

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie/Biologie Cellulaire et Moléculaire

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيوكيمياء حيوية / البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**Étude de la réponse antioxydante d'une bactérie endophyte, *Serratia marcescens*,
au stress oxydatif généré par le cadmium.**

Présenté par : BENAMIRA Dounia
BENALLA Racha

Le 26/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : KASSA-LAOUAR M. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : MEGHNOUS O. (MAB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : MOKRANI E.H. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire
2021 - 2022**

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu, le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce mémoire.

*Ces remerciements sont adressés chaleureusement à **Mme. Kassa-Laour M.** de nous avoir encadré dans notre mémoire de fin d'étude, nous la remercions aussi pour son précieux conseil, sa disponibilité, et son aide durant toute la période du travail. Ce fut un immense plaisir de travailler avec vous Docteur.*

*On tient à remercier aussi les membres du jury de nous avoir fait l'honneur d'évaluer ce travail : **Melle. Meghnous O. et Mr. Mokrani E.L.***

*Nos remerciements s'adressent à **Melle. Meghnous O.** d'avoir accepté de nous accueillir dans laboratoire, merci aussi à toute l'équipe d'avoir répondu à nos questions avec une plus grande gentillesse.*

Nous adressons nos sincères remerciements à l'ensemble du corps enseignants, depuis l'école primaire aux études supérieures pour toutes les connaissances et les conseils qu'ils nous ont transmis.

Enfin, nous remercions également toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Afin d'être reconnaissante envers ceux qui m'ont appuyé et encouragé à effectuer ce travail de recherche, je dédie ce mémoire :

A MES TRÈS CHERS PARENTS : Mabrouk et Farida

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père.

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.

A TOUTE MA FAMILLE : Benamira

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A tous mes cousins et cousines et sur tous mes adorables Razan et Ratil.

*A ma chère **binôme** Racha, ma douce sœur qui a eu la patience de me supporter durant ce mémoire et son père Charaf pour son soutien dans toute la période de réaliser ce travail.*

A mes chères amies: Aya, Asma, Houda, Youssra, et Safia.

Benamira Dounia

Dédicaces

C'est avec grand plaisir que je dédie ce modeste travail :

A ma très chère Maman, qui me donne toujours l'espoir de vivre et qui a toujours été présente dans les moments sombres de ma vie et qui n'a jamais cessé de prier pour moi.

A mon très cher Papa, pour ses encouragements, son soutien, surtout pour son amour et son sacrifice afin que rien n'entrave le déroulement de mes études.

Que dieu les garde et les protège.

A mon frère Ilyes à qui je souhaite une bonne réussite à ces études.

A ma sœur Romila à qui je souhaite tout le bonheur du monde.

A mon très chère oncle Azzedine, que dieu le garde.

A mes chères tantes et chers oncles.

A tous mes cousins et cousines.

A ma chère tante Soraya de canada et sa petite famille, Lina, Adil et Maram sans oublier oncle Karim, à qui je souhaite les voir cet été inchallah.

A ma copine Dounia qui m'a accompagné tout le long de la réalisation de ce travail.

A mes chères amies Rayenne, Khaoula et Djouheina, pour tous les moments que nous avons partagés.

A tous mes professeurs, qui m'ont soutenu durant toutes ces années d'études.

Benalla Racha

Table des matières

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
---------------------------	---

Synthèse bibliographique

1 Bactéries endophytes	3
1.1 Définition.....	3
1.2 Intérêt des bactéries endophytes.....	3
1.2.1 Protection des plantes hôtes contre les stress	3
2 <i>Serratia marcescens</i>	4
2.1 Définition.....	4
2.2 <i>Serratia</i> bactérie endophytes	5
2.3 Pathologie.....	5
3 Stress oxydatif	6
3.1 Radicaux libres.....	6
3.2 Sources biologiques des radicaux libres.....	7
3.2.1 Source endogène.....	7
3.2.2 Source exogène.....	7
3.3 Origine des espèces oxydantes	8
3.3.1 Radical superoxyde	8
3.3.2 Peroxyde d'hydrogène	8
3.3.3 Radical hydroxyle.....	8
3.4 Cibles des radicaux libres.....	8
3.4.1 Acide désoxyribonucléique (ADN).....	9
3.4.2 Protéines	10
3.4.3 Lipides.....	11
4 Antioxydants	11
4.1 Antioxydants enzymatiques.....	11
4.1.1 Superoxyde dismutase.....	12
4.1.2 Catalase	12
4.1.3 La glutathion peroxydase	13
4.2 Antioxydants non enzymatiques.....	13

5 Métaux lourds	13
5.1 Définition.....	13
5.2 Origine des métaux lourds.....	14
5.2.1 Origine naturelle.....	15
5.2.2 Origine anthropique.....	15
5.3 Différents types des métaux lourds	15
5.3.1 Métaux essentiels.....	15
5.3.2 Métaux non essentiels.....	15
5.4 Toxicité des métaux lourds.....	15
5.5 Biodisponibilité des métaux lourds	16
5.5.1 Facteurs abiotiques	16
5.5.1.1 pH.....	16
5.5.1.2 Potentiel redox.....	16
5.5.1.3 Teneur en argile.....	17
5.5.1.4 Matière organique.....	17
5.5.2 Facteurs biotiques.....	17
5.6 Cadmium	18
5.6.1 Origine de cadmium	18
5.6.1.1 Origine naturelle.....	18
5.6.1.2 Origine anthropologique.....	18
5.7 Résistance des bactéries aux métaux lourds	18
5.7.1 Exclusion du métal toxique par la perméabilité	18
5.7.2 Transport actif par des systèmes d'expulsion.....	19
5.7.3 Séquestration	19
6 Cadmium et stress oxydatif	19
7 Stress généré par les métaux lourds chez les bactéries	19

Matériel et méthodes

1 Objectif	21
2 Matériel biologique	21
3 Étude du stress oxydatif de la bactérie endophyte <i>Serratia marcescens</i>	21
3.1 Préparation de la biomasse bactérienne.....	21
3.2 Estimation de la croissance	22
3.3 Détermination du H ₂ O ₂ intracellulaire	22
3.4 Préparation de l'extrait enzymatique.....	22
3.5 Détermination du malonyldialdéhyde (MDA)	22

4	Dosage de la catalase	23
5	Dosage des protéines	23

Résultats et discussion

1	Objectif	24
2	Effet du cadmium sur la croissance de <i>Serratia marcescens</i>	24
3	Effet du cadmium sur la teneur en H ₂ O ₂	25
4	Effet du cadmium sur la teneur en MDA	26
5	Effet du cadmium sur l'activité de la catalase	28

Conclusion	30
------------------	----

Références bibliographiques	32
-----------------------------------	----

Annexes

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

- Abs** : Absorbance
- AGPI** : Acides gras polyinsaturés
- As** : Arsenic
- BSA** : Albumine de sérum bovin
- CAT** : Catalase
- Cd** : Cadmium
- CEC** : capacité d'échange cationique
- Cu** : Cuivre
- Eh** : Potentiel redox
- ERO** : Espèces Réactives de l'Oxygène
- ETM** : Eléments Traces Métalliques
- Fe** : Fer
- GPX** : Guaicol Peroxydase
- GR** : Glutathion Réductase
- GST**: Glutathion S-transferase
- H⁺** : Cation hydrogène
- H₂O₂** : Peroxyde d'Hydrogène
- Hg** : Mercure
- IAA** : Acide indole-3-acétique
- IgA** : Immunoglobulines A
- IgG** : Immunoglobuline G
- LB** : Luria- Bertani
- MDA** : Malondialdéhyde
- Mn** : Manganèse
- N** : Azote
- Ni** : Nickel
- O₂•** ou **O₂⁻** : Anion Superoxyde
- OH°**: Radical Hydroxyle
- TBA** : Acide thiobarbiturique
- Pb** : Plomb
- PGPR** : Plant Growth-Promoting *Rhizobacteria*
- P** : Phosphore

PVP : Polyvinylpyrrolidone

ROO° : Radical Peroxyde

Sb : Antimoine

SOD : Superoxyde Dismutase

Zn : Zinc

8-OH-Dg : 8-hydroxydésoxyguanosine

Liste des figures

- Figure 1 :** Représentation schématique des différentes interactions plante-endophyte bactériennes et leurs applications.
- Figure 2 :** Schéma de la balance entre les ERO et les antioxydants.
- Figure 3 :** Formation des radicaux libres.
- Figure 4 :** Différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène.
- Figure 5 :** Lésions de l'ADN formées par l'attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.
- Figure 6 :** Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire.
- Figure 7 :** Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes.
- Figure 8 :** Classification périodique des éléments.
- Figure 9 :** Origine des métaux lourds dans le sol.
- Figure 10 :** Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds.
- Figure 11 :** Localisation (spéciation) des éléments en traces métallique dans le sol.
- Figure 12 :** Effet de cadmium sur le taux croissance de *Serratia marcescens*.
- Figure 13 :** Variation de la teneur en H₂O₂ en fonction de la concentration du cadmium.
- Figure 14 :** Variation de la teneur en MDA en fonction de la concentration du cadmium.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Enzymes antioxydants majeures impliquées dans la détoxification des ERO.

Introduction

Introduction

Les métaux lourds sont des éléments largement distribués dans les écosystèmes. Ils proviennent de nombreuses sources comme les déchets urbains, les engrais, les pesticides et les déchets industriels des usines (Soni et Amarnath, 2020). Les métaux lourds sont des molécules non biodégradables, ils peuvent persister dans l'environnement pendant de longues périodes. Leur accumulation peut se répercuter sur la santé des êtres humains, des animaux et des végétaux. A l'échelle microscopique. Les métaux lourds ont aussi des effets néfastes sur les populations bactériennes (Huynh, 2009).

Le cadmium est considéré comme l'un des métaux lourds les plus dangereux dans le sol. Il a été suggéré que c'est l'élément le plus mobile dans les sols cultivés. En effet, sa présence dans le sol endommage la communauté bactérienne, il provoque divers effets nuisibles, tels que l'allongement de la phase de latence, l'inhibition des activités enzymatiques, l'altération de la structure de l'ADN et la réduction de la biodiversité microbienne. En outre, le cadmium affecte négativement les protéines transporteurs, les enzymes de la chaîne respiratoire, ainsi que les molécules biologique à l'intérieur de la cellule, et tout cela se répercutent sur la croissance bactérienne (Yakoubi, 2019).

Ces dernières années, le développement des techniques efficaces pour la décontamination des sites pollués est devenu indispensable. La technique la plus utilisée est la bioremédiation, elle permet d'exploiter les capacités accumulatrices des organismes rhizosphériques et/ou endophytiques pour extraire les métaux des sites contaminés, ce qui contribue à la fertilité du sol et aide au développement des plantes (Huynh, 2009 ; Yakoubi, 2019).

Les endophytes bactériens sont des microorganismes qui colonisent les tissus internes d'une plante sans lui causer de dommages apparents. Ils forment des relations symbiotiques très diverses, ils apportent les nutriments et la protection à la plante hôte contre les différents stress. Les bactéries endophytes peuvent interagir avec les métaux de différentes manières pour atténuer leur toxicité et aider les plantes à les accumuler sans augmenter la phytotoxicité, ce qui permet l'amélioration de la bioremédiation (Kassa-Laour, 2020).

L'exposition des bactéries à des fortes concentrations de métaux lourds peut entraîner une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Cela induit la production des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde distumase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX) et la peroxydase, ainsi que des composés non enzymatiques

Introduction

comme la proline, la vitamine C et le glutathion (GSH), permettant ainsi une adaptation des bactéries aux conditions stressantes.

Le présent travail vise à étudier la réponse antioxydante d'une bactérie endophyte, *Serratia marcescens*, suite à un stress induit par la présence du cadmium. Pour cela, la croissance bactérienne, la teneur en H₂O₂ et en MDA ainsi l'activité de la catalase ont été mesurée à des concentrations graduelles en Cd additionnées dans le milieu de culture.

Ce mémoire est subdivisé en trois parties. La première est une synthèse bibliographique qui contient des informations sur les bactéries endophytes, notamment la souche *Serratia marcescens*, les métaux lourds, le stress oxydatif et aussi la résistance des bactéries aux métaux. La deuxième partie comprend les protocoles expérimentaux utilisés pour atteindre les objectifs visés. La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus et leur discussion avec d'autres travaux similaires. Le mémoire se termine par une conclusion et des perspectives.

Synthèse bibliographique

1 Bactéries endophytes

1.1 Définition

Un endophyte est un organisme qui vit à l'intérieur d'une plante. Ces microorganismes peuvent coloniser les tissus internes des végétaux sans causer de dommages apparents chez l'hôte (Lemsara et Aouarib, 2016). Cette définition inclut l'ensemble des interactions symbiotiques impliquant une plante et des microorganismes comme: le parasitisme, le commensalisme, le mutualisme (Santara, 2004) (Figure 1).

En général, les microorganismes endophytes peuvent provenir : du sol (rhizosphère), de la surface de feuilles (phylloplane), des racines, des organes végétatifs, des semences ou des grains (Santara, 2004).

1.2 Intérêt des bactéries endophytes

Les endophytes ont la capacité d'améliorer le développement et la résistance de leur plante hôte (Morgane, 2019). L'effet positif de ces bactéries est dû à divers mécanismes : l'apport en éléments essentiels (P, N...) (Louaar et Maatoug, 2016), et la production des phytohormones (les auxines, les cytokines...) qui stimulent la croissance des plantes. L'acide indole-3-acétique (IAA) est un membre de la classe des auxines augmentant l'efficacité de la colonisation (Pablo et Leonard, 2015).

1.2.1 Protection des plantes hôtes contre les stress

Les bactéries endophytes protègent la plante contre les différents types de stress tels que :

Stress biotique : est déclenché par l'action néfaste d'un autre organisme vivant (champignons, insecte, bactérie, adventices...). Les endophytes utilisent des moyens de défenses contre ces organismes, par la production des métabolites secondaires permettent également de lutter contre une agression microbienne ou insecte ravageur. Donc les endophytes assurent la protection de sa hôte (Morgane, 2019).

Stress abiotique : comme les inondations, la salinité et la présence de métaux lourds. Par exemple, il a été montré qu'une bactérie du genre *Serratia* améliore la croissance et la tolérance de *Lupinus luteus* (une plantes herbacées) sur un substrat contaminé par l'arsenic, le plomb et le cuivre (Louaar et Maatoug, 2016).

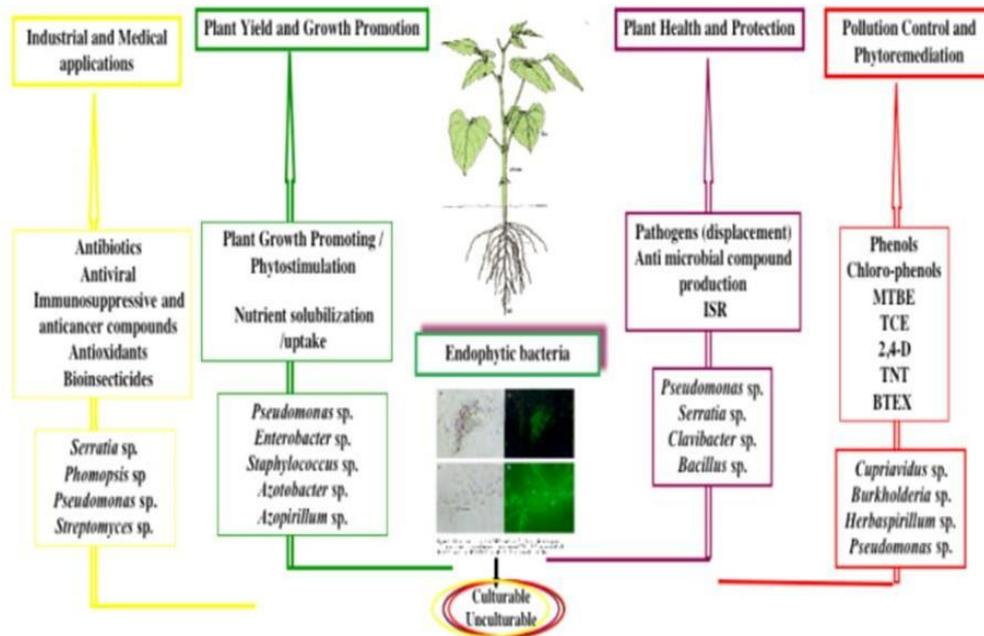


Figure 1 : Représentation schématique des différentes interactions plante-endophyte bactériennes et leurs applications (El Aafi et *al.*, 2012).

2 *Serratia marcescens*

2.1 Définition

Les espèces du genre *Serratia* sont des bactéries anaérobies facultatives (Grimont et Grimont, 1992), elles peuvent se développer en présence d'oxygène (aérobie) ou en l'absence d'oxygène (anaérobie) (Slonczewski et John, 2009). *Serratia marcescens* est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet court qui mesurent 0,9 à 2 μm de longueur et 0,5 à 0,8 μm de diamètre (Van et *al.*, 2007). Les bactéries à Gram négatif ont une fine paroi cellulaire constituée d'une seule couche de peptidoglycane entourée d'une membrane externe sert également de moyen pour réguler l'absorption des nutriments et l'exclusion des toxines (Slonczewski et John, 2009).

Serratia marcescens possède un flagelle péritriche qui lui permet de nager et de se déplacer en faisceau en forme d'hélice (avec différenciation) (Grimont et Grimont, 1992). Cette espèce est bien connue pour une pigmentation rouge qu'elle produit à température ambiante appelée prodigiosine (Schlegel, 1992), et qui possède des propriétés antibiotiques, immunosuppressives, proapoptotiques et anticancéreuses puissantes (Van et *al.*, 2007).

2.2 *Serratia* bactérie endophytes

Les *Serratia* associées aux plantes comprennent à la fois des endophytes et des espèces libres dans la rhizosphère. De nombreuses espèces de *Serratia* ont la capacité de favoriser la croissance des plantes (PGP), et sont des agents de lutte biologique contre les pathogènes fongiques du sol qui infectent diverses cultures (Muller et Berg, 2008).

Serratia marcescens a été décrite comme un important endophyte du riz (Gyaneshwar et al., 2001), et elle a été également isolée de fleurs de courges d'été (Selvakumar et al., 2008), de tissus sains de cactus comestibles (Li et al., 2011), et d'une plante médicinale *Centella asiatica* (Nongkhlaw et Joshua, 2014). De nombreuses études ont montré le potentiel de *S. marcescens* qui induit la croissance des plantes en stimulant la production de phytohormones et la solubilisation du phosphate, ainsi que l'amélioration de l'approvisionnement en azote dans les associations non symbiotiques (Kaidem et al., 2016).

2.3 Pathologie

Serratia marcescens est un pathogène opportuniste responsable d'infections nosocomiales: infections des voies urinaires et du cristallin oculaire. Il a également été lié à l'endocardite, à l'ostéomyélite, à la septicémie, aux infections des plaies et des voies respiratoires (Dasantila, 2008).

Les facteurs de virulence potentiels impliqués dans sa pathogénicité sont les protéases, la nucléase, la lécithinase et l'hémolysine. Une sérine protéase de 56 kDa a été démontré qu'elle favorise la kératite en clivant les IgG, les IgA et le lysozyme (Hume et al., 1999). Cependant, le facteur pathogène le mieux étudié est l'hémolysine Sh1A, provoque l'hémolyse des érythrocytes humains et animaux, et la libération des médiateurs inflammatoires, tels que l'histamine et les leucotriènes des leucocytes (Dasantila, 2008).

3 Stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme étant un déséquilibre de la balance entre les prooxydant et les antioxydants en faveur des premiers, ce qui conduit à des dégâts cellulaires irréversibles (Pincemail et *al.*, 1999).

Lorsque la concentration des espèces réactives oxygénées augmente et la réponse antioxydante n'est plus suffisante pour la contenir: il résulte une perte d'homéostasie redox et conduisant, ainsi à l'apparition d'un déséquilibre avec une production de grandes quantités de ERO, entraînant un stress oxydatif (Sies, 1997) (Figure 2).

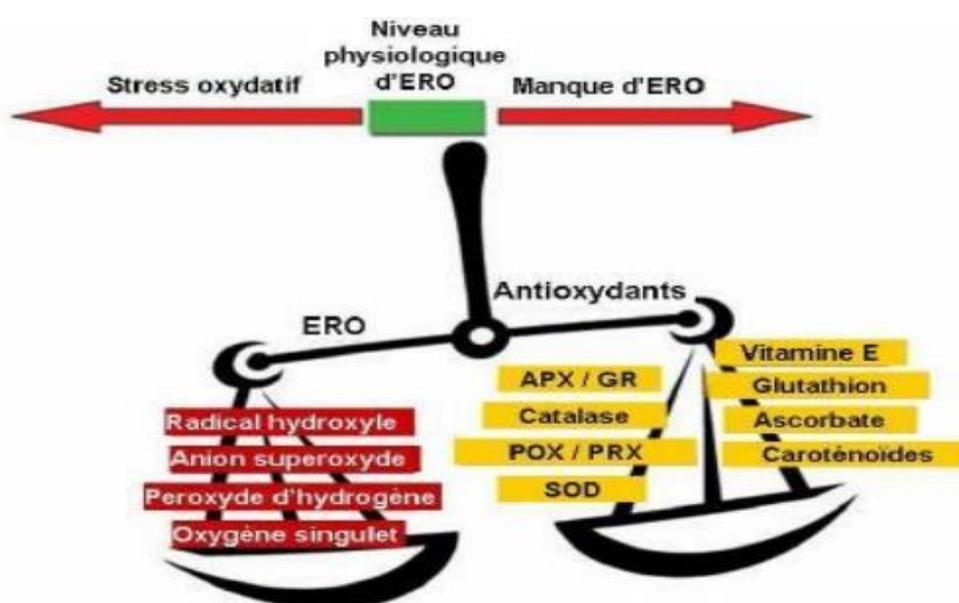


Figure 2 : Schéma de la balance entre les ERO et les antioxydants (Sies, 1997).

3.1 Radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié), et jouent un rôle comme accepteur d'électron en arrachant des électrons à d'autres molécules. Ces électrons libres sont exprimés par l'ajout du symbole $^{\circ}$ ou \bullet dans la formule chimique des radicaux libres (Gilgun-Sherki et *al.*, 2001) (Figure 3).

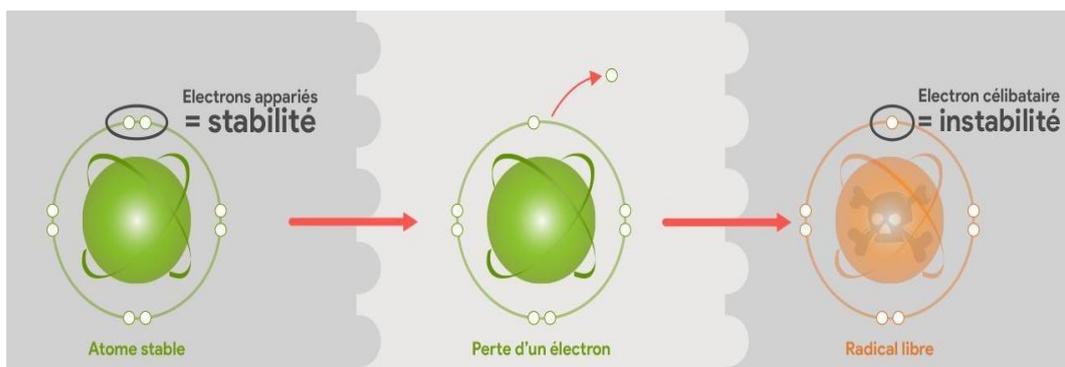


Figure 3 : Formation des radicaux libres (Knopik et Dahmani, 2018).

Les espèces réactives de l'oxygène sont produites d'une manière accrue lorsque la régulation du métabolisme de l'oxygène est perturbée (stress oxydant). Elles deviennent agressives lorsqu'elles sont formées en grandes quantités. Cette production radicalaire est dommageable s'elle est prolongée ou incontrôlée, dépassant les capacités de neutralisation et donne lieu au stress oxydant (Favier, 2003).

3.2 Sources biologiques des radicaux libres

3.2.1 Source endogène

Dans l'organisme, il y a de nombreuses sources d'ERO dont l'importance varie selon les tissus. La réaction chimique de Fenton produit des ERO dans la cellule. Les sources des ERO sont enzymatiques et non enzymatiques (Dröge, 2001).

3.2.2 Source exogène

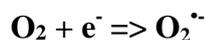
Les ERO peuvent être générés par des agents physiques tels que le rayonnement (rayonnement ionisé X, gamma ou ultraviolet), qui sont capables de produire des anions superoxydes ou l'oxygène (Ghazi, 2011).

Des toxiques tels que le monoxyde d'azote (NO°) et le dioxyde d'azote (NO°_2) présents dans notre environnement (goudron, polluants industriels...etc.), et participent à la genèse de radicaux libres (Pincemail et *al.*, 1998).

3.3 Origine des espèces oxydantes

3.3.1 Radical superoxyde

L'anion superoxyde (O_2°) est formé par la réduction monoélectronique de l'oxygène. Dans la cellule, le superoxyde est produit majoritairement au niveau de la chaîne respiratoire, chez les bactéries et peut être à la fois oxydant $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ et réducteur $O_2/O_2^{\cdot-}$ (Bonnot, 2009).

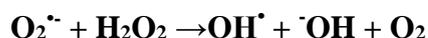


3.3.2 Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est un produit plus stable que le superoxyde, c'est pourquoi, il se diffuse facilement à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. C'est un oxydant très puissant, capable d'accepter deux électrons supplémentaires (Goudable et Favier, 1997).

3.3.3 Radical hydroxyle

Le radical hydroxyle $OH\cdot$ est le plus dangereux dans l'organisme, il est formé lors de la réaction de l'anion superoxyde avec l'hydrogène peroxyde (Halliwell et *al.*, 1984) :



Le radical hydroxyle est le plus réactive et le plus puissant. Il est proposé que ce radical est principalement dérivé de la décomposition du peroxyde d'hydrogène par la réaction de Fenton catalysée par le fer (Sollin, 2021) :



3.4 Cibles des radicaux libres

Les ERO peuvent réagir avec la plupart des biomolécules présentant des doubles liaisons comme les acides gras insaturés, les protéines et l'ADN (Kassa-Laouar, 2020) (Figure 4).

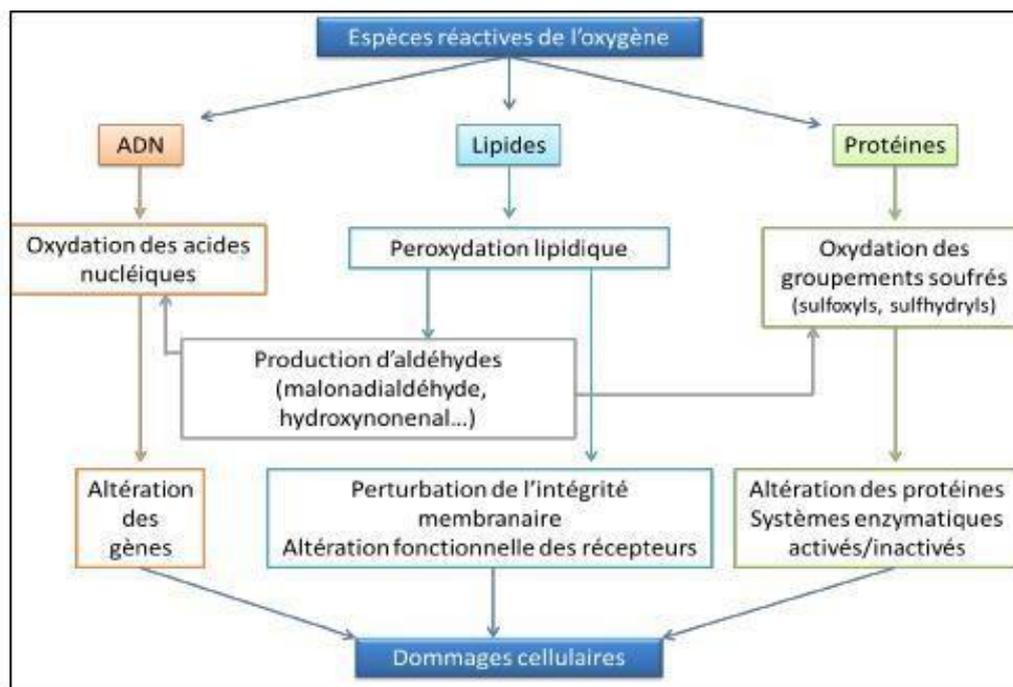


Figure 4 : Différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Laib et Medbouh, 2016).

3.4.1 Acide désoxyribonucléique (ADN)

L'ADN est très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène, et les classes principales de dommages oxydatifs sont regroupés en quatre grandes catégories : les coupures simples des doubles brins, la modification de bases, la formation de sites abasiques et les pontages ADN-protéines (Favier, 2003) (Figure 5).

L'ADN est une cible principale d'ERO par exemple : la guanine peut être associée à OH pour former 8-hydroxy-2'-déoxyguano-cytosine (8-OH-dG) qui s'apparie avec l'adénine au lieu la cytosine, entraînant des mutations au sein de l'ADN et conduisant à des altérations du message génétique impliqué dans le déclenchement le vieillissement (Haleng et al., 2007).

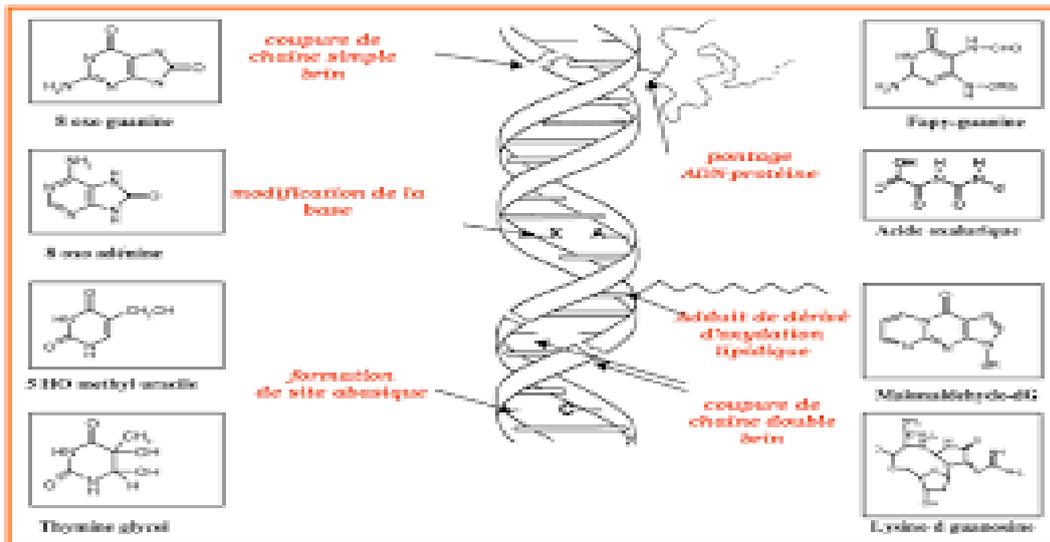


Figure 5 : Lésions de l'ADN formées par l'attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules (Favier, 2003).

3.4.2 Protéines

Les acides aminés ont des sensibilités différentes à l'ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. Toute attaque radicalaire d'un acide aminé provoque l'oxydation de certains résidus conduisant ainsi à l'apparition de groupements carbonylés, des clivages de chaînes peptidiques et des ponts bi-tyrosine intra- et inter-chaînes (Haleng et al., 2007). Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques, et sont beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Stadtman et Levine, 2000) (Figure 6).

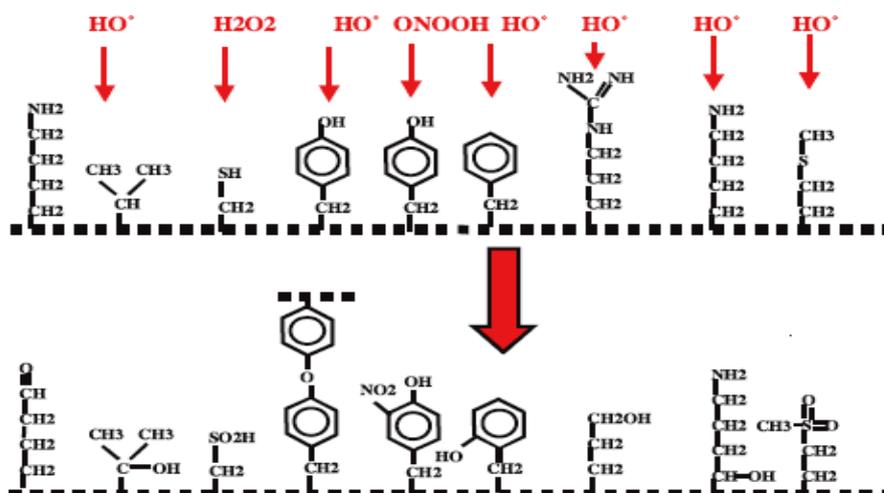


Figure 6 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (Favier, 2003).

3.4.3 Lipides

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont les composants les plus facilement oxydés par les ERO à cause de la présence d'hydrogène bis-allylique (Halliwell et Gutteridge, 1986). Le radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux doubles liaisons des acides gras polyinsaturés (AGPI) : c'est la phase d'initiation. Le radical lipidique qui réagit avec une molécule d'oxygène pour former un radical peroxyde (ROO°), suffisamment réactifs pour arracher un H^+ à un AGPI voisin, propageant ainsi la réaction. Il en résulte une altération de la fluidité membranaire qui conduit inévitablement à la mort cellulaire (Haleng *et al.*, 2007).

4 Antioxydants

Un antioxydant est une substance chimique qui réduit le stress oxydant chez organisme vivant. Selon leur mode d'action, les antioxydants se répartissent en deux catégories : enzymatiques et non enzymatiques (Desmier, 2016 ; Soufane *et al.*, 2018) (Figure 7).

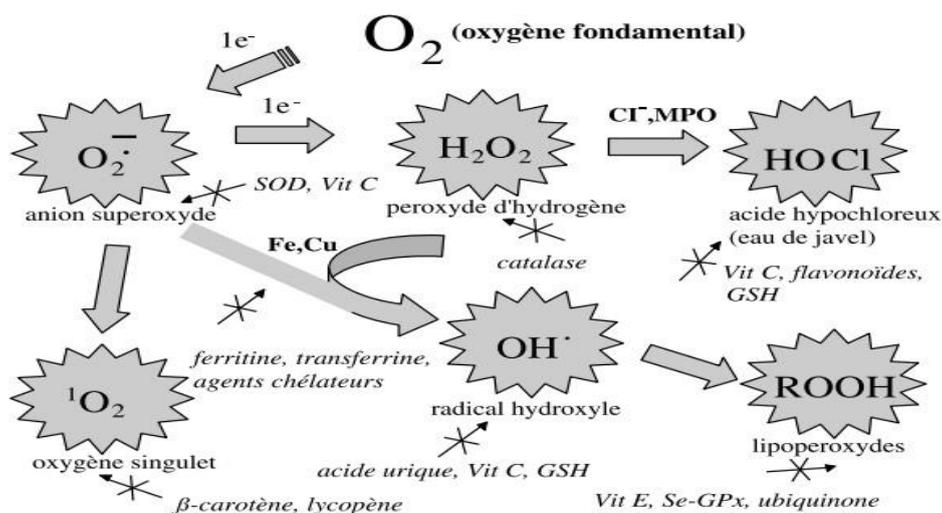


Figure7 : Régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les systèmes de défenses antioxydantes (Hamma *et al.*, 2015).

4.1 Antioxydants enzymatiques

Les principales enzymes antioxydantes : la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-

Synthèse bibliographique

transférase (GST) (Matés, 1999). Ils sont à l'avant-garde dans la lutte contre les attaques oxydatives (Tableau1).

Tableau 1 : Enzymes antioxydantes majeures impliquées dans la détoxification des ERO (Righa et Bousseboua, 2015).

Enzyme	Code enzymatique	Réaction
SOD	EC : 1.15.1.1	$O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$
CAT	EC : 1.11.1.6	$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$
GPX	EC : 1.6.4.2	$2GSH + R-O\ddot{O}H \longrightarrow R-OH + GSSG + 2H_2O$
GST	EC : 1.11.1.12	$RX + GSH \longrightarrow HX + R-S-GSH$
GR	EC : 2.8.1.18	$GSSG + NADPH + H^+ \longrightarrow NADP^+ + 2GSH$

4.1.1 Superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase (SOD) est la première enzyme antioxydant de défense contre le stress oxydatif. Ce sont des métalloprotéines qui ont la capacité d'éliminer l'anion superoxyde et catalyse la dismutation l' $O_2^{\bullet -}$ en H_2O_2 et O_2 (Herrero et *al.*, 2008) (Tableau 1).

Trois isoformes de SOD ont été distinguées : la SOD contenant du cuivre et du zinc (Cu/Zn SOD), la SOD contenant le manganèse (Mn/SOD) et la SOD contenant du fer (Fe /SOD) (Wuerges et *al.*, 2004).

4.1.2 Catalase

La catalase (CAT) est l'une des enzymes antioxydant les plus efficaces. C'est une enzyme tétramérique, dont chaque sous unité contient dans son site actif un ion Fe^{+3} et une molécule NADPH. Elle abaisse le taux du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en libérant de l'oxygène et de l'eau (Goudable et Favier, 1997) (Tableau 1).

La CAT est une hémoprotéine contenant quatre groupes hème. Elle possède une activité peroxydase et aussi capable d'utiliser une molécule d' H_2O_2 comme substrat donneur d'électrons et autre molécule d' H_2O_2 comme oxydant ou accepteur d'électrons (Murray et *al.*, 2013).

4.1.3 La glutathion peroxydase

La glutathion peroxydase (GPX) est une grande famille d'isoenzymes (Righa et Bousseboua, 2015). Son rôle est l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (Haleng et *al.*, 2007) (Tableau 1).

C'est une molécule tétramérique, dont chaque unité contient des atomes de sélénium. Elle assure la réduction du H₂O₂ en eau, des hydroperoxydes organiques (ROOH) et en alcools (ROH) (Khelaf et *al.*, 2016).

4.2 Antioxydants non enzymatiques

Parmi les systèmes antioxydants non enzymatiques, certains sont solubles dans l'eau ce qui leur permet d'agir dans la fraction soluble de la cellule, comme la vitamine C, glutathion et l'acide urique (Hamma et *al.*, 2015). Ils sont capables de piéger les ERO en captant leur électron libre et en les réduisant ainsi en molécules plus stables (Bouhidel et *al.*, 2016).

5 Métaux lourds

5.1 Définition

Les métaux lourds sont des groupes d'éléments inorganiques de masse volumique supérieure à 5 Kg/dm³. Ce sont des éléments métalliques ayant une densité relativement élevée et qui sont toxiques même à de faibles concentrations. Ils sont présents dans l'eau, le sol et l'air sous différentes formes chimiques (Huynh, 2009 ; Benhamdi, 2014).

Le terme élément trace métallique (ETM) est aussi utilisé pour décrire les métaux lourds, car ils se retrouvent souvent en très faible quantité dans l'environnement. Parmi les éléments recensés dans la classification périodique de Mendeleïev, 53 sont considérés comme des métaux lourds (Benkhaoua, et *al.*, 2017) (Figure 8).

1a																				0																	
1	H			IIa													IIIa			IVa	Va	VIIa	VIa			VIIa			2	He							
3	Li	Be												5	B	6	C	7	N	8	O	9	F	10	Ne												
11	Na	Mg		IIIb	IVb	Vb	VIIb	VIII			Ib	IIb	13	Al	14	Si	15	P	16	S	17	Cl	18	Ar													
19	K	20	Ca	21	Sc	22	Ti	23	V	24	Cr	25	Mn	26	Fe	27	Co	28	Ni	29	Cu	30	Zn	31	Ga	32	Ge	33	As	34	Se	35	Br	36	Kr		
37	Rb	38	Sr	39	Y	40	Zr	41	Nb	42	Mo	43	Tc	44	Ru	45	Rh	46	Pd	47	Ag	48	Cd	49	In	50	Sn	51	Sb	52	Te	53	I	54	Xe		
55	Cs	56	Ba	57	La	72	Hf	73	Ta	74	W	75	Re	76	Os	77	Ir	78	Pt	79	Au	80	Hg	81	Tl	82	Pb	83	Bi	84	Po	85	At	86	Rn		
87	Fr	88	Ra	89	Ac	104	Rf	105	Db	106	Sg	107	Bh	108	Hs	109	Mt	110		111		112		113		114		115		116		117		118			
										* lanthanide series																											
										58	Ce	59	Pr	60	Nd	61	Pm	62	Sm	63	Eu	64	Gd	65	Tb	66	Dy	67	Ho	68	Er	69	Tm	70	Yb	71	Lu
										** actinide series																											
										90	Th	91	Pa	92	U	93	Np	94	Pu	95	Am	96	Cm	97	Bk	98	Cf	99	Es	100	Fm	101	Md	102	No	103	Lr

Figure 8 : Classification périodique des éléments (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

5.2 Origine des métaux lourds

Les métaux lourds sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantités très faibles. Leur présence dans les sols peut être naturelle ou anthropogénique (Figure 9).

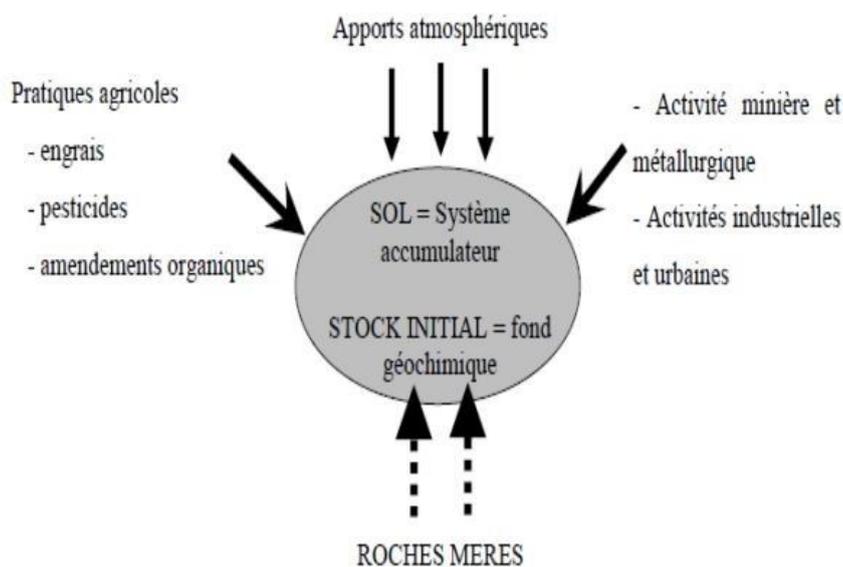


Figure 9 : Origine des métaux lourds dans le sol (Korfi, 2019).

5.2.1 Origine naturelle

Les métaux lourds sont présents de façon naturelle dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique. 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 (Kassa-Laouar, 2020 ; Maatoug et Louaar, 2016).

5.2.2 Origine anthropique

Les principaux types de pollutions anthropiques responsables de l'augmentation des flux de métaux, sont la pollution atmosphérique (rejets urbains et industriels), la pollution liée aux activités agricoles et la pollution industrielle (Singh et *al.*, 2003).

5.3 Différents types des métaux lourds

5.3.1 Métaux essentiels

Ce sont des éléments indispensables, à l'état de trace, pour de nombreux processus cellulaires. Ils se trouvent en proportion très faible dans les tissus biologiques (Loué, 1993), et ils deviennent toxiques lorsque leur concentration dépassent un certain seuil (Cuivre (Cu), Fer (Fe), Nickel (Ni) et Zinc (Zn)) (Kabata-Pendias et Pendias, 2001).

5.3.2 Métaux non essentiels

Comme le Cadmium (Cd), le Mercure (Hg) et le Plomb (Pb)..., sont des polluants avec des effets toxiques pour les organismes vivants même à faibles concentrations ; ils n'ont aucun rôle biologique connu (Korfi, 2019).

5.4 Toxicité des métaux lourds

Les métaux lourds toxiques ont des effets néfastes sur les microorganismes même à faible concentration. Ils provoquent l'inhibition de l'activité enzymatique en se fixant sur les atomes d'oxygène, d'azote, de soufre et surtout sur les résidus de cystéine, inhibant ainsi l'activité de nombreuses enzymes par le blocage des groupes fonctionnels des molécules biologiques importantes. De plus, le déplacement ou le remplacement d'ions essentiels dans les biomolécules, ainsi que le changement de conformation et la dénaturation ou l'inactivation des enzymes et la rupture de tout type de membrane cellulaire (Bellion, 2006).

5.5 Biodisponibilité des métaux lourds

Les métaux lourds peuvent exister sous forme d'ion libre ou sous forme liée à des particules de sol. Ils sont des éléments cationiques qui peuvent réagir dans le sol avec des particules organiques ou minérales chargées négativement (Huynh, 2009) (Figure 10). Plusieurs facteurs du sol sont responsables de la biodisponibilité des métaux lourds parmi lesquels :

La capacité d'échange de cation (CEC), le pH, le potentiel redox (Eh), la teneur en phosphate disponible, la teneur en matière organique et les activités biologiques (Huynh, 2009) (Figure 11).

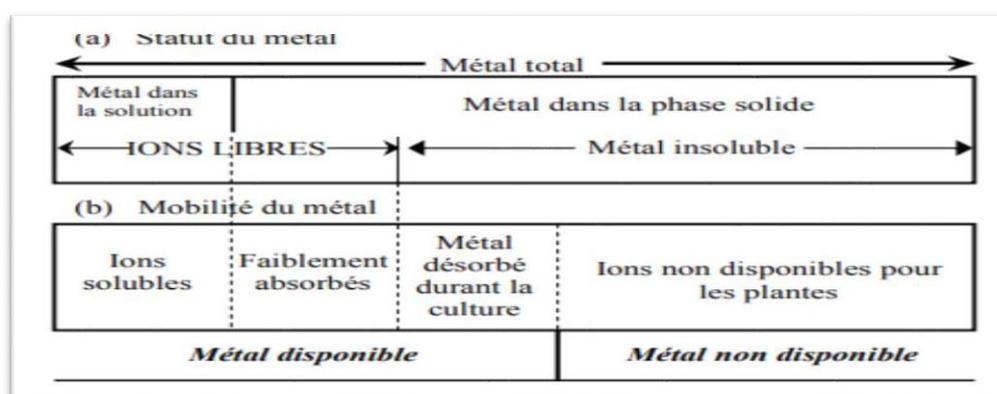


Figure10 : Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds (Huynh, 2009).

5.5.1 Facteurs abiotiques

5.5.1.1 pH

Le pH influence la solubilité, la spéciation du métal et sa toxicité. Les métaux lourds sont plus solubles et plus mobiles à pH acide, car ils se trouvent sous forme d'ions libres (Hahne et Kroontje, 1973).

5.5.1.2 Potentiel redox

Le potentiel redox (Eh) permet de caractériser les échanges d'électrons entre les espèces chimiques. Ainsi, les faibles valeurs d'Eh favorisent la dissolution des hydroxydes et amènent une augmentation de la concentration des métaux associés avec des composants. De plus, la modification du degré d'oxydation des ligands ou des éléments se liant avec le métal influence indirectement la solubilité des métaux lourds (Huynh, 2009).

5.5.1.3 Teneur en argile

Les argiles jouent un rôle très important dans la disponibilité des métaux lourds. De plus, il a été montré que les métaux peuvent être absorbés et immobilisés par les minéraux argileux grâce à leurs charges négatives, ou être complexés par la matière organique du sol en formant un complexe organométallique (Huynh, 2009 ; Louaar et Maatoug, 2016).

5.5.1.4 Matière organique

Les acides humiques présentent de nombreux groupements fonctionnels tels que des carboxyles et hydroxyle. Ces groupements peuvent interagir avec les métaux lourds pour former des complexes ou des chélates qui sont souvent très stables (Campbell et *al.*, 2000 ; Welp et Brtimmer, 1997).

5.5.2 Facteurs biotiques

L'activité biologique est le seul facteur biotique caractéristique du sol (Kassa-Laouar, 2020). Par exemple on retrouve de nombreuses populations bactériennes et fongiques dont les activités métaboliques influencent la mobilité des métaux lourds (Huynh, 2009).

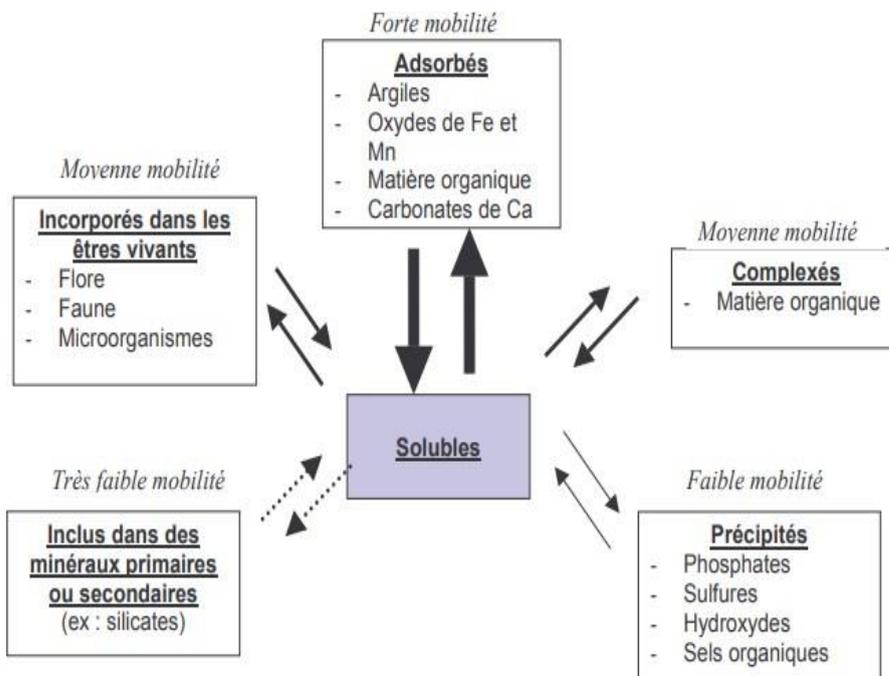


Figure 11 : Localisation (spéciation) des éléments en traces métallique dans le sol (Kassa-Laouar, 2020).

5.6 Cadmium

Le cadmium est un élément chimique de symbole Cd et de numéro atomique 48. C'est un métal blanc argenté avec des teintes de bleu. Il appartient à la famille des métaux de transition (Zorrig, 2011). Le Cd n'existe pas à l'état natif. Dans la croûte terrestre, on le retrouve principalement dans les minerais de zinc, de plomb et de cuivre. C'est un composé hautement toxique, soluble dans l'eau et peut être facilement absorbé par les plantes.

5.6.1 Origine du cadmium

5.6.1.1 Origine naturelle

Le cadmium est présent de façon naturelle dans la croûte terrestre. L'altération et l'érosion des roches vont libérer une quantité importante du cadmium qui sera transportée par les eaux. De plus, les sources naturelles conséquentes de libération du cadmium dans l'atmosphère sont l'activité volcanique et les feux de forêts (Pierre-clément, 2011).

5.6.1.2 Origine anthropologique

Les sources anthropologiques sont les activités industrielles parce que le cadmium est utilisé pour de nombreux usages industriels, ruissellement urbain ainsi que les activités agricoles, et la contamination par les tuyaux d'adduction galvanisés ou les soudures et les brasages des tuyauteries et chauffe-eau (cadmiage) (Pierre-Clément, 2011).

5.7 Résistance des bactéries aux métaux lourds

Les bactéries ont développé des systèmes de résistance pour faire face aux stress générés par les métaux toxiques. Ces systèmes sont basés sur des gènes chromosomiques, plasmidiques et/ou sur des transposons, et ils confèrent des résistances aux espèces métalliques (Louaar et Maatoug, 2016).

Les principaux mécanismes de détoxification des métaux chez les bactéries sont :

5.7.1 Exclusion du métal toxique par la perméabilité

C'est un système non spécifique qui empêche l'entrée du métal par une modification du système de transport membranaires ou par un arrêt de la production de la porine responsable de la perméabilité membranaire (Boukarboua, et *al.*, 2021).

5.7.2 Transport actif par des systèmes d'expulsion

C'est le mécanisme le plus utilisé chez les bactéries. Il s'agit des protéines membranaires très spécifique qui exporte les métaux toxiques du cytoplasme à l'extracellulaire (Boukarboua et *al.*, 2021).

5.7.3 Séquestration

L'accumulation intracellulaire du métal s'effectue notamment dans le cytoplasme par des métallothionéines. Ce sont des petites protéines riches en cystéine qui se lient aux métaux lourds. Elles emprisonnent le métal à l'intérieure de la cellule et le rend moins toxique (Silver et Phung, 1996).

6 Cadmium et stress oxydatif

Les ions métalliques peuvent être toxiques en activant les formes réduites de l'oxygène pour aboutir à la formation d'espèces radicalaires qui réagissent avec les molécules essentielles de l'architecture cellulaire (les protéines, les lipides et l'ADN), engendrant ainsi des dégâts cellulaires, des dysfonctionnements enzymatiques ou la peroxydation lipidiques (Yakoubi, 2019).

En présence de cadmium, il se crée un déséquilibre entre la génération des ERO et la production des antioxydants. De ce fait, il induit la production des ERO. Ce métal généré indirectement un stress oxydant suite à sa capacité à déplacé des éléments métalliques tels que le Fe^{2+} et Cu^{2+} des métalloprotéines, ce qui permet d'augmenter la concentration de ces oligoéléments dans la cellule (Yakoubi, 2019).

7 Stress généré par les métaux lourds chez les bactéries

L'exposition des bactéries à certains métaux lourds conduit à l'apparition d'un stress oxydatif, caractérisé par la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Car, ces éléments toxiques produisent des anions superoxydes (O_2^-), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et des radicaux hydroxyles (OH), qui perturbent l'homéostasie redox cellulaire (Kassa-Laouar, 2020). Les éléments métalliques affectent la croissance, la morphologie et le métabolisme de *S. marcescens* 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. *Serratia*

Synthèse bibliographique

marcescens utilise principalement la fermentation comme moyen de récupération d'énergie et possède des enzymes (superoxyde dismutase, catalase ou peroxydes) qui la protègent des espèces réactives de l'oxygène (Slonczewski et John, 2009; Etesami, 2018).

Matériel et méthodes

1 Objectif

L'objectif de ce travail est porté sur l'étude de la réponse antioxydante d'une bactérie endophyte, *Serratia marcescens*, suite à un stress induit par le cadmium. Pour cela, le taux croissance, la teneur en H₂O₂, en MDA ainsi l'activité de la catalase ont été mesurés en présence de concentrations graduelles de ce toxique.

2 Matériel biologique

La bactérie endophyte était isolée des tissus internes des racines saines d'*Hedysarum pallidum* ; une plante accumulatrice de métaux lourds et qui pousse sur des sols riche en antimoine et en arsenic dans la région de Djbel hamimet à Oum El Bouaghi.

Des tests de toxicité sur un milieu solide et liquide ont révélé que la bactérie ainsi isolée a pu tolérer la présence de 450 mM d'antimoine dans son milieu de culture. L'identification phénotypique (en utilisant des tests biochimiques) et génotypique (en utilisant le séquençage et la comparaison du gène d'ARNr 16S avec les données de *GenBank*) ont permis son identification. En effet, cet endophyte est affilié à l'espèce *Serratia marcescens* avec une similitude de 99 %.

3 Étude du stress oxydatif de la bactérie endophyte *Serratia marcescens*

Afin de connaître l'étendue de la résistance de *Serratia marcescens* à ce métal et leur capacité antioxydante, la teneur en MDA, en H₂O₂ ainsi l'activité de la catalase ont été mesurées.

3.1 Préparation de la biomasse bactérienne

La biomasse a été produite dans 50 mL de bouillon Luria-Bertani (LB) modifié (Annexe 1), en utilisant 1mL d'une préculture de 24 h contenant environ 4×10^5 UFC. Le milieu est supplémenté de différentes concentrations en cadmium, à savoir (0 ; 0,125 ; 0,25 ; 0,5 et 0,75). Chaque concentration est réalisée en 3 répétitions. Les cultures sont incubées dans un incubateur rotatif (New Brunswick Scientific) à 150 rpm, pendant 24 h à 30 °C. La récupération des biomasses est effectuée par une centrifugation à 8000 g pendant 15 min à 4 °C, et lavée avec l'eau désionisée stérile.

3.2 Estimation de la croissance

La croissance bactérienne a été estimée en mesurant l'absorbance à 650 nm (Perkin Elmer UV/VIS, Spectrometer, Lambda 25) pour chaque concentration en cadmium. La croissance en présence de cadmium est ensuite exprimée en pourcentage par rapport au témoin négatif. La valeur de l'absorbance mesurée du milieu de culture sans métal est prise comme 100% de référence pour normaliser les données.

3.3 Détermination du H₂O₂ intracellulaire

Les niveaux d'H₂O₂ sont déterminés selon la méthode de Sergiev et *al.* (1997). La biomasse est homogénéisée dans un bain de glace avec 5 mL de TCA 0,1 %. Après centrifugation à 12000g pendant 15 min, 0,5 mL du surnageant sont ajoutés 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, et le taux d'H₂O₂ est déterminé à partir d'une courbe d'étalonnage (Annexe 2, Figure 1).

3.4 Préparation de l'extrait enzymatique

Les biomasses récupérées sont lavées avec de l'eau désionisée stérile, puis suspendues dans une solution d'extraction glacée contenant le phosphate 50 mM (pH 7), 0,1% de triton X-100 et 1% de PVP. Après centrifugation à 10000g à 4 °C pendant 15 min, le surnageant représente l'extrait enzymatique, il est utilisé pour déterminer le niveau de la peroxydation lipidique, l'activité de la catalase et le taux des protéines.

3.5 Détermination du malonyldialdéhyde (MDA)

La teneur en MDA 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 % TCA et 0,5 % TBA. Le mélange est incubé à 95 °C pendant 30 minutes. La réaction est arrêtée en plaçant les tubes dans un bain de glace. Après centrifugation pendant 10 minutes à 10000 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 mM⁻¹ cm⁻¹.

4 Dosage de la catalase

Le dosage de l'activité enzymatique de la catalase (CAT) a été réalisé par la méthode de Chance et Maehly (1955). Le mélange réactionnel est constitué de 0,1mL d'extrait enzymatique et 2,9 mL d'une solution d'H₂O₂ (50 mM) préparée dans un tampon phosphate (50 mM à pH 7). La diminution de la concentration de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est mesurée chaque minute à 240 nm pendant les trois premières minutes.

5 Dosage des protéines

Le taux des protéines est déterminé selon la méthode de Lowry et *al.* (1951) en utilisant le Sérum Bovine Albumine (BSA) comme standard (Annexe 2, Figure 2).

Résultats et discussion

1 Objectif

Le présent travail porte sur l'étude de la réponse antioxydant d'une souche bactérienne endophyte, *Serratia marcescens*, isolée des racines d'*Hedysarum pallidum*, vis à vis la toxicité générée par le cadmium.

2 Effet du cadmium sur la croissance de *Serratia marcescens*

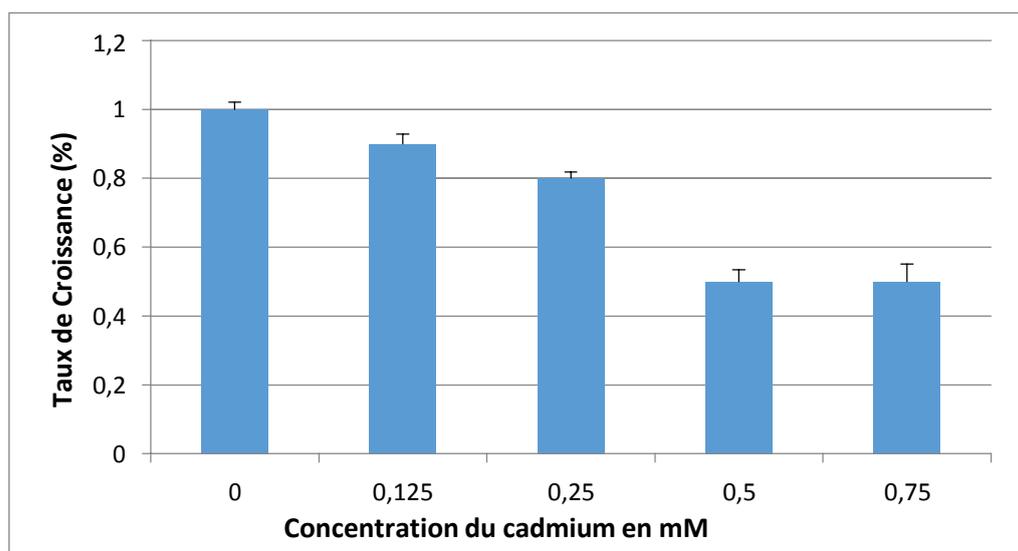


Figure 12 : Effet du cadmium sur le taux de croissance de *Serratia marcescens*.

La figure 14 représente l'effet de la concentration du cadmium sur le taux de la croissance de l'endophyte *Serratia marcescens*. Globalement, on note qu'il y a une diminution du taux de croissance quand la concentration du cadmium augmente de 0 à 0,5 mM. Les pourcentages de réduction sont environ 10%, 20% et 50%, respectivement. Ce résultat montre que le cadmium possède un effet néfaste sur la croissance bactérienne. Cependant à 0,5 et 0,75 mM de Cd, on constate une stabilisation de ce taux à 50%, cela peut être expliqué par une adaptation de la bactérie à la présence de Cd dans son milieu de culture.

La diminution du taux de croissance constaté chez *Serratia marcescens* en présence de Cd est expliquée par la diminution du nombre de cellules bactériennes viables. Cela peut être expliqué par des modifications de l'état physiologique de la souche, car la présence de ce toxique dans son milieu de culture peut provoquer une inhibition des enzymes de la chaîne respiratoire, une réduction des biomolécules (protéines, acides nucléiques) et/ou une altération de l'activité de certaines enzymes des voies métaboliques (Boularbah et *al.*, 1993 ; Igiri et *al.*,

2018). Comme elle peut être due à une possible autolyse en réponse à la toxicité de Cd (Bahar et *al.*, 2013).

De plus, Yakoubi (2019) a rapporté que la toxicité du Cd peut influencer aux niveaux membranaire et intercellulaire. La toxicité du Cd est envisageable sur les protéines de transport et les enzymes de l'espace périplasmique, ainsi que sur les molécules biologique à l'intérieur de la cellule et par conséquent, une perte importante de nutriments essentiels à la croissance bactérienne.

Les résultats obtenus sont similaires à ceux présentés par Yilmaz (2003), qui a constaté une réduction de la croissance de la souche *Bacillus circulans*, résistante aux métaux lourds, cultivée en présence de différentes doses en cadmium. De même, Govarthan et *al.* (2015) pour *Herbaspirillum* sp en présence de l'arsenic. De plus, Kassa-Laouar (2020) a rapporté une diminution du taux de croissance de *S.marcescens* en présence de l'antimoine et de l'arsenic.

3 Effet de cadmium sur la teneur en H₂O₂

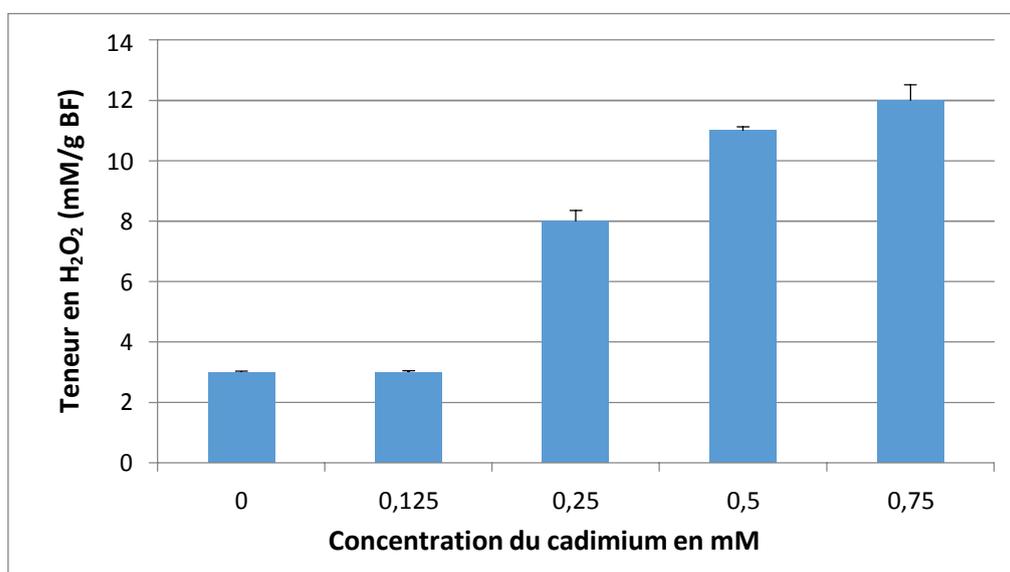


Figure 13 : Variation de la teneur en H₂O₂ en fonction des concentrations du cadmium

La figure 15 montre l'effet du cadmium sur la teneur en H₂O₂ dans les biomasses de *S. marcescens*. On constate que 0,125 mM de cadmium n'a pas stimulé la production de H₂O₂. Au-delà de cette concentration, la teneur en H₂O₂ augmente d'une façon significative jusqu'elle atteint 12 mM/g à 0.75 mM de Cd.

L'augmentation de la teneur intracellulaire en H_2O_2 , est induite par la présence des concentrations de Cd. L' H_2O_2 est un oxydant même à des faibles concentrations. Il pourrait causer des dommages oxydatifs. Il peut diffuser à travers les aquaporines membranaires et conduire à la formation de radicaux libres loin de son lieu de formation pour causer des dommages oxydatifs (Foyer et *al.*, 1997).

La concentration intracellulaire en peroxyde d'hydrogène n'est pas nulle, même en absence de toute contamination métallique (0 mM Cd), car celui-ci peut être généré en continu par réduction séquentielle de l'oxygène moléculaire (O_2) par les enzymes de la chaîne respiratoire associés à la membrane afin d'obtenir de l'énergie (Cabisco et *al.*, 2000).

Ces résultats sont similaires aux travaux de Behera et *al.* (2014) sur *Bacillus cereus* en présence de Cu. Par ailleurs, les travaux de Meghnous et *al.* (2019) portés sur *Aspergillus tubingensis* en présence de l'antimoine, ont révélé un accroissement des teneurs intracellulaires en H_2O_2 en présence des doses graduelles en Sb dans le milieu de culture. Le même résultat est rapporté par Kassa-Laouar (2020), qui a constaté que l'augmentation de la teneur intracellulaire en H_2O_2 a été induite chez *S. marcescens* par la présence de Sb dans le milieu de culture, ceci s'explique par une réponse oxydative.

4 Effet de cadmium sur la teneur en MDA

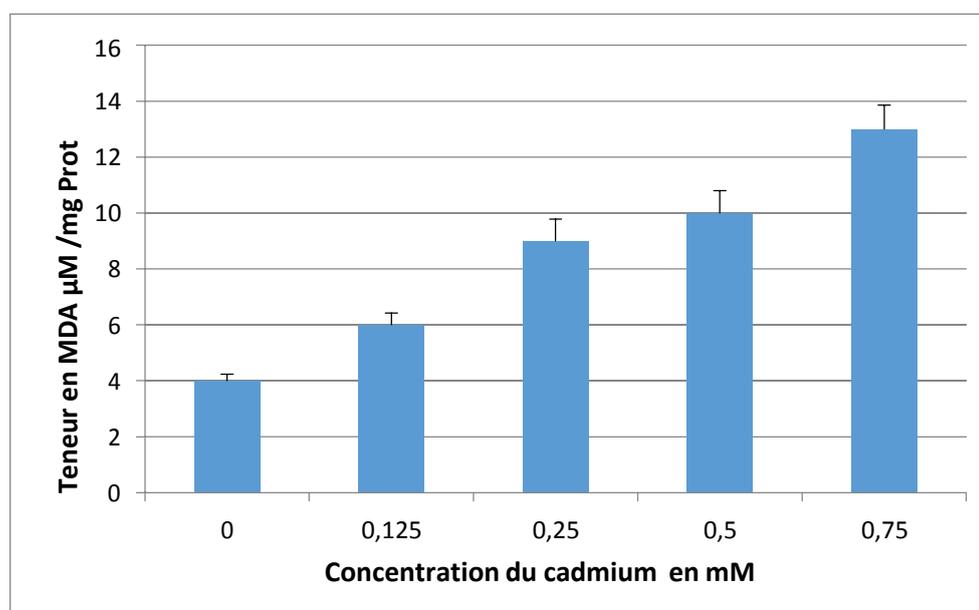


Figure 14 : Variation de la teneur en MDA en fonction de la concentration du cadmium.

Résultats et discussion

La figure ci-dessus présente l'effet du cadmium sur la teneur en MDA. On constate qu'il y a une augmentation progressive du MDA avec l'élévation de la concentration du cadmium dans le milieu de culture. Elle atteint 4, 6, 9, 10 et 13 $\mu\text{M}/\text{mg}$ de protéines à 0, 0,125, 0,25, 0,5 et 0,75 mM de cadmium, dans cet ordre.

L'augmentation de la concentration du MDA est justifiée par la génération des ERO tels que : H_2O_2 et O_2^- . Lorsque le H_2O_2 est présent dans la cellule bactérienne, il entraîne la peroxydation des acides gras polyinsaturés, pour donner un produit fini qui est le MDA. Ceci provoque une altération des propriétés biochimiques des biomolécules notamment celles de la membrane ; ce qui conduit à la diminution de sa fluidité, la perte de sa fonctionnalité de transport particulièrement des nutriments, la perte de la régulation de la balance osmotique et l'inactivation des ATPases (Alberts et *al.*, 2012), et entraîne ainsi la réduction de la croissance de la souche (William et *al.*, 1975).

L'augmentation de la teneur en H_2O_2 générée par l'augmentation de la concentration du cadmium, a entraîné la peroxydation lipidique et donc une production accrue du MDA. Ces résultats montrent qu'il y'a une corrélation entre les teneurs en H_2O_2 et en MDA et la concentration de Cd.

L'accumulation du MDA en présence des ions métalliques a été rapportée chez plusieurs microorganismes à savoir *Aspergillus niger* en présence d'arsenate (Mukherjee et *al.*, 2010), *Saccharomyces cerevisiae* en présence du Cd (Muthukumar et Nachiappan, 2010) et *Enterobacter cloacae* en présence du Pd et Ni (Banerjee et *al.*, 2015).

Des résultats similaires ont été observés chez Choudhary et *al.* (2007) pour *Spirulina platensis-S5* en présence de Cu, Pd et Zn. Ainsi, Jean-Noël et *al.* (2012) ont montré que la production de MDA a été mise en évidence chez *Pseudomonas fluorescens* suite à leur exposition à différents stress.

5 Effet de cadmium sur l'activité de la catalase

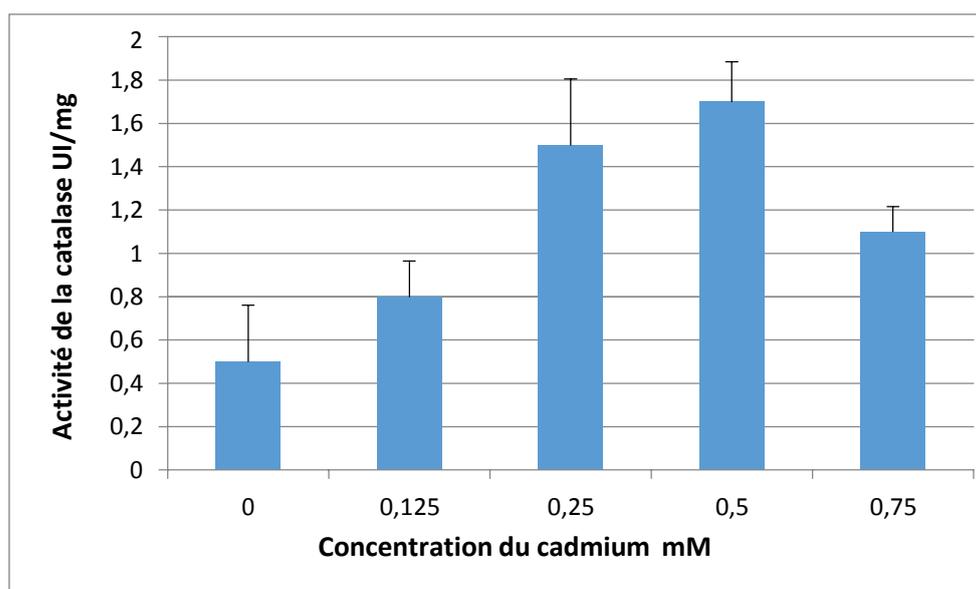


Figure 15 : Variation de l'activité de la CAT en fonction de la concentration du cadmium.

La figure 17 présente l'effet de la concentration graduelle en cadmium sur l'activité de la CAT. On remarque une augmentation progressive de l'activité catalasique avec l'augmentation de la concentration du cadmium dans le milieu de culture. Elle atteint son maximum (1,7 UI/mg) à 0,5mM de Cd. Au-delà de cette concentration, on constate une réduction de l'activité de la catalase.

L'accroissement de l'activité de la catalase peut être expliqué 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, ce qui met en évidence l'implication de cette enzyme dans la catalyse du H_2O_2 .

La diminution de l'activité de la catalase peut être causé soit par l'hyperproduction d' H_2O_2 intracellulaire par la souche testée ; ce qui inactive la catalase et favorise encore l'accumulation du H_2O_2 dans la biomasse bactérienne (Yakoubi, 2019), soit par la fixation des cations métalliques sur la protéine enzymatique. La réduction de l'activité de la catalase, serait probablement due à un influx massif d'ion Cd conduisant à l'inhibition de cet enzyme, ce dernier peut être l'un des facteurs d'accumulation d' H_2O_2 dans la cellule (Yakoubi, 2019 ; Kassa-Laouar, 2020).

Polidoros et Scandalios en 1999 ont rapportés que l'activité de la CAT est directement régulée par la concentration de H_2O_2 , ainsi, les fortes concentrations en ce dernier pouvaient réduire cette activité.

Résultats et discussion

Une étude réalisée par Chakraborty et *al.* (2014), a montré une augmentation de l'activité de la catalase chez *Aspergillus foetidus* en présence du Cd. Aussi, Khalid et Jin, (2013) ont noté la stimulation de la catalase de *Burkholderia cepacia* en présence du Cd. De même, David et *al.* (2016) et El-Esawi et *al.* (2020) ont constaté le même résultat pour *Bacillus sp* en présence d'As, Cd et Zn, et pour *S. marcescens* en présence de Cd, respectivement.

Une concentration élevée en Cd a 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. Aussi, Kassa-Laouar (2020) a constaté le même résultat pour *Serratia marcescens* en concentration élevée de Sb.

Conclusion

Conclusion

La pollution par les métaux lourds est un facteur majeur dans la dégradation de l'environnement. A cause leur caractère biopersistant, les métaux lourds causent des perturbations de l'écosystème ; ils détériorent les sols, les eaux, et s'accumulent dans les plantes *via* un transfert sol-plante.

Hedysarum Pallidum est une plante accumulatrice des métaux lourds. Elle pousse sur des sols riches en antimoine et en arsenic. Des études antérieurs ont montré qu'elle contient dans ses racines une bactérie endophyte caractéristique, *Serratia marcescens*, résistante à jusqu'à 450 mM d'antimoine dans son milieu de culture.

Ce travail est basé sur l'étude de la réponse antioxydante de *Serratia marcescens* vis-à-vis le stress oxydatif généré par le cadmium, en mesurant le taux de croissance, la teneur en MDA, en d'H₂O₂ et l'activité de la catalase en présence de ce toxique. L'addition de concentrations graduelles en Cd dans le milieu de culture a provoqué la formation d'ERO ; ceci a conduit à une forte accumulation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans la cellule. Ce dernier a provoqué la peroxydation lipidique des acide gras polyinsaturés, conduisant par la suite à l'accumulation du MDA dans la biomasse bactérienne ce qui entraîne la diminution de la croissance de l'espèce testée, ce qui confirme l'effet néfaste du cadmium sur l'endophytetesté. Malgré la toxicité du milieu, *Serratia marcescens* est capable de tolérer cette toxicité par son système antioxydant. Pour cela, *S. marcescens* a activé une enzyme antioxydante la CAT. Les résultats dévoilent une augmentation significative de l'activité de la CAT, qui est directement régulée par la concentration d'H₂O₂. L'activation du système antioxydant pour diminuer le stress oxydatif généré par la toxicité du Cd est une preuve de l'adaptation de *S. marcescens* à la toxicité de ce polluant présent dans le milieu de culture. Avec ces données, nous pouvons considérer cette souche comme un agent efficace pour la détoxification des solscontaminés par le cadmium.

Il est bien clair que ces résultats ouvrent un large terrain d'investigations et beaucoup des perspectives biologiques, parmi ces perspectives :

- Dosages des biomarqueurs du stress oxydatif à des concentrations plus élevées.
- Evaluation d'autres paramètres (SOD, GST, POD...) de stress oxydant est obligatoire pour confirmer les résultats.

Conclusion

- Afin de développer la bioremédiation, on pourra faire l'étude sur d'autres bactéries endophytes qui ont des caractéristiques similaires à la bactérie *Serratia marcescens*.
- Examiner le pouvoir de l'endophyte à contribuer à la bioprotection de la plante hôte contre certains agents pathogènes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Akkoyun A. M., Özdemir S., Kılınc 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.

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.

Banerjee G., Pandey S., Ray A. K., Kumar R. 2015. Bioremediation of heavy metals by a novel bacterial strain *Enterobacter cloacae* and its antioxidant enzyme activity, flocculant production, and protein expression in presence of lead, cadmium, and nickel. Water, Air, & Soil Poll. 226 (4): 91.

Behera M., Dandapat J., Rath C. C. 2014. Effect of heavy metals on growth response and antioxidant defense protection in *Bacillus cereus*. J. Basic. Microbio. 54 (11): 1201- 1209.

Bellion M. 2006. Caractérisation fonctionnelle de gènes impliqués dans la tolérance au stress métallique chez les champignons *ectomycorhiziens* par agrotransformation d'*Hebeloma cylindrosporum*. Thèse de Doctorat : Biologie Végétale et Forestière. Nancy : Université Henri Poincaré, Nancy I : 90.

Benhamdi A. 2014. Etude des enzymes de stress oxydatif chez *Hedysarum pallidum* Desf. et *Lygeum spartum L.* en réponse à la pollution du sol par l'antimoine. Thèse de Doctorat : Biochimie et Biotechnologie. Constantine : Université Frères Mentouri Constantine : 104.

Benkhaoua W., El Houchet H., Haridi S. 2017. Recherche des bactéries tolérantes aux métaux lourds (cadmium et cuivre) dans la région de Guelma. Mémoire de fin d'étude : Santé, Eau et Environnement / Microbiologie de l'Environnement. Université 8 Mai 1945 Guelma.

Références bibliographiques

Bonnot F. 2009. Superoxyde réductase : Mécanisme de transfert d'électrons vers le site actif et rôle de la lysine 48 dans la catalyse. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I. Français.

Bouhidel I., Bouridane M., Khelaf A. 2016. Évaluation de l'effet antioxydant d'un extrait éthanolique de la plante *Thapsia garganica* de la région de Jijel contre la toxicité hépatique du diclofénac chez les souris NMRI. Mémoire fin d'étude : Biologie Moléculaire et Cellulaire. Université Mohammed Seddik Ben Yahia.

Boukarboua R., Missi B. A., Toubane M. B. 2021. Etude comparative de la réponse antioxydante d'*Aspergillus tubingensis* et *Serratia marcescens* au stress oxydatif généré par l'antimoine. Mémoire fin d'étude : Mycologie et Biotechnologie Fongique. Université des Frères Mentouri Constantine.

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.

Bouriel P. H., Berthelin J. 1998. Contamination des sols par les éléments en trace les risques et leur gestion. TEC et DOC. Lavoisier (ED) Paris.

Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int. Microbiol. 3:3-8.

Campbell C. D., Hird M., Lumsdon D. G., Meeussen J. C. L. 2000. The effect of EDTA and fulvic acid on Cd, Zn, and Cu toxicity to a bioluminescent construct (pUCD607) of *Escherichia coli*. Chemosphere 40, 319-325.

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.

Chowdhary P., Raj A., Verma D., Akhter Y. 2020. Microorganisms for sustainable environment and health (1 ed). Elsevier Scie, 534.

Références bibliographiques

Dasantila G. 2008. *Serratia, Edwardsiella and Morganella* Infections. York University, Toronto, Canada. 1-6.

David M., Krishna P. M., Sangeetha J. 2016. Elucidation of impact of heavy metal pollution on soil bacterial growth and extracellular polymeric substances flexibility. 3 Biotech. 6 (2) : 1- 11.

Desmier T. 2016. Les antioxydants de nos jours : Définition et applications. Thèse de Doctorat: Faculté de Pharmacie. Université de Limoges, 88.

El Aafi N., Brahada F., Dary M., Filali A., Maltouf., Pajuelo. 2012. Rhizostabilization of metals in soils using *lupinus luteus* inoculated with the metal resistant rhizo bacterieum *Serratia Sp.* MSMC 541, Int. J. Phytoremediation. 14 :3, 261-274.

El-Esawi M.A., Elkelish A., Soliman M., Elansary H.O., Zaid A., Wani S.H. 2020. *Serratia marcescens* BM1 enhances cadmium stress tolerance and phytoremediation potential of soybean through modulation of osmolytes, leaf gas exchange, Antioxidant machinery, and stress-responsive genes expression. Antioxidants. 9(1): 43.

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.

Favier A., 2003. Le stress oxydant. Actual. Chim : 108–15.

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.

Ghazi S. 2011. Détermination par méthodes in vitro de l'efficacité des différents systèmes photoprotecteurs (vêtements, verres, produits solaires). Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes:38, 67,68.

Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D. 2001. Oxidative stress induced neurodegenerative diseases : The need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. Neuropharmacology. 40 (8): 959- 975.

Références bibliographiques

Goudable J., Favier A. 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. Nutr. Clin. Mdtabol. 11:115-20

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.

Grimont F., Grimont P. A. D. 1992. The genus *Serratia*. The Prokaryotes. 3 : 2822–2848

Guillaume B. 2015. Diversité des organismes endophytes dans les racines de plantes poussant en milieu contaminé en hydrocarbures. Mémoire de fin d'étude : Département des Sciences Biologiques. Faculté des Arts et des Sciences.

Gyaneshwar P., James E., Mathan N., Reddy P., Reinhold-Hurek B., Ladh J. 2001. Colonisation endophyte du riz par une souche diazotrophe de *Serratia marcescens*. J Bacteriol. 183: 2634-2645.

Hahne H. C. H., Kroontje W. 1973. Significance of pH and chloride concentrations on behaviour of heavy metal pollutants: mercury(II), cadmium(II), zinc(II) and lead(II). J. Environ. Qual. 2 : 444-253.

Haleng J., Pincemail J., Defraigne J. O., Chaelier C., Chapelle J. P. 2007. Le stress oxydant. Rev Med Liege. 62(10): 628-638.

Haliwell B., Gutteridge J. M. C. 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch. Biochem. Biophys. 246: 501-514.

Halliwell B., Gutteridge J. M. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J. 219:1–14.

Hamma S.A., Nouri N., Fergani I., Lekhala A., Cheriet S., Abadi N., Lezzar A., Benlatreche C. 2015. Biologie des espèces réactives et stress oxydant. J. Alg Méd.

Herrero E., Ros J., Bellí G., Cabiscol E. 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj. 1780 : 1217–1235.

Références bibliographiques

Herrero E., Ros J., Bellí G., Cabisco E. 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.* 1780 : 1217–1235.

Huynh T. M. D. 2009. Impact des métaux lourds sur les interactions plante/ ver de terre/ microflore tellurique .Thèse de doctorat: Ecologie Microbienne. Paris: Université Paris Est, 151.

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.

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.

Kabata-Pendias A., Pendias H. 2001. Trace elements in soils and plants. CRC (press).London.

Kaidem A., Gauri D. 2016. Plant growth promoting endophyte *Serratia marcescens* AL2-16 enhances the growth of *Achyranthes aspera* L, a medicinal plant. *Hayati Journal Of Bioscience.* 23 :173-180.

Kassa-Laouar M. 2020. 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. Thèse de Doctorat : Biochimie-Microbiologie appliquée. Université des Frères Mentouri Constantine1.

Kassa-Laouar M., Mechakra A., Rodrigue A., Meghnous O., Bentellis A., Rached O. 2020. Antioxidative Enzyme Responses to Antimony Stress of *Serratia marcescens* – an Endophytic Bacteria of *Hedysarum pallidum* Roots. *Pol. J. Environ. Stud.* 29 (1) : 141-152.

Khalid A., Jin H. 2013. Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 7: 2288-2296.

Knopik L., Dahmeni R. 2018. Intérêt des antioxydants alimentaires dans la lutte radicalaire chez le sportif. Ecole de diététique et nutrition humain..

Références bibliographiques

Korfi A. 2019. Impacte du plomb sur la cinétique du taux de germination et la longueur des radicules et des tigelles de *Moringa oleifera L.* Mémoire de fin d'études : Biodiversité et Environnement. Université de Mostaganem.

Laib A., Medbouh S. 2016. Impact de l'huile d'oléastre sur l'inflammation colique chez le rat de la souche Wistar. Mémoire fin d'étude : Biochimie Moléculaire et Santé. Université des Frères Mentouri Constantine.

Louaar S., Maatoug S. 2016. Etude du stress oxydatif chez une bactérie résistante à l'antimoine. Mémoire de fin d'étude : Biochimie /Analyse protéomique et santé. Constantine : Université Frères Mentouri Constantine.

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

Meghnous O., Dehimat L., Dumas 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.

Melila M., Poutouli W., Amouzou K. S., Tchangbedji G., Tchaou M., Doh A., Goto C. 2012. Induction du stress oxydatif chez l'homme suite à la bioconcentration des éléments traces métalliques (cadmium et plomb) par voie trophique à Kpémé (Sud du Togo). Intern. J. Biolo. Chem. Sci. 6(3): 1263-1270.

Morgane B. 2019. Etude de la diversité chimique et biologique d'endophytes de palmiers. Thèse de Doctorat : Ecole doctorale : Sciences de la Nature et de l'Homme, 227.

Mukherjee A., Das D., Mondal S. K., Biswas R., Das T. K., Boujedaini N., KhudaBukhsh A. R. 2010. Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. Ecotoxicol. and Environ. Saf. 73 (2): 172-182.

Muller H., Berg G. 2008. Impact des procédures de formulation sur l'effet de l'agent de lutte biologique *Serratia plymuthica* HRO-C48 sur la flétrissure verticillienne du colza. Biocontrôle. 53: 16-905

Murray R., Bender D., Botham K., Kennelly P., Rodwell., weil. 2013. Biochimie de Herper. 5^e édition. Paris. Edition De Boeck Université. ISBN 978-2-35745-199-5.

Références bibliographiques

Pablo R. H., Leonard S., Van O. 2015. Le monde caché des plantes : considérations écologiques et évolutives pour définir le fonctionnement des endophytes microbiens.

Pierre-Clément D, 2011. Synthèse des connaissances sur l'origine et la disponibilité du cadmium dans les eaux continentales. l'Onema/Agences de l'eau et l'OIEau.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J. O. 1999. L'évaluation du stress oxydatif d'un individu : une réalité pour la médecine. Vaisseaux, cœur, poumons. 4 (5) :1-7.

Pincemail J., Meurisse M., Limet R., Defraigne J. O. 1998. Fumée de cigarette: une source potentielle de production d'espèces oxygénées activées. Medi. Sphère. 78: 37-39.

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.

Righa A., Bousseboua S. 2015. Etude de l'effet du zinc sur le système antioxydant de l'haricot blanc (*Phaseolus vulgaris L.*). Mémoire fin d'étude : Analyse Protéomique et Santé. Université des Frères Mentouri Constantine.

Santara H. 2004. Les endophytes de *Eugenia jambolana lam.*(*Myrtaceae*) : Un modèle de relation plante-Microorganismes. Mémoires de fin d'étude : Biologie et Ecologie végétale. Université d'Antananarivo.

Schlegel H. 1992. General Microbiology. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. :. 88.

Selvakumar G., Mohan M., Kundu S., Gupta A., Joshi S. 2008. Tolérance au froid et potentiel de promotion de la croissance des plantes de la souche SRM de *Serratia marcescens* (MTCC 8708) isolée à partir de fleurs de courge d'été (*Cucurbita pepo*).Lett Appl Microbiol. 46:171-175.

Selvakumar G., Mohan M., Kundu S., Gupta A., Joshi S. 2008. Tolérance au froid et potentiel de promotion de la croissance des plantes de la souche SRM de *Serratia marcescens* (MTCC 8708) isolée à partir de fleurs de courge d'été (*Cucurbita pepo*).Lett Appl Microbiol. 46:171-175.

Références bibliographiques

Sies H. 1997. "Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82 (2) : 291-295.

Silver S., Phung L. T. 1996. Bacterial heavy metal resistance new: surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 5: 753-789.

Singh O. V., Labana S., Pandey G., Budhiraja R., and Jain R. K. 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 405-412.

Slonczewski J., John F. 2009. *Microbiology: An Evolving Science.* Norton & Company, Inc : 91, 488.

Sollin M. 2021. Analyse quantitative de l'oxydation radicalaire de Matériaux organiques: Étude cinétique et théorique de l'oxydation des hydroperoxydes. Mémoire fin d'étude: Université du Québec, Montréal.

Soni K., Amarnath M. 2020. Heavy métal contamination, intechopen, récupèrele. *Intech.* 10. 5772.

Soufane S., Mekkiou N. 2018. Evaluation des paramètres du stress oxydatif chez une bactérie capable de biodégrader le diclofénac. Mémoire de fin d'étude: Biochimie. Université Mohammed- Seddik Benyahia- Jijel.

Stadtman E. R., Levine R. L. 2000. "Protein Oxidation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 899 (1): 191-208.

Van Houdt R., Givskov M., Michiels C. W. 2007. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol. Rev.* 31(4), 407-424

Welp G., Brtimmer G. W. 1997. Microbial toxicity of Cd and Hg in different soils related to total and water-soluble contents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 200-204.

William A. P., Stanley P. 1975. Suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J. Org. Chem:* 3615-3617

Références bibliographiques

Wuerges J., Lee J. W., Yim Y., Yim H. S., Kang S., Djinovic K. C. 2004. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Biochem* 101: 8569 – 8574.

Yakoubi L. 2019. Isolement et caractérisation de bactéries cadmium-résistantes de sols des sites pollués : Etude de l'accumulation des ions métalliques. Thèse de Doctorat : Ecologie Microbienne de la Rhizosphère. Université Des Sciences Et De La Technologie Houari Boumediene.

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

Zorrig W. 2001. Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue *Lactuca sativa*. Thèse de Doctorat : Département Des Sciences Biologiques. Université Tunis. El Manar.

Annexes

Annexes

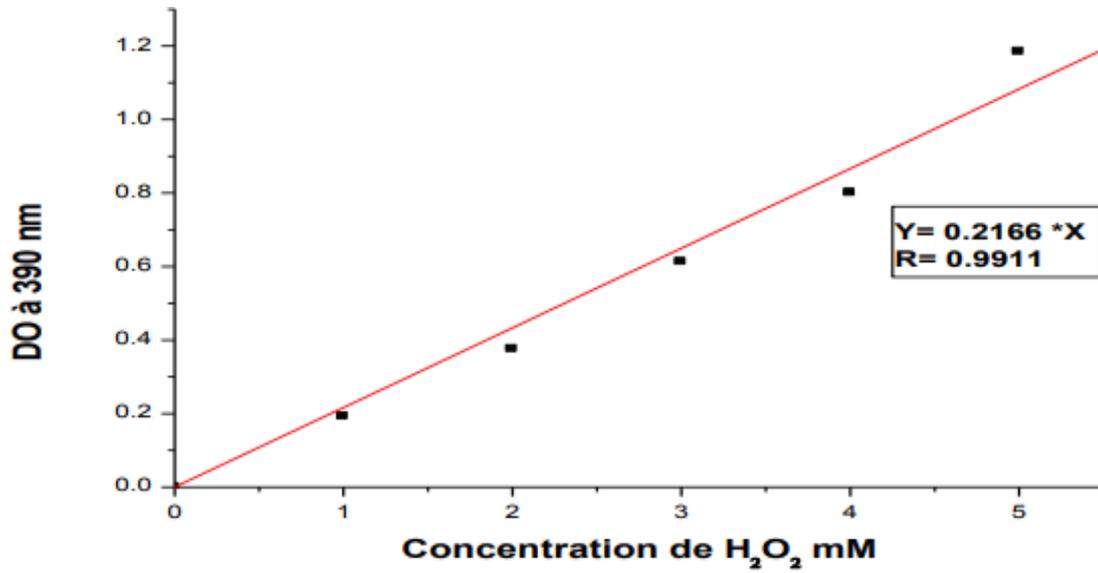
Annexe1

Luria-Bertani modifié

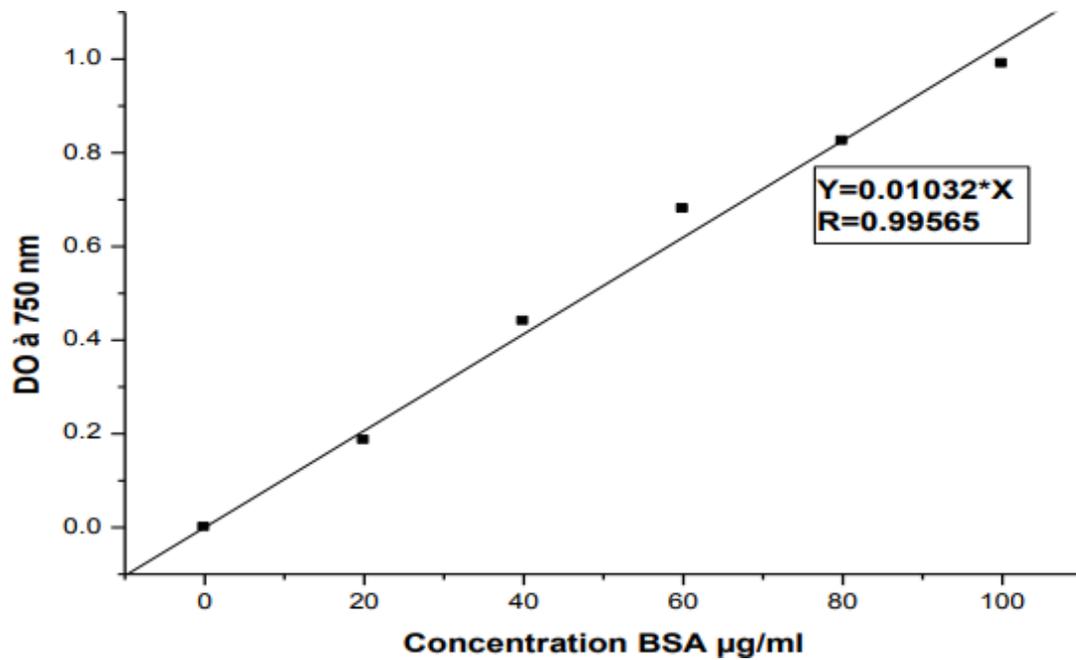
NaCl	10g
Glucose	5g
Tryptone	10g
Tompon : Citrate 50 mM	qsp
pH	7,0

Annexe 2 : Courbes étalons

-Courbe d'étalonnage d'H₂O₂



-Courbe d'étalonnage des protéines



Résumés

Résumé

Notre travail consiste à étudier la réponse antioxydante de *Serratia marcescens*, une bactérie endophyte résistant à 450mM d'antimoine, vis-à-vis du stress oxydatif induit par la présence des différentes concentrations de cadmium ajouté à son milieu de culture. Pour cela, la croissance bactérienne, la teneur en H₂O₂ et en MDA, et même l'activité de la CAT ont été estimées en présence de ce toxique. Les résultats de dosage ont montré que les concentrations graduelles en Cd ont provoqué une diminution progressive de la croissance avec l'augmentation des doses de ce métal sans aucun effet létal sur la croissance de *S. marcescens*. De plus, la mesure des paramètres du stress oxydatif indique que la concentration intracellulaire en H₂O₂ et en MDA n'est pas nulle même en absence de toute contamination métallique. Puis, on constate une augmentation importante de la teneur en H₂O₂ et en MDA avec l'augmentation de la quantité du Cd dans le milieu de culture. L'élévation du H₂O₂ entraîne la peroxydation lipidique, et par la suite une production accrue du MDA. L'H₂O₂ généré par le stress métallique est détoxifié par la catalase. Cette dernière est stimulée jusqu'à 0,75 mM en Cd. Au-delà de cette concentration, l'activité de la catalase est réduite. Les résultats indiquent que la production des antioxydants par la bactérie endophyte est un signe de sa résistance à la toxicité de cadmium, et soulignent le rôle important du système de défense antioxydante de *S. marcescens* contre le stress oxydatif induit par le Cd.

Mots clés : bactéries endophytes, cadmium, stress oxydatif, H₂O₂, MDA, enzyme antioxydant, résistance.

Abstract

Our work consists in studying the antioxidant response of *Serratia marcescens*, an endophyte bacterium resistant to 450 mM of antimony, vis à vis the oxidative stress induced by the presence of different concentrations of cadmium added to its culture medium. For this, the growth bacterial, H₂O₂ and MDA content, and even CAT activity were estimated by presence of this toxin. The assay results showed that the gradual concentrations of Cd caused a progressive decrease in growth with increasing doses of this metal without any lethal effect on the growth of *S.marcescens*. In addition, the measurement of oxidative stress parameters indicates that the intracellular concentration of H₂O₂ and MDA is not zero even in the absence of any metallic contamination. Then we note an important increase of the H₂O₂ and MDA with the increase of the quantity of Cd in the culture medium. The elevation of H₂O₂ leads to lipid peroxidation, and subsequently an increased production of MDA. The H₂O₂ generated by the metallic stress is detoxified by the catalase. The latter is stimulated up to 0.75 mM in Cd. Beyond this concentration, catalase activity is reduced. The results indicate that the production of antioxidant by the endophyte bacterium is a sign of its resistance to cadmium toxicity, and emphasize the important role of the antioxidant defense system of *S. marcescens* against stress oxidative induced by Cd.

Key words : endophytic bacteria, cadmium, oxidative stress, H₂O₂, MDA, antioxidant enzyme, resistance

ملخص

يرتكز عملنا على دراسة إستجابة مضادات الأوكسدة لبكتيريا *Serratia marcescens*، وهي بكتيريا داخلية مقاومة 450mM للثمد (Sb)، ضد الإجهاد التأكسدي الناجم عن وجود تركيزات مختلفة من الكادميوم أضيف إلى وسط إستزراعها. ولهذا تم تقدير: نمو البكتيريا، محتوى H_2O_2 و MDA و حتى نشاط CAT في وجود هذه المادة السامة. أظهرت نتائج الفحص أن تراكيز الكادميوم التدريجية تسببت في الإنخفاض التدريجي لنمو *S.marcescens* عند جرعات متزايدة من هذا المعدن دون أي تأثير مميت على نموها. بالإضافة إلى ذلك، يشير قياس معلمات الإجهاد التأكسدي إلى أن تركيز H_2O_2 و ال MDA داخل الخلايا ليس معدوما حتى في حالة عدم وجود أي تلوث معدني. ثم هناك زيادة كبيرة في محتوى H_2O_2 و MDA مع زيادة كمية الكادميوم في وسط الإستزراع. ارتفاع ال H_2O_2 يؤدي إلى أكسدة الدهون وبالتالي زيادة إنتاج ال MDA. ال H_2O_2 الناتج عن الإجهاد التأكسدي يتم إزالة سمومه عن طريق الكatalاز، يتم تحفيز هذه الاخيرة حتى 0,75mM من الكادميوم. بعد هذا التركيز يتم انخفاض نشاط الكatalاز. تشير النتائج إلى أن إنتاج مضادات الأوكسدة من قبل البكتيريا الداخلية (endophyte) علامة على مقاومتها لسمية الكادميوم، وتسلط الضوء على الدور المهم لنظام الدفاع المضاد للأوكسدة ل *S.marcescens* ضد الإجهاد التأكسدي الناجم عن الكادميوم.

الكلمات المفتاحية : البكتيريا الداخلية، الكادميوم (Cd)، الإجهاد التأكسدي، بيروكسيد الهيدروجيني (H_2O_2)، مالونديالدهيد (MDA)، انزيم مضاد للأوكسدة، مقاومة.

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BENAMIRA Dounia
BENALLA Racha

Étude de la réponse antioxydante d'une bactérie endophyte, *Serratia marcescens*, au stress oxydatif généré par le cadmium.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Résumé

Notre travail consiste à étudier la réponse antioxydante de *Serratia marcescens*, une bactérie endophyte résistante à 450mM d'antimoine, vis-à-vis de stress oxydatif induit par la présence des différentes concentrations de cadmium ajouté dans le milieu de culture. Pour cela, la croissance bactérienne, la teneur en H₂O₂ et en MDA, et même l'activité de la CAT ont été estimées en présence de ce toxique. Les résultats de dosage ont montré que les concentrations graduelles en Cd ont provoqué une diminution progressive de la croissance avec l'augmentation des doses de ce métal sans aucun effet létal sur la croissance de *S. marcescens*. De plus, la mesure des paramètres du stress oxydatif indique que la concentration intracellulaire en H₂O₂ et en MDA n'est pas nulle même en absence de toute contamination métallique. Puis, on constate une augmentation importante de la teneur en H₂O₂ et en MDA avec l'augmentation de la quantité du Cd dans le milieu de culture. L'élévation du H₂O₂ entraîne la peroxydation lipidique, et par la suite une production accrue du MDA. L'H₂O₂ généré par le stress métallique est détoxifié par la catalase. Cette dernière est stimulée jusqu'à 0,75 mM en Cd. Au-delà de cette concentration, l'activité de la catalase est réduite. Les résultats indiquent que la production des antioxydants par la bactérie endophyte est un signe de sa résistance à la toxicité de cadmium, et soulignent le rôle important du système de défense antioxydante de *S. marcescens* contre le stress oxydatif induit par le Cd.

Mots-clefs : bactéries endophytes, cadmium, stress oxydatif, H₂O₂, MDA, enzyme antioxydant, résistance.

Laboratoires de recherche :
Laboratoire de Biologie et Environnement (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Encadreur : KASSA-LAOUAR M. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 1 : MEGHNOUS O. (MAB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

Examineur 2 : MOKRANI E.H. (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).

