROS, accumulés dans la cellule, par réduction (El Ghazouani, 2008). Certaines de ces enzymes utilisent des co-substrats dont certains sont d'origine des antioxydants comme l'acide ascorbique et le glutathion réduit (GSH) (**Figure 12**).

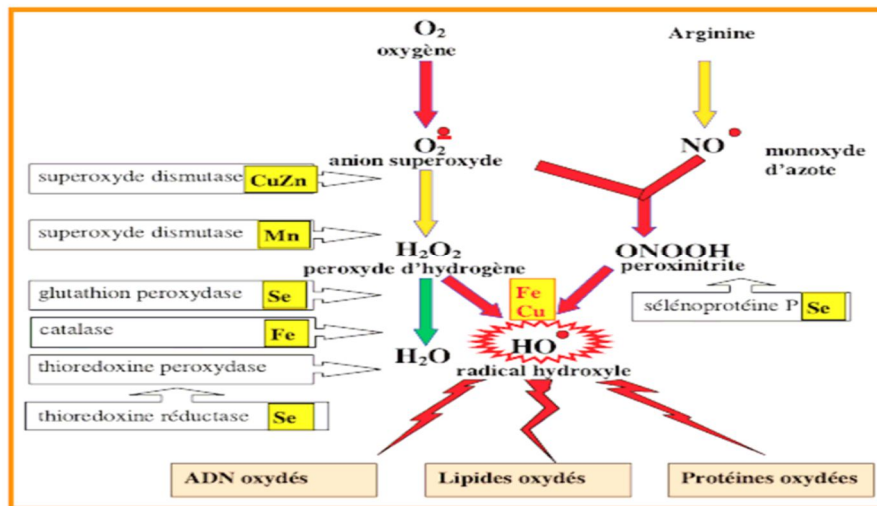


Figure 12 : Mode d'action des enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (Favier, 2003)

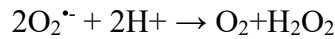
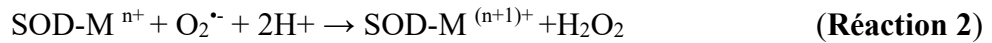
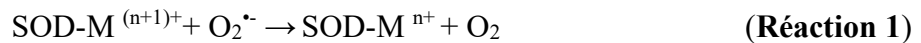
4.4.1.1 Superoxyde dismutase (SOD, EC1.15.1.1)

L'ion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est le point de départ de la chaîne de production des radicaux libres. Il est obtenu suite à la réduction de l'oxygène par la réception d'un électron de la chaîne respiratoire (Halliwell et Gutteridge, 1986). Messner et Schröder (1999) ont montré que cet ion est majoritairement produit au niveau de la chaîne respiratoire, chez les bactéries comme chez les organismes supérieurs.

Dans les conditions physiologiques, l'ion superoxyde est dismuté, dans un stade précoce dès sa production, en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). C'est une réaction spontanée ou, le plus souvent, catalysée par des enzymes appelés superoxydes dismutases (SOD) (Fridovich, 1989). De ce fait, la SOD est l'un des composants essentiels du mécanisme de défense contre le stress oxydatif dans la mesure où H_2O_2 est moins réactif que $O_2^{\bullet-}$.

La SOD est une métalloprotéine qui représente l'une des premières lignes de défense contre le stress oxydatif. Elle a comme fonction la conversion de deux molécules de superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en oxygène moléculaire (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par un mécanisme de dismutation, c'est-à-dire une oxydoréduction entre deux molécules identiques (Scandalios, 2005). Cette réaction s'effectue en deux étapes (**Réaction 1 et 2**), faisant intervenir $O_2^{\bullet-}$ à la fois comme réducteur et comme oxydant vis-à-vis du métal du site actif (Klug-Roth et al., 1972). Dans la première étape, le métal de transition du site actif est réduit par une première molécule d' $O_2^{\bullet-}$, libérant ainsi l'oxygène moléculaire (O_2) ; et ensuite sa ré-

oxydation par une deuxième molécule d' $O_2^{\cdot-}$ permet sa régénération et la libération d'une molécule d' H_2O_2 .



M: Cu (n=1), Mn (n= 2), Fe (n= 2) et Ni (n= 2)

Il existe divers isoformes de SOD qui diffèrent entre elles par leur homologie structurale (monomère, dimère ou tétramère) et leur localisation cellulaire. Elles comportent divers groupements prosthétiques dans le site actif (Cu^{2+}/Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} et Ni^{2+}). Ces métaux changent de valence lors de la réaction par la perte d'électron associé à l'étape de réduction, cependant, ils seront chargés de façon identique en fin de catalyse (Moran et *al.*, 2003, Scandalios, 2005).

- Les SODs (Cu^{2+}/Zn^{2+}) cuivre-dépendantes : elles possèdent du Cu^{2+} et du Zn^{2+} au niveau du site actif. C'est la première famille à avoir été caractérisée (McCord et Fridovich, 1969). Elle est généralement localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial, le cytoplasme, le noyau, les lysosomes et les peroxysomes des cellules eucaryotes (Weisiger et Fridovich, 1973 ; Geller et Winge, 1982 ; Chang et *al.*, 1988). Elle est rarement trouvée chez les bactéries à Gram négatif (Benov et Fridovich, 1994). Elle est localisée dans le périplasma (Kroll et *al.*, 1995). Elle peut aussi être adhérente à la membrane externe comme la SOD Cu^{2+}/Zn^{2+} de *Mycobacterium tuberculosis* (Wu et *al.*, 1998). Cela lui confère un rôle de première barrière dans la protection des fonctions membranaires contre les ROS.
- Les SOD (Mn^{2+}) manganèse-dépendantes : elles présentent du Mn^{2+} dans le site actif. Chez les eucaryotes, elles sont localisées dans les chloroplastes, dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale (Keele et *al.*, 1970, Weisiger et Fridovich, 1973). Elles jouent un rôle dans la protection du complexe III de la chaîne respiratoire (Raha et *al.*, 2000). Chez les bactéries, les SOD (Mn^{2+}) sont localisées dans le cytosol où elles assurent une protection efficace de l'ADN de $O_2^{\cdot-}$ (Steinman et *al.*, 1994).
- Les SODs (Fe^{2+}) fer-dépendantes : elles présentent du Fe^{2+} dans leur site actif. Elles sont retrouvées chez les procaryotes, les algues (Radha, 2010) et dans les chloroplastes de certaines plantes supérieures, et même chez certains protozoaires comme *Trypanosoma cruzi* (Temperton et *al.*, 1996). Les SOD (Fe^{2+}) sont cytosoliques et

proches de la membrane mitochondriale interne, où environ 60% de $O_2^{\cdot-}$ est produit (Gregroy et Fridovich, 1973).

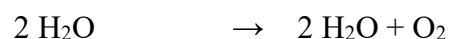
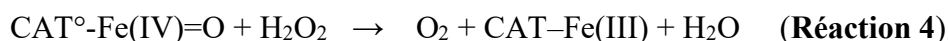
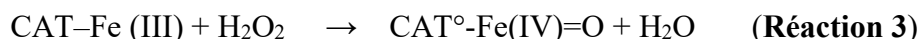
- Enfin, les SOD (Ni^{3+}) nickel-dépendantes avec du Ni^{3+} dans leur site actif. La présence de cette famille de SOD a été récemment découverte dans le cytosol des actinomycètes du genre *Streptomyces* (*S. pyogenes* et *S. coelicolor*) et chez des cyanobactéries (Palenik *al.*, 2003, Scandalios, 2005).

4.4.1.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Le peroxyde d'hydrogène est le résultat de la réduction d' O_2 par deux électrons. C'est une espèce stable et non radicalaire, ce qui lui permet de diffuser librement au travers des membranes biologiques, d'où une possibilité d'action à distance (Romero-Puertas *et al.*, 2004). Il peut provenir également en fin de la dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ par la SOD. Le H_2O_2 , formé par le métabolisme, est décomposé directement par la catalase en dioxygène (O_2) et eau (H_2O) (Radha, 2010).

La catalase (CAT), également appelée hydro-peroxydases, est la peroxydase la plus étudiée. Elle possède une structure tétramérique, chaque sous-unité contient un groupement hémique comprenant un atome de fer (Reid *et al.*, 1981). Il est possible quelquefois de retrouver du NADPH lié à chaque sous-unité, enfoui au sein de la structure et qui ne fonctionne pas comme co-facteur, mais plutôt comme protecteur du site catalytique de l'enzyme contre l'attaque d' H_2O_2 (Kirkman *et al.*, 1987).

La dismutation du peroxyde d'hydrogène, présent en grande concentration, par la catalase se fait en deux étapes. Dans la première étape (**Réaction 3**), H_2O_2 oxyde l'hème en une espèce oxyferryl ($Fe(IV)=O$) ; puis dans la seconde étape (**Réaction 4**), une deuxième molécule d' H_2O_2 est utilisée comme réducteur pour régénérer l'enzyme, produisant ainsi de l'eau et du dioxygène (Sharma *et al.*, 2012).



Il existe deux familles de catalases :

- Les catalases non hémiques à site binucléaire à manganèse, qui sont peu étudiées. Elles sont découvertes chez les bactéries, par exemple, *Thermus thermophilus* (Antonyuk et al., 2000) et *Lactobacillus plantarum* (Kono et Fridovich, 1983).
- Les catalases hémiques monofonctionnelles ou catalases typiques qui sont les mieux caractérisées.

4.4.1.3 Catalase-peroxydases (POX, EC 1.11.1.6. et 1.11.1.7)

Les catalase-peroxydases sont des catalases hémiques bifonctionnelles à activité peroxydasique qui décompose le H₂O₂ d'une façon catalasique (**Réaction 5**) et/ou peroxydasique (**Réaction 6**) (Passardi et al., 2007):

Catalasitique (dismutation) : $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (**Réaction 5**)

Peroxydasique (Réduction): $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + 2\text{AH}$ (**Réaction 6**)

Ce type d'enzyme fonctionne de deux façons : à forte concentration en H₂O₂, elle décompose H₂O₂ comme une catalase monofonctionnelle ; cependant, dans des conditions en faible concentration en H₂O₂, elle agit comme une peroxydase en oxydant un substrat hydrogéné approprié (Youn et al., 1995).

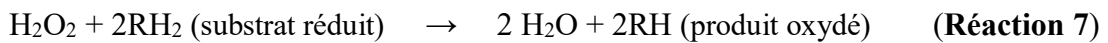
Il a été rapporté que ces enzymes sont évoluées par la fusion d'un gène de la peroxydase avec un autre de la catalase (Passardi et al., 2007). Elles sont présentes chez plusieurs taxons bactériens, et même chez les champignons (Hahn et al., 2000). Les catalases-peroxydases bactériennes les plus étudiées sont celles de *Klebsiella pneumoniae* (Hochman et Goldberg, 1991), d'*Escherichia coli* (Seaver et Imlay, 2001), de *Bacillus subtilis* (Rao et Kavya, 2014) et de *Streptomyces coelicolor* (Kim et al., 1994).

Diverses études ont montré une forte homologie entre les séquences des catalases-peroxydases bactériennes et les séquences d'autres peroxydases, y compris le cytochrome c peroxydase (CcP) fongique, les peroxydases procaryotique et l'ascorbate peroxydase (APx) végétale, mais elles montrent très peu d'homologie avec les catalases monofonctionnelles (Ghiladi et al., 2005). D'ailleurs, Zou et al. (1999) ont montré que la catalase-peroxydase de *Streptomyces reticuli* était capable d'oxyde l'ascorbate, et le gaïacol ainsi que l'alcool vératrylique. De plus, Passardi et al. (2007) ont publié que la structure cristalline de quatre catalase-peroxydases bactériennes a été définie, et l'analyse structurale a révélé que les

poches hémiques des extrémités N-terminales contiennent des acides aminés spécifiques et identiques à ceux des autres peroxydases de classe I telles que l'APx et CcP.

4.4.1.4 Peroxydases

Les peroxydases (POX) constituent une large famille des oxydoréductases hémiques qui catalysent la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats donneurs d'électrons, généralement des composés aromatiques de bas poids moléculaires, tels que les hydroquinones, les phénols et les flavonoïdes (**Réaction 7**) (Rajkumar *et al.*, 2013). Parmi lesquelles on cite :



H_2O_2 : peut-être un peroxyde organique pour certaines peroxydases

➤ Peroxydase (POD, EC 1.11.1.7)

Comme toutes les peroxydases, les PODs sont des hémoprotéines qui catalysent la réduction du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par de nombreux substrats aromatiques (donneur de protons) (Medjeldi *et al.*, 2012). L'hème est un complexe entre un ion de fer et des molécules de protoporphyrine. La peroxydase catalyse le transfert d'oxygène de l'eau oxygénée à un substrat approprié et oxyde le substrat aromatique, donneur d'électrons tels que le guaiacol et le pyragallol (Sharma *et al.*, 2012).

Les PODs sont largement présentes chez les bactéries Gram positif et Gram négatif. Les peroxydases bactériennes sont des enzymes intracellulaires, elles jouent un rôle très important dans la protection de la bactérie contre le H_2O_2 responsable de dommages cellulaires. Elles possèdent une grande spécificité pour les substrats phénoliques et une plus grande affinité pour H_2O_2 , à faible concentration, que la CAT (Radwan *et al.*, 2010 ; Shahid *et al.*, 2014).

➤ Ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11)

L'ascorbate peroxydase est un autre membre de la famille des peroxydases à hème. Elle est régulée par des signaux rédox et par la concentration en H_2O_2 (Welinder, 1992), car elle est impliquée dans la réduction du peroxyde d'hydrogène en H_2O , lors d'un stress oxydatif. Comme leur nom l'indique, ces enzymes utilisent l'ascorbate comme donneur d'électrons (Raven *et al.*, 2004) :

Ces enzymes sont relativement bien connues, notamment leur mécanisme d'action, qui dépend principalement du cycle ascorbate-glutathion. Selon l'état d'oxydation du fer au niveau de l'hème, la structure du site actif est modifiée, régulant ainsi l'activité de cette peroxydase (Badyal et *al.*, 2008). La première étape est la formation d'un intermédiaire oxydé, par deux électrons, qui sera réduit généralement par un substrat de nature organique. Une histidine est conservée au niveau du site actif, étant le catalyseur acido-basique du clivage de la molécule d' H_2O_2 (Hiner et *al.*, 2002).

Selon la bibliographie, les APXs se trouvent principalement chez les plantes supérieures, les algues et certaines cyanobactéries (Sano et *al.*, 2001 ; Sharma et Dubey, 2004). Cependant, certains travaux ont mis en évidence la présence de cette enzyme chez quelques insectes (Mathews et *al.*, 1997), chez *Trypanosoma cruzi* (Boveris et *al.*, 1980) et dans l'œil des bovins, tissus riches en ascorbate (Boveris et *al.*, 1980 ; Wada et *al.*, 1998). La présence d'une similitude entre la séquence N-terminale de ces enzymes et celle des APXs végétales, fait ressortir que l'ascorbate-peroxydase n'est pas spécifique aux plantes ou aux organismes chlorophylliens (Wada et *al.*, 1998). En effet, toutes les APXs d'origine procaryotique, fongiques et végétales, appartiennent à la superfamille des peroxydases de la classe I (Dąbrowska et *al.*, 2007).

4.4.2 Système antioxydants non-enzymatiques

Parallèlement aux enzymes antioxydantes, certaines molécules réductrices participent à la protection de la cellule bactérienne contre les ROS et maintiennent l'environnement intracellulaire réduit. Parmi ces molécules, les antioxydants non enzymatiques tels que l'acide ascorbique, la proline, le glutathion (GSH) et autres (Cabisco et *al.*, 2000).

4.4.2.1 Proline

La proline est un acide aminé qui joue différentes fonctions cellulaires. C'est un osmolyte, un stabilisant de macromolécules et un régulateur de pH cytosolique (Matysik et *al.*, 2002). La proline peut également agir comme un chélateur pour certains métaux lourds (Saint-Denis et *al.*, 2001), elle réduit les effets nocifs des ROS en inhibant la peroxydation lipidique (Mehta et Gaur, 1999), car c'est un piègeur de radicaux hydroxyles et de l'oxygène singulier (Smirnoff et Cumbes, 1989 ; Matysik et *al.*, 2002).

4.4.2.2 Acide ascorbique

L'acide ascorbique, ou la vitamine C, est un antioxydant très puissant. C'est un facteur réducteur important, il est utilisé par l'APX pour réduire le H₂O₂ en eau (H₂O) avec génération concomitante de monodéhydroascorbate (MDHA). Ce dernier est rapidement transformé en dehydroascorbate et acide ascorbique (Gapper et Dolan, 2006). À côté, l'acide ascorbique réagit d'une manière non enzymatique en captant le superoxyde (O₂^{•-}), l'oxygène singulet (¹O₂) et le radical hydroxyl (OH[•]) (Li et Jin 2007).

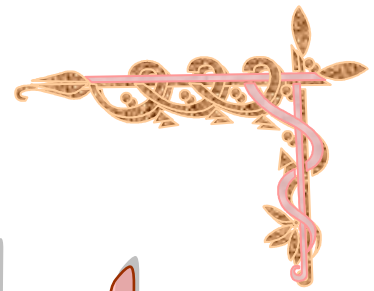
4.4.2.3 Glutathion

Le glutathion (GSH) est un tripeptide (γ -Glutamyl-Cystéine-Glycérine) (**Figure 15**) possédant une fonction antioxydante grâce au groupement thiol de la cystéine. Par oxydation, deux molécules de GSH se dimèrent grâce à une liaison disulfure en une molécule de glutathion oxydé (GSSG) (Borg et Reeber, 2004 ; Moussard, 2006).

A l'état normal, il est présent essentiellement sous sa forme réduite pour maintenir un environnement réducteur dans la cellule. Cette forme est maintenue par la glutathion réductase en utilisant le NADPH (Cabicol et *al.*, 2000). Son action détoxifiante peut être directe grâce à son potentiel antioxydant qui est dû à son habilité à donner l'hydrogène, ce qui lui permet de réduire les radicaux libres. Cette réaction permet la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau (**Réaction 8**) (Foyer et Noctor, 2005).



En revanche, il réagit, de façon non enzymatique, avec les autres espèces radicalaires de l'oxygène comme l'oxygène singulet, le radical superoxyde et le radical d'hydroxyle. Il participe également à la régénération de l'ascorbate via le cycle ascorbate-glutathion. Il est aussi capable de chélater les ions métalliques grâce au groupement thiol nucléophile de la cystéine (Foyer et Noctor 2005).



Matériel et méthodes



1 Objectif du travail

L'objectif de ce travail porte essentiellement sur l'identification des endophytes bactériens résistants à des teneurs élevées en antimoine (Sb) et en arsenic (As) et sur l'étude de leurs mécanismes de résistance. Ces microorganismes ont été isolés à partir des racines de deux plantes steppiques : *Hedysarum pallidum* et *Lygeum spartum* poussant sur les déblais de la mine d'antimoine de la région d'Aïn Babouch à Oum El Bouaghi.

Dans un premier volet, on présente des techniques qui permettent d'étudier la biodiversité des endophytes bactériens hébergés dans les tissus internes des racines des deux plantes citées ci-dessus, puis de sélectionner les endophytes les plus résistants à l'antimoine et à l'arsenic et d'étudier leurs systèmes antioxydants en présence de différentes concentrations en ces deux métalloïdes. Cette première partie a été effectuée au Laboratoire de Biologie et Environnement (LBE) de l'université des frères Mentouri, Constantine I.

Le deuxième volet est l'identification moléculaire des souches résistantes au Sb et As et l'étude de leurs mécanismes physiologique et moléculaire de résistance vis-à-vis des métalloïdes. Cette deuxième partie a été effectuée au laboratoire de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie (MAP), UMR 5240, INSA, Lyon I.

2 Caractéristiques de la zone d'étude

La zone d'isolement est une ancienne mine d'antimoine. Elle est située dans la Wilaya d'Oum El Bouaghi, dans le Nord-est algérien (35 ° 58 '37, 64 "N-7 ° 11' 22, 80" E 36 ° 01 '09, 78 "N-7 ° 14 '38, 38" E), dans la région d'Aïn Babouche et plus précisément au flanc du Djebel Hammimat (**Figure 13**). Cette région est caractérisée par des sols d'une forte teneur en métaux lourds, notamment, l'antimoine et l'arsenic (Rached-Mosbah et *al.*, 1992 ; Benhamdi et *al.*, 2014 ; Bentellis- Mosbah, 2014).

Selon Benhamdi et *al.* (2014), les concentrations des métalloïdes dans le sol de la zone d'étude sont $62\,000 \pm 4924$ mg/kg pour le Sb et $2\,300 \pm 186$ mg/kg pour l'As. Les mêmes auteurs ont montré que le pH de la zone d'étude varie entre 7,8 et 8,5 avec une moyenne de $8,01 \pm 0,09$. Ce qui indique que le sol est modérément alcalin. De plus, le taux de carbonate de calcium (CaCO₃) varie de 33,5 % à 48,22 % avec une moyenne de $38,7 \% \pm 1,8$. De telles valeurs caractérisent en général les sols calcaires.

L'analyse granulométrique réalisée par Benhamdi *et al.* (2014) a montré que les teneurs en matière organique (MO) du sol de la zone d'étude sont faibles à moyennes (0,69 % à 1,1 %). De plus, la teneur moyenne de la fraction argileuse est de $23,0 \pm 4,9$ %, celle de la fraction limoneuse est de $16,3 \pm 1,02$ % et de la fraction sableuse est de $53,7 \pm 3,22$ %. Ces résultats montrent que le sol de la zone d'échantillonnage a en grande partie une texture sableuse.

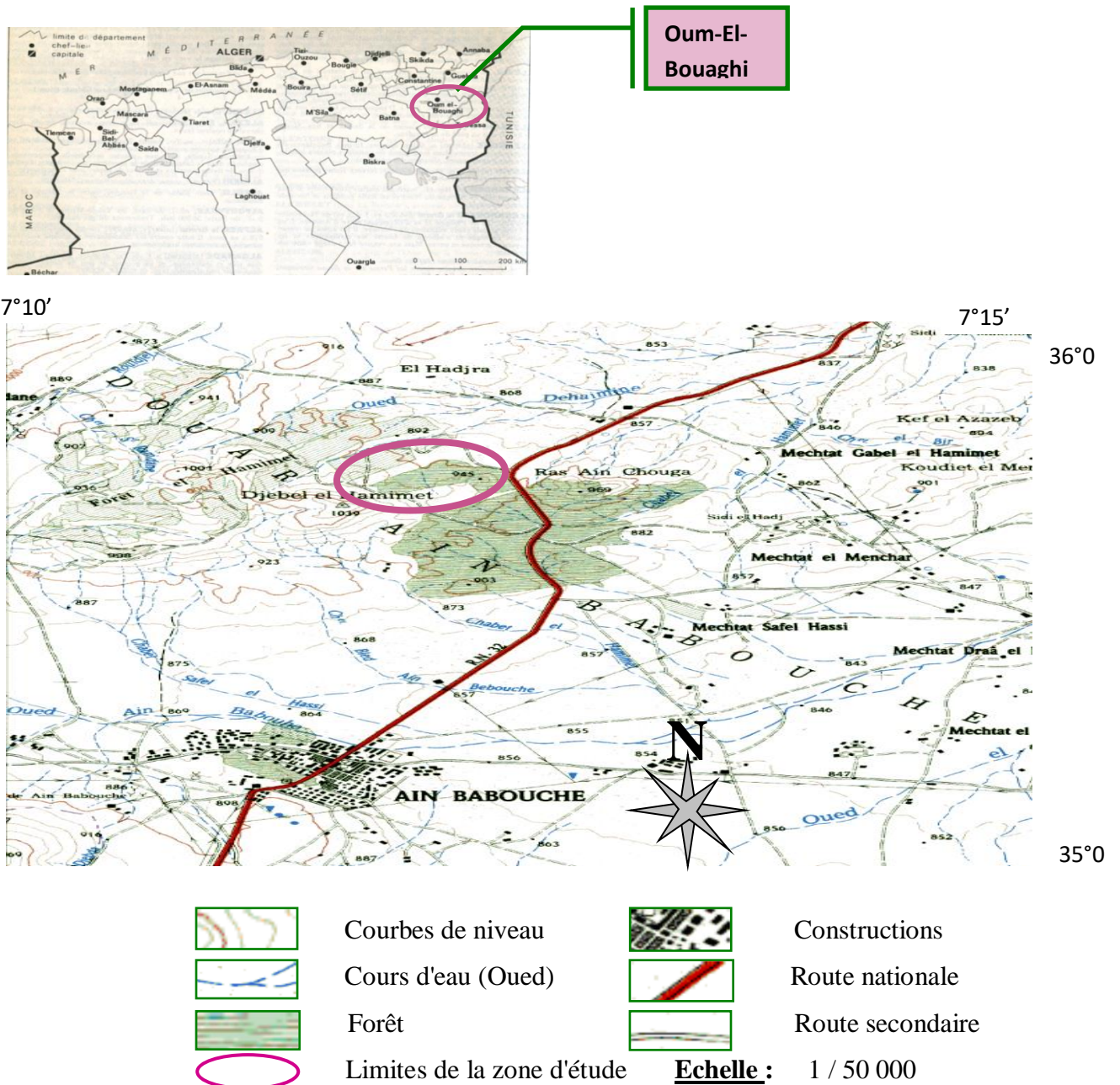


Figure 13 : Localisation géographique du terrain d'étude

3 Caractéristiques des plantes étudiées

Nous avons choisi *Lygeum spartum* Loefl. ex L. (une Poacea) et *Hedysarum pallidum* Desf. (une Fabacea), deux espèces végétales ciblées dans notre étude en raison de leurs capacités à croître et à se reproduire sur les déblais de la mine d'antimoine du Djebel Hammimat.

Par ailleurs, les études de Rached-Mosbah et *al.* (1992) et Bentellis- Mosbah (2014) ont révélé que ces deux espèces végétales sont dites indifférentes ou pseudométallophytes, car elles sont résistantes à l'effet de l'antimoine généré par la mine et elles sont également présentes sur des sols non métallifères. De plus, des analyses chimiques réalisées lors d'une autre étude sur quelques espèces végétales au niveau de cette mine (Rached-Mosbah et *al.*, 1992) avaient révélé que *H. pallidum* accumulait le Sb, alors que *L. spartum* l'excluait.

3.1 *Hedysarum pallidum*

H. pallidum est une espèce pérenne qui appartient au genre *Hedysarum* (sulla ou sainfoin d'Espagne) et à la famille des *Fabaceae* (légumineuses) (Ozenda, 1958). C'est une plante vivace, cespiteuse et endémique du nord-africaine (Algérie, Tunisie et Maroc). Elle se caractérise par de longues tiges plus ou moins prostrées, des inflorescences en grappes plus ou moins allongées pouvant atteindre 10 à 15 cm à la fructification, de grandes fleurs rosées ou blanches lavées de pourpre, parfois blanches, et des calices entièrement hispides (Quezel et Santa, 1962) (**Figure 14A**).

3.2 *Lygeum spartum*

L. spartum est une espèce steppique vivace, appartenant à la famille des Poacea (graminées). Elle est appelée communément le sparte en français. En arabe, elle est nommée Sennagh ou Sengha (Killian, 1948 ; Ozenda, 1958). C'est une plante caractérisée par un ensemble de talles semblables qui lui donnent un aspect touffu. Elle est souvent confondue avec l'alfa à l'état végétatif (Quezel et Santa, 1962) (**Figure 14B**). C'est une endémique d'Afrique du Nord (Algérie, Maroc et Tunisie) et d'Espagne.

Le sparte est une plante unciforme qui présente un rhizome rampant couvert d'écailles brillantes. Les feuilles sont glauques, coriaces et cylindriques par suite de l'enroulement de leurs bords. Cependant, il ne se présente pas comme l'alfa et est marqué par des ligules. Cette plante possède une inflorescence constituée par une spathe, à l'intérieur de laquelle se situent

2-3 épillets, cornés à la base, pour former un tube recouvert de longs poils soyeux (Quezel et Santa 1962).

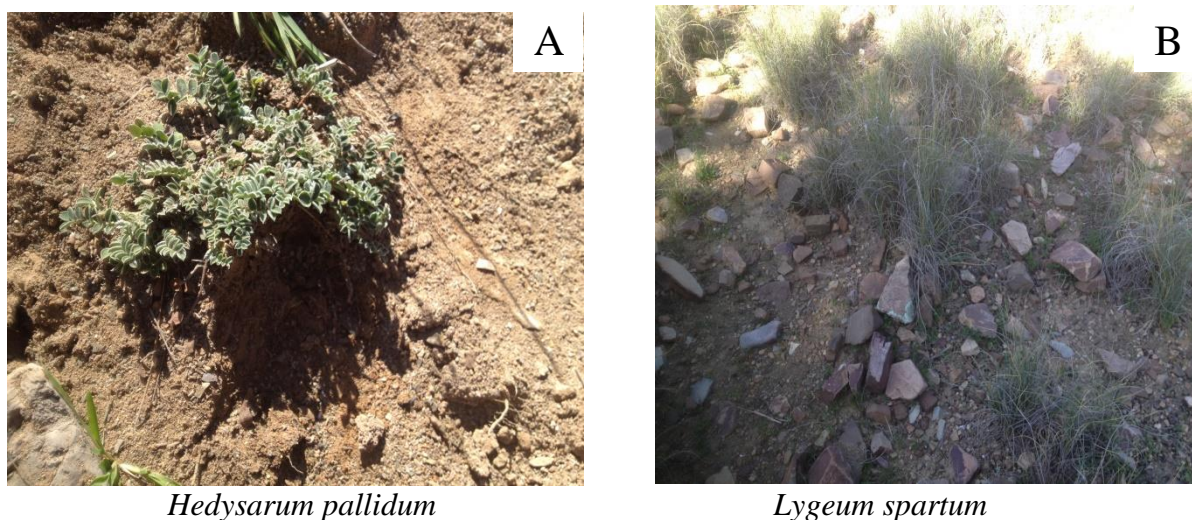


Figure 14 : Photos d'*Hedysarum pallidum* (A) et de *Lygeum spartum* (B) prises lors des prélèvements des échantillons dans la zone d'étude

4 Échantillonnage des plantes

La collecte des échantillons de racines des plantes a été faite aseptiquement au mois de Février 2013 dans la région d'Aïn Babouche sur le Djebel Hammimat (Algérie). La zone d'échantillonnage sélectionnée se situe sur les déblais de la mine où le niveau de pollution en métaux était très élevé.

Pour chaque plante, huit échantillons de racines saines sont choisis au hasard. Tous les prélèvements sont effectués dans des trous d'une profondeur de 10 cm environ à l'aide d'une tarière stérile (flambée avec de l'alcool sur place). Les racines profondes sont ensuite prélevées, puis transvasées à l'aide d'une spatule stérile dans des bocaux stériles et étiquetés. Les échantillons ont été conservés à une température de -20°C jusqu'à leur utilisation.

5 Mise en évidence des bactéries endophytes

Avant d'êtreensemencées dans des boîtes de Pétri, les racines des deux plantes ont subi une stérilisation superficielle afin d'éliminer les microorganismes qui tapissent la surface des racines, tout en préservant la population microbienne endophyte. Les microorganismes externes sont considérés comme des épiphytes et des contaminants qui adhèrent à la surface des racines.

Pour cela, on a adopté la méthode décrite par Jiang *et al.* (2008) et Sheng *et al.* (2008), qui consiste à un rinçage délicat des racines sous l'eau de robinet courante pour enlever les impuretés qui s'y sont déposées (terre, poussière, etc.) ; puis à des traitements en série par : l'éthanol (75 %) pendant 2 minutes, puis l'hypochlorite de sodium (NaOCL) (5 %) pendant 1 minute et enfin les racines sont rincées trois fois à l'eau distillée stérile pendant 1 minute.

Une fois stérilisées, les racines sont coupées en petits segments de quelques millimètres d'épaisseur et qui sontensemencés sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive (GN) (**Annexe 1a**) à raison de 4 explants par boîte ; chaque racine estensemencée en trois répliques. Le milieu utilisé est additionné de 10 mgL⁻¹ de l'Amphotéricine B (Wolfratshausen, Allemagne) pour inhiber toute croissance fongique pouvant gêner la croissance d'éventuels endophytes bactériens.

Les boîtes contenant les explants sont incubées à 30 °C pendant une semaine. Les cultures sont examinées périodiquement ; chaque colonie apparue est isolée, purifiée et conservée à 4 °C sur de la gélose inclinée en présence du glycérol 20 %. Si on n'observe pas de colonies bactériennes se développant sur la GN, la racine est considérée comme stérile.

Pour vérifier l'efficacité de la désinfection des racines, des aliquotes de 0,3 mL d'eau provenant du dernier rinçage sontensemencés en nappe sur la GN contenant l'antifongique précédemment cité. L'absence de toute croissance microbienne sur ces boîtes indique que toutes les bactéries obtenues sur les boîtes contenant les fragments des racines, sont des endophytes.

Au total, on a 96 explants pour chacune des deux espèces, soit 192 fragments au total. Chaque boîteensemencée est considérée comme étant une unité de culture, nous avons ainsi 24 unités de cultures par espèce et 48 unités de cultures au total.

6 Fréquence de colonisation (FC)

La fréquence de colonisation ou d'infection (FC) et la fréquence d'isolement d'un individu (FI) sont deux paramètres de suivi. Ils sont exprimés en % et calculés selon les formules suivantes (Fisher et Petrini, 1987 ; Tejesvi *et al.*, 2006) :

FC% = (Le nombre des explants colonisés par les endophytes bactériens/nombre total des explants ensemencés) x 100.

FI% = (Le nombre d'isolement d'un taxon/ nombre total des explants ensemencés) x 100

7 Biodiversité des endophytes

Cette partie concerne principalement l'isolement et la purification des bactéries endophytes associées aux racines d'*Hedysarum pallidum* et de *Lygeum spartum*. L'examen de leur diversité est effectué *via* des approches morphologiques et biochimiques, afin de les caractériser et de les regrouper.

7.1 Purification des isolats

Afin de récupérer un maximum de diversité d'endophytes bactériens, l'utilisation de différents milieux de culture spécifiques s'est avérée nécessaire. Pour cela, chaque colonie apparue a été prélevée et diluée dans 1 mL d'eau distillée stérile puis ensemencée sur des milieux spécifiques dont le Mac Conkey, le Cetrimide, le Chapman et la Trypticase Soy Agar (**Annexe 1a**). Plusieurs repiquages ont été effectués sur ces mêmes milieux jusqu'à l'obtention des souches pures.

7.2 Description morphologique

C'est la première étape de l'identification bactérienne d'une souche. Il s'agit d'une description macroscopique des colonies isolées ; taille, forme, bords, degré d'opacité et couleur. Cependant, l'observation des bactéries au microscope optique renseigne rapidement sur la forme et la mobilité des cellules, ainsi que sur les arrangements ou les groupements qu'elles constituent entre elles.

7.3 Test de Gram

La coloration de Gram est une double coloration qui permet d'avoir une idée sur la forme, l'arrangement, la pureté et surtout les propriétés de la paroi des isolats. Cette coloration est réalisée systématiquement sur les différentes colonies purifiées pour mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et préciser le caractère Gram positif ou Gram négatif. Avec cette double coloration, les bactéries ayant une simple paroi seront dites bactéries à Gram positive, elles apparaissent en violet foncé ; tandis que les bactéries pourvues d'une membrane externe supplémentaire seront dites à Gram négatives et elles sont colorées en rose. Les étapes de la coloration de Gram et les solutions utilisées sont détaillées dans l'annexe 1b.

Les frottis ainsi obtenus sont soumis à une observation microscopique à immersion (microscope Leica LAS EZ) au grossissement x 100. Cet examen microscopique permet non seulement la détermination du Gram, mais il vérifie également la pureté des endophytes isolés.

7.4 Type respiratoire

La détermination du type respiratoire permet d'observer le caractère des bactéries vis-à-vis de l'oxygène. Le milieu utilisé est la gélose Viande-Foie (VF) (**Annexe 1a**). Ce milieu contient du glucose comme source du métabolisme énergétique, et ne contient pas de nitrates, accepteurs d'électrons.

Avant d'être ensemencés, les tubes contenant le milieu VF doivent être régénérés par un séjour d'une demi-heure au bain-marie bouillon puis refroidis à 45 °C. Ces tubes sont ensemencés par des pipettes Pasteur scellées en réalisant des tours de spires du fond du tube à 1 cm en dessous de la surface de la gélose. Ensuite, les cultures sont incubées à 30 °C pendant 24 h.

7.5 Type de métabolisme du glucose (test OF)

Cette étude est réalisée sur milieu Hugh et Leifson ; c'est un milieu semi solide additionné d'un indicateur de pH et de 10 % de glucose par filtration (filtre 0,2 µm) (**Annexe 1a**). Deux tubes contenant ce milieu sont ensemencés par piqûre centrale à l'aide d'une anse de platine à fil droit chargé de culture jeune. L'un des tubes est recouvert par de l'huile de paraffine (1cm environ) pour créer une condition d'anaérobie. A la fin, les cultures sont incubées à 30 °C pendant 24 h.

7.6 Test de l'oxydase

Le principe de ce test repose sur la recherche de l'oxydase, une enzyme respiratoire qui catalyse la réaction d'oxydation d'un substrat organique, le N diméthyl paraphénylène diamine. Le test s'effectue sur une culture jeune. Un test positif se traduit par une coloration violette pourpre en 10 secondes.

7.7 Identification biochimique à l'aide des galeries API®

Des galeries API-20E, API- 20NE et API-Staph (BioMérieux) ont été utilisées afin de compléter l'identification des isolats. Ces tests biochimiques permettent en général de

distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles. Le choix de la galerie est fondé sur les caractères morphologiques de l'isolat (la forme, la mobilité et la coloration de Gram), le type respiratoire, le métabolisme du glucose et le test de l'oxydase.

Une colonie bactérienne de la souche à identifier est prélevée à partir d'une culture jeune et mise en suspension dans 5 mL d'eau stérile. 200 µL de cette suspension sont inoculés dans chacun des 20 microtubes de chaque galerie. Pour les microtubes ADH, LDC, ODC, H₂S et URE la cupule est remplie par de l'huile de paraffine afin de créer des conditions d'anaérobiose. Finalement, la boîte d'incubation est fermée puis incubée à 30 °C pendant 24 h. Les réactions produites pendant l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs (TDA, JAMES, VP1 et VP2, NIT1 et NIT2 et la poudre de zinc).

La lecture des résultats se fait en se référant à un tableau de lecture fourni par le fabricant. Les résultats des tests sont introduits dans une matrice de calcul fournie par le laboratoire MAP, Lyon, France.

8 Impact de l'antimoine et de l'arsenic sur les bactéries endophytes

Cette manipulation consiste à tester l'impact des deux métalloïdes, l'antimoine (Sb) et l'arsenic (As), sur les bactéries endophytes isolées. Au cours de ce test, nous avons réalisé deux séries d'expériences ; la première sur le milieu solide avec différentes concentrations métalliques, et la deuxième avec les mêmes échantillons et les mêmes concentrations métalliques, mais en utilisant un milieu liquide.

Les sels de métaux ont été ajoutés au milieu stérilisé à partir des solutions en stock stériles conservées à 4 °C. Les produits métalliques utilisés pour cette étude sont : le tartrate antimonyl et de potassium trihydrate (C₈H₄K₂O₁₂Sb₂ 3H₂O Sigma-Aldrich) (Sb III), et le sodium métaarsenite (NaAsO₂ Sigma-Aldrich) (As III).

8.1 Préparation de l'inoculum

50 µL de chaque souche bactérienne pure sont transvasés dans un tube contenant 5 mL du bouillon nutritif, et incubés à 30 °C pendant 24 h. Ces cultures constituent des inoculums pour des tests de toxicité vis-à-vis de l'antimoine et de l'arsenic.

8.2 Tests de toxicité *in vitro*

8.2.1 Sur milieu solide

Chaque culture obtenue estensemencée dans des boites de Pétri contenant la gélose de Luria Bertani (LB) modifié (**Annexe 1a**) supplémentée en Sb et en As séparément et à différentes concentrations variant de 0 (témoin) jusqu'au 450 mM pour l'antimoine, et de 0 à 175 mM pour l'arsenic. Après incubation à 30 °C pendant 24 h à 48 h, la croissance bactérienne est révélée par l'apparition de colonies. La concentration minimale inhibitrice de chaque métal pour une souche microbienne donnée, est celle qui inhibe totalement la croissance microbienne (absence totale de colonies).

8.2.2 Sur milieu liquide

Dans chaque essai, 0,5 mL de l'inoculum sontensemencés dans des tubes contenant 9,5 mL du bouillon Luria-Bertani (LB) modifié contenant les mêmes concentrations précédemment utilisées pour chaque métalloïde (Sb et As). Le tube contenant le milieu sans métal a été utilisé comme témoin. Les tubes sont incubés dans un incubateur agitateur à 30 °C pendant 24-48 h à 150 rpm. La tolérance des bactéries à ces deux métalloïdes a été évaluée sur la base de la croissance observée (présence d'un trouble). La concentration minimale inhibitrice de chaque métal pour une souche bactérienne donnée est celle qui inhibe totalement la croissance microbienne (absence totale de trouble)

9 Identification moléculaire des bactéries résistantes à l'antimoine et à l'arsenic

Les bactéries résistantes sont soumises à des tests d'identification macro et microscopiques ainsi qu'à des tests biochimiques complémentaires avec les galeries API® (Bio Mérieux). L'identification moléculaire de ces souches a été effectuée *via* l'amplification du gène d'ADN correspondant à l'ARNr 16S. Après le séquençage des amplifiants, leur alignement est effectué avec des séquences de références du *GenBank*. L'arbre phylogénétique et les distances évolutives ont été calculés à l'aide du programme MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis 7).

9.1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique des souches à identifier permet d'obtenir le gabarit pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR. L'extraction a été réalisée

avec le kit Wizard® Genomic DNA Purification. Le protocole suivi est celui fourni par le fabricant (**Annexe 2a**).

9.2 Amplification du gène correspondant à l'ARN 16S

9.2.1 Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR)

La technique de la PCR permet l'amplification simultanée des deux brins de l'ADN après la dénaturation thermique du double brin. Elle est effectuée par une ADN polymérase thermostable en présence de deux amorces, *reverse* et *forward* (sens et antisens). L'opération est répétée plusieurs cycles, dont chaque cycle de synthèse est constitué de trois étapes :

1. La dénaturation de la matrice d'ADN par chauffage à 95 °C.
2. L'hybridation des amorces à l'ADN simple brin réalisée à une température (Th) dépendante de la composition en base des oligonucléotidique.
3. L'extension des amorces par l'ADN polymérase réalisée à 72 °C en présence de dNTP.

9.2.2 Optimisation de la PCR avec la Prim STAR polymérase

Dans un volume final de 25 µL sont ajoutés 1 µL d'ADN à amplifier, 12,5 µL de Prim Star et 1,5 µL de chacune des amorces, fD1 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGAC-3') (Sigma). Une amplification classique, de 35 cycles, est réalisée par le thermocycleur (Bioer) précédée par une étape de dénaturation de 15 secondes à 98 °C, une phase d'hybridation de 10 secondes à 50 °C et une phase d'élongation à 72 °C (**Annexe 2b**).

9.2.3 Vérification des amplifiats par électrophorèse

L'électrophorèse est réalisée sur un gel d'agarose à 0,8 %, il a été préparé dans un tampon TAE 1X (Tris-Acétate-EDTA). Les produits de la PCR sont mélangés à un colorant, de faible masse moléculaire par rapport au fragment d'ADN, avant de les déposer dans le gel d'agarose, pour marquer le fond de migration au cours de l'électrophorèse.

Le gel polymérisé est recouvert par le TAE 1X. Les échantillons à tester aussi bien le marqueur de taille, Exact Ladder DNA PreMix 2 Log (0,1-10 kb), ainsi que le témoin négatif sont déposés dans les puits. Ensuite, le gel est déposé dans une plaque de migration sous tension de 100 V pendant 30 min.

La révélation des bandes est effectuée par l'immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) (1 µg/mL). Ce dernier intercale les acides nucléiques et se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et rend l'ADN fluorescent sous les rayons ultraviolets (UV).

9.2.4 Séquençage et analyse des séquences

Pour l'identification des souches résistantes, 17 µL de produits de PCR contenant 20 ng/µL d'ADN amplifié sont envoyés pour les séquencer. Le séquençage des amplifiants est effectué par une société privée (Villeurbanne, Lyon, France).

Les résultats du séquençage des souches sont obtenus sous forme de séquences de nucléotides. Elles sont par la suite comparées avec la banque de données du site du NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) afin d'identifier les taxons les plus proches. L'alignement des séquences du gène d'ARNr 16S avec d'autres séquences homologues du *GenBank* est effectué en utilisant le logiciel Clustal W (Larkin et al., 2007) pour définir la séquence consensus. Après avoir aligné les séquences, l'arbre phylogénétique est construit à l'aide du programme MEGA version 7 (Kumar et al., 2016), selon la méthode du "Neighbor Joining" (NJ) (Saitou et Nei, 1987). Les distances évolutives sont calculées par la méthode de *p*-distance (Nei et Kumar, 2000).

10 Étude du stress oxydatif des bactéries endophytes résistantes

10.1 Préparation de la biomasse bactérienne

Pour les essais des biomarqueurs antioxydants, le milieu Luria-Bertani (LB) modifié est utilisé pour éviter la précipitation des métaux. Dans chaque essai, 1 mL d'une préculture de 24 h (contenant environ 4×10^5 UFC) estensemencé dans des Erlenmeyer de 250 mL contenant 50 mL de bouillon LB modifié stérile (**Annexe 1a**), et contenant différentes concentrations d'antimoine et d'arsenic séparément. Toutes les cultures sont réalisées en trois répétitions et incubées dans un incubateur rotatif (New Brunswick Scientific, Co., Inc., NJ, USA) à 150 rpm, pendant 24 h à 30 °C.

10.2 Changement de pH

Avant l'ajout des solutions métalliques, le pH du milieu est maintenu à environ 7 en utilisant le tampon citrate (50 mM, pH 7). Le pH du milieu de culture a été mesuré avant et après fermentation.

10.3 Estimation de la croissance

La croissance bactérienne est estimée par la mesure de l'absorbance à 650 nm (Abs650) (Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 25). Pour chaque lot d'expériences, la valeur de l'absorbance mesurée sur le milieu de culture sans métal est prise comme 100 % de référence pour normaliser les données. La croissance en présence de métal est ensuite exprimée en pourcentage par référence à la croissance sans métaux.

10.4 Détermination du H₂O₂ intracellulaire

Les niveaux de peroxyde d'hydrogène sont déterminés selon la méthode de Sergiev et *al.* (1997). La biomasse de 24h de chaque culture est récupérée par centrifugation à 8 000 g pendant 15 min à 4 °C, puis lavée avec de l'eau désionisée stérile. La biomasse est homogénéisée dans un bain de glace avec 5 mL de TCA 0,1 % (w : v). L'homogénat est centrifugé à 12 000 g pendant 15 min. 0,5 mL du surnageant est ajouté à 10 mL de tampon phosphate 0,5 mM (pH 7) et 1 mL du KI 1 M. L'absorbance est lue à 390 nm. Le taux d'H₂O₂ est déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage (**Annexe 3b**).

10.5 Détermination de la proline intracellulaire

La teneur en proline libre est déterminée par la méthode décrite par Troll et Lindsley (1955). 0,1 g de biomasse fraîche (précédemment décrite) sont broyés dans un bain de glace. 2 mL de méthanol 40 % (v : v) sont ajoutés, après incubation à 85 °C pendant 60 min et refroidissement à température ambiante, 1 mL de la solution d'extraction est mélangé avec 2 mL d'acide acétique, 25 mg ninhydrine et 1 mL d'un mélange contenant: l'acide acétique, l'eau distillée, l'acide orthophosphorique (120 : 300 : 80) (v : v : v). L'homogénat est porté à ébullition pendant 30 minutes et ensuite placé dans un bain de glace à fin d'arrêter la réaction. Pour permettre la séparation des phases, le toluène est ajouté au mélange et agité vigoureusement. L'intensité de la couleur rouge de la phase supérieure est lue à 528 nm. La concentration de la proline est déterminée, en utilisant le coefficient d'extinction 0,62 $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, par rapport au poids frais.

10.6 Préparation de l'extrait enzymatique

Les biomasses sont récupérées après 24h d'incubation à partir de la culture en batch (30°C/150 rpm) par centrifugation, à 8 000 g pendant 15 min à 4 °C. Les culots ainsi obtenus sont lavés avec de l'eau désionisée stérile puis suspendus dans un tampon phosphate glacé 50 mM (pH 7) contenant 0,1% de triton X-100 (v:v) et 1% de polyvinyl pyrrolidone (PVP) (w:v). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 10 000 g à 4 °C pendant 15 min, et le surnageant obtenu est utilisé pour déterminer le niveau de la peroxydation lipidique et des activités enzymatiques spécifiques (CAT, POD, APX et SOD).

10.6.1 Détermination du malonyldialdéhyde (MDA)

La teneur en malondialdéhyde (MDA), le produit final de la peroxydation lipidique, est dosée selon la méthode de Dhindsa et *al.* (1981) et Kosugi et Kikugawa (1985). Une aliquote de 0,5 mL de l'extrait est ajoutée à 1 mL de 20 % (w : v) d'acide trichloroacétique (TCA) et 0,5 % (w : v) d'acide thiobarbiturique (TBA). Le mélange est incubé à 95 °C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée en plaçant les tubes dans un bain de glace. Une centrifugation est réalisée pendant 10 minutes à 10 000 g, l'absorbance du surnageant est lue à 532 nm et à 600 nm. La valeur de l'absorbance non spécifique à 600 nm est soustraite de la valeur de 532 nm. La quantité du complexe MDA-TBA (pigment rouge) est calculée en utilisant l'absorbance ajustée et le coefficient d'extinction $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

10.6.2 Activités enzymatiques antioxydantes

10.6.2.1 Catalase

L'activité de la Catalase (CAT) (EC.1.11.1.6) est mesurée en utilisant la méthode de Chance et Maehly (1955). Le mélange réactionnel est préparé par addition de 0,1 mL d'extrait enzymatique et 2,9 mL de peroxyde d'hydrogène à 50 mM dans du tampon phosphate 50 mM à pH 7. La décomposition du peroxyde d'hydrogène est suivie directement en mesurant la diminution de l'absorbance à 240 nm ($39,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Les variations de l'absorbance sont lues chaque minute au cours des 3 premières minutes. L'activité spécifique de la CAT correspond à la quantité de H_2O_2 consommée par mg de protéine.

10.6.2.2 Peroxydase

L'activité de la peroxydase (POD) (EC.1.11.1.7) est mesurée selon la méthode de Chance et Maehly (1967). Le mélange réactionnel est constitué de 0,5 mL d'extrait

enzymatique, 2 mL tampon phosphate 10 mM (pH 6,8), 1 mL de 0,01 M pyrogallol et 1 mL de H₂O₂ 50 mM. La réaction est arrêtée par l'ajout d'acide sulfurique 24 % (v : v) après incubation pendant 5 minutes à 25 °C. La solution de référence est préparée dans les mêmes conditions, mais H₂SO₄ est ajouté avant l'incubation. La quantité du purpurogalin libérée après la réaction du pyrogallol avec H₂O₂ est mesurée à 420 nm. L'activité enzymatique est exprimée en unité (U mg⁻¹) qui correspond à 0,1 absorbance min⁻¹ mg⁻¹ de protéines.

10.6.2.3 Ascorbate peroxydase

L'activité de l'ascorbate peroxydase (APX) (EC.1.11.1.11) est dosée selon Nakano et Asada (1981) en mesurant la diminution de l'absorbance de l'ascorbate oxydée à 290 nm ($\epsilon = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Le mélange réactionnel, d'un volume total de 1 mL, contient l'extrait enzymatique, 50 mM de H₂O₂ dans du tampon phosphate 50 mM (pH 7) et 0,5 mM d'ascorbate dans le même tampon.

10.6.2.4 Superoxyde dismutase

L'activité totale de la superoxyde dismutase SOD (EC.1.15.1.1) est quantifiée selon le procédé de Marklund et Marklund (1974). Le mélange réactionnel est composé de 2,85 mL tampon Tris-HCl 0.1 mM (pH 8,2), 25 μL pyrogallol 24 mM et 0,1 mL de la préparation enzymatique. Le blanc est réalisé avec les mêmes quantités de réactifs, mais sans l'ajout de l'enzyme. Après 30 s, l'absorbance est lue à 420 nm. Une unité est définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour inhiber 50 % de l'auto-oxydation du pyrogallol.

10.6.2.5 Dosage des protéines

Le taux des protéines solubles est estimé selon la méthode de Lowry et *al.* (1951), en utilisant le sérum albumine bovine (BSA) comme standard (**Annexe 3c**).

10.7 Étude statistique

Les résultats expérimentaux sont des moyennes \pm SEM (Somme des Erreurs Moyenne) des expériences effectuées en triple. Les données ont été analysées à l'aide d'une analyse de la variance (ANOVA) suivie du test de *Tukey*. Le traitement des résultats est effectué moyennant les logiciels XLStat 2014 avec un seuil de signification de 5 %. Des associations univariées ont été mesurées à travers les corrélations marginales de *Pearson* entre la concentration des métalloïdes et chacune des autres variables incluses dans l'analyse.

11 Formation de biofilms par les bactéries endophytes résistantes

Les puits de deux plaques de polystyrène de 24 puits ont été remplis par 2 mL du milieu : LB, M63G et LB modifié et inoculé avec 10 μ L d'une préculture des souches étudiées et la souche de référence, *E. coli* W 3110. Après 24 h et 48 h d'incubation à 30 °C, la phase liquide a été délicatement aspirée, c'est la fraction surnageant. Les puits sont lavés afin d'éliminer les bactéries faiblement adhérentes aux parois des puits. Les bactéries collées à la paroi des puits, la fraction biofilm, sont fixées par incubation à 80 °C pendant 1 h 30 min au four Pasteur, puis colorées par addition d'une solution du cristal violet à 1 % pendant 15 min. Les puits sont alors rincés plusieurs fois avec de l'eau distillée avant d'être séchés à l'air libre, puis scannés. L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre de bactéries adhérentes.

12 Détermination du seuil de toxicité de quelques métaux

12.1 Sur milieu solide

50 μ l de préculture contenant 10⁶ bactéries / mL de chaque souche résistante et de la souche référence *E. coli* W 3110, sont ensemencés en spirale par un automate sur un milieu M63G gélosé. Dans chaque boîte, deux disques stériles sont ajoutés puis imbibés par des solutions mères de 50 mM des différents métaux : Ni, Co, Pb, Cd, Hg et Cu. Chaque culture est réalisée en trois répliques. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après incubation à 30 °C pendant 24 h par le Scan 500, version 7.0.14.0.

12.2 Sur milieu liquide

Des cultures de 200 μ l sont réalisées en milieu M63G liquide dans une plaque de 96 puits transparents (Nunc R). Ces milieux sont supplémentés par des concentrations croissantes de métaux. Les cultures sont agitées à 30°C pendant 24h. L'absorbance à 600 nm (Abs₆₀₀) est lue toutes les 20 min grâce à un lecteur de plaque, le TECAN (Magellan infinite M200 pro).

13 Tests de résistance aux antibiotiques

50 μ l de chaque culture des souches résistantes et la souche de référence contenant 10⁶ bactéries / mL sont ensemencés en spirale par un automate sur un milieu M63G gélosé. Les trois disques stériles ajoutés sont imbibés par des solutions d'antibiotiques ; le chloramphénicol (2 ng/mL), l'ampicilline (10 ng/mL) et la kanamycine (5 ng/mL). Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés après incubation à 30 °C pendant 24 h par le Scan 500, version 7.0.14.0.

14 Étude moléculaire de la résistance aux métalloïdes

14.1 Extraction de l'ADN plasmidique des endophytes résistante

14.1.1 Principe

La méthode par lyse alcaline « *miniprep* », adaptée de Birnboim et Doly (1979), permet d'extraire de l'ADN plasmidique en petite quantité. Cette méthode est basée sur la dénaturation différentielle de l'ADN génomique de structure relâchée, et de l'ADN plasmidique superenroulé. Lorsque la soude est ajoutée au lysat cellulaire, seul l'ADN génomique est dénaturé de façon irréversible. Si l'on ajoute alors de l'acide et du sel, l'ADN chromosomique se réassocie en un réseau insoluble qui peut être éliminé par centrifugation, alors que l'ADN plasmidique reprend sa forme superenroulée native soluble.

14.1.2 Protocole

1,5 mL d'une culture de nuit sont centrifugés à 12 000 rpm / 3 min. Le culot est suspendu dans 100 µL de la solution A froide (**Annexe 2c**). Le mélange est laissé à température ambiante pendant 5 min et sous agitateur. Ensuite, 200 µL de la solution B (**Annexe 2c**) sont ajoutés au mélange ; celle-ci va permettre la lyse des cellules bactériennes et la dénaturation de l'ADN. Le mélange est agité par inversion jusqu'à ce que la solution devienne transparente et visqueuse (maxi 5 min). Puis, 150 µL de la solution C froide sont ajoutés (**Annexe 2c**), elle contient de l'acétate de sodium. Ce dernier provoque ainsi la renaturation de l'ADN chromosomique qui forme un blob insoluble. La mixture est ensuite laissée 2 min sur glace, puis elle est centrifugée 10 min à 12 000 rpm.

Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est récupéré dans un nouveau tube Eppendorf contenant 1 mL d'éthanol pur afin de faire précipiter l'ADN plasmidique. À nouveau, une centrifugation de 10 min à 12 000 rpm est effectuée. Le culot est alors repris et lavé par 1 mL d'alcool 70 % avant d'être une dernière fois centrifugé, 5 min à 12 000 rpm, puis séché 5 min au Speed vac puis, dissout dans 30 µL d'eau osmosée stérile additionnée de RNase diluée. Pour vérifier l'efficacité de l'extraction, 2 µL du plasmide ainsi obtenu sont déposés sur le gel d'agarose 0,8 %.

14.2 Quantification de l'ADN

La concentration d'ADN a été déterminée par un Nanodrop spectrophotomètre à 260 nm. Cet appareil permet également d'évaluer la pureté de l'ADN extrait par comparaison de

l'absorbance à 260 nm et à 280 nm. En effet, l'ADN absorbe à 260 nm, alors que les protéines présentent un spectre global avec un pic d'absorption à 280 nm. Le ratio A_{260}/A_{280} , d'une solution suffisamment pure, doit être compris entre 1,5 et 2.

14.3 Transformation bactérienne

Deux méthodes de transformations sont utilisées au laboratoire de MAP : la méthode chimique basée sur un traitement des cellules au TSS et la méthode par électroporation, qui permet souvent de meilleurs rendements de transformation

14.3.1 Transformation par l'ADN plasmidique

Dans l'expérience effectuée, les plasmides sont introduits dans les cellules d'*Escherichia coli* W3110, rendues compétentes par un traitement au tampon de transformation TSS (Transformation Storage Solution) selon la méthode décrite par Chung et al. (1989).

Une culture d'*E. coli* **W3110** est effectuée sur milieu LB jusqu'à une densité optique de $Abs_{600} = 0,4$. Ensuite, 1mL de cette culture est centrifugé à 4000 g pendant 5 min à 4 °C. Le culot est repris délicatement par 0,1 mL d'une solution de TSS froide (polyéthylène glycol (PEG) 10 %, $MgCl_2$ 10 %, $MgSO_4$ 10 mM, Diméthylsulfoxyde (DMSO) 5 % dans LB). Pour la transformation, 5 μ L de plasmide sont ajoutés aux cellules compétentes. Le mélange est laissé 30 min dans la glace afin de figer la membrane. Après addition de 900 μ L du LB, la culture est incubée à 37 °C pendant 1 h ; ce qui permet la restauration de la fluidité des membranes, l'incorporation des plasmides et l'expression des gènes nouvellement incorporés

Enfin, la suspension bactérienne obtenue est étalée sur des milieux sélectifs, contenant des antibiotiques (l'ampicilline (100 μ g/mL), la kanamycine (50 μ g/mL) et le chloramphénicol (20 μ g/mL). Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 h à 48 h. Le(s) clone(s) apparu(s) sera (seront)ensemencé(s) sur LB modifié supplémenté par le Sb et l'As, et sur du M63G additionné du Ni et du Co.

14.3.2 Transformation par l'ADN génomique

Cette étape vise à la recherche de(s) gène(s) chromosomique(s) responsable(s) de la résistance à l'antimoine chez l'endophyte résistant à ce métalloïde.

14.3.2.1 Vecteur et souche sauvage

Le plasmide utilisé pour cloner le gène de résistance à l'antimoine est le pUC 18 (**Figure 15**). C'est un ADN circulaire double brin de 2686 paires de bases. Il contient :

- Le gène *amp^r* : La présence de ce gène permet à la bactérie porteuse de ce plasmide de ne pas être sensible à l'effet de l'ampicilline.
- Le promoteur du gène *lacZ*.
- Un site *polylinker* : une région avec des sites multiples pour des enzymes de restriction. Elle peut recevoir une séquence d'ADN étrangère par recombinaison.
- Enfin, la séquence de la partie NH₂ terminale du gène de la β-galactosidase. Elle est indispensable pour que la bactérie hôte puisse faire la réaction de cette enzyme

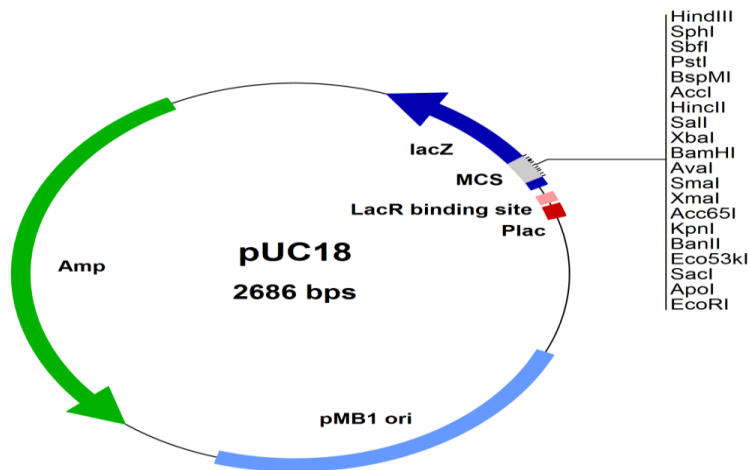


Figure 15 : Carte de restriction du plasmide pUC 18

Les plasmides clonés sont transférés, par électroporation, dans *E. coli* TOP *ten* électrocompétente. Les cellules d'*E. coli* W3110 sont rendues compétentes après une collection par centrifugation à froid lorsqu'elles sont en phase exponentielle et à une densité suffisante.

14.3.2.2 Digestion par les endonucléases de restriction

Une digestion enzymatique est effectuée pour l'ADN génomique de la souche résistante à l'antimoine et du plasmide pUC18 en utilisant deux enzymes de restriction différents : *Sau3A* et *BamHI*, respectivement.

-Pour la digestion de l'ADN génomique, on a pris 20 µL d'ADN, 1 µL d'enzyme. 4 µL de tampon, 4 µL du BSA dans un volume total de 40 µL. Après incubation à 37 °C pendant

5 min, la réaction est arrêtée en désactivant de la *Sau3A* par incubation à 65 °C pendant 20 minutes. 2 µL mélange sont déposés sur un gel d'agarose 0,8 % afin de vérifier l'efficacité de la digestion de l'ADN génomique.

- Pour la digestion de l'ADN plasmidique 10 µL de pUC18 sont mélangés avec 1 µL de *BamH1* et 2 µL de tampon dans un volume total de 20 µL. Après incubation à 37 °C pendant une nuit, une déphosphorylation est effectuée afin d'éviter la refermeture du plasmide. Cette étape est effectuée en ajoutant 1 µL d'antarctic phosphatase et 2,5 µL de son tampon au mélange de digestion. Après incubation à 37°C pendant 1 h 30, l'ADN est purifié en utilisant le kit PCR clean-up, gel extraction (MACHEREY – NAGEL). 2 µL du mélange sont déposés sur un gel d'agarose 0,8 % afin de vérifier l'efficacité de la digestion du plasmide.

14.3.2.3 Ligation de l'ADN

Après restriction et déphosphorylation du plasmide pUC 18, la ligation est faite dans un volume total de 15 µL ; dans lequel on a mis l'ADN génomique digéré et le plasmide Puc18 linéarisé avec un rapport insert / vecteur (2 : 1), en présence de 1,5 µL tampon ligase 10X et 1,5 µL de T4 DNA ligase. Pendant une nuit d'incubation à 19 °C, cette enzyme catalyse la formation d'un pont phosphodiester entre un 3' OH et un 5' phosphate, elle permet la formation d'un nouveau plasmide contenant les gènes de la souche étudiée.

14.3.2.4 Electroporation

L'électrocompétence des cellules d'*E. coli* est effectuée suite à leur croissance sous agitation jusqu'en phase exponentielle. Les cellules ont subi une succession de centrifugation en alternance avec plusieurs lavages avec de l'eau distillées stérile froide. Les cellules d'*E. coli* TOP *ten* compétentes, sont récupérées dans le glycérol à 20 % stérile, elles sont ensuite utilisées pour l'électroporation.

Pour la transformation de bactéries TOP *ten* compétentes, un protocole d'électroporation a été réalisé. 50 µL de cellules électrocompétentes sont mélangés avec de plasmides clonés (20-40 ng/µL). Ce mélange est placé dans une cuve d'électroporation stérile et refroidie dans la glace. L'échantillon est soumis à un choc électrique, très bref et de très forte intensité (voltage de 2500 V), généré par un électroporateur (Electroporateur 2510). L'application du champ électrique induit des ruptures réversibles de la membrane cellulaire, en préservant la viabilité des cellules et en leur permettant une perméabilité membranaire pendant quelques

minutes. Les pores ainsi formés permettent aux plasmides de pénétrer dans la cellule bactérienne.

Après impulsion électrique, les cellules sont reprises dans 1 mL de milieu LB glacé et incubées 1 h à 37 °C. À la suite de cette culture d'expression, les cellules sont centrifugées et le culot étalé sur milieu LB contenant l'ampicilline, le X-Gal et l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant 24 à 48 h. Les colonies blanches, résistantes à l'ampicilline et incapables de produire la β -galactosidase, sont sélectionnées et isolées comme candidates potentielles portant une fusion génétique d'un ou des gènes chromosomiques de l'endophyte bactérien résistant à l'antimoine. Elles constituent donc une banque de clones et elles seront donc retenues pour la suite du travail.

14.3.2.5 Criblage de la banque

Pour sélectionner les clones résistants à la présence d'antimoine, la banque est transférée sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB modifié, supplémenté avec du Sb à une concentration de 400 mM. Ces boîtes sont incubées pendant 24 à 48 h à température 30 °C. Le ou les clone (s) poussant sur ce milieu sera (seront) ensemencé(s) sur LB modifié liquide supplémenté par différentes doses en Sb.



Résultats et discussion



1 Choix des plantes

Les études antérieures réalisées par Rached-Mosbah et Gardou (1988), sur les communautés végétales de la mine d'antimoine de Djebel Hamimat, ont mis en évidence l'effet des taux élevés de Sb sur la végétation spontanée des sols qui entourent les déblais de mines. En 1992, Rached-Mosbah et ses collaborateurs ont réparti les espèces végétales, poussant dans cette zone, en trois catégories selon leur comportement vis-à-vis des teneurs en métalloïdes. Certaines espèces végétales ont pu survivre sur des sols très pollués par l'antimoine et l'arsenic, elles sont dites **toxicophytes** (ou résistantes). D'autres sont non résistantes, elles n'ont pu se développer que dans des sols à faible teneur en métalloïdes, elles sont appelées **toxicophobes**. Alors que les espèces dites **indifférentes**, sont capables de pousser aussi bien sur les sols à fortes concentrations en métalloïdes que sur les sols à faibles concentrations

Dans notre étude, deux plantes indifférentes sont sélectionnées ; *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum* L. Celles-ci ont la capacité de tolérer de fortes concentrations en métalloïdes dans le sol (Rached-Mosbah et *al.*, 1992).

- *Hedysarum pallidum* Desf., est une Fabaceae. Elle est connue par son caractère fertilisant des sols par la fixation de l'azote atmosphérique. Elle pousse dans les zones arides et semi-arides (Hannachi-Salhi et *al.*, 2004). Elle peut concentrer en moyenne $72,20 \pm 16,80$ mg/kg de Sb et $10,75 \pm 2,60$ mg/kg d'As dans ses parties supérieures et $90,02 \pm 11,48$ mg/kg de Sb et $27,00 \pm 7,37$ mg/kg d'As dans ses racines (Benhamdi et *al.*, 2014).
- *Lygeum spartum* L., est une Poaceae qui peut tolérer des conditions extrêmes telles que la sécheresse, la salinité et les températures élevées (Nedjimi, 2009). D'ailleurs, cette plante est utilisée comme un bioindicateur de la salinité des sols (Alvarez et *al.*, 2001). Elle est capable d'accumuler en moyenne $61,04 \pm 8,10$ mg/kg de Sb et $71,66 \pm 29,36$ mg/kg d'As dans sa partie racinaire, et $18,58 \pm 3,53$ mg/kg de Sb et $5,58 \pm 2,39$ mg/kg d'As dans sa partie aérienne (Benhamdi et *al.*, 2014).

Selon les analyses effectuées par Benhamdi et *al.* (2014), sur les parties aériennes et racinaires de ces deux plantes, il ressort que les concentrations des métalloïdes (Sb et As) accumulés dans les tissus des deux plantes sont supérieures aux valeurs de références de la phytotoxicité de l'antimoine (5-10 mg/kg) (Levresse et *al.*, 2012) et des concentrations typiques de l'arsenic (0,01-1,5 mg/kg) (Alloway, 1995). Ces teneurs sont également beaucoup

plus élevées à celles rapportées par Rached-Mosbah et *al.* (1992) qui ont étudié les mêmes espèces de la même zone.

Par ailleurs, l'étude de Benhamdi et *al.* (2014) a montré que *L. spartum* accumule les deux métalloïdes beaucoup plus dans ses racines que dans ses parties supérieures, contrairement à *H. pallidum* qui accumule le Sb dans la partie aérienne et racinaire. De plus, la concentration d'As dans les racines d'*H. pallidum* est supérieure à celle de la partie aérienne, mais qui demeure toujours très inférieure par rapport à celle mesurée dans les racines de *L. spartum*.

2 Mise en évidence des endophytes bactériens

Après désinfection des huit racines saines des deux plantes, les échantillons sont mis en culture sur GN additionnée d'un antifongique à 30 °C. Les premières colonies bactériennes commencent à apparaître après 48 h d'incubation, à partir des segments racinaires des deux plantes (**Figure 16 A et B**). Contrairement aux boîtes qui ont étéensemencées par l'eau du dernier rinçage des racines, aucun microorganisme n'a poussé (**Figure 16 C**). Ce qui signifie que toutes les bactéries obtenues sont des endophytes ; ils émergent les tissus internes des racines saines d'*Hedysarum pallidum* et de *Lygeum spartum*. Ce qui montre la présence de bactéries endophytes dans le système racinaire des deux espèces végétales.



Figure 16 : Développement de colonies bactériennes endophytes à partir des racines d'*H. pallidum* (A) et de *L. spartum* (B) sur GN additionnée d'un antifongique et (C) représente la boîte contrôle

Ce résultat montre également que la méthode de désinfection utilisée est efficace pour éliminer toute bactérie épiphyte ou contaminante. L'efficacité de la désinfection a été vérifiée dans des boîtes témoins qui n'ont montré aucune croissance microbienne. Cela indique que les épiphytes ont été complètement enlevés ; ce qui traduit l'efficacité du protocole utilisé.

La stérilisation préalable des surfaces des racines est une condition indispensable pour l'isolement des microorganismes endophytes. De plus, il est bien établi que l'isolement des endophytes doit être réalisé à partir des tissus les plus sains afin d'éviter toute contamination par les microorganismes épiphytes (Frommel et *al.*, 1991 ; Sturz, 1997).

L'établissement d'une méthode d'isolement de ces microorganismes des tissus internes des végétaux était un défi pour les chercheurs. Plusieurs protocoles de stérilisation ont été établis et répertoriés dans la littérature, en fonction de la plante, des tissus prélevés et de l'endophyte à isoler en faisant varier la concentration ou l'ordre d'utilisation des désinfectants ou le temps d'immersion des explants. Aucune de ces méthodes n'est arrivée à éliminer 100 % de la flore épiphyte sans qu'il y ait la pénétration des désinfectants à l'intérieur des tissus ; ce qui provoque la mort de quelques souches endophytes (Lodewyckx et *al.*, 2002). De plus, quelques résidus de l'hypochlorite de sodium peuvent affecter la croissance ou induire la mutagenèse et la mort des microorganismes ; ce qui rend nécessaire de rincer les tissus plusieurs fois, soit avec de l'eau distillée stérile, soit avec du thiosulfate de sodium pour éliminer complètement l'hypochlorite de sodium résiduel (Rosenblueth et Martinez-Romero, 2006).

Les racines des deux plantes sont fragmentées en fragments de quelques millimètres d'épaisseur afin de faire sortir les bactéries endophytes des tissus internes. Gamboa et *al.* (2001) ont recommandé que la taille des segments doit être la plus petite possible ; ce qui permet d'estimer la diversité des microorganismes endophytes dans les tissus internes des végétaux en réduisant le phénomène de compétition entre les microorganismes. Par conséquent, ces derniers peuvent tous s'exprimer et le nombre des isolats sera donc plus élevé.

Dans cette étude, on a pu isoler 122 colonies bactériennes des racines des deux plantes, dont la grande proportion est issue des racines d'*H. pallidum*, soit 73 isolats, avec un taux de colonisation de 65,62 %. Par ailleurs, 49 isolats proviennent des racines de *L. spartum* avec une fréquence de colonisation (FC) de 48,96 %. Cette fréquence est un paramètre qui permet d'indiquer le degré d'infection des racines des deux plantes par les endophytes bactériens. Le nombre d'isolats obtenu pour chaque racine de chacune des deux espèces végétales, ainsi les fréquences de colonisation ou d'infection (FC) exprimées en pourcentage (%) sont représentés dans le tableau 2 et la figure 17.

Tableau 2 : Résultats d'isolement et la fréquence de colonisation (FC) (%) des endophytes bactériens d'*H. pallidum* et de *L. spartum*

Plante Racine	<i>H. pallidum</i>			<i>L. spartum</i>		
	Nombre de segments infectés	Nombre d'isolats	(FC %)	Nombre de segments infectés	Nombre d'isolats	(FC %)
Racine 1	7	8	58,33	8	8	66,66
Racine 2	9	9	75	6	6	50
Racine 3	12	15	100	4	5	33,33
Racine 4	3	3	25	4	4	33,33
Racine 5	9	9	75	7	7	58,33
Racine 6	6	8	50	5	5	41,66
Racine 7	8	10	66,66	5	6	41,66
Racine 8	9	11	75	8	8	66,66
Total		73	65,62	47	49	48,96

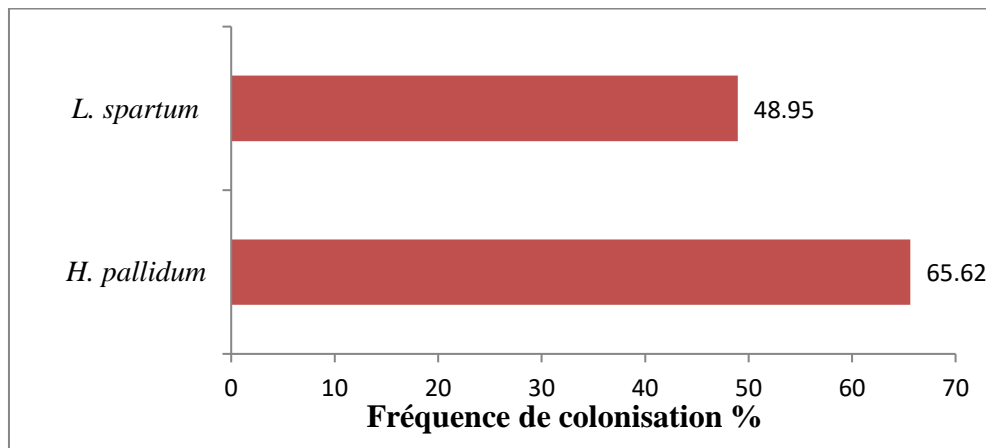


Figure 17 : Fréquence de colonisation (%) des bactéries endophytes chez *H. pallidum* et *L. spartum*

Le tableau 2 et la figure 17 résument la fréquence de colonisation pour les deux espèces végétales en question. Pour *H. pallidum*, on note une fréquence de colonisation globale de 65,62 %, avec de fréquences différentes entre les huit racines de la plante. On remarque pour la racine 3 est colonisée à 100 % par rapport aux autres racines qui présentent une FC qui varie entre 75 % et 25 %. Pour *L. spartum*, on note une FC maximale de 66,66 %. Cependant, pour les autres racines, on a enregistré des FCs variant entre 33,33 % et 58,33 %.

Cette distinction entre les fréquences de colonisation des différentes racines de la même espèce peut être liée à l'épaisseur, à la longueur et à l'âge de la racine (Djabeur et al., 2008). De plus, la fréquence de colonisation élevée chez *H. pallidum* reflète la richesse des tissus

internes de son système racinaire par des endophytes bactériens par rapport aux racines de *L. spartum*. En revanche, aucune information n'est disponible concernant les mécanismes régissant les modalités de l'infection naturelle, ainsi que l'internalisation des bactéries endophytes au sein des tissus racinaires des deux espèces végétales explorées.

Ce résultat est en parfaite concordance avec les travaux de Chareprasert et *al.* (2006) et Gong et Guo (2009) qui ont trouvé des FCs différentes des endophytes isolés des différents phytotaxons de la même région et collectés pendant la même période. De plus, Mishra et *al.* (2014) et Reshma et Linu (2017) ont rapporté que la diversité et la fréquence de colonisation des endophytes étaient principalement influencées par le type de tissu exploré et la saison de collecte des plantes. Selon la bibliographie, cette étude est la première à mettre en évidence des endophytes bactériens isolés des racines d'*H. pallidum* et de *L. spartum* en Algérie.

Les colonies de nos isolats sont soit rouges, soit roses, soit orange ou bien blanches ; avec différentes formes circulaires et convexes. L'identification n'étant pas encore faite, chaque isolat est considéré comme une unité, même s'il peut présenter des doublons ; c'est-à-dire, lors de la numération, un isolat peut se rencontrer dans plusieurs boîtes de la même racine ou de racines différentes. Par ailleurs, il pourrait encore exister des microorganismes qui ne se sont pas exprimés. Cela peut être dû soit à la compétition qui peut se présenter entre les microorganismes pour coloniser le nouveau milieu de culture, soit au caractère anaérobie strict de certains microorganismes qui les rend non extractibles.

Dans cette étude, on a pu montrer que, globalement, la colonisation des racines d'*H. pallidum* et de *L. spartum* par les bactéries endophytes est significative sur le plan quantitatif. Ce qui témoigne clairement, que ces deux plantes constituent des niches de prédilection de bactéries endophytes. Celles-ci sont d'une part, protégées de toute compétition et des stress environnementaux. D'autre part, cette microflore peut contribuer à la croissance et à la tolérance de ces deux phytotaxons aux agressions de l'environnement sans qu'ils induisent de symptômes visibles ou latents aux plantes hôtes (Zhao et *al.*, 2016 ; Qin et *al.*, 2017).

Selon la littérature, parmi les 300 000 espèces de plantes existantes sur notre planète, chacune est probablement un hôte d'au moins d'un endophyte (Strobel, 2003). En effet, une large gamme de plantes peut être une niche pour ce type de bactéries. Ainsi, elles sont isolées des arbres (pins, ifs), des fourrages (luzerne, trèfle et sorgho), des légumes (carotte, radis,

tomates, patates douces, salade, soja), des fruits (bananes, ananas, agrumes), des céréales (maïs, riz, blé) et d'autres cultures (canne à sucre, café).

De ce fait, plusieurs études ont pu mettre en évidence la présence de bactéries endophytes dans les différentes parties de différentes plantes hôtes. Jabaji et *al.* (2009) ont isolé 52 bactéries endophytes des feuilles du panic érigé (*Panicum virgatum*). Altalhi (2009) a pu isoler 111 bactéries endophytes à partir des tissus internes des feuilles et des tiges de la vigne (*Vitis vinifera* L.). 76 bactéries endophytes étaient isolées des différents tissus internes du tournesol (*Helianthus annuus* L.), du bananier (*Musa accuminata* Colla), du citronnier (*Citrus limon* L. *Burm* L.) et bathu (*Chenopodium album* L.) (Muzzamal et *al.*, 2012). De plus, 158 isolats bactériens ont été isolés des feuilles d'haricot (*Phaseola vulgaris*) (Costa et *al.*, 2012). Ji et *al.* (2014) ont obtenu 576 isolats des racines, des tiges et des feuilles de 10 variétés du riz (*Orzya sativa* L.). En 2015, Sharma et *al.* ont pu isoler 54 bactéries endophytes du safran (*Crocus sativus*). Dans cette même année, Anjum et Chandra ont mis en évidence 35 bactéries endophytes des racines, des tiges et des feuilles de plusieurs plantes médicinales : *Catharanthus roseus*, *Ocimum sanctum*, *Mentha arvensis* et *Stevia rebaudiana*. Récemment, 110 isolats sont isolés des feuilles de deux variétés du théier (*Camellia sinensis* var. *assamic* et *C. sinensis*) (Yan et *al.*, 2018) et 60 bactéries endophytes des racines du maïs (*Zea mays* L.) (Abedinzadeh et *al.*, 2019).

L'ubiquité des endophytes est un aspect partagé entre les divers phytotaxons étudiés. Cependant, l'évaluation de la population bactérienne endophyte totale d'une plante dépend de l'espèce bactérienne, du génotype et des conditions environnementales de l'hôte (Chebotar et *al.*, 2015). Elle dépend également de la composition des milieux de culture utilisés pour l'isolement et la méthode de stérilisation des surfaces (Kleopfer et Beauchamp, 1992 ; Gong et Guo, 2009). Cela explique la différence entre le nombre des endophytes obtenus et ceux de la bibliographie. Par conséquent, la comparaison entre les différentes études doit tenir compte de tous ces facteurs.

3 Biodiversité des endophytes bactériens

L'étude de la biodiversité des bactéries endosymbiotiques suscite de nouvelles perspectives pour divers domaines (Seghers et *al.*, 2004). Elle permet la découverte de nouvelles souches et par conséquent de nouvelles molécules bioactives (les flavonoïdes, les tannins, les indols, les composés phénoliques, ...) (Hallmann et *al.*, 1997). Pour cela,

l'objectif de cette partie de notre étude est l'identification des bactéries endophytes isolées des racines d'*H. pallidum* et de *L. spartum* afin d'évaluer leur diversité chez les deux plantes.

3.1 Purification des isolats

La purification des 122 colonies bactériennes des racines sur quatre milieux (Mac Conkey, Cetrimide, Chapman et TSA) a permis l'obtention de 258 souches bactériennes ; 148 isolées d'*H. pallidum*, soit 57,4 % et 110 de *L. spartum*, soit 42,6 %. La pureté de la collection bactérienne endophytique ainsi obtenue est confirmée par l'observation microscope des frottis, au grossissement x 100, après coloration de Gram.

On constate que le nombre d'isolats obtenu est très important, cela peut s'expliquer par le fait que le système racinaire est le premier à être colonisé par les bactéries endophytes. À l'exception de la propagation des bactéries par les graines, la colonisation des tissus racinaires est particulièrement abondante par la microflore rhizosphérique (Wiehe et *al.*, 1994; Pan et *al.*, 1997). En effet, certaines bactéries passent de la rhizosphère aux racines, puis aux tiges et aux feuilles *via* le xylème, dont le nombre de bactéries endophytes diminue progressivement en allant des racines vers les parties aériennes (Frommel et *al.*, 1991 ; Compant et *al.*, 2005). Ce phénomène a également été constaté chez le riz lors de la propagation des rhizobiums comme des endophytes (Chi et *al.*, 2005).

La colonisation de l'épiderme racinaire par les endophytes s'explique par la présence de cellulases et de pectinases spécifiques produites par plusieurs bactéries, comme *Azoarcus* sp. (Hurek et *al.*, 1994), *Azospirillum irakense* (Khammas et Kaiser, 1991) et *Pseudomonas fluorescens* (Duijff et *al.*, 1997 ; Hallmann et *al.*, 1997).

3.2 Caractérisation des isolats

Après purification des isolats racinaires endophytiques d'*H. pallidum* et de *L. spartum*, les taxons bactériens sont différenciés sur la base des caractères morphologiques de la colonie et de la cellule, la composition chimique des parois cellulaires, les besoins nutritifs et les activités biochimiques.

3.2.1 Description morphologique des colonies

Cette première étape du diagnostic bactérien d'une souche consiste en une description macroscopique des colonies isolées. En effet, chaque colonie bactérienne a ses caractéristiques de taille, de forme, de bords, de degré d'opacité et de couleur.

Après examen à l'œil nu, on a pu mettre en évidence des colonies circulaires transparentes ou opaques, de diverses couleurs (blanchâtre, crème, jaune, orange, rose et rouge), avec un contour régulier ou irrégulier, un relief variable (convexe, plat, concentrique ou concave). Ces colonies sont soit lisses, soit rugueuses.

3.2.2 Coloration de Gram

3.2.2.1 Composition biochimique des parois cellulaires

Rappelons que la méthode de la coloration de Gram est basée sur la capacité de la cellule à retenir le cristal violet (première coloration) ; elle met en évidence principalement les propriétés biochimiques de la paroi bactérienne.

Le test de Gram a été réalisé pour les différentes colonies isolées. Les bactéries ont été examinées sous microscope au grossissement x 100. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 22. Cette dernière révèle que les isolats des racines des deux plantes contiennent des bactéries à Gram négatif et à positif. Sur l'ensemble des endophytes bactériens des deux espèces végétales, on constate que les bactéries à Gram-négatif sont plus fréquentes (62,79 %) que les bactéries à Gram-positif (37,21 %) (**Figure 18A**).

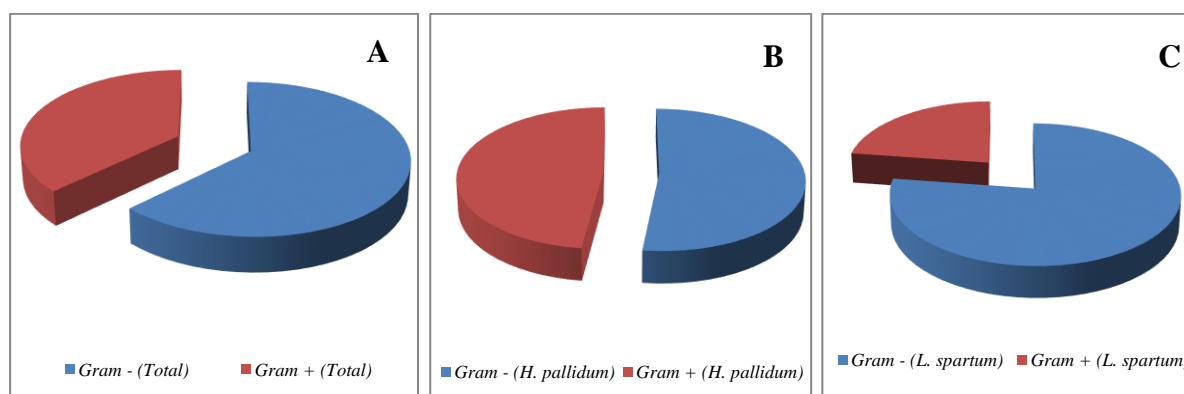


Figure 18 : Distribution des bactéries endophytes selon leur Gram. Bactéries endophytes totales (A), bactéries endophytes isolées des racines d'*H. pallidum* (B), bactéries endophytes isolées des racines de *L. spartum* (C)

La répartition des bactéries endophytes selon le Gram est différente chez les deux plantes. Chez *H. pallidum*, on remarque que les bactéries à Gram négatif sont légèrement

supérieures (52,03 %) à celles à Gram négatif (47,97 %) (**Figure 18B**). Chez *L. spartum*, on constate une prédominance des bactéries à Gram négatif (77,27 %) par rapport aux bactéries à Gram positif (22,73 %) (**Figure 18C**)

La littérature montre que la répartition des endophytes bactériens selon le Gram est très hétérogène ; elle diffère d'une plante à une autre. En effet, les travaux réalisés par Hallmann et al. (1997) ont montré une prédominance des endophytes bactériens à Gram négatif dans les racines du citronnier (*Citrus limon*) et de l'alfalfa (*Medicago sativa*). Des résultats similaires sont obtenus pour les endophytes de maïs (*Zea mays*) et de coton (*Gossypium hirsutum* L.) (McInroy et Kloepper, 1995), de différentes variétés de riz (*Oryza sativa* L.) (Elbeltagy et al., 2000) et des arbres de pistachier (*Pistacia atlantica* L.) (Etminani et Harighi, 2018). Par contre, de nombreuses autres études ont montré que certaines plantes hébergent un taux de bactéries endophytes à Gram positif plus élevé que celui des bactéries à Gram négatif ; c'est le cas des feuilles et des tiges de la vigne (*Vitis vinifera* L.) (Altalhi, 2009) et des cabosses du cacaoyer (*Theobroma cacao*) (Kebe et al., 2009). D'autres par contre, constituent une niche pour une microflore bactérienne totalement à Gram positif ; c'est le cas du Mélilot d'Inde (*Melilotus indicus* L.) (El-Batanony et al., 2018) et du maïs (*Zea mays* L.) (Abedinzadeh et al., 2019). D'autres enfin, abritent dans leurs tissus des bactéries à Gram négatif et positif à des pourcentages égaux ; c'est le cas de plusieurs plantes agronomiques (Zinniel et al., 2002) et du colza (*Brassica napus* L.) (Etesami et Alikhani, 2016).

3.2.2.2 Répartition des isolats selon la morphologie

Le test de Gram a permis, non seulement de différencier entre les bactéries selon le Gram, mais également de déterminer la morphologie des isolats. La figure 19A montre que l'observation microscopique des 258 isolats, d'*H. pallidum* et de *L. spartum*, a mis en évidence trois formes bactériennes où les bacilles sont prédominants (73,65 %), suivis par les coccobacilles (18,60 %) puis par les cocci (7,75 %).

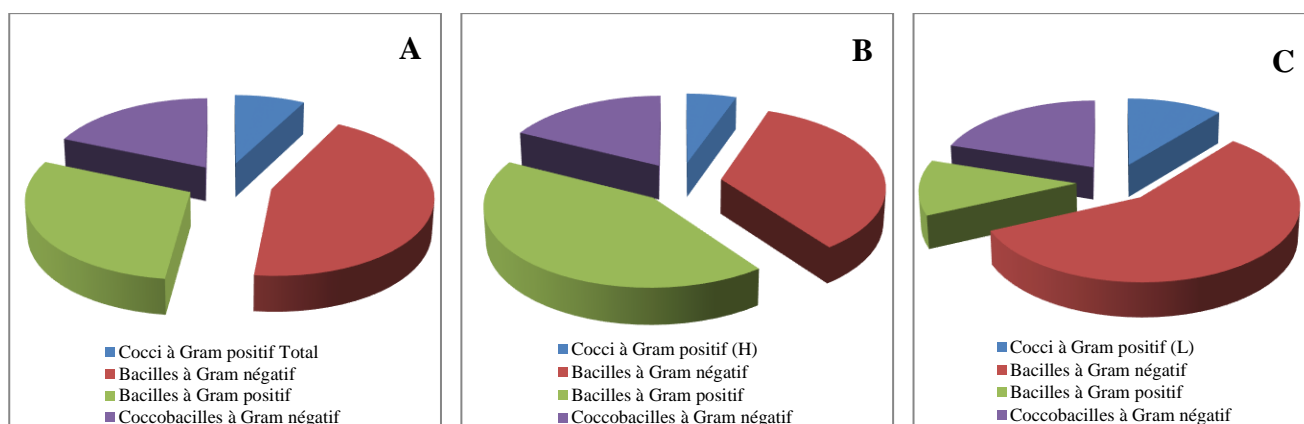


Figure 19 : Distribution des bactéries endophytes selon leur morphologie et leur Gram. Bactéries endophytes totales (A), Bactéries endophytes isolées des racines d'*H. pallidum* (B), Bactéries endophytes isolées des racines de *L. spartum* (C)

En effet, les figures 19B et 19C indiquent que 77,03 % des isolats d'*H. pallidum* et 69,09 % de *L. spartum* sont bacilles ; 17,57 % des isolats des racines d'*H. pallidum* et 20 % des racines de *L. spartum* sont des coccobacilles et 5,41 % et 10,91 % des endophytes isolés d'*H. pallidum* et de *L. spartum*, respectivement, sont des cocci. Selon ces résultats, il n'apparaît pas une différence dans la distribution de ces formes entre les deux plantes explorées.

3.2.3 Identification biochimique en utilisant les galeries API®

L'identification des isolats est complétée par l'utilisation des galeries API-20E, API-20NE et API-Staph (BioMérieux). Le choix de la galerie est fondé sur le résultat de la coloration de Gram, du type respiratoire, du type de métabolisme du glucose et enfin du test de l'oxydase. Au bout de la période d'incubation, la lecture est réalisée selon la notice fournie par le fabricant. Les résultats obtenus sont notés sur une fiche des résultats puis portés dans la matrice d'identification.

Le système API-20E permet l'identification des bacilles Gram négatifs non exigeants qui appartiennent aux Enterobacteriaceae. Ces mêmes galeries sont également utilisées pour l'identification des bacilles à Gram positif. Cependant, le système API-20NE est utilisé pour l'identification des bacilles Gram négatifs aérobies stricts et non fermentaires. Le choix de ce dernier type de galeries est guidé par le test de l'oxydase, qui est positif. Enfin, le système API-Staph est choisi pour l'identification des cocci à Gram positif.

En suivant cet algorithme, on a pu regrouper les isolats bactériens des deux plantes en 18 genres (**Tableau 3**) : *Pantoea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Escherichia*

(Gram négatif, Enterobacterales), *Rhizobium* et *Methylobacterium* (Gram négatif, Rhizobiales), *Pseudomonas* et *Acinetobacter* (Gram négatif, Pseudomonadales), *Burkholderia* (Gram négatif, Burkholderiales), *Pasteurella* (Gram négatif, Pasteurellales), *Stenotrophomonas* (Gram négatif, Xanthomonadales), *Micrococcus*, *Kocuria* (Gram positif, Actinomycetales), *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Brevibacillus* (Gram positif, Bacillales). Cependant, huit coccobacilles n'ont pu être identifiés ; cinq isolées des racines d'*H. pallidum* et trois des racines de *L. spartum*. Ces résultats sont résumés dans le tableau 3 et la figure 20.

Selon la bibliographie, la plupart des isolats identifiés correspondent à des espèces de genres communément isolés de la rhizosphère ou des bactéries endophytes associées aux plantes (Elbeltagy et al., 2001 ; Costa et al., 2012 ; Mufti et al., 2015 ; Rhoden et al., 2015 ; Sharma et al., 2015 ; Selvankumar et al., 2017 ; Ahmad et al., 2018 ; Correa-Galeote et al., 2018 ; Etmnani et Harighi, 2018 ; Mukherjee et al., 2018).

À travers l'étude morphologique et biochimique des isolats, on décèle un niveau élevé de la biodiversité au sein des isolats endophytiques des deux plantes explorées. De plus, on constate, sur le tableau 3 et la figure 20, une différence qualitative et quantitative dans le nombre de genres identifiés. En effet, les isolats racinaires de *L. spartum* sont avérées moins diversifiés que ceux d'*H.pallidum*. Ainsi, sur cette base comparative, nous avons identifié 18 genres bactériens chez les isolats d'*H.pallidum* et 16 genres chez les isolats de *L. spartum*.

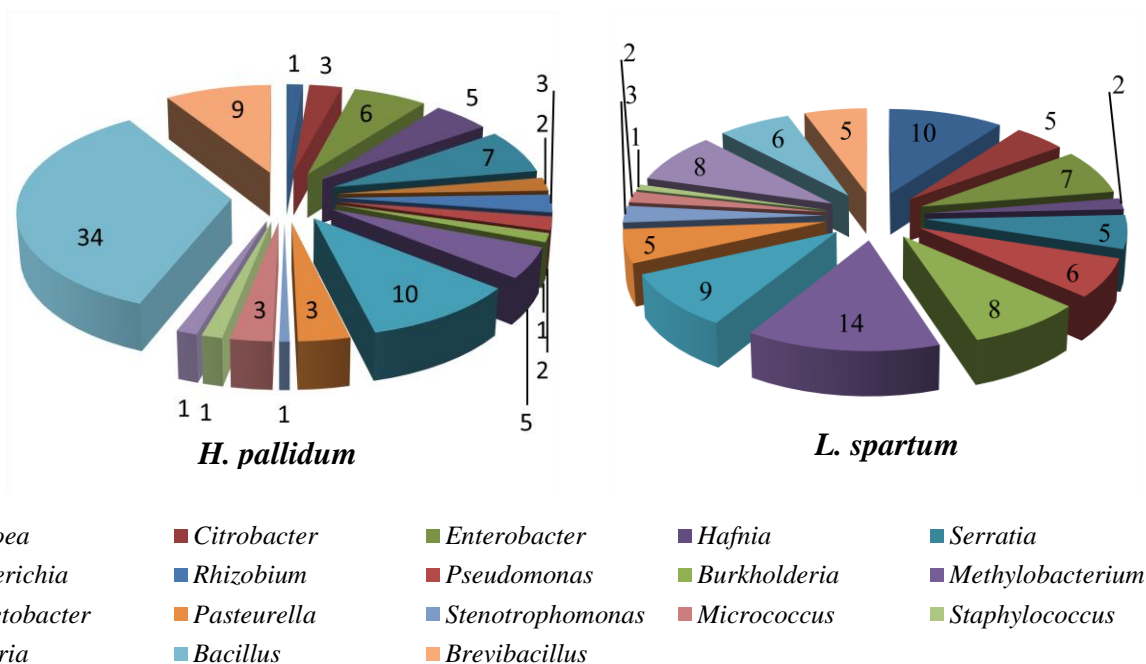


Figure 20 : Composition de la flore bactérienne endophyte des racines d'*H. pallidum* et de *L. spartum*

Tableau 3 : Composition générale de la flore bactérienne endophyte et fréquence d'individu (%) des endophytes bactériens chez *H. pallidum* et *L. spartum*

Plantes Taxon bactérien	<i>H. pallidum</i>		<i>L. spartum</i>	
	Nombre	FI (%)	Nombre	FI (%)
<i>Bacilles à Gram négatif Fermentaire</i>	35	36,45	32	33,33
<i>Pantoea</i>	2	2,08	11	11,45
<i>Citrobacter</i>	4	4,16	5	5,20
<i>Enterobacter</i>	9	9,37	8	8,33
<i>Hafnia</i>	7	7,29	2	2,08
<i>Serratia</i>	10	10,41	6	6,25
<i>Escherichia</i>	3	3,12	0	0
<i>Bacilles à Gram négatif Non Fermentaire</i>	16	16,66	31	32,29
<i>Rhizobium</i>	4	4,16	0	0
<i>Pseudomonas</i>	3	3,12	7	7,29
<i>Burkholderia</i>	2	2,08	9	9,37
<i>Methylobacterium</i>	7	7,29	15	15,62
<i>Coccobacilles</i>	26	27,08	22	22,91
<i>N'ont pas poussées</i>	5	5,20	3	3,12
<i>Acinetobacter</i>	15	15,62	10	10,41
<i>Pasteurella</i>	5	5,20	6	6,25
<i>Stenotrophomonas</i>	1	1,04	3	3,12
<i>Coccis à Gram positif</i>	8	8,33	12	12,5
<i>Micrococcus</i>	4	4,16	2	2,08
<i>Staphylococcus</i>	2	2,08	1	1,04
<i>Kocuria</i>	2	2,08	9	9,37
<i>Bacilles à Gram positif</i>	63	65,62	13	13,54
<i>Bacillus</i>	50	52,08	7	7,29
<i>Brevibacillus</i>	13	13,54	6	6,25
Total	148		110	

L'analyse des résultats présentés dans le tableau 3 et la figure 20 fait ressortir une répartition hétérogène des germes endophytes identifiés chez les deux plantes :

Chez *H. pallidum*, les bacilles à Gram positif de l'ordre des Bacillales constituent le groupe principal des endophytes, soit 42,56 % des isolats. Celles-ci sont représentées par deux genres, *Bacillus* et *Brevibacillus*. Ensuite, vient le groupe des bacilles à Gram négatif fermentaire (23,65 %), appelé également les Enterobacterales, avec six genres différents, *Pantoea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia* et *Escherichia*. Le reste des bacilles à Gram négatif (10,81 %) est représenté par l'ordre des Rhizobiales avec deux genres (*Rhizobium* et *Methylobacterium*) et l'ordre des Pseudomonadales et Burkholderiales avec un seul genre chacun, *Pseudomonas* et *Burkholderia*. L'identification partielle des isolats de cette plante a mis en évidence un quatrième groupe qui réunit les Coccobacilles à Gram négatif avec une fréquence de 17,57 %. Dans ce groupe, on a pu compter trois ordres : les Pseudomonadales (*Acinetobacter*), les Pasteurellales (*Pasteurella*) et les Xanthomonadales (*Stenotrophomonas*). Dans le cinquième groupe, enfin, on trouve les coques à Gram positif (5,40 %), dont un genre appartenant à l'ordre des Bacillales (*Staphylococcus*) et deux genres appartenant à l'ordre des Actinomycetales (*Micrococcus* et *Kocuria*).

Pour la deuxième espèce végétale *L. spartum*, l'ensemble des bacilles à Gram négatif (fermentaires et non fermentaires) est dominant, soit 57,27 % des isolats. Pour le groupe des bacilles à Gram négatif fermentaires, cinq genres d'Enterobacterales ont été enregistrés ; *Pantoea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia* et *Serratia*. Pour le groupe des bacilles à Gram négatif non fermentaires, trois genres ont été comptés : *Pseudomonas* de l'ordre des Pseudomonadales, *Burkholderia* de l'ordre des Burkholderiales et *Methylobacterium* des Rhizobiales. Vient ensuite le groupe des coccobacilles (20 %) englobant trois genres ; *Acinetobacter* (Pseudomonadales), *Pasteurella* (Pasteurellales) et *Stenotrophomonas* (Xanthomonadales), suivi par les groupes des bacilles (11,81 %) et des cocci (10,90 %) à Gram positif ; le premier est représenté par deux genres des Bacillales (*Bacillus* et *Brevibacillus*) et le deuxième par deux genres des Actinomycetales (*Micrococcus*, *Kocuria*) et un genre de Bacillales (*Staphylococcus*).

D'après ces résultats, le nombre de genres d'endophytes isolés est relativement significatif, avec la prédominance des bacilles à Gram positif chez *H. pallidum* et des bacilles à Gram négatif chez *L. spartum*. De plus, les bactéries à Gram négatif sont plus diversifiées que les bactéries à Gram positif, et ce, pour les deux plantes. Par ailleurs, le statut qualitatif et

quantitatif de la flore bactérienne endophyte d'*H. pallidum* est plus important que celui de *L. spartum*. Ainsi, 148 souches bactériennes pures ont été isolées des tissus internes d'*H. pallidum* ; elles ont été classées en 18 genres différents. Cependant, 110 bactéries endophytes ont été mises en évidence à partir des racines de *L. spartum* et ont été rangées en 16 genres uniquement.

La présence de ces genres d'endophytes dans les racines d'*H. pallidum* et de *L. spartum*, laisse suggérer qu'il existait une certaine compatibilité ou sélection entre les endophytes identifiés et les deux plantes. D'après Kleopfer et Beauchamp (1992) et Clay (1993), la plante hôte exerce une pression sélective sur les bactéries endophytes, leur fournissant une niche compatible, par la production de certains métabolites secondaires (les sesquiterpènes, les flavonoïdes, les tanins et la résine) qui peuvent non seulement inhiber la croissance des endophytes dans leurs tissus, mais également limiter leur propagation, et même restreindre le nombre de taxons bactériens associés. Cette constatation peut être projetée sur nos résultats pour expliquer le fait que certains genres endophytes, tels que *Rhizobium* et *Escherichia*, sont particulièrement présents dans les racines d'*H. pallidum*.

Les genres *Staphylococcus* et *Serratia* sont isolés dans ce travail comme bactéries endophytes, alors que ce sont fondamentalement des bactéries pathogènes ; quelquefois, ils sont modifiés par mutation pour devenir des endophytes non-pathogènes. Plusieurs espèces du genre *Staphylococcus* ont été isolées des racines du niébé (*Vigna unguiculata*) (Marzan et al., 2018), du safran (*Crocus sativus*) (Sharma et al., 2015) et de *Trichilia elegans* Juss. (Rhoden et al., 2015). Ces dernières années, le genre *Serratia* a aussi été rapporté comme bactérie endophyte du cactus comestible (*Opuntia Milpa Alta*) (Li et al., 2011) et des pistachiers (*Pistacia atlantica* L.) (Etminani et Harighi, 2018).

Ces résultats montrent la richesse des systèmes racinaires des deux phytotaxons explorés par des endophytes bactériens. Ces microorganismes sont l'un des groupes les plus diversifiés, mais malheureusement inexplorés. En Algérie, une telle étude est réalisée pour la première fois. Elle apporte des informations importantes sur la biodiversité de cette flore endophytique qui peut éventuellement être appliquée dans le domaine d'agriculture, de médecine et de biotechnologie, et d'indiquer son potentiel technologique dans le contrôle des microorganismes pathogènes.

L'étude de la biodiversité des bactéries endophytes a été réalisée pour la première fois par Gardner et *al.* (1982) sur le xylème des racines du citron rugueux (*Citrus jambhiri*). 13 genres ont été isolés et identifiés ; les genres *Pseudomonas* et *Enterobacter* ont été les plus fréquents. Un résultat similaire a été obtenu par Hallmann et *al.* (1997). Ces auteurs ont constaté que la plupart des endophytes isolées des racines d'alfalfa (*Medicago sativa*) appartenaient au groupe des pseudomonas (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*) ou des entérobactéries (*Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*). Bacon et Hinton (1996) ont pour leur part décrit les *Pseudomonas* comme des endophytes largement répandus, souvent avec des effets promoteurs sur la croissance de leurs hôtes. Il est important de signaler qu'aucune spécificité bactérie-plante n'a été signalée.

Cette étude a révélé également que les racines d'*H. pallidum* Desf. et *L. spartum*, poussant sur des sols fortement contaminés par l'antimoine et l'arsenic, hébergent un groupe diversifié de bactéries endophytes qui pourraient jouer un rôle potentiel dans la tolérance de l'hôte végétal à des conditions stressantes telles que la pollution par les métalloïdes. Leur adaptation à de tels niveaux de métaux lourds peut indiquer leur rôle potentiel dans la remédiation des sites pollués.

4 Détermination des niveaux de résistance des isolats vis-à-vis du Sb et d'As

Les niveaux de résistance des isolats sont déterminés dans le but de sélectionner les souches résistantes /tolérantes à des teneurs élevées en antimoine et en arsenic. Pour cela, les concentrations minimales inhibitrices (CMI) sont déterminées afin d'évaluer leur capacité à lutter contre la toxicité des métalloïdes.

4.1 Choix du milieu de culture

Le niveau de tolérance de chaque isolat a été déterminé sur le milieu Luria Bertani (LB) modifié (solide et liquide) additionné de concentrations croissantes en Sb et en As. Cette manipulation permet de déterminer la CMI à partir de laquelle une souche bien définie ne peut plus se développer.

Après l'addition des métalloïdes au milieu gélosé, on a constaté leur précipitation. Cela suggère une plus faible biodisponibilité des ions métalliques dans un milieu gélifié que dans un milieu liquide. D'autre part, des tests de toxicité préliminaire ont révélé que les CMI des métaux en milieu liquide sont plus élevées qu'en milieu solide. Pour expliquer ces résultats,

deux hypothèses sont envisagées ; soit une partie des métaux forme des complexes chimiques avec les composants du milieu de culture solide (Ramamoorthy et Kushner, 1975), notamment ceux de l'agar, soit la gélification du milieu provoque une réduction importante de la diffusion des métaux, ce qui, dans les deux cas, les rendrait moins biodisponibles qu'en milieu liquide. Pour cela, le screening des différents isolats et leurs CMI vis-à-vis des deux métalloïdes sont effectués sur un milieu liquide.

Le milieu LB (**Annexe 1a**) est généralement utilisé dans de telles études. Comme la plupart des milieux riches, le LB contient du phosphate inorganique qui peut chélater ou précipiter les cations métalliques et les rendre ainsi moins biodisponibles pour la cellule bactérienne (Barkay et *al.*, 1997). Pour cela, le milieu LB est remplacé par le milieu LB modifié (**Annexe 1a**). Ce dernier permet d'assurer une bonne croissance bactérienne sans précipiter les ions métalliques, même à fortes doses. C'est un milieu qui contient de la peptone et du chlorure de sodium (NaCl) où l'extrait de levure est remplacé par le glucose. Tous ces constituants sont dissous dans un tampon citrate (50 mM et pH 7) avant autoclavage.

4.2 Seuil de tolérance aux métalloïdes étudiés

La détermination des CMI de chaque souche vis-à-vis des deux métalloïdes étudiés a montré que la sensibilité des souches bactériennes dépend du métal étudié ainsi que de sa concentration ; les valeurs des CMI varient grandement d'une souche à une autre. Cette étude montre également d'une part, la croissance bactérienne est inversement proportionnelle à la concentration du métal et d'autre part, chaque espèce possède son propre profil de résistance/tolérance.

Les valeurs des CMI ainsi obtenues pour l'antimoine et l'arsenic se situent respectivement entre 5 et 450 mM et entre 2,5 et 175 mM (**Figure 21**). Selon la littérature, les valeurs de la concentration minimale inhibitrice (CMI) indiquent le niveau de la résistance/tolérance ou la sensibilité d'un microorganisme vis-à-vis d'un élément toxique (Ansari et Malik, 2010). Par conséquent, la CMI d'un métal qui est suffisamment importante montre la faible toxicité du métal et on peut suggérer que le microorganisme est tolérant ou résistant à cet élément. Par contre, une valeur faible de la CMI désigne une toxicité élevée du métal et le microorganisme est considéré comme sensible aux effets toxiques du métal (Mishra et *al.*, 2014).

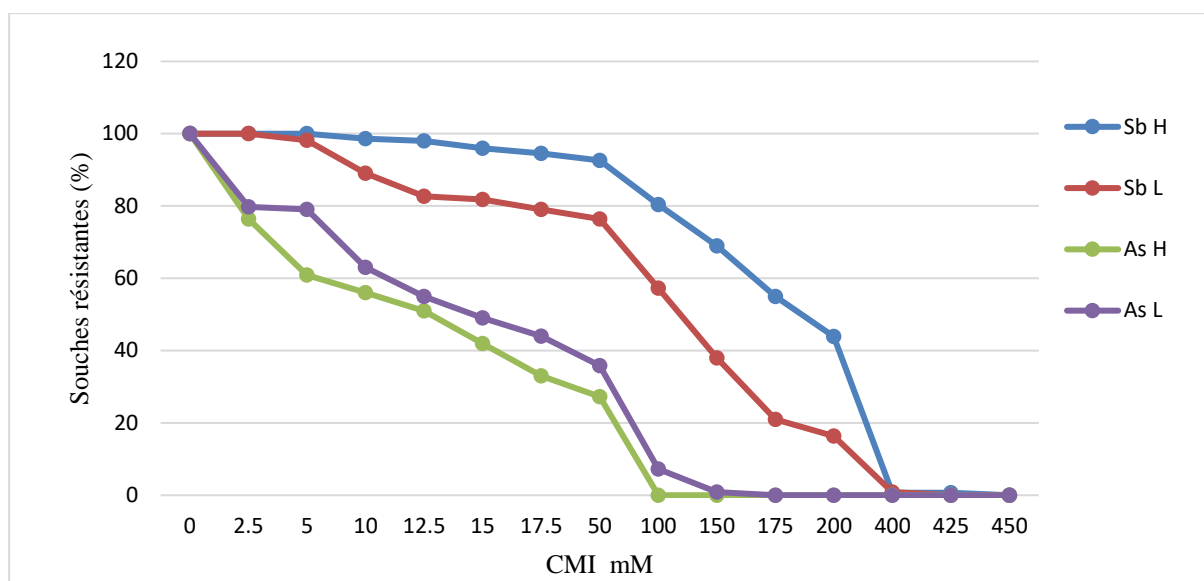


Figure 21: Abondance de bactéries endophytes résistantes à différentes concentrations d'antimoine (Sb) et d'arsenic (As), isolées des racines d'*H. pallidum* (H) et *L. spartum* (L)

4.2.1 Résistance des endophytes à l'antimoine

Selon la figure ci-dessus, et en tenant compte de la monorésistance à l'antimoine, la quasi-totalité de la communauté endophytique d'*H. pallidum* (100-93 %) croît jusqu'à la concentration de 50 mM ; contrairement à *L. spartum*, un pourcentage moins important des endophytes (100 à 76 %) a pu tolérer ces mêmes concentrations. Au-delà, une diminution progressive et très significative des isolats résistants est constatée ; seuls 44 % des isolats de d'*H. pallidum* et 16 % des isolats de *L. spartum* ont montré une résistance à 200 mM de Sb. Parmi ces isolats, **H6R1B Mc** est l'unique bactérie qui a poussé à 425 mM de Sb avec une CMI de 450 mM, soit 54792 ppm.

Ce résultat est largement supérieur à celui obtenu par Wang et *al.* (2015) qui ont isolé 125 souches à partir de sols miniers sur le milieu MDP supplémenté par Sb (III). Ces auteurs ont constaté que la souche *Arthrobacter* sp. LH11 a montré la plus grande résistance au Sb avec une CMI de 16 mM. Cependant, une étude menée au sein du Laboratoire de Biologie et Environnement (LBE), a montré qu'un mycoendophyte isolé à partir des racines d'*H. pallidum* Desf. présentait une CMI de 500 mM pour ce même métalloïde (Meghnous et *al.*, 2019). Il est important de signaler, que très peu de travaux ont été menés sur l'étude de la toxicité de l'antimoine vis-à-vis des bactéries, c'est pour cela que nous n'avons pas trop comparé les CMI obtenues avec celles de la littérature.

4.2.2 Résistance des endophytes à l'arsenic

L'addition de concentrations graduelles en As dans le milieu de culture a montré que les isolats des racines d'*H. pallidum* étaient plus sensibles à ce métalloïde que les isolats des racines de *L. spartum* et qu'ils présentaient les CMI les plus basses. En effet, de 80 à 36 % des isolats de *L. spartum* sont capables de tolérer de 2,5 à 50 mM d'As alors que 76 à 27 % des isolats d'*H. pallidum* ont pu résister à de telles concentrations. De plus, 100 mM représente une dose létale pour tous les isolats d'*H. pallidum*, mais elle n'a aucun effet sur la croissance de 7 % des isolats de *L. spartum*. L'augmentation de la concentration en As dans le milieu de culture a montré que la souche **L6R2B Mc** a pu se développer à une dose supérieure à 150 mM de ce métalloïde et a montré une CMI de 175 mM, soit 13111,28 ppm.

Des tests de toxicité de l'arsenic sur des bactéries endophytes isolées des racines de *Pteris vittata* ont révélé que la souche *Citrobacter* sp. RPT a présenté la plus haute CMI de 400 mg/L d'As, soit 5,34 mM (Selvankumar et al., 2017). Les travaux de Mukherjee et al. (2018) ont mis en évidence sept bactéries endophytes de *Lantana camara* tolérantes à 4000 ppm d'arsenic, soit 53,34 mM, dont trois sont affiliées à *Kocuria* sp, trois à *Enterobacter* sp et une à *Kosakonia*.

Les valeurs des CMI de nos isolats sont largement supérieures à ceux des bactéries isolées des sols contaminés par l'arsenic ; c'est le cas de *Microbacterium* qui a indiqué une résistance jusqu'à 30 mM d'As (III) ; les genres *Arthrobacter* sp. et *Alcaligenes* sp, ont résisté à 70 mM d'As (III) (Bachate et al., 2009). Par ailleurs, les travaux de Das et al. (2014) ont isolé douze bactéries résistantes à l'As ; l'isolat ASR1 avait les plus hautes CMI de 30 mM pour l'As (III). De même, Abbas et al. (2014) ont rapporté une CMI de 300 mg/L d'As (III), i.e. 4 mM, pour *Enterobacter* sp. et *Klebsiella pneumoniae*1 et de 370 mg/L, i.e. 4.94 mM, pour *Klebsiella pneumoniae*2.

Toutefois, l'hétérogénéité des valeurs des CMI rapportée par la bibliographie reflète la diversité des paramètres intervenant lors des études. Ces paramètres peuvent être expliqués par le comportement des bactéries étudiées, qui diffère d'une espèce à une autre, par le type de milieu de culture utilisé (liquide ou solide) et sa constitution en matière organique et en phosphate, par la nature chimique du sel métallique utilisé et enfin par la méthode utilisée pour déterminer le niveau de résistance dans chaque étude (en utilisant des disques ou par

incorporation). Tous ces paramètres peuvent modifier la biodisponibilité et par conséquent, la toxicité des métaux testés.

Les résultats des tests de toxicité montrent que quelle que soit l'origine des isolats, d'*H. pallidum* ou de *L. spartum*, d'une part, leur résistance est très variable vis-à-vis des métalloïdes testés et les CMI's varient grandement d'un isolat à l'autre et d'autre part, les CMI's de l'antimoine sont supérieures à celles de l'arsenic chez la plupart des souches. Par conséquent, l'antimoine est beaucoup moins toxique pour ces endophytes bactériens que l'arsenic. Donc, cela indique que *H. pallidum* et *L. spartum*, poussant sur des sols riches en antimoine et en arsenic, abritent des bactéries endophytes résistantes à ces deux polluants et aux stress environnementaux induits par ces derniers.

Ces résultats sont confirmés par Arivalagan et al. (2014) qui ont montré que les microorganismes pouvaient s'adapter aux conditions extrêmes pour leur survie, notamment dans des endroits contaminés par les métaux lourds. Rajkumar et al. (2010) ont indiqué pour leur part que les bactéries isolées des milieux contaminés avaient une résistance plus élevée aux métaux lourds que les isolats des zones non contaminées. Par ailleurs, la présence de bactéries endophytes résistantes aux métaux a été rapportée dans les racines des plantes poussant sur des sols contaminés par les mêmes polluants (Rajkumar et al., 2009 ; Guo et al., 2010 ; Zubair et al., 2016, Abdelkrim et al., 2019 ; Abedinzadeh et al., 2019).

D'une manière générale, on remarque que les endophytes isolés des racines d'*H. pallidum* exhibent une meilleure tolérance à l'antimoine (CMI jusqu'à 450 mM Sb) que les endophytes isolés des racines de *L. spartum* (CMI jusqu'à 200 mM Sb) ; par contre, les isolats qui ont les plus hautes CMI's d'As proviennent des racines de *L. spartum* (CMI jusqu'à 175 mM As) contrairement à ceux qui sont isolés des racines d'*H. pallidum* (CMI jusqu'à 100 mM As). Cette différence de sensibilité des souches testées vis-à-vis de Sb et d'As peut être attribuée à la pollution du sol d'origine par ces métalloïdes (62000 ± 4924 mg/kg d'antimoine et 2300 ± 186 mg/kg d'arsenic) et à leur accumulation par les tissus racinaires des deux plantes. Pour rappel, *H. pallidum* est une plante qui accumule plus d'antimoine que d'arsenic (jusqu'à 182,94 ppm de Sb et 116,74 ppm d'As) contrairement à *L. spartum* qui accumule plus d'arsenic que d'antimoine (jusqu'à 126,18 ppm de Sb et 611,01 ppm d'As) (Benhamdi et al., 2014). Par conséquent, ces bactéries sont adaptées aux conditions de leurs hôtes ; elles ont donc développé des systèmes de résistance à ces métalloïdes (Achour-Rokbani, 2008 ; Cardoso et al., 2018).

D'autre part, les progrès des recherches sur les interactions plantes-bactéries ont montré que les plantes sont capables de sélectionner leur propre microbiote rhizosphérique et endophytique (Pieterse et *al.*, 2014) ; par conséquent, les plantes soumises à diverses contraintes environnementales, y compris les métaux lourds, hébergent des bactéries résistantes au stress et contribuent à l'établissement de leurs hôtes dans de telles conditions (Hardoim et *al.*, 2008).

5 Identification des souches résistantes

Les souches montrant les CMI les plus élevées, à savoir 450 mM pour Sb et 175 mM pour As, sont considérées comme potentiellement résistantes à ces métalloïdes, elles sont donc soumises à une identification moléculaire *via* le séquençage du gène codant pour l'ARN16S. Il est important de signaler que tous les endophytes isolés des racines d'*H. pallidum* et *L. spartum* ont été identifiés en se basant sur les caractères morphologiques, macro et microscopiques, ainsi que des tests biochimiques (cf. 4.2.3).

5.1 Caractérisation phénotypique

Les deux souches résistantes ont été isolées et purifiées sur la gélose Mac Conkey. Après 24 h d'incubation, les colonies étaient de couleur rose à rouge, lisses et brillantes de forme ronde et convexe. De plus, elles ne différaient que par leur taille, où les colonies de la souche résistante à l'antimoine (**H6R1B Mc**) étaient plus grandes par rapport à celles de la souche résistante à l'arsenic (**L6R2B Mc**) (**Figure 22**). La coloration de Gram et l'examen microscopique révèlent que les deux souches sont des bacilles à Gram négatif (**Figure 23**).

L'utilisation du milieu Viande-Foie (VF) a révélé que les souches sélectionnées parviennent à se développer tout au long du tube ; ce sont donc des bactéries aérobies-anaérobies facultatives (**Figure 24VF**). De plus, l'utilisation du milieu Hugh et Leifson, additionné du glucose a montré que ces souches peuvent métaboliser le glucose soit par oxydation, soit par fermentation et elles sont considérées comme mobiles (**Figure 24HL**). En outre, le test d'oxydase révèle que les deux isolats sont des oxydases négatives.

Selon les données bibliographiques, les bacilles à Gram négatif, anaérobies facultatifs, oxydase négative et catalase positive, appartiennent à la famille des Enterobacteriaceae. Elles possèdent un flagelle péritriche qui leur permet de se déplacer en faisceau en forme d'hélice (Van Houdt et *al.*, 2007).

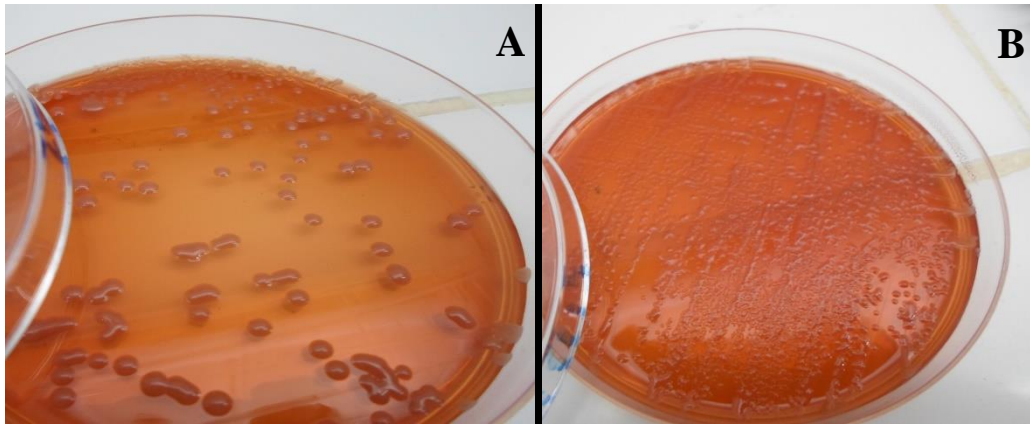


Figure 22 : Photos de la souche H6R1B Mc résistante à l'antimoine (A) et de la souche L6R2B Mc résistante à l'arsenic (B) sur la gélose Mac Conckey

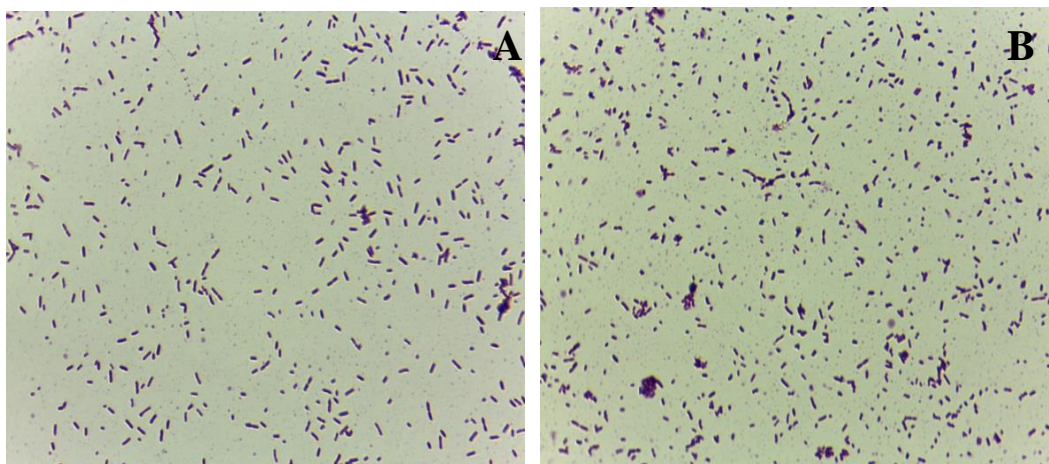


Figure 23 : Observation microscopique (G x 100) de la souche H6R1B Mc (A) et de la souche L6R2B Mc (B), après coloration de Gram

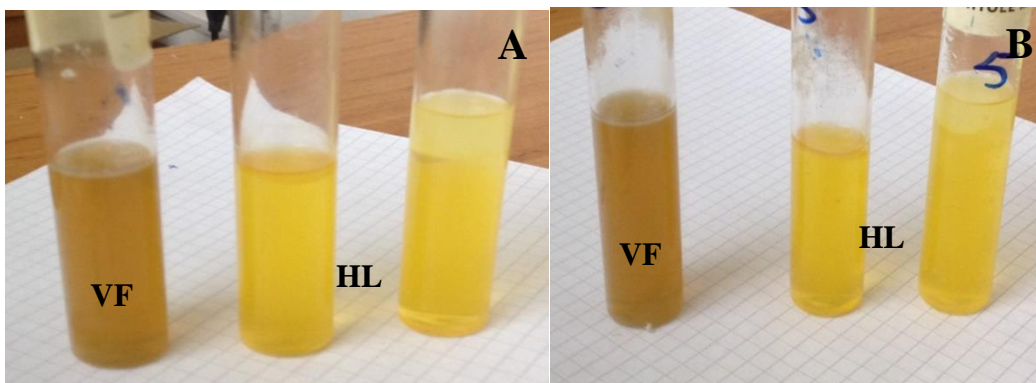


Figure 24 : Résultat du type respiratoire (VF) et de la voie de métabolisme glucidique (HL) de la souche H6R1B Mc (A) et de la souche L6R2B Mc (B)

L'identification des isolats est complétée par l'utilisation des galeries API-20E. Les tests biochimiques de chaque souche sont portés dans la figure 25.



Figure 25 : Résultats des tests biochimiques sur des Galeries API 20E de la souche H6R1B Mc (A) et de la souche L6R2B Mc (B)

L'incubation à 30°C pendant 24h d'une jeune suspension de chacune des deux souches sur les galeries API 20E, a montré des similarités des réponses à la réaction de Voges-Proskauer VP (+), à la production d'indole (-), d'H₂S (-) et de gélatinase (+) ; et des dissimilitudes des réponses à l'uréase, l'ONPG et au métabolisme de quelques sucres. Les résultats de chaque souche sont introduits dans une matrice d'identification qui donne le degré de compatibilité avec des souches répertoriées. D'après ces tests, les deux souches sélectionnées, **H6R1B Mc** et **L6R2B Mc**, appartiennent à l'espèce *Serratia marcescens*. En effet, la souche **H6R1B Mc** résistante à Sb correspond parfaitement au profil numérique de *S. marcescens* avec une excellente identification qui présente un taux d'analogie de 99 %. Par ailleurs, la souche **L6R2B Mc** résistante à l'As, a présenté un pourcentage de certitude plus faible (91 %), cela est dû à un résultat négatif pour la réaction d'ONPG (-) et positif pour l'uréase (+).

De plus, les deux isolats sont producteurs d'un pigment d'une couleur rouge à rose, ce qui est une caractéristique physiologique particulière de *Serratia marcescens*. Ce pigment est appelé la prodiginine (Grimont et Grimont, 2006). C'est un métabolite secondaire dont l'intensité de sa couleur dépend de l'âge des colonies (Anuradha et al., 2004). Il existe cinq formes de ce métabolite, dont la prodigiosine est la forme la plus produite par les isolats environnementaux et qui possède des propriétés antibiotiques (Van Houdt et al., 2007 ; Lapenda et al., 2015).

5.2 Caractérisation moléculaire

Pour compléter l'identification des deux endophytes résistants aux métalloïdes, on a fait appel à l'outil moléculaire. Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude est le gène ribosomal 16S. C'est un gène omniprésent chez toutes les espèces bactériennes. Sa vitesse

d'évolution est relativement constante par rapport au reste du génome bactérien, car il contient des régions très conservées (**Figure 26**) (Fox et *al.*, 1980 ; Vandamme et *al.*, 1996). De plus, c'est le marqueur le plus représenté dans les banques de données. De ce fait, ce gène peut servir pour suivre l'évolution bactérienne, et son amplification, suivie du séquençage, permettra d'affilier des souches bactériennes inconnues à un groupe bactérien connu.

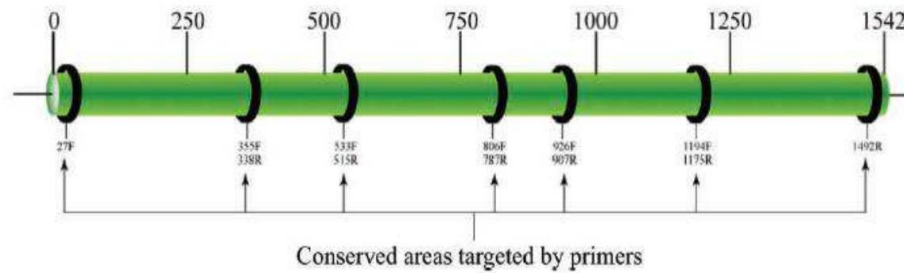


Figure 26 : Représentation schématique du gène codant pour l'ARNr 16S. Les cercles représentent les régions conservées utilisées pour désigner les amorces nécessaires à l'amplification et au séquençage. Dans notre cas, les amorces utilisées sont (fD1 et rP2) (Petti, 2007).

Pour l'identification des deux souches bactériennes monorésistantes aux deux métalloïdes étudiés, on a procédé à l'extraction de leur ADN génomique en utilisant le kit Wizard® Genomic DNA Purification. L'efficacité de l'extraction était vérifiée sur un gel d'agarose à 0,8 %, et le résultat obtenu est illustré dans la figure 27. Cette dernière montre que la méthode d'extraction utilisée a donné de très bonnes quantités et qualités de l'extrait d'ADN génomique des deux souches.

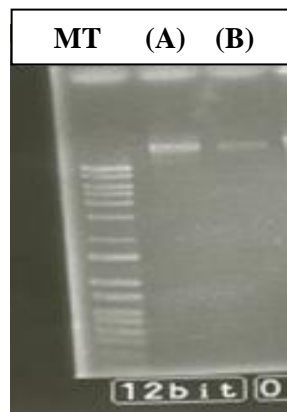


Figure 27 : Profil électrophorétique, sur le gel d'agarose 0,8 %, de l'ADN génomique des bactéries endophytes monorésistantes à l'antimoine et à l'arsenic
MT : marqueurs de poids moléculaire ; **(A)** : l'isolat H6R1B Mc ; **(B)** : l'isolat L6R2B Mc

L'amplification du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S est réalisée à partir de l'ADN génomique des isolats. En effet, les électrophorégrammes des produits d'amplification

sur gel d'agarose 0,8 % en présence de BET et sous lumière UV, ont donné une bande d'ADN de taille 1,5 kpb pour chacune des souches étudiées (**Figure 28**).

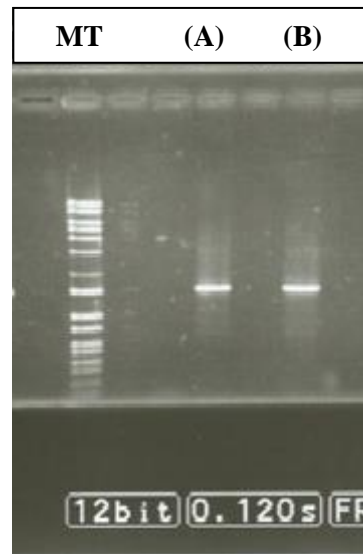


Figure 28 : Produits d'amplification du gène 16S ribosomique des bactéries, monorésistantes à l'antimoine et à l'arsenic, sur le gel d'agarose 0,8 %
 MT : marqueurs de poids moléculaire ; (A) : l'isolat H6R1B Mc ; (B) : l'isolat L6R2B Mc

Après le séquençage des amplifiants des isolats **H6R1B Mc** et **L6R2B Mc**, les séquences obtenues (**Annexe 4a**) sont comparées à celles rapportées dans la banque de données *GenBank* ; elles dévoilent que les deux souches sont complètement identiques et qu'elles sont affiliées à l'espèce *Serratia marcescens* (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Affiliation phylogénétique des endophytes H6R1B Mc et L6R2B Mc

Description	IdentI	Accession
<i>S. marcescens</i> strain NBRC 102204	99,00%	NR_114043.1
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>sakuensis</i> strain KRED	99,00%	NR_036886.1
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880 strain DSM 30121	99,00%	NR_041980.1
<i>S. marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i> ATCC 13880 strain JCM 1239	98,84%	NR_113236.1
<i>S. nematodiphila</i> DZ0503SBS1	98,67%	NR_044385.1
<i>Cronobacter condimentii</i> 1330	97,33%	NR_116999.1

L'étude phylogénétique des séquences obtenues réalisée par le programme MEGA version 7 (Kumar et al., 2016) a permis de construire l'arbre phylogénétique en utilisant l'algorithme Neighbor-Joining selon le modèle *p*-distance (Saitou et Nei, 1987) (**Figure 29**). Le dendrogramme ainsi obtenu est construit de deux grands clades, et toutes les espèces du genre *Serratia* sont rassemblées dans le même groupe et elles sont distinctes des autres Enterobacteriaceae (*Cronobacter condimentii* 1330).

De plus, les deux souches endophytiques étudiées occupent une ligne phylogénétique commune et elles sont placées dans la même branche avec leurs souches apparentées ; il en ressort qu'elles sont affiliées au genre *Serratia*. Cette évaluation phylogénétique a permis également de les identifier jusqu'au stade de l'espèce où elles sont regroupées en un seul taxon, *Serratia marcescens*, avec lequel elles partagent une homologie de 99 %. En effet, cette analyse phylogénétique montre une bonne cohérence entre l'identification phénotypique et génotypique. Les séquences des deux souches, **H6R1B Mc** et **L6R2B Mc**, ont été enregistrées au niveau de *Genbank* sous les numéros d'accèsion : **MN535229.1** et **MN534323.1** (Annexe 4b).

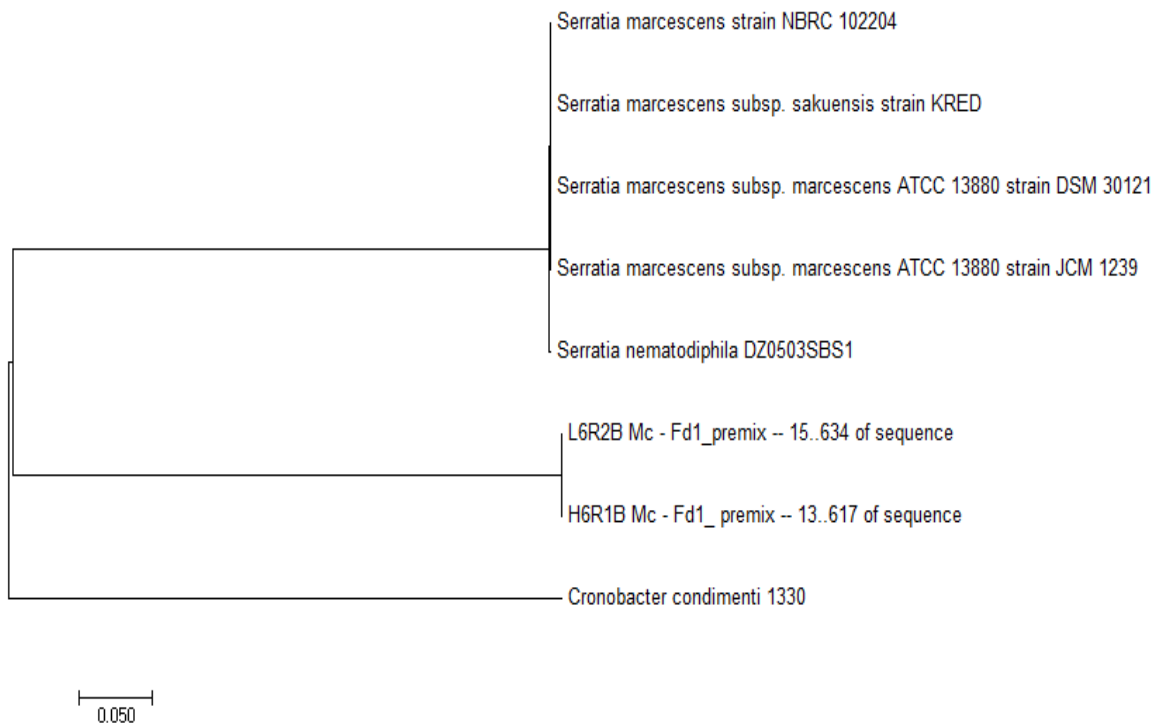


Figure 29 : Arbre phylogénétique selon la méthode de *p*-distances (Neighbor-Joining) construit d'après l'analyse des séquences d'ADNr 16S en utilisant le logiciel Mega version 7 montrant la position phylogénétique des deux endophytes. 0,05 représentent le nombre de substitutions par position de nucléotide.

Il est important de noter que même si les résultats d'identification des isolats sont les mêmes, ces derniers diffèrent par l'aspect macroscopique de leurs colonies sur le Mac Conkey ; d'ailleurs, l'isolat résistant à l'arsenic, **L6R2B Mc** (*Serratia marcescens* (As)), donne des petites colonies tandis que la souche résistante à l'antimoine, **H6R1B Mc** (*Serratia marcescens* (Sb)), présente de grandes colonies. De plus, chaque bactérie est résistante à un des deux métalloïdes.

Dans cette partie du travail, deux endophytes bactériens ont été isolés, chacun est monorésistant à l'Sb et à l'As. L'isolement est effectué à partir de racines saines d'*H. pallidum* et de *L. spartum*. Les tests macroscopiques, microscopiques, biochimiques et moléculaires révèlent que les deux souches sont identifiées comme *S. marcescens*.

Généralement, cette espèce est connue comme un opportuniste pour l'homme (Hejazi et Falkiner, 1997), une espèce pathogène pour les plantes (Rascoe et al., 2003) et les insectes (Hejazi et Falkiner, 1997) ; elle est également reconnue comme une rhizobactérie favorisant la croissance de son hôte (Selvakumar et al., 2008) ou un agent de biocontrôle (Roberts et al., 2007) ou un endophyte (Tan et al., 2001 ; Zaheer et al., 2016 ; Yan et al., 2018). Les résultats d'examens des différences entre les souches de *S. marcescens* isolées des plantes et celles des êtres humains ou des animaux ont indiqué qu'il n'y avait aucune différence significative entre les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des différents isolats (Khan et al., 2017).

L'isolement de *S. marcescens* à partir d'autres phytotaxons a été rapporté dans la littérature. En effet, plusieurs auteurs ont isolé des espèces de *Serratia* à partir des tissus internes sains de diverses plantes comme le coton (*Gossypium hirsutum*), le maïs (*Zea mays*) (McInroy et Kloepper, 1995), les concombres (*Cucumis sativus* L.) (Liu et al., 1995), le bétel (*Piper betel* L.) (Lavania et al., 2006), les fleurs de courges d'été (*Cucurbita pepo*) (Selvakumar et al., 2008), le cactus (*Opuntia Milpa Alta*) (Li et al., 2011), l'herbe d'Eugène (*Achyranthes aspera* L.) et le pois chiche (*Cicer arietinum*) (Zaheer et al., 2016), ainsi que la rhizosphère et les graines du riz (*Oryza sativa*) (Mukhopadhyay et al., 1996 ; Gyaneshwar et al., 2001).

Plusieurs espèces de ce genre ont été également qualifiées comme endophytes. D'ailleurs, les travaux de Purushotham et al. (2012) ont montré que l'espèce *S. proteamaculans* favorisait la croissance de son hôte en produisant des oligosaccharides spécifiques comme la lipochitine. Luo et al. (2011) ont également montré, que l'endophyte *S. nematodiphila* LRE07 était capable de solubiliser le phosphate et était producteur d'IAA et de sidérophores. De même, *S. plymuthica* est une rhizobactérie qui améliore la croissance de sa plante hôte (Weise et al., 2014) ; c'est une bactérie antagoniste des bactéries phytopathogènes, car elle produit une large gamme de composés antimicrobiens (De Vleeschauwer et Höfte, 2003). Ces données peuvent justifier la présence de cette espèce comme endophyte des racines d'*H. pallidum* et de *L. spartum* et sa tolérance de concentrations très élevées en métalloïdes tels que Sb et As.

Des méthodes génétiques ont été utilisées pour étudier le génome de plusieurs PGPR appartenant au genre *Serratia* isolés comme endophytes. Ces études ont révélé que la plupart de ces isolats présentaient une tolérance aux métaux lourds et avaient des effets de phytoremédiation sur leurs plantes hôtes (Luo et *al.*, 2011 ; Ryu et *al.*, 2013 ; Khan et *al.*, 2015 ; Khan et *al.*, 2017).

6 Étude du stress oxydatif induit par les métalloïdes chez les endophytes résistants

Dans cette partie du travail, l'ensemble des manifestations biochimiques qui régissent le stress oxydatif induit par le Sb et l'As ont été étudiés. Pour cela, on a déterminé la quantité du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), la teneur en malondialdéhyde (MDA) et en proline, ainsi que les activités spécifiques des enzymes antioxydantes à savoir : la catalase (CAT), la peroxydase (POD), l'ascorbate peroxydase (APX) et la superoxyde dismutase (SOD) chez *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As).

Il a été largement rapporté que le pH influençait grandement la toxicité des métaux lourds en modifiant leur spéciation. Il affecte également la croissance bactérienne et l'expression de certains gènes (Worden *al.*, 2009). Pour cela, le suivi des variations du pH du milieu de culture était important pendant cette étude.

6.1 Effet des métalloïdes sur le pH du milieu de culture

Les valeurs du pH des milieux supplémentés par différentes concentrations de Sb et d'As, séparément, avant et après 24 h de culture en *batch*, pour les deux souches résistantes aux métalloïdes sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Valeurs du pH du milieu de culture avant et après 24 h d'incubation de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) dans le milieu LB modifié, en présence de concentrations graduelles en Sb et en As

Concentration des métalloïdes (mM)	pH initial du milieu de culture		pH final du milieu résiduel	
	Sb	As	Sb	As
C0	6,88	6,88	6,50 ± 0,000 a	6,25 ± 0,05 a
C1	6,90	7,69	6,62 ± 0,088 a	7,35 ± 0,02 b
C2	6,85	8,27	6,60 ± 0,088 a	7,62 ± 0,06 d
C3	6,87	8,68	6,55 ± 0,050 a	7,75 ± 0,01 cd
C4	6,83	8,90	6,53 ± 0,020 a	7,84 ± 0,07 c

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± SEM. Les lettres représentent les différences statistiques entre les différentes concentrations de chaque métal pour chaque souche en utilisant l'ANOVA suivie par le test de Tukey, $p < 0,05$.

D'après le tableau 5, l'addition graduelle d'antimoine (SbIII) au milieu ne provoque aucune modification significative du pH. Cependant, l'ajout de concentrations croissantes d'arsenic (AsIII) provoque une alcalinisation significative ; le pH du milieu de culture de la plus grande concentration en As est de 8,90, alors que celui du contrôle négatif est de 6,88. Selon ce même tableau, il ressort qu'après 24 h d'incubation à 30 °C en présence de Sb, les valeurs du pH sont identiques à celles du témoin, mais elles sont relativement inférieures à celles des milieux initiaux. Cependant, une augmentation progressive et significative du pH par rapport au témoin est constatée dans les milieux de fermentation contenant des concentrations graduelles en arsenic, mais il demeure toujours inférieur à celui du milieu avant fermentation.

Durant ces manipulations, on a utilisé le milieu LB modifié et tamponné qui nous a permis de maintenir un pH presque constant et favorable à la croissance bactérienne, après l'addition des solutions métalliques et tout au long de la culture. Il a permis également d'éviter la précipitation des métalloïdes, et de générer un stress oxydatif chez ces bactéries, lié aux variations de pH.

Les études de Franklin *et al.* (2000) et de Sandrin et Maier (2002) ont montré que le pH influence la solubilité des métaux. En effet, ils ont rapporté qu'à pH acide, il s'établit une compétition entre les protons et les ions métalliques à des surfaces chargées négativement, ce qui augmente la précipitation des métaux et, par conséquent, réduit leur biodisponibilité, et même leur toxicité.

6.2 Effet des métalloïdes sur la croissance bactérienne

L'effet de Sb et d'As sur la croissance de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) a été étudié, en culture submergée, en fonction de concentrations croissantes et non létales de ces éléments. Afin de normaliser les résultats, la valeur de l'absorbance mesurée sur le milieu de culture du témoin (C_0) est prise comme référence (100 %) ; tandis que la croissance en présence de métalloïdes est exprimée en pourcentage par référence à la croissance du témoin. Les résultats obtenus sont donnés dans la figure 30.

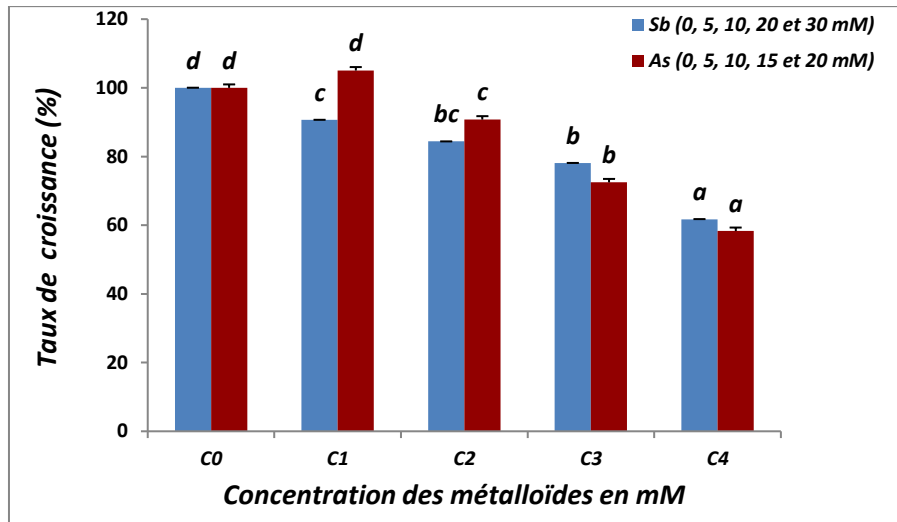


Figure 30 : Taux de croissance de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture

Les concentrations (C0, C1, C2, C3 et C4) sont indiquées en fonction de l'augmentation graduelle de Sb et d'As, dont C0 est considérée comme témoin. Les taux de croissance sont exprimés par des moyennes \pm SEM. Les lettres représentent les différences statistiques entre les différentes concentrations de chaque métal, séparément, pour chaque souche en utilisant l'ANOVA suivie par le test de Tukey, $p < 0,05$.

L'étude des histogrammes portés par cette figure montre qu'il y a une diminution progressive du taux de croissance avec l'augmentation de la concentration du métal dans le milieu, sauf à 5 mM d'As où on observe une légère augmentation. Selon les résultats de ce test, aux concentrations de 5, 10, 20 et 30 mM de Sb, on constate que l'antimoine a provoqué des réductions d'environ 9%, 15 %, 21% et 38% respectivement du taux de croissance de *S. marcescens* (Sb). Dans le cas de *Serratia marcescens* (As), on observe une diminution progressive et significative de la croissance à partir de 10 mM d'As. Cette diminution correspond à 9,24 %, 27,52 % et 41,7 % pour des concentrations d'As de 10, 15 et 20 mM, respectivement.

Les corrélations de *Pearson* entre la concentration des métalloïdes (Sb et As) et tous les biomarqueurs de toxicité des deux souches de *S. marcescens* sont présentées dans les tableaux 6 et 7 (**Annexe 5**). Elles montrent une corrélation négative particulièrement élevée et très significative entre le taux de croissance des endophytes tests et la teneur en Sb ($r = -0,97$, $p < 10^{-3}$) et en As ($r = -0,93$, $p < 10^{-3}$). Une telle corrélation fait ressortir l'effet toxique des métalloïdes sur les mécanismes physiologiques des deux souches.

La réduction de la croissance de *S. marcescens* est due à la toxicité des métalloïdes étudiés. Ce phénomène s'explique par la diminution du nombre de cellules bactériennes

viables suite à une modification des mécanismes physiologiques de la souche. En effet, les doses métalliques sublétales induisent chez les bactéries des modifications morphologiques (Boularbah et *al.*, 1993 ; Gauthier et *al.*, 2014), une inhibition de la respiration, une réduction de la biosynthèse des protéines et des acides nucléiques et/ou une altération de l'activité de certaines enzymes (Boularbah et *al.*, 1993 ; Igiri et *al.*, 2018). De plus, Bahar et *al.* (2013), Siripornadulsil et Siripornadulsil (2013), Chakraborty et *al.* (2014) et Nunes et *al.* (2018) ont déduit que la fixation des ions métalliques sur la membrane induisait une perturbation dans la perméabilité membranaire de la cellule bactérienne et par conséquent, une perte importante de nutriments essentiels à la croissance bactérienne.

Par ailleurs, les études de Caffrey et Feigenson (1984) ont montré que les ions du cadmium modifiaient la fluidité membranaire des bactéries. De plus, de nombreuses activités enzymatiques telles que la phosphatase alcaline (Srivastava et *al.*, 1981), la β -galactosidase et les déshydrogénases (Cenci et *al.*, 1985 ; Katayama-Hirayama, 1986) sont modifiées en présence de ce métal. Chez *E. coli*, plusieurs auteurs ont observé une inhibition de la synthèse d'ARN, et même la réplication ou /et la transcription de l'ADN seraient plus sensibles au cadmium (Blundell et Wild, 1969). Et encore, Mitra et Bernstein (1977) ont observé des ruptures au niveau d'un simple brin dans l'ADN d'*E. coli* exposée aux ions Cd^{2+} .

La réduction du taux de croissance des bactéries exposées aux métaux lourds était rapportée par plusieurs auteurs. C'est le cas de Yilmaz (2003) qui a constaté une réduction de la croissance de la souche *Bacillus circulans* EB1 cultivée en présence de différentes doses de $CdCl_2$. Siripornadulsil et Siripornadulsil (2013) ont également signalé que les bactéries étudiées avaient une croissance rapide avec une phase de latence plus courte en absence de $CdCl_2$ qu'en présence de ce produit toxique. De même, Govarthanan et *al.* (2015) ont rapporté une diminution du taux de croissance d'*Herbaspirillum* sp. GW103 en présence d'arsenic. De plus, Selvankumar et *al.* (2017) ont révélé que le taux de croissance du *Citrobacter* sp. RPT, endophyte des racines de *Pteris vittata*, diminuait avec l'augmentation de la concentration d'As dans le bouillon LB.

6.3 Effet des métalloïdes sur la teneur intracellulaire en peroxyde d'hydrogène

La figure 31 résume les variations des teneurs en H_2O_2 dans les biomasses des souches de *S. marcescens* en fonction de la concentration en Sb et en As. On constate que les teneurs intracellulaires en H_2O_2 des deux souches présentaient globalement la même variation. En

effet, on observe une augmentation significative à 5 et 10 mM de Sb et d'As. Ces teneurs dépassent celles des témoins de 23 % et 46 % et de 18 % et 158 %, respectivement. À 30 mM de Sb et 20 mM d'As, elles présentent une augmentation très importante, atteignant respectivement, 345 % et 223 % par rapport aux témoins.

Par ailleurs, on remarque qu'aux hautes concentrations en métalloïdes, la quantité de peroxyde d'hydrogène dans la biomasse de *S. marcescens* (Sb) est nettement supérieure à celle mesurée dans la biomasse de *S. marcescens* (As).

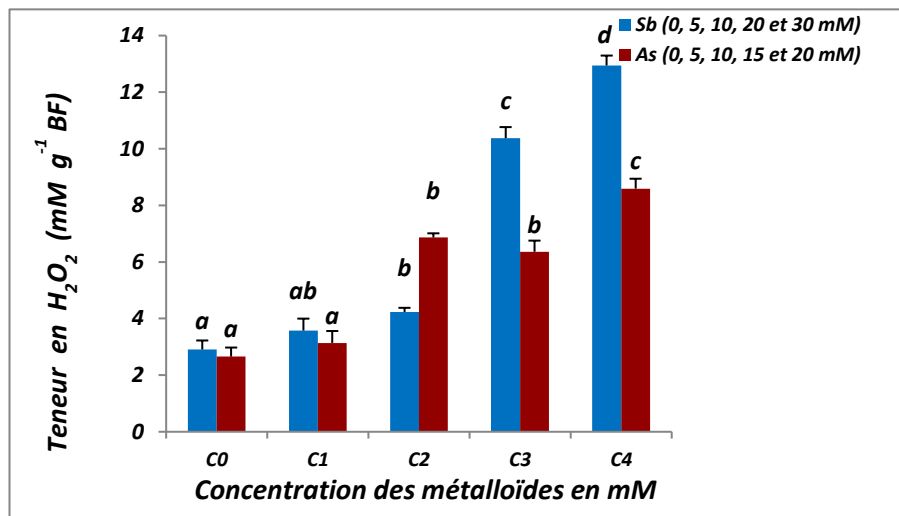


Figure 31 : Teneur intracellulaire en H₂O₂ dans la biomasse fraîche (BF) de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture

La comparaison des variations des taux de croissance (**Figure 30**) et celles des teneurs en H₂O₂ intracellulaire des deux souches (**Figure 31**) montre que ces deux paramètres progressent en sens inverse. En effet, l'analyse de la matrice de *Pearson* montre que les teneurs en H₂O₂ intracellulaires étaient corrélées très significativement et positivement aux concentrations en Sb ($r = 0,97, p < 10^{-3}$) et en As ($r = 0,92, p < 10^{-3}$) des milieux de culture, mais elles sont corrélées négativement et très significativement ($p < 10^{-3}$) au taux de croissance des souches testées (**Tableaux 6 et 7 en annexe 5**). Ce résultat montre que l'addition de doses croissantes des métalloïdes augmente la teneur en H₂O₂ intracellulaire.

Le peroxyde d'hydrogène est une espèce oxygénée active relativement stable et, contrairement aux autres radicaux d'oxygène, il ne possède pas d'électrons non appariés. C'est un oxydant fort, même à de faibles concentrations ; pour cela, il est souvent considéré comme un indicateur de stress (Sharma et al., 2012). Par ailleurs, Foyer et al. (1997) ont

dévoilé que le peroxyde d'hydrogène pouvait diffuser à travers les aquaporines membranaires et conduire à la formation de radicaux libres loin de son lieu de formation. À ce niveau, il peut causer des dommages oxydatifs de la bicouche lipidique de la membrane cellulaire par la peroxydation des acides gras polyinsaturés et, par conséquent, la perturbation de la fonction métabolique et la perte de l'intégrité cellulaire. Il présente également une réactivité spécifique vis-à-vis de certains résidus cystéine et méthionine des protéines qui peuvent être oxydés ; ce qui inactive toute enzyme contenant ces résidus (Velikova et *al.*, 2000 ; Sharma et *al.*, 2012, Shahid et *al.*, 2014). De tels dommages entraînent forcément la diminution de la croissance, ce qui est mis en évidence par la corrélation négative et très significative ($p < 10^{-3}$) entre les teneurs en H₂O₂ et le taux de croissance de *S. marcescens*.

La concentration intracellulaire en peroxyde d'hydrogène n'est pas nulle, même en absence de toute contamination métallique (0 mM Sb et 0 mM As). Car celui-ci peut être généré en continu par réduction séquentielle de l'oxygène moléculaire (O₂) par les enzymes de la chaîne respiratoire associés à la membrane afin d'obtenir de l'énergie (Cabiscol et *al.*, 2000), comme il peut provenir de la réaction de dismutation de l'anion superoxyde par la SOD (Mishra et *al.*, 2006 ; Sharma et *al.*, 2012). Donc, sa concentration est finement contrôlée par un système de régulation qui maintient ses niveaux intracellulaires, ce qui lui permet d'accomplir son rôle dans les mécanismes de signalisation cellulaire et l'homéostasie redox (Finkel, 2003 ; Scandalios, 2005).

L'augmentation significative des teneurs en H₂O₂ en fonction des concentrations graduelles en Sb et en As et leurs corrélations positives et très significatives, montrent que l'addition de doses croissantes de ces éléments stimulait la production d'H₂O₂ et augmentait son accumulation intracellulaire. Cela s'explique par une réponse antioxydante de *S. marcescens* qui se traduit par la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), dont le H₂O₂, suite à son exposition à ces métaux. On peut supposer que l'augmentation des niveaux intracellulaires d'H₂O₂ enregistrée chez les souches étudiées est due à la réduction de l'activité de la catalase (CAT) et des peroxydases (POD et APX) responsables de l'élimination d'H₂O₂, ce qui a conduit à son accumulation et donc, à un déséquilibre oxydant. La réduction de l'activité de ces enzymes est probablement due à la fixation des métaux lourds sur ces protéines, ce qui a mené à la diminution de leurs activités.

Des résultats similaires ont été observés chez *Xanthomonas campestris* pv. Lors de son exposition à un stress généré par la rifampicine (Li et *al.*, 2008) et chez *Methylophilus* sp. et

Methylobacterium sp. sous l'influence d'un stress osmotique en présence de concentrations graduelles en NaCl (Giri *et al.*, 2013). Le même résultat est rapporté par Meghnous *et al.* (2019) dans son étude portée sur *Aspergillus tubingensis*, endophyte des racines d'*Hedysarum pallidum*, lors son exposition à différentes concentrations en antimonite.

6.4 Effet des métalloïdes sur la peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique a été évaluée par mesure des teneurs du malondialdéhyde (MDA), issu de la fragmentation des acides gras polyinsaturés membranaire des deux souches de *S. marcescens* en présence de doses croissantes en métalloïdes. Les résultats synthétisés dans la figure 32 révèlent que la variation des teneurs en MDA présentait la même allure. On constate une augmentation significative du MDA avec l'élévation du niveau de contamination par les métalloïdes par rapport aux témoins. En effet, les teneurs en MDA à 5 mM de Sb et d'As ne dépassent celles des témoins que d'environ 48 % et 40 % ; alors qu'à 10 mM, elles les dépassent de 122 et 118 %, dans cet ordre. À 20 mM de Sb et à 15 mM d'As les teneurs en MDA restent significativement invariables. Cependant, à 30 mM de Sb et à 20 mM d'As, l'accumulation du MDA diminue significativement pour rejoindre celles des témoins.

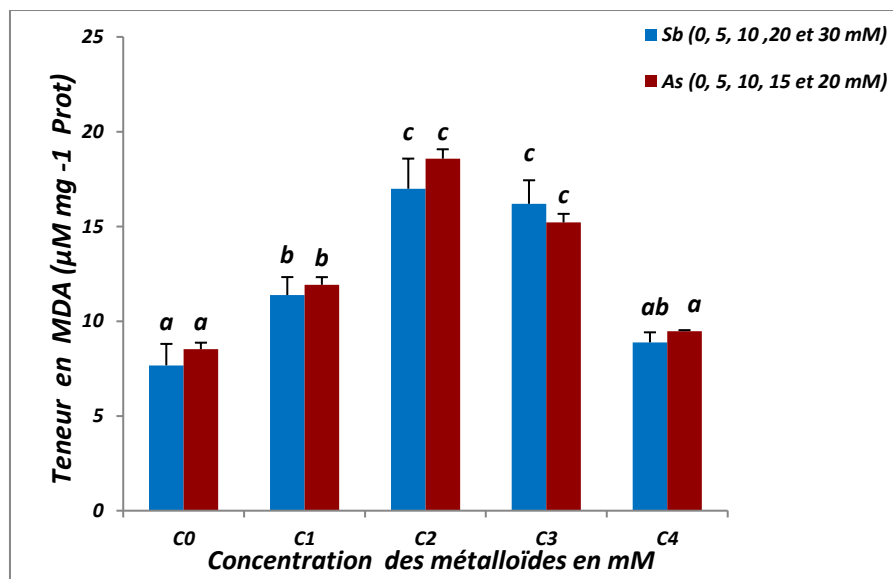


Figure 32 : Teneur intracellulaire en MDA dans la biomasse de *S.marcescens* (Sb) et de *S.marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture

Le test de corrélation de *Pearson* apparaît que la production du MDA par les deux souches de *S. marcescens* n'était corrélée ni à la teneur en métalloïdes, ni à la croissance des deux souches, ni à la teneur en H₂O₂ (**Tableaux 6 et 7 en annexe 5**). Cependant, lorsqu'on soustrait les valeurs obtenues à 30 mM Sb, la teneur en MDA de *S. marcescens* (Sb) devient

corrélée significativement et positivement aux teneurs en Sb ($r = 0,81, p < 10^{-2}, n = 12$) et en H_2O_2 ($r = 0,59, p < 0,05, n = 12$) et significativement et négativement à la croissance ($r = -0,89, p < 10^{-3}, n = 12$) (**Tableau 8 en annexe 5**). De plus, après la suppression des valeurs obtenues à 20 mM d'As, la teneur en MDA dans la biomasse de *S. marcescens* (As) ne devient corrélée significativement et positivement qu'aux teneurs en As ($r = 0,79, p < 10^{-2}, n = 12$) et en H_2O_2 ($r = 0,89, p < 10^{-3}, n = 12$) (**Tableau 9 en annexe 5**).

L'augmentation significative des teneurs en MDA chez *S. marcescens* avec la progression des concentrations en Sb et en As, et la corrélation significative et positive de ces deux paramètres aux faibles doses métalliques, témoignent l'installation d'un stress oxydatif chez *S. marcescens* (Sb) et *S. marcescens* (As). Cela est induit par une génération accrue des ROS (Fashola et al., 2016), dont le H_2O_2 , en déclenchant ainsi la peroxydation des lipides membranaires et en augmentant par conséquent l'accumulation du MDA (Jos et al., 2005 ; Benavides et al., 2005). Une telle réponse serait à l'origine de l'altération des propriétés biochimiques des biomolécules notamment celles de la membrane ; ce qui conduit à la diminution de sa fluidité, à la perte de sa fonctionnalité de transport particulièrement des nutriments, à la perte de la régulation de la balance osmotique et à l'inactivation des ATPases (Alberts et al., 2012), et entraîne ainsi la réduction de la croissance des deux souches. Cette interprétation est mise en évidence par la corrélation négative et significative du MDA avec la croissance de *S. marcescens* aux faibles traitements métalliques utilisés ; soit pour le Sb, soit pour le As.

L'inexistence de corrélation entre la teneur en Sb ou en As et celle du MDA, lorsque toutes les valeurs sont considérées, est liée à l'importante diminution de la teneur en MDA de *S. marcescens* à 30 mM de Sb et 20 mM d'As. Ceci peut être expliqué, d'une part, par la séquestration des métaux par les groupements ionisables de la membrane et la paroi cellulaire bactériennes (Igiri et al., 2018) ou par les exopolysaccharides (EPS) qui chélatent les ions métalliques (Bhaskar et Bhosle, 2006). Ceux-ci limitent leur diffusion dans le cytoplasme ; ce qui entraîne la diminution du stress oxydatif et la réduction de la production du MDA par la suite. D'autre part, la production excessive des aldéhydes, y compris le MDA, lors de l'oxydation des lipides a conduit à leur interaction avec d'autres biomolécules, notamment les protéines, et/ou à leur dégradation en d'autres substances non-mesurables par la méthode de dosage utilisée, ce qui peut expliquer encore la diminution des valeurs du MDA observée à des teneurs élevées en Sb et en As.

L'accumulation du MDA en présence des ions métalliques a été rapportée chez plusieurs microorganismes ; où il a été qualifié comme un biomarqueur de stress, en indiquant des dommages membranaires plus ou moins importants. Ainsi, Howlett et Avery (1997) ont montré que la toxicité des métaux causait une peroxydation des lipides accompagnée par une perte de l'intégrité cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae*. Lenaertova et al. (1998) ont également constaté que l'exposition de *Streptococcus bovis* et de *Selenomonas ruminantium* aux ions Hg (II) augmentait considérablement la concentration du MDA. De plus, Sanaa et al. (2013) ont enregistré une augmentation de la production du MDA chez *E. coli* ASU 7 en présence de concentrations graduelles en Cr⁶⁺ et Cr³⁺. De même, Dhuldhaj et al. (2018) ont noté une accumulation accrue du MDA dans la biomasse d'*Anabaena* sp. en réponse aux ions d'arsénite (AsIII).

La production de MDA a été mise en évidence chez plusieurs bactéries suite à leur exposition à différents stress tels que la lyophilisation de *Lactobacillus* (Yao et al., 2008) et de *Pseudomonas fluorescens* (Jean-Noël et al., 2012). Ces auteurs ont montré que les acides gras polyinsaturés de bactéries étaient les premières cibles des attaques des radicaux libres au cours de leur stockage à l'état sec. Du même, la présence de *Streptomyces* sp. HJC-D1 dans le milieu de culture de *Microcystis aeruginosa* (cyanobactérie) a induit une peroxydation de ses lipidiques membranaires, évaluée par la mesure de la teneur en MDA (Kong et al., 2013).

6.5 Effet des métalloïdes sur la production de la proline

Le contenu intracellulaire en proline dans la biomasse fraîche des deux souches de *S. marcescens*, en réponse aux concentrations croissantes en métalloïdes, est illustré par la figure 33. Celle-ci indique que l'allure globale des diagrammes montrait une augmentation progressive des teneurs de la proline en fonction de celles de Sb et d'As. En revanche, on note une diminution significative des teneurs en proline aux fortes concentrations, mais qui restent relativement supérieures à celles des témoins négatifs.

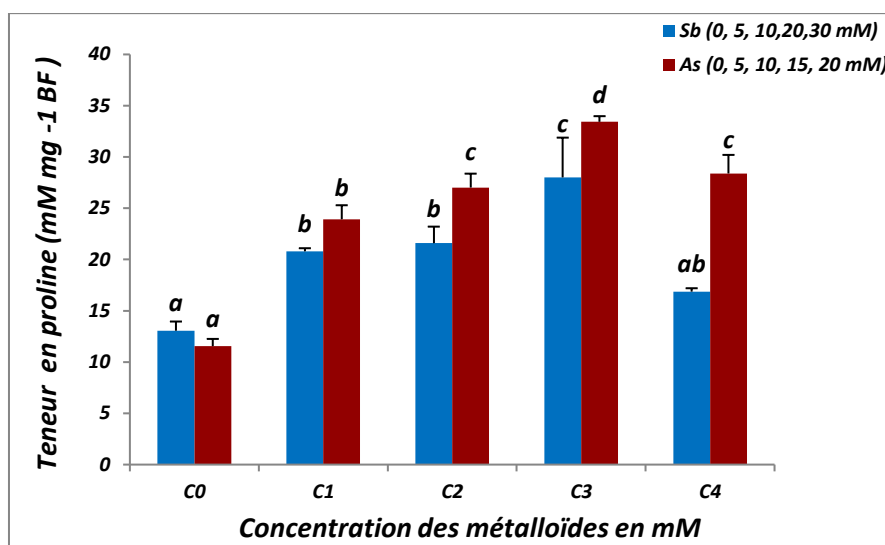


Figure 33 : Teneur intracellulaire en proline dans la biomasse fraîche (BF) de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture

En effet, 5, 10 et 20 mM d'antimoine sont capables d'augmenter la production de la proline par *S. marcescens* (Sb) d'environ 59 %, 65 % et 115 %, successivement, par rapport à 0 mM. Cependant, à 30 mM de Sb, la concentration de la proline diminue pour se rapprocher à celle du témoin. Le test de *Pearson* révèle une corrélation significative et positive de la teneur en proline avec la teneur en MDA et les enzymes antioxydantes ; mais elle n'est corrélée ni à la teneur en Sb, ni à la croissance, ni à la teneur en H₂O₂ (**Tableau 6 en annexe 5**). Cependant, lorsqu'on soustrait les valeurs obtenues à 30 mM, donc n = 12, la teneur en proline devient corrélée très significativement et positivement aux teneurs en Sb ($r = 0,91$, $p < 10^{-3}$) et en H₂O₂ ($r = 0,83$, $p < 10^{-2}$) et très significativement et négativement à la croissance ($r = -0,90$, $p < 10^{-3}$) (**Tableau 8 en annexe 5**).

De même, l'addition de 5, 10 et 15 mM d'arsenic, provoque une augmentation de la production de la proline par *S. marcescens* (As) d'environ 107 %, 134 % et 189 %, respectivement, par rapport à 0 mM. En revanche, la concentration de 20 mM d'As diminue la quantité de cet acide aminé, mais sa teneur reste toujours plus importante que celle de l'essai sans métalloïde. Le test de *Pearson* fait ressortir une corrélation significative et positive entre la teneur en proline et les teneurs en As ($r = 0,83$, $p < 10^{-3}$), en H₂O₂ ($r = 0,71$, $p < 10^{-2}$) et en MDA ($r = 0,57$, $p < 0,05$) et une corrélation significative et négative avec la croissance ($r = -0,63$, $p < 0,05$). De plus, elle est corrélée à toutes les enzymes antioxydantes sauf à l'APX (**Tableau 7 en annexe 5**).

La présence de la proline dans l'essai sans métal est liée au métabolisme protéique de *S. marcescens*. Car la plupart des bactéries utilisent cet acide aminé comme une source de carbone et de nitrogène pour soutenir leur croissance (Nagata et al., 2003). L'accumulation intracellulaire de la proline s'effectue à partir du milieu externe par augmentation de l'activité de transports, notamment, chez les bactéries à Gram négatif (*E. coli*). Toutefois, plusieurs espèces bactériennes à Gram positif (*Bacillus* et *Streptomyces*) sont capables de le synthétiser (Bremer et Kramer, 2000).

L'accumulation de la proline dans la biomasse de *S. marcescens* et sa corrélation positive et significative avec les teneurs en MDA, en H₂O₂ et en métalloïdes, sauf à 30 mM de Sb, montre que sa production était induite par la présence des concentrations croissantes en métalloïdes afin de lutter contre la peroxydation lipidique provoquée par la toxicité d'H₂O₂. De plus, la corrélation négative de la proline avec la croissance pour toutes les concentrations d'As et pour les concentrations inférieures à 30 mM de Sb, s'explique par la diminution de la croissance bactérienne, du fait de la toxicité de ces métaux et qui serait le facteur déclenchant de la production ou de l'absorption de la proline. Cela suggère que la proline jouait un rôle important dans la détoxification des ROS et dans la tolérance des souches testées en réponse au stress induit par la toxicité du Sb et d'As. La production de la proline par *S. marcescens* peut donc être considérée comme une stratégie adoptée par cette bactérie pour faire face à la toxicité des métaux, et diminuer ses effets délétères sur leur métabolisme pour empêcher une importante diminution de sa croissance.

De plus, les corrélations significatives et positives de la proline avec la CAT, la POD, l'APX et la SOD suggèrent que la production de proline serait liée à l'induction de l'activité de ces enzymes. En fait, selon les travaux d'Öztürk et Demir (2002), sur des plantes, la CAT et la POD étaient activées par la proline, qui joue également le rôle de protecteur de l'activité de ces enzymes. Ceci pourrait être le cas chez *S. marcescens* non seulement pour la CAT et la POD, mais aussi pour l'APX et la SOD.

Dans le cas de l'antimoine, l'inexistence de corrélation entre les teneurs en proline, en Sb, en H₂O₂ et la croissance, lorsque les valeurs obtenues à 30 mM de Sb sont prises en considération, s'explique par la forte diminution de la teneur en proline à cette concentration. Cela peut être dû à une perturbation dans le mécanisme de détoxification cellulaire par la proline à cette concentration en Sb (Zhang et al., 2015).

Selon la littérature, des niveaux élevés en proline intracellulaire sont des caractéristiques des populations hypertolérantes aux métaux lourds. Car elle agit comme un chélateur pour certains métaux ou comme un stabilisateur des membranes en réduisant l'oxydation des lipides membranaires (Saint-Denis et *al.*, 2001 ; Hoque et *al.*, 2007) et elle protège la cellule contre le stress généré par la présence des métaux lourds par l'activation des enzymes antioxydantes et le piégeage des radicaux libres (Hoque et *al.*, 2007 ; Sharma et *al.*, 2011 ; Liang et *al.*, 2013).

Par ailleurs, l'augmentation de la concentration de la proline en réponse au stress métallique a été rapportée par Wu et *al.* (1995) et Zhang et *al.* (2013) ; ils ont constaté une accumulation importante de la proline intracellulaire chez *Anacystis nidulans* (cyanobactérie) et *Proteus mirabilis* exposés à des concentrations délétères du cuivre et du mercure, respectivement. Chakraborty et *al.* (2012) et Chakraborty et *al.* (2014) ont également noté une accumulation de la proline dans la biomasse d'*Aspergillus foetidus* en présence du Pb et du Cd.

L'accumulation de la proline en réponse à autres stress a été rapportée par Ankri et *al.* (1996), ils ont constaté que la proline était la principale réponse de *Corynebacterium glutamicum* lorsqu'elle est exposée aux conditions de salinité et de sécheresse. Madkour et *al.* (1990) ont constaté également que le stress osmotique a provoqué une accumulation accrue de la proline chez des bactéries diazotrophiques isolées des nodules racinaires de plusieurs plantes. En outre, Chattopadhyay et *al.* (2004) ont montré le rôle thermoprotecteur de la proline en diminuant l'agrégation des protéines d'*E. coli* lors d'un stress thermique.

6.6 Effet des métalloïdes sur les activités des enzymes antioxydantes

La présence de l'antimoine et de l'arsenic dans le milieu de culture de *S. marcescens* a induit un stress oxydatif par la production des radicaux libres. Afin de contrecarrer leur action, la souche bactérienne dispose d'un système enzymatique de défense antioxydant. Cette partie du travail est consacrée à l'étude de l'activité des enzymes antioxydantes (CAT, POD, APX et SOD) chez les deux souches de *S. marcescens* exposées à différentes concentrations en Sb et en As.

6.6.1 Catalase (CAT)

Les résultats de dosage de l'activité de la CAT de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As), en présence de concentrations croissantes en métalloïdes, sont résumés dans la figure 34. À partir de laquelle, on remarque que la CAT des deux souches présentait la même évolution. D'ailleurs, on note un accroissement progressif et significatif de l'activité de cette enzyme avec la progression des concentrations de Sb et d'As. Elle atteint son maximum à 20 mM de Sb et 15 mM d'As, où elle est environ 5,2 et 4,1 fois supérieure à celles mesurées à 0 mM de Sb et d'As, respectivement. Par contre, à 30 mM Sb et 20 mM As, on enregistre une diminution significative de l'activité pour atteindre des valeurs relativement proches de celles des témoins.

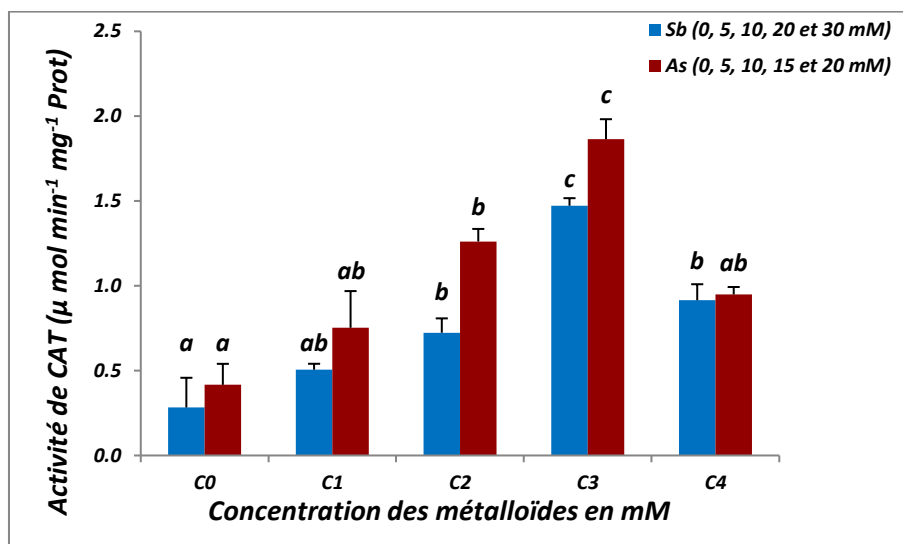


Figure 34 : Variation de l'activité de la CAT de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture

La CAT des deux souches de *S. marcescens* n'est corrélée significativement et positivement qu'aux teneurs en métalloïdes, en H₂O₂, en MDA et en proline, et significativement et négativement à la croissance des souches, à l'exception en cas de l'arsenic. De plus, la CAT de *S. marcescens* (As) est corrélée significativement et positivement à la POD et à la SOD ; alors, celle de *S. marcescens* (Sb) est faiblement corrélée à l'activité de l'APX (**Tableaux 6 et 7 en annexe 5**)

La catalase joue un rôle important dans la détoxification du H₂O₂ pendant un stress oxydatif puisqu'elle l'élimine par sa conversion en H₂O. Dans le présent travail, une stimulation très significative ($p < 0,05$) de la CAT est constatée suite à l'addition de doses graduelles en métalloïdes. Elle peut être expliquée par l'augmentation de la concentration de

son substrat, le peroxyde d'hydrogène, suite à l'augmentation de la concentration des ions métalliques dans les milieux de culture de *S. marcescens*. Cela met en évidence l'implication de cette enzyme dans la catalyse du H₂O₂ intracellulaire formé en présence de ces métalloïdes.

Ces résultats sont similaires à ceux de Banjerdkij et *al.* (2005) qui ont rapporté que l'exposition de *Xanthomonas campestris* à 75 mM CdCl₂ pendant 30 min était capable d'augmenter l'activité de la CAT 10 fois plus qu'en absence du sel dans le milieu de culture. De même, Hussein et Joo (2013) ont signalé une stimulation de la CAT de *P. putida* KNU5, de *P. putida* KNU8 et de *B. subtilis* Kh en présence de Zn⁺². Récemment, Elahi et Rehman (2018) et Elahi et *al.* (2019) ont constaté que l'addition de 2 mM de Cr⁶⁺ dans le milieu de culture de *Bacillus aerius* S1, *Brevibacterium iodinum* S2 et *Microbacterium testaceum* B-HS2 avait provoqué une augmentation de l'activité de la CAT d'environ 717 %, 27 % et 42 %, dans cet ordre. De plus, Akkoyun et *al.* (2019) ont remarqué une augmentation importante de l'activité de la CAT d'*Exiguobacterium profundum* en présence d'Hg et de Pb.

Cependant, des concentrations élevées en Sb et en As ont provoqué une réduction significative de la CAT de *S. marcescens*. Ce même résultat est obtenu par Akkoyun et *al.* (2019) en exposant *Exiguobacterium profundum* à des fortes concentrations en Hg et Pb. La réduction de la CAT peut être causé soit par la fixation des cations métalliques sur la protéine enzymatique, soit par l'hyperproduction d'H₂O₂ intracellulaire par les souches testées ; ce qui inactive la catalase et favorise encore l'accumulation du peroxyde d'hydrogène dans la biomasse bactérienne. Ces résultats sont en accord avec ceux de Polidoros et Scandalios (1999), qui ont rapporté que l'activité de la CAT était directement régulée par la concentration en H₂O₂ ; dont ses fortes concentrations pouvaient réduire cette activité. En outre, Chen et *al.* (1993) et Du et Klessig (1997) ont suggéré que la catalase peut être inactivée par sa liaison à l'H₂O₂ ; ce qui provoque une inhibition irréversible en agissant probablement avec un résidu d'histidine. Cette inhibition peut être l'un des facteurs d'accumulation d'H₂O₂ dans la cellule (Velikova et *al.*, 2000).

6.6.2 Peroxydase (POD)

La variation de l'activité de la POD des deux souches de *S. marcescens* en présence de concentrations croissantes en Sb et en As est résumée dans la figure 35. Globalement, on constate une similitude des allures des histogrammes des deux souches. Cependant, les valeurs les plus élevées de la POD sont enregistrées chez *S. marcescens* (Sb).

L'activité de la POD augmente d'une façon significative jusqu'elle atteint des niveaux élevés à 10 mM Sb et à 15 mM As. Elle est environ 7,9 fois et 4,4 fois celles des témoins, respectivement. Une diminution progressive et significative est notée pour donner une valeur similaire à celle du témoin en présence de 30 mM de Sb, et supérieure à celle du témoin à 20 mM d'As.

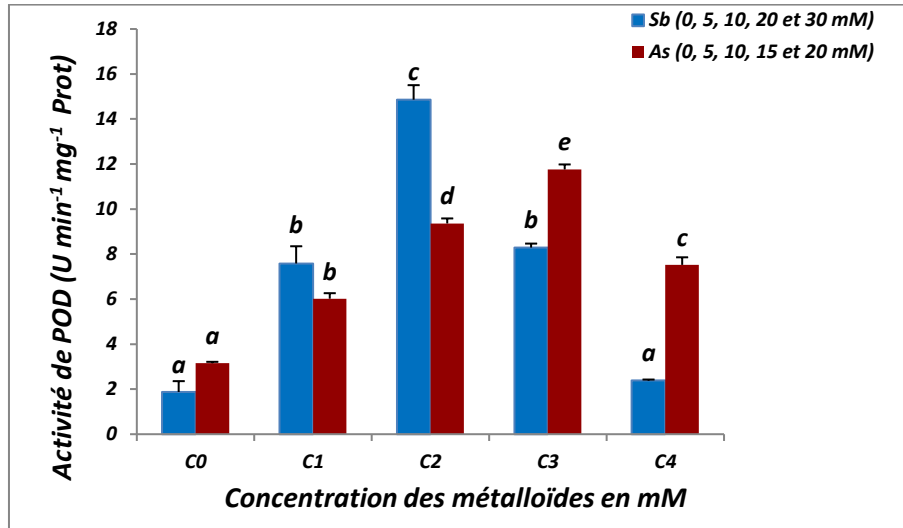


Figure 35 : Variation de l'activité de la POD de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture

La matrice de *Pearson* montre, d'une part, que la POD de *S. marcescens* (Sb) est corrélée très significativement et positivement au MDA, à la proline, à l'APX et à la SOD. Mais elle n'est corrélée ni aux teneurs en Sb et en H₂O₂, ni à la croissance, ni à l'activité de la CAT (**Tableau 6 en annexe 5**). Elle ne devient corrélée significativement et négativement à la croissance ($r = -0,66$, $p < 0,05$) qu'une fois les valeurs obtenues à 30 mM de Sb sont soustraites ($n = 12$) (**Tableau 8 en annexe 5**). D'autre part, ce même test révèle que la POD de *S. marcescens* (As) est faiblement et négativement corrélée à la croissance de cette souche ; mais elle est significativement et positivement corrélée aux teneurs en As, en H₂O₂, en MDA, en proline, à la CAT et à la SOD (**Tableau 7 en annexe 5**).

La POD représente une autre voie de destruction d'H₂O₂ dans la cellule. Elle a plus d'affinité pour l'H₂O₂ que la CAT (Shahid et *al.*, 2014). Cette enzyme joue un rôle important dans les mécanismes de défense en réponse à diverses conditions de stress, particulièrement celui généré par des cations métalliques pour éliminer l'excès en H₂O₂ (Kim et *al.*, 2010).

L'augmentation de l'activité de la POD des plantes a été documentée sous des conditions de stress très variées comme la sécheresse (Zhang et Kirkham, 1994) et la présence

des doses toxiques d'Al, Cu, Cd et Zn (Chaoui et al., 1997 ; Shah et al., 2001). Des résultats similaires sont également rapportés pour les bactéries, telles que *E. coli* en présence de Cr³⁺ et Cr⁶⁺ (Sanaa et al., 2013), *B. subtilis* Kh en présence de Zn²⁺ et Pb²⁺ (Hussein et Joo, 2013) et *Bacillus aerius* S1, *Brevibacterium iodinum* et *Microbacterium testaceum* B-HS2 exposées au chrome hexavalent (Elahi et Rehman, 2018 ; Elahi et al., 2019)

La diminution de l'activité de la POD au-delà de 10 mM de Sb et 15 mM d'As, peut expliquer par la complexation de l'enzyme avec les ions métalliques additionnés aux milieux de culture, ce qui provoque des modifications structurales de la protéine enzymatique, notamment au niveau du site actif (Hou et al., 2007). De plus, la sensibilité de cette enzyme aux fortes teneurs en H₂O₂ peut conduire à une réduction de son activité (Bowler et al., 1992 ; Valderrama et al., 2002)

La baisse de l'activité de la POD a été observée chez le maïs (*Zea mays*) en réponse à de fortes concentrations en Sb dans le sol (Pan et al., 2011) et dans les feuilles de maïs en présence de niveaux élevés en Cd (Ekmekçi et al., 2008). Le même résultat a été rapporté par Meghnous et al. (2019), quand ils ont étudié la variation de la POD de l'endophyte *Aspergillus tubingensis* en présence de concentrations graduelles en Sb.

6.6.3 Ascorbate peroxydase (APX)

La variation de l'activité de l'APX des deux souches de *S. marcescens*, en réponse de concentrations progressives en Sb et en As, est résumée dans la figure 36 ; dans laquelle on remarque que les diagrammes des activités de l'APX des deux souches possèdent une grande ressemblance.

En effet, des doses croissantes en Sb et en As stimulent d'une manière significative et positive l'activité de l'APX. À 10 mM de Sb et d'As, elle atteint son maximum avec une augmentation d'environ 4,3 et 2,8 fois celles des témoins, respectivement. Une diminution progressive et significative de l'activité enzymatique est notée par la suite, mais elle reste toujours plus importante que celle du témoin en présence de 30 mM Sb et similaire à celle du témoin en présence de 20 mM As. L'APX de *S. marcescens* (Sb) est corrélée significativement et positivement à toutes les variables mesurées sauf à la teneur en Sb, à la croissance et à la teneur en H₂O₂ (**Tableau 6 en annexe 5**). Cependant, celle de *S. marcescens* (As) n'est corrélée significativement et positivement qu'aux teneurs en MDA et à l'activité de la SOD (**Tableau 7 en annexe 5**).

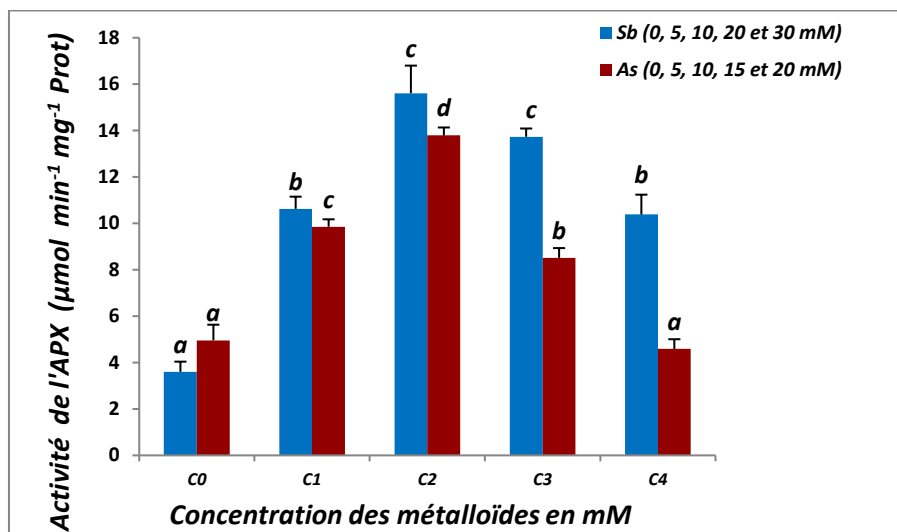


Figure 36 : Variation de l'activité de l'APX de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture

L'ascorbate peroxydase est une autre enzyme antioxydante qui catalyse l'élimination d' H_2O_2 en utilisant l'acide ascorbique comme substrat (Iturbe-Ormaetxe et al., 2001). Selon la littérature scientifique, les APXs sont principalement des enzymes antioxydantes des plantes supérieures et des organismes chlorophylliens (Shigeoka et al., 1980 ; Miyake et al., 1991 ; Takeda et al., 2000 ; Sano et al., 2001 ; Sharma et Dubey, 2004). Or, plusieurs travaux ont pu mettre en évidence la présence de cette enzyme dans plusieurs tissus riches en acide ascorbique de plusieurs organismes non chlorophylliens (Mathews et al., 1997 ; Boveris et al., 1980 ; Wada et al., 1998). De plus, les études biochimiques de ces APXs et celles des plantes ont révélé une grande similitude entre leurs séquences N-terminale. Par conséquent, cette enzyme peut être utilisée comme un biomarqueur de stress oxydatif chez les organismes chlorophylliens et non chlorophylliens (Wada et al., 1998).

L'augmentation significative de l'activité de l'APX en présence de concentrations croissantes en Sb et en As indique que leur présence dans le milieu de culture avait induit l'activité de cette enzyme chez *S. marcescens*, pour lutter contre la peroxydation lipidique provoquée par les différents radicaux libres, dont le H_2O_2 , générés par la toxicité de ces métaux. En effet, un tel rôle est confirmé par les corrélations positives et significatives de l'activité de l'APX avec les teneurs en MDA pour les deux métalloïdes.

De nombreux auteurs ont signalé un accroissement de l'activité de l'APX en réponse au stress métallique. C'est le cas de Sanaa et al. (2013) qui ont signalé que l'addition des ions Cr^{3+} , Cr^{6+} , Co^{2+} , Cu^{2+} et Ni^{2+} avait induit l'activité de l'APX d'*E. coli*. Pareillement, Hussein

et Joo (2013) ont constaté une augmentation très importante de l'activité de cette enzyme chez *P. putida* KNU5 exposé aux ions Zn^{2+} . De plus, Elahi et Rehman (2018) Elahi et *al.* (2019) ont noté une augmentation d'environ 699 % et 19 % de l'activité de l'APX de *B. aerius* S1 et *M. testaceum* B-HS2, respectivement, cultivés en présence des ions Cr^{6+} . De même, Dhuldhaj et *al.* (2018) ont également rapporté un accroissement progressif de l'APX suite à l'addition de doses graduelles en As (III) dans le milieu de culture d'*Anabaena* sp.

Du fait de la réduction de l'activité de l'APX à des fortes concentrations soit en Sb ou en As, il semble que cette enzyme est impliquée dans l'élimination du H_2O_2 aux faibles concentrations en ces métaux. De plus, la production excessive d' H_2O_2 peut affecter la structure de l'enzyme (Cabaleiro et *al.*, 2001) ou entraîner l'épuisement de l'ascorbate réduit, ce qui inactive l'APX, comme cela est rapporté par Shikanai et *al.* (1998). Une telle inhibition peut être la conséquence de la production de grandes quantités d' H_2O_2 .

En effet, plusieurs travaux ont montré que des niveaux élevés en ROS, induits par les métaux, seraient responsables de l'inhibition de l'APX. Par exemple, Elahi et Rehman (2018) ont rapporté une réduction de 1 % de l'activité de l'APX produite par *B. iodinum* S2, après son exposition aux ions Cr^{3+} . Ce résultat rejoint celui de Feng et *al.* (2016) qui ont noté une régression de l'activité de l'APX et de la POD des racines du riz paddy exposé à l'antimoine et au sélénium. Récemment, Meghnous et *al.* (2019) ont montré que l'APX de l'endophyte fongique étudié, est inhibée par des concentrations élevées en Sb.

La POD et l'APX sont deux modes alternatifs à la CAT pour la destruction d' H_2O_2 (Bowler et *al.*, 1992). Contrairement à la CAT, la POD et l'APX se renouvellent lentement, elles exigent un réducteur pour leur fonctionnement et elles possèdent une grande affinité vis-à-vis de l' H_2O_2 . Ceci permet à ces deux enzymes d'éliminer efficacement le H_2O_2 dans des conditions stressantes (Wang et *al.*, 1999 ; Sharma et *al.*, 2012). Dans notre étude, l'augmentation des activités de ces trois enzymes chez les deux souches de *S. marcescens*, en fonction de faibles concentrations en Sb et As, indique leur implication dans l'élimination du H_2O_2 généré par la toxicité des métalloïdes. Cette réaction permet donc de protéger les lipides, les protéines et les acides nucléiques cellulaires des dommages causés par H_2O_2 et les autres ROS (Imlay et Linn, 1988). Un tel rôle est confirmé par les corrélations positives et significatives des activités des trois enzymes avec les teneurs en MDA.

Selon Mizuno et *al.* (1998), la CAT et l'APX coopèrent pour la protection contre l'H₂O₂ généré par le stress abiotique, ce qui explique la corrélation positive et significative entre ces deux enzymes en présence de Sb. Cependant, selon Shikanai et *al.* (1998), lorsqu'on considère la stabilité de l'enzyme dans des conditions de stress oxydatif, la CAT est beaucoup plus efficace que l'APX en tant qu'enzyme résistante au stress. Ceci expliquerait le fait que la CAT, à l'inverse de l'APX, soit corrélée avec toutes les teneurs en métalloïdes. Néanmoins l'hyperproduction d'H₂O₂ à des hautes concentrations en Sb et As par les souches résistantes, en raison de l'excès des métalloïdes, aurait entraîné également la réduction significative de l'activité de la CAT. En effet, Polidoros et Scandalios (1999) ont également rapporté que l'activité de la CAT serait directement régulée par la concentration de H₂O₂ dont les fortes concentrations pouvaient réduire son activité.

L'étude de Sanaa et *al.* (2013) a montré une augmentation importante de l'activité de la CAT, de la POD et de l'APX des souches d'*E. coli* résistantes aux métaux en présence de Cr⁶⁺, Cr³⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ et de Pb²⁺. Les résultats d'Hussein et Joo (2013) ont également rapporté que 100 mg/L de Zn²⁺ ou de Pb²⁺ pourraient induire les activités de la CAT, de la POD et de l'APX de *Pseudomonas putida* KNU5, *Pseudomonas putida* KNU8 et *Bacillus subtilis* Kh. Ces mêmes auteurs ont noté que l'induction de la POD était moins importante que celles de la CAT et de l'APX. De plus, Lee et Shin (2003) ont rapporté que l'activité de la CAT a faiblement augmenté, suivie par l'APX et la POD de *Nannochloropsis oculata* après un traitement avec le cadmium.

6.6.4 Superoxyde dismutase (SOD)

Les résultats de l'activité de la SOD mesurée chez les deux souches de *S. marcescens* sont présentés dans la figure 37. Dans l'ensemble, les histogrammes des activités de la SOD des deux souches, soit en présence de Sb ou d'As, sont très similaires. Cependant, les valeurs de l'activité de cette enzyme varient selon la concentration des métalloïdes dans le milieu de culture.

Selon la figure 37, la SOD s'accroît significativement avec l'accroissement des concentrations de Sb et d'As. Elle atteint son maximum à 10 mM de Sb et d'As, où elle dépasse celles des témoins d'environ 4 fois plus. Cependant quand les souches sont exposées aux concentrations élevées en métalloïdes, on note une diminution progressive et significative de l'activité de la SOD, mais elle reste supérieure à celles des témoins.

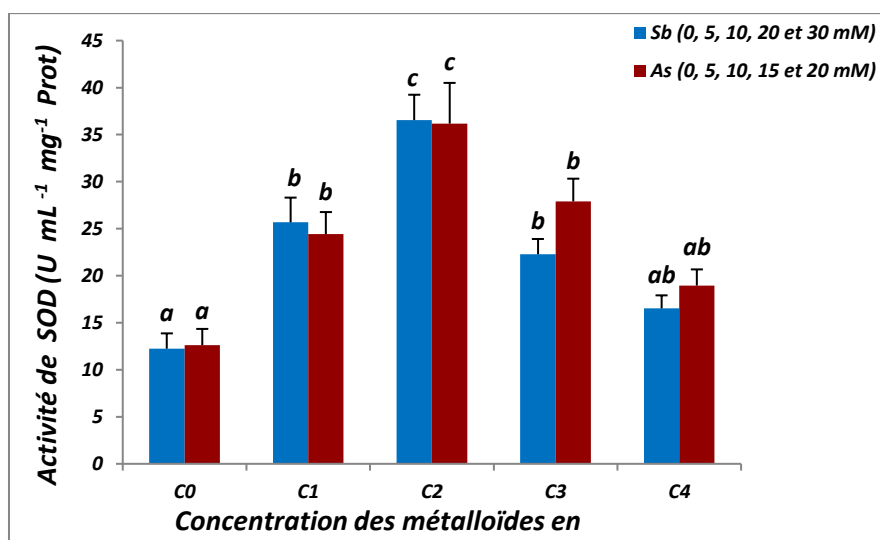


Figure 37 : Variation de l'activité de la SOD de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) en fonction de l'augmentation des concentrations de Sb et d'As dans le milieu de culture

Les résultats de la corrélation révèlent que la SOD de *S. marcescens* (Sb) n'est corrélée significativement et positivement qu'aux teneurs en MDA, à l'activité de la POD et à celle de l'APX ; alors que, celle de *S. marcescens* (As) est corrélée au MDA et à la proline, ainsi qu'aux toutes les enzymes antioxydantes (**Tableaux 6 et 7 en annexe 5**).

L'augmentation de l'activité de la SOD, mesurée chez les souches de *S. marcescens*, aux faibles concentrations en métaalloïdes, s'explique par l'augmentation de la concentration de son substrat, le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Car cette enzyme catalyse la dismutation de deux molécules de ce radical en oxygène (O_2) et peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Sharma et al., 2012). Contrairement à l' H_2O_2 , l'anion superoxyde est un radical instable qui possède une courte durée de vie, car il est rapidement dismuté en H_2O_2 par la SOD (Blokhina et Fagerstedt, 2010 ; Bhatt et Tripathi, 2011). Le H_2O_2 ainsi produit est ensuite décomposé par la POD, l'APX et la CAT (Bowler et al., 1992). En effet, les corrélations sont positives et significatives de la SOD avec les teneurs en As et avec les activités de la CAT, de la POD et de l'APX. Par ailleurs, l'augmentation significative des activités de la SOD et de la POD en fonction des concentrations de Sb et leurs corrélations très significatives jusqu'à 10 mM de Sb prouvent, comme pour la CAT et l'APX, que la présence des métaalloïdes dans le milieu de culture avait pour effet d'induire leurs activités chez *S. marcescens*.

La SOD joue un rôle capital en situation de stress oxydatif chez les organismes aérobies. Elle permet de réduire la quantité d' $O_2^{\cdot-}$ produit lors d'un stress et d'empêcher la formation des radicaux hydroxyles ($OH^{\cdot-}$) dans la réaction d'Haber-Weiss. Ces radicaux

hydroxyles sont les espèces les plus réactives causant la peroxydation lipidique, la dénaturation des protéines et la mutation de l'ADN. En effet, l'absence d'un mécanisme enzymatique permettant son élimination conduit à son accumulation ; ce qui peut conduire éventuellement à la mort cellulaire (Pinto et *al.*, 2003 ; Sharma et *al.*, 2012).

L'induction de la SOD lors d'un stress métallique a été rapportée par Lenaertova et *al.* (1998) qui ont étudié la SOD de *Streptococcus bovis* et *Selenomonas ruminantium* sous stress induit par le mercure. Ainsi, Sanaa et *al.* (2013) ont constaté une stimulation de la SOD d'*E. coli* après l'addition des ions Cr^{3+} dans son milieu de croissance. Elahi et *al.* (2019) ont également signalé l'augmentation de l'activité de la SOD de *B. aerius* (683 %), de *B. iodinum* (16 %) et de *M. testaceum* B-HS2 (28 %) suite à leur exposition à un stress métallique dû aux ions Cr^{6+} . De même, Akkoyun et *al.* (2019) ont signalé l'induction de la SOD d'*Exiguobacterium profundum* après son exposition au Hg^{2+} et au Pb^{2+} .

La réduction de l'activité de la SOD, après 10 mM de Sb et As, peut être expliquée, comme pour la CAT, la POD et l'APX, par la sensibilité de cette enzyme aux fortes teneurs en H_2O_2 (Bowler et *al.*, 1992 ; Valderrama et *al.*, 2002). De plus, la génération du radical hydroxyle dans la réaction d'Haber-Weiss peut réagir avec les groupements fonctionnels des enzymes, conduisant ainsi à leur inhibition, notamment les enzymes antioxydantes y compris la CAT et la SOD (Shahid et *al.*, 2014). Ceci explique les corrélations significatives et positives entre la SOD, la CAT, la POD et l'APX, dans le cas d'As, et le fait que la SOD et la POD ne soient corrélées à la CAT et à l'APX que pour les valeurs inférieures à 10 mM de Sb. La réduction de l'activité de la SOD peut également être expliquée par la fixation des ions métalliques sur cette protéine enzymatique (Gupta et *al.*, 2009). Car, ces éléments peuvent inhiber plusieurs enzymes par leurs interactions compétitives ou non compétitives avec le substrat ou causer des changements conformationnels des protéines enzymatiques (Gauthier et *al.*, 2014 ; Igiri et *al.*, 2018).

L'inhibition de la SOD par les métaux lourds a été rapportée par Sanaa et *al.* (2013) qui ont étudié la SOD d'*E. coli* en présence des ions Cr^{6+} , par Banjerdkiy et *al.* (2005) qui ont suivi la variation de la SOD de *Xanthomonas campestris* en présence du Cd^{2+} et par Akkoyun et *al.* (2019) qui ont indiqué une diminution de l'activité de la SOD d'*Exiguobacterium profundum* en présence de fortes concentrations en Hg^{2+} et Pb^{2+} .

Les études de Benhamdi et *al.* (2014) menées sur *H. pallidum* et *L. spartum* poussant sur les déblais de mine d'antimoine, ont ressorti une adaptation des deux phytotaxons à un tel environnement naturel hostile grâce à leur système antioxydant induit par la présence de concentrations élevées en antimoine et en arsenic dans le sol. En effet, ces études ont mis en évidence une augmentation importante des activités de la CAT et de l'APX dans les racines d'*H. pallidum* et des activités de la CAT et de la POD dans les racines de *L. spartum* en fonction de la contamination du sol par les métalloïdes (Benhamdi et *al.*, 2014).

Le présent travail dévoile l'existence d'une corrélation positive et hautement significative de la CAT et de l'APX de *S. marcescens* (Sb), l'endophyte des racines d'*H. pallidum*, et de la CAT et de la POD de *S. marcescens* (As), l'endophyte des racines de *L. spartum*. Il est donc très probable que les deux bactéries ont un impact sur la production de ces enzymes par leurs plantes hôtes en leur permettant de résister au stress lié à la présence de concentrations élevées en ces métalloïdes et donc d'augmenter leur résistance vis-à-vis de toute contamination métallique. En outre, selon Hamilton et *al.* (2012), les endophytes qui colonisent la partie racinaire peuvent augmenter la tolérance de l'hôte à divers stress, notamment le stress métallique, *via* des mécanismes impliquant plusieurs antioxydants.

Les mêmes travaux de Benhamdi et *al.* (2014) ont révélé que les activités de la POD et de la SOD des racines d'*H. pallidum* augmentent avec l'accroissement des niveaux de contamination des sols par les métalloïdes. Contrairement aux activités de ces deux enzymes produites par *S. marcescens* (Sb), étant réduites aux concentrations élevées en Sb dans son milieu de culture. Cette bactérie aurait donc moins d'impact sur leur production chez son hôte. De plus, *L. spartum*, dont a été isolée *S. marcescens* (As), avait présenté des faibles activités de l'APX et de la SOD, notamment aux fortes contaminations du sol par le Sb et l'As (Benhamdi et *al.*, 2014) ; cette souche n'interviendra donc pas dans leur activation chez son hôte.

7 Effet de l'antimoine et de l'arsenic sur la morphologie cellulaire

L'observation des deux souches de *S. marcescens*, à l'aide d'un microscope optique, révèle des différences morphologiques entre les cellules cultivées en présence et en absence de concentrations sublétales de chacun des deux métalloïdes (**Figure 38**). En effet, on constate qu'en absence de contamination métallique, les cellules bactériennes apparaissent sous forme de bâtonnets isolés, alors qu'en présence de contamination métallique, elles

apparaissent sous forme sphérique et elles sont associées en agrégats. Le changement observé est réversible ; car les cellules bactériennes reprennent leur forme de bâtonnets dispersées lorsqu'elles sont mises en culture sans aucune contamination.

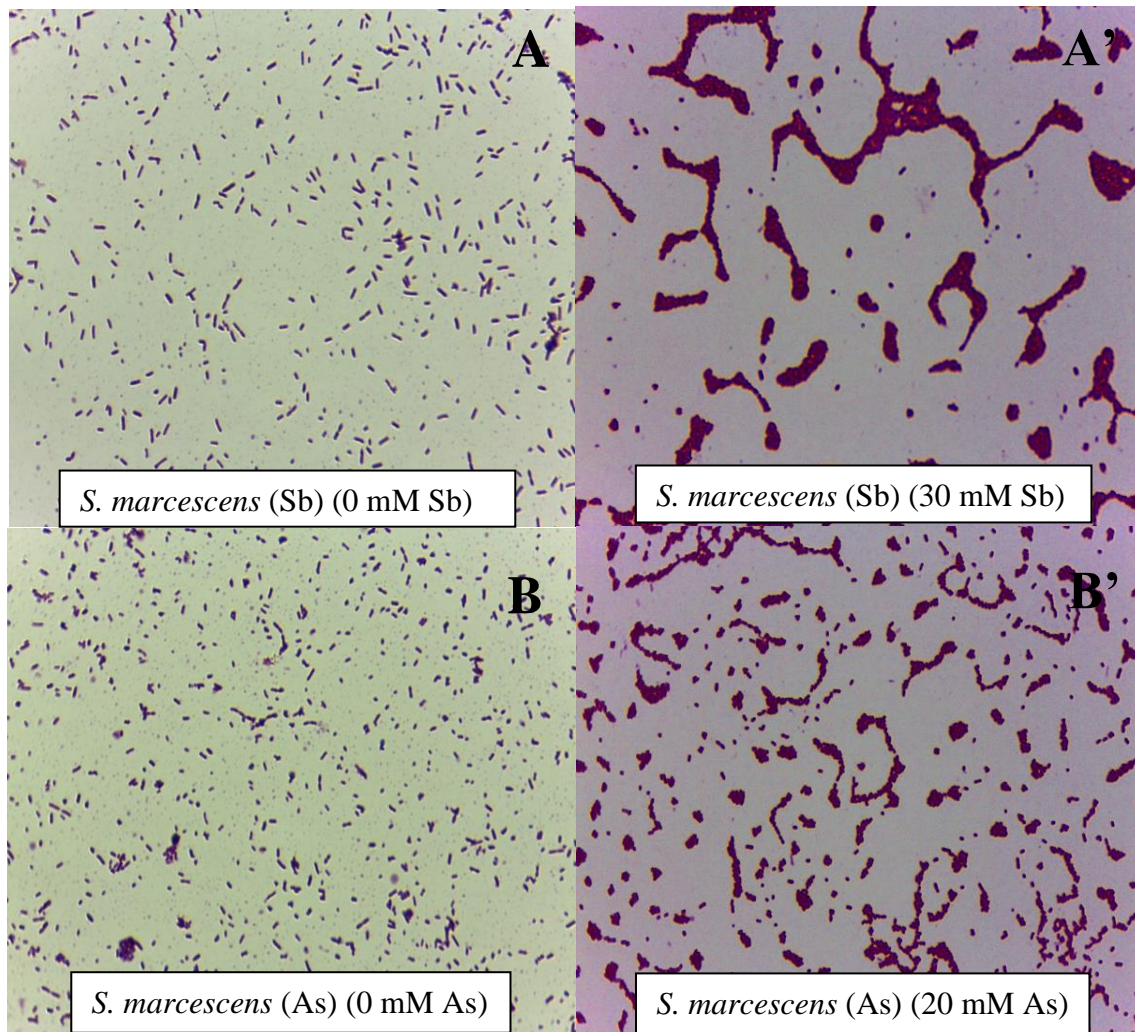


Figure 38 : Mode de regroupement de *S. marcescens* (Sb) en absence et en présence d'antimoine (**A et A'**) et de *S. marcescens* (As) en absence et en présence d'arsenic (**B et B'**) (G x100)

La toxicité des métaux lourds affecte non seulement la croissance et le métabolisme de la cellule bactérienne, mais elle affecte également sa taille, sa morphologie et son mode de regroupement comme cela a été rapporté par plusieurs auteurs (Chibuïke et Obiora, 2014 ; Fashola et *al.*, 2016). Le changement de morphologie peut être dû à des modifications structurales de la paroi sous l'effet de la fixation du métal, ou d'une interférence entre les ions métalliques et certains constituants de la paroi au cours de leur assemblage (Svarachorn et *al.*, 1989). De plus, le changement de mode de regroupement peut être un mécanisme de protection contre les ions métalliques présents dans le milieu de croissance en quantité sublétales, en diminuant la surface de contact des bactéries avec les ions métalliques (Boularbah et *al.*, 1993). En effet, le regroupement en amas diminue la diffusion du métal à

l'intérieur de la masse cellulaire, par conséquent, une fraction de la biomasse reste viable. Ces changements sont réversibles lorsque la bactérie est mise dans un milieu sans métal. Cela indique que les conditions des milieux de culture déterminent très fortement la morphologie et la composition de la paroi cellulaire (Ellwood et Tempest, 1972 ; Koch, 1983).

Les études réalisées par Boularbah (1993) ont montré l'apparition de modifications morphologiques importantes et réversibles induites par des concentrations sublétales de Cd chez *Bacillus brevis* isolé d'un sol pollué. L'auteur a également observé sous microscopes optique et électronique une organisation en amas des cellules modifiées. Ces observations ont été expliquées par une inhibition des autolysines qui interviennent dans l'élongation du peptidoglycane (Svarachorn et al., 1989). Chakravarty et Banerjee (2008) ont rapporté que l'exposition de l'*Acidiphilium* H8 à des concentrations métalliques non inhibitrices induit la transformation des coccobacilles dispersés en forme de chaînes de coccoïdes. Alors que le Cu provoque leur transformation en cellules rondes et le Ni permet l'agrégation des cellules. Cependant, le Zn n'a montré aucun effet sur cette souche.

D'une façon analogue, Higham et al. (1986) ont montré que l'exposition de *Pseudomonas putida* aux ions Cd^{2+} , les cellules se regroupent en agrégats sous forme de grappes beaucoup plus petites que les cellules cultivées sans cadmium. Desai et al. (2008) ont noté une augmentation de la longueur et de l'épaisseur des cellules de *Pseudomonas* sp. G1DM21 exposé au Cr (VI). Naik et Dubey (2011) et Naik et al. (2012) ont rapporté pour leur part une réduction de la taille des cellules de *P. aeruginosa* 4EA et d'*Enterobacter cloacae* P2B lorsqu'elles sont exposées au nitrate de plomb. Ces altérations morphologiques sont considérées comme la réponse des cellules bactériennes contre la toxicité des métaux lourds.

Les phénomènes de changement de morphologie cellulaire et de la formation d'agrégation bactériennes peuvent être dûs à d'autres facteurs, tels que le stress hyperosmotique (Boublenza, 2013), le stress acide ou basique (Lemay et al., 2000 ; Isom et al., 1995) et le stress hypothermique ou hyperthermique (Marceau et al., 2003 ; Lorca et Font de Valdez, 1999).

8 Formation de biofilm par *S. marcescens*

Les souches de *S. marcescens* résistantes à l'antimoine et à l'arsenic sont testées pour la formation de biofilm en culture pure. Les résultats obtenus (**Figure 39**) montrent que ces

souches sont capables de former des biofilms dans les 24 h, mais pas aux mêmes densités cellulaires. La meilleure souche productrice de biofilm est celle résistante à l'antimoine. De plus, les biofilms formés par *S. marcescens* sont plus importants que celui produit par *E. coli* W3110, souche de référence.

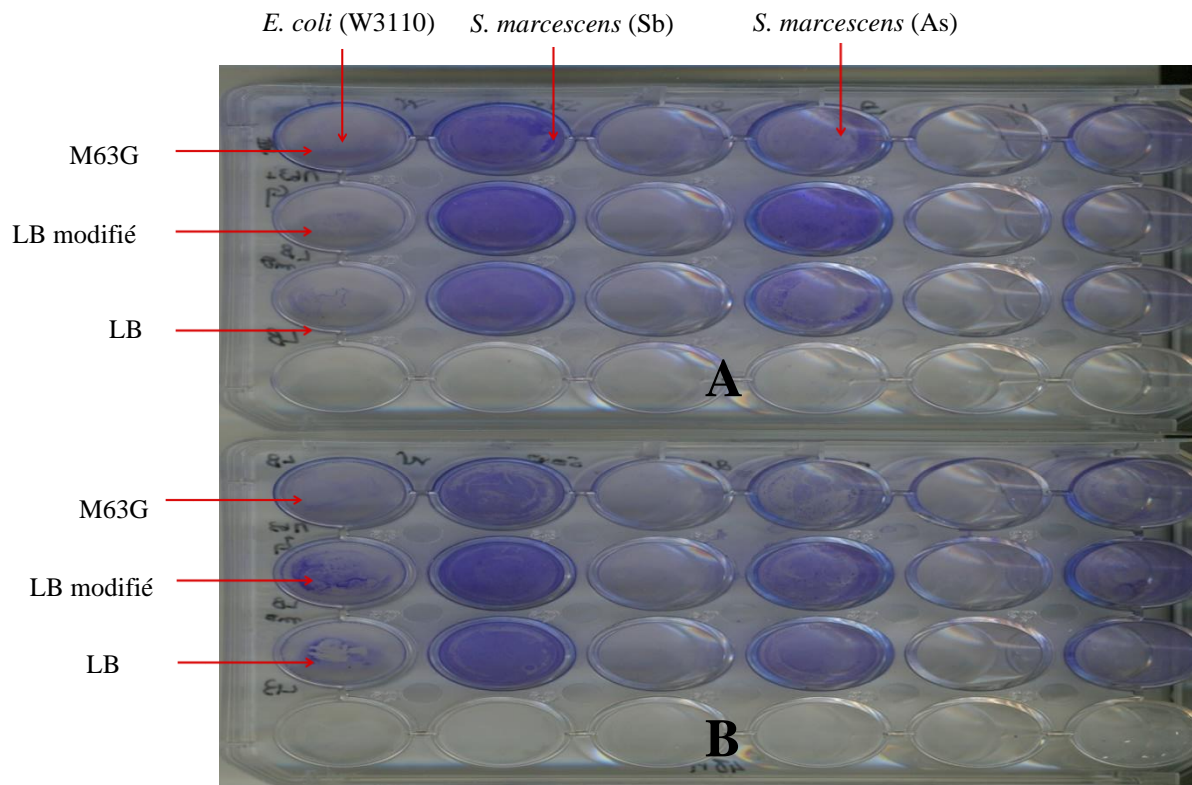


Figure 39 : Etude de formation de biofilm par *S. marcescens* et *E. coli* W3110 sur une plaque de polystyrène après 24 h (A) et 48 h (B) d'incubation sur M63G, LB modifié et LB

Les biofilms sont des associations structurées d'agrégats microbiens sessiles attachés à des surfaces biotiques ou abiotiques. Ils sont constitués de populations enfermées dans une matrice de polymères autoproduit (Santacecilia et *al.*, 2012). Par comparaison avec leurs homologues planctoniques, les cellules sessiles sont généralement plus résistantes à de nombreux stress environnementaux (Donlan, 2000), notamment des métaux lourds et des métalloïdes (Kruger et *al.*, 2013).

La formation de biofilm est une stratégie importante utilisée par la plupart des microorganismes pour survivre en présence de métaux toxiques. Elle permet la séquestration des métaux sur la membrane et la paroi cellulaire des bactéries périphériques qui fournissent de nombreux sites de liaison aux ions métalliques (Igiri et *al.*, 2018). En effet, les peptidoglycanes, les polysaccharides et les lipides, riches en groupements de charges négatives, permettent la fixation des cations métalliques sur la surface du biofilm ; ainsi, ils

limitent la diffusion de ces composés toxiques et protègent les cellules bactériennes à l'intérieur du biofilm. Les sites impliqués dans l'adsorption des métaux sont les groupements hydroxyle, alcool, phosphoryle, amine, carboxyle, ester, sulfhydrile, sulfonâtes et thiols (Fomina et Gadd, 2014 ; Ayangbenro et Babalola, 2017 ; Igiri et *al.*, 2018).

Ce mécanisme est utilisé par les deux souches *S. marcescens* isolées dans cette étude, où l'antimoine et l'arsenic peuvent être séquestrés dans la matrice extracellulaire du biofilm ; ce qui peut expliquer leur survie, même en présence de fortes concentrations en ces polluants. Cela est montré par Newman et *al.* (1997) qui ont étudié la séquestration de l'arsenic par *Desulfosporosinus auripigmentum*, *Herminiimonas arsenicoxydans* et *Thiomonas* spp. par la production d'exopolysaccharides (EPS). Ce mécanisme est également rapporté par Teitzel et Parsek (2003) lors de la formation de biofilm par *P. aeruginosa* résistantes aux ions de cuivre, de plomb et de zinc. De plus, ces auteurs ont montré que les cellules périphériques du biofilm sont mortes, ce qui confirme le rôle des exopolymères du biofilm dans l'accumulation des ions métalliques et la protection des cellules à l'intérieur. Pareillement, Uhrynowski et *al.* (2019) ont montré que *Shewanella* sp. O23S adoptait ce même mécanisme pour faire face à la toxicité de l'arsenic.

On remarque que l'intensité des cellules adhérentes à la paroi de la plaque diminue après une incubation plus longue (48 h), cela suggère que les cellules adhérentes ont été lysées ou ont provoqué la lyse de certaines cellules libres à cause de l'épuisement des nutriments et de la transformation de *S. marcescens* en cellules libres (Uhrynowski et *al.*, 2019 ; Drewniak et *al.*, 2016).

9 Seuil de tolérance des deux souches de *S. marcescens* à quelques métaux

Dans ce test, nous avons examiné les niveaux de tolérance en métaux des endophytes bactériens, *S. marcescens*, monorésistant à l'antimoine et à l'arsenic. Pour cela, la souche *E. coli* W 3110 était incluse comme référence ; elle était fournie par le Laboratoire de Microbiologie, Adaptation et Pathogénie (MAP) de Lyon, France. Cette bactérie a été choisie, d'une part parce qu'on dispose de nombreuses informations sur sa physiologie ainsi que sur la mise en œuvre de ses manipulations *in vitro*, et d'autre part, cette souche est sensible ou moins résistante aux différents métaux utilisés, ce qui permet d'établir une estimation du niveau de résistance de *S. marcescens* vis-à-vis ces toxiques.

Résultats et discussion

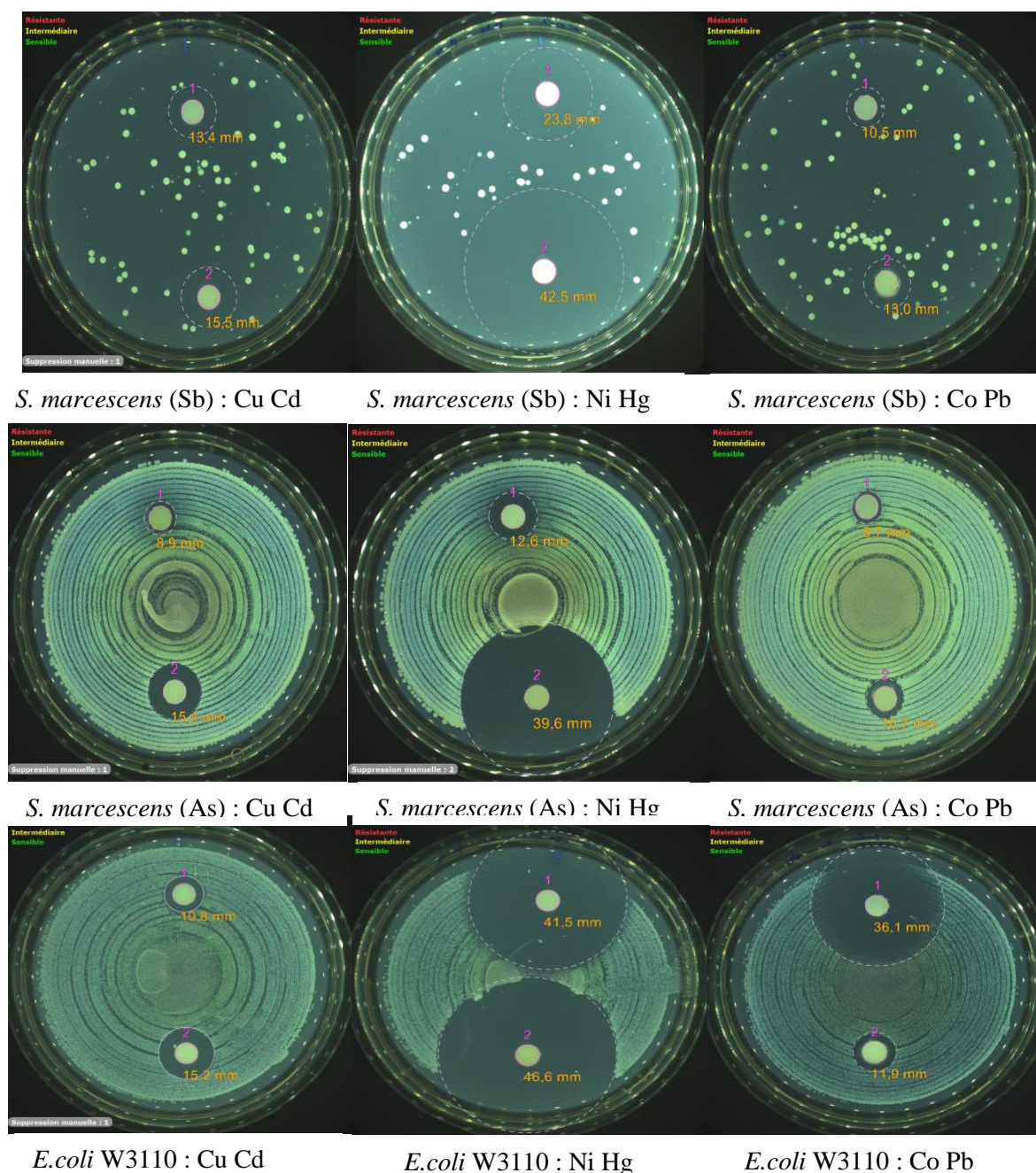


Figure 40 : Zones d'inhibition de la croissance de *S. marcescens* (Sb), de *S. marcescens* (As) et d'*E. coli* W3110, en présence de Cu, de Cd, de Ni, de Hg, de Co et de Pb. Les diamètres sont mesurés avec SCAN 500®, version 7.0.14.0.

Pour chaque métal, les diamètres des zones d'inhibition (mm) ont été mesurés par SCAN 500®, version 7.0.14.0 (**Figure 40**). Les valeurs moyennes des diamètres des zones d'inhibition et les écart-types correspondants sont calculés. Les résultats obtenus sont synthétisés dans la figure 41. On constate que les deux souches étudiées présentent une résistance importante vis-à-vis du nickel et du cobalt, et un moindre degré contre Cu, Cd, Pb et Hg par rapport à la souche de référence.

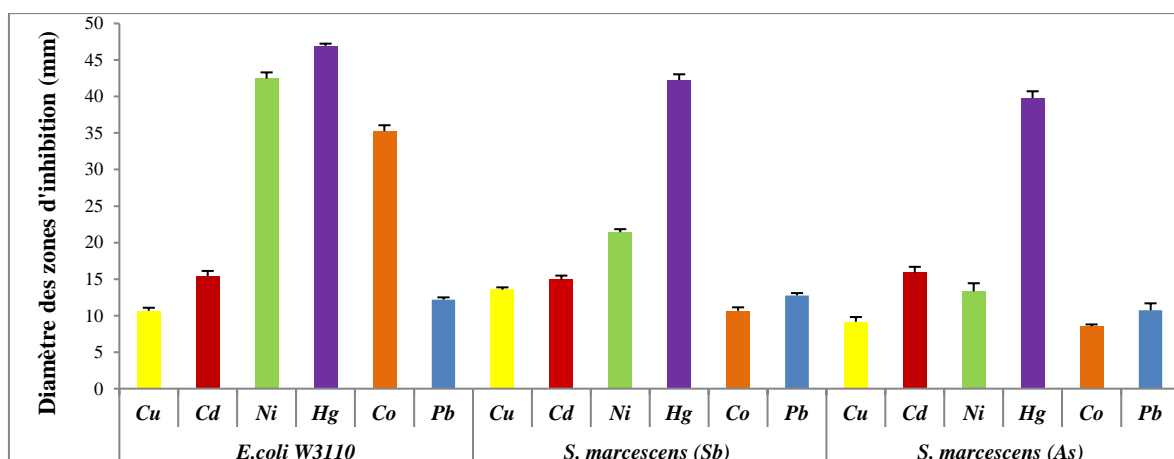


Figure 41 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition de la croissance de *S. marcescens* (Sb), de *S. marcescens* (As) et d'*E. coli* W3110 (W), en présence de Cu, de Cd, de Ni, de Hg, de Co et de Pb

Les CMI des isolats et de la souche de référence vis-à-vis du Ni et du Co ont été mesurées après des cultures en microplaques à 96 puits sur le milieu liquide M63G supplémenté par des concentrations graduelles de nickel et de cobalt. C'est un milieu minimum qui doit être complété par du glucose (**Annexe 1**). Il a été choisi pour éviter la chélation des métaux par les composés présents dans un milieu riche.

Après incubation à 30 °C pendant 24 h, les résultats de l'évolution de la croissance des souches testées sont synthétisés dans la figure 42. Celle-ci montre que quel que soit le métal testé, la croissance est très faible en début d'incubation, puis elle augmente continuellement jusqu'à la fin de l'incubation. Elle montre également un écart d'absorbance en absence et en présence de métaux lourds chez les deux bactéries testées et la souche de référence.

Par ailleurs, l'absorbance est plus importante en absence de toute contamination métallique. Cependant, la croissance bactérienne est dose-dépendante ; elle devient nulle à des seuils métalliques élevés. Ces derniers diffèrent d'une souche à une autre et d'un métal à un autre. Les concentrations minimales inhibitrices détectables par les trois bactéries sont très différentes. En effet, la croissance d'*E. coli* W3110 est complètement inhibée en présence de 3 mM de nickel, alors qu'une concentration plus élevée (4 mM) était tolérée par les endophytes étudiés. Ainsi, *S. marcescens* (Sb) a gardé environ 79 % de son taux de croissance et *S. marcescens* (As) n'a gardé que 31 %. Ces mêmes isolats ont gardé presque 97 % et 83 % de leur viabilité en présence de 2 mM de cobalt ; alors que, 1 mM a provoqué une inhibition totale de la croissance de la souche de référence.

Résultats et discussion

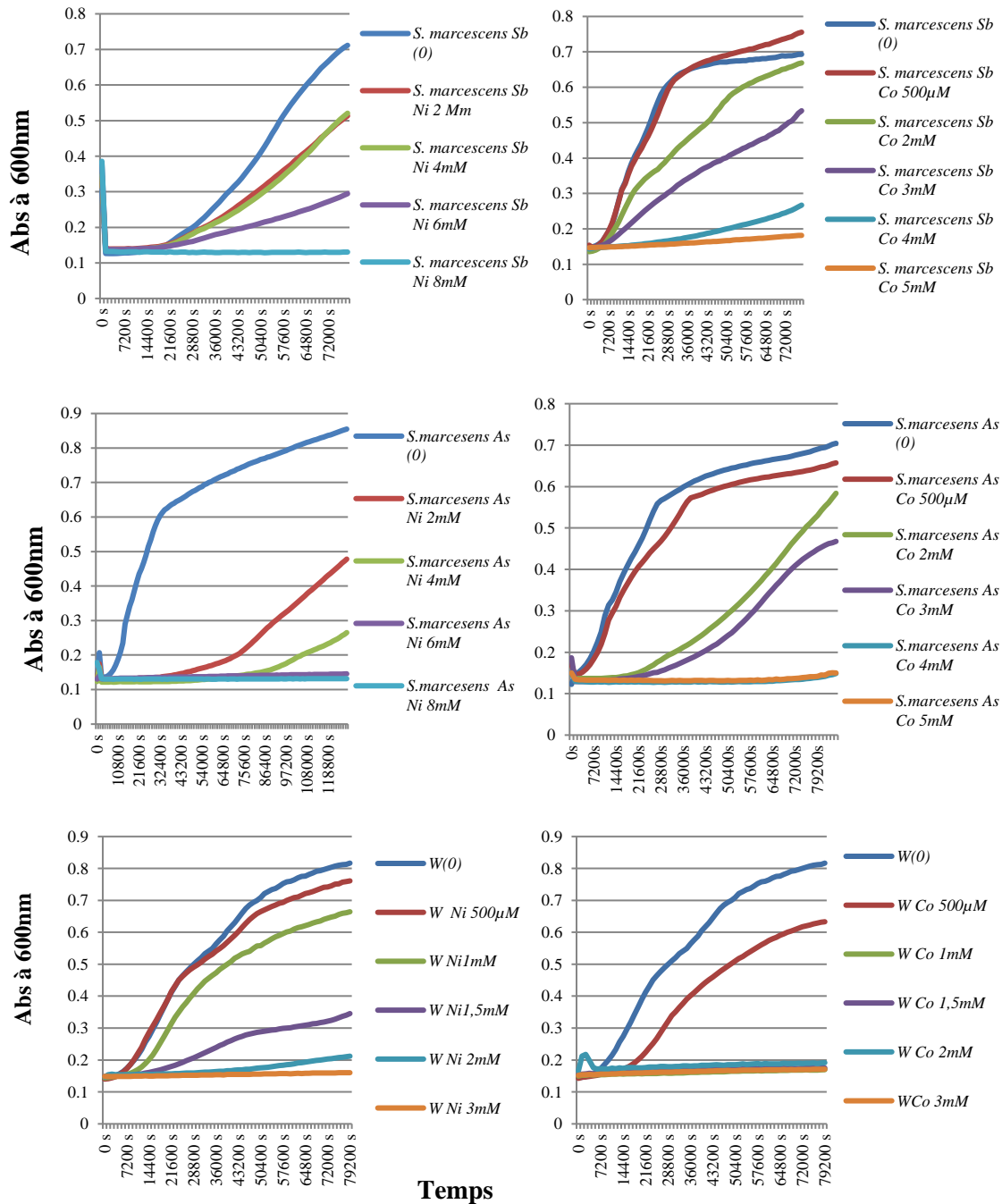


Figure 42 : Profil de croissances de *S. marcescens* (Sb), de *S. marcescens* (As) et d'*E. coli* W3110 (W), en présence de concentrations graduelles de Ni et de Co

Par conséquent, des valeurs des CMI's relativement étendues sont obtenues pour le nickel, elles se situent entre 6 et 8 mM de Ni pour l'endophyte résistant à l'antimoine et entre 4 et 6 mM de Ni pour celui résistant à l'arsenic. De plus, la CMI obtenue pour le cobalt se situe entre 3 et 4 mM de Co pour *S. marcescens* (As) et entre de 4 et 5 mM pour *S. marcescens* (Sb). Ces résultats indiquent que les endophytes étudiés présentent un potentiel de résistance au Ni et au Co, plus important que celui d'*E. coli* W3110.

Dans ce contexte, plusieurs travaux ont montré que les bactéries endophytes isolées à partir de plantes des zones contaminées par les métaux lourds développaient une multirésistance importante vis-à-vis de ces polluants. Cela peut être dû à des mécanismes de résistance intrinsèques ou induits qui réduisent la toxicité des métaux (Xiao et *al.*, 2010). Par exemple, dans l'étude de Guo et *al.* (2010), les isolats endophytes de feuilles de *Solanum nigrum* L. cultivé dans des sols contaminés par le cadmium, ont montré une résistance au Cd, mais également au Pb, au Zn, au Cu et au Cr. Les mêmes résultats sont obtenus par Bestawy et *al.* (2013) qui ont montré, d'une part, que les bactéries isolées de plantes et de leurs rhizosphères, irriguées avec des eaux usées, avaient résisté à des concentrations élevées de Cu, de Cd, de Co et de Cr. D'autre part, cette étude a dévoilé que la résistance des bactéries rhizosphériques aux métaux lourds était supérieure à celle des bactéries endophytes. Par ailleurs, la mesure des CMI correspondant au Pb, Cd, Cu, Co, Ni, Cr et Zn réalisée par Abedinzadeh et *al.* (2019) a révélé que la microflore endophytique du maïs était globalement moins résistante que celle de la rhizosphère, en raison du fait que les bactéries endophytes ne sont pas en contact direct avec l'environnement extérieur (Hallmann et *al.*, 1997).

10 Résistance des deux souches de *S. marcescens* à quelques antibiotiques

L'étude de la résistance aux antibiotiques a été réalisée pour compléter la caractérisation des endophytes étudiés. Celle-ci est effectuée par la méthode de diffusion de disques sur la gélose à l'aide d'un panel de trois antibiotiques, le chloramphénicol (2 ng/mL), l'ampicilline (10 ng/mL) et la kanamycine (5 ng/mL). Les profils de résistance des deux souches isolées sont réalisés par référence à *E. coli* W3110. Les diamètres d'inhibition (mm) mesurés sont portés dans la figure 43, les moyennes des zones d'inhibition de chaque antibiotique et les écart-type correspondants sont synthétisés dans les histogrammes de la figure 44.

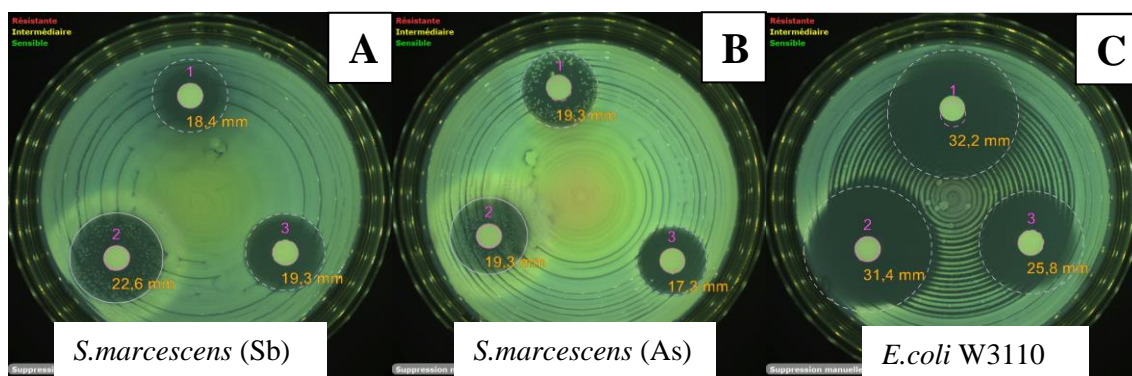


Figure 43 : Zones d'inhibition de la croissance de *S. marcescens* (Sb) (A), de *S. marcescens* (As) (B) et d'*E. coli* W3110 (C), en présence du chloramphénicol (2 ng/mL) (1), de l'ampicilline (10 ng/mL) (2) et de la kanamycine (5 ng/mL) (3). Les diamètres sont mesurés avec SCAN 500®, version 7.0.14.0

Le présent travail révèle une différence significative entre le comportement des souches étudiées et celui de la souche de référence, et ce, vis-à-vis des trois antibiotiques. Les mesures des diamètres des zones d'inhibition de *S. marcescens* ont donné des moyennes différentes pour chaque antibiotique, inférieurs à ceux de la souche de référence ; ce qui montre que la souche de référence est la plus sensible (**Figure 44**).

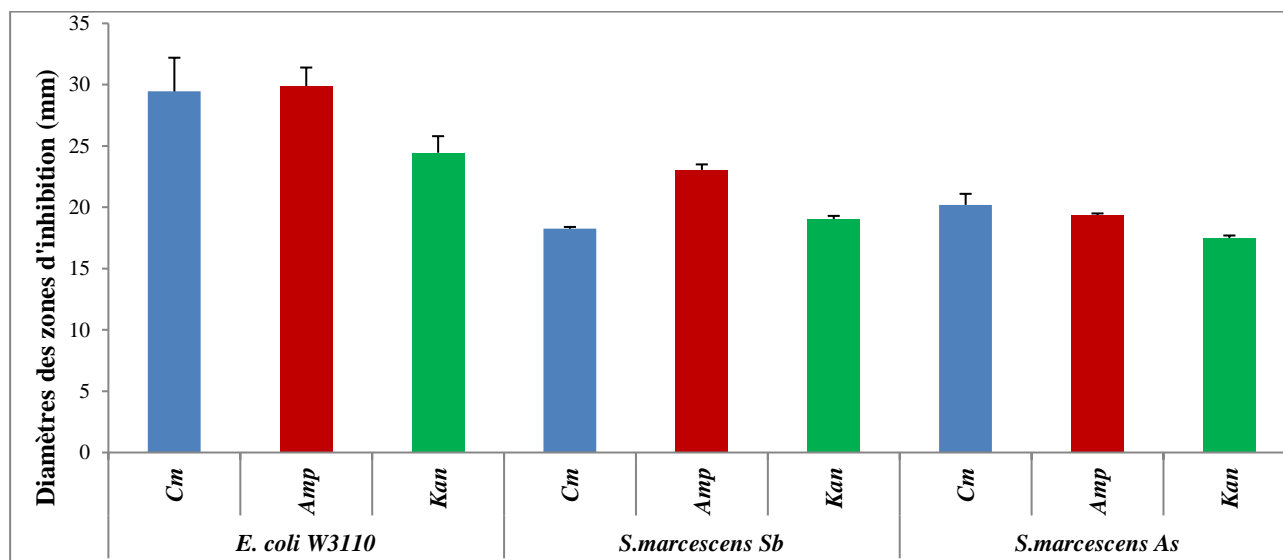


Figure 44 : Moyennes des diamètres des zones d'inhibition de la croissance de *S. marcescens* (Sb), de *S. marcescens* (As) et d'*E. coli* W3110 (W), en présence du chloramphénicol (2 ng/mL) (Cm), de l'ampicilline (10 ng/mL) (Amp) et de la kanamycine (5 ng/mL) (Kan)

La résistance naturelle aux antibiotiques est un phénomène constant et transmissible chez la plupart des bactéries. Les résultats de plusieurs études génétiques ont révélé que cette résistance était généralement codée par le chromosome (Martinez, 2009), des transposons, des intégrons ou des plasmides (Courvalin, 2008 ; Georgopapadakou, 2008).

Selon la littérature, *S. marcescens* présente une multirésistance importante aux antibiotiques, à savoir les β -lactamines, les aminosides et les quinolones. Il est bien établi que cette bactérie peut rapidement développer une résistance à de multiples β -lactamines, car elle héberge un gène, l'*Amp C* chromosomique (Silva et al., 2015). L'augmentation de la fréquence de la résistance de *S. marcescens* aux antibiotiques, notamment aux aminosides et aux quinolones, s'explique par la production d'enzymes modificateurs d'antibiotiques par adénylation, phosphorylation ou acétylation (Silva et al., 2015 ; Belbel et al., 2014 ; Davis et al., 2010). Les gènes codant pour ces enzymes sont généralement situés sur des plasmides transférables (Belbel et al., 2014 ; Yang et al., 2013). Cependant, certaines souches de la même espèce de *S. marcescens* sont naturellement sensibles aux antibiotiques, mais elles

deviennent résistantes, soit par mutations chromosomiques, soit par l'acquisition de gènes étrangers portés sur des éléments mobiles transférables (Gazengel, 2013).

Des études antérieures sur *S. marcescens* FS14, un endophyte isolé d'*Atractylodes macrocephala* Koidz (appelée Baizhu en Chine), ont montré que cette souche était résistante à l'ampicilline (10 µg), à la pénicilline G (10 IU), à la rifampicine (5 µg), à la streptomycine (100 µg) et à la tetracycline (30 µg) ; mais elle était sensible au chloramphénicol (30 µg), à la gentamicine (10 µg) et à la kanamycine (30 µg). Cette résistance dépend du type d'antibiotique et de sa concentration (Li et al., 2015).

11 Relation entre la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds

Les métaux lourds libérés de diverses activités représentent une véritable menace toxicologique, mais également écologique. Ils peuvent avoir également un impact important dans la conservation et la propagation de la résistance des bactéries à ces polluants et aux antibiotiques, en raison des caractéristiques structurelles et fonctionnelles communes de ces deux systèmes de résistance (Baker-Austin et al., 2006). En outre, de nombreux rapports suggèrent que l'exposition des bactéries aux contaminants métalliques dans leurs environnements naturels pourrait jouer un rôle important dans le maintien et la prolifération de la résistance aux antibiotiques (Schulz et Boyd, 2006 ; Seiler et Berendonk, 2012).

Généralement, la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds peut s'exprimer par le même gène (communément appelée résistance croisée) ou bien par deux gènes co-localisés sur le même élément mobile (Di Cesare et al., 2016). Selon Ugur et Ceylan (2003), les déterminants génétiques codant pour la résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques sont portés fréquemment sur les plasmides ; alors que, Baker-Austin et al. (2006) ont montré que ces gènes pouvaient également être situés à proximité des intégrons ou étroitement associés à ceux-ci, souvent sur le même transposon ou le même plasmide. L'ampleur de cette co-résistance est liée à l'abondance de transposons chez les bactéries, notamment celles qui sont isolées des échantillons cliniques et/ou environnementaux.

Dans ce travail, on a pu sélectionner deux endophytes affiliés à l'espèce de *S. marcescens*. Ils ont pu tolérer des concentrations importantes en métalloïdes (Sb et As) et en métaux lourds (Ni et Co) et ils ont présenté une résistance remarquable à la kanamycine (classe des aminosides) (5 ng/mL), au chloramphénicol (classe des phénicoles) (2 ng/mL) et à l'ampicilline (classe des bêta-lactamines) (10 ng/mL) par rapport à la souche de référence. Ce

résultat laisse suggérer l'existence d'une corrélation entre la résistance de ces deux souches aux métaux lourds ainsi qu'aux trois antibiotiques testés.

La co-régulation de la résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds chez les bactéries endophytes a été rapportée par plusieurs auteurs (El-Deeb, 2009 ; Schulz et Boyle, 2006). De plus, plusieurs études précédentes ont montré que les bactéries isolées des différents environnements contaminés par les métaux lourds étaient résistantes à ces derniers et présentaient également une résistance à une large gamme d'antibiotiques. Ainsi, Allen et *al.* (1977) ont isolé des bactéries des milieux contaminés par les métaux lourds ; elles ont été résistantes au plomb, au cobalt, au mercure et au molybdène ainsi à l'ampicilline et au chloramphénicol. De même, Calomiris et *al.* (1984) ont étudié la multitolérance des bactéries vis-à-vis des ions Cu^{2+} , Pb^{2+} et Zn^{2+} et son association significative à la multirésistance aux antibiotiques, contrairement aux germes sensibles. Pal et *al.* (2004) ont pour leur part montré que la bactérie isolée d'un sol contaminé était résistante au Ni et a présenté une résistance multiple à plusieurs antibiotiques. De même, Sevim et Sevim (2015) ont montré une co-résistance de *Bacillus*, isolés des sols de régions industrialisées, vis-à-vis de 17 antibiotiques et 10 métaux. Ces auteurs ont montré que cette résistance était due à des déterminants génétiques portés par le plasmide ; ils ont également confirmé l'existence d'une corrélation entre la résistance aux métaux lourds et celle aux antibiotiques. Par ailleurs, l'étude d'Uhrynowski et *al.* (2019) a montré que le plasmide pSheB de *Shewanella sp.* O23S portait des gènes de résistance à l'arsenic et une large gamme d'antibiotique.

12 Étude moléculaire de la résistance de *S. marcescens* à l'antimoine et à l'arsenic

L'objectif de cette partie vise l'isolement et la caractérisation des gènes impliqués dans la résistance des deux souches de *S. marcescens* à l'antimoine et à l'arsenic. Selon la littérature, les endophytes isolés de plantes poussant sur des sols contaminés par les métaux, possèdent des gènes de résistance localisés sur des plasmides ou des transposons (Busenlehner et *al.*, 2003). Cependant, après le séquençage du génome de plusieurs endophytes bactériens, il apparaît qu'un nombre important de gènes étaient portés par l'ADN chromosomique (Mukherjee et *al.*, 2018). En se basant sur ces données, des techniques de transformation de cellules compétentes ont été effectuées par de l'ADN plasmidique et génomique de *S. marcescens*.

12.1 Recherche de plasmides

Les bactéries monorésistantes à Sb et As sont examinées pour mettre en évidence la présence de l'ADN plasmidique. La figure 45 montre une séparation électrophorétique typique des plasmides des isolats ainsi que leur nombre et leur taille approximative. Selon cette figure, on constate que chacune des souches possédait un seul plasmide. En outre, les plasmides ainsi récupérés avaient des tailles relativement grandes (> 10 kb).

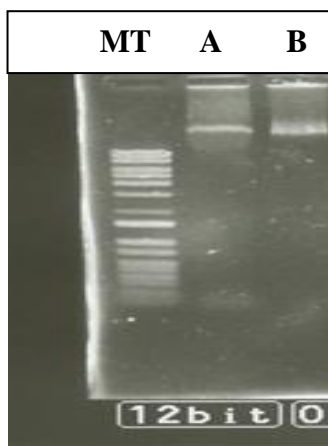


Figure 45 : Profil électrophorétique du plasmide des deux endophytes *S. marcescens* sur le gel d'agarose 0,8 %
 MT : marqueurs de poids moléculaire ; (A) : *S. marcescens* (Sb) ; (B) : *S. marcescens* (As)

Selon la bibliographie, la plupart des souches de *Serratia marcescens* contiennent au moins un plasmide ; dont il code, dans la plupart du temps pour des fonctions conférant un avantage de résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds, à la virulence, aux toxines ou à de nouvelles voies métaboliques (Grimont et Grimont, 2006). De plus, plusieurs bactéries endophytes isolées des feuilles et des tiges de la vigne (*Vitis vinifera* L.) possèdent un à deux plasmides de tailles différentes. Par exemple, parmi les bacilles à Gram négatifs, l'*Enterobacter* 47 et l'*Erwinia* 13 ont deux grands plasmides, tandis que les *Enterobacter* 23 et 18 contiennent un seul grand plasmide. Cependant, *Vibrio*7 possède deux petits plasmides. En outre, les bactéries Gram positif représentées par le genre *Bacillus* hébergent un seul grand plasmide (Altalhi, 2009).

La majorité des plasmides des endophytes portent des gènes transférables aux plantes par conjugaison ; ce qui donne des plantes transgéniques améliorées génétiquement, tolérantes aux différentes conditions environnementales (Piotrowska et al., 2005). Une autre approche alternative utilisée par les endophytes est la sécrétion des produits utiles sans intégration de l'ADN étranger dans le génome de la plante (Barac et al., 2004).

12.2 Transformation par l'ADN plasmidique de *S. marcescens*

Des tests de transformation d'*E. coli* W3110 rendue compétente, par les plasmides de *S. marcescens* (Sb) et de *S. marcescens* (As) ont été réalisés. Les cellules sont étalées sur un milieu sélectif qui ne permet que la croissance des bactéries ayant intégré les plasmides. La sélection des cellules transformées est basée sur des marqueurs phénotypiques de la multirésistance aux antibiotiques (le chloramphénicol, l'ampicilline et la kanamycine) et aux métaux (Sb, As, Ni et Co).

Pour cela, le mélange de transformation est incubé sur la gélose LB contenant l'ampicilline (100µg/mL), la kanamycine (50µg/mL) et le chloramphénicol (20µg/mL), séparément. Deux transformants par le plasmide de *S. marcescens* (Sb) ont été isolés sur le milieu supplémenté par la kanamycine. Ce résultat montre que chez l'endophyte résistant à l'antimoine, les gènes de résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol ne sont éventuellement pas portés par le plasmide, contrairement au gène de résistance à la kanamycine. Cependant, chez l'endophyte résistant à l'arsenic, les gènes responsables de la résistance aux trois antibiotiques ne sont probablement pas plasmidiques.

Les deux transformants obtenus ont été repiqués sur le même milieu liquide, afin d'avoir une suspension bactérienne suffisante pour les étudier et les caractériser. Chaque suspension est ensemencée sur le milieu LB modifié solide additionné de 400 mM de Sb. Après 48 h d'incubation à 30 °C, aucun des deux transformants n'a pu se développer.

Ensuite, les profils de résistance des deux transformants vis-à-vis de Ni et de Co ont été étudiés et comparés à ceux de *S. marcescens* (Sb) et d'*E. coli* W3110 sauvage. Cela, afin de vérifier si les gènes plasmidiques de *S. marcescens* (Sb) confèrent aux transformants une résistance à ces deux ions. Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 46. Ils dévoilent que les transformants possédaient des CMI d'environ 3 mM Ni et 1 mM Co sur milieu M63G. Ces valeurs sont inférieures aux CMI déjà enregistrées chez *S. marcescens* (Sb) (cf. section 10). En effet, aucun des deux transformants n'a été résistant aux métaux étudiés ; la complémentation de la souche sauvage *E. coli* W3110 par les plasmides de l'endophyte *S. marcescens* (Sb) n'a pas restauré le phénotype de la souche sauvage pour les métaux étudiés.

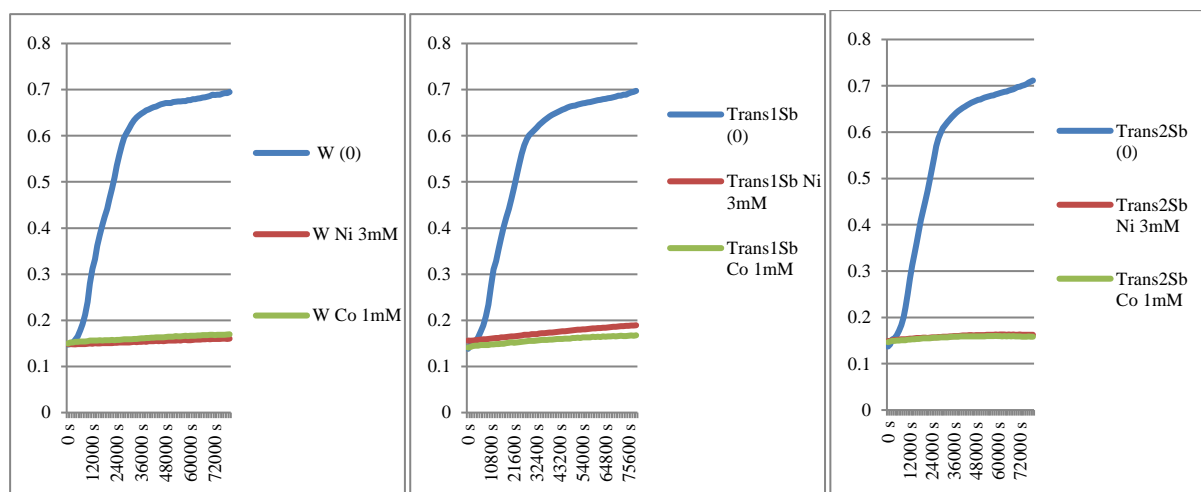


Figure 46 : Profil de croissances d'*E. coli* W3110 (**W**) et les transformants par le plasmide de *S. marcescens* Sb (**Trans Sb**) en présence de 3 mM de Ni et 1 mM de Co sur le milieu M63G

Pour expliquer ces résultats, deux hypothèses peuvent être émises : soit les gènes du plasmide ne sont pas fonctionnels dans la souche sauvage *E. coli* W3110, soit le plasmide ne contient pas les gènes responsables de la résistance à la gamme des métaux utilisée dans ce test. Cependant, plusieurs gènes de résistance à l'arsenic, portés par des plasmides bactériens, sont connus depuis de nombreuses années (Kaur et Rosen, 1992). En effet, cinq gènes, transcrits sous forme d'un seul ARNm polycistronique dans l'ordre *ars* RDABC, ont été trouvés sur les plasmides d'*E. coli* R773 et R46 (Mobley et Rosen, 1982 ; Owolabi et Rosen, 1990 ; Bruhn et *al.*, 1996). Ces opérons *ars* confèrent une résistance à l'arsenic et à l'antimoine au moyen d'un mécanisme d'efflux dépendant de l'ATP.

Plusieurs études menées sur des bactéries résistantes aux métaux lourds ont mis en évidence des gènes plasmidiques. Seget et *al.* (2005) ont trouvé que les déterminants génétiques de la résistance aux métaux lourds chez des bactéries cliniques et environnementales se trouvaient fréquemment sur des plasmides ou des transposons. Récemment, Jayaprakashvel et *al.* (2017) ont trouvé que la résistance de *Pseudomonas* sp. AMET1221 est médiée par un gène porté par un grand plasmide. Il en est de même pour Adekanmbi et *al.* (2019) qui ont montré que des souches isolées des eaux usées des imprimeries possédaient un grand plasmide porteur de gènes de résistance au cuivre (*Bacillus stratosphericus* PW1b), au chrome (*Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa* et *Providencia vermicola*) et au plomb (*P. aeruginosa*). Par ailleurs, l'étude du génome de *Shewanella* sp. O23S résistante à l'arsenic par Uhrynowski et *al.* (2019) a montré que cette souche hébergeait un plasmide pSheB porteur de gène de respiration (*arr*) et de l'opéron (*ars*) ; ce qui confère aux cellules hôtes des capacités de respiration et de résistance à l'arsenic.

D'autres études ont, par ailleurs, indiqué des résultats différents. El-Deeb (2009) a isolé *Enterobacter sp.*, un endophyte des feuilles d'*Eichhornia crassipes*, capable de vivre dans un milieu contenant des ions de cadmium et de zinc, grâce à la présence d'un gène porté par un grand plasmide. Cependant, la capacité de cet endophyte de vivre dans un milieu riche en plomb est médiée par un gène localisé sur son chromosome. Roane et Kellog (1996) et Roane (1999) ont pour leur part mis en évidence des isolats bactériens, prélevés de sols contaminés, résistants au plomb et dépourvus de plasmides.

12.3 Transformation par l'ADN génomique de *S. marcescens*

Seule la souche *S. marcescens* (Sb) a été choisie pour caractériser le(s) gène(s) chromosomique(s) responsable(s) de son phénotype de résistance à l'antimoine, et ce, d'une part, parce que l'antimoine est un analogue de l'arsenic; pour cela, les mécanismes de résistance exploités par les bactéries contre ces métalloïdes sont semblables et elles sont codés par les mêmes déterminants génétiques (Brattin et al., 2013). D'autre part, en raison du peu de publications ayant étudié les gènes bactériens de résistance à l'antimoine. De plus, l'antimoine est le métalloïde le plus abondant dans la zone d'échantillonnage (Benhamdi et al., 2014).

Notre démarche a pour but d'établir une banque d'ADN génomique de *S. marcescens* (Sb) en utilisant le clonage. Elle consiste à insérer un fragment d'ADN nommé *insert*, dans le plasmide pUC18, qui sert comme vecteur. Le nouveau plasmide ainsi créé sera ensuite introduit par électroporation dans une cellule hôte, *E. coli* Top ten. Celle-ci sera alors sélectionnée et multipliée afin d'obtenir une grande quantité du plasmide d'intérêt.

L'ADN total de l'endophyte *S. marcescens* (Sb) déjà extrait (**Figure 27**) est hydrolysé avec la nucléase de restriction, *Sau3A*, (**Figure 47**). Alors que le plasmide pUC18 a été hydrolysé séparément avec *BamH1* (**Figure 48**). Le choix de ces enzymes est basé sur la génération des séquences complémentaires entre les fragments d'ADN génomique et les sites multiples de clonage sur le plasmide linéarisé. *Sau3A* est une enzyme de restriction couramment utilisée dans la construction de banques d'ADN. Elle coupe très fréquemment l'ADN au site palindromique GATC, elle produit des extrémités cohésives (5' GATC) compatibles avec les extrémités générées après digestion du vecteur pUC18 par *BamHI*; sachant que cette enzyme coupe au palindrome GATCXC et génère également des extrémités collantes.

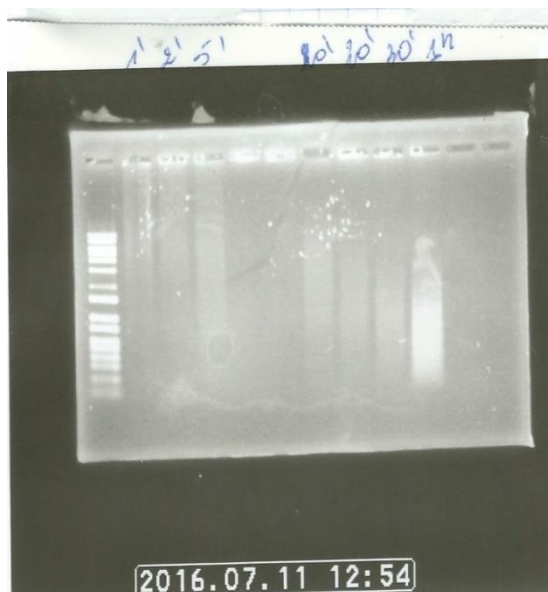


Figure 47: Digestion de l'ADN génomique de *S. marcescens* (Sb) par *Sau3A*

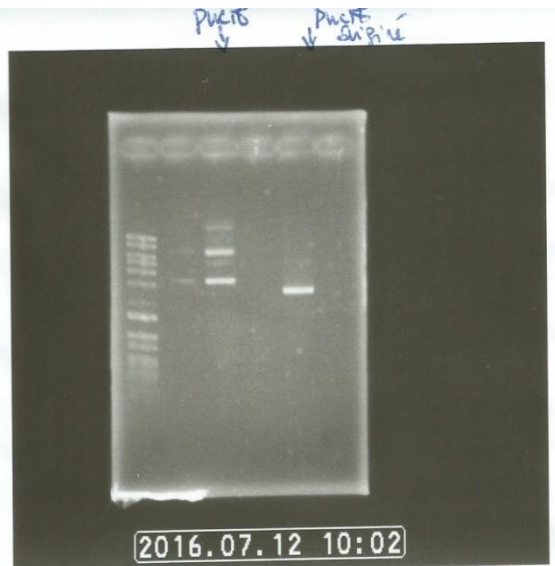


Figure 48: Digestion du plasmide pUC18 par *Bam*HI

Les fragments d'ADN résultants de la digestion du génome de *S. marcescens* (Sb) sont clonés dans le vecteur pUC18 préalablement linéarisé puis déphosphorylé par une phosphatase alcaline qui libère le phosphate des extrémités 5'. Cette étape de déphosphorylation est indispensable afin d'empêcher la recirculation du plasmide.

L'insertion des fragments d'ADN génomique sur le vecteur est assurée par la T₄ DNA ligase en présence d'ATP. Celle-ci scelle de façon covalente les plasmides et forme par la suite un nouveau plasmide circulaire contenant le gène de résistance pour l'ampicilline et probablement un *insert* d'ADN génomique. Il faut alors indiquer qu'à cette étape, certains plasmides sont refermés sans aucune molécule d'ADN étrangère. Par conséquent, après transformation par électroporation des plasmides ligaturés dans *E. coli* Top ten, les transformants ainsi obtenus peuvent pousser sur un milieu de culture contenant l'ampicilline.

Afin de discriminer les bactéries avec plasmides sans *insert* des bactéries avec plasmides recombinants, un système enzymatique appartenant à l'opéron lactose est utilisé. Dans le plasmide pUC18 il existe un fragment du gène *lacZ* de l'opéron, le peptide alpha (*lacZ*_o), qui code pour la β -galactosidase. Celle-ci transforme le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) incolore en galactose et X (5-bromo-4-chloro-3-indolol). Ce dernier est un produit de couleur bleue insoluble qui s'accumule dans les cellules. Pour pouvoir métaboliser le X-gal, la cellule doit être exposée à un inducteur, l'IPTG (Isopropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside).

L'insertion du fragment d'ADN dans le plasmide doit inactiver le gène *lacZ*, car l'expression du peptide complémentaire de la β -galactosidase est interrompue et la bactérie ne pourra plus digérer ni le lactose, ni le X-Gal. Par conséquent, les bactéries transfectées par le vecteur recombinant forment donc des colonies blanches. Cependant, en absence d'insert, le gène *lacZ* sera fonctionnel et la colonie bactérienne deviendra bleue. Ce phénotype bleu/blanc est donc un moyen de sélectionner visuellement des bactéries qui contiennent le plasmide avec insert. De plus, la présence de ce colorant donne la preuve de l'activité de la β -galactosidase, donc de son expression à partir du gène, et par conséquent de la viabilité du vecteur transfecté dans les bactéries.

Les cultures dans le milieu LB gélosé en présence d'IPTG, de X-gal et de l'ampicilline, ont donné 39 colonies bleues et 98 colonies blanches (**Figure 49**). Les premières sont résistantes à l'ampicilline et transformées par des plasmides non recombinants et les secondes, sont également résistantes à l'ampicilline mais transformées par les plasmides recombinants. Celles-ci ont perdu la capacité de cliver le X-gal par la β -galactosidase. Les colonies blanches sont repiquées sur des boîtes contenant de l'ampicilline pour le criblage. Elles constituent une génothèque de la souche *S. marcescens* (Sb) où les individus de chaque colonie sont un clone (transformant) ; ils sont génétiquement identiques et contiennent le même fragment d'ADN génomique de la souche étudiée. Par contre, dans cette collection de colonies, chacune est différente des autres, car elle contient un fragment d'ADN différent.

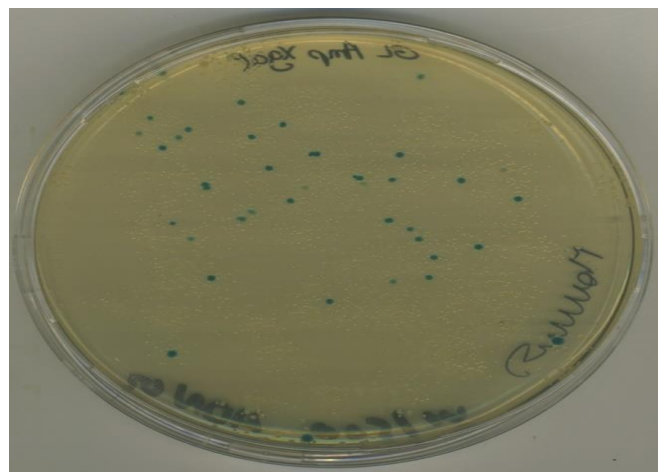


Figure 49 : Résultats de la transformation d'*E. coli* Top ten par l'ADN génomique de *S. marcescens* (Sb) en utilisant le plasmide pUC18 comme vecteur

12.4 Criblage de la banque génomique

Le criblage de la banque d'ADN génomique de *S. marcescens* (Sb) consiste à trouver des clones répondant à la présence de concentrations élevées en Sb. Pour cela, la banque est transférée sur des boîtes de Pétri contenant du milieu LB modifié solide dans lequel le Sb est ajouté à une concentration de 400 mM. Ce premier criblage a permis de sélectionner 6 clones résistants (**Figure 50**). Ils sont considérés comme candidats potentiels portant le gène d'intérêt.

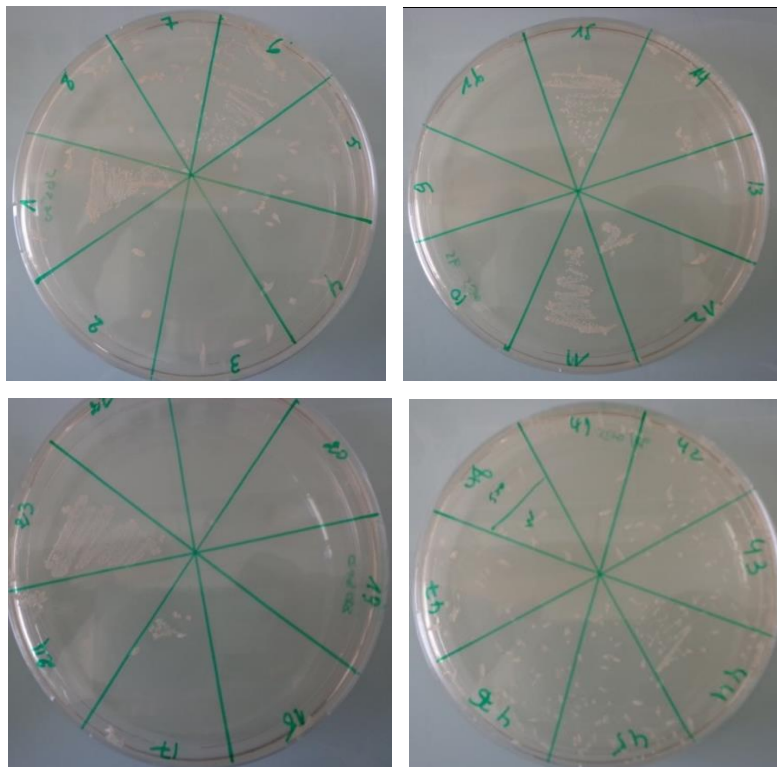


Figure 50 : Criblage de la génothèque de l'endophyte *S. marcescens* (Sb) sur le milieu LB modifié solide supplémenté par 400 mM de Sb

Le second criblage consiste à exposer les six clones à la même concentration, mais sur milieu LB modifié liquide. Cette fois, seul le clone 44 a pu pousser en présence de cette quantité de Sb. Afin de confirmer ces résultats, des cinétiques de 24 heures en milieu LB liquide modifié, contenant différentes concentrations en Sb, sont réalisées à partir de la phase exponentielle de croissance du clone 44, de *S. marcescens* (Sb) et d'*E. coli* W3110. La réponse des trois souches à la présence de concentrations graduelles en antimoine est synthétisée dans la figure 51. Cette dernière indique que l'isolat 44 avait résisté à des concentrations élevées en Sb avec une diminution de la densité cellulaire d'environ 51 % à 200 mM de Sb.

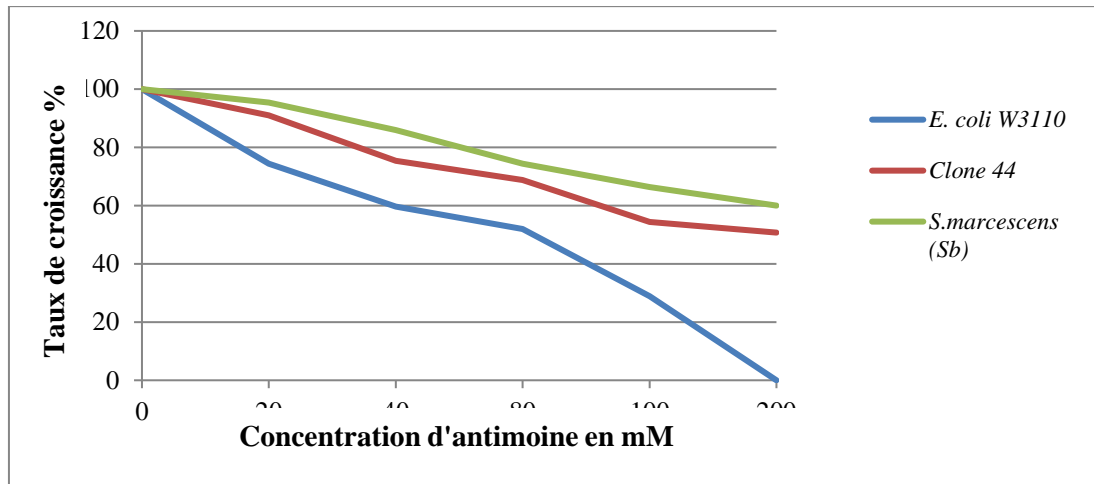


Figure 51 : Taux de croissance du clone 44, de *S. marcescens* (Sb) et d'*E. coli* W3110 (W) en présence de concentrations graduelles en Sb dans le milieu LB modifié liquide

À l'issue de cette partie du travail, il a été constaté que le fragment d'ADN génomique de *S. marcescens* (Sb), porté par le plasmide recombinant du clone 44, était capable de lui conférer une résistance à 400 mM d'antimoine sur milieu solide et jusqu'à 200 mM sur milieu liquide, ce qui suggère qu'une partie du système génétique responsable de cette résistance est porté par le chromosome et qu'il est fonctionnel dans *E. coli* sensible à ces concentrations.

L'antimoine et l'arsenic sont des analogues qui partagent les mêmes propriétés physicochimiques et biologiques (Wang et al., 2015). Selon la littérature, il a été montré que les mécanismes de résistance exploités par les bactéries contre ces métalloïdes sont semblables (Brattin et al., 2013). En effet, la résistance à l'arsenic (AsIII et AsV) et à l'antimoine (SbIII) est assurée par des protéines codées par l'opéron *ars* qui est répandu chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Silver et Phung, 2005a). Cet opéron code pour la protéine ArsB transporteur d'efflux chimiosmotique d'AsIII et de SbIII et pour la protéine ArsC qui agit comme une arséniate réductase qui réduit l'AsV en AsIII avant son exportation (Rosen et al., 1999). En se basant sur ces données de la littérature scientifique, on peut suggérer que les deux souches *S. marcescens* (Sb) (résistante à l'antimoine) et *S. marcescens* (As) (résistante à l'arsenic) peuvent contenir des déterminants génétiques identiques, portés par leurs chromosomes, pour faire face à la toxicité de ces métalloïdes.

Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus par Cai et al. (1998) qui ont rapporté que l'opéron *ars* porté par le chromosome de *P. aeruginosa* confère une augmentation de la résistance à l'arsenic et l'antimoine chez cette souche, et même chez *E. coli* sensible à l'arsenic. Muller (2004) a également trouvé que la souche *Cenibacterium*

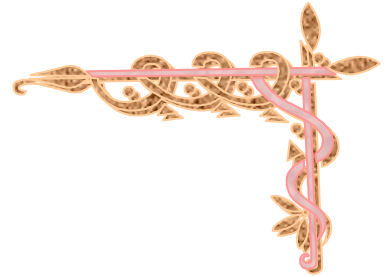
arsenoxidans ULPAs1 sp. nov., dépourvue de tout plasmide, était résistante à l'arsenic grâce aux opérons *ars* et *aox* codés par le chromosome bactérien. De même, Duquesne et al. (2008) ont dévoilé que *Thiomonas arsenitoxydans*, résistante vis-à-vis de l'arsenic était capable d'oxyder l'arsénite en arsénate pour minimiser sa toxicité. Slyemi et al. (2011) ont trouvé, pour leur part, que le génome de *T. arsenitoxydans* était constitué d'un chromosome et d'un plasmide ; le chromosome contenait des gènes impliqués dans la résistance à ce métalloïde. De plus, Su et al. (2012) ont montré la présence de l'opéron *ars* sur le chromosome d'*E. cloacae* LSJC7 résistant à l'As qui permet à la souche de se détoxifier de l'arséniate, de l'arsénite et de l'antimonite.

Les études de Román-Ponce et al. (2015) et de Mukherjee et al. (2018) sur des bactéries endophytes homologues et résistantes à l'As, ont révélé la présence d'un opéron *ars* chromosomique ou plasmidique pour la détoxification d'As. C'est le cas de la souche *Kocuria arsenatis* isolée du *Prosopis laegivata* poussant sur des résidus miniers riche en As et les deux souches *Kocuria* sp. LC5 et *Kocuria palustris* isolées de *Lantana camara* tolérante à l'As.

Ce système de résistance à l'antimoine présente des particularités originales méritant des études plus approfondies, basées essentiellement sur la récupération de l'*insert* porté sur le plasmide du clone 44 puis son séquençage.



Conclusion



Conclusion

L'activité minière a intensifié les problèmes de pollution de l'environnement, particulièrement par l'accumulation des métaux lourds. En Algérie, l'ancienne exploitation du minerai d'antimoine du Djebel Hamimat a généré une importante quantité de déblais. Ceux-ci ont été à l'origine de niveaux très élevés en antimoine (Sb) et en arsenic (As) dans les sols qui les entourent. Cette situation a abouti à des modifications de la végétation spontanée et à la survie d'un certain nombre de phytotaxons tolérants ou résistants, tels que *H. pallidum* et *L. spartum*.

De ce fait, notre travail a porté sur l'étude de la biodiversité des bactéries associatives aux racines d'*H. pallidum* et de *L. spartum*. Les expériences de l'isolement ont permis de sélectionner une large collection de bactéries endophytes : 148 bactéries endophytes des racines d'*H. pallidum* et 110 des racines de *L. spartum*. L'étude phénotypique, basée sur des caractères morphologiques et biochimiques a permis de révéler une grande hétérogénéité au sein de cette flore.

Le *screening* effectué sur cette collection de bactéries endophytes a permis de repérer deux bactéries possédant les plus hautes CMI, à savoir 450 mM de Sb et 175 mM d'As. Celles-ci sont considérées comme les plus résistantes à ces métalloïdes. L'identification génotypique des deux bactéries a été réalisée par le séquençage et la comparaison de leur gène d'ARNr 16S avec les données de *GenBank* ; elle a confirmé leur identification phénotypique et a révélé une grande ressemblance entre les deux souches. Elles sont affiliées à l'espèce *Serratia marcescens* avec une similitude de 99 %.

L'étude *in vitro* de la réponse biochimique des souches de *S. marcescens* en présence de Sb et d'As dans le milieu de culture a provoqué la production d'hydrogène peroxyde à des niveaux élevés, ce qui a entraîné une peroxydation lipidique et par la suite, une légère diminution de la croissance bactérienne malgré la toxicité du milieu ; cela traduit l'adaptation des deux bactéries aux concentrations excessives en métalloïdes. A l'origine de la tolérance à des doses élevées en métalloïdes, les deux souches de *S. marcescens* ont pris en charge les ERO par la production de la proline et l'induction des enzymes antioxydantes (CAT, POD, APX et SOD). Cette réponse antioxydante varie d'une espèce à une autre, et d'un métalloïde à un autre.

L'activation du système antioxydant pour diminuer le stress oxydatif généré par la toxicité des métalloïdes est une autre preuve de l'adaptation des souches de *S. marcescens* à la toxicité de ces polluants présents dans leur milieu de culture ; ceci suggère que ces bactéries pourraient être des symbiotes d'*H. pallidum* et de *L. spartum* impliquées dans l'aptitude des plantes à se développer sur les déblais miniers d'antimoine.

L'étude de la culture des deux souches de *S. marcescens* en présence d'une gamme de métaux lourds et d'antibiotiques, a révélé une résistance multiple au nickel et au cobalt, ainsi qu'une résistance à la kanamycine, à l'ampicilline et au chloramphénicol.

Les expérimentations portées sur la production de biofilm par les deux souches de *S. marcescens* ont révélé qu'elles sont capables de former des biofilms de densités cellulaires différentes après 24 h d'incubation. Ce mode de regroupement en biofilm permet la diminution de la toxicité des du Sb et d'As. Ce mécanisme cellulaire adopté par *S. marcescens* pour lutter contre la toxicité des métalloïdes additionnés au milieu de culture, peut être l'un des mécanismes potentiels pour la bioremédiation des sols et des environnements aquatiques contaminés par les métaux lourds.

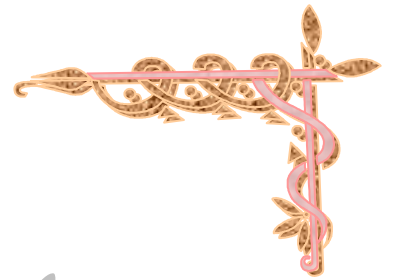
Par ailleurs, la caractérisation des gènes impliqués dans la résistance des endophytes de *S. marcescens* à l'antimoine et à l'arsenic a été réalisée *via* des procédés de transformation de cellules compétentes. Elle fait ressortir que les déterminants génétiques responsables de la résistance aux métalloïdes testés ne sont pas portés par les plasmides. De plus, ces mêmes procédés ont confirmé que la résistance de *S. marcescens* à l'antimoine était codée par un gène chromosomique.

D'une manière générale, nos résultats soulignent la diversité des réponses adaptatives des endophytes bactériens, *S. marcescens*, au stress métallique. Pour résister à la toxicité des métalloïdes, ces souches ont mis en œuvre plusieurs stratégies biochimiques et cellulaires à savoir la production de la proline, l'activation du système enzymatique antioxydant et l'organisation des cellules en biofilms. Ceci pourrait faire de *S. marcescens*, seule ou associée à une plante hôte, une candidate potentielle pour la bioremédiation des sols et des environnements aquatiques métallifères.

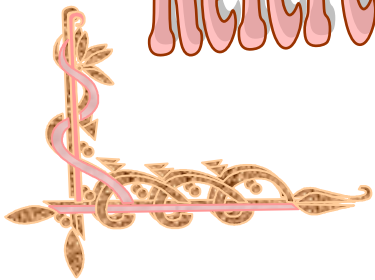
L'originalité de ces travaux, permettant l'évaluation de la diversité des bactéries endophytes associées aux racines d'*H. pallidum* et de *L. spartum*, constitue une valeur

scientifique considérable et prometteuse. Cependant, l'ouverture de nouvelles perspectives, dans le but de rentabiliser davantage nos investigations, serait judicieuse :

1. Compléter l'étude de la réponse antioxydante par la mesure d'autres biomarqueurs, notamment la GST.
2. Dosage des biomarqueurs du stress oxydatif à des concentrations plus élevées.
3. Compléter l'étude moléculaire *via* le séquençage du gène de résistance porté par le clone 44.
4. Exposer le clone 44 à des concentrations élevées en As, pour vérifier si le gène de résistance à l'antimoine confère à ce clone une résistance à l'arsenic.
5. Procéder à l'inoculation de ces bactéries endophytes à d'autres plantes pour pouvoir vérifier leur faculté à bioremédier des sols contaminés par les métaux lourds.
6. Mener des études histologiques permettant la localisation de ces bactéries à l'intérieur des tissus des plantes inoculées.
7. Examiner le pouvoir de ces endophytes à contribuer à la bioprotection des plantes hôtes contre certains agents pathogènes.



Références bibliographiques



A

- Abbas S. Z., Riaz M., Ramzan N., Zahid M. T., Shakoory F. R., Rafatullah M. 2014. Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater. *Braz. J. Microbiol.* 45 (4) :1309-1315.
- Abdelkrim S., Jebara S.H., Saadani O., Chiboub M., Abid G., Mannai K., Jebara M. 2019. Heavy metal accumulation in *Lathyrus sativus* growing in contaminated soils and identification of symbiotic resistant bacteria. *Arch. Microbiol.* 201: 107-121.
- Abedinzadeh M., Etesami H. , Alikhani H. A. 2019. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. *Biotech. Rep. (Amst).* 2019 Mar, 21: e00305.
- Achour-Rokbani A. 2008. Etude du système ars bactérien de résistance à l'arsenic : Diversité des transporteurs d'arsénite et analyse moléculaire d'un opéron ars. Thèse de doctorat. Université Paul Verlaine de Metz : 117-111.
- Adekanmbi A. O., Adelowo O. O., Okoh A. I., Fagade O.E. 2019. Metal-resistance encoding gene-fingerprints in some bacteria isolated from wastewaters of selected printerries in Ibadan, South-western Nigeria. *J. Taibah Univ. Sci.* 13(1): 266-273.
- Adler R.A., Claassen M., Godfrey L., Turton A.R. 2007. Water, mining and waste: An historical and economic perspective on conflict management in South Africa. *Econ. Peace Secur. J.* 2: 32–41.
- Adriano D.C. 2001. Trace elements in terrestrial environments: Biochemistry, bioavailability and risks of metals. Springer-Verlag, New York : 867.
- Ahemad M., Khan M.S. 2012. Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere.* 86:945–950.
- Ahmad M., Pataczek L., Hilger T.H., Zahir Z.A., Hussain A., Rasche F., Schafleitner R., Solberg S.O. 2018. Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. *Front. Microbiol.* 9:2992.
- Akkoyun A. M., Özdemir S., Kılınç E., Emre B. 2019. Investigations of Hg (II) and Pb (II) tolerance, removal and bioaccumulation and their effects on antioxidant enzymes on thermophilic *Exiguobacterium profundum*. *Hum. Ecol. Risk Asses. Int. J.* 1234-1253.
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2012 : L'essentiel de la biologie cellulaire. Lavoisier, Paris, France : 364-371.
- Allen D. A., Austin B., Colwell R. R. 1977. Antibiotic resistance patterns of metal tolerant bacteria isolated from an Estuary. *Antimicrob. Ag. Chemother.* 12:545-547.
- Alloway B.J. 1995. Heavy metals in soils. Edited by Alloway, B. J. (Dir) London: Blackie Academic and Professional : 368.
- Altalhi A.D. 2009. Plasmids profiles, antibiotic and heavy metal resistance incidence of endophytic bacteria isolated from grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Afr. J. Biotech.*8 (21): 5873-5882.
- Alvarez R. J., Ortiz Silla R., Alcaraz Ariza F. 2001. Edaphic characterization and soil ionic composition influencing plant zonation in a semiarid Mediterranean salt marsh. *Geoderma.* 99: 81-98.
- Anjum N., R. Chandra. 2015. Endophytic bacteria: Optimizatopn of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. *Asian. J. Pharm. Clin. Res.* 8(4):233-238.
- Ankri S., Serebrijski I., Reyes O., Leblon G. 1996. Mutations in the *Corynebacterium glutamicum* proline biosynthetic pathway: a natural bypass of th proA step. *J. Bacteriol.* 178: 4412-4419.
- Ann M. H., Dietz B. W., David B. M., Julie C., Brett T., John I. Y. 2003. Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecolo. Soc. Am.* 84 (4) :858- 868.
- Ansari M.I., Malik A. 2007. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with wastewater. *Bioresour. Technol.* 98: 3149–3153.
- Antonyuk S. V., Melik-Adamyan V. R., Popov A. N., Lamzin V. S., Hempstead P. D., Harrison P. M., Artymyuk P. J., Barynin V. V. 2000. Three-dimensional structure of the enzyme imanganese catalase from *Thermus thermophilus* at 1 angstrom resolution. *CrysT. Rep.* 45: 105-116.

- Anuradha V. G. N. A., Geetha M., Gautam P. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiol.*4:11.
- Appenroth K. J. 2010. Definition of “Heavy Metals” and their role in biological systems. In: Sherameti A, Verma A (eds) *Soil heavy metals*. Springer. Berlin:19–29.
- Araujo W.L., Maccheroni W., Aguilar-Vildosa C.I., Barrosa P.A.V., Saridakis H.O., Azevedo J.L. 2002. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Can. J. Microbiol.* 47:229–236.
- Arivalagan P., Singaraj D., Haridass V., Kaliannan T. 2014. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. *Ecol. Eng.* 71:728–735.
- Arnér E. S. J., Holmgren A. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Euro. J. Biochem.* 267(20): 6102-6109.
- Aubert H., Pinta M. 1977. Trace element in soils. Elsevier. Amsterdam: 395.
- Ayangbenro A. S., Babalola O. O. 2017. A new strategy for heavy metal polluted environments: a review of microbial biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 14:94.

B

- Baath E. 1992. Measurement of heavy metal tolerance of soil bacteria using thymidine incorporation into bacteria extracted after homogenization-centrifugation. *J. Soil. Biochem.* 24: 1167-1172.
- Babich H., Stotzky G. 1980. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 8: 99-145.
- Bachate S.P., Cavalca L., Andreoni V. 2009. Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. *J. App. Microbiol.* 107: 145–156.
- Bacon C.W., Hinton D.M. 1996. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: *Manual of Environmental Microbiology* (Hurst C.J., Knudsen G.R., McInerney M.J. and L.D. Stetzenbach, eds.). ASM Press, Washington : 413-421.
- Badyal S.K., Metcalfe C.L., Basran J., Efimov I., Moody P.C., Raven E.L. 2008. Iron oxidation state modulates active site structure in a heme peroxidase. *Biochem.* 47(15): 4403-4409.
- Bahar M.M., Megharaj M., Naidu R. 2013. Kinetics of arsenite oxidation by *Variovorax* sp. MM-1 isolated from a soil and identification of arsenite oxidase gene. *J. Hazard. Mater.* 262 : 997-1003.
- Baker-Austin C., Wright M. S., Stepanauskas R., McArthur J. V. 2006. Coselection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiol.* 14:176-182.
- Bandowe B. A. M., Bigalke M., Boamah L., Nyarko E., Saalia F. K., Wilcke W. 2014. Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and health risk assessment. *Environ. Int.* 65:135–146;
- Banjerdkij P., Vattanaviboon P., Mongkolsuk S. 2005. Exposure to cadmium elevates expression of genes in the oxyr and ohrr regulons and induces crossresistance to peroxide killing treatment in *Xanthomonas campestris*. *App. Environ. Microbiol.*71(4): 1843-1849.
- Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen L., Colpaert J.V., Vangronsveld J., Vander der Lelie D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble volatile, organic pollutant. *Nat. Biotech.* 22: 583-588.
- Barkay T., Gillman M., Turner R.R. 1997. Effects of dissolved organic carbon and salinity on bioavailability of mercury. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 :4267-4270.
- Barkay T., Miller S.M., Summers A. O. 2003. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2-3). 355–384.
- Bary A. 1866. Morphologie and Physiologie der Pilze, Flechten and Myxomyceten, Holfmeister's Handbook of Physiological Botany. Germany : Leipzig; vol. 2.
- Battaglia-Brunet F., Joulain C., Garrido F., Dictor M.C., Morin D., Coupland K., Barrie Johnson D., Hallberg K.B., Baranger P. 2006. Oxidation of arsenite by *Thiomonas* strains and characterization of *Thiomonas arsenivorans* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 89(1):99-108.
- Belbel Z., Chettibi H., Dekhil M., Ladjama A., Nedjai S., Rolain J.M. 2014. Outbreak of an armA methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric algerian hospital. *Microb. Drug. Resist.* 20: 310-315.

- Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L. 2005. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant. Physiol.* 17 : 21-34.
- Benedetto M. 1997. Méthodes spectrophotométriques d'analyse et de caractérisation, métaux lourds, Axe "Génie des procédés", centre SPIN, école des mines de Saint-Etienne : 5
- Benhamdi A., Bentellis A., Rached O., Laing G.D, Mechakra A. 2014. Effects of antimony and arsenic on antioxidant enzyme activities of two steppic plant species in an old antimony mining area. *Biol. Trace. Elem. Res.* 158: 96–104.
- Benov L.T., Fridovich I. 1994. *Escherichia coli* expresses a copper and zinc containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 269 : 25310–25314
- Bentellis Mosbah A. 2014. Etude écologique de la végétation des bordures d'un oued en région semi aride : cas de l'oued Dahimine (Wilaya de Oum El Bouaghi). Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université des frères Mentouri Constantine, Algérie. 79-111.
- Bentley R., Chasteen T.G. 2002. Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony and bismuth. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 250–271.
- Bertrand H., Plassard C., Pinochet X., Touraine B., Normand P., Cleyet-Marel J. C. 2000. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can. J. Microbiol.* 46 (3): 229-36.
- Bestawy E.E., 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.
- Bhaskar P.V., Bhosle N.B. 2006. Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): a carrier of heavy metals in the marine food-chain. *Environ. Int.* 32 (2):191-198.
- Bhatt I., Tripathi B.N. 2011. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. *Biotech. Adv.* 29:850–859
- Biney C. A. T., Amuzu A. T., Calamari D., Kaba N., Mbome I.L., Naeve H., Ochumba P. B. O., Osibanjo O., Radegonde V., Saad M. A. H. 1994. Review of heavy-metals in the African aquatic environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 28:134-159.
- Birnboim H.C., Doly J., 1979. A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 :1513-1523.
- Blanchard C. 2000. Caractérisation de la mobilisation potentielle des polluants inorganiques dans les sols pollués. *Thèse de doctorat*. Institut national des sciences appliquées, Lyon, France : 301.
- Blokhina O., Fagerstedt K. V. 2010. Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiol. Plant.* 138 (4): 447– 462.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot.* 91:179 -194.
- Blundell M.R., Wild D.G. 1969. Inhibition of bacterial growth by metal salts. A survey of effects on the synthesis of ribonucleic acid and protein. *Biochem. J.* 115:207-211.
- Booth G., Stalker T.J., Lefer A.M., Scalia R. 2002. Mechanisms of amelioration of glucose-induced endothelial dysfunction following inhibition of protein kinase C in vivo. *Diabetes.* 51 :1556-1564.
- Borg J., Reeber A. 2004. *Biochimie métabolique*. Ellipses : 240.
- Boublenza F. 2013. Etude de stress osmotique chez des lactocoques isolés de lait de chamelle de Timimoune. Thèse de doctorat. Université d'Oran. Algérie : 80.
- Boularbah A., Morel J.L., Lefebvre G. 1993. Altérations morphologiques des cellules de *Bacillus brevis* par le cadmium. *C. R. Acad. Sci. Paris, t. 316, Série III*: 307-313.
- Boveris A.H., Sies H., Martino E.E., Decampo R., Turreus J.F., Stoppani A.O.M. 1980. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 188: 643– 648.
- Bowler C., Van Montague M., Inzé D.1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83–116.
- Brattin W., Drexler J., Lowney Y., Griffin S., Diamond G., Woodbury L. 2013. An in vitro method for estimation of arsenic relative bioavailability in soil. *J. Toxicol. Environ. Health. Part A.* 76 (7): 458-478
- Bremer E., Kraamer R. 2000. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes. In: Storz G., Hengge-Aronis R. (eds) *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, DC: 79–97.

- Bruhn D. F., Li J., Silver S., Roverto F., Rosen B. P. 1996. The arsenical resistance operon of IncN plasmid R46. *FEMS Microbiol. Lett.* 139:149-153.
- Bruins M., Kapil M., Oehme F.W. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45:198-207.
- Busenlehner L.S., Pennella M.A., Giedroc D.P. 2003. The SmtB/ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 131–143.

C

- Cabaleiro D.R., Rodriguez S., Sanroman A., Longo M.A. 2001. Characterisation of deactivating agents and their influence on the stability of manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Chem. Tech. Biotech.* 76: 867–872.
- Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3:3–8.
- Caffrey M., Feigenson G.W. 1984. Influence of metal ions on the phase properties of phosphatidic acid in combination with natural and synthetic phosphatidyl cholines : An X. ray diffraction study using synchrotron radiation. *Biochem.* 23: 323.
- Cai J., Salmon K., DuBow M.S. 1998. A chromosomal ars operon homologue of *Pseudomonas aeruginosa* confers increased resistance to arsenic and antimony in *Escherichia coli*. *Microbiol.* 144: 2705-2713.
- Caille O., Rossier C., Perron K. 2007. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 189: 4561-4568.
- Callender E. 2003. Heavy Metals in the Environment-Historical Trends. In: Lollar B.S. (Ed.), *Environmental Geochemistry. Treatise on Geochemistry.* Elsevier-Pergamon, Oxford: 67-105.
- Calomiris J. J., Armstrong J. L., Seidler R. J. 1984. Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1238-1242.
- Campbell P., Errecalde O., Forti C., Hiriartbaer V., Vigneault B. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicol. Pharmacol.* 133: 189-206.
- Cardoso P., Alves A., Silveira P., Sá C., Fidalgo C., Freitas R., Figueira E. 2018. Bacteria from nodules of wild legume species: Phylogenetic diversity, plant growth promotion abilities and osmotolerance. *Sci. Total Environ.* 645: 1094–1102.
- Carlin J. R. 2000. Antimony. U.S. geological survey mineral commodity summaries: 20-21.
- Carroll G.C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody plants. In: Fokkema N.J. 1991. Van Den Heuvel J, editors. *Microbiology of the phyllosphere.* Cambridge (UK): Cambridge University Press, London, United Kingdom. : 205–222.
- Cenci G., Morozzi G., Caldini G. 1985. Injury by heavy metals in *E. coli*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34 :188-195.
- Cervantes C., Campos-García J., Devars S. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (3):335-347.
- Cha J.S., Cooksey D. A. 1991. Copper resistance in *Pseudomonas syringae* mediated by periplasmic and outer membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88 (20) : 8915–8919.
- Chaignon V. 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées. Cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse. Ecole Doctorale, Sciences de l'Environnement. Système Terre. Université d'Aix-Marseille : 183-190.
- Chakraborty S., Mukherjee A., Das T. K. 2013. Biochemical characterization of a lead-tolerant strain of *Aspergillus foetidus*: An implication of bioremediation of lead from liquid media. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 84: 134-142.
- Chakraborty S., Mukherjee A., Khuda-Bukhsh A.R., Das T. K. 2014. Cadmium-induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus*: its possible role in cadmium bioremediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106: 46–53.
- Chakravarty R., Banerjee P.C. 2008. Morphological changes in an acidophilic bacterium induced by heavy metals. *Extremophiles.* 12: 279–284.

- Chance B., Maehly A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*. 2:764–775.
- Chance B., Maehly A.C. 1967. *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 1, Interscience Publishers Inc, New York: 424.
- Chang L.Y., Fente J.W., Gueuze H.J., Crapo J.D. 1988. Molecular immunocytochemistry of the Cu/Zn superoxide-dismutase in rat hepatocytes. *J. Cell. Biol.*107:2169-2179.
- Chaoui A., Mazhoudi S., Ghorbal M.H., El Ferjani E. 1997. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*phaseolus vulgaris* l.). *Plant Sci.* 127(2): 139-147.
- Chareprasert S., Piapukiew J., Thienhirun S., Whalley A.J.S., Sihanonth P. 2006. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. *World J. Microbiol. Biotech.* 22: 481–486.
- Chattopadhyay M.K., Kern R., Mistou M.Y., Dandekar A.M., Uratsu S.L., Richarme G. 2004. The chemical chaperone proline relieves the thermo- sensitivity of a DNaK deletion mutant at 42 °C. *J. Bacteriol.* 186: 8149 – 8152.
- Chebotar V. K., Malfanova N. V., Shcherbakov A. V., Ahtemova G. A., Borisov A. Y., Lugtenberg B. Tikhonovich I. A. 2015. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 51 :271-277.
- Chen M., Lin, L., Zhang Y., Su L., An Q. 2013. Genome sequence of *Klebsiella oxytoca* SA2, an endophytic nitrogen-fixing bacterium isolated from the pioneer grass *Psammodochloa villosa*. *Genom. Announc.* 1:e00601-13. doi: 10.1128/genomeA.00601-13
- Chen Y.X., Lin Q., Luo Y.M., He Y.F., Zhen S.J., Yu Y.L., Tian G.M., Wong M.H. 2003. The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere.* 50: 807-811.
- Chen Z., Silva H., Klessig D.F. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Sci.* 262 :1883–1886.
- Chi F., Schi S. H., Cheng H. P., Jing Y. X., Yanni. Y. G., Dazzo F. B. 2005. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7271- 7278.
- Chibuike G., Obiora S. 2014. Heavy metal polluted soils: Effect on plants and bioremediation methods. *Appl. Environ. Soil Sci.*1–12.
- Chung C. T., Suzanne L., Niemela R. H. M. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Biochem.* 86: 2172-2175.
- Chung H., Park M., Madhaiyan M., Seshadri S., Song J., Cho H., Sa T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1970-1974.
- Clay K. 1993. The ecology and evolution of endophytes. *Agr. Ecosyst. Environ.* 44: 39-64.
- Clemens S., Palmgren M.G., Kräner U. 2002. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends Plant Sci.* 7:309-315.
- Compant S., Kaplan H., Sessitsch A., Nowak J., Ait Barka E., Clément C. 2008. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN : from the rhizosphere to inflorescence issues. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63 (1):84-93.
- Compant S., Mitter B., Colli-Mull J.G., Gangl H., Sessitsch A. 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microb. Ecol.* 62 (1):188-97.
- Compant S., Reiter B., Sessitsch A., Nowak J., Clément C., Barka E. A. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 : 1685- 1693.
- Conejo M.C., Garcia I., Martinez-Martinez L., Picabea L., Pascual A. 2003. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 47: 2313-2315.
- Correa-Galeote D., Bedmar E. J., Arone G. J. 2018. Maize endophytic bacterial diversity as affected by soil cultivation history. *Front Microbiol.* 9: 484.

- Costa L. E. O., Queiroz M. V., Borges A. C., Moraes C. A., Araújo E. F. 2012. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Braz. J. Microbiol. 43(4): 1562-1575.
- Courvalin P. 2008. La résistance des bactéries aux antibiotiques: combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. Bull. Acad. Vét. 161:7-12.

D

- Dąbrowska G., Kata A., Goc A., Hebda M. S., Skrzypek E. 2007. Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family. Acta Biol. Cracov. Bot. 49 (1): 7–17
- Das S., Jean J.S., Kar S., Chou M.L., Chen C.Y. 2014. Screening of plant growth-promoting traits in arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soil and their potential implication for arsenic bioremediation. J. Hazard. Mater. 272:112-120.
- Davis M.A., Baker K.N., Orfe L.H., Shah D.H., Besser T.E., Call D.R. 2010. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 54: 2666-2669.
- De Vleeschauwer D., Höfte M. 2003. Using *Serratia plymuthica* to control fungal pathogens of plants. CAB Rev. 46:189–257.
- Deneux-Mustin S., Roussel-Debet S., Mustin C., Henner P., Munoe-Lamy C., Colle C., Berthelin J., Garnier-Lapalace J., Leyval C. 2003. Mobilité et transfert racinaires des éléments en traces : influence des micro-organismes du sol. TEC & DOC. Paris :45.
- Desai C., Jain K., Madamwar D. 2008. Hexa valent chromate reductase activity in cytosolic fractions of *Pseudomonas* sp. G1DM21 isolated from Cr (VI) contaminated industrial land fill. Process Biochem. 4:713–721.
- Dhindsa R.S., Plumb-Dhindsa P., Thorpe T.A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. J. Exp. Bot. 32: 93–101.
- Dhuldhaj U., Pandya U., Singh S. 2018. Anti-oxidative response of cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 to arsenite (AsIII). Microbiol. 87(6):810–818.
- Di Cesare A., Eckert E.M., Corno G. 2016. Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria J. Limnol. 75(2): 59-66.
- Dictor M.C., Baranger P., Chéry L., Michel K., Barlier J., Clozel B., Touzé S., Le Gall A.C., Brosselin P. 2004. Synthèse des travaux de R&D en France (1999-2003) sur la thématique arsenic. BRGM/RP-53252-FR., 4 III. 3 Ann. : 130
- Ding W., Ong C. 2003. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. FEMS Microbiol. Lett. 220:1-7.
- Ding Y., Zhao Y., Bai X., Fang Z., Cheng K. 2008. Phytotoxic effects of cyanobacteria extract on *Lemna minor* and *Myriophyllum spicatum* phyto-tolerance and superoxide dismutase activity. wiley interscience (www.interscience.wiley.com).
- Djabeur A., Kaid-Harche M., Catesson A.M. 2008. Structure des infrutescences et capacité fructifère de deux cytotypes de *Lygeum spartum* L. de l'ouest algérien. Ecol. Mediterr. 34: 5-12.
- Donlan R.M. 2000. Biofilms : microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Dis. 8 :881-890.
- Drewniak L., Krawczyk P.S., Mielnicki S., Adamska D., Sobczak A., Lipinski L., Burec-Drewniak W., Sklodowska A. 2016. Physiological and metagenomic analyses of microbial mats involved in self-purification of mine waters contaminated with heavy metals. Front. Microbiol. 7: 1252.
- Du H., Klessig D.F. 1997. Identification of a soluble, highaffinity salicylic acid-binding protein in tobacco. Plant Physiol. 113: 1319–1327.
- Duijff B.J., Gianinazzi-Pearson V., Lemanceau P. 1997. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. New Phytol. 135:325–334.
- Duquesne K., Lietaud A., Ratouchniak J., Muller D., Lett M.C., Bonnefoy V. 2008. Arsenite oxidation by a chemoautotrophic moderately acidophilic *Thiomonas* sp: from the strain isolation to the gene study. Environ. Microbiol. 10 : 228-237.

E

- Ekmekçi Y., Tanyolac D., Ayhan B. 2008. Effect of cadmium on antioxidant enzyme and photosynthetic activities in leaves of two maize cultivars. *J. Plant Physiol.* 165:600-611.
- Elahi A., Ajaz M., Rehman A., Rehman A., Vuilleumier S., Khan Z., Hussain S. Z. 2019. Isolation, characterization, and multiple heavy metal-resistant and hexavalent chromium-reducing *Microbacterium testaceum* B-HS2 from tannery effluent. *J. King Saud Univ. Sci.*: 1437-1444
- Elahi A., Rehman A. 2018. Multiple metal resistance and Cr⁶⁺ reduction by bacterium, *Staphylococcus sciuri* A-HS1, isolated from untreated tannery effluent. *J. King Saud Univ. Sci.*: 1005-1013
- El-Batanony N. H., Ali M. H., Hassan H. T. 2018. Diversity of non-rhizobial endophytic bacteria from nodules of *Melilotus indicus* L. and their plant growth promoting activities. *Egypt. J. Exp. Biol. (Bot.)* 14(2): 253 – 266.
- Elbeltagy A., Nishioka K., Sato, T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Minamisawa K. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *App. Environ. Microbiol.* 67(11):5285-5293.
- Elbeltagy A., Nishioka K., Suzuki H., Sato T., Sato Y.I., Morisaki H., Mitsui H., Minamisawa K. 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46(3):617-629.
- El-Deeb B. 2009. Plasmid mediated tolerance and removal of heavy metals by *Enterobacter* sp. *J. Biochem. Biotech.* 5 (1) : 47-53.
- El Ghazouani A. 2008. Etude biochimique et fonctionnelle de la protéine PerR de *Bacillus subtilis* : un senseur bactérien du peroxyde d'hydrogène. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier - Grenoble I : 20-36.
- Ellwood D.C., Tempest D.W. 1972. Effects of environment on bacterial wall content and composition. *Adv. Microb. Physiol.* 7 :83-117.
- Eslinger E., Peaver D. 1988. Clay minerals for petroleum geologists and engineers. Short course No 22, SEPM, Society of Economic Paleontologists and Mineralogists, Tulsa.
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 11:81–128.
- Etesami H. 2018. Bacterial mediated alleviation of heavy metal stress and decreased accumulation of metals in plant tissues: mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147:175–191.
- Etesami H., Alikhani H.A. 2016. Rhizosphere and endorhiza of oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant harbor bacteria with multifaceted beneficial effects. *Biol. Control.* 94:11–24.
- Etminani F., Harighi B. 2018. Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and biocontrol potential from wild pistachio trees. *Plant Pathol. J.* 34(3): 208-217.
- Evans M.D., Dizdaroglu M., Cooke M.S. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat. Res.* 567 :1–61.

F

- Fashola M. O., Ngole-Jeme V. M., Babalola O. O. 2016. Heavy metal pollution from gold mines: Environmental effects and bacterial strategies for resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 13 (11): 1047.
- Favier A. 2003. Le stress oxydant : intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Act. Chim.* : 108-115.
- Feng R., Liao G., Guo J., Wang R., Xu Y., Ding Y., Mo L., Fan Z., Li N. 2016. Responses of root growth and antioxidative systems of paddy rice exposed to antimony and selenium. *Environ. Exp. Bot.* 122 :29–38.
- Ferret C. 2012. Rôle des *Pseudomonas fluorescens* dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremédiation. Thèse de Doctorat. Université de Strasbourg, France: 42-71.
- Filella M., Belzile N., Lett M. 2007. Antimony in the environment: A review focused on natural waters. III. Microbiota relevant interactions. *Earth Sci. Rev.* 80: 195–217.

- Finkel T. 2003. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15: 247-254.
- Fisher P.J., Petrini O. 1987. Location of fungal endophytes in tissues of *Suaeda fruticosa*: a primary study. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 89: 246-249.
- Fomina, M., Gadd G.M. 2014. Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Tech.* 160: 3–14.
- Fox G. E., Stackebrandt E., Hespell R. B., Gibson J., Maniloff J., Dyer T. A., Wolfe R. S., Balch W. E., Tanner R. S., Magrum L. J., Zablen L. B., Blakemore R., Gupta R., Bonen L., Lewis B. J., Stahl D. A., Luehrsen K. R., Chen K. N., Woese C. R. 1980. The phylogeny of prokaryotes. *Sci.* 209: 457- 463.
- Foyer C.H., Lopez-Delgado H., Dat J.F., Scott I.M. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant* 100: 241–254.
- Foyer C.H., Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell.* 17:1866–1875.
- Franklin N.M., Stauber J.L., Markich S.J., Lim R.P. 2000. pH-dependent toxicity of copper and uranium to a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). *Aquat. Toxicol.* 48(2-3):275-289.
- Fridovich I. 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* 264 :7761–7764.
- Frommel M. I., Nowak J., Lazarovits G. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiol.* 96: 928- 936.

G

- Gadd G.M. 2009. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiol.* 156: 609-643.
- Gamboa M. A., Laureano S., Bayman P. 2001. Endophytic fungal diversity: Measuring diversity of endophytic fungi in leaf fragments: does size matter? *Mycopathol.* 156(1):41-5.
- Gao Y., Liu Q., Zang P., Li X., Ji Q., He Z. 2015. An endophytic bacterium isolated from *Panax ginseng* CA. Meyer enhances growth, reduces morbidity, and stimulates ginsenoside biosynthesis. *Phytochem. Lett.* 11:132–138.
- Gapper C., Dolan L. 2006. Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiol.* 141:341–345.
- Gardner J.M., Feldman A.W., Zablotowicz M. 1982. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1335–1342.
- Gauthier P. T., Norwood W. P., Prepas E. E., Pyle G. G. 2014. Metal-PAH mixtures in the aquatic environment: A review of co-toxic mechanisms leading to more-than-additive outcomes. *Aquat. Toxicol.* 154: 253–269.
- Gazengel J.M., Orecchioni A. M. 2013. Le préparateur en pharmacie - Guide théorique et pratique, 2nd. Lavoisier Tech et Doc :1971
- Geller B. L., Winge D. R. 1982. Rat-liver Cu,Zn-superoxide dismutase. Sub-cellular location in lysosomes. *J. Biol. Chem.* 257: 945-8952.
- Georgopapadakou N. H. 2008. Antibiotic resistance in *Enterobacteria* in: Bacterial resistance to antimicrobials. editors, R. G. Wax , K. L. Abigail, A. Salyers, H. Taber 2nd ed. CRC Press Taylor & Francis Group.
- Ghiladi R. A., Knudsen G. M., Medzihradsky K. F., Ortiz de Montellano P. R. 2005. The Met-Tyr-Trp cross-link in *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG): autocatalytic formation and effect on enzyme catalysis and spectroscopic properties. *J. Biol. Chem.* 280 (24) :22651–22663.
- Ghiorse W.C. 1984. Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. *Ann. Rev. Microbio.* 38: 515-550.
- Giri D.D., Kumar A., Shukla P.N., Singh R.I.T.U., Singh P.K., Pandey K.D. 2013. Salt stress tolerance of methylotrophic bacteria *Methylophilus* sp. and *Methylobacterium* sp. isolated from coal mine spoils. *Pol. J. Microbiol.* 62: 273–280.

- Giller E., Witter K., Ernst., Mcgrath P.S. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 30:1389-1414.
- Gong L. J., Guo S. X. 2009. Endophytic fungi from *Dracaena cambodiana* and *Aquilaria sinensis* and their antimicrobial activity. *Afr. J. Biotech.* 8: 731-736.
- Govarthanan M., Lee S.M., Kamala-Kannan S., Oh B.T. 2015. Characterization, real-time quantification in silico modeling of arsenate reductase (*arsC*) genes in arsenic resistant *Herbaspirillum* sp. GW103. *Res. Microbiol.* 166:196–204.
- Gregory E. M., Fridovich I. 1973. Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* 114: 1193.
- Grimont F., Grimont P. A. D. 2006. The genus *Serratia*. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edn. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer et E. Stackebrandt. New York, Springer. 6:219–244.
- Große C., Anton A., Hoffmann T. 2004. Identification of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system *czc* via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans*. *Arch. Microbiol.* 182(2-3):109-118.
- Guo H., Luo S., Chen L., Xiao X., Xi Q., Wei W., Zeng G., Liu C., Wan Y., Chen J. 2010. Bioremediation of heavy metals by growing hyperaccumulaor endophytic bacterium *Bacillus* sp. L14. *Bioresource Tech.* 101: 8599–8605.
- Gupta A., Rai D.K., Pandey R.S. 2009. Analysis of some heavy metals in the riverine water, sediments and fish from river Ganges at Allahabad. *Environ Monit Assess.* 157: 449.
- Gyaneshwar P., James E. K., Mathan N., Reddy P.M., Reinhold-Hurek B., Ladha J. K. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic Strain of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 183: 2634 –2645.

H

- Haferburg G., Kothe E. 2007. Microbes and metals: interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* 47: 453-467.
- Hahn J.S., Oh S.Y., Roe J.H. 2000. Regulation of the *furA* and *catC* operon, encoding a ferric uptake regulator homologue and catalase-peroxidase, respectively, in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 182(13): 3767– 3774.
- Haliwell B., Gutteridge J. M. C. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medecine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
- Halliwell B., Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British J. Pharmacol.* 142: 31-32.
- Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W.F., Kleopfer W. 1997: Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43(10): 895-914.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 95-108.
- Hamilton C. E., Gundel P. E., Helander M., Saikkonen K. 2012. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Divers.* 54:1–10.
- Hamilton E.I. 2000. Environmental variables in a holistic evaluation of land contaminated by historic mine wastes: a study of multi-element mine wastes in West Devon, England using arsenic as an element of potential concern for human health. *Sci. Tot. Environ.* 249 : 171-221.
- Hannachi-Salhi A., Combes D., Baatout H., Figier J. Boussaid M., Marrakchi M., Trififarah N. 2004. Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. *IPGRI- FAO.* 130 :65-72.
- Hannauer M., Schafer M., Hoegy F., Gizzi P., Wehrung P., Mislin G.L.A., Budzikiewicz H., Schalk I.J. 2012. Biosynthesis of the pyoverdine siderophore of *Pseudomonas aeruginosa* involves precursors with a myristic or a myristoleic acid chain. *FEBS Lett.* 586: 96-101.
- Hardoim P.R., van Overbeek L.S., van Elsas J.D. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trend. Microbiol.* 16: 463–471
- Hassan S.H., Abskharon R.N., El-Rab S.M., Shoreit A.A. 2008. Isolation, characterization of heavy metal resistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from polluted sites in Assiut city, Egypt. *J. Basic. Microbiol.* 48: 168-176.
- Hejazi A., Falkiner F.R. 1997. *Serratia marcescens*. *J. Med. Microbiol.* 46: 903–912. PMID: 9368530.

- Hengstler J.G., Bolm-Audorff U., Faldum A., Janssen K., Reifenrath M., Gotte W., Jung D., Mayer-Popken O., Fuchs J., Gebhard S. 2003. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogen*. 24:63–73.
- Hider R.C., Kong X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27: 637-657.
- Higham D.P., Sadler P.J., Scawen M.D. 1986. Effect of cadmium on the morphology, membrane integrity and permeability of *Pseudomonas putida*. *J. Gen. Microbiol.* 132 :1475–1482.
- Hiner A.N., Raven E.L., Thorneley R.N., Garcia-Canovas F., Rodriguez-Lopez J.N. 2002. Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases. *J. Inorg. Biochem.* 91(1):27-34.
- Hochman A., Goldberg I. 1991. Purification and characterization of a catalase-peroxidase and a typical catalase from the bacterium *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1077: 299–307.
- Hoque M.A., Banu M.N.A., Okuma E., Murata Y. 2007. Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate-glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco bright yellow-2 suspension-cultured cells. *J. Plant Physiol.* 164:1457–1468.
- Hou W., Chen X., Song G., Wang Q., Chang C.C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol. Biochem.* 45:62-69.
- Howlett N.G, Avery S.V. 1997. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in *Saccharomyces cerevisiae* and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 2971–2976.
- Hu Z., Liu Y., Li D., Dauta A. 2005. Growth and antioxidant system of the cyanobacterium *Synechococcus elongates* in response to microcystin-RR. *Hydrobiologia*. 534:23-29.
- Humphries K.M., Sweda L.I. 1998. Selective inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochem. J.* 337:15835–15841.
- Hurek T., Reinhold-Hurek B., Van Montagu M., Kellenberger E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 176:1913–1923.
- Hussein K.A., Joo J. H. 2013. Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7(20) : 2288-2296.
- Huynh T. M. D. 2009. Impacts des métaux lourds sur l'interaction plante/ ver de terre/ microflore tellurique. Thèse de Doctorat. Université Paris Est. France : 4-14

I

- Igiri B. E., Okoduwa S. I. R., Idoko G. O., Akabuogu E. P., Adeyi A. O., Ejiogu I. K. 2018. Toxicity and bioremediation of heavy metals contaminated ecosystem from tannery wastewater: A Review. *J. Toxicol.* Volume 2018.: 2568038.
- Imlay J.A. 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* 77:755-76.
- Imlay J.A., Linn S. 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Sci.* 240:1302–1309.
- Isom L.L., Khambatta Z.S., Moluf J.L., Akers D.F., Martin S.E. 1995. Filament formation in *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 1031-1033.
- Iturbe-Ormaetxe I., Matamoros M.A., Rubio M.C., Dalton D.A., Becana M. 2001. The antioxidants of legume nodule mitochondria. *Am. Phytopathol. Soc.* 14: 1189-1196.
- Iyer A., Mody K., Iha B. 2005. Biosorption of heavy metals by a marine bacterium. *Mar. Pollut. Bull.* 50 (3) : 340-343.

J

- Jabaji S., Séguin P., Samson R., Bourque F. G. 2009. L'isolation et la caractérisation des endophytes du panic érigé (*Panicum virgatum*). Projet de recherche du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation et Agriculture et Agroalimentaire Canada.
- Jacobs P.H., Waite T.D. 2004. The role of aqueous iron (II) and manganese (II) in sub-aqueous active barrier systems containing natural clinoptilolite. *Chemosphere.* 54: 313-324.
- James E.K. 2000. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crop Res.* 65 :197–209.

- Jana U. 2009. Etude des interactions entre la plante *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh et le ver de terre *Aporrectodea caliginosa* (Savigny) : Application à la phytoremédiation de l'arsenic et de l'antimoine. Thèse de doctorat. Université Paris Est :12-20.
- Jayaprakashvel M., Divya B. C., Muthazhilan R., Jaffar H. A. 2017. Horizontal transfer of heavy metal resistance plasmid from a brahchish waster bacterium *Pseudomonas* Sp. AMET1221 to *Escherichia coli* DH5 α . Int. J. Pure App. Biosci. 5 (2) : 1199-1206.
- Jean-Noel M. K., Mputu K. J.N., Celine P., Frederic W., Frank D., Jacqueline D., Jean-Pau W. 2012. Effects of glycerol on *Pseudomonas fluorescens* BTP1 freeze-dried. Inter. J. Biotech. Biochem. 8(2): 245.
- Ji S. H., Gururani M. A., Chun S.C. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiol. Res. 169:83– 98.
- Jiang M., Cao L., Zhang R. 2008. Effects of *Acacia* (*Acacia auriculaeformis* A. Cunn) associated fungi on mustard (*Brassica juncea* L.) Coss. var. *foliosa* Bailey growth in Cd and Ni contaminated soils. Lett. Appl. Microbiol. 47:561–565.
- Jos A., Pichardo S., Prieto A., Repetto G., Vasquez C., Moreno I. Camean A. 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystin induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. Aquat. Toxicol. 72 :261-271.
- Juste C. 1995. Les micro-polluants métalliques dans les boues résiduares des stations d'épuration urbaines, Convention ADEME-INRA, ADEME éd :209.
- Jyoti B., Harsh K. S. N. 2014. Utilizing *Aspergillus niger* for bioremediation of tannery effluent. Octa J. Environ. Res. 2(1) :77–8.

K

- Kabata-Pendias A. 2004. Soil-plant transfer of trace elements - an environmental issue. Geoderma. 122: 143-149.
- Kabata-Pendias A., Pendias H. 2001. Trace elements in soils and plants. 3rd CRC Press, Boca Raton, London, New-York, Washington, D&C: 403.
- Katayama-Hirayama K. 1986. Inhibition of the activities of β -galactosidase and deshydrogenases of activated sludge by heavy metals. Wat. Res. 20:491-494.
- Kaur P., Rosen B. P. 1992. Plasmid-encoded resistance to arsenic and antimony. Plasmid. 27: 2940.
- Kebe I.B., Mpika J., N'guessan K. F., Hebbar P. K., Samuels G. S., Ake S. 2009. Isolement et identification de microorganismes indigènes de cacaoyères en Côte d'Ivoire et mise en évidence de leurs effets antagonistes vis-à-vis de *Phytophthora palmivora*, agent de la pourriture brune des cabosses. Sci. Nat. 6 (1): 71 – 82.
- Keele B. B., Mccord J. M., Fridovic I. 1970. Superoxide dismutase from *Escherichia coli*-B. A new manganese-containing enzyme. J. Biol. Chem. 245: 6176-6181.
- Kelly S.D., Boyanov M.I., Bunker B.A., Fein J.B., Fowle D.A., Yee N., Kemner K.M., 2001. XAFS determination of the bacterial cell wall functional groups responsible for complexation of Cd and U as a function of pH. J. Synchrotron. Radiat. 8: 946-948.
- Khammas K.M., Kaiser P. 1991. Caractérisation d'une activité pectinolytique chez *Azospirillum irakense*. Plante et sol. 137 :75 – 79.
- Khan A.R., Park G.S., Asaf S., Hong S.J., Jung B.K., Shin J.H. 2017. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. PLoS ONE 12 (2): e0171534.
- Khan A.R., Ullah I., Khan A.L., Park G.S., Waqas M., Hong S.J. 2015. Improvement in phytoremediation potential of *Solanum nigrum* under cadmium contamination through endophytic-assisted *Serratia* sp. RSC-14 inoculation. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 22 : 14032–42.
- Killian C. 1948. Contribution édaphiques et relations des plantes indicatrices de la région alfatière Algérienne. Ann. Agron. 1: 4-27.
- Kim H., Lee J.S., Hah Y.C., Roe J.H. 1994. Characterization of the major catalase from *Streptomyces coelicolor* ATCC 10147. Microbiol. 140 (12):3391-7.

- Kim T. H., Maik B., Hu H. H., Noriyuki N., Julian I. S. 2010. Guard cell signal transduction network advances in Understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61:56–91.
- Kirkman H.N., Galiano S., Gaetani G.F. 1987. The function of catalase-bound NADPH. *J. Biol. Chem.* 262 :660–666.
- Kleopffer J. W., Beauchamp C. J. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant root by bacteria. *Can. J. Microbiol.* 38:1219-1232.
- Klug-Roth D., Fridovich I., Rabini J. 1972. Pulse radiolytic investigations of superoxide catalyzed disproportionation: Mechanism for bovine superoxide dismutase. *J. Am. Chem. Soc.* 95:2786-2790.
- Koch A. L. 1983. The surface stress theory of microbial morphogenesis. *Adv. Microb. Physiol.* 24:301–366.
- Koedrith P., Seo Y. R. 2011. Advances in carcinogenic metal toxicity and potential molecular markers. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 9576–9595.
- Kong Y., Xu X., Zhu L. 2013. Cyanobactericidal effect of *Streptomyces* sp. HJC-D1 on *Microcystis aeruginosa*. *PLoS ONE* 8(2): e57654.
- Kono Y., Fridovich I. 1989. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257: 5751–5754.
- Kosugi H., Kikugawa K. 1985. Thiobarbituric acid reaction of aldehydes and oxidized lipids in glacial acetic acid. *Lipids* 20:915–920.
- Kroll H., Kiefel V., Giers G., Murphy M., Kaplan C., Kekomaki R., Kanhai H.H.H., Waters A.H., Mueller-Eckhardt C. 1995. Current concepts of diagnosis and treatment of fetal alloimmune thrombocytopenia: an international survey. *Infusionsther Transfusionsmed.* 22: 77–79.
- Kruger M.C., Bertin P.N., Heipieper H. J., Arsène-Ploetze F. 2013. Bacterial metabolism of environmental arsenic -mechanisms and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotech.* 97:3827–3841.
- Kuan K.B., Othman R., Abdul Rahim K., Shamsuddin Z.H. 2016. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PLoS One.* 11(3): e0152478.
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33:1870-1874.

L

- Lapenda J.C., Silva P.A., Vicalvi M.C., Sena K.X., Nascimento S.C. 2015. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *World J. Microbiol. Biotech.* 31: 399-406.
- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Cenna R., McGettigan P.A., McWilliam H. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinform.* 23: 2947-2948.
- Lavania M., Chauhan P.S., Chauhan S.V.S., Singh H.B., Nautiyal C.S. 2006. Induction of plant defense enzymes and phenolics by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* NBRI1213. *Curr. Microbiol.* 52: 363–368.
- Leblanc M., Morales J.A., Borrego J., Elbaz-Poulichet F. 2000. 4,500 Years-old mining pollution in the Southwestern Spain, Long-term implications for modern mining pollution. *Econ. Geol.* 95(3): 655-662.
- Lee M.Y., Shin H.W. 2003. Cadmium-induced changes in antioxidant enzymes from the marine alga *Nannochloropsis oculata*. *J. Appl. Phycol.* 15 : 13–19.
- Lemay M.J., Rodrigue N., Gariépy C., Saucier L. 2000. Adaptation of *Lactobacillus alimentarius* to environmental stresses. *Int. J. Food Microbiol.* 55 (1-3): 249- 53.
- Lenaertova V., Holovska K., Javorsky P. 1998. The influence of mercury on the antioxidant enzyme activity of rumen bacteria *Streptococcus bovis* and *Selenomonas ruminantium*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27:319-325.
- Levrès G., Lopez G., Tritlla J., Cardellach López E., Carrillo Chavez A., Mascuñano Salvador E. 2012. Phytoavailability of antimony and heavy metals in arid regions: The case of the Wadley Sb district (San Luis, Potosí, Mexico). *Sci. Total Environ.* 427(28) : 115–125.

- Li B., Yu R., Liu B., Tang Q., Zhang G., Wang Y., Xiel G., Sun G. 2011. Characterization and comparison of *Serratia marcescens* isolated from edible cactus and from silkworm for virulence potential and chitosan susceptibility. *Braz. J. Microbiol.* 42: 96-104.
- Li J. M., Jin H. 2007. Regulation of brassinosteroid signaling. *Trends Plant Sci.* 12: 37–41.
- Li P., Kwok A.H.Y., Jiang J., Ran T., Xu D., Wang W. 2015. Comparative Genome Analyses of *Serratia marcescens* FS14 Reveals Its High Antagonistic Potential. *PLoS ONE* 10 (4): e0123061.
- Li X., Feng H.Q., Pang X.Y., Li H.Y. 2008. Mesosome formation is accompanied by hydrogen peroxide accumulation in bacteria during the rifampicin effect. *Mol. Cell. Biochem.* 311(1):241-7.
- Li X.Z., Nikaido H., Williams K.E. 1997. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag and are deficient in porins . *J. Bacteriol.* 179(19):6127-6132.
- Liang X., Zhang L., Natarajan S.K., Becker D.F. 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid. Redox Signal.* 19: 998 –1011.
- Lima A. I. G., Corticeiro S. C., de Almeida Paula Figueira E. M. 2006. Glutathione-mediated cadmium sequestration in *Rhizobium leguminosarum*. *Enzy. Microb. Tech.* 39(4):763–769.
- Lin L., Wei C., Chen M., Wang H., Li Y., Li Y. 2015. Complete genome sequence of endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E. *Stand Genomic. Sci.* 10:22.
- Liu L., Kloepper J.W., Tuzun S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathol.* 85 (10): 1113-1218.
- Lodewyckx C., Vangronsveld J., Porteous F., Moore E.R.B., Taghavi S., Mezgeay M., Lelie1 D. V. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21(6):583–606.
- Lorca G.L., Font de Valdez G. 1999. The effect of suboptimal growth temperature and growth phase on resistance *Lactobacillus acidophilus* to environmental stress. *Cryobiol.* 39(2):144-9.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265–275.
- Lugtenberg B.J., Dekkers L.C., Bloemberg G.V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39:461–490.
- Luo S., Wan Y., Xiao X., Guo H., Chen L., Xi Q. 2011. Isolation and characterization of endophytic bacterium LRE07 from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. and its potential for remediation. *Appl. Microbiol. Biotech.* 89: 1637–44.
- Luptakova A., Kusnierova M. 2005. Bioremediation of acid drainage contaminated by SRB. *Hydrometallurgy.* 77(1-2): 97-102.

M

- Ma L., Cao Y.H., Cheng M.H., Huang Y. 2013. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 103 (2): 299-312.
- Madhaiyan M., Alex T. H., Ngoh S. T., Prithiviraj B., Ji L. 2015. Leaf-residing *Methylobacterium* species fix nitrogen and promote biomass and seed production in *Jatropha curcas*. *Biotech. Biofuels.* 8:222.
- Madkour M. A., Smith L. T., Smith G. M.1990. Preferential osmolyte accumulation: a mechanism of osmotic stress adaptation in diazotrophic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (9): 2876-2881.
- Manasi N., Rajesh V.R. 2016. Evaluation of the genetic basis of heavy metal resistance in an isolate from electronic industry effluent. *J. Genetic Eng. Biotech.* 14(1): 177–180.
- Marceau A., Zagorec M., Champomier- Verges M.C. 2003. Positive effect at growth suboptimal temperature and high salt concentration non long term survival of *Lactobacillus sakei*. *Res. Microbiol.* 154 (3):37-42.
- Marklund S., Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47:469–474.
- Martinez J. L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157 : 2893-2902.

- Marzan L. W., Alam R., Hossain M. A. 2018. Characterization, identification and antibiogram studies of endophytic bacteria from cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Bangladesh J. Agril. Res.* 43(2): 175-186.
- Mathews M.C., Summers C.B., Felton G.W. 1997. Ascorbate peroxidase: a novel antioxidant enzyme in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 34: 57– 68.
- Matysik J., Alia Bhalu B., Mohanty P. 2002. Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Curr. Sci.* 82:525 – 532.
- McCord J.M., Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:6049 – 6055.
- McInroy J.A., Kloepper J.W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil.* 173:337–349.
- Medjeldi M. S., Limam F., Issam Smaali M., Ulber R., Marzouki M. N. 2012. A new thermostable peroxidase from garlic *Allium sativum*. Purification, biochemical properties, immobilization and use in H₂O₂ detection in milk. *App. Biochem. Biotech.* 27(3) : 273–289.
- Meghnous O., Dehimat L., Doumas P., Kassa-Laouar M., Mosbah F., Rached O. 2019. Oxidative and antioxidative responses to antimony stress by endophytic fungus *Aspergillus tubingensis* isolated from antimony accumulator *Hedysarum pallidum* Desf. *Biol.* 74(12) :1711-1720.
- Mehta S.K., Gaur J.P. 1999. Heavy metal-induced proline accumulation and its role in ameliorating metal toxicity in *Chlorella vulgaris*. *New Phytol.* 143: 253–259.
- Mergeay M., Monchy S., Vallaes T., Auquier V. 2003. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27 (2-3): 385-410.
- Messner B., Schröder P. 1999. Burst amplifying system in cell suspension cultures of spruce (*Picea abies* L. Karst): Modulation of elicitor induced release of hydrogen peroxide (oxidative burst) by ionophores and salicylic acid. *J. Appl. Bot.* 73 :6 –10.
- Miquel M. 2001. Les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Rapport office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (Dir.). Rapport Sénat n°26 : 360.
- Mire C.E., Tourjee J.A., O'Brien W.F. 2004. Lead precipitation by *Vibrio harveyi*: evidence for novel quorum-sensing interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (2): 855-864.
- Mishra M., Chadha N., Kumar V., Prasad R., Varma A. 2014. Root endophytic fungi from two extreme geographical regions of India. *J. Endocytobiosis Cell. Res.* 25: 20-26.
- Misra M., Olinski R., Dizdaroglu M., Kasprzak K.S. 1993. Enhancement by l-histidine of nickel (II)-induced DNA–protein cross-linking and oxidative DNA base damage in the rat kidney. *Chem. Res. Toxicol.* 6:33–37.
- Mitra R.S., Bernstein I.A. 1977. Nature of the repair process associated with the recovery of *Escherichia coli* after exposure to Cd²⁺. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 74: 7450 -1455.
- Miyake C., Michihata F., Asada K. 1991. Scavenging of hydrogen peroxide in procaryotic and eucaryotic algae: acquisition of ascorbate peroxidase during the evolution of cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* 32: 33 – 43.
- Mizuno M., Kamei M., Tsuchida H. 1998. Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low temperature storage. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 144 (4):717.
- Mobley H. L. T., Rosen B. P. 1982. Energetics of plasmid- mediated arsenate resistance in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 79:6119-6122.
- Möller I. M., Jensen P. E., Hansson A. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants, *Annu. Rev. Plant Biol.* 51: 459-481.
- Monchy S., Benotmane M.A., Janssen P., Vallaes T., Taghavi S., van der Lelie D., Mergeay M. 2007. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals. *J. Bacteriol.* 189 :7417-7425.
- Monteil C., Mulder P., Thuillez C. 2004. Stress oxydant et insuffisance cardiaque : une cible thérapeutique utopique?. *Médecine thérapeutique Cardiologie.* 2: 75-85.
- Moran J. F., James E. K., Rubio M. C., Sarath G., Klucas R. V., Becana M. 2003. Functional characterization and expression of a cytosolic iron-superoxide dismutase from cowpea root nodules. *Plant Physiol.* 133 : 773–782.

- Moussard C. 2006. Biochimie structurale et métabolique. De Boeck Supérieur : 368.
- Mubarak H., Chai L.Y., N. Mirza Z.H., Yang A., Pervez M., Tariq S., Shaheen Q. 2015. Antimony (Sb) – pollution and removal techniques – critical assessment of technologies. *Toxicol. Environ. Chem.* 97: 1–22.
- Mufti R., Amna, Rafique M., Haq F., M.F.H. Munis, S. Masood, A. S. Mumtaz and H.J. Chaudhary. 2015. Genetic diversity and metal resistance assessment of endophytes solated from *Oxalis corniculata*. *Soil Environ.* 34(1): 89-99.
- Mukherjee G., Saha C., Naskar N., Mukherjee A., Mukherjee A., Lahiri S., Majumder A. L., Seal A. 2018. An endophytic bacterial consortium modulates multiple strategies to improve arsenic phytoremediation efficacy in *Solanum nigrum*. *Sci. Rep.* 8:6979-6995.
- Mukhopadhyay K., Garrison N., Hinton D. M., Bacon C. W., Khush G. S., Peck H. D., Datta N. 1996. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. *Mycopathol.* 134:151–159.
- Mukhopadhyay R., Rosen B.P., Phung L.T., Silver S. 2002. Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 26 (3) : 311-325.
- Muller D. 2004. Analyse génétique et moléculaire du stress arsenic de souches bactériennes isolées d'environnements contaminés par l'arsenic. Thèse de doctorat. Université Louis Pasteur, Strasbourg I : 10-15
- Muzzamal H., Sarwar R., Sajid I., Hasnain S. 2012. Isolation, identification and sreening of endophytic bacteria antagonistic to biofilm former. *Pakistan J. Zool.* 44 (1): 249-257.

N

- Nagata K., Nagata Y., Sato T., Fujino M.A., Nakajima K., Tamura T. 2003. L-Serine, D- and L-proline and alanine as respiratory substrates of *Helicobacter pylori*: correlation between in vitro and in vivo amino acid levels. *Microbiol.* 149:2023–2030.
- Naik M.M., Pandey A., Dubey S.K. 2012. Biological characterization of lead enhanced exopolysaccharide from lead resistant *Enterobacter cloacae* strain P2B. *Biodegrad.* 23(5):775-83
- Naik M.M., Dubey S. 2011. Lead-enhanced siderophore production and alteration in cell morphology in a Pb-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain 4EA. *Curr. Microbiol.* 62:409-14.
- Nakano Y., Asada K. 1981. Spinach chloroplasts scavenge hydrogen peroxide on illumination. *Plant Cell. Physiol.* 21:1295–1307.
- Narita M., Chiba K., Nishizawa H. 2003. Diversity of mercury resistance determinants among *Bacillus* strains isolated from sediment of Minamata Bay. *FEMS Microbiol. Lett.* 223 (1):73-82.
- Nedjimi B. 2009. Salt tolerance strategies of *Lygeum spartum* L.: A new fodder crop for Algerian saline steppes. *Distrib. Funct. Ecol. Plants.* 204:747-754.
- Nei M., Kumar S. 2000. Molecular Evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York.
- Newman D.K., Beveridge T.J., Morel F.M.M. 1997. Precipitation of arsenic trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2022–2028.
- Neumann R. B., Ashfaq K. N., Badruzzaman A. B. M., Ali M. A., Shoemaker J. K., Harvey C. F. 2010. Anthropogenic influences on groundwater arsenic concentrations in Bangladesh. *Nat. Geosci.* 3: 46–52.
- Nies D.H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotech.* 51: 730–750.
- Nies D.H., 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 313-339.
- Nunes T., Cardoso P., Freitas R., Figueira E. 2018. Protective effects of farnesol on a *Rhizobium* strain exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 165: 622–629.

O

- Olaniran A.O., Balgobind A., Pillay B. 2013. Bioavailability of heavy metals in soil: Impact on microbial biodegradation of organic compounds and possible improvement strategies. *Int. J. Mol. Sci.* 14:10197–10228.
- Onishi H. 1969. Arsenic, in: Wedepohl K.H. (Ed.), *Handbook of Geochemistry*, Springer- Verlag, New York, vol II: 33.
- Owolabi J. B., Rosen B. P. 1990. Differential mRNA stability controls relative gene expression within the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *J. Bacteriol.* 172 : 2367-2371.

- Ozenda, P., 1958. Flore du sahara septentrionale et centrale. CNRS, ed. France : 286.
 Öztürk L., Demir Y. 2002. *In vivo* and *in vitro* protective role of proline. *Plant Growth Regul.* 38(3): 259.

P

- Pal A., Choudhuri P., Dutta S., Mukherjee P.K., Paul A. K. 2004. Isolation and characterization of nickel resistant microflora from serpentine soils of Andaman. *World J. Microbiol. Biotech.* 20:881– 886.
- Palenik B., Brahamsha B., Larimer F. W., Land M., Hauser L., Chain P., Lamerdin J., Regala W., Allen E. E., Mccarren J., Paulsen I., Dufresne A., Partensky F., Webb E. A., Waterbury J. 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nat.* 424:1037-1042.
- Pan M.J., Rademan S., Kuner K., Hastings J.W. 1997. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 by the endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. *J. Phytopathol.* 145:479–486.
- Pan X. L., Zhang D. Y., Chen X., Bao A. M., Li L. H. 2011. Antimony accumulation, growth performance, antioxidant defense system and photosynthesis of *Zea mays*, in response to antimony pollution in soil. *Water Air Soil Pollut.* 215:517–523.
- Pardo R., Herguedas M., Barrado E., Vega M. 2003. Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (1):26-32.
- Passardi F., Bakalovic N., Teixeira F.K., Margis-Pinheiro M., Penel C., Dunand C. 2007. Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes. *Genomics.* 89(5) :567-79.
- Pereira S.I.A., Lima A.I.G., Figueira E.M.A.P. 2006. Heavy metal toxicity in *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* isolated from soils subjected to different sources of heavy metal contamination: effect on protein expression. *Appl. Soil Ecol.* 33:286–293.
- Perron K., Caille O., Rossier C., Van Delden C., Dumas J.L., Köhler T. 2004. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 279(10):8761-8.
- Petrini O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews J.H., Hirano S.S., editors. *Microbial ecology of leaves*. New York: Springer :17–197.
- Petti C. A. 2007. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 44:1108-1114.
- Pieterse C.M.J., Zamioudis C., Berendsen R.L., Weller D.M., Van Wees S.C.M., Bakker P.A.H.M. 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 52: 347–375.
- Pinto E., Sigaud-Kutner T. C. S., Leitão M. A. S., Okamoto O. K., Morse D., Colepicolo P. 2003. Heavy metal induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.* 39 (6): 1008–1018.
- Piotrowska S. Z., Cycon M., Kozdroj J. 2005. Metal tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Appl. Soil Ecol.* 28 : 237-246.
- Pourrut B. 2008. Implication du stress oxydatif dans la toxicité du plomb sur une plante modèle, *Vicia faba*. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse. Ecotoxicologie . Toulouse. France :51.
- Polidoros A.N., Scandalios J.G. 1999. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). *Physiol Plant.* 106: 112–120.
- Poole K., McKay G.A. 2003. Iron acquisition and its control in *Pseudomonas aeruginosa*: many roads lead to Rome. *Front. Biosci.* 8: 661-686.
- Purushotham P., Arun P.V., Prakash J. S., Podile A. R. 2012. Chitin binding proteins act synergistically with chitinases in *Serratia proteamaculans*. *PLoS One.* 7: e36714.

Q

- Qin S., Feng W. W., Wang T. T., Ding P., Xing K., Jiang J. H. 2017. Plant growth-promoting effect and genomics analysis of the beneficial endophyte *Streptomyces* sp. KLBMP 5084 isolated from halophyte *Limonium sinense*. *Plant Soil.* 416:117–132.
- Qin S., Zhang Y. J., Yuan B., Xu Y. P., Xing K., Wang J. 2014. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense*

- (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant Soil*. 374 : 753–766
- Qu C., Ma M., Chen W., Cai P., Yu X. Y., Feng X., Huang Q. 2017. Modeling of Cd adsorption to goethite-bacteria composites. *Chemosphere*. 193 : 943–950.
- Quezel P., Santa S. 1962. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. C.N.R.S. Paris.tome 1 :1170.

R

- Rached-Mosbah O., Gardou C. 1988. Relation sols-plantes dans des zones pastorals à substrat riche en antimoine :exemple du Djebel Hamimat (Algérie). Colloque Phytosociologique XVI : Phytosociologie et pastoralisme. Paris : 307–320.
- Rached-Mosbah O., Gardou C., Pauwels J.M. 1992. Accumulation d'antimoine par les végétaux sur sol contaminé, en zone steppique. *Bull. Soc. Bot. Fr. Actual. Bot.* 139:133–139.
- Radha P. 2010. Antioxidant responses evoked in vitro and in vivo by *Bacopa monnieri* leaf extracts. Thèse de doctorat. Avinashilingam Deemed University for Women. Coimbatore. India : 12-14
- Radwan M.A., El-Gendy K.S., Gad A.F. 2010. Biomarkers of oxidative stress in the land snail, *Theba pisana* for assessing ecotoxicological effects of urban metal pollution. *Chemosphere*. 79 :40–46.
- Raha K., Italia M. J., Wollacott A. M., Desjarlais J. 2000. Prediction of amino acid sequence from structure. *Protein Sci.* 9(6):1106 - 1119 .
- Rajkumar M., Ae N., Freitas H. 2009. Endophytic bacteria and their potential to enhance heavy metal phytoextraction. *Chemosphere*. 77:153–160.
- Rajkumar M., Ae N., Prasad M.N., Freitas H. 2010. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. *Trends Biotech.* 28: 142–149.
- Rajkumar R., Yaakob Z., Takriff M. S., Kamarudin K. F. 2013. Optimization of medium composition for the production of peroxidase by *Bacillus* sp. *Der. Pharma. Chemica.* 5(2):167-174.
- Ramamoorthy S., Kushner D. J. 1975. Binding of mercury and other heavy metals ions by microbial growth media. *Microb. Eco.* 2: 162-176.
- Ramey B.E., Koutsoudis M., von Bodman S.B., Fuqua C. 2004. Biofilm formation in plant microbe associations. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 602-609.
- Rao P.R., Kavya P. 2014. Production, isolation and purification of peroxidase using *Bacillus subtilis*. 1st International congress on environmental, biotechnology, and chemistry engineering, vol.64. IACSIT Press. Singapore : 21-27.
- Rascio N., Navari-Izzo F. 2011. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180: 169-181.
- Rascoe J., Berg M., Melcher U., Mitchell F.L., Bruton B.D., Pair S.D., Fletcher J., 2003. Identification, phylogenetic analysis, and biological characterization of *Serratia marcescens* strains causing cucurbit yellow vine disease. *Phytopathol.* 93:1233–1239.
- Raskin I., Kumar N., Dushenkov S., Salt D. E. 1994. Bioconcentration of heavy metals by plants. *Curr. Opin. Biotech.* 5 (3) :285-290
- Raven E.L., Lad, L., Sharp K.H., Mewies M., Moody P.C. 2004. Defining substrate specificity and catalytic mechanism in ascorbate peroxidase. *Biochem. Soc. Symp.* 71: 27-38.
- Reid T.J., Murthy M.R., Sicignano A., Tanaka N. Musick W.D., RossmannM.G. 1981. Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5Å resolution. *Proc. Nat. Acad. Sci.*78:4767-4771.
- Reniero D., Mozzon E., Galli E., Barbieri P. 1998. Two aberrant mercury resistance transposons in the *Pseudomonas stutzeri* plasmid pPB. *Gene.* 208 (1) 37-42.
- Rensing C., Rosen B. 2009. Biogeochemical cycles for redox-active metal(oids): As, Cu, Mn and Se. In M. Schaechter (Ed.). *Encyclopedia of microbiology*. Oxford. Elsevier: 205–219
- Reshma J., Linu M. 2017. Endophytic fungal assemblage in *Achyranthes aspera* Linn. revealed by internal transcribed spacer region of nuclear ribosomal RNA genes. *3 Biotech.* 7:109
- Rhoden S.A., Garcia A., Santos E., Silva M.C., Azevedo J.L., Pamphile J.A. 2015. Phylogenetic analysis of endophytic bacterial isolates from leaves of the medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss. (Meliaceae). *Genetic. Mol. Res.* 14 (1): 1515-1525.

- Ribeiro D.T., De Oliveira R.C., Di Mascio P., Menck C.F. 1994. Singlet oxygen induces predominantly G to T transversions on a single-stranded shuttle vector replicated in monkey cells. *Free Radic. Res.* 21(2):75-83.
- Rijavec T., Lapanje A. 2016. Hydrogen cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Front. Microbiol.* 7:1785.
- Roane T.M. 1999. Lead resistance in two bacterial strains from heavy metal contaminated soils. *Microbiol. Ecol.* 37: 218-224.
- Roane T.M., Kellogg S.T. 1996. Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* 42 : 593-603.
- Robert M., Juste C. 1999. Dynamique des éléments traces de l'écosystème sol. In Club CRIN Environnement et Ministère de l'environnement. Spéciation des métaux dans le sol. Paris : CRIN. : 495
- Roberts D.P., McKenna L.F., Lakshman D.K., Meyer S.L.F., Kong H., de Souza J.T., Lydon J., Baker C.J., Buyer J.S., Chung S. 2007. Suppression of damping-off of cucumber caused by *Pythium ultimum* with live cells and extracts of *Serratia marcescens* N4-5. *Soil Biol. Biochem.* 39:2275–2288.
- Rodriguez S. M., Romero-Puertas M. C., Zabalza A., Corpas F. J., Gomez M., Del Rio L. A., Sandalio L. M. 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum Sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell. Environ.* 2: 1532–1544.
- Roldan A.T., Ariza R. R. 2009. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutat. Res.* 681(2-3): 169-179.
- Román-Ponce B. Wang D., Va´squez-Murrieta M. S., Chen W. F., Santos P. E., Sui X. H., Wang E. T. 2015. *Kocuria arsenatis* sp. nov., a novel arsenic-resistant endophytic actinobacterium associated with *Prosopis laegivata* grown on high arsenic polluted mine tailing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 10.1099/ijsem.0.000830.
- Romero-Puertas M. C., Rodríguez-Serrano M., Corpas F. J., Gómez M., del Río L. A., Sandalio L. M. 2004. Cadmium induced subcellular accumulation of O₂ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant Cell. Environ.* 27: 1122–1134.
- Rosen B.P., Bhattacharjee H., Zhou T.Q., Walmsely A.R. 1999. Mechanism of the ArsA ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1461:207-15.
- Rosenblueth M., Martinez-Romero E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19:827-837.
- Ross S.M., Kaye K. 1994. The Meaning of Metal Toxicity in soil-plant systems. In: Ross, S.M. (Ed). *Toxic metals in soil-plant systems.* John Wiley & Sons ed, New-York :27- 35.
- Ryan R. P., Germaine K., Franks A., Ryan D. J., Dowling D. N. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278 (1) :1-9.
- Ryu C.M., Choi H.K., Lee C.H., Murphy J.F., Lee J.K., Kloepper J.W. 2013. Modulation of quorum sensing in acylhomoserine lactone-producing or-degrading tobacco plants leads to alteration of induced systemic resistance elicited by the rhizobacterium *Serratia marcescens*. *Plant Pathol. J.* 29: 182.

S

- Sabry S.A., Ghozlan H.A., Abou-Zeid D.M. 1997. Metal tolerance and antibiotic resistance patterns of a bacterial population isolated from sea water. *J. Appl. Microbiol.* 82 (2) :245-252.
- Saint-Denis M., Narbonne J.F., Arnaud C., Ribera D. 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biol. Biochem.* 33:395–404.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sanaa M.F.G.R., Romany N.N.A., Sedky H.A. H., Ahmed A.M. S. 2013. The influence of heavy metals toxicity on the antioxidant enzyme activities of resistant *E. coli* strains isolated from waste water sites. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2(12): 162-17.

- Sand W., Gehrke T., 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron (III) ions and acidophilic bacteria. *Res. Microbiol.* 157: 49-56.
- Sandrin T. R., Maier R. M. 2002. Effect of pH on cadmium toxicity, speciation, and accumulation during naphthalene biodegradation. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(10): 2075-2079.
- Sano S., Ueda M., Kitajima S., Takeda T., Shigeoka S., Kurano N., Miyachi S., Miyake C., Yokota A. 2001. Characterization of ascorbate peroxidases from unicellular red alga *Galdieria partita*. *Plant Cell Physiol.* 42: 433-440.
- Santacecilia A., Matteucci F., Cacchio P., Ercole C., Del Gallo M. 2012. Biofilm formation by endophytic bacteria. *Environ. Eng. Manage. J.* 11(3):83
- Scandalios J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(7): 995-1014.
- Schulz B., Boyle C. 2006. What are Endophytes? In: *Microbial root endophytes*, Schulz, B.J.E., C.J.C. Boyle and T.N. Siever (Eds.). Springer-Verlag. Berlin: 1-33.
- Seaver L.C., Imlay J.A. 2001. Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 7182-7189.
- Seget P.Z., Cycoń J., Kozdrój J., 2005. Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *App. Soil Ecol.* 28: 237-246.
- Seghers D., Wittebolle L., Top E. M., Verstraete W., Siciliano S. D. 2004. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1475-1482.
- Seiler C., Berendonk T.U. 2012. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in oil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.* 3: 399
- Selvakumar G., Mohan M., Kundu S., Gupta A.D., Joshi P., Nazim S., Gupta H.S. 2008. Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbita pepo*). *Lett. Appl. Microbiol.* 46:171-175.
- Selvankumar T., Radhika R., Mythili S., Arunprakash P., Srinivasan M. 2017. Isolation, identification and characterization of arsenic transforming exogenous endophytic *Citrobacter* sp. RPT from roots of *Pteris vittata*. *Biotech.* 7:264.
- Sergieiev I., Alexieva V., Karanov E., 1997. Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci.* 51: 121-124.
- Sevim A., Sevim E. 2015. Plasmid mediated antibiotic and heavy metal resistance in bacillus strains isolated from soils in rize, Turkey. *J. Nat. App.* 10(2) :133-145.
- Shah K., Kumar R.G., 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 Sci.* 161(6): 1135-1144.
- Shahid M., Khalid S., Abbas G., Shahid N., Nadeem M., Sabir M. 2015. Heavy metal stress and crop productivity. in *Crop production and global environmental issues* ed. Hakeem K. R., editor. Cham: Springer International Publishing: 1-25.
- Shahid M., Pourrut B., Dumat C., Nadeem M., Aslam M., Pinelli E. 2014. Heavy-metal-induced reactive oxygen species: phytotoxicity and physicochemical changes in plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 232 :1-44.
- Sharma P., Dubey R. S. 2004. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes. *Plant Sci.* 167 :541-550.
- Sharma P., Jha A. B., Dubey R. S., Pessaraki M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative. Defense mechanism in plants under stressful conditions. *J. Botany.* Volum 2012. Article ID 217037: 26.
- Sharma P.K., Balkwill D.L., Frenkel A., Vairavamurthy M.A. 2000. A new *Klebsiella planticola* strain (Cd) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7) : 3083-3087.
- Sharma S., Villamor J.G., Verslues P.E. 2011. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiol.* 157:292-304.
- Sharma T., Kaul S., Dhar M.K. 2015. Diversity of culturable bacterial endophytes of saffron in Kashmir, India. *Springer plus.* 4: 661.

- Sheng X.F., Xia J.J., Jiang C.Y., He L.Y., Qian M. 2008. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape. *Environ. Pollut.* 156: 1164-1170.
- Shigeoka S., Nakano Y., Kitaoka S. 1980. Purification and some properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis* Z. *Arch. Biochem. Biophys.* 201: 121–127.
- Shikanai T., Takeda T., Yamauchi H., Sano S., Tomizawa K.I., Yokota A., Shigeoka S. 1998. Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Lett.* 428:47-51.
- Sies H. 1993. Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutat. Res.* 299:183–191.
- Sies H., Menck C.F. 1992. Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat. Res.* 275:367–375.
- Silva K.E., Cayo R., Carvalhaes C.G., Correa de Sacchi F.P., Rodrigues-Costa F., da Silva A.C., Croda J., Gales A.C., Simionatto S. 2015. Co-production of KPC-2 and IMP-10 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolated from an outbreak in a brazilian teaching hospital. *J. Clin. Microbiol.* 53(7):2324-8.
- Silver S. 1996. Bacterial resistances to toxic metal ions — a review. *Gene* 179 : 9 -19.
- Silver S., Phung L.T. 2005a. Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(2): 599-608.
- Silver S., Phung L.T. 2005b. A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* 32:587-605.
- Singh A., Sharma R.K., Agrawal M., Marshall F.M. 2010. Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the wastewater irrigated site of a dry tropical area of India. *Food Chem. Toxicol.* 48:611–619.
- Siripornadulsil S., Siripornadulsil W. 2013. Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: Potential for microbial bioremediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 94 : 94–103.
- Slyemi D., Moinier D., Brochier-Armanet C., Bonnefoy V., Johnson D.B. 2011. Characterization of a phylogenetically ambiguous, arsenic-oxidizing *Thiomonas* sp., *Thiomonas arsenitoxydans* strain 3As (T) sp. nov. *Arch. Microbiol.* 193:439-449.
- Smedley P.L., Kinniburgh D.G., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl. Geochem.* 17: 517-568.
- Smirnoff N., Cumbes Q. J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochem.* 28 :1057–1060.
- Soussou S. 2013. Adaptation de la symbiose Fabacées-rhizobium aux sites miniers : Absorption du zinc par *Anthyllis vulneraria* et analyse de la diversité des bactéries symbiotiques d'*Hedysarum coronarium*. Thèse. Ecole doctorale : Agronomie et Environnement. Institut Supérieur Agronomique de Chott Meriam. Université de Sousse. Tunis : 163-161.
- Spiteller G. 1998. Linoleic acid peroxidation - the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein - and its relationship to chronic diseases. *Chem. Phys. Lipids.* 95 :105-116.
- Sposito G. 1984. The surface chemistry of soils. New York: Oxford University Press: 234-240
- Srivastava S. K., Tanaka H., Chutjian A., Trajmar S. 1981. Elastic scattering of intermediate-energy electrons by Ar and Kr. *Phys. Rev. A.* 23: 2156.
- Staniek A., Woerdenbag H. J. and Kayser O. 2008. Endophytes exploiting biodiversity for the improvement of natural product-based drug discovery. *J. Plant Interact.* 3: 75-98.
- Steinman H. M., Weinstein L., Brenowitz M. 1994. The manganese superoxide dismutase of *Escherichia coli* K-12 associates with DNA. *J. Biol. Chem.* 269:28629–28634.
- Strobel G. A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microb. Infec.* 5(6) : 535-544.
- Sturz A.V., Christie B.R., Matheson B.G. et Nowak J. 1997. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soils* 25: 13-19.
- Svarachorn A., Schinmyo A., Tsuchido T. Takano M. 1989. Autolysis of *Bacillus subtilis* induced by monovalent cations. *Appl. Microbiol.* 30: 299-304.
- Su J., Ye J., Zhu Y. 2012. Draft genome sequence of a novel bacterial strain, LSJC7, belonging to the family Enterobacteriaceae with dual resistance to arsenic and tetracycline. *J. Bacteriol.* 194: 7005–7006.

- Summers A.O. 2002. Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clin. Infect. Dis.* 34 (1): 85-92.
- Summers A.O., Silver S. 1972. Mercury resistance in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112 (3):1228-1236.

T

- Takeda T., Yoshimura K., Yoshii M., Kanahoshi H., Miyasaka H., Shigeoka S. 2000. Molecular characterization and physiological role of ascorbate peroxidase from halotolerant *Chlamydomonas* W80 strain. *Arch. Biochem. Biophys.* 376: 82–90.
- Tan R. X., Zou W. X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448-459.
- Tan Z., Hurek T., Gyaneshwar P., Ladha J.K., Reinhold-Hurek B. 2001. Novel endophytes of rice form a taxonomically distinct subgroup of *Serratia marcescens*. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 245–251.
- Taniguchi J., Hemmi H., Tanahashi K. 2000. Zinc biosorption by a zinc-resistant bacterium, *Brevibacterium* sp. strain HZM-1. *Appl. Microbiol. Biotech.* 54 (4) :581-588.
- Teitzel G.M., Parsek M.R. 2003. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (4): 2313-2320.
- Tejesvi M. V, Mahesh B., Nalini M. S., Prakash H. S., Kini K. R., Subbiah V., Shetty H. S., 2006. Fungal endophyte assemblages from ethnopharmacologically important medicinal trees. *Can. J. Microbiol.* 52: 427-435.
- Temperton N. J., Wilkinson S. R., Kelly J. M. 1996. Cloning of an Fe-superoxide dismutase gene homologue from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 76, 339-343.
- Thelwell C., Robinson N. J., Turner-Cavet J. S. 1998. An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 95 (18):10728–10733.
- Tiwari S., Lata C. 2018. Heavy Metal Stress, Signaling, and tolerance due to plant-associated microbes: An overview. *Front. Plant Sci.* 9:452.
- Trotter E.W., Grant C.M. 2002. Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 46(3): 869-878.
- Troll W., Lindsley J. 1955. A photometric method for determination of proline. *J. Biol. Chem.* 215(2):655-60.

U

- Ugur A., Ceylan O. 2003. Occurrence of resistance to antibiotics, metals, and plasmids in clinical strains of *Staphylococcus* spp. *Arch. Med. Res.* 34: 130–136.
- Uhrynowski W., Radlinska M., Drewniak L. 2019. Genomic analysis of *Shewanella* sp. O23S: The natural host of the pSheB plasmid carrying genes for arsenic resistance and dissimilatory reduction. *Int. J. Mol. Sci.* 20 :1018.

V

- Valderrama B., Ayala M., Vazquez-Duhalt R. 2002. Suicide inactivation of peroxidases and the challenge of engineering more robust enzymes. *Chem. Biol.* 9 (5) :555-65.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12(10): 1161-1208.
- Van Houdt R., Givskov M., Michiels C. W. 2007. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol. Rev.* 31(4): 407- 424.
- Vandamme P. B., Grillis P. D. V., Kersters K., Swing J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacteria systematic. *Microbiol. Rev.* 60:407- 438.
- Velikova V., Yordanov I., Edreva A. 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants protective role of exogenous polyamines. *Plant Sci.* 151 :59 – 66
- Verginie I. 2001. Les conséquences de la pollution par les métaux lourds sur l'environnement. *ADEME*:25.

- Verma S., Verma P. K., Mehe A. K., Bansywa A. K., Tripathi R. D., Chakrabarty D. 2017. A novel fungal arsenic methyltransferase, WaarsM reduces grain arsenic accumulation in the transgenic rice plant. *J. Hazard. Mater.* 344: 626–634.
- Verma V., Sudan P., Kour A. 2008. Endophytes: A novel source for bioactive molecules. *Proc. Indian Acad.* 74:73-86.
- Viti C., Pace A., Giovannetti L. 2003. Characterization of Cr (VI)-resistant bacteria isolated from chromium-contaminated soil by tannery activity. *Curr. Microbiol.* 46 (1):1–5.

W

- Wada N., Kinoshita S., Matsuo M., Amako K., Miyake C., Asada K. 1998. Purification and molecular properties of ascorbate peroxidase from bovine eye. *Biochem. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242: 256–261.
- Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D. 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicol.* 192 : 95-117.
- Walker V. 2013. Impact de l'inoculation de micro-organismes phytobénéfiques sur le métabolisme secondaire de *Zea mays* L. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1 : 208.
- Wang C.L., Ozuna S.C., Clark D.S., Keasling J.D. 2002. A deep-sea hydrothermal vent isolate, *Pseudomonas aeruginosa* CW961, requires thiosulfate for Cd²⁺ tolerance and precipitation. *Biotech. Lett.* 24 (8): 637-641.
- Wang J., Zhang H., Allen R. D. 1999. Overexpression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. *Plant Cell Physiol.* 40(7): 725–732.
- Wang Q., Warelow T.P., Kang Y.S., Romano C., Osborne T.H., Lehr C.R., Bothner B., McDermott T.R., Santini J.M., Wang G. 2015. Arsenite oxidase also functions as an antimonite oxidase. *App. Environ. Microbiol.* 81(6):1959-3278.
- Weise T., Thurmer A., Brady S., Kai M., Daniel R., Gottschalk G. 2014. VOC emission of various *Serratia* species and isolates and genome analysis of *Serratia plymuthica* 4Rx13. *FEMS Microbiol. Lett.* 352:45–53.
- Weisiger R. A., Fridovich I. 1973. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J. Biol. Chem.* 248: 4793-4796.
- Welinder K. G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2(3): 388–393.
- West E.R., Cother E.J, Steel C.C., Ash G.J. 2010. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. *Can. J. Microbiol.* 56: 209–216.
- Wiehe W., Hecht-Buchholz C., Höflich G. 1994. Electron microscopic investigations on root colonization of *Lupinus albus* and *Pisum sativum* with two associative plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* and *Rhizobium leguminosarum* bv.trifolii. *Symbiosis* 17:15–31.
- Wireman J., Liebert C.A., Smith T., Summers A.O. 1997. Asociation of mercury resistance with antibiotic resistance in the gram-negative fecal bacteria of primates. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (11): 4494-4503.
- Worden C. R., Kovac W.K., Dorn L. A., Sandrin T. R. 2009. Environmental pH affects transcriptional responses to cadmium toxicity in *Escherichia coli* K-12(MG1655). *FEMS Microbiol. Lett.* 293:58–64.
- Wright D. A., Welbourn P. 2002. Environmental toxicology. Cambridge University Press: 274-280.
- Wu J.T., Chang S.C., Chen K.S. 1995. Enhancement of intracellular proline level in cells of *Anacystis nidulans* (cyanobacteria) exposed to deleterious concentrations of copper. *J. Phycol.* 31:376-9.
- Wu C.H.H., Huang Y.T., Tsai-Wu J.J., Ching Y.L. 1998. Identification and subcellular localization of a novel Cu/Zn superoxide dismutase of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Lett.* 439 (1-2):192-6.

X

- Xiao X., Luo S., Zeng G., Wei W., Wan Y., Chen L., Guo H., Cao Z., Yang L., Chen J. 2010. Biosorption of cadmium by endophytic fungus *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresour. Technol.* 101: 1668–1674.

Xiao Y., Wang X., Chen W., Huang Q. 2017. Isolation and identification of three potassium-solubilizing bacteria from rape rhizospheric soil and their effects on ryegrass. *Geomicrobiol. J.* 34:873–880.

Y

Yan X., Wang Z., Mei Y., Wang L., Wang X., Xu Q., Peng S., Zhou Y., Wei C. 2018. Isolation, diversity, and growth-promoting activities of endophytic bacteria from tea cultivars of Zijuan and Yunkang-10. *Front. Microbiol.* 9 :1848.

Yang H.F., Cheng J., Zhou X., Zhu Y.L., Liu Y.Y., Hu L.F., Ye Y., Li J.B. 2013. 16S rRNA methylase gene, together with quinolone resistance determinant *aac* (6′)-Ib-cr, in a *Serratia marcescens* isolate from China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 76: 123-124.

Yao A., Bera A. F., Franz C., Holzapfel W., Thonart P. 2008. Survival rate analysis of freeze-dried lactic acid bacteria using the Arrhenius and z-Value models. *J. Food Protect.* 71:431-434.

Yilmaz E.I. 2003. Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Res. Microbiol.* 154: 409–415.

Youn H.D., Yim Y.I., Kim K., Hah Y. C., Kang S.O. 1995. Spectral characterization and chemical modification of catalase-peroxidase from *Streptomyces* sp. *J. Biol. Chem.* 270: 13740–13747.

Z

Zabalgogazcoa I. 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish J. Agricul. Res.* 6: 138-146.

Zaheer A., Mirza B. S., Mclean J. E., Yasmin S.T. M, Malik K. A, Mirza M. S. 2016. Association of plant growth-promoting *Serratia* spp. with the root nodules of chickpea. *Res. Microbiol.* 167 (6): 510-520.

Zeller T., Klug G. 2006. Thioredoxins in bacteria: Functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften.* 93(6): 259-266.

Zhang J., Kirkham M.B.1994. Droughtstress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. *Plant Cell. Physiol.* 35(5): 785-791.

Zhang L., Alfano J.R., Becker D.F. 2015. Proline metabolism increases katG expression and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 197:431–440.

Zhang W., Yin K., Li B., Chen L. 2013. A glutathione-S-transferase from *Proteus mirabilis* involved in heavy metal resistant and its potential application in removal Hg²⁺. *J. Hazard. Mater.* 261: 646-652.

Zhao S., Zhou N., Zhao Z. Y., Zhang K., Wu G. H., Tian C. Y. 2016. Isolation of endophytic plant growth-promoting bacteria associated with the halophyte *Salicornia europaea* and evaluation of their promoting activity under salt stress. *Curr. Microbiol.* 73 :574–581.

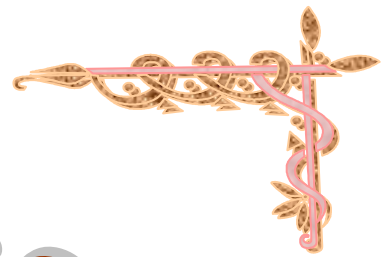
Zinniel D. K., Lambrecht P., Harris N. B., Feng Z., Kuczmarski D., Higley P., Ishimaru C.A., Arunakumari A., Barletta R.G., Vidaver A. K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 :2198-2208.

Zou P.J., Borovok I., Lucana D.O.O., Müller D., Schrempf H. 1999. The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase peroxidase, its gene and regulation by FurS. *Microbiol.* 145:549–559.

Zscheck K. K., Murray B. E. 1990. Evidence for a staphylococcal-like mercury resistance gene in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34(6) : 1287–1289.

Zubair M., Shakir M., Ali Q., Rani N., Fatima N., Farooq S., Shafiq S., Kanwal N., Ali F., Nasir I.A. 2016. Rhizobacteria and phytoremediation of heavy metals. *Environ. Tech. Rev.* 5: 112–119.

Annexes



Annexes

Annexe 1

1a- Composition des milieux de cultures

Formule exprimée dans un litre d'eau distillée

Cétrimide

Peptone de gélatine:.....	16,0 g
Peptone de caséine:.....	10,0 g
Bromure de tétradonium (cétrimide):.....	0,2 g
Acide nalidixique:.....	15,0 mg
Sulfate de potassium:.....	10,0 g
Chlorure de magnésium:.....	1,4 g
Agar:.....	10,0 g

Chapman

Peptone	10g
Extrait de viande de bœuf	1g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol	10g
Rouge de phénol.....	0,025g
Agar-Agar.....	15,0g
pH	7,4

Hugh et Leifson : (Pronadisa)

Tryptone.....	2 g
Bleu de bromothymol.....	30 mg
Chlorure de sodium.....	5 g
Hydrogénophosphate de potassium.....	0,3 g
Agar.....	2,5 g
pH.....	7,1

Luria-Bertani (LB)

NaCl	10 g
Tryptone	10 g.
Extrait de levure	5 g
pH.....	pH 7,0

Luria-Bertani modifié

NaCl	10g
Glucose	5g
Tryptone.....	10g
Tampon:Citrate 50 mM (pH7)	qsp
pH	7,0

Annexes

Mac Conkey

Peptone tryptique de gélatine.....	17 g
Peptone de viande et de aséine.....	3 g
Lactose.....	10 g
Sels biliaires	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Rouge neutre.....	40 mg
Gélose.....	13 g
pH	7,4

Milieu minimum M63G

KH ₂ PO ₄	13,6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
MgSO ₄	0,2 g
FeSO ₄	0,5 mg
pH.....	7,2.

Ce milieu doit être complété par du glucose (2 g.l⁻¹).

Nutrient Agar (GN) (Sigma-Aldrich)

Extrait de levure	2g
Extrait de viande.....	1g
Peptone.....	5g
NaCl	5g
Agar.....	15g
pH.....	pH 7,0

Tryptocaseine Soja Agar (TSA): (Pronadisa)

Tryptone (peptone de caséine).....	17 g
Peptone de soja.....	3 g
Glucose.....	2,5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Phosphate dipotassique.....	2,5 g
Gélose.....	15 g
pH.....	7,3

Annexes

1b- Technique de la coloration de Gram

La coloration de Gram permet à la fois de connaître la forme des bactéries et de les classer en fonction de leur capacité ou non à retenir la coloration violette du cristal violet dans les conditions opératoires. Elle peut être obtenue suivant divers protocoles normalisés, basés tous sur les mêmes principes et la même chronologie : fixation de l'échantillon, coloration, décoloration, contre-coloration. L'un des protocoles les plus usuels se déroule selon les étapes suivantes :

1- **Fixation du frottis** de la suspension bactérienne par séchage à la chaleur douce (trois ou quatre passages brefs dans la flamme du bec bunsen) sur une lame porte objet en verre, après son étalement préalable à l'aide d'une anse de platine.

2- **Coloration primaire** au violet de gentiane par la couverture totale de la lame pendant 1 min.

3- **Stabilisation de la coloration** au Lugol (qualifié d'agent mordant) par la couverture totale de la lame, pendant 1 min.

4- **Décoloration** au goutte à goutte à l'éthanol à 95° avec une légère agitation, jusqu'à l'élimination du colorant.

5- **Contre-coloration** pendant 20 à 30s par la couverture totale de la lame avec une solution de Fuschine diluée dans l'éthanol à 95%.

6- Lavage à l'eau

La lame, une fois séchée, peut être observée au microscope optique avec un objectif à immersion. Si les cellules sont violettes on parle de bactérie à Gram positif, si elles sont roses elles sont dites des bactéries à Gram négatif.

Annexes

Annexe 2 : Protocoles de biologie moléculaire

2a- Extraction de l'ADN total

Cette méthode a été utilisée pour extraire l'ADN génomique des souches à identifier afin d'obtenir le gabarit pour l'amplification PCR du gène codant pour l'ARNr 16S. L'extraction a été réalisée avec le kit Wizard® Genomic DNA Purification. Le protocole suivi est celui fourni par le fabricant.

Lyse cellulaire

- Centrifuger un aliquote de 1mL d'une culture de nuit min à 13000 rpm. Jeter le surnageant.
- **Resuspendre le culot dans 600µL** de la solution *Nuclei Lysis Solution* **par pipettage répété** pour remettre le culot en suspension. **Incuber 5heure à 85°C** puis refroidir à température ambiante.
- Ajouter 3µL de la solution RNase (4mg/mL) et incubé 45min à 37°C.

Précipitation des protéines

- Ajouter 200µL de la solution *Protein Precipitation Solution*, bien mélanger par le vortex et incubé 5 minutes sur la glace. Centrifuger à 13000 rpm pendant 3minutes et transférer délicatement le surnageant dans un tube propre.
- Recommencer ces trois dernières étapes 4 à 5 fois jusqu'à la disparition de l'interface protéique blanche.

Précipitation de l'ADN

- Transférer Le surnageant recueilli dans un tube Eppendorf contenant 600µL d'isopropanol stérile. Centrifuger le mélange 2 min à 13000 rpm puis éliminer le surnageant.
- Ajouter 600µL d'éthanol 70%. Centrifuger le mélange 2 min à 13000 rpm puis vider complètement l'éthanol, ensuite sécher le culot avec le Speed vac
- Reprendre le culot dans 50µL de tampon Tris (100Mm et pH 8) pour 1 heure à 65°C, puis garder la suspension une nuit à 4°C.
- 2µl de d'ADN génomique sont déposés sur gel d'agarose 0,8% pour vérifier l'efficacité de l'extraction.

Annexes

2b- Optimisation de la PCR avec la Prim STAR

Cycle 1		95°C	2-4 min (3 min)	
Cycle 2	Dénaturation	98°C	15 sec	Repeater 35X
	Hybridation (Ta)	50°C	10 sec	
	Elongation	72°C	25 sec/kb	
Cycle 3	Elongation	72°C	5-7 min	
Cycle 4	Hold	20°C		

Réactif	Volume
Prim Star (2X)	12.5 µL
Oligonucléotide fwd (10µM)	1.5 µL
Oligonucléotide rev (10µM)	1.5 µL
ADN à amplifier	1 µL
Eau	qsq 25 µL

Annexes

2c- Solutions d'extraction de l'ADN plasmidique

Composition des solutions d'extraction

1) Solution A (conserver à 4°C)

Glucose 0.1M	10mL Glucose 20%
Tris/HCl 0.0025 M pH 8	5mL Tris/HCl 1M pH 8
EDTA 0.01M	4mL EDTA 0.5 M pH 8
H ₂ O Δ	qsq 200 mL

2) Solution B (se conserver une semaine à température ambiante)

H ₂ O Δ	8.8 mL
NaOH 0.2M	0.2 mL Na OH 10N
SDS 1%	1mL SDS 10%

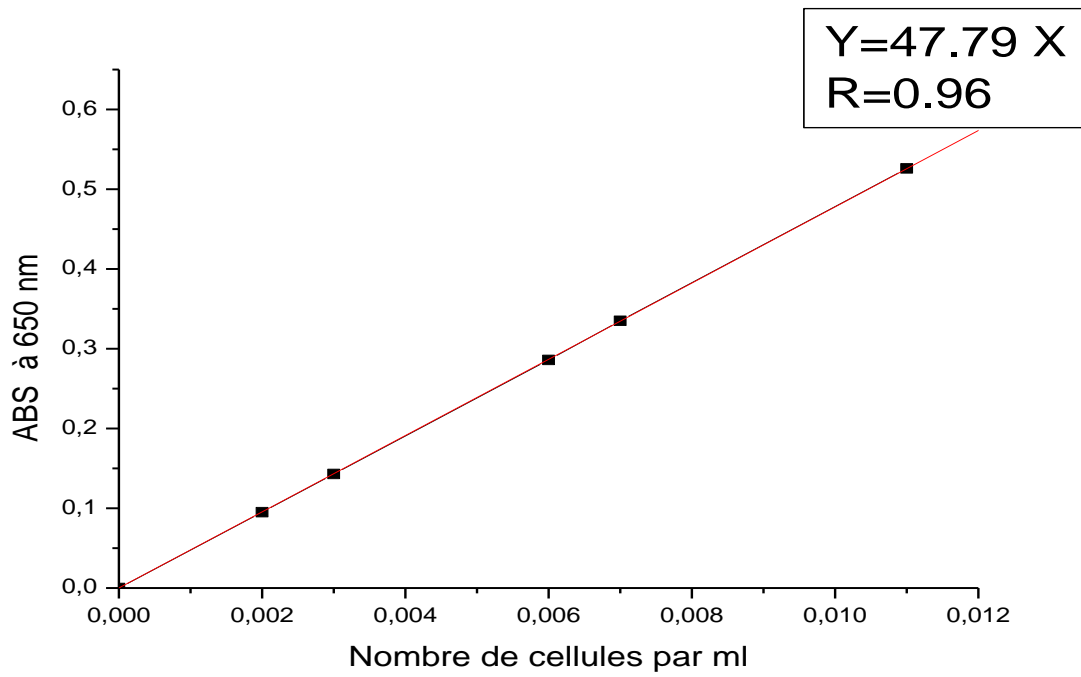
3) Solution C Acétate Na 3M pH 5 (à conserver 4°)

Acétate Na 3H ₂ O	204 g
CH ₃ COOH	150 mL
H ₂ O Δ	qsq 500 mL

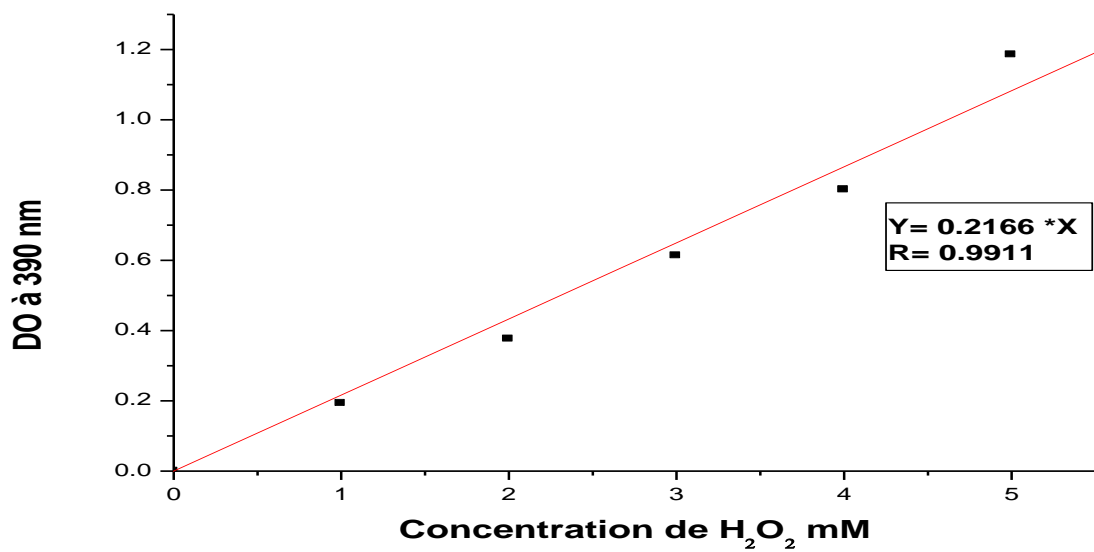
Annexes

Annexe 3 : Courbes étalons

3a- Courbe d'étalonnage de la biomasse

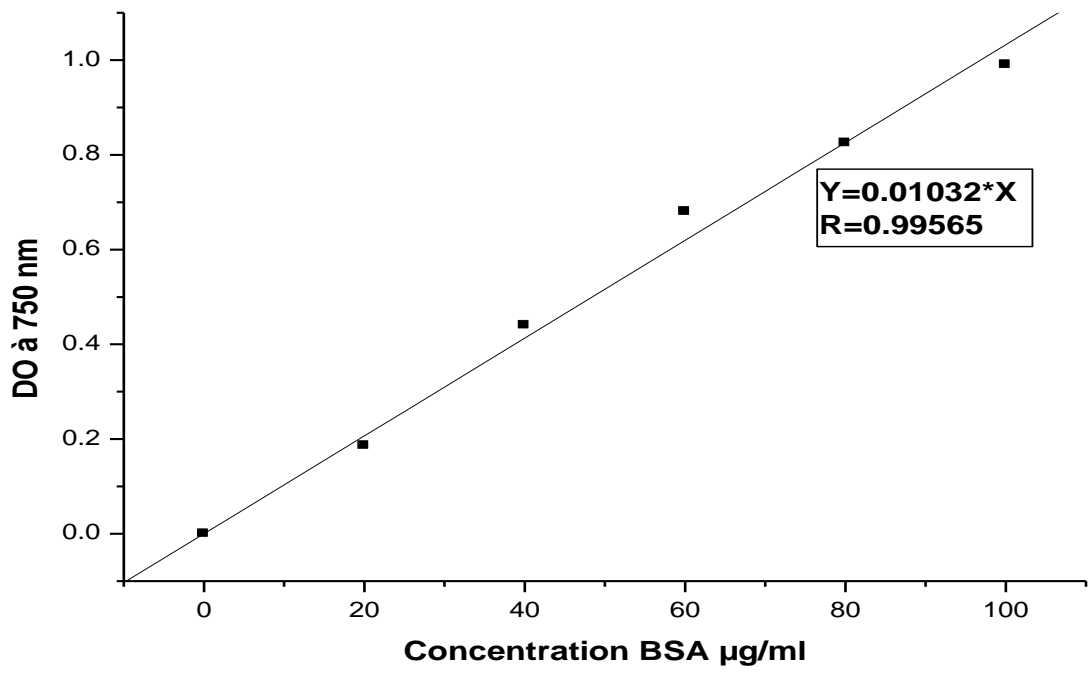


3b- Courbe d'étalonnage d'H₂O₂



Annexes

3c- Courbe d'étalonnage des protéines



Annexes

Annexe 4 : Séquence et analyse des séquences du gène 16S ribosomique des isolats H6R1B Mc et L6R2B Mc

4a- Séquences du gène 16S ribosomique des isolats H6R1B Mc et L6R2B Mc

H6R1B Mc	1	AGTGGTA-GCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGG
L6R2B Mc	1	----GTA-GCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGAACCCACTCCCATGG
H6R1B Mc	60	TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGA
L6R2B Mc	56	TGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGA
H6R1B Mc	120	TTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGTA
L6R2B Mc	116	TTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGTA
H6R1B Mc	180	CTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCAC
L6R2B Mc	176	CTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCAC
H6R1B Mc	240	GTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGT
L6R2B Mc	236	GTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGT
H6R1B Mc	300	TTACTACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGT
L6R2B Mc	296	TTACTACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGT
H6R1B Mc	360	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACAGGAGCTGACGACAGCCATGCAG
L6R2B Mc	356	TGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACAGGAGCTGACGACAGCCATGCAG
H6R1B Mc	420	CACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAA
L6R2B Mc	416	CACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAA
H6R1B Mc	480	GAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGG
L6R2B Mc	476	GAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGG
H6R1B Mc	540	GCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGTGATTTA
L6R2B Mc	536	GCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGTGATTTA
H6R1B Mc	600	ACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCATGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACA
L6R2B Mc	596	ACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCATGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTACA
H6R1B Mc	660	GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCA
L6R2B Mc	656	GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCA
H6R1B Mc	720	GTCTTCGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTAC
L6R2B Mc	716	GTCTTCGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTAC
H6R1B Mc	780	CGCTACACCTGGAATTCTACCCCC-----
L6R2B Mc	776	CGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACGAGACTCTAGCTTGCC-----

Annexes

4b- Analyse des séquences du gène 16S ribosomique des isolats H6R1B Mc et L6R2B Mc

Serratia marcescens strain MOLBE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN535229.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MN535229 605 bp DNA linear BCT 09-OCT-2019
DEFINITION Serratia marcescens strain MOLBE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MN535229
VERSION MN535229.1
KEYWORDS .
SOURCE Serratia marcescens
ORGANISM [Serratia marcescens](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Yersiniaceae; Serratia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 605)
AUTHORS Kassa Laouar,M., Meghnous,O., Mosbah,F., Rodrigue,A. and Rached,O.
TITLE Antioxidative Enzyme Responses to Antimony Stress of Serratia marcescens - an Endophytic Bacteria of Hedysarum pallidum Roots
JOURNAL Pol J Environ Stud 29 (1), 1-12 (2020)
REFERENCE 2 (bases 1 to 605)
AUTHORS Kassa Laouar,M., Meghnous,O., Mosbah,F., Rodrigue,A. and Rached,O.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (03-OCT-2019) Biochimie, University Constantine 1, Ain el Bey, Constantine 25000, Algeria
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..605
/organism="Serratia marcescens"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="MOLBE"
/isolation_source="plant"
/host="Sulla pallida"
/db_xref="taxon:615"
/country="Algeria"
rRNA <1..>605
/product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 taccatgcag tcgagcggta gcacagggga gcttgctccc tgggtgacga gcggcggacg
61 ggtgagtaat gtctgggaaa ctgcctgatg gagggggata actactggaa acggtagcta
121 ataccgcata acgtcgcaag accaaagagg gggaccttcg ggcctcttgc catcagatgt
181 gccagatgg gattagctag taggtgggtt aatggctcac ctaggcgacg atccctagct
241 ggtctgagag gatgaccagc cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg
301 cagcagtggt gaatattgca caatgggcgc aagcctgatg cagccatgcc gcgtgtgtga
361 agaaggcctt cgggttgtaa agcactttca gcgaggagga aggtggtgaa ctttaatacgt
421 tcatcaattg acgttactcg cagaagaagc accggctaac tccgtgccag cagccgcggt
481 aatacggagg gtgcaagcgt taatcggaat tactgggcgt aaagcgcacg cagggcggtt
541 gttaagtcag atgtgaaatc ccccgggctc aacctgggga actgcatttt gaaactgggc
601 aagct

Annexes

Serratia marcescens strain MOFLBE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: MN534323.1

[FASTA Graphics](#)

[Go to:](#)

LOCUS MN534323 620 bp DNA linear BCT 09-OCT-2019
DEFINITION Serratia marcescens strain MOFLBE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION MN534323
VERSION MN534323.1
KEYWORDS .
SOURCE Serratia marcescens
ORGANISM [Serratia marcescens](#)
Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacterales; Yersiniaceae; Serratia.
REFERENCE 1 (bases 1 to 620)
AUTHORS Kassa Laouar,M., Meghnous,O., Mosbah,F., Rodrigue,A. and Rached,O.
TITLE Selection of Arsenic resistant endophytic bacteria
JOURNAL Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 620)
AUTHORS Kassa Laouar,M., Meghnous,O., Mosbah,F., Rodrigue,A. and Rached,O.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (03-OCT-2019) Biochimie, University Constantine 1, Ain el Bey, Constantine 25000, Algeria
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..620
/organism="Serratia marcescens"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="MOFLBE"
/isolation_source="plant"
/host="Lygeum spartum L"
/db_xref="taxon:615"
/country="Algeria"
rRNA <1..>620
/product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 taccatgcag tcgagcggta gcacagggga gcttgctccc tgggtgacga gggcgggacg
61 ggtgagtaat gtctgggaaa ctgcctgatg gagggggata actactggaa acggtagcta
121 ataccgcata acgtcgcaag accaaagagg gggaccttcg ggcctcttgc catcagatgt
181 gccagatgg gattagctag tagtggggt aatggctcac ctaggcgacg atccctagct
241 ggtctgagag gatgaccagc cacactggaa ctgagacacg gtccagactc ctacgggagg
301 cagcagtggy gaatattgca caatgggcgc aagcctgatg cagccatgcc gcgtgtgtga
361 agaaggcctt cgggttghtaa agcactttca gcgaggagga aggtggtgaa ctttaatacgt
421 tcatcaattg acgttactcg cagaagaagc accggctaac tccgtgccag cagccgcggt
481 aatacggagg gtgcaagcgt taatcggaat tactgggcgt aaagcgcacg caggcggttt
541 gttaagtcag atgtgaaatc ccccgggctc aacctgggga actgcatttt gaaactgggc
601 aagccttagag tctccgtaga

Annexes

Annexe 5 : Tableaux de corrélation

Tableau 6 : Coefficients de corrélation de *Pearson* entre les concentrations de l'antimoine (Sb) dans le milieu de culture et entre tous les biomarqueurs analysés. * $p < 0,05$, ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ (n = 15)

Variables	DO 650nm	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	POD	APX	SOD
Sb en Mm	-0,9675 ***	0,9717 ***	0,1082	0,2900	0,6985**	-0,1215	0,4217	-0,0814
DO 650nm	1	-0,9046 ***	-0,0938	-0,2333	-0,6091*	0,0706	-0,4414	0,0064
H ₂ O ₂		1	0,0259	0,2952	0,7267**	-0,2670	0,2864	-0,2472
MDA			1	0,7736***	0,5359*	0,8748***	0,8503***	0,7726***
Proline				1	0,7439**	0,5937*	0,7599**	0,5072
CAT					1	0,2140	0,5902*	0,1479
POD						1	0,8251***	0,9586***
APX							1	0,8290***

Tableau 7 : Coefficients de corrélation de *Pearson* entre les concentrations de l'arsenic (As) dans le milieu de culture et entre tous les biomarqueurs analysés. * $p < 0,05$, ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ (n = 15)

Variables	DO 650nm	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	POD	APX	SOD
As en mM	-0,9292***	0,9173***	0,1840	0,8316***	0,5907*	0,6995**	-0,0864	0,2749
DO 650nm	1	-0,8604***	0,0378	-0,6292*	-0,5041	-0,5346*	0,3711	-0,0228
H ₂ O ₂		1	0,3038	0,7121**	0,5476*	0,6531**	0,0460	0,3669
MDA			1	0,5673*	0,6697**	0,7410**	0,9014***	0,9333***
Proline				1	0,8248***	0,9293***	0,3467	0,6321
CAT					1	0,9294***	0,3617	0,6672**
POD						1	0,4688	0,7256**
APX							1	0,8715***

Annexes

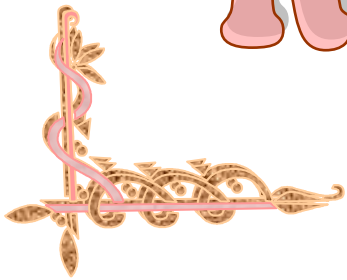
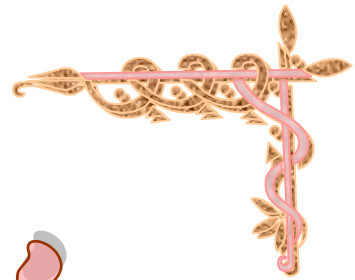
Tableau 8 : Coefficients de corrélation de *Pearson* entre les concentrations de l'antimoine (Sb), sauf 30 mM, dans le milieu de culture et entre tous les biomarqueurs analysés. * $p < 0,05$, ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ (n = 12)

Variables	DO 650nm	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	POD	APX	SOD
Sb en mM	-0,9435***	0,9351***	0,8087**	0,9066***	0,9668***	0,4897	0,7533**	0,3544
DO 650nm	1	-0,8011**	-0,8850***	-0,8994***	-0,8818***	-0,6586*	-0,8760***	-0,5569
H ₂ O ₂		1	0,5867*	0,8346***	0,9507***	0,1721	0,4915	0,0357
MDA			1	0,7476**	0,6972*	0,8449***	0,9193***	0,7339**
Proline				1	0,8605***	0,5356	0,7840**	0,4471
CAT					1	0,3465	0,6280*	0,2195
POD						1	0,9205***	0,9633***
APX							1	0,8724***

Tableau 9 : Coefficients de corrélation de *Pearson* entre les concentrations de l'arsenic, sauf 20 mM, dans le milieu de culture et entre tous les biomarqueurs analysés. * $p < 0,05$; ** $p < 10^{-2}$, *** $p < 10^{-3}$ (n = 12)

Variables	DO 650nm	H ₂ O ₂	MDA	Proline	CAT	POD	APX	SOD
As en mM	-0,8528***	0,8506***	0,7920**	0,9649***	0,9357***	0,9973***	0,5130	0,7293**
DO 650nm	1	-0,7364**	-0,5299	-0,7136**	-0,9016***	-0,8393***	-0,0920	-0,4179
H ₂ O ₂		1	0,8942***	0,7641**	0,8168**	0,8780***	0,6532*	0,7920**
MDA			1	0,7782**	0,7047*	0,8261***	0,8784***	0,9389***
Proline				1	0,8798***	0,9601***	0,5910*	0,7688**
CAT					1	0,9349***	0,3729	0,6729*
POD						1	0,5558	0,7638**
APX							1	0,8902***

Résumés



Résumé

Ce travail porte sur l'étude de la flore bactérienne endophytique des racines d'*H. pallidum* et *L. spartum* poussant sur les sols d'une région minière contaminée par l'antimoine (Sb) et l'arsenic (As). Puis la sélection des bactéries tolérantes à des teneurs élevées en ces métalloïdes ; ainsi la détermination des mécanismes biochimique, physiologique et moléculaire de défense adoptés par cette microflore pour tolérer le stress métallique.

Les analyses morphologiques et biochimiques ont mis en évidence une grande biodiversité de cette microflore endophytique. L'étude de la toxicité du Sb et d'As a permis de sélectionner deux souches bactériennes possédant les plus hautes CMI, à savoir 450 mM de Sb et 175 mM d'As. L'identification moléculaire des souches résistantes, *via* le séquençage du gène ARNr 16S, a montré qu'elles sont identiques et affiliées à l'espèce *Serratia marcescens* avec une homologie de 99 %. La culture *en batch* en présence de concentrations graduelles en Sb et As a révélé une diminution progressive de la croissance des deux souches. De plus, la mesure des paramètres du stress oxydatif indique une augmentation importante de la teneur en H₂O₂, de la teneur en MDA, de la proline intracellulaire, et même des activités des enzymes antioxydantes, sauf à des seuils élevés en Sb et en As. Ces enzymes permettent la détoxification de la bactérie par élimination du H₂O₂ et des autres radicaux libres générés par le stress métallique. De plus, l'étude de la résistance des souches de *S. marcescens* à une gamme de métaux lourds et d'antibiotiques montre une résistance multiple au nickel et au cobalt, ainsi qu'à la kanamycine, à l'ampicilline et au chloramphénicol. Pour faire face à la présence de Sb et d'As, *S. marcescens* a adopté la vie en mode de regroupement sous forme de biofilms pour atténuer leur toxicité. L'étude moléculaire des mécanismes de résistance des deux souches en utilisant des méthodes de transformations cellulaires a dévoilé que les déterminants génétiques responsables de la résistance de *S. marcescens* aux métalloïdes sont portés principalement par le chromosome.

Mots clés : bactéries endophytes, métalloïdes, stress oxydatif, H₂O₂, MDA, proline, enzymes antioxydantes, biofilm, transformation, résistance.

Abstract

This work focuses on the study of the endophytic bacterial flora of *H. pallidum* and *L. spartum* roots, growing on the soil of mining region polluted by Sb and As, and the determination of the physiological, biochemical and molecular defense mechanisms adopted by this microflora to fight against metallic stress.

The morphological and biochemical analyzes reveal a high biodiversity of this endophytic microflora. The study of the Sb and As toxicity allows the selection of two strains having the highest MICs, namely 450 mM of Sb and 175 mM of As. The molecular identification of resistant strains *via* 16S RNA gene sequencing shows that they are identical and belong to the *Serratia marcescens* species with 99% homology. The batch culture in presence of gradual Sb and As concentrations reveals a progressive decrease in bacterial growth of the two strains. Moreover, the measurement of oxidative stress parameters indicates a significant increase in the H₂O₂ amount, the MDA amount, the intracellular proline and even the activities of antioxidant enzymes, except at high thresholds in Sb and As. These enzymes permit the detoxification of the bacteria by elimination of the H₂O₂ and the other free radicals generated by metallic stress. In addition, the study of the resistance of *S. marcescens* strains to a range of heavy metals and antibiotics shows multiple resistance to nickel and cobalt, as well as to kanamycin, ampicillin and chloramphenicol. To cope with the presence of Sb and As, *S. marcescens* has adopted life in group mode and form biofilms to reduce their toxicity. The molecular study of the resistance mechanisms of the two strains, using cell transformation methods, reveals that the genetic determinants responsible for the resistance of *S. marcescens* to metalloids are carried mainly by the chromosome.

Key words: bacterial endophytes, metalloids, oxidative stress, H₂O₂, MDA, proline, antioxidant enzymes, biofilm, transformation, resistance.

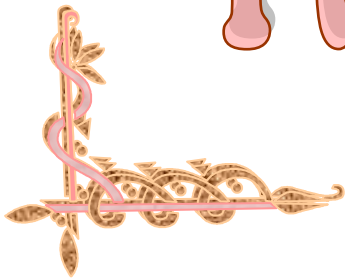
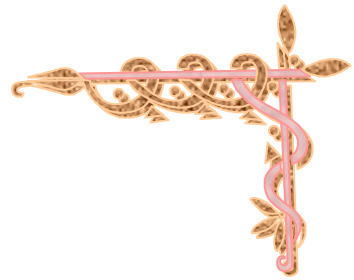
ملخص

يتناول هذا العمل دراسة البكتيريا الداخلية لجذور *L. spartum* و *H. pallidum* التي تنمو في منطقة منجمية ملوثة بالاثمد والزرنيخ، و تحديد الآليات الدفاعية الفسيولوجية، البيوكيميائية والجزئية التي اعتمدها هذه الكائنات المجهرية لمكافحة الإجهاد المعدني.

أبرزت التحاليل المورفولوجية والبيوكيميائية عن وجود تنوع بيولوجي كبير في هذه البكتيريا الداخلية. أتاحت دراسة سمية المعدين (Sb و As) إنتقاء سلالتين بكتيريتين الأكثر تحمل لهذين المعدنين من خلال تحديد الحد الأدنى من تركيزاتها المثبطة (MICs) ، Sb mM 450 و As mM 175. كما أظهرت الدراسة الجزئية لمورثة 16S RNA لهتين سلالتين تطابقهما التام وإنتماؤهما لنفس السلالة (*Serratia marcescens*) بنسبة تماثل قدرت ب 99%. وكشفت زراعة هذه البكتيريا في وسط يحتوي تراكيز متزايدة من Sb و As عن انخفاض تدريجي في نمو السلالتين. بالإضافة الى ذلك فإن تقييم مستوى الإجهاد التأكسدي أشار إلى زيادة كبيرة في محتوى H_2O_2 ، MDA ، في نسبة البرولين وحتى في أنشطة إنزيمات مضادات الأكسدة ، إستثنائيا عند عتبات عالية من Sb و As. هذه الانزيمات تسمح بإزالة السموم من البكتيريا عن طريق القضاء على H_2O_2 وغيرها من الجذور الحرة. أظهرت دراسة سمية مجموعة من المعادن الثقيلة والمضادات الحيوية أن سلالتي *S. marcescens* مقاومتين للنكل والكوبالت، وكذلك للكاناميسين والأمبيسيلين والكلورامفينيكول. و لتقليل من سمية Sb و As، تفضل هذه السلالتين العيش على شكل أغشية حيوية (biofilms). كما كشفت الدراسة الجزئية لآليات مقاومة السلالتين من خلال طرق تحويل الخلايا أن المحددات الجينية المسؤولة عن مقاومة *S. marcescens* لكل من Sb و As محمولة بشكل رئيسي على الكروموسوم.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الداخلية ، المعادن الثقيلة ، الإجهاد التأكسدي ، H_2O_2 ، MDA ، البرولين ، إنزيمات مضادات الأكسدة ، المقاومة ، التحول.

Publication



See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/335567188>

Antioxidative Enzyme Responses to Antimony Stress of *Serratia marcescens* – an Endophytic Bacteria of *Hedysarum pallidum* Roots

Article in Polish Journal of Environmental Studies · September 2019

DOI: 10.15244/pjoes/100494

CITATIONS

0

READS

72

6 authors, including:



Mechakra Aïcha

Mentouri University, Constantine 1

35 PUBLICATIONS 135 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Agnès Rodrigue

Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

51 PUBLICATIONS 1,262 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Ouissem Meghnous

University of Constantine 1

2 PUBLICATIONS 2 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Alima Bentellis

5 PUBLICATIONS 22 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Identification by Tn-seq of *Dickeya dadantii* genes required for survival in chicory plants [View project](#)



Production of Milk Clotting Protease by *Rhizopus Stolonifer* through Optimization of Culture Conditions [View project](#)

KASSA LAOUAR Mounia ép. CHOUIKH	Date de soutenance : 09 / 07 / 2019
<p><i>Thème :</i></p> <p>Etude des mécanismes de résistance de bactéries endophytes isolées à partir des racines d'<i>Hedysarum pallidum</i> et de <i>Lygeum spartum</i> poussant sur des déblais de mine d'antimoine.</p>	
<p><i>Thèse de Doctorat en Sciences</i></p> <p><i>Option : Biochimie-Microbiologie appliquée</i></p>	
<p>Résumé</p> <p>Ce travail porte sur l'étude de la flore bactérienne endophytique des racines d'<i>H. pallidum</i> et <i>L. spartum</i> poussant sur les sols d'une région minière contaminée par l'antimoine (Sb) et l'arsenic (As). Puis la sélection des bactéries tolérantes à des teneurs élevées en ces métalloïdes ; ainsi la détermination des mécanismes biochimique, physiologique et moléculaire de défense adoptés par cette microflore pour tolérer le stress métallique.</p> <p>Les analyses morphologiques et biochimiques ont mis en évidence une grande biodiversité de cette microflore endophytique. L'étude de la toxicité du Sb et d'As a permis de sélectionner deux souches bactériennes possédant les plus hautes CMI, à savoir 450 mM de Sb et 175 mM d'As. L'identification moléculaire des souches résistantes, <i>via</i> le séquençage du gène ARNr 16S, a montré qu'elles sont identiques et affiliées à l'espèce <i>Serratia marcescens</i> avec une homologie de 99 %. La culture <i>en batch</i> en présence de concentrations graduelles en Sb et As a révélé une diminution progressive de la croissance des deux souches. De plus, la mesure des paramètres du stress oxydatif indique une augmentation importante de la teneur en H₂O₂, de la teneur en MDA, de la proline intracellulaire, et même des activités des enzymes antioxydantes, sauf à des seuils élevés en Sb et en As. Ces enzymes permettent la détoxification de la bactérie par élimination du H₂O₂ et des autres radicaux libres générés par le stress métallique. De plus, l'étude de la résistance des souches de <i>S. marcescens</i> à une gamme de métaux lourds et d'antibiotiques montre une résistance multiple au nickel et au cobalt, ainsi qu'à la kanamycine, à l'ampicilline et au chloramphénicol. Pour faire face à la présence de Sb et d'As, <i>S. marcescens</i> a adopté la vie en mode de regroupement sous forme de biofilms pour atténuer leur toxicité. L'étude moléculaire des mécanismes de résistance des deux souches en utilisant des méthodes de transformations cellulaires a dévoilé que les déterminants génétiques responsables de la résistance de <i>S. marcescens</i> aux métalloïdes sont portés principalement par le chromosome.</p>	
<p>Mots clés : bactéries endophytes, métalloïdes, stress oxydatif, H₂O₂, MDA, proline, enzymes antioxydantes, biofilm, transformation, résistance.</p>	
<p>Laboratoire de recherche : Laboratoire de Biologie et Environnement</p>	
<p>Président: Pr. AMMEDAH. S. Directrice: Pr. MECHAKRA. A. Co-Directrice Pr. RACHED O. Examineurs: MCA. BANI M. Pr. ARHAB R. Pr. AFRI-MEHENNAOUI F.Z.</p>	<p>Université des Frères Mentouri Constantine 1 Université des Frères Mentouri Constantine 1 ENSB Constantine. ENSB Constantine. Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi Université des Frères Mentouri Constantine 1</p>
<p>Année universitaire 2019/2020</p>	