



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature  
et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : BIOCHIMIE/BIOLOGIE CELLULAIRE et MOLECULAIRE

قسم الكيمياء الحيوية / البيولوجيا  
الخلوية والجزيئية

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/Analyse Protéomique et Santé.*

Intitulé :

---

## Etude du stress oxydatif chez une bactérie résistante à l'antimoine

---

Présenté et soutenu par LOUAAR Sabrina

Le : 02/06/2016

MAATOUG Samah

Jury d'évaluation :

*Président du jury :* MECHAKRA. A

*Prof - UFM Constantine.*

*Encadreur :* KASSAH LAOUAR M.

*MAA - UFM Constantine.*

*Co-encadreur :* BENKAHOUL M.

*MCB - UFM Constantine.*

*Examinatrice :* BENHAMDI A.

*MCB - UFM Constantine.*

*Année universitaire  
2015 - 2016*

# ***Remerciements***

*On voudrait en premier lieu remercier notre dieu Allah qui nous a donné la volonté et le courage pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons en second lieu à remercier chaleureusement notre encadreur **Mme KASSA LAOUAR Mounia** qui a dirigé ce modeste travail. Nous la remercions pour ses conseils, sa patience et pour sa présence afin d'accomplir ce travail.*

*Merci également à **Mme BENKAHOUL Malika**. Notre coencadreur pour son aide et pour ses conseils.*

*Nos plus vifs remerciements s'adressent aussi:*

*A **Mme MECHAKRA A.** professeur à l'Université des Frères Mentouri pour le grand honneur qui elle nous accorde en présidant ce jury.*

*A **Mlle BENHAMDI A.** Dr à l'Université des Frères Mentouri d'avoir bien voulu examiner ce travail.*

*Aussi on présente notre reconnaissance à **Mme MECHAKRA A** d'avoir accepté de nos accueillir dans son laboratoire, merci aussi à toute l'équipe de répondre à nos interrogations avec la plus grande gentillesse.*

*Enfin, nous tenons également à remercier tous nos professeurs qui nous ont enseigné durant nos études et toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.*

*Samah Et Sabrina*

## *Dédicace :*

*Je tiens à exprimer ma plus profonde reconnaissance à*

### ***· Mes parents :***

*Ma mère CHEBEBHI Touasse, qui a oeuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père Amar, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi*

### ***Mes chers frères :***

*Ismail et son épouse Ghania et leurs enfants, Abed el Nasser et son épouse Mounira , Moured , Belkassem et soeurs Ouahiba et son mari Khaled ,Noura et son mari Fouad et leurs enfants Aya et Isselam qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*A mes grand mère Rbiha et Aljdia . A mes grand père Bachir et Naoui pour leur douceur.*

### ***Mes professeurs :***

*Université des Frères Mentouri Constantine qui doivent voir dans ce travail la fierté d'un savoir bien acquis.*

### ***Mes chères Amis :***

*LOUAAR Sabrina, CHADI Ahmed. Houda, Aicha, Sara, Afaf, Ibtissem , Fateh, Firas, Hillel*

*OSACHAT*

*Je dédie ce mémoire à :*

***A ma très chère mère Louaar Laarem***

*Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

***A la mémoire de mon Père Ahmed***

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation. Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein et que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.*

***A mon très cher frère Abdelkrim, son épouse***

***Kenza et leurs petites filles***

*Mon cher frère qui m'est le père et la mère, les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mon ange gardien et mon fidèle compagnant dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Je vous dédie ce travail avec tous mes voeux de bonheur, de santé et de réussite.*

***A ma très chère soeur Houda, son mari Nabil***

***et leurs enfants.***

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Malgré la distance, vous êtes toujours dans mon coeur. Je vous remercie pour votre hospitalité sans égal et votre affection si sincère. Je vous dédie ce travail avec tous mes voeux de bonheur, de santé et de réussite.*

***A ma très chère soeur Nawel, son mari Bilal  
et leurs enfants.***

*Ma chère grande sœur présent dans tous mes  
moments d'examens par ses soutien moral et ses belles  
surprises sucrées.*

*Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de  
réussite et de sérénité.*

*Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de  
fraternité et d'amour.*

***A mon très cher oncle Bilal***

*Vous avez toujours été présents pour les bons conseils.  
Votre affection et votre soutien m'ont été d'un grand secours au  
long de ma vie professionnelle et personnelle.*

*Veillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour  
tous vos efforts.*

***A tous les membres de ma famille, petits et grands***

*Veillez trouver dans ce modeste travail l'expression de mon  
Affection*

***Mes professeurs de l'Université des Frères Mentouri qui doit voir dans ce travail la fierté  
d'un savoir bien acquis.***

***A mes chères ami(e)s***

*Maatoug Samah, Benidir Nacira, Boulahya monira, Laouar Ibetisame,  
Louaar Khadidja, Louaar Sara, aicha, houda, Fouzia, Hiba, mohamed .*

***A mes chères collègues***

*Mezaache Hamel, Boubidi Djelloul, Annab Rahma*

*Sabrina*

# Table des matières

<b>Table des matières</b>	<b>i</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>iv</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>v</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>vi</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>

## Première parti synthèse bibliographique

<b>1. Les bactéries endophytes</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. Définition des bactéries endophytes</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. Intérêts des bactéries endophytes</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. Réactivité des bactéries vis à vis des métaux</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. Résistance bactérienne vis à vis les aux métaux lourds</b> .....	<b>4</b>
<b>. Les éléments traces métalliques dans les sols</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1. Définition des métaux lourds</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2. Origine des éléments traces métalliques dans les sols</b> .....	<b>7</b>
2.2.1. Origine naturelle.....	9
2.2.2. Origine anthropique.....	9
<b>2.3. Comportement des éléments trace métalliques dans les sols</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4. Spéciation et toxicité des ETM</b> .....	<b>9</b>
<b>2.5. Mobilité et biodisponibilité des métaux lourds</b> .....	<b>11</b>
<b>2.6. Impacts des métaux lourds sur les organismes</b> .....	<b>12</b>
2.6.1. Toxicité pour l'homme.....	12
2.6.2. Phytotoxicité.....	12
2.6.3. Toxicité pour les microorganismes du sol.....	14
<b>2.7. Effets cellulaires des ETM</b> .....	<b>14</b>

2.7.1. Altération des membranes cellulaires.....	14
2.7.2. Interactions avec les acides nucléiques.....	16
2.7.3. Inhibition d'enzymes.....	16
2.7.4. Génération de stress oxydatif par les EMT.....	16
<b>2.8. L'antimoine (Sb).....</b>	<b>18</b>
<b>2.8.1. Définition de l'antimoine.....</b>	<b>18</b>
<b>2.8.2. Origines de l'antimoine.....</b>	<b>18</b>
2.8.2.1 Origine Naturelle.....	18
2.8.2.1. Origine anthropologique.....	18
<b>2.8.3. Spéciation de l'antimoine.....</b>	<b>19</b>
<b>3. stress oxydatif.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. Définition de stress oxydatif.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Définition des radicaux libres.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3. Origine des espèces oxydantes.....</b>	<b>21</b>
3.3.1. Radical anion Superoxyde $O_2^{\bullet}$ .....	23
3.3.2. Peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$ .....	23
3.3.3. Radical hydroxyle $\bullet OH$ .....	23
<b>3.4. Les cibles des radicaux libres.....</b>	<b>22</b>
3.4.1. Altérations des protéines.....	25
3.4.2. Altération des lipides.....	25
3.4.4. Altération des acides nucléiques.....	27
<b>3.5. Systèmes antioxydants.....</b>	<b>27</b>
3.5.1. Systèmes enzymatiques.....	27
3.5. 1.1. Superoxyde dismutase.....	27
3.5.1.2. Catalase (CAT).....	28

3.5.1.3 Glutathionne-S-transférase .....28  
3.5.2. Antioxydants non enzymatiques.....28

## Deuxièmes parti matériels et méthodes

**1. Objectif** .....31  
**2. Choix de la Souche**.....31  
**3. Préparation du milieu de culture et ensemencement**.....31  
**4. Mesure et récupération de la biomasse**.....31  
    4.1. Mesure de la croissance.....31  
    4.2. Récupération de la biomasse.....31  
    4.3. Dosage de la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>..... 32  
    4.4. Dosage de la teneur en Malonedialdéhyde MDA.....32  
**5. Dosage des enzymes antioxydants**..... 33  
    5.1. Préparation de l'extrait enzymatique.....33  
    5.2. Superoxyde dismutase (SOD) .....33  
    5.2. Catalase(CAT)..... 33  
**6. Dosage des protéines**..... 33  
**7. Analyse statistique**.....34

## Troisièmes parti Résultat et discussions

**1. Effet de l'antimoine sur la croissance bactérienne**.....35  
**2. Effet de l'antimoine sur la teneur en MDA**.....36  
**3. Effet de l'antimoine sur la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**.....37  
**4. Effet de l'antimoine sur les enzymes antioxydants**.....38  
    4.1. Effet de l'antimoine sur l'activité de la CAT.....38  
    4.2. Effet de l'antimoine Sb sur l'activité de la SOD.....39

## CONCLUSION

### Annexes

### Références bibliographiques

### Résumé

### ملخص

### Abstract



## Liste des figures

- Figure 1:** Représentation schématique des différentes interactions plante endophyte bactériennes qui ont été étudiées et leurs applications.
- Figure 2 :** Schématisation des interactions entre les métaux et les bactéries (adaptée de Ledin, 2000).
- Figure 3 :** Origine des métaux lourds dans le sol (D'après Robert et Juste, 1999).
- Figure 4 :** Spéciation des ETM dans les sols (D'après Shallari, 1997) La taille des flèches reflète la mobilité des ETM.
- Figure 5 :** Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds (Ademe et Apca, 2005).
- Figure 6 :** Courbes de réponses « dose-effet biologique » illustrant les effets des changements de concentrations phytodisponible (d'après Deneux-Mustin et al., 2003).
- Figure 7 :** Tableau périodique : les éléments métalliques sont en bleu, les métalloïdes sont des éléments d'orange et non métalliques sont en vert.
- Figure 8 :** mécanismes de toxicité métalliques dans les organismes vivants au niveau cellulaire (Modifié à partir de Wysocki et Tamás, 2010).
- Figure 9:** Schéma de la balance entre les ERO et les antioxydants (Sies, 1997).
- Figure 10:** Voies de production des espèces oxygénées (ERG) et nitrées (ERN) réactives (d'après Nathan & Shiloh, 2000).
- Figure 11 :** Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Monteil, 2004).
- Figure 12 :** Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (d'après Favier, 2003).
- Figure 13 :** Origine des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par les ETM et leurs actions sur les biomolécules (d'après Jomova et al., 2012).

**Figure 14** : Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.

**Figure 15** : Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (d'après Matés, 1999).

**Tableau 1:** Sources industrielles et agricoles des métaux présents dans l'environnement  
(Biney et al., 1991).

## Liste des abréviations

ETM	: Eléments Traces Métalliques.
CEC	: Capacité d'Echange de Cation.
ROS	: Espèces Réactives de l'Oxygène.
ERN	: Espèces Réactives de Nitrées.
O <sub>2</sub> •	: Anion Superoxyde
•OH	: Radical hydroxyle
-SH	: Groupement sulphhydryle.
MDA	: Malonyldialdéhyde .
4-HNE	: 4-hydroxynonenal.
R•	: Radical d'acide gras.
ROO•	: Radical peroxyde.
4-HNE	:4-hydroxynonenal.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Peroxyde d'hydrogène.
SOD	: Superoxyde Dismutase.
CAT	: Catalase.
GPX	: Glutathion Peroxydase.
GR	: Glutathion Réductase.
GST	: Glutathion S-Transférase.

# **INTRODUCTION**

La redistribution de l'antimoine dans la biosphère est gouvernée par de nombreux phénomènes tels que les éruptions volcaniques, les embruns et les feux de forêt, ainsi des activités anthropologiques, principalement minières, contribuent à l'enrichissement du sol par ce métalloïde (Carlin, 2000; Filella et al., 2002 ) et une accumulation dans la chaîne alimentaire ; ce qui pose des menaces à long terme pour la vie de l'homme, de la faune et de la flore. Par conséquent, le développement d'une stratégie de remédiation des sols contaminés par l'antimoine s'avère urgente (Zhao ,2010).

La bioremédiation est une option qui offre la possibilité de détruire ou de rendre moins toxiques les polluant, en utilisant des activités biologiques naturelles. Les microorganismes sont utilisés depuis environ un siècle pour le traitement des eaux usées et des composts. Ce qui est nouveau c'est l'utilisation de ce procédé microbiologique pour nettoyer les sols, les eaux souterraines, les estuaires etc. Les systèmes sont différents en raison de la nature du polluant et du milieu où se déroule la dégradation (Chedly, 2007).

L'exposition des bactéries à des concentrations élevées en métaux lourds a pour conséquence une surproduction d'espèces réactives oxygénées (ERO ou ROS). Cela induit la production des 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 ; ceux-ci permettent une adaptation des bactéries aux stress environnementaux. Malgré la description des mécanismes de résistance contre l'antimoine chez les bactéries (Sanders et al., 1997; Meng et al., 2004), le rôle du système antioxydant reste peu connu.

Le présent travail vise à étudier l'impact de l'antimoine sur la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la peroxydation lipidique et le mécanisme antioxydant par la mesure des activités de la CAT et la SOD chez une bactérie endophyte isolée des racines d' *Hedysarum pallidum* au niveau de laboratoire de microbiologie et environnement.

**PREMIERE PARTIE :**  
**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

## Chapitre 1 : Bactéries endophytes

### 1. Les bactéries endophytes

#### 1.1. Définition des bactéries endophytes

Les bactéries isolées de l'intérieur des tissus, qui y habitent sans nuire à leur hôte sont appelées endophytes (Azevedo et al., 2000; Petrini et al., 1989). Elles résident dans l'apoplasme ou le symplasme de la plante. Parmi ces bactéries, de nombreux genres sont retrouvés, tels que Burkholderia, Enterobacter, Klebsiella, Mycobacterium, Pseudomonas, Rhizobium, capables de coloniser une grande variété d'espèces végétales (riz, maïs, soja, carotte, bananier...) (Rosenblueth et Martinez Romero, 2006).

En général, les bactéries endophytes proviennent de communautés bactériennes de la rhizosphère, de la phyllosphère<sup>1</sup>, ou de graines. Outre leur capacité à pénétrer dans les plantes par des orifices naturels ou par des blessures, les bactéries endophytes utiliseraient activement des enzymes hydrolytiques, telles la cellulase et la pectinase, pour atteindre l'intérieur des plantes (Hallmann et al., 1997).

#### 1.2. Intérêts des bactéries endophytes

Certaines bactéries endophytes peuvent participer à la phytostabilisation. Elles améliorent la croissance et confèrent à leurs hôtes une meilleure tolérance aux stress métalliques. Certaines de ces bactéries permettant d'améliorer la croissance de la plante sont appelées PGPR pour « Plant Growth Promoting Rhizobacteria ». L'effet positif des PGPR sur la croissance végétale est dû à divers mécanismes: production de phytohormones ; mobilisation d'éléments essentiels (P, N...) ; protection contre les pathogènes par production d'antibiotiques ou d'antifongiques et diminution de la biodisponibilité des éléments trace

s métalliques (ETM), en réduisant ainsi leur toxicité pour la plante. (Ma et al., 2011).

Par exemple, il a été montré qu'une bactérie du genre *Serratia* améliore la croissance et la tolérance de *Lupinus luteus* sur un substrat contaminé par l'arsenic, le cuivre, le plomb ou le zinc. De plus, les plants inoculés accumulent moins ces éléments dans leurs parties aériennes ou leurs racines (El Aafi et al., 2012) (**Figure1**).



### 1.3. Réactivité des bactéries vis à vis des métaux

Les interactions entre les cellules bactériennes et les métaux sont gouvernées par des mécanismes passifs ou actifs (Chang, 1997; Haferburg et Kothe, 2007).

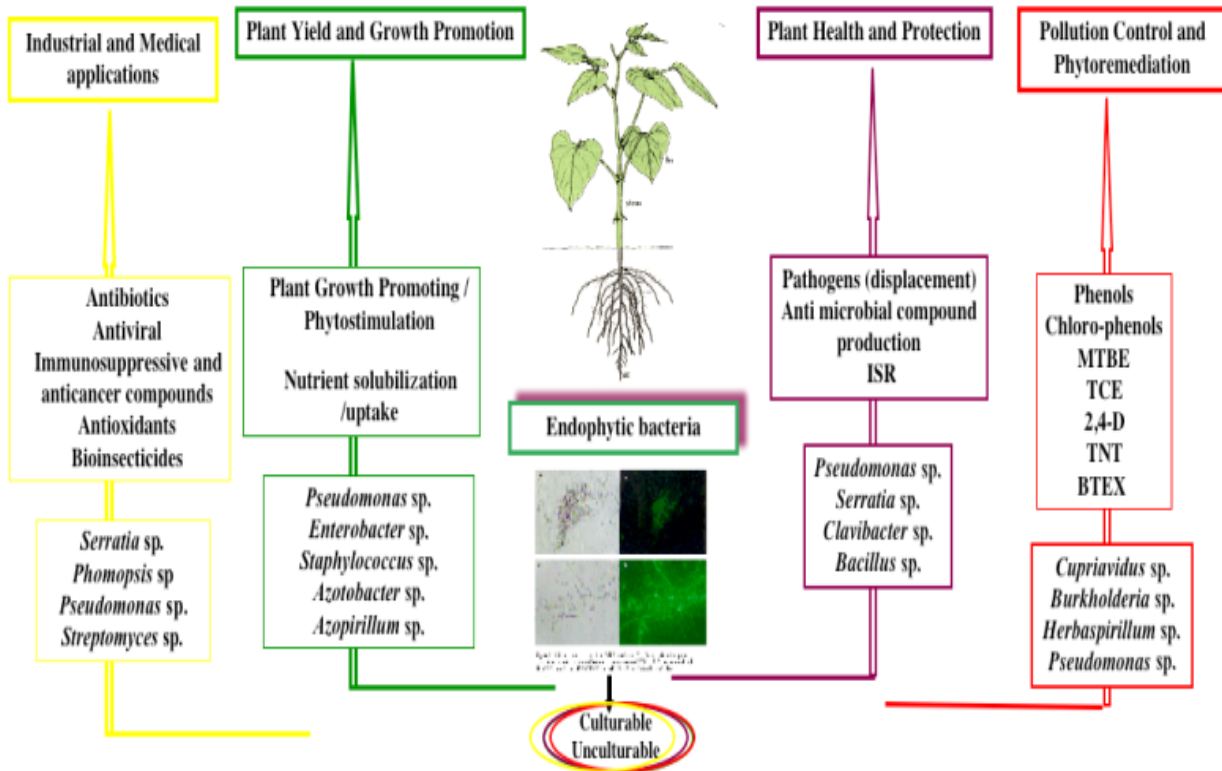
D'une manière générale, on considère que les métaux lourds peuvent être fixés dans la structure cellulaire et conséquemment biosorbés sur des sites de liaisons. Ceci est indépendant du métabolisme et est connu sous le terme de biosorption ou « Passive uptake » (Malik, 2004). Les métaux peuvent également pénétrer dans les cellules en passant la membrane par l'intermédiaire du métabolisme. Ce mode est connu sous le terme d'assimilation ou « active uptake » (Malik, 2004). Ces deux modes d'interaction sont plus généralement regroupés sous le terme de bioaccumulation (Malik, 2004).

Les bactéries peuvent transformer les métaux par des processus d'oxydation/réduction ou d'alkylation. Ceux qui modifient la toxicité et la mobilité du métal (Ledin, 2000). De plus, les bactéries peuvent influencer de manière indirecte la mobilité des métaux par des modifications du milieu (dégradation de la matière organique ou synthèse de sulfite) (Jean, 2011). Ces différents mécanismes sont résumés dans la **Figure 2**.

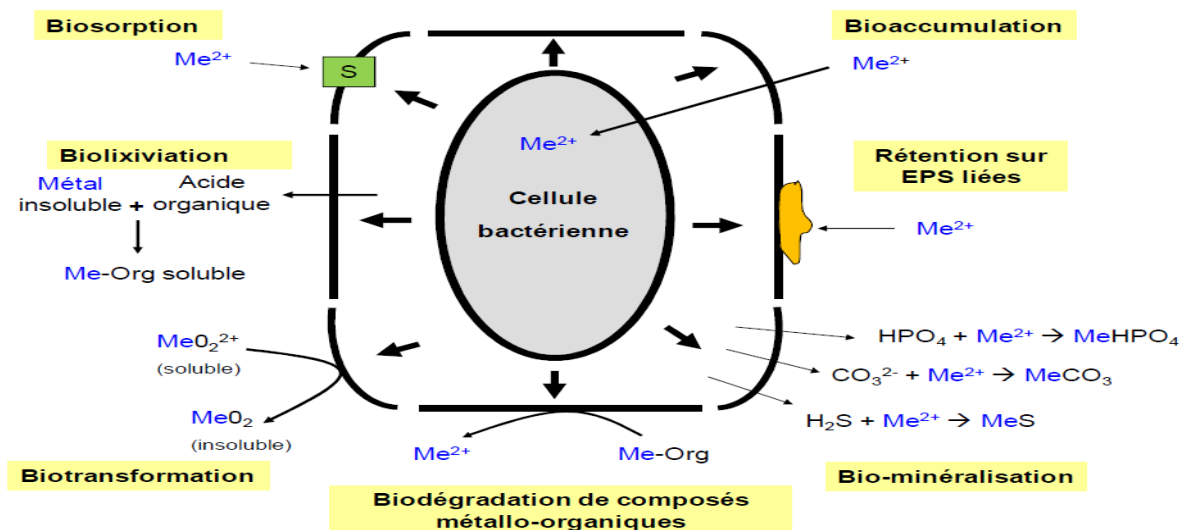
### 1.4. Résistance bactérienne vis à vis les aux métaux lourds

Le défi principal de la cellule bactérienne consiste à maintenir une concentration intracellulaire appropriée en éléments traces essentiels et à exclure en même temps des métaux toxiques. Ainsi, ces microorganismes ont développé des systèmes de résistance pour faire face aux stress générés par les métaux toxiques. Ces systèmes, qui sont basés sur des gènes chromosomiques, plasmidiques ou encore sur des transposons qui confèrent des résistances à la quasi-totalité des éléments du tableau périodique (silver et misra, 1988; silver, 1998).

Chez les microorganismes, les principaux mécanismes de détoxification des métaux concernent :



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



**Figure 2 :** Schématisation des interactions entre les métaux et les bactéries (adaptée de Ledin, 2000). S correspond aux groupements réactifs présents sur la paroi bactérienne.  $Me^{2+}$  correspond à un cation métallique. Org correspond à un composé organique.

### **1.4.1. L'exclusion du métal toxique par la perméabilité**

Il s'agit de systèmes non spécifiques qui empêchent l'entrée du métal dans la cellule : soit par altération de systèmes de transport membranaires ; soit par fixation du métal à la surface cellulaire par des composants de la membrane externe, de la paroi ou d'exopolysaccharides (Bruins et al., 2000).

### **1.4.2. La séquestration intracellulaire ou extracellulaire**

L'accumulation intracellulaire s'effectue notamment dans le cytoplasme par des métallothionéines. Il s'agit de petites protéines riches en cystéines qui fixent des métaux lourds au niveau des groupements sulfhydryles. Ainsi, elles piègent les métaux à l'intérieur de la cellule et les rendent inoffensifs (Silver et Phung, 1996).

A l'extérieur d'un microorganisme, les métaux peuvent également être immobilisés par complexation ou précipitation. Des sous-produits du métabolisme microbien tels que le H<sub>2</sub>S produit par les bactéries sulfato-réductrices ou encore le phosphate produit par *Citrobacter* entraînent la précipitation des métaux (Bruins et al., 2000).

### **1.4.3. Le transport actif par des systèmes d'expulsion**

Il implique des protéines membranaires très spécifiques qui exportent les métaux toxiques du cytoplasme vers l'extérieur de la cellule. Chez les bactéries deux principaux systèmes de transport actif peuvent être distingués selon la source d'énergie: les Transporteurs chimiosmotiques qui utilisent un potentiel membranaire comme source d'énergie et les ATPase de type P qui servent à maintenir des conditions ioniques convenables par une translocation active de cations à travers les membranes biologiques (Lutsenko et Kaplan, 1995).

## Chapitre II: Les éléments traces métalliques

### 2. Métaux lourds

#### 2.1. Définition des métaux lourds

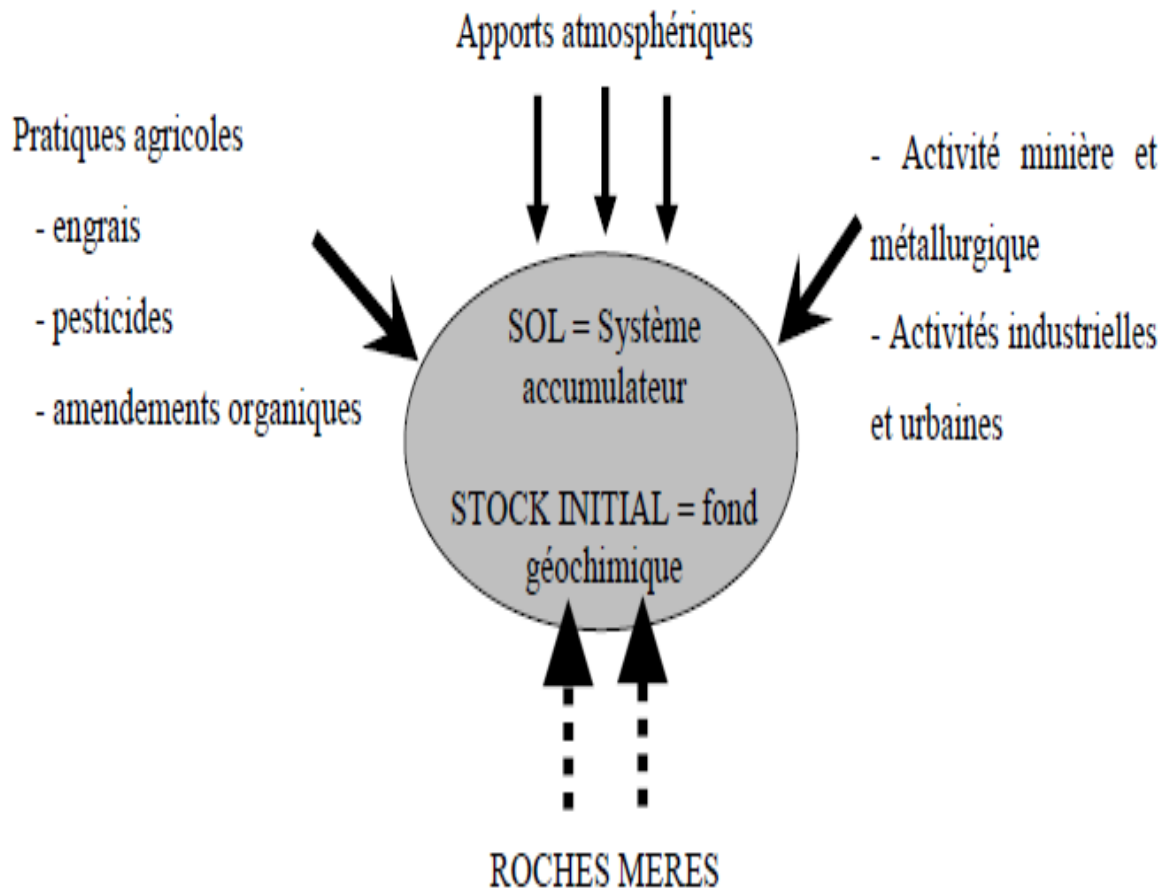
Un métal est un élément chimique doté d'un éclat particulier, bon conducteur de chaleur et d'électricité, ayant des caractéristiques de dureté et de malléabilité, se combinant ainsi aisément avec d'autres éléments pour former des alliages utilisés par l'homme (Miquel, 2001). On appelle métaux lourds les éléments métalliques naturels caractérisés par une masse volumique supérieure à  $5 \text{ g/cm}^3$  (Miquel, 2001).

La classification des métaux lourds est souvent discutée car certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (ex : le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas des métaux mais des métalloïdes (ex : l'arsenic). Pour ces différentes raisons, la plupart des scientifiques préfèrent à l'appellation métaux lourds, l'appellation « Eléments traces Métalliques » (**ETM**) (Miquel, 2001), on distingue ainsi :

- **Les éléments traces essentiels** : Ils sont indispensables au déroulement des processus biologiques mais à de très faibles quantités, ils deviennent toxiques à des fortes concentrations comme : le Fer(Fe), le Cuivre(Cu), le Zinc(Zn), le Cobalt(Co), le Manganèse(Mn), le Chrome(Cr), le Molybdène(Mo), le Sélénium(Se), le Nickel(Ni), le Vanadium(V), le Titane(Ti) et l'Arsenic (As).
- **Les éléments traces non essentiels** : Ils n'ont aucun rôle biologique connu tels que le Plomb(Pb), le Cadmium(Cd), le Mercure(Hg) et l'Antimoine(Sb) (Chiffolleau et al., 2001).

#### 2. 2. Origines des éléments traces métalliques

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 3**).



**Figure 3 :** Origine des métaux lourds dans le sol (D'après Robert et Juste, 1999).

### 2.2.1. Origine naturelle

Les métaux lourds sont présents naturellement dans les roches, ils sont libérés lors de l'altération de celles-ci pour constituer le fond géochimique (Bourrelier et Berthelin, 1998).

La concentration naturelle de ces métaux lourds dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation et son âge.

### 2.2.2. Origine anthropique

Au cours des décennies dernières, l'apport de métaux lourds au sol dans le monde s'est étendu ; les principaux types de pollutions anthropiques sont liés aux activités agricoles et la pollution industrielle. Le tableau 1 présente quelques exemples de sources industrielles et agricoles d'où peuvent provenir les métaux présents dans l'environnement.

## 2.3. Comportement des éléments trace métalliques dans les sols

Dans le sol, les ETM se répartissent entre les phases liquides et solides du sol. Les ETM sont souvent présents sous forme de complexes inorganiques (par association avec les sulfites, carbonates, nitrites ou nitrates, chlorures ou phosphates) ou organiques (par association avec l'acide citrique, oxalique, fulvique, glutathion ou métallothionéines (Deneux-Mustin et al., 2003).

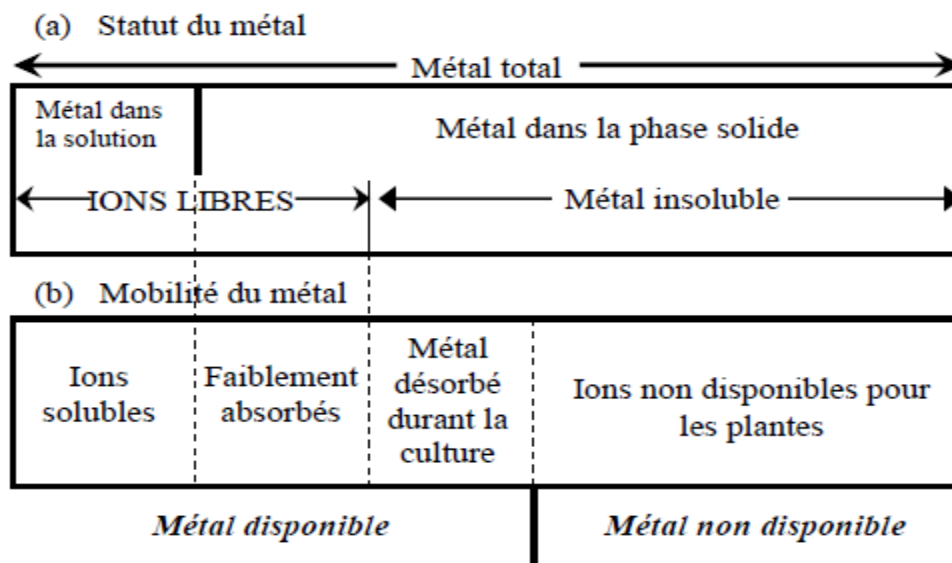
Les ETM peuvent également être présents dans la phase solide du sol. En effet, la plupart des composés organiques (matière organique) et minéraux (argiles, oxydes) du sol possède des charges positives ou négatives qui interviennent dans l'échange ou l'adsorption d'ions (Deneux-Mustin et al., 2003).

## 2.4. Spéciation et toxicité des ETM

La toxicité d'un métal dépend de sa spéciation (forme chimique) autant que des facteurs environnementaux (Babich, 1980). En effet, un métal n'est toxique pour les organismes vivants que s'il est sous forme libre ; il est alors biodisponible (**Figure 4**).

**Tableau 1:** Sources industrielles et agricoles des métaux présents dans l'environnement (Biney et al., 1991).

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



**Figure 4 :** Spéciation des ETM dans les sols (D'après Shallari, 1997) La taille des flèches reflète la mobilité des ETM.

### 2.5. Mobilité et biodisponibilité des métaux lourds

La biodisponibilité des métaux lourds varie en fonction de plusieurs facteurs du sol (le pH, le potentiel redox Eh et la matière organique). (Bourrelier et Berthelin, 1998) (**Figure 5**).

#### 2.5.1. Influence du pH

Les métaux lourds sont généralement plus solubles et plus mobiles à pH acide qu'à des pH élevés. En milieu acide, ils se trouvent sous forme d'ions libres, alors qu'une augmentation progressive du pH (donc des concentrations en ions hydroxydes) provoque la formation de complexes métalliques hydroxylés dans l'ordre suivant (Hahne et Kroontje, 1973).

#### 2.5.2. Influence du potentiel redox Eh

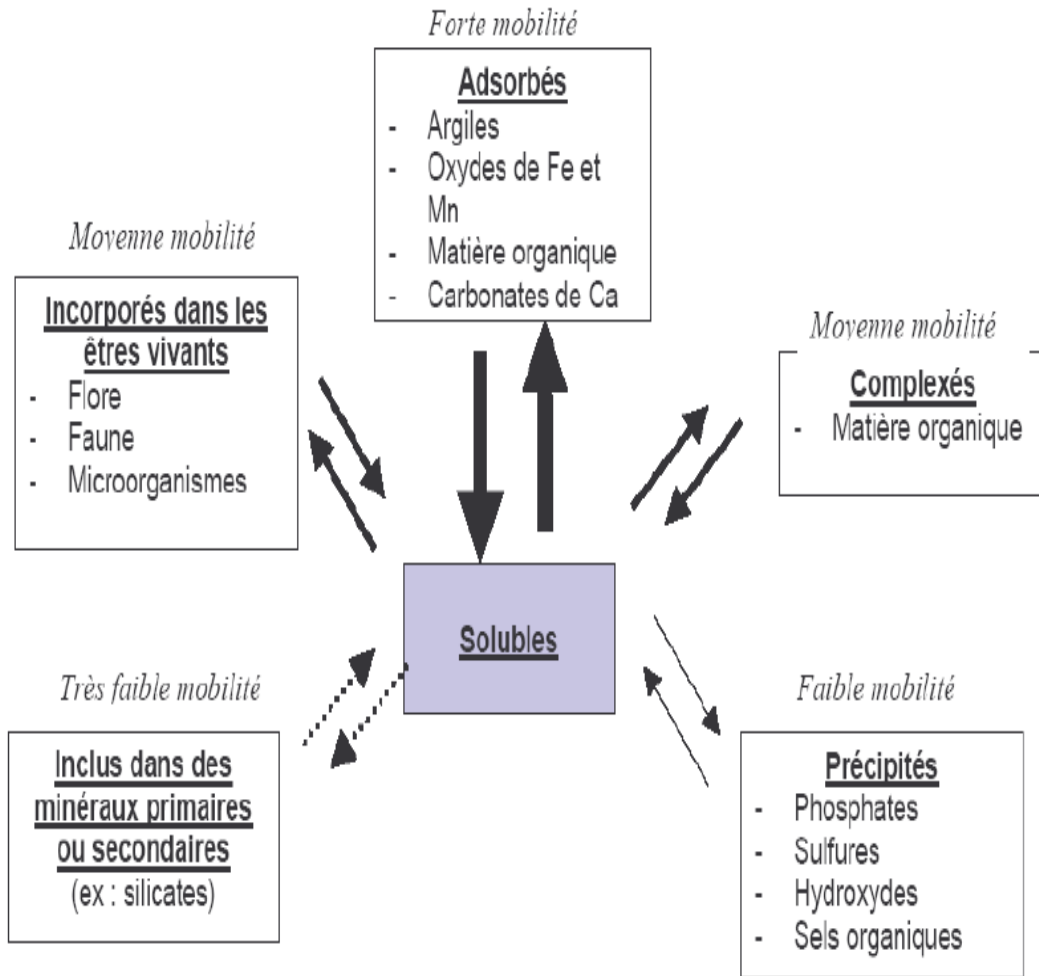
Le potentiel redox (Eh) est une mesure de la disponibilité en électrons dans un milieu. Des valeurs d'Eh, positives indiquent un environnement oxydant et des valeurs d'Eh négatives indiquent un environnement réducteur. Le potentiel redox est fonction du pH et varie d'environ -59 mV par unité de pH (Schmitt et Sticher, 1991).

Le potentiel redox peut modifier directement le degré d'oxydation des métaux lourds. Comme le transport des cations à travers des membranes biologiques dépend fortement de leur niveau d'oxydation, la biodisponibilité des métaux est directement influencée par le potentiel redox du milieu (Sposito, 1983).

#### 2.5.3. Influence des anions

Certains anions, tels que  $S_2^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$  ou  $PO_4^{3-}$  forment des composés insolubles avec les métaux lourds, toujours en fonction du pH et du Eh du milieu. Inversement, d'autres anions forment des complexes solubles avec les métaux lourds ( $Cl^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $CN^-$ ). (Hahne et Kroontje, 1973). L'ion métallique libre  $M^{2+}$  peut s'adsorber sur les constituants minéraux d'un sol. Mais en présence de chlorure, des complexes d'une charge négative provoquent une désorption du métal et une augmentation de leur biodisponibilité (Babich et Stotzki, 1977; Krenkel, 1974).





**Figure 5** : Schéma illustrant la mobilité des métaux lourds (Ademe et APCA, 2005).

### 2.5.4. Influence des argiles

Les argiles sont constituées de minerais d'aluminosilicates tels que la kaolinite, l'illite, la montmorillonite, qui sont généralement chargés négativement d'où les métaux lourds, peuvent s'adsorber (Morgan et Stumm, 1991). Ainsi, le métal toxique est immobilisé, et se trouve donc sous forme non disponible (Babich et Strotzki, 1980).

### 2.5.5. Influence de la matière organique

Les acides humiques (solubles en milieu alcalin) et les acides fulviques (solubles) sont des composés chimiquement réactifs, car ils présentent de nombreux groupements fonctionnels tels que des carboxyles, carbonyle, hydroxyle, amino et le sulfhydryle, ainsi que des composés aromatiques (Babiche et Stotzki, 1980). Ces groupements fonctionnels peuvent interagir avec les métaux lourds pour former des complexes ou des chélates qui sont souvent très stables et qui sont incapables de traverser des membranes biologiques. (Campbell et al., 2000 ; Welp et Brtimmer, 1997).

## **2.6. Impacts des métaux lourds sur les organismes**

### 2.6.1. Toxicité pour l'homme

En général, les humains sont exposés aux ETM par l'ingestion (boisson ou nourriture), par inhalation (voie respiratoire) ou par voie cutanée (Martin et Griswold, 2009; Qu et al., 2012). Une exposition permanente à de petites doses de métaux peut déclencher de nombreuses réactions chez l'être humain. Dans la plupart des cas, un effet cancérigène des ETM est relevé (Silvera et Rohan, 2007).

### 2.6.2. Phytotoxicité

La réponse des plantes à la toxicité d'ETM peut être représentée par des courbes de réponse « dose/effet biologique » (Deneux-Mustin et al., 2003). Si l'élément est essentiel, la réponse de la plante suivra une courbe « en cloche » dont les trois phases observées seront la carence, la tolérance puis la toxicité. Et si l'élément n'a pas de fonction physiologique établie,

seules les deux dernières phases de la courbe (tolérance et toxicité) sont observées (**Figure 6**).

### **2.6.3. Toxicité pour les microorganismes du sol**

En général, les facteurs étudiés pour mesurer l'effet d'une pollution aux ETM sur les communautés bactériennes sont la mesure de la biomasse, de la respiration (dégagement de CO<sub>2</sub>) et des activités enzymatiques intervenant dans les cycles du carbone, du phosphore, du soufre ou de l'azote (Deneux-Mustin et al., 2003). Une baisse de la biomasse et de l'activité enzymatique microbiennes est souvent observée lors d'une contamination du sol par des ETM (Kandeler et al., 1996 ; Kuperman et Carreiro, 1997 ; Qu et al., 2011).

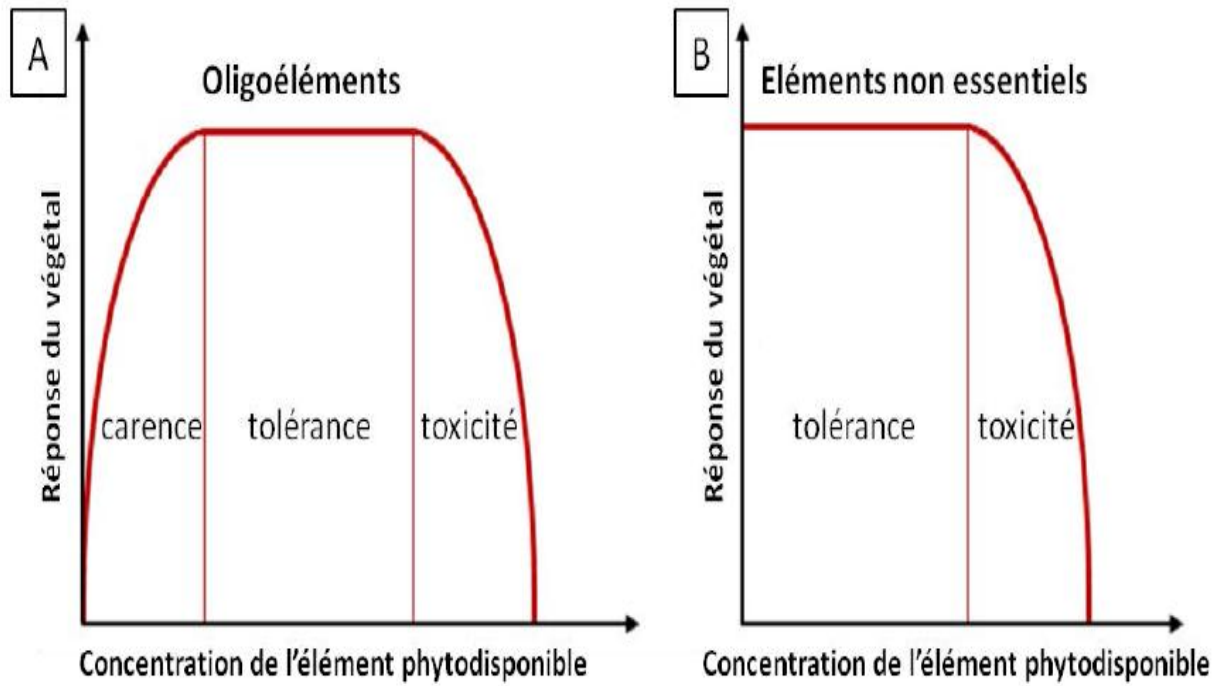
En revanche, dans certains cas, l'effet inverse est observé. Ainsi, une étude portant sur l'impact d'une pollution aux ETM issus de l'épandage des eaux usées industrielles a mis en évidence une augmentation de la biomasse, de l'activité et de la diversité fonctionnelle enzymatiques (Chaerun et al., 2011). Ces différences de comportement des communautés bactériennes ne sont pas nécessairement liées directement à la contamination par les ETM mais plutôt à l'influence de ces éléments sur la disponibilité des éléments minéraux essentiels ou de la matière organique (Giller et al., 1998).

## **2.7. Effets cellulaires des ETM**

L'effet toxique des ETM impliquent un blocage de groupes fonctionnels de biomolécules importantes (Gadd, 1993). La plupart des effets néfastes des ETM pour la cellule sont indirects et liés à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), à l'origine d'un stress oxydatif pour la cellule.

### **2.7.1. Altération des membranes cellulaires**

Les ETM peuvent avoir un effet direct sur les membranes cellulaires en modifiant leur perméabilité (Valko et al., 2005) et en entraînant souvent ainsi un efflux d'ions et une dépolarisation de la membrane plasmique (Rodriguez-Serrano et al., 2009 ; Sanz et al., 2009).



**Figure 6 :** Courbes de réponses « dose-effet biologique » illustrant les effets des changements de concentrations phytodisponible en oligoéléments (A) ou en éléments non essentiels (B) sur la vitalité de la plante (d'après Deneux-Mustin et al., 2003).

### 2.7.2. Interactions avec les acides nucléiques

Les ETM peuvent également agir en perturbant le fonctionnement de protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN. Par exemple, les ions  $\text{Co}^{2+}$  ou  $\text{Cd}^{2+}$  peuvent se substituer aux ions  $\text{Zn}^{2+}$ , notamment présents dans certaines enzymes de réparation de l'ADN ou certains facteurs de transcription (Bertin et Averbek, 2006 ; Ortega et al., 2009 ; Koedrith et Seo, 2011).

### 2.7.3. Inhibition d'enzymes

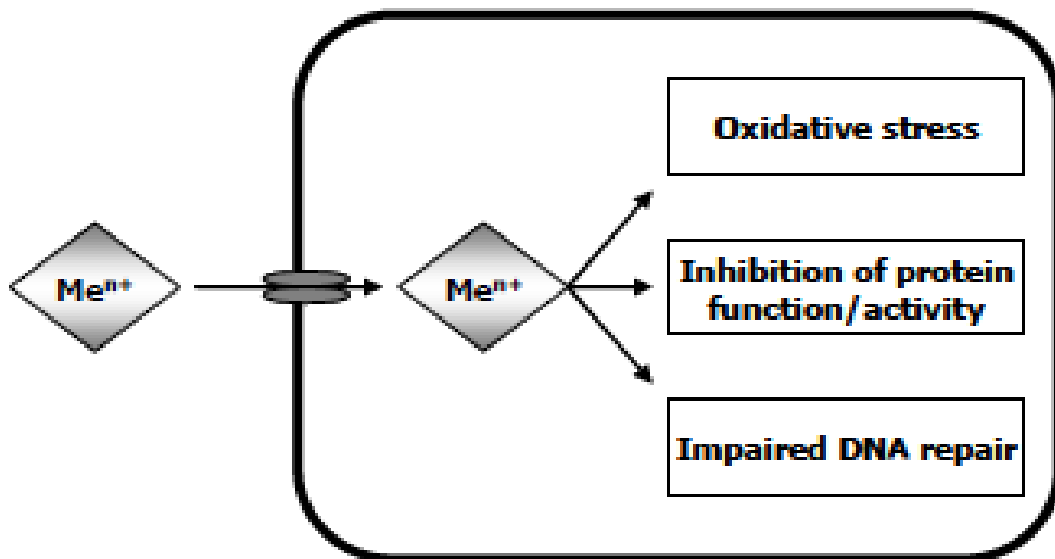
Deux mécanismes d'inhibition des enzymes par les ETM sont prédominants :

- la fixation de l'élément sur les groupements thiols responsables de l'activité catalytique ou de l'intégrité des enzymes.
- l'induction d'une carence en métaux nécessaires aux métallo-enzymes et/ou la substitution d'un élément essentiel nécessaire par l'élément toxique au niveau du complexe enzymatique (Bhaduri et Fulekar, 2012).

### 2.7.4. Génération de stress oxydatif par les EMT

Certains ETM comme le cadmium, le fer, le cuivre, le zinc, le chrome, le cobalt ou le vanadium vont pouvoir générer, via des réactions de types Fenton ou Haber-Weiss, la formation de ROS tels que le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), les ions Superoxydes ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et les radicaux hydroxyles ( $\bullet\text{OH}$ ) (Gadd, 1993 ; Leonard et al., 2004 ; Galanis et al., 2009).

La formation de ROS par les ETM peut également être liée à l'inactivation de certaines enzymes impliquées dans la résistance au stress oxydatif (Peroxydases, Catalases, Superoxyde Dismutase) ou par la baisse du pool intracellulaire de molécules antioxydantes comme le glutathion (Bhaduri et Fulekar, 2012) (**Figure 8**).



**Figure 8** : mécanismes de toxicité métalliques dans les organismes vivants au niveau cellulaire (Modifié à partir de Wysocki et Tamás, 2010).

### 2.8. L'antimoine (Sb)

#### 2.8.1. Définition de l'antimoine

L'antimoine fut découvert probablement par l'alchimiste allemand Basil Valentine en 1450. Cet élément et ses minerais étaient confondus et les latins les nommaient stibium, d'où dérive le symbole Sb (European Union Council Directive, 1998). On le trouve à l'état naturel sous forme de minerai, la stibine  $Sb_2S_3$  et sous forme d'oxyde  $Sb_2O_3$  (Valentine, 1450).

L'antimoine est un métalloïde argenté, dur et cassant. Il n'est pas attaqué par les acides et les bases dilués, ne réagit pas avec l'air sec mais se combine directement avec l'oxygène et les halogènes (Rouxel, 2003). Il ne se ternit pas à température ambiante. C'est un mauvais conducteur de chaleur et d'électricité. Finement dispersé dans l'air (Audion, 2012).

L'antimoine, de symbole chimique Sb, occupe la 51<sup>ème</sup> position dans le tableau périodique et placé dans la quinzième colonne avec l'azote, le phosphore, l'arsenic et le bismuth (groupe des pnictogènes). Il possède une masse atomique de 121,7 mol/g, une densité de 6.70 (**Figure 7**).

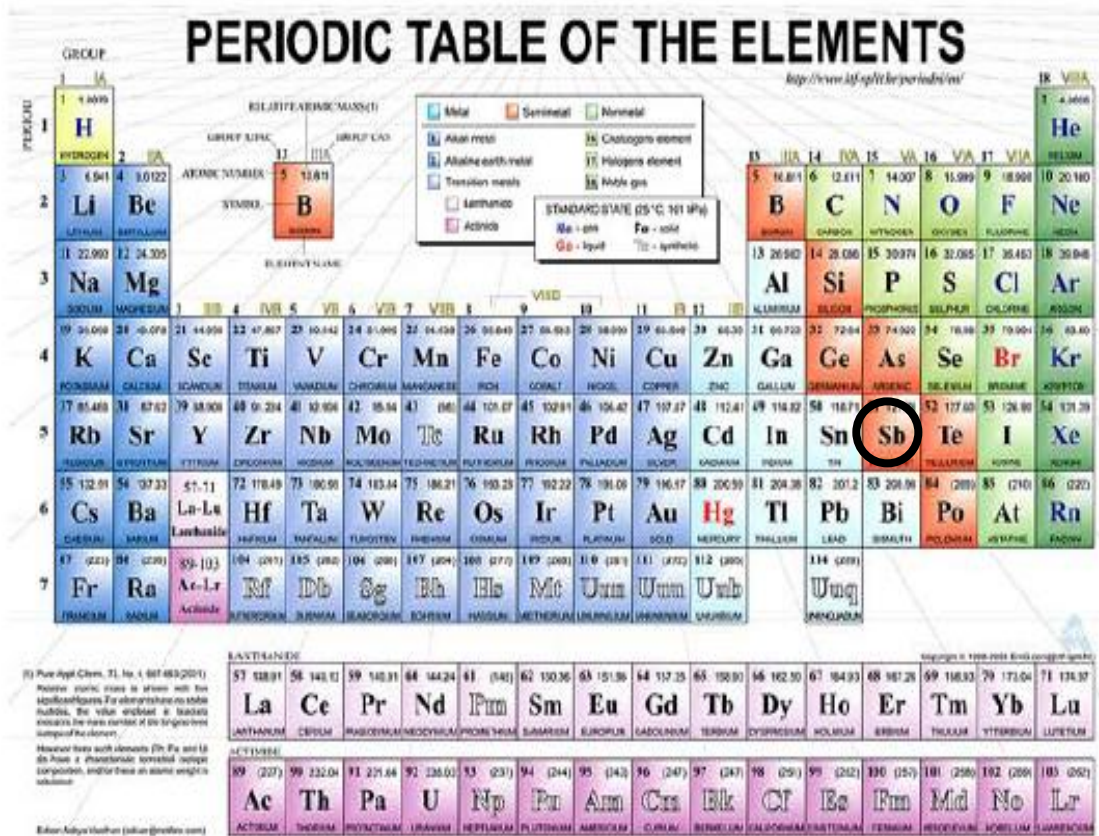
#### 2.8.2. Origines de l'antimoine

##### 2.8.2.1. Origine naturelle

L'antimoine est le 65ème élément constitutif de l'écorce terrestre, à raison de 0,2 ppm en moyenne (Hamilton, 2000). Il 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,  $Sb_2S_3$ , et la valentinite,  $Sb_2O_3$ .

##### 2.8.2.2 Origine anthropologique

Les sources anthropologiques d'antimoine sont liées à ces industries ainsi aux activités minières et au trafic automobile qui peuvent enrichir le sol par ce métalloïde. Les concentrations typiques des aérosols des zones non influencées par des rejets d'origine anthropique sont inférieures à 0,1 ng.m<sup>-3</sup> et peuvent atteindre plusieurs ng.m<sup>-3</sup> sous l'influence de rejets, dans des zones industrialisées (Filella et al., 2002).



**Figure 7 :** Tableau périodique : les éléments métalliques sont en bleu, les métalloïdes sont des éléments d'orange et non métalliques sont en vert. ([http://blogs.4j.jane.edu/taylor\\_k/2010/06/01/metalsthis-week-in-science-june-1-june-4/](http://blogs.4j.jane.edu/taylor_k/2010/06/01/metalsthis-week-in-science-june-1-june-4/)).



### 2.8.3. Spéciation de l'antimoine

L'antimoine possède quatre degrés d'oxydation : - III, 0, + III et +V (Ulrich N, 2005; Picot A, Proust N. A paraitre)

- $\text{Sb}^{-3}$  ou Sb (-III), espèce chargée négativement (anion antimoniure) à laquelle on rattache le trihydrure d'antimoine ou stibine ( $\text{SbH}_3$ ) un gaz très toxique dont il possède les propriétés hémolysantes.
- $\text{Sb}^0$  ou Sb (0), la forme élémentaire présente un aspect métallique, mais est un mauvais conducteur de l'électricité, ce qui l'apparente aux non métaux, et le fait classer comme l'arsenic dans les éléments mixtes.
- $\text{Sb}^{+3}$  ou Sb (III), forme ionisée correspondant au cation trivalent, possède des propriétés réductrices.
- $\text{Sb}^{+5}$  ou Sb (V), forme ionisée la plus oxydée, qui avec le cation trivalent forme un couple oxydoréduction,  $[\text{Sb}^{3+} \text{ Sb}^{5+}]$ , semblable au couple de l'arsenic  $[\text{As}^{3+} \text{ As}^{5+}]$ .

## Chapitre 3 : Stress oxydatif

### 3. Stress oxydatif

#### 3.1. Définition de stress oxydatif

Au sein de l'organisme, il existe un équilibre entre d'une part les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont présentes à l'état basal en faible concentration et d'autre part le système anti-oxydant qui contient notamment des enzymes, des vitamines, des oligoéléments, le glutathion. Cette régulation, appelée équilibre redox et se fait en permanence.

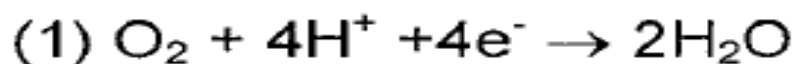
Quand la concentration en ROS est augmentée de façon constante, et la réponse anti-oxydant n'est plus suffisante pour la contenir : une perte de l'homéostasie redox apparaît conduisant à l'apparition d'un déséquilibre avec une production en ROS forte, provoque un stress oxydant (**Figure 9**).

#### 3.2. Définition des radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques (atomes ou molécules) qui possèdent un électron célibataire (ou non apparié). L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé « espèces réactives de l'oxygène » (ERO). (Angelos et al., 2005; Wolin et al., 2005; Wolin, 1996).

#### 3.3. Origine des espèces oxydantes

De nombreuses réactions biochimiques caractéristiques du métabolisme aérobie des cellules eucaryotes et procaryotes requièrent le transfert de quatre électrons vers l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) pour former une molécule d'eau ( $H_2O$ ).



Dans la plupart des cas ce transfert s'effectue spontanément sans la formation d'aucun autre intermédiaire réactionnel. Cependant, l' $O_2$  possède la propriété d'être réduit séquentiellement pour former d'autres entités réactives oxygénées (ERO) et nitrées (ERN), dont les propriétés chimiques et la toxicité envers la cellule sont variables (**figure10**).

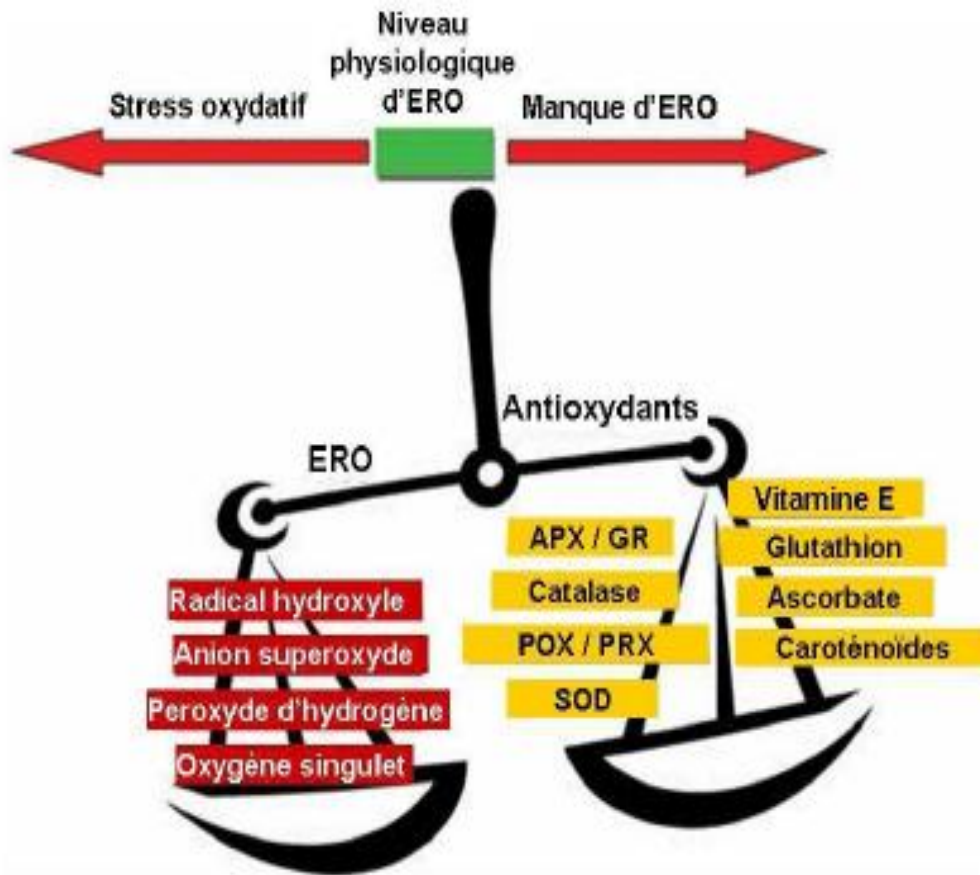


Figure 9: Schéma de la balance entre les ERO et les antioxydants (Sies, 1997).

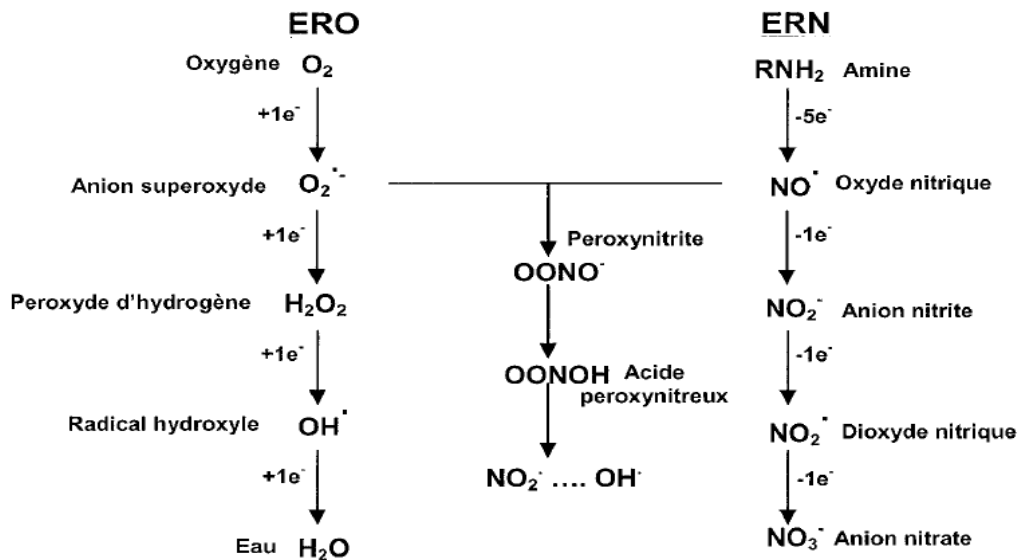


Figure 10: Voies de production des espèces oxygénées (ERO) et nitrées (ERN) réactives (d'après Nathan et Shiloh, 2000).

### 3.3.1. Radical anion Superoxyde $O_2^{\bullet-}$

C'est la forme réduite de l'oxygène moléculaire par la réception d'un électron, c'est le premier radical formé lors du transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire (Harman, 2000).  $O_2 + e^- \Rightarrow O_2^{\bullet-}$

L'anion Superoxyde  $O_2^{\bullet-}$  joue un rôle très important dans la génération de d'autres radicaux libres tels que le peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , le radical hydroxyle  $OH^{\bullet}$ , et l'oxygène singulet  $O_2^{\bullet}$  (Stief, 2003).

### 3.3.2. Peroxyde d'hydrogène $H_2O_2$

Il n'a pas d'électrons non appariés et n'est donc pas un radical. A pH physiologique, tout ion peroxyde formé va se protoner pour donner immédiatement du peroxyde d'hydrogène. La nature non ionique de cette molécule lui permet de traverser facilement les membranes cellulaires et ainsi de diffuser très facilement d'où une possibilité d'action à distance (Halliwell, 1997).

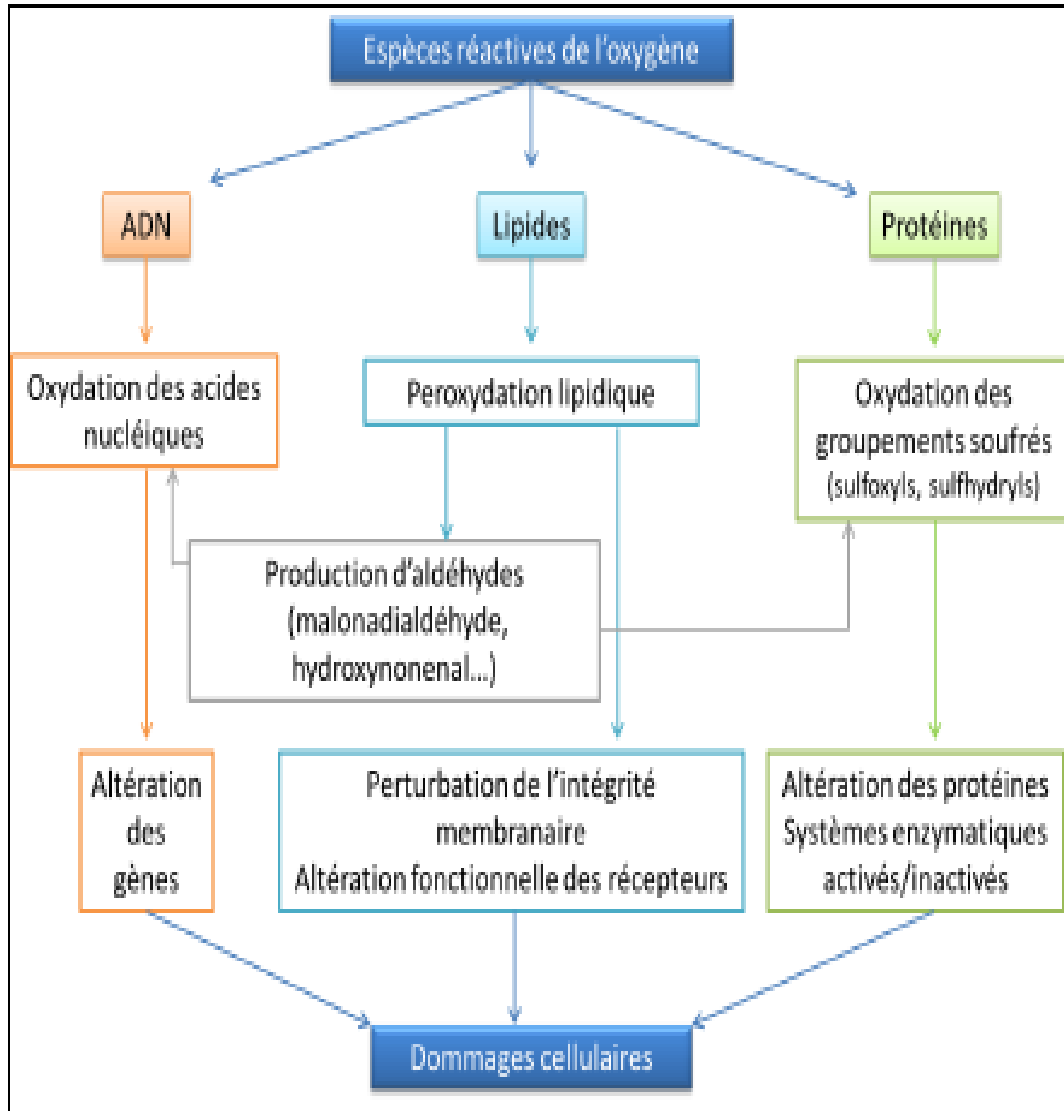
### 3.3.3. Radical hydroxyle $OH^{\bullet}$

C'est le radical le plus dangereux dans l'organisme, il est formé de la réaction de l'anion superoxyde avec l'hydrogène peroxyde :  $O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + O_2$

Cependant, une solution de peroxyde d'hydrogène avec des ions ferreux suffit à fournir des radicaux hydroxyles. Cette réaction fut observée pour la première fois par Fenton en 1894 (Halliwell et al., 1984 ; Vergely et al., 2003).  $Fe^{2+} + H_2O_2 \Rightarrow Fe^{3+} + OH^{\bullet} + OH^-$

## 3.4. Les cibles des radicaux libres

Les dommages liés à un stress oxydant se traduisent par diverses altérations de l'ADN (Cooke et al., 2003), des protéines (Davies, 2003), et des lipides (Monteil, 2004)(**Figure 11**).



**Figure 11** : Les différentes cibles des Espèces Réactives de l'Oxygène (Monteil, 2004).

### 3.4.1. Altérations des protéines

Les protéines les plus touchées sont celles comportant un groupement sulphydyle (-SH), comme c'est le cas pour de nombreuses enzymes et protéines de transport (Stadtman et Levine, 2000). Ainsi, l'histidine, l'arginine, la lysine ou encore la proline sont des cibles privilégiées de ce processus d'altération oxydative (Stadtman et Levine, 2000; Wong et al., 2008).

Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques, et sont beaucoup plus sensibles à l'action des protéases (Stadtman et Levine, 2000). Enfin, les ERO induisent des modifications indirectes des protéines via la formation d'adduits par des aldéhydes dérivant de la peroxydation des lipides (Lynch et al., 2001) (**Figure 12**).

### 3.4.2. Altération des lipides

Les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées des ROS radicalaires en raison de leurs hydrogènes bis-allyliques facilement oxydables (Halliwell et Gutteridge, 1989).

La phase d'initiation consiste en la création d'un radical d'acide gras ( $R\bullet$ ) à partir d'un acide gras (RH) par soustraction d'un atome d'hydrogène. Ce radical lipidique subit ensuite un réarrangement moléculaire pour donner un autre radical avec une structure plus stable, qui peut réagir avec une molécule d' $O_2$  et former un radical peroxy ( $ROO\bullet$ ) (Esterbauer et al., 1997). Ce dernier est suffisamment réactif pour arracher à nouveau, un hydrogène à un acide gras polyinsaturé voisin, propageant ainsi la réaction.

L'hydroperoxyde lipidique formé peut être oxydé en présence de métaux de transition divalents de  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$  et entraîner la formation d'alcalanes et d'aldéhydes toxiques dont le malonyldialdéhyde (MDA) ou le 4-hydroxynonanal (4-HNE).

La réaction en chaîne peut être interrompue (phase de terminaison) par l'association de deux radicaux libres et la formation d'un composé stable ou le plus souvent par la réaction du radical avec une molécule antioxydante (Delattre et al., 2005) (**Figure 13**).

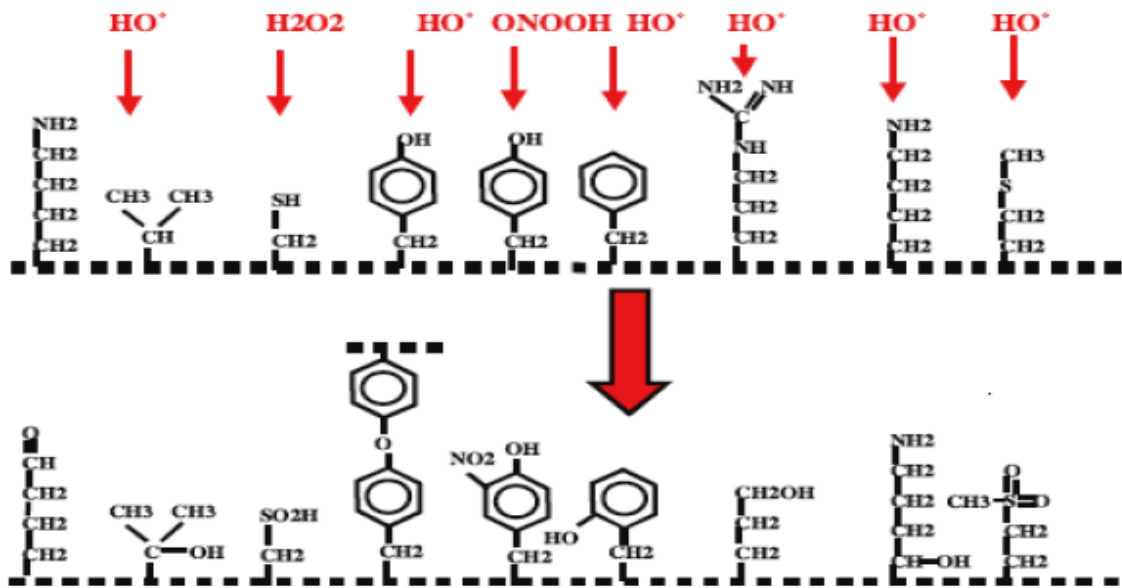


Figure 12 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales d'acides aminés des protéines après attaque radicalaire (d'après Favier, 2003).

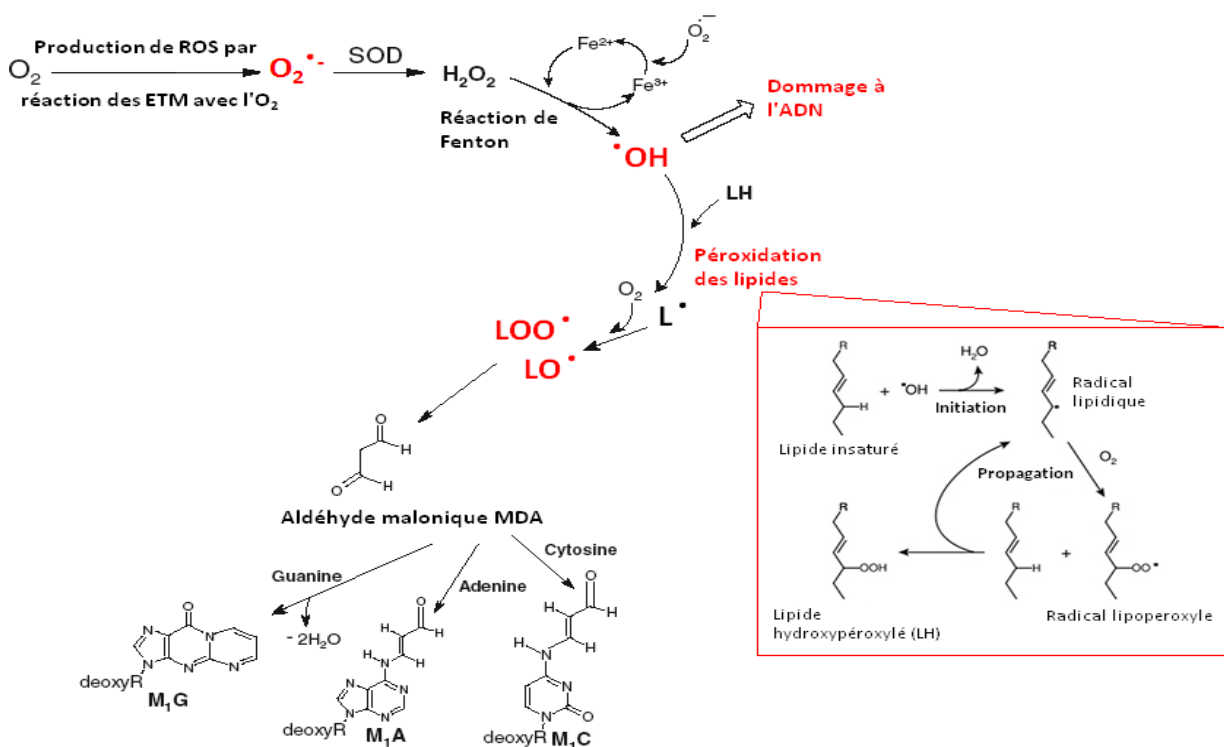


Figure 13 : Origine des différents radicaux libres et espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées par les ETM et leurs actions sur les biomolécules (d'après Jomova et al., 2012). SOD : Superoxyde Dismutase ; LH : Lipide Hydroxypéroxylé ; L : Lipide ; L• : radical lipidique ; LOO• : radical lipopéroxylé ; MDA : aldéhyde malonique ; M1G : pyrimido [1,2-a]purin-10(3H)-one ; M1A : N6-(3-oxo-propenyl) deoxyadenosine ; M1C : N4-(3-Ioxopropenyl) deoxycytidine.

### 3.4.4. Altération des acides nucléiques

Les altérations oxydatives causées par les ERO sont considérées comme la source majeure de dommages spontanés sur l'ADN (Beckman et Ames, 1997). Ces dégâts sont regroupés en quatre grandes catégories : les coupures simples et doubles brins, la modification de bases, la formation de sites abasiques et les pontages ADN-protéines (Favier, 2003) (**Figure14**).

### 3.5. Systèmes antioxydants

Les cellules possèdent des mécanismes de défense enzymatiques et non enzymatiques qui, de manière générale, suffisent à renverser le stress oxydant appelés antioxydants (Wassmann et al., 2004).

#### 3.5.1. Systèmes enzymatiques

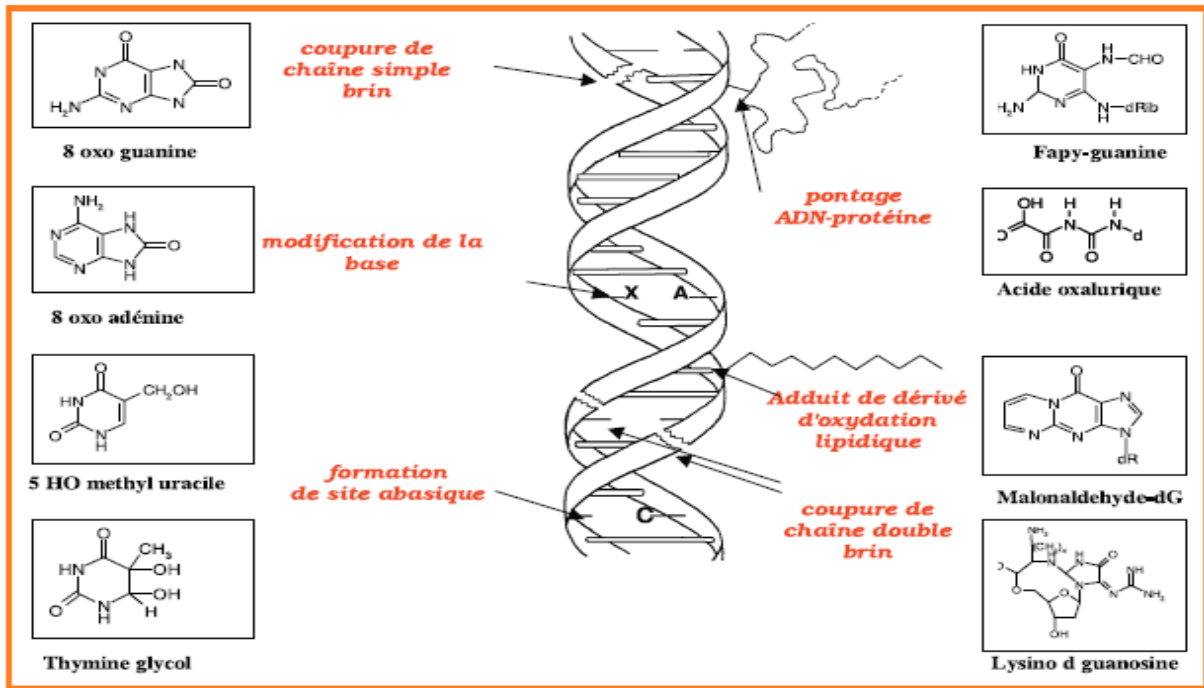
Les principales enzymes antioxydantes sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion peroxydase (GPX), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST) (Matés, 1999) (**Figure15**).

##### 3.5.1.1. Superoxyde dismutase

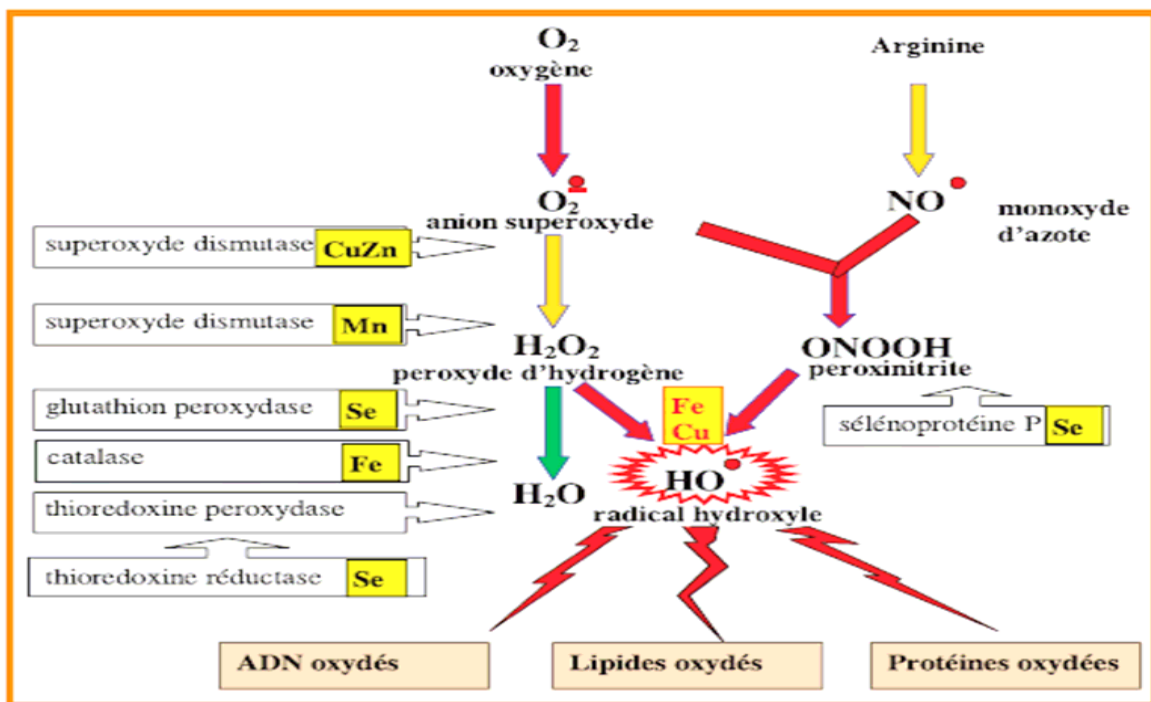
Superoxyde dismutase (EC 1, 15, 1,1) est l'enzyme antioxydant la plus importante dans la défense contre le stress oxydatif (Anderson et al, 1997); est une métalloenzyme qui dismute l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et peroxyde d'hydrogène (Fridovich, 1995 ; Akihiko et al., 1991 ; Frank et al., 2004). Trois isoformes de SOD ont été distinguées ; la SOD contenant du cuivre et du zinc (Cu, ZnSOD), manganèse (MnSOD), SOD contenant de fer (FeSOD). Récemment, une nouvelle Superoxyde dismutase contenant du nickel, NiSOD, a été purifiée à partir de plusieurs espèces de Streptomyces (Wuerges et al., 2004) (Schafer et Kardinah, 2003).

Les Cu / Zn-SOD sont très répandues dans le cytosol et périplasma des procaryotes (Steinman, 1985; Steinman, 1992) ainsi que chez les eucaryotes (Getzoff et al., 1989). Les types Fe et Mn se trouvent principalement dans les procaryotes et les mitochondries (Schafer et Kardinah, 2003). Le mécanisme général de dismutation est décrit par la réaction suivante :

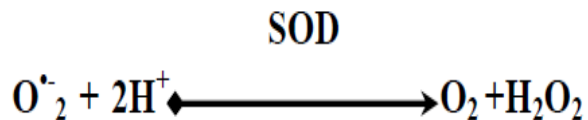




**Figure 14 :** Lésions de l'ADN formées par attaque radicalaire du patrimoine génétique des cellules.



**Figure 15:** Mode d'action des principaux systèmes enzymatiques antioxydants et de leurs cofacteurs métalliques (d'après Matés, 1999).



Ces enzymes accélèrent la vitesse de cette réaction spontanée rendant très rapide la disparition du superoxyde mais en générant le peroxyde d'hydrogène. Celui-ci est un composé oxydant mais peut être ultérieurement catabolisé par la catalase et les glutathion peroxydases.

#### 3.5.1.2. Catalase (CAT)

Catalase (EC 1, 11, 1,6) est une enzyme responsable de la détoxification du peroxyde d'hydrogène produit dans les conditions physiologiques (Nancy ,2006 ; Niki et al., 2007 ). (Ye-Shih et al., 2004). La réaction catalysée par cette enzyme est une dismutation du peroxyde d'hydrogène :  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

La catalase est une enzyme tétramérique, chaque sous unité comporte dans son site actif un ion  $\text{Fe}^{+3}$  et une molécule de NADPH. La présence du NADPH dans la catalase lui confère une protection contre l'attaque de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Delattre et al., 2005).

Cette enzyme est présente dans les cellules de presque tous les organismes vivants (Vainshtein et al., 1985). Elle est principalement située dans les peroxisomes de tous les types cellulaire de mammifères où  $\text{H}_2\text{O}_2$  est généré par les différentes oxydases (Purdue and Lazarow, 1996)

#### 3.5.2. Antioxydants non enzymatiques

Certaines substances ont la propriété de piéger et de détruire les espèces réactives de l'oxygène. Il s'agit de composés facilement oxydables présents dans le cytoplasme ou dans les membranes cellulaires comme : l'acide Ascorbique ou la vitamine et le glutathion ... (Vertuani et al., 2004).

**DEUXIEME PARTIE :**  
**MATERIELS ET METHODES**

### **1. Objectif**

L'étude porte sur l'effet de l'antimoine Sb sur la croissance bactérienne et le stress oxydatif chez une bactérie endophyte résistante à l'antimoine. Ce microorganisme a été isolé à partir d'une zone de mine riche en antimoine qui se trouve à Ain Babouche de Ain M'Lila.

### **2. Choix de la Souche**

C'est une bactérie endophyte isolée à partir des racines d'une plante qui s'appelle *Hedysarum pallidum* au niveau de laboratoire de microbiologie et environnement. Après des tests de toxicité il est avéré que cette souche résiste à l'antimoine jusqu'à 500mM.

### **3. Préparation du milieu de culture et ensemencement**

Le milieu Luria-Bertani (LB) modifié et tamponné contient 10 g/L de peptone, 5 g/L de glucose et 5 g/L de NaCl dans le tampon citrate 50mM pH ; après homogénéisation des constituants et stérilisation par autoclavage (1bar et 120°C / 20 min), le pH final du milieu est ajusté à 7,0.

Dans des Erlenmeyer de 250 mL on met 50 mL du milieu LB modifié et tamponné, auxquels on a ajouté la solution métallique d'antimoine stérile (500 mM) de façon à obtenir les concentrations suivantes : 0, 5, 10, 20, 30 mM en trois répétitions; puis on ajoute 0.5mL de la suspension bactérienne de 24h d'incubation dans le même milieu LB mais sans métal. Les erlens sont incubés à 30°C pendant 24h sous agitation 150 rpm dans un incubateur agitateur (New Brunswick Scientific).

### **4. Mesure et récupération de la biomasse**

#### **4.1. Mesure de la croissance**

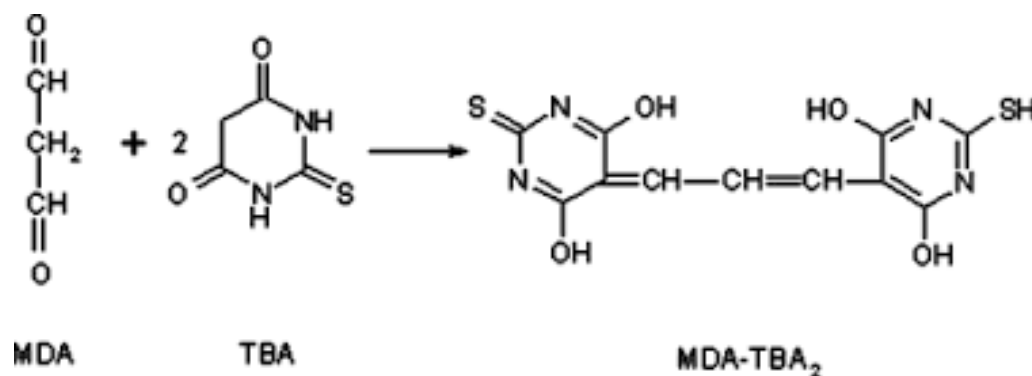
Après 24h d'incubation on mesure l'absorbance de chaque concentration à 650nm pour détecter l'effet de l'antimoine sur la croissance bactérienne.

#### **4.2. Récupération de la biomasse**

On récupère les biomasses de chaque concentration par une centrifugation à 10000g pendant 20min.

### 4.3. Dosage de la teneur en Malonedialdéhyde MDA

L'MDA est dosé selon la méthode de Kosugi and Kikugawa 1985 .Le principe repose sur la réaction qui se produit entre Malonedialdéhyde et l'acide thiobarbitrique (TBA) formant le derive coloré MDA-TBA<sub>2</sub> de couleur rose absorbent à 532 nm.



**Figure1.** Réaction TBA- MDA dans l'essai de TBA.

On prend 0.5g de biomasse fraîche et on ajoute 5mL du mélange réactionnel contenant 20% TCA et 0.5% TBA. Après incubation à 95°C pendant 30min puis un refroidissement dans un bain de glace le mélange est centrifugé à 5000 g pendant 10min. La lecture de l'absorbance à 600 nm et à 532 nm. La teneur en MDA dans la biomasse est calculée en utilisant l'équation suivante : l'activité de MDA :  $[\text{MDA}] = (\epsilon \times L) \mu\text{Mol/g}$  de tissu. Sachant que :  $L = \text{Abs}_{532} - \text{Abs}_{600}$  et le coefficient d'extinction  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 4.4. Dosage de la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Pour le dosage H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on ajoute 5mL TCA 0.1% (w/v) à 0.5g de biomasse fraîche. Après une homogénéisation et centrifugation à 12000 g/15 min, on prend 0.5 mL de surnageant auquel on additionne 0.5mL de tampon phosphate 10mM pH7 et 0.5mL de KI 1M. L'absorbance est faite à 390 nm, et la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est déterminée en utilisant une courbe d'étalonnage.

### 5. Dosage des enzymes antioxydants

#### 5.1. Préparation de l'extrait enzymatique

Après la récupération de la biomasse on fait l'extraction par une solution glacée constituée de PVP 1% et de Tween 20 0.1% dans un tampon phosphate 50 mM pH7. Une agitation puis une centrifugation à 12000g pendant 20min, le surnageant représente l'extrait enzymatique.

#### 5.2. Superoxyde dismutase SOD

Le dosage de l'activité enzymatique de la SOD se fait selon la méthode de Marklund and Marklund, (1974). Le principe repose sur le capacité d inhibition de l'antioxydation du pyrogallol par la SOD à 420nm. On a pris 2.85mL tris HCl, 0.1mLde l'extrait enzymatique et 25µL de pyrogallol puis l'incubation pendant 30 secondes .on a préparé aussi le blanc par la même méthode mais on a remplacé l'extrait enzymatique par 0.1 mL de l'eau distillées .puis La lecture de l'absorbance à 420 nm. L'activité de la SOD est mesurée comme suite:

SOD (U/mL)= (%d inhibitions x 1000) /volume de prise x50) et sachant que :

% d'inhibition= (Abs Blanc –Abs test)/Abs test.

#### 5.2. Catalase CAT

Pour le dosage l'activité de la CAT on met 0.1 mL l'extrait enzymatique dans un 2.9mL le tampon phosphate 50 mM pH7 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La diminution de la concentration de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est mesurée chaque minute à 420 nm pendant les 3premières minutes. L'activité de la CAT est égale à:

Unité enzyme =  $\Delta\text{Abs} \cdot V_t \cdot F_D / \epsilon (39.4) \cdot V_e$ . Sachant que le coefficient d'extinction  $\epsilon=2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

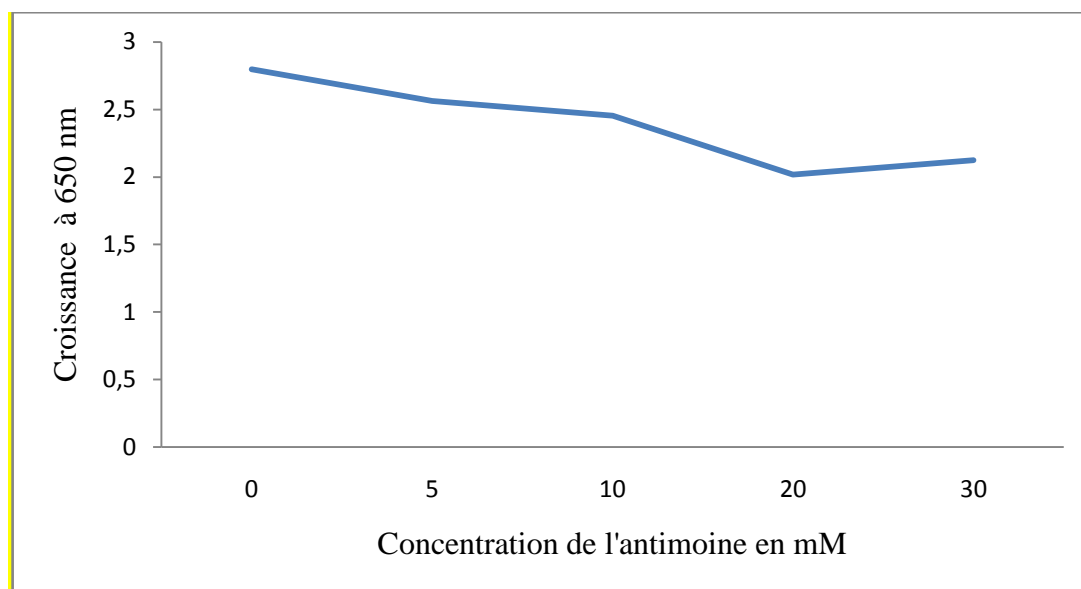
### 6. Dosage des protéines

Les protéines sont quantifiées selon la méthode de Lowry et al., (1951) en utilisant le Sérum Bovine Albumine (BSA) comme standard.

**TROISIEME PARTIE :**  
**RESULTATS ET DISCUSSION**

Le présent travail porte sur l'étude du comportement biochimique d'une souche bactérienne endophyte, isolée de des racines d'*Hedysarum pallidum*, vis à vis la toxicité générée par l'antimoine.

### 1. Effet de l'antimoine sur la croissance bactérienne



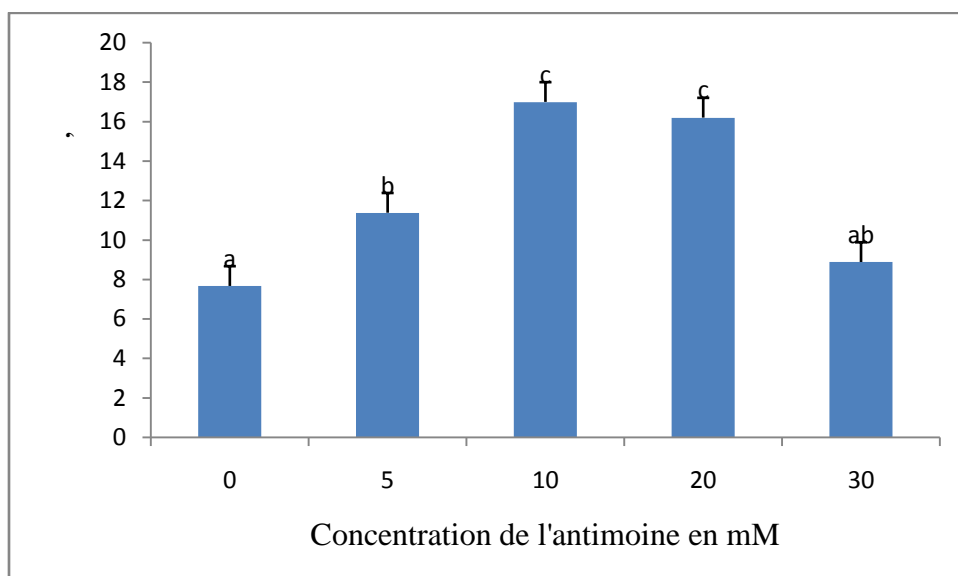
**Figure 1. Effet de la concentration de l'antimoine sur la croissance bactérienne**

L'effet du Sb sur la croissance de la bactérie endophytes cultivée en culture submergée en absence et en présence de différentes concentrations de Sb est représenté dans la figure 1. Sur cette dernière, on observe qu'il y a une diminution progressive de l'absorbance à 650 nm quand la concentration du métal augmente de 0 à 20mM. Les taux de réduction de la croissance sont 103.93 %, 99.55 %, 81.82%, 86.16% par rapport au témoin aux concentrations 5, 10 et 20 mM, respectivement. Ce résultat montre que l'antimoine possède un effet néfaste sur la croissance bactérienne. Cependant à 30 mM d'antimoine, on constate une légère augmentation de cette absorbance, cela pourrai expliquer par une adaptation de la souche à la présence de l'antimoine dans son milieu de culture.

La diminution du nombre de cellules bactériennes en présence de l'antimoine après 24 heures de culture peut être due à une possible autolyse en réponse à la toxicité du Sb (Bahar et al., 2013). Ce résultat est similaire à celui présenté par (Yilmaz, 2003) qui a constaté une réduction de la croissance de la souche *Bacillus circulans* EB1, résistante aux métaux lourds, cultivée en présence de différentes doses de cadmium.



## 2. Effet de l'antimoine sur la teneur en MDA



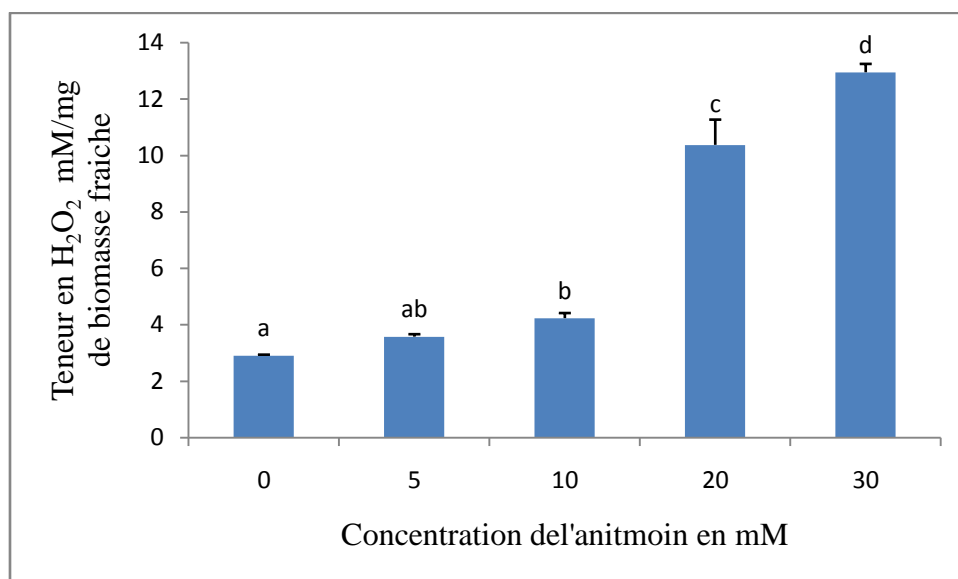
**Figure 2.** Variation de la teneur en l'MDA en fonction de la concentration de l'antimoine

Après 24 h de croissance bactérienne, le contenu en MDA a augmenté progressivement avec 148% et 221%, par rapport au témoin, à 5 et 10 mM Sb respectivement. A 20 mM une diminution non significative est observée, ensuite le contenu en MDA se réduit avec l'accroissement du stress métallique (Fig. 2).

La figure 2 montre qu'après 24 h de croissance bactérienne, le contenu en MDA a augmenté d'une façon très significative, il atteint son maximum, à 10 mM de Sb avec 212% par rapport au témoin. Mais à 10 et 20 mM cette teneur reste relativement stable. Au-delà de 20mM d'antimoine on enregistre une diminution de 53 % à 30 mM par rapport à celle de 10Mm.

L'augmentation de la concentration de l'MDA peut être justifié par la génération des espèces réactives oxygénées tels que  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'autres, et ce, en présence des métaux lourds. Ces ROS peuvent être responsables de la peroxydation lipidique des acides gras polyinsaturés (Douglas, 1996). Cette réaction produit différents types de cytotoxines comme la malondialdéhyde (MDA) qui est un indicateur de stress oxydative (Pathak et al., 2006).

### 3. Effet de l'antimoine sur la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



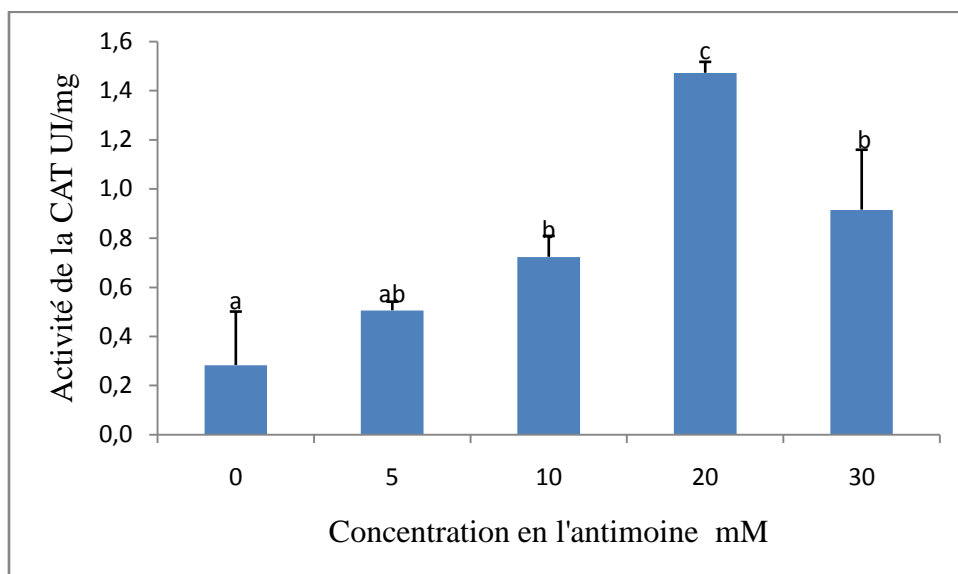
**Figure 3.** Variation de la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction de la concentration de l'antimoine.

Les variations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire sont présentées dans la figure 3. A 5 mM d'antimoine, une légère augmentation de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est notée. Au-delà de 10 mM, elle augmente d'une façon significative jusqu'à 333% et 433% à 20 et 30 mM en Sb, respectivement par rapport au témoin.

Les variations des teneurs en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en fonction des concentrations en Sb montrent que l'addition de doses croissantes en antimoine augmente la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire. Ce dernier est un oxydant fort même à des faibles concentrations; il pourrait causer des dommages oxydatifs, et par conséquent, l'observation de la perturbation de la fonction métabolique, de la perte de l'intégrité cellulaire et de l'accumulation de MDA (Foyer et al., 1997).

#### 4. Effet de l'antimoine sur les enzymes antioxydants

##### 4.1. Effet de l'antimoine sur l'activité de la CAT

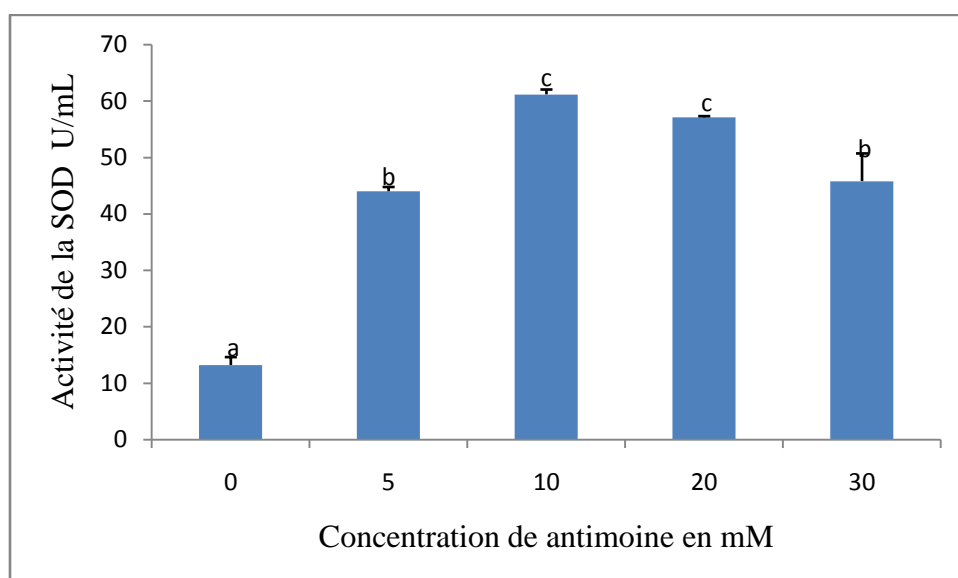


**Figure 4.** Variation de l'activité de la CAT en fonction de la concentration de l'antimoine.

La figure 4 présente les changements d'activité de la catalase (CAT) à différentes concentrations d'antimoine. Une augmentation progressive de l'activité CAT est remarquée avec l'augmentation significative de la dose d'antimoine jusqu'à 20 mM. L'augmentation est d'environ 1.66, 2.33 et 5 fois supérieure par rapport au contrôle pour les concentrations de 5, 10 et 20 mM, respectivement. Cela dévoile l'implication de cette enzyme dans la catalyse du  $H_2O_2$  intracellulaire formé en présence d'antimoine. Cependant, à 30 mM de ce métalloïde provoque une réduction significative de cette activité. Cela peut être causé par l'hyperproduction de  $H_2O_2$  intracellulaire par la souche test, ce qui inhibe l'activité de la catalase et favorise encore l'accumulation de  $H_2O_2$ .

Polidoros et Scandalios en 1966 ont également 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.

### 4.2. Effet de l'antimoine Sb sur l'activité du superoxyde dismutase SOD



**Figure 5.** Variation de l'activité de la SOD en fonction de la concentration de l'antimoine Sb.

L'activité du superoxyde dismutase (SOD) est augmentée de plus de 3.38 et 4.69 fois à 5 et 10 Mm respectivement par rapport au contrôle ; elle atteint son maximum à 10 mM. Cette augmentation de l'activité de la SOD se traduit par une augmentation de la concentration des radicaux superoxydes  $O_2^{\bullet -}$ . Cela révèle le rôle de cette enzyme en situation de stress oxydatif (Dazy et al., 2009).

Une diminution progressive de l'activité enzymatique est observée avec les fortes doses d'antimoine, près de 93% à 20 mM et 75% à 30 mM Sb en comparaison avec la valeur maximale. La réduction de l'activité de la SOD à forte concentration en Sb est la conséquence d'une sensibilité de l'enzyme à l'excès en  $H_2O_2$  en produisant des perturbations dans la défense antioxydante dans les cellules (Dietz et al., 1999).

# **CONCLUSION**

Pour pallier à cette pollution de plus en plus importante, des procédés de biorémediation font l'objet de plusieurs travaux de recherche. Ces derniers dépendent de plusieurs facteurs dont l'existence d'une population microbienne adaptée aux conditions extrêmes.

Pour cela, notre travail porte essentiellement sur l'impact du Sb sur la croissance et le mécanisme de défense antioxydant vis-à-vis le stress oxydatif induit par l'antimoine de la bactérie endophyte adaptée aux sols antimonieux.

Une conséquence fréquente de stress par les métaux lourds est la formation de ROS. Nos expérimentations ont montré que la souche test était capable de tolérer la toxicité de ces produits par son système antioxydant. Il ressort que l'augmentation du stress oxydatif, évalué par les taux de l'MDA, l' $H_2O_2$  et l'activité de certaines enzymes antioxydants présentes chez l'espèce étudiée, varient en fonction de concentration du métalloïde (Sb) ce qui montre leur adaptation à un environnement naturel hostile.

Avec ces données, nous pouvons considérer cette souche comme un agent efficace pour la détoxification des sols contaminés par l'antimoine.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographique

---

- Audion, 2012. Panorama 2011 du marché de l'antimoine, p18.
- Andersen, H. R. Nielsen, J. B. Nielsen, F. Grandjean, P. 1997. Anti oxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry*, Vol 43: 562-568.
- Angelos, M. G. Kutala, V. K. Torres, C. A. He, G. Stoner, J. D. Mohammed, M, Oennan, K. 2005. Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radiacal generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Vol 290: 341-347.
- Babich, H., Stotzki, G. (1977) Effects of cadmium on fungi and on interactions between fungi And bacteria on soil: influence of clay minerals and pH. *Appl. Env. Microbiol.* 33, 1059-1063.
- Babich, H and Stotzky, G. (1980). Environmental factors that influence the toxicity of heavy metals and gaseous pollutants to microorganisms, *Crit. Rev. Microbiol.* 8, 99-145.
- Bactér Rosenblueth M, Martinez-Romero E (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 827-837 endophyti.
- Bahar MM, 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.
- Bruins, R., Kapil, S., Oehme, F.W. (2000) Microbial resistance to heavy metals in the environment. *Ecotoxicity Environ. Safety* 45, 198-20.
- 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.
- Carlin JF, (2000) Minerals year book. Antimony. U.S. Department of the interior. US Geological survey Minerals Information. 988 National Center, Reston, VA 20192 USA. <http://minerals.er.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/antimony/060400.pdf>.
- Chang, J., 1997. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research* 31, 1651-1658.



## Références bibliographique

---

Dazy M, Masfaraud JF, Féraud JF (2009) Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Chemosphere* 75: 297–302.

Deneux-Mustin S, Roussel-Debet S, Mustin C, Henner P, Munier-Lamy C, Colle C, Berthelin J, Garnier- Laplace J, Leyval C. 2003. Mobilité et transfert racinaire des éléments en traces : influence des microorganismes du sol. Paris: Tec et Doc.

Dietz KJ, Baier M, Krämer U (1999) Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: Prasad MNV, Hagemeyer J, eds. *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*. Berlin: Springer-Verlag, 73–97.

Douglas CJ (1996) Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends Plant Sci* 1: 171–178.

Esterbauer, H. Gebicki, J. Puhl, H. Jurgens, G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, Vol 13: 341-390.

European Union Council Directive 98/83/EC. Of 3 November 1998. On the quality of water intended for human consumption. Official journal L330 (1998) 32.

Filella M, Belzile N et Chen YW (2002-a). Antimony in the environment: a review focused on natural waters. I. Occurrence. (*DUWK\_6FL\_5HY*, 57: 125-176.

Filella M, Belzile N et Chen YW (2002-b). Antimony in the environment: a review focused on natural waters. II. Relevant solution chemistry. (*DUWK\_6FL\_5HY*, 59(1-4): 265-285.

Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. *Physiol Plant* 100: 241–254.

Jomova K, Baros S, Valko M. 2012. Redox active metal-induced oxidative stress in biological systems. *Transition Metal Chemistry* 37: 127-134.

## Références bibliographique

---

Haferburg, G., Kothe, E., 2007. Microbes and metals: Interactions in the environment. *J. Basic Microbiol.* 47, 453-467.

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

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

Halliwell, B. 1997. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev.* Vol 55:44–49.

Hallmann J, QuadtHallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914.

Hamilton EI (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. 6FL\_7RW\_ (QYLURQ, 249: 171-221.

Harman, D. 2000. Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci.* Vol 928:1–2.

Krenkel, P.A. (1974) Mercury environmental considerations, part II *CRC Crit. Rev. Environ. Contro* 41 ,251-264.

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

Lutsenko S., Kaplan, J.H. (1995) Organization of P-type ATPases: Significance of structural diversity. *Biochemistry* 34, 15607-15613.

Lynch MP, C Faustman, LK Silbart, D Rood and HC Furr (2001). "Detection of Lipid-Derived Aldehydes and Aldehyde:Protein Adducts In Vitro and in Beef." *Journal of Food Science* 66(8): 1093-1099.

## Références bibliographique

---

Ma Y, Prasad MNV, Rajkumar M, Freitas H (2011) Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* 29:248-258.

Malik, A., 2004. Metal bioremédiation through growing cells. *Environment International* 30, 261-278.

MC (2007) Antimony in the environment: A review focused on natural waters. III. Microbiota relevant interactions. *Earth Sci Rev* 80:195–217  
Meng YL, Liu Z, Rosen BP (2004) As (III) and Sb (III) uptake by GlpF and efflux by ArsB in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279:18334–18341 In: Filella M, Belzile N, Lett.

Médico-Chirurgicale (EMC). Elsevier SAS, Paris. Toxicologie Pathologie professionnelle. A paraitre.

Miquel G., 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°261: 360.

Nancy, J. Linford, S. I. Chriner, E. Peter, S. Rabinovitch. 2006. Oxidative Damage and Aging: Spotlight on Mitochondria. *Cancer Res*; 66: 2497-2499.

Nathan, C. and Shiloh, M. U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relation ship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sei. U S.* 97:8841-8848.

Pathak S, Das JK, Biswas SJ, Khuda-Bukhsh AR (2006) Protective potentials of a potentized homeopathic drug, *Lycopodium-30*, in ameliorating azodye induced hepatocarcinogenesis in mice. *Mol Cell Biochem* 258: 121–131.

Picot A, Proust N. Toxicochimie des produits minéraux : importance de la spéciation. Encyclopédi.

Polidoros AN, Scandalios JG (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.

## Références bibliographique

---

Rouxel O, Ludden J et Fouquet Y (2003). Antimony isotope variations in natural systems and implications for their use as geochemical tracers. *&KHP\_\*HRO*, 200(1-2): 25-40.

Sanders OI, Rensing C, Kuroda M, Mitra B, Rosen BP (1997) Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 3365–3367.

Schmitt, H .W. Sticher H,. (1991) Heavy metal compound in the soil. Dans: *Metals and their compound in the environment*. Merian, E. (ed.), VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 311 -331.

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

Silver, S. (1998) Genes for all metals - a bacterial view of the periodic table. The 1996 Thom Award lecture. *J. Ind. Microbiol. Biotechno.* 120, 1-12.

Sies H (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Experimental Physiology* 82(2): 291-295. Silbergeld E, M Waalkes and J Rice (2000). "Lead as a carcinogen: Experimental evidence and mechanisms of action." *American Journal of Industrial Medicine* 38(3): 316-323. Silbergeld EK (2003). "Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen." *Mutation*.

Sposito, G,. (1983) The chemical forms of trace metals in soils. Dans: *Applied environmental geochemistry*, Thornton, I. (ed.), Academic Press, London, 123-170.

Stadtman ER and RL Levine (2000). "Protein Oxidation." *Annals of NY Academy of Science* 899(1): 191-208.

Stief, T. W. 2003. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypoth* .Vol 60:567–572.

Ulrich N. Speciation of Antimony. Dans Cornelis R. *Handbook of Elemental Speciation*. Tome II. Chichester, John Wiley and Sons. 2005. 47-68.

## Références bibliographique

---

Vertuani, S. Angusti, A. Manfredini, S. 2004. The antioxidants and pro-oxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.* Vol 10: 1677-1694.

Wassmann, S. Wassmann, K. Nickenig, G. 2004. Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hyperten.* Vol 44: 381-386.

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

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. *Biochemistry.* Vol 101: 8569 – 8574.

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

Zhao FJ, McGrath SP, Meharg AA (2010) Arsenic as a food chain contaminant: mechanisms of plant uptake and metabolism and mitigation strategies. *Annu Rev Plant Biol* 61: 535–559.

# **ANNEXES**

## Annexes 1 : Etude statistique

### 1. Effet de l'antimoine sur la teneur en MDA

Modalité	Moyenne estimée	Erreur standard	Groupes		
0	8	1,131	A		
5	11	0,949		B	
10	17	1,587			C
20	16	1,240			C
30	9	0,531	A	B	

### 2. Effet de l'antimoine sur la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Modalité	Moyenne estimée	Erreur standard	Groupes			
0	3	0,031	A			
5	4	0,087	A	B		
10	4	0,180		B		
20	10	0,894			C	
30	13	0,296				D

### 3. Effet de l'antimoine sur les enzymes antioxydants

#### 3.1. Effet de l'antimoine sur l'activité de la CAT

Modalité	Moyenne estimée	Erreur standard	Groupes		
0	0,3	0,218	A		
5	0,5	0,035	A	B	
10	0,7	0,085		B	
20	1,5	0,045			C
30	0,9	0,244		B	

#### 3.2. Effet de l'antimoine Sb sur l'activité de la SOD

Modalité	Moyenne estimée	Erreur standard	Groupes		
0	13	1,403	A		
5	44	0,756		B	
10	61	0,853			C
20	57	0,196			C
30	46	4,893		B	

# Résumés



## Etude du stress oxydatif chez une bactérie résistante à l'antimoine

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie :  
Analyse Protéomique et Santé.

### Résumé :

Notre travail porte essentiellement sur l'étude de la toxicité de l'antimoine sur la croissance d'une bactérie isolée des racines d'une plante poussant sur des déblais de mine de l'antimoine. Ainsi voir l'impact de ce métalloïde sur l'activité de la catalase CAT, le superoxyde dismutase SOD, et de la teneur en Malonedialdéhyde MDA et de la teneur en Peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nos résultats montrent que l'antimoine n'a pas un effet létal sur la croissance de cette bactérie. Le test de toxicité de l'antimoine sur la teneur en Malonedialdéhyde MDA et de la teneur en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nous indiquent que ce métalloïde stimule la synthèse de ces derniers par la génération des espèces réactives oxygénées ROS. Il possède aussi un effet sur l'activité catalasique CAT et le superoxyde dismutasique SOD ; d'ailleurs il stimule l'activité de ces deux enzymes à des concentrations marquées et s'il dépasse un certain seuil il provoque des dommages qui se sont traduits par l'inhibition de ces activités.

**Mots clés :** antimoine, croissance bactérienne, activité enzymatique, toxicité, catalase, superoxyde dismutase, Malonedialdéhyde, Peroxyde d'hydrogène.

**Laboratoire de recherche :** Microbiologie et Environnement

### Jury d'évaluation :

**Président du jury :** MECHAKRA. A (Prof - UFM Constantine).

**Encadreur :** KASSAH LAOUAR M. (MAA - UFM Constantine).

**Co-encadreur :** BENKAHOUL M. (MCB - UFM Constantine).

**Examinatrice :** BENHAMDI A. (MCB - UFM Constantine).

**Date de soutenance :** 02/06/2016

### ملخص

عملنا يركز على دراسة سمية الانتيمون ( Antimoine ) على نمو البكتيريا المعزولة من جذور النباتات التي تنمو على غنيمية منجم الانتيمون وتأثير هذا الفلز على نشاط الكاتالاز ( Catalase ) ، سوبراوكسيد ديسميوتاز ( Superoxyde ) dismutase ومحتوى فوق اكسدة الليبيدات (Malonedialdéhyde) وأيضا محتوى بيروكسيد الهيدروجين H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. تظهر نتائجنا أن الانتيمون ليس له تأثير قاتل على نمو البكتيريا. اختبار سمية الانتيمون على محتوى فوق اكسدة الليبيدات (Malonedialdéhyde) ومحتوى بيروكسيد الهيدروجين H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> بين لنا أن هذا الفلز يحفز على تخليق هذه الأخيرة عن طريق تجديد أنواع الاكسيجينات التفاعلية. ويملك أيضا تأثيرا على نشاط الكاتالازي و سوبراوكسيد ديسميوتاز ; علاوة على ذلك فانه يحفز على نشاط هذين الإنزيمين عند تركيزات ملحوظة وإذا تجوز عتبة معينة يسبب الضرر الذي أدى إلى تشييط هذه الأنشطة.