



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث 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 والحياة

Département : Microbiologie : قسم

الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Écologie et environnement

Spécialité : Écologie microbienne

Intitulé :

Etude de bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures et son amélioration par mutagénèse

Présenté et soutenu par :

Le : 30/09/2020

MERABET Hadjer

KITA Maroua

Jury d'évaluation :

Président du jury : OULMI Lamia (MCB- UFM Constantine).

Rapporteur : ZERMANE Férial (MAA- UFM Constantine).

Examineurs : GUERGOURI Ibtissem (MAA- UFM Constantine).

*Année universitaire
2019- 2020*

Remerciements

Nous voudrions tout d'abord adresser toute notre gratitude à notre encadreur Madame F. ZERMANE. Maître assistante à l'Université des Frères Mentouri-Constantine 1 pour l'aide qu'elle a fournie et les connaissances qu'elle a su nous transmettre. Nous la remercions également pour sa disponibilité et la qualité de ces conseils.

Nous tenons à remercier avec une plus grande gratitude Madame L. OULMI. Maître de conférences à l'Université des Frères Mentouri-Constantine 1 de l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider le jury de notre soutenance.

Nous remercions également, Madame I. GUERGOURI. Maître assistante à l'Université des Frères Mentouri-Constantine 1 d'avoir bien voulu accepter d'examiner notre travail.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail A mes très chers parents **maman** et **papa** sources de tendresse et la force de courage d'étude Je vous remercie d'être toujours à mes coté de me soutenir, aimer, Protéger et pour tous ce que vous avez fait pour moi.

À mes Chères frères et mes sœurs :

- * **CHARAF**
- * **HAKIM**
- * **LOUAI**
- * **KAWTHER**
- * **KARIMA**
- * **AMIRA**
- * **NOUSSA**

À nos chers Amis.

Résumé

En raison de leur persistance et génotoxicité, les hydrocarbures pétroliers présentent un problème environnemental majeur.

Plusieurs techniques ont été mises en évidence pour lutter contre cette pollution, parmi ces techniques, la bioremédiation qui se base sur l'utilisation de microorganismes pour transformer ces composés en formes moins dangereuses ou non dangereuses avec moins d'apport de produits chimiques et d'énergie. La biodégradation des hydrocarbures a été largement étudiée et de nombreuses souches microbiennes ont été isolées en raison de leur capacité à métaboliser les hydrocarbures avec des taux de dégradation variables.

Ils sont capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers en les utilisant comme seules sources de carbone et d'énergie. L'amélioration génétique par mutagenèse via les rayons ultraviolets, de souches dégradantes des hydrocarbures a rapporté des mutants présentant une capacité plus importante de dégradation de pétrole et de diesel. La bioremédiation des sols contaminés par des hydrocarbures pétrolier dans différentes conditions a été menée en utilisant principalement des bactéries Gram négatives comme *Pseudomonas*, qui est le genre de bactéries le plus prometteur dans ce domaine. La capacité de *Pseudomonas sp.* d'utiliser les hydrocarbures a été expliqué par la production de biosurfactants lipidiques pour la dégradation des alcanes.

Mots clés : pollution, hydrocarbures pétroliers, bioremédiation, mutation, les ultraviolets.

Abstrat

Due to their persistence and genotoxicity, petroleum hydrocarbons present a major environmental problem. Several techniques have been identified to fight against this pollution, among these techniques, la bioremediation which is based on the use of microorganisms to transform these compounds into less dangerous or not dangerous forms with less input of chemicals and energy. The Biodegradation of hydrocarbons has been extensively studied and many microbial strains have been isolated due to their ability to metabolize hydrocarbons with varying degradation rates. They are able to degrade petroleum hydrocarbons using them as the sole sources of carbon and energy. Genetic improvement by mutagenesis via ultraviolet ray of degrading strains of hydrocarbons has reported mutants with a greater capacity for degradation of petroleum and diesel . The Bioremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons under different conditions has been carried out using mainly Gram negative bacteria such as *Pseudomonas*, which is the most promising genus of bacteria in this field. The ability of *Pseudomonas sp.* to use hydrocarbons has been explained by the production of lipid biosurfactants for the degradation of alkanes.

Key words : Pollution, petroleum hydrocarbons , bioremediation, , mutation, Ultraviolet .

ملخص

نظرا لاستمراريتها وسميتها الجينية تمثل الهيدروكاربونات البترولية مشكلة بيئية رئيسية. تم تحديد العديد من التقنيات لمكافحة هذا التلوث ومن بين هذه التقنيات المعالجة البيولوجية التي تعتمد على استخدام الكائنات الحية الدقيقة لتحويل هذه المركبات الى أشكال أقل خطورة او ليست خطيرة مع مدخلات أقل للمواد الكيميائية والطاقة.

تمت دراسة التحلل الحيوي للهيدروكاربونات على نطاق واسع وتم عزل العديد من السلالات الميكروبية نظرا لقدرتها على استقلاب الهيدروكاربونات بمعدلات تحلل متفاوتة وهي قادرة على تحلل الهيدروكاربونات باستخدامها كمصدر وحيد للكربون والطاقة. أبلغ التحسين الجيني عن طريق الطفرات عبر الأشعة فوق البنفسجية لسلالات الهيدروكاربونات المتدهورة عن وجود طفرات ذات قدرة أكبر على تحلل البترول والديزل. المعالجة البيولوجية للترربة الملوثة بالهيدروكاربونات البترولية في ظل ظروف مختلفة بإستخدام البكتيريا سالبة الجرام بشكل اساسي مثل *Pseudomonas*، و هو جنس البكتيريا الاكثر تحفيزا في هذا المجال. تم تفسير قدرة *Pseudomonas* على استخدام الهيدروكاربونات من خلال انتاج مواد حيوية ذهنية لتحلل الألكانات.

الكلمات المفتاحية: التلوث، الهيدروكاربونات البترولية، المعالجة البيولوجية، الطفرة، فوق البنفسجية.

Liste des abreviations

Les PCDD : Les polychlorodibenzo-dioxines

Les PCDF : Les poly-chlorodibenzo-furanes

Les PCB : Polychlorobiphényles

HP : hydrocarbure pétrolier

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique

Les BTEX : Benzène, Toluène, Ethylène et Xylène

MES : Matières en suspension

TID : transfert interfacial direct

UV : Ultra-Violet

ADN : Acide désoxyribonucléique

BU : Le bromo-uracile

EMS : L'éthyl-méthane sulfonate

ARNr 16S : l'ARN ribosomal 16S

Listes des tableaux

Tableau 1 : La composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers.....	6
Tableau 2 : Les différentes espèces microbiennes dégradant les hydrocarbures ...	17
Tableau 3 : Les différentes espèces fongiques dégradant les hydrocarbures.....	19

Liste des figures

Figure 1 : Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétrolier...5
Figure 2 : Ensemble des hydrocarbures présents dans les pétroles bruts.....8
Figure 3 : Devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol.....10
Figure 4 : Les émulsions formées par le pétrole.....12
Figure 5 : Dégradation des matières organique.....13
Figure 6 : Mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries.....21
Figure 7 : Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures...22
Figure 8 : Métabolisme du phénanthrène par différents espèces de champignons....25
Figure 9 : types de mutations ponctuelles30
Figure 10 : Action des radiations comme les UV32

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Résumés	
Liste des abréviations.....	i
Liste des tableaux.....	ii
Liste des figures.....	ii
Introduction	1
 Chapitre 01 : La pollution	
1.Définition	2
2. Pollution de sol.....	2
2.1. Formes de pollution du sol	2
2.2. Les micropolluants de sol.....	2
 Chapitre 02 : Les hydrocarbures pétroliers	
1.Définition.....	5
2.Composition chimique.....	5
3.Classification	6
3.1.Les hydrocarbures saturés	6
3.2.Les hydrocarbures aromatiques.....	7
3.3.Les composés polaires	7
3.4.Les asphaltées	7
4. Propriétés physico-chimiques.....	8
4.1.Viscosité	9
4.2.Tension de vapeur.....	9
4.3.Densité.....	9
4.4.Solubilité	9
5. Toxicité des hydrocarbures pétroliers	9
6. Devenir des hydrocarbures pétroliers dans le sol	10
6.1.Evaporation.....	10
6.2.Solubilisation ou dissolution.....	11

6.3.Emulsification	11
6.4.Sédimentation.....	12
6.5.Photo-oxydation.....	12
6.6.Biodégradation.....	13

Chapitre 03 : La bioremédiation des sols pollués par les

hydrocarbures pétroliers

1. Définition.....	14
2. Principe de la biodégradation	14
3. Mécanismes de biodégradation	15
4. Microorganismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures.....	16
4.1. Les bactéries	17
4.2. Les champignons.....	19
5. Adaptation des micro-organismes aux sites pollués	20
6. Adaptation génétique des bactéries	20
7. Modes d'accession des hydrocarbures par la cellule bactérienne	21
7.1. Utilisation de la phase dissoute	21
7.2. Transfert interfacial direct (TID).....	21
7.3. L'accession interrassiale facilitée (émulsifiassions)	22
7.4. Transfert micellaire (Pseudo solubilisation)	22
8. Les voies biologiques de dégradation des hydrocarbures	23
8.1. Voies biologiques bactérienne aérobies	23
8.1.1. Biodégradation des hydrocarbures saturés	23
8.1.2. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques	23
8.2. Voies biologiques bactérienne anaérobies	24
8.2.1. Biodégradation des hydrocarbures saturés	24
8.2.2. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques	24
8.3. Voies biologiques fongiques.....	24
9. Facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures dans l'environnement	25
9.1. Structure et nature du milieu récepteur	26
9.2. Nature du polluant - Composition chimique des hydrocarbures	26
9.3. Facteurs microbiologiques.....	26
9.4. Facteurs environnementaux	26

9.4.1. Influence de la température.....	27
9.4.2. Influence de l'oxygène	27
9.4.3. Influence des éléments nutritifs.....	27
9.4.4. Effet de la salinité	27
9.4.5. Effet du pH	28
9.4.6. Effet des UV	28
10. Amélioration le pouvoir de biodégradation des microorganismes par mutagénèse	28
10.1. La mutagénèse.....	29
10.2. Mutations ponctuelles	29
10.3. Types de mutations ponctuelles	29
10.4. Les agents mutagènes	30
10.4.1. Les agents chimiques	30
10.4.2. Les agents physiques	31
10.5. L'amélioration le pouvoir de dégradation des hydrocarbures par mutagénèse	33
10.6. Amélioration de la biodégradation des hydrocarbures par <i>Pseudomonas sp.</i> Par mutation induite par les ultraviolets.....	34
Conclusion	36
Les références bibliographiques	37

INTRODUCTION

Les hydrocarbures posent un problème environnemental dans la mesure où ils ont des propriétés toxiques, cancérigènes, voire même tératogènes. L'hydrophobie, la persistance environnementale et la génotoxicité augmentent généralement avec leur poids moléculaire et donc avec le nombre de cycles aromatiques présents dans leurs molécules (**Bidaud , 1998**).

Le phénomène de pollution par les hydrocarbures a une importance de plus en plus grande sur les plans environnemental, sanitaire et économique. Cette pollution peut avoir un impact soit direct ou indirect, sur la santé humaine et l'équilibre des écosystèmes donc la qualité des sols peut également en être altérée (**Khelil-Radji, 2015**).

Pour lutter contre cette pollution plusieurs techniques ont été mises en évidence, l'une de ces techniques de décontamination économique et avantageuse des sols est la bioremédiation, celle-ci consiste en l'élimination de polluants par l'utilisation de microorganismes qui utilisent ces derniers comme source de carbone et d'énergie en les transformant en composés moins toxiques soit en les minéralisant complètement (**Acevedo et al., 2011**). Pour cela, les microorganismes indigènes sont stimulés à dégrader les hydrocarbures pétroliers ou bien des microorganismes déjà adaptés à la dégradation de ces composés sont introduit dans le sol.

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent affecter, positivement ou négativement, le métabolisme microbien. S'il est clair que les conditions environnementales vont directement affecter les caractéristiques intrinsèques des hydrocarbures pétroliers, le même constat peut être fait en ce qui concerne leur biodégradabilité par les communautés microbiennes de ces milieux. Parmi ces facteurs on distingue la température, l'oxygène, les éléments nutritifs, la salinité, le pH, l'humidité et surtout les rayons ultraviolets qui font des interactions avec l'ADN bactérienne pour améliorer la capacité des microorganismes à s'adapter à la dégradation des hydrocarbures pétroliers (**Hassaine, 2016**).

Le présent travail est un support bibliographique qui se subdivise en trois parties :

- La première partie consiste à des données relatives aux hydrocarbures pétroliers (nature, propriétés, classification, toxicité et devenir).
- La deuxième partie présente la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers
- La troisième partie explique la possibilité d'amélioration génétique par mutagenèse via les rayons ultraviolets, de souches dégradantes des hydrocarbures.

LA POLLUTION

1. Définition

La pollution est une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les modalités de répartition des flux d'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physicochimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes (**Roger et Jacq, 2000**).

Ces modifications peuvent affecter l'homme directement ou au travers des ressources en produits agricoles, en eau et autres produits biologiques. Elles peuvent aussi l'affecter en altérant les objets physiques qu'il détient, les possibilités créatrices du milieu ou encore en enlaidissant la nature (**Fréjaville, 2009**).

2. Pollution de sol

« La pollution du sol correspond à l'accumulation de composés toxiques : produits chimiques, sels, matières radioactives ou agents pathogènes qui, tous, ont des effets nocifs sur les organismes vivants, pouvant être absorbée par voie foliaire ou racinaire chez les plantes, par inhalation, ingestion ou contact chez les animaux » (**Hateb et al., 2012**).

2.1. Formes de pollution du sol

On distingue deux types de pollution des sols :

- **Les pollutions ponctuelles** : dépôt ou épandage de polluants sur une surface restreinte, que l'on peut assimiler à une source
- **Les pollutions diffuses** : épandage ou retombée de polluants sur une grande surface

Pour chacun de ces types, on distingue deux origines de pollution :

- Les pollutions accidentelles : (déversement ou dépôt ponctuel de polluant) ou une grande quantité de polluant est déversée en fonction du temps.
- Les pollutions chroniques : (apport continu de contaminants par fuite ou lessivage), dont les effets cumulés peuvent être plus importants que ceux d'une pollution accidentelle (**Jeannot et al., 2000**).

2.2. Les micropolluants de sol

On distingue deux types de micropolluant de sol :

2.2.1. Micropolluants inorganiques

Ils sont accumulatifs et toxiques quand ils sont présents en grande quantité (**Benahmed, 2017**), ces composés peuvent se classer en deux catégories, les micropolluants minéraux métalliques et non métalliques les plus rencontrés sont : le cadmium, le chrome, le cuivre, le mercure, le nickel, le plomb, le sélénium, le zinc, l'arsenic, le molybdène, le cobalt, le bore et le thallium (**Mersch et al., 1993**).

Ils sont présents naturellement à des concentrations basses dans les sols mais l'altération de la roche mère du sous-sol et les activités anthropiques peuvent conduire à une augmentation de ces concentrations naturelles (**Malayri, 1995**).

2.2.2. Micropolluants organiques

Ce sont des composés organiques possédants principalement du carbone, de l'hydrogène et d'autres éléments appelés hétéroatomes : oxygène, azote, soufre, phosphore, chlore (**Jullien, 1997**), ils proviennent de trois ensembles d'activités : industrielles (production d'énergie, métallurgie, industries chimiques...), urbains (transport, traitement des déchets,...) et agricoles (utilisation de produits phytosanitaires) (**Brillas et al., 2009**).

Exemples :

- **Les polychlorodibenzo-dioxines et poly-chlorodibenzo-furanes**

Les PCDD et les PCDF ce sont des micropolluants organiques produits par des phénomènes thermiques principalement à partir de produit organiques chlorés, par exemple, lors de l'incinération de déchets ou de résidus organiques et de la combustion d'essences plombées utilisant des déccassant chlorés (**Saint-Denis et Sycotom, 1909**).

« Des PCDD et PCDF sont aussi formé au cour de blanchissement du papier par chloration ou de la synthèse de composés organiques avec des impuretés à base de chlorophénols. D'autre source d'émission sont les fonderies et les installation sidérurgique » (**Barriuso et al., 1996**).

- **Polychlorobiphényles**

Les PCB ce sont des substances chlorées très stables et insolubles dans l'eau, largement utilisées dans la production des condensateurs, transformateurs, fluides hydrauliques, lubrifiants, dans les peintures, les vernis, les encres et les papiers autocopiants. Ils peuvent être dégradés à haute température (1200°C), leur combustion peut générer des dioxines et des furanes, des substances cancérigènes et mutagènes (**De et al., 2004**). Les PCB sont des micropolluants dont les effets sont nuisibles sur l'environnement et les organismes vivants à partir de concentrations très faibles de l'ordre de la centaine de ppt au ppm (**Surchamp, 2016**).

- **Phénols et dérivés**

Les phénols sont des composés aromatiques hydroxylés comprenant le phénol et ses dérivés tels que les chlorophénols (mono-, di-, tri-, tétra-, penta), les nitrophenols, les crésols, les diméthylphénols ou xylols. Ils sont utilisés dans de nombreux procédés industriels comme la fabrication du papier, des

plastiques, des colorants ou du produit pharmaceutique et agrochimiques. Ils sont également présents dans les effluents de raffineries, de cokeries, de pétrochimie.

Les phénols proviennent également de la dégradation des insecticides organophosphorés et des herbicides chlorophénoxyacides ainsi que de transformation de composés organiques naturels comme les lignines, les tanins et les acides humique. Dans le group des chlorophénols, le pentachlorophénol est considéré comme un polluants prioritaire car il a été longtemps utilisé dans le traitement du bois (Lemière *et al.*, 2001).

- **Les pesticides**

Le terme pesticide est un mot latin. Il contient la racine anglaise « pest », qui signifie animal, insecte ou plante nuisible et le suffixe « cide » qui signifie tuer (Colin, 2000).

Il désigne donc toutes les substances chimiques naturelles ou de synthèse destinées à prévenir, contrôler, attirer, repousser, détruire ou combattre les différentes sortes d'agents nuisibles y compris tous les vecteurs de maladies humaines et animales. Ils regroupent ainsi un grand nombre de composés aux usages variés (insecticides, herbicides, fongicides...) et de familles chimiques très différentes (organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthriinoïdes ...).

Leur utilisation massive et incorrecte fait encourir des risques écologiques et sanitaires. Leurs résidus qui s'accumulent dans les tissus végétaux ou animaux, dans les eaux souterraines et de surface menacent la santé des humains et des animaux conduisant à des effets toxicologiques différents (Mairif, 2014).

- **Les hydrocarbures**

Les hydrocarbures sont parmi les polluants susceptibles qui impactent les sols, sont des polluants ubiquitaires. Ils sont hydrophobes dont la persistance dans les écosystèmes est principalement due à leur faible solubilité aqueuse et en raison de leurs potentialités toxiques, mutagènes et cancérigènes, certains d'entre eux sont considérés comme des substances dangereuses (Hassaine, 2016).

Les hydrocarbures sont des composés facilement analysables et stables représentent des biomarqueurs très utilisés pour élucider les sources de la matière organique, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts (Rouidi, 2014).

LES HYDROCARBURES
PETROLIER

1. Définition

Les hydrocarbures sont des composés organiques contenant exclusivement des atomes de carbones (C) et d'hydrogènes (H) (**Heider et al., 1998**).

D'après **Harayama et al., 1999**, le terme « hydrocarbure pétrolier » (HP) est un terme générique qui désigne les mélanges de composés organiques présents dans des matières géologiques comme l'huile, le bitume et le charbon ou dérivés de ces matières.

2. Composition chimique

« Les hydrocarbures pétroliers contiennent principalement des molécules composées d'atomes de carbone et d'hydrogène. Il s'agit d'alcane non cycliques (ou paraffines), des cycloalcanes (ou naphènes), d'alcènes (ou oléfines) et d'hydrocarbures aromatiques.

D'autres constituants mineurs sont également présents dans les hydrocarbures pétroliers, comme des métaux et des composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre ou de l'oxygène. Les molécules polaires de faible masse moléculaire sont appelées des résines, les plus lourdes étant regroupées sous l'appellation d'asphaltée » (**Nicolas et al., 2015**).

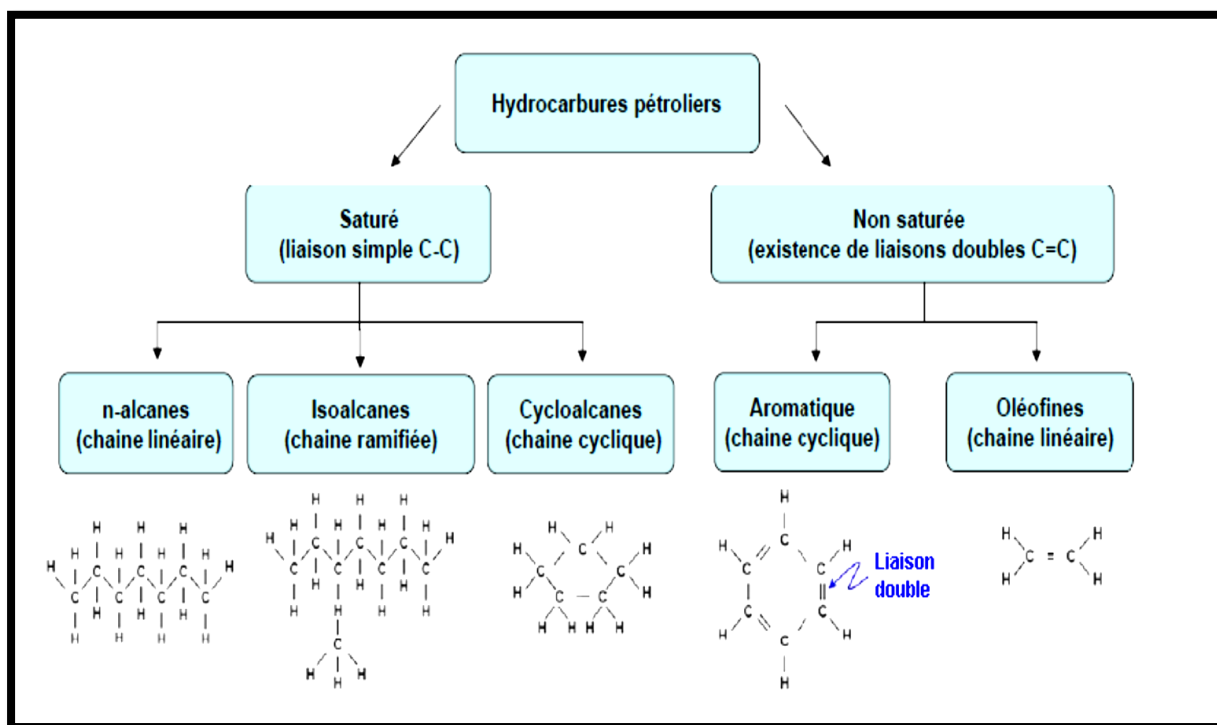


Figure 1: Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétrolier (**Colombano et collab, 2008**)

Tableau 1: La composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers (Speight, 2014) .

Éléments	Pourcentage
Carbone	83 à 87 %
Hydrogène	10 à 14 %
Azote	0 ,1 à 2 %
Oxygène	0,05 à 6,0 %
Soufre	0,05 à 6,0 %
Métaux	< 0 ,1 %

3. Classification

Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Ces hydrocarbures peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon leur origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et poly aromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %) (Syakti, 2004) (Figure 2).

3.1 . Les hydrocarbures saturés

Parmi lesquels, on distingue :

- **Alcanes linéaires**

Les alcanes linéaires (*n*-alcanes, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone, constituent l'une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier) (Guermouche m'rassi, 2014).

- **Alcanes ramifiés**

Les plus abondants sont les iso-alcanes (groupement méthyle en position 2), les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou poly ramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple: pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut dans des proportions sensiblement égales à celles des *n*-alcanes (Guermouche m'rassi, 2014).

• Cyclo alcanes

Les cyclo alcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels que les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (**Guermouche m'rassi, 2014**).

3.2. Les hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et poly aromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques, les cycles aromatiques peuvent être agencés de manière linéaire (anthracène), angulaire (phénanthrène) ou groupe (pyrène). Au sens strict, ils ne contiennent donc que des atomes de carbone et d'hydrogène (**seo et al., 2009**).

Les HAP se subdivisent en deux groupes : les légers, dont la masse molaire est comprise entre 150 et 180 g.mol⁻¹ (HAP de moins de quatre cycles) et les lourds (au moins quatre cycles) ; dont les masses molaires varient de 200 à 280 g.mol⁻¹ (**Samanta et al., 2002**). En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (**Soltani, 2004**).

3.3. Les composés polaires

« Cette fraction correspond à des molécules hétérocycliques, telles que :

- Les composés oxygénés : phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes,...
- Les composés soufrés : mercaptans, sulfures, disulfures,...
- Les composés azotés : pyridines, quinoléines » (**Colombano et al., 2014**).

3.4. Les asphaltènes

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. La structure de ces composés est mal connue du fait, d'une part de leur composition chimique complexe (à base de cycles aromatiques condensés, de naphthéo-aromatiques, de ramifications et d'hétéroatomes (O, N, S), et d'autre part de méthodes analytiques difficilement utilisables (**Lefebvre, 1987**).

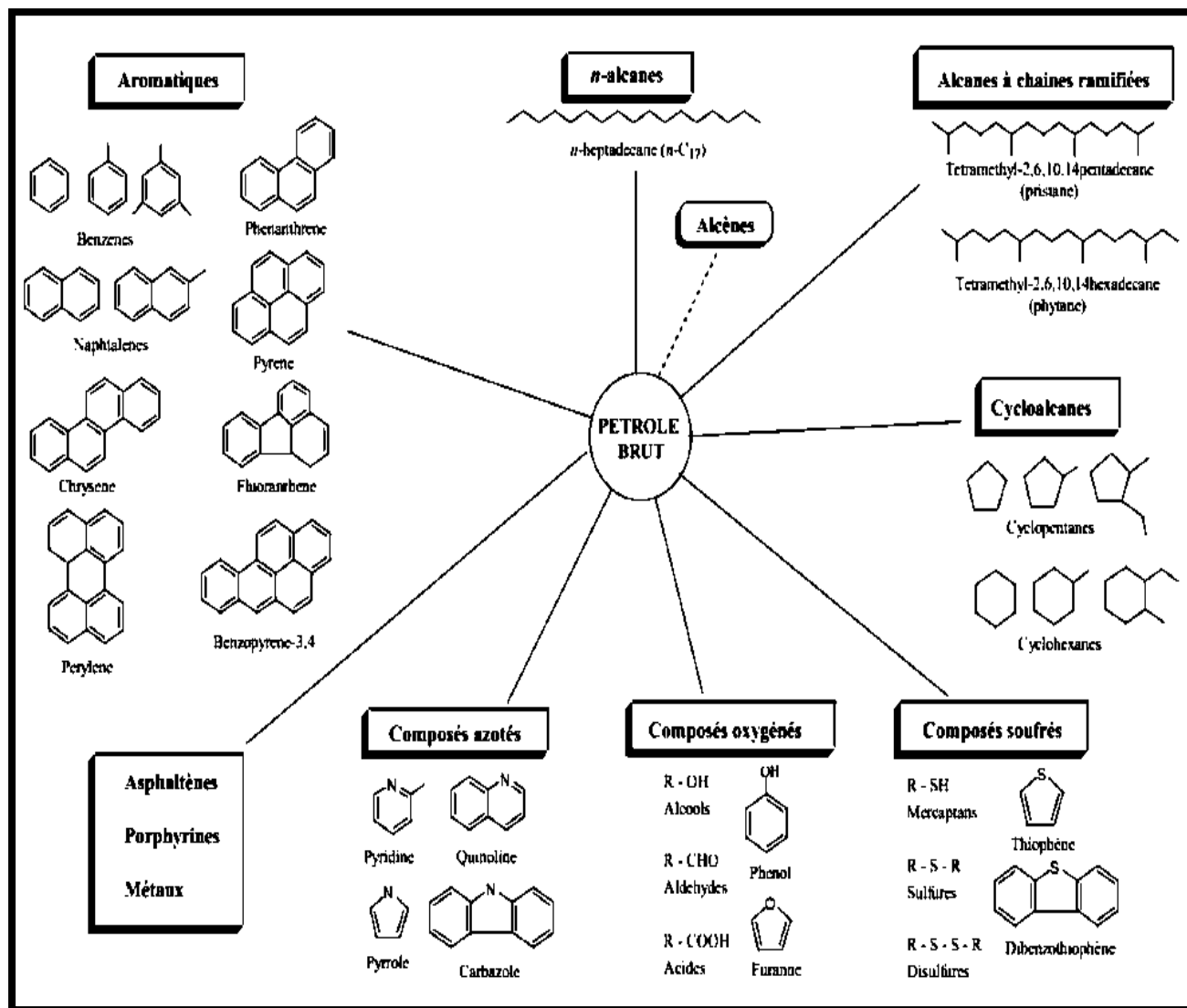


Figure 2 : Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut (Soltani, 2004).

4. Propriétés physico-chimiques

Les hydrocarbures pétroliers sont des composés organiques qualifiés de peu volatiles, apolaires et hydrophobes. Leur solubilité dans l'eau est faible à très faible et leur pression de vapeur, de faible à modérément élevée. Leur coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}) est relativement élevé, ce qui représente un important potentiel d'adsorption sur le sol et sur les matières particulaires (Johnsen *et al.*, 2005).

Leur propriétés physico-chimiques les rendent récalcitrants à la dégradation naturelle, et donc persistants sur les sites contaminés. Leur structure moléculaire varie et influence sur les propriétés de ces hydrocarbures. Les propriétés physiques des hydrocarbures responsables de son comportement dans l'environnement sont : la viscosité, tension superficielle, la densité et la solubilité (Hassaine, 2016).

4.1. Viscosité

La viscosité est définie comme étant la mesure de la résistance d'un fluide. Elle est influencée par la température et agit directement sur le processus d'évaporation des hydrocarbures. En effet, plus la température est élevée, plus la viscosité est basse et plus les hydrocarbures pétroliers ont tendance à s'évaporer ou à se propager rapidement au niveau du sol (**Nicolas *et al.*, 2015**).

4.2. Tension de vapeur

La tension de vapeur contrôle le taux d'évaporation et la concentration dans l'air des hydrocarbures, généralement citée en pression de vapeur Reid mesurée à 37,8 °C. Dans la plupart des conditions, une pression de vapeur supérieure à 3 kPa (kilo-pascal) (23 mm Hg) est requise pour que l'évaporation se produise (**Hassaine, 2016**).

4.3 . Densité

Elle correspond à la masse par unité de volume. La densité est utilisée pour distinguer les hydrocarbures pétroliers (HP) légers et lourds. La densité tend à diminuer lors des processus d'altération des hydrocarbures, en particulier dans des situations suivantes : évaporation des fractions plus légères, augmentation de la température ou interaction avec les particules du sol (**Radovic *et al.*, 2012**).

4.4. Solubilité

C'est la capacité d'une substance à se dissoudre dans une autre substance. Les hydrocarbures pétroliers les plus solubles sont essentiellement les hydrocarbures légers.

Plus la proportion d'hydrocarbures légers sera importante, plus la solubilité du produit pétrolier dans l'eau sera significative. La solubilité des HP est considérée par certains auteurs comme étant un facteur important à leur biodisponibilité face aux attaques microbiennes (**Grimberg *et al.*, 1996**).

5. Toxicité des hydrocarbures pétroliers

La toxicité peut être définie comme l'ensemble des effets négatifs sur les organismes causés par leur exposition à une substance ou un produit chimique (**Dupuis et Ucan-Marin, 2015**).

Les hydrocarbures constituent une classe des produits chimiques organiques dangereux dont certains de leurs effets toxiques sont reconnus comme fortement cancérigènes, écotoxiques, immunologique, mutagénique ou tératogénie (**Wang *et al.*, 2000**).

La toxicité des hydrocarbures pétroliers est en fonction de leur persistance, de leur biodisponibilité et de leur cinétique de pénétration dans l'organisme. Elle dépend aussi des capacités des organismes à les bio accumuler et à les métaboliser (**Dupuis et Ucan-Marin, 2015**).

En terme de toxicité intrinsèque, il est généralement admis que, les composés aromatiques sont plus toxiques que les composés aliphatiques, (**Harayama et al., 1999**). Parce que les composés de faible poids moléculaire sont plus volatils que ceux ayant un poids moléculaire élevé. Ces derniers ont l'avantage d'affinités pour le carbone organique des sédiments et les lipides des cellules (**Benchouk, 2017**).

6. Devenir des hydrocarbures pétroliers dans le sol

À la suite d'un déversement des hydrocarbures au niveau du sol, ceux-ci ont soumis différents processus d'altération physique, chimique et biologique qui vont déterminer leur devenir dans le milieu. Ceci étant, il n'est pas toujours évident de prédire avec certitude le comportement d'un polluant au niveau du sol, car celui-ci est un grand système dynamique, complexe, hétérogène et évolutif dans le temps (**figure 3**).

Ce dynamisme vivant, le plus souvent caractérisé par des phénomènes abiotiques (évaporation, etc.) et biotiques (biodégradation, etc.) (**Fingas, 2012**), dépendent beaucoup des propriétés intrinsèques : la structure moléculaire, la pression de vapeur, la taille des particules et le spectre d'adsorption (ultraviolet et visible), ainsi que les capacités d'adsorption sur les solides et l'effet éventuel d'agents dispersants (**Benchouk, 2017**). Parmi les différentes altérations que peut subir un hydrocarbure, on cite les facteurs environnementaux suivant :

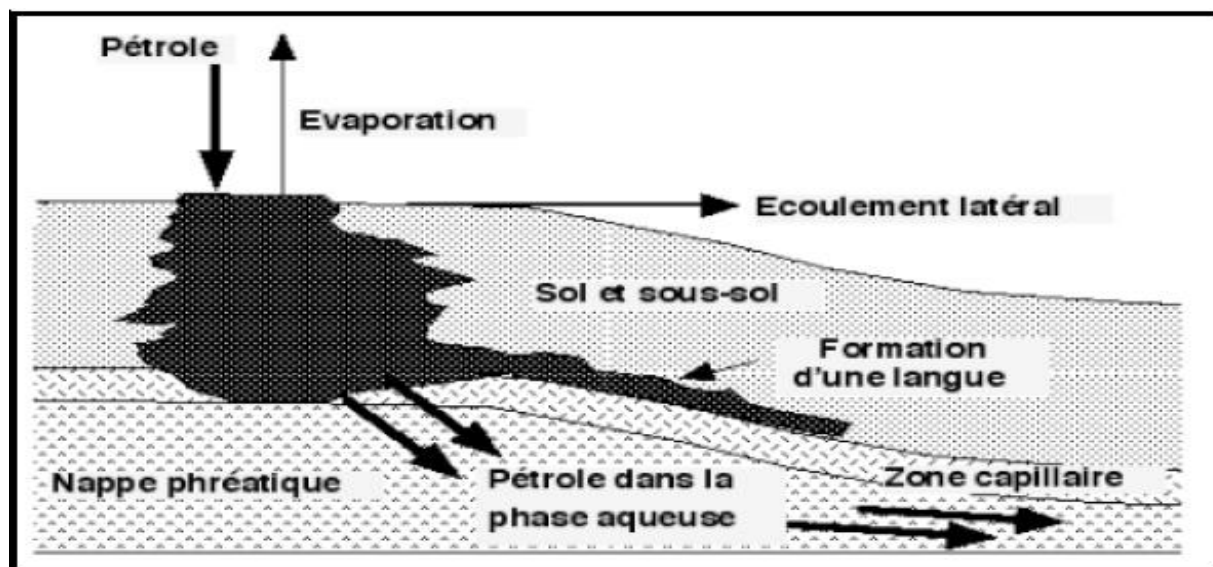


Figure 3: Devenir d'une pollution pétrolière à la surface du sol (**Roger et Jacq, 2000**) .

6.1. Evaporation

L'évaporation est un processus qui débute immédiatement après un déversement d'hydrocarbures et peut se poursuivre pendant quelques jours. Elle correspond au transfert des

composés volatils plus légers, comme les aliphatiques, les BTEX et les HAP de faible masse moléculaire, vers l'atmosphère (Neff et collab, 2000). Cette perte des composés volatils entraîne la modification de certaines propriétés physiques des hydrocarbures, telles que la densité et la viscosité. Les principaux facteurs qui influent sur le processus d'évaporation sont la volatilité des composés présents et les conditions atmosphériques, telles que la température du milieu, la présence de vent ou de soleil.

De façon générale, lors de déversements d'hydrocarbures pétroliers, l'évaporation est le processus qui induit la plus grande perte de masse pour les hydrocarbures légers. Ainsi, quelques jours après un déversement, les pétroles bruts légers peuvent perdre jusqu'à 75 % de leur volume initial et les bruts moyens, jusqu'à 40 %. En revanche, les hydrocarbures lourds ne perdent pas plus de 10 % de leur volume dans les premiers jours suivant un déversement (Fingas, 2012).

6.2. Solubilisation ou dissolution

La solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible. un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée. Il est importante noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement. Ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore (Soltani, 2004).

6.3. Emulsification

C'est le mélange de deux fractions non miscibles : l'eau et le pétrole. Deux types d'émulsions peuvent se former : eau dans l'huile appelée "mousse Chocolat" et huile dans l'eau. Les émulsions eau dans l'huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages (Soltani, 2004). Leur formation et leur stabilisation dépendent essentiellement de la composition chimique du pétrole et en particulier d'une teneur élevée en composés polaires, en résines et en asphaltées. Elles sont très stables, leur dégradation est alors considérablement ralentie et elles sont extrêmement dommageables pour les zones côtières qui sont impactées.

Les émulsions huile dans eau, quant à elles facilitent l'élimination des hydrocarbures, leur formation est favorisée par la présence de substances tensioactives naturelles. Parallèlement, la biodégradation s'accompagne d'une production de substances émulsifiantes (biosurfactants) qui vont favoriser la dispersion/dissolution (Rouidi, 2014).

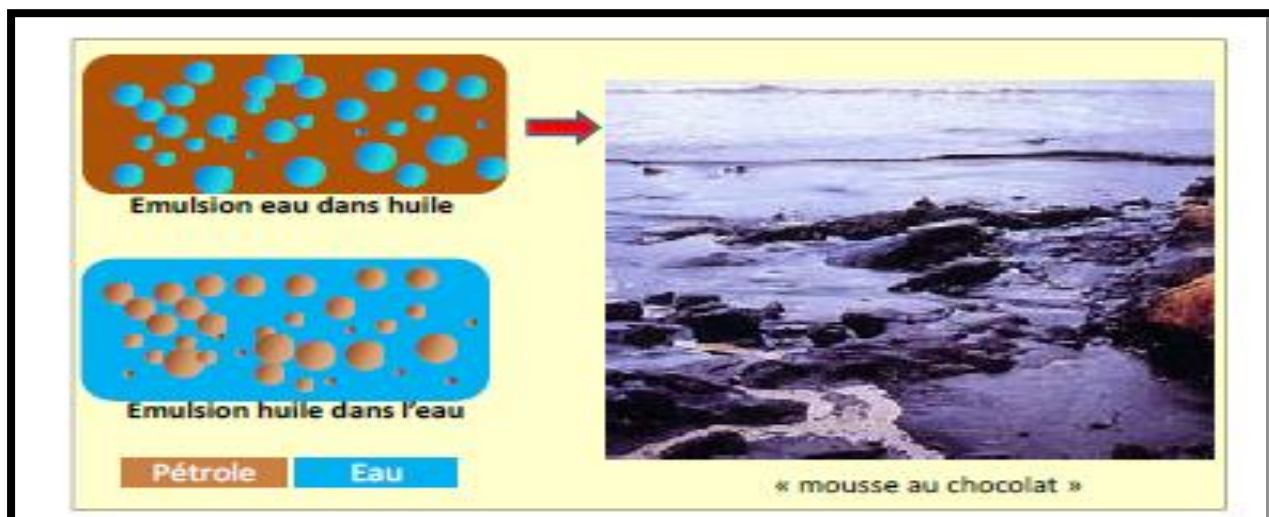


Figure 4: Les émulsions formées par le pétrole (Rouidi, 2014).

6.4. Sédimentation

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Les gouttelettes d'hydrocarbures dispersées peuvent interagir naturellement avec les matières en suspension (MES) présentes dans la colonne d'eau, tels que les minéraux argileux ou la matière organique, pour former des agrégats hydrocarbures-MES (Gong *et al.*, 2014).

La formation d'agrégats hydrocarbures-MES est due à des interactions de charges électriques (ponts cationiques) entre les surfaces des particules et les composés polaires des hydrocarbures (Bandara *et al.*, 2011).

Ce phénomène est d'ailleurs capital en termes d'exportation de la surface vers le fond, notamment en eau océanique profonde (Dachs *et al.*, 2002). La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradables par voie naturelle (Soltani, 2004).

6.5. Photo-oxydation

La photo-oxydation, ou oxydation photochimique, est un processus d'altération des hydrocarbures qui est modulé par différents facteurs, notamment le spectre et l'intensité lumineuse du rayonnement solaire, la composition chimique des hydrocarbures déversés. Sous l'action du rayonnement solaire, essentiellement les rayons UV, certains composés peuvent être oxydés. Les composés produits sont alors plus solubles que les composés initiaux et peuvent être plus toxiques. Les composés saturés ne sont pas affectés, mais la majorité des composés aromatiques sont convertis en résines ou en molécules polaires (Prince *et al.*, 2003). Par ailleurs, plus les composés aromatiques sont alkyles, plus ils sont sujets à la photo oxydation parce que les alkyles augmentent la sensibilité des composés aromatiques à l'oxydation photochimique (Garrett *et al.*, 1998).

6.6. Biodégradation

La biodégradation correspond à la décomposition de polluants organiques par des micro-organismes (bactéries, champignons ou algues). Les polluants sont convertis en dioxyde de carbones (lorsque les biodégradations est totale), en eau et en énergie pour construire de la biomasse (Rivière, 1998). (Figure 5).

Les hydrocarbures pétrolières sont des polluants organiques qui sont soumis à la biodégradation dès que les micro-organismes capables de les utiliser se sont développés (Noel, 2014).

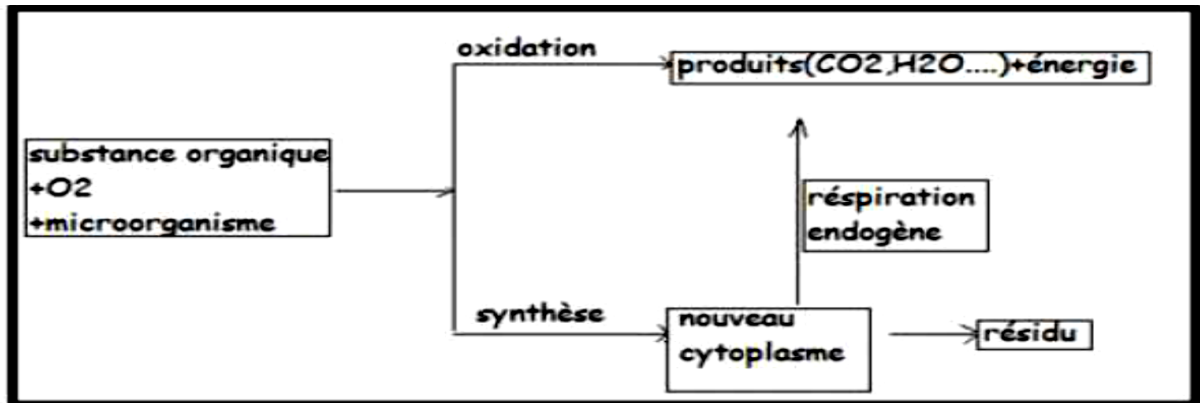


Figure 5: Dégradation des matières organique (Hongwei *et al.*, 2002).

**LA BIOREMEDIATION DES SOLS
POLLUES PAR LES
HYDROCARBURES PETROLIERS**

1. Définition

Le terme de bioremédiation est composé de ‘‘Bios’’ qui signifie la vie et se réfère aux organismes vivants et ‘‘remédier’’ qui signifie résoudre un problème (**Sardrood et al., 2013**).

C’est un ensemble des techniques biologiques qui basé sur utilisation des microorganismes (bactéries et /ou champignons) pour dégrader les contaminants. Ces organismes peuvent être déjà présents dans la zone polluée (indigènes) ou ajoutés au milieu (exogène) (**Abdelly, 2006**). Il existe deux principales méthodes de la bioremédiation: la bioaugmentation et la biostimulation.

➤ Bioaugmentation

C’est une méthode de traitement insitu, qui consiste àensemencer des souches spécifiques de microorganismes exogènes dans le sol afin d’optimiser l’activité microbienne indigène responsable de la biodégradation des polluants organiques. Les microorganismes peuvent être naturels ou génétiquement modifiés. Cette méthode, bien que souvent efficace, peut toutefois conduire au déclin de la population introduite par des réactions de compétitivité avec la microflore indigène ou par défaut d’acclimatation avec le milieu récepteur. Alors, l’autre solution consiste donc à prélever des microorganismes indigènes aptes à dégrader le polluant organique, d’en faire une culture de souche microbienne afin de les réinjecter dans ce sol même (**Odokuma et Dickson, 2003**).

➤ Biostimulation

La biostimulation consiste à stimuler l’activité des populations microbiennes indigènes du sol par apport de nutriments et par ajustement des conditions de milieu (potentiel d’oxydoréduction, humidité ...). La forme la plus courante de biostimulation est l’addition d’éléments nutritif, principalement l’azote, le phosphore et le potassium nécessaires aux bactéries indigènes du sédiment du sol afin d’accélérer la dégradation des contaminants (**Miyasaka et al., 2006**).

2. Principe de la biodégradation

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l’environnement (**Soltani, 2004**). L’existence de ce phénomène dépend non seulement de la biodégradabilité intrinsèque du polluant mais aussi de la présence de microflore déprédatrices compétentes dans les sols (**Solano-Serena et al., 2001**).

On appelle biodégradation des hydrocarbures, l’ensemble des transformation des chaines carbonées par l’action des microorganismes appelés hydrocarbonoclastes. Ce processus de biodégradation est un phénomène complexe et largement dépendant des condition influant sur

l'activité bactérienne (**Eckford et al., 2002**), à savoir les conditions environnementales et la biodisponibilité des éléments nutritifs.

D'autre part la biodégradation est la transformation à l'aide des microorganismes d'un composé organique métabolisable sous une autre forme plus simple, qui peut être moins toxique que le composé d'origine (biotransformation) et aboutit à un produit final qui est le dioxyde de carbone et l'eau (minéralisation) (**Kumar et Gopal, 2015**).

3. Mécanismes de biodégradation

La biodégradation est l'ensemble des mécanismes de transformation d'un contaminants en différents sous produit par l'action des microorganismes. Ce phénomène peut s'effectuer à n'importe quel milieu (sol, eau) ainsi que dans différentes phases du polluants (liquide, solide, gazeuse) (**Lecomte, 1995**).

La biotransformation d'une molécule de polluant peut faire intervenir un ou plusieurs processus simultanément ou successivement et conduire à la formation de différents produits issus du métabolisme d'un ou plusieurs microorganismes. L'amplitude de la transformation dépend de différents facteurs biotiques et abiotiques, comme la température, l'humidité, le pH, la pression partielle d'oxygène dans le sol, la concentration en polluant(**Hassaine, 2016**).

Les hydrocarbures sont des molécules inertes du point de vue chimique et doivent être activés par les bactéries tant en conditions oxygène qu'anoxique. Une grande variété de micro-organismes présente la capacité de dégrader les hydrocarbures. Ils sont qualifiés d'« hydrocarbonoclastes » (**Berthe-Corti et Höpner, 2005**).

Les réactions initiales de transformation des hydrocarbures font intervenir une grande diversité d'enzymes spécifiques des bactéries hydrocarbonoclastes. Ces enzymes sont codées par différents gènes dont la localisation, l'organisation et la régulation apparaissent également diversifiées (**Wang et al., 2010**).

Les principaux processus de biotransformation sont la minéralisation et le co-métabolisme.

3.1. Minéralisation

La minéralisation est une forme de biodégradation complète des produits aboutissant à la production d'énergie et de carbone au travers d'une série de réaction complexe d'oxydoréduction. Dans ce cas les substances impliquées sont considérées comme des source de croissance primaires, puisqu'elles sont directement impliquées dans la croissance bactérienne . Au cours de ce procédé biologique, les électrons subissent des transferts par addition ou retrait au niveau d'intermédiaires tout au long de la chaîne de réaction (**Guermouche M'rassi, 2014**).

3.2. Co-métabolisme

Les hydrocarbures sont biodégradés soit directement en servant de source de carbone, soit indirectement par co-métabolisme (**Hazen, 2010**).

Le co-métabolisme correspond à la dégradation biologique d'un composé, par une enzyme produite de manière fortuite. Cette enzyme catalyse normalement un autre substrat, mais elle peut présenter une certaine non-spécificité de substrat. Par principe, le phénomène de co-métabolisme ne bénéficie pas aux microorganismes produisant l'enzyme. Le polluant ne sert pas de source principale de carbone ou d'énergie, le microorganisme a besoin d'une source primaire de substrat, et le polluant est considéré comme un substrat secondaire. Ainsi, les produits de dégradation liés au co-métabolisme ne stimulent pas la croissance bactérienne des populations concernées. En culture bactérienne pure, le produit du co-métabolisme est généralement stocké et n'est pas entièrement minéralisé. Tant que le métabolite n'est pas toxique, la transformation du substrat peut continuer. Dans le cas d'un consortium microbien, il peut exister une forme de commensalisme, où une première espèce dégrade un substrat. Le métabolite produit n'étant pas utilisé par la bactérie, cette source d'énergie peut servir à une seconde espèce comme un champignon (**Bouchez et al., 1999**). Un exemple d'alcane co-métabolisé est le cyclohexane dégradé par *Mycobacterium austroafricanum* en présence d'isooctane (**Guermouche M'rassi, 2014**).

Les HAP de faible poids moléculaire peuvent être entièrement biodégradés, en revanche, les HAP de haut poids moléculaire, c'est-à-dire comportant plus de cycles, ne sont pas dégradés directement. Leur biodégradation nécessite l'intervention d'un cortège de microorganismes (**Chen et Aitken, 1999**), ainsi que la présence d'une source de carbone supplémentaire : cette dégradation se ferait par co-métabolisme (**Heitkamp et al., 1988**).

4. Microorganismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures.

De nombreux microorganismes ont la capacité de métaboliser les polluants organiques comme les hydrocarbures, pour les transformer en constituants cellulaires (**Dash et al., 2013**). Les microorganismes, qui ont la faculté de métaboliser les hydrocarbures pétroliers sont essentiellement des bactéries et des champignons et sont les acteurs principaux de la biodégradation environnementale (**Leahy et Colwell, 1990**).

La biodégradation exploite la diversité génétique et le caractère versatile du métabolisme des micro-organismes pour la transformation des contaminants en produits moins dangereux, qui sont ensuite intégrés dans les cycles géochimiques naturels. Elle tient compte du potentiel métabolique des micro-organismes existants par l'utilisation de nouvelles fonctions cataboliques issues soit de la sélection, soit de l'introduction de gènes codant pour ces fonctions (**Van der Meer et al., 1992**).

Les microorganismes dégradants les hydrocarbures sont communément appelés hydrocarbonoclastes. Ils représentent moins de 0,1% de la communauté microbienne indigène en milieu non pollué, mais peuvent représenter près de 100% dans les milieux pollués par des déversements d'hydrocarbures, que ces déversements soient d'origine naturelle ou anthropique (Atlas, 1981 ; Si-Zhong *et al.*, 2009) .

4.1. Les bactéries

Les bactéries sont la classe des microorganismes activement impliqués dans la dégradation des hydrocarbures des sites contaminés. Cette dégradation résulte de voies métaboliques qui mettent en jeu des populations microbiennes spécifiques ou des capacités métaboliques combinées concernant différentes communautés microbiennes (Marchand *et al.*, 1994).

Lorsque l'on nomme les bactéries capables de dégrader les hydrocarbures, presque tous les clades phylogénétiques sont représentés. Aussi, on retrouve aussi bien des bactéries Gram négatives que des bactéries Gram positives (Técher, 2011).

On peut y retrouver tous les types de bactéries, des autochtones, des hétérotrophes, des aérobies ; des anaérobies ; des mésophiles ; des psychrophiles et des thermophiles (Gabet, 2004). De nombreux genres bactériens ont été recensés et décrits comme aptes à dégrader des hydrocarbures, parmi ces genres bactériens les plus souvent rencontrés : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Actinomycètes* et *Nocardia* (Fardeau *et al.*, 1994), et dans chaque genre mentionné précédemment, il existe différentes espèces microbiennes qui dégradent différents types d'hydrocarbure (Tableau 2).

Tableau 2 : Les différentes espèces microbiennes dégradant les hydrocarbures (Champagnat et Adria, 1974).

Genre	Espèces	Hydrocarbures
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	Nitrochlorobenzène
	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Nitrobenzène
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Octane
	<i>Pseudomonas testosteroni</i>	Hexadécane
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Naphtalène
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4-Nitrobenzène

Suite du tableau 2 :

Genre	Espèces	Hydrocarbures
<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus sp.</i>	3-Nitrochlorobenzène 4- Nitrochlorobenzène 1,3-Dinitrobenzène Benzène
<i>Mycobacterium</i>	<i>Mycobacterium vaccae</i> <i>Mycobacterium</i>	2,4,6-Trinitrotoluène Toluène, chlorobenzène, benzène et éthylbenzène
<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter sp.</i>	Hydrocarbures aromatiques et hydrocarbures aliphatiques
<i>Comamonas</i>	<i>Comamonas testosteroni</i> <i>Comamonas acidovorans</i>	n-alcane Naphtalène n-alcane
<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrosomonas europae</i>	Phénantrène, anthracène
<i>Methylosinus</i>	<i>Methylosinus trichosporium</i> <i>OB3b</i>	Nitrobenzène et naphtalène Alcane chloré Methane, ethane, ethène Trichloroéthylène
<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>	1,4-Dichlorobenzène 1,3-Dichlorobenzène
<i>Xanthomonas</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	N-alcane
<i>Cycloclasticus</i>	<i>Cycloclasticus oligotrophus RB1</i>	HAP

Parmi les caractéristiques des bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures on cite les suivantes :

- Apte à se reproduire rapidement suite à un entreposage de longue durée.
- Apte à biodégrader une vaste étendue de polluants pétroliers.
- Activité enzymatique et croissance des bactéries dans des conditions environnementales optimum.
- Aucun effet secondaire néfaste et produits finaux non toxiques.
- 63% pigmentés (orange, jaune et rouge).
- La majorité des souches bâtonnées Gram négatives.
- 32% des bactéries motiles ou mobiles.
- 20% des bactéries à Gram positives, filamenteux (**Khelil-Radji, 2015**).

4.2. Les champignons

De nombreuses études ont démontré l'utilité et l'efficacité des champignons pour la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures (**Bogan et al., 1999**). Parmi ces champignons les genres : *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Talaromyces*, *Graphium*, *Candida*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Penicillium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Pleurotus*, *Cycloclasticus*, *Eupenicillium*, *Emericella*, *Phanerochaete*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* et *Trichoderma* (**Chaillan et al., 2004**) et dans chacun de ces genres, il existe différentes espèces qui dégradent différents types d'hydrocarbure (**Tableau 3**).

Tableau 3: Les différentes espèces fongiques dégradant les hydrocarbures (**Champagnat et Adria, 1974**).

Genre	Espèce	Hydrocarbures
<i>Phanerochaete</i>	<i>Phanerochaete sordida</i>	HAP
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	HAP, creosote Phenanthrène Benzo[A]Pyrène
<i>Pleurotus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>	HAP
<i>Trametes</i>	<i>Trametes versicolor</i>	Benzo[a]pyrène, Anthracène

Suite du tableau 3 :

Genre	Espèce	Hydrocarbures
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavipes</i>	HA, asphltène, résines
<i>Penicillium</i>	<i>Penicellium javanicum</i>	HA, asphltène, résines
<i>Graphium</i>	<i>Graphium putredinis</i>	HA, asphltène, résines
<i>Eupenicillium</i>	<i>Eupinecillium javanicum</i>	HA, asphltène, résines
<i>Emericella</i>	<i>Emericella nidulans</i>	HA, asphltène, résines

Les avantages principales des champignons par rapport aux bactéries sont leur capacité à se propager dans les sols grâce à leur mycélium et à produire des enzymes extracellulaires par exemple des oxydases à large spécificité de substrats qui permettent un meilleur contact avec les hydrocarbures (Singh, 2006).

5. Adaptation des micro-organismes aux sites pollués

Dans les sites pollués aux hydrocarbures depuis longtemps, il a été mis en évidence que les micro-organismes présentent la capacité de s'adapter à la présence des polluants, leur sensibilité vis à vis des composés organiques peut ainsi être diminuée de plusieurs ordres de grandeur (Klimkowicz et Maliszewska, 2003). De même la dégradation des hydrocarbures pétroliers dans un sol ayant déjà été exposé à ces molécules est plus rapide que dans un sol non précédemment exposé (Barriuso *et al.*, 1996).

6. Adaptation génétique des bactéries

Les microorganismes d'un sol non exposé à des composés contaminants ne possèdent pas forcément la capacité de les métaboliser. Cependant, lorsqu'ils sont exposés à de tels composés, ils sont souvent capables de s'adapter, c'est-à-dire d'acquérir le potentiel métabolique de dégradation de ces polluants par recrutement vertical ou horizontal de gènes spécifiques (Carmona et Díaz, 2005).

Le recrutement des voies métaboliques, présentes dans le génome mais non exprimées, peut se faire par des évènements de mutation ponctuelle, de réarrangement génétique ou de transposition (recrutement vertical) (Habe et Omori, 2003).

Les microorganismes peuvent aussi acquérir des clusters de gènes cataboliques *via* des éléments mobiles transférés d'un hôte donneur à un hôte receveur (transfert horizontal) (**Figure 6**). Chez les bactéries, les phénomènes de transferts les plus connus sont la conjugaison *via* des plasmides, la transformation ou la transduction (**Juhas *et al.*, 2009**).

Ces phénomènes de transferts horizontaux augmentent les capacités métaboliques des bactéries, notamment en élargissant leur gamme de substrats, et permettent l'adaptation des populations microbiennes à de nouveaux contaminants (**Van der Meer et Sentchilo, 2003**).

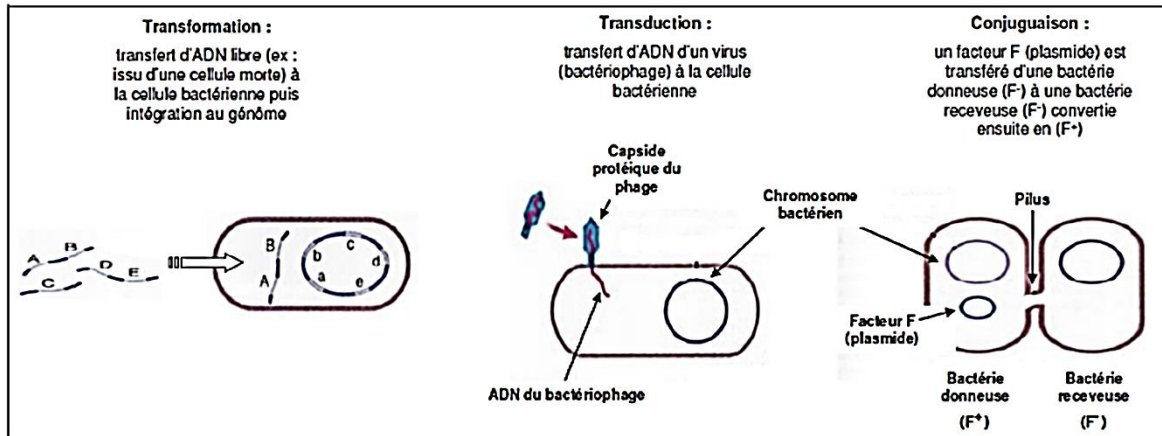


Figure 6 : Mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries (**Técher, 2011**).

7. Modes d'accès des hydrocarbures par la cellule bactérienne

Selon **Scott et Finnerty (1976)**, le mécanisme d'accès implique dans le transport des hydrocarbures à travers la paroi des microorganismes est mal élucidé bien que des gouttelettes d'hydrocarbures soient fréquemment observées dans la cellule. Ainsi, du fait de la faible solubilité de la plupart des hydrocarbures, le mécanisme d'accès par les microorganismes peut se faire selon quatre modes que l'on peut décrire comme suit :

7.1. Utilisation de la phase dissoute

L'assimilation en phase aqueuse est surtout rapportée pour des alcanes légers et certains hydrocarbures aromatiques suffisamment solubles. C'est sous forme solubilisée que le substrat pénètre dans la cellule (**Goswami et Singh, 1991**).

7.2. Transfert interfacial direct

Dans le cas de transfert interfacial direct TID, le microorganisme ne produit pas de biosurfactant mais va adhérer du fait de sa forte hydrophobicité à l'interface (phase hydrophobe/phase aqueuse). Ainsi, beaucoup de microorganismes dégradant les hydrocarbures ont des surfaces hydrophobes et

peuvent donc s'associer aux gouttelettes d'hydrocarbure ou même entrer dans la phase organique pendant la culture. Plusieurs chercheurs ont largement démontré que les changements étendus dans la composition des lipides de la membrane cellulaire peuvent se produire pendant la croissance sur des alcanes ; et peuvent dans certains cas, représenter le moyen d'augmenter l'association cellulaire avec la phase d'hydrocarbure. Un système actif de transport employé par *AcinetobacterHO1-N* cultivé sur n-hexadécane, où des gouttelettes d'hydrocarbure ont été en capsulées dans les microvésicules de la membrane finissant alors par pénétrer dans la cellule (**Ballerini et Vandecasteele, 1999**)

7.3. L'accession interrassiale facilitée (émulsifiassions)

Dans ce mécanisme, le transfert entre les hydrocarbures et le microorganisme s'effectue par contact direct, mais l'intervention de biosurfactants produit par le microorganisme accélère le transfert en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobes et hydrophiles. On parle de transfert interfacial assisté (**Khelil-Radji, 2015**).

7.4. Transfert micellaire (Pseudo solubilisation)

Il existe une formation d'une microémulsion suite à une pseudo solubilisation de l'hydrocarbure par des biosurfactants produits par le microorganisme (**Figure 7**). La micelle entre en contact avec la cellule. La surface externe de la micelle est majoritairement hydrophile et le transfert micellaire est privilégié chez les microorganismes dont l'hydrophobicité de l'enveloppe cellulaire est faible (**Bouchez-Naitali et al., 1999**).

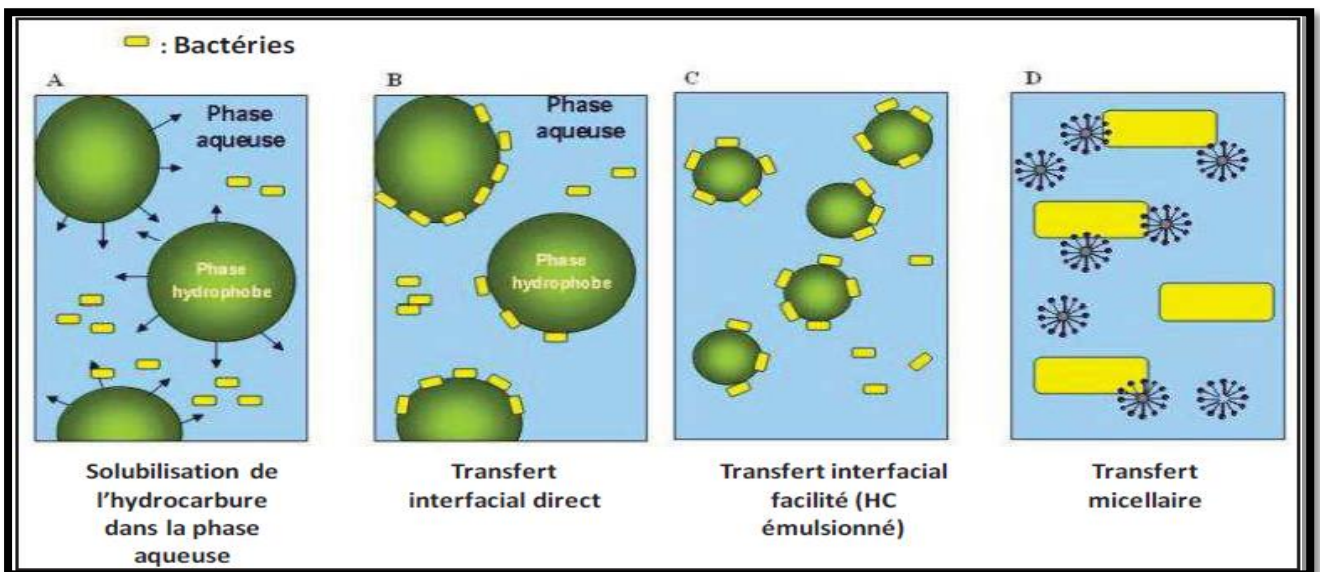


Figure 7 : Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures (**Hentati, 2018**).

8. Les voies biologiques de dégradation des hydrocarbures

8.1. Voies biologiques bactérienne aérobie

8.1.1. Biodégradation des hydrocarbures saturés

La biodégradation des hydrocarbures saturés est essentiellement un processus aérobie réalisé par des bactéries. Les alcanes à chaîne moyenne (C5-C10) sont utilisés notamment par des espèces de bactéries du genre *Pseudomonas* comme *P. aerogénosa*, *P. putida* et *P. oleovorans* qui ont été particulièrement étudiées.

Les alcanes à chaînes longue (C10-C20) sont très bien utilisés par les microorganismes, plus rapidement que les alcanes moyens, ils contribuent à la formation de films d'hydrocarbures. Les bactéries remplissant ce rôle appartiennent en particulier aux groupes des *Corynebacterium*, *Mycrobacterium* et *Nocardia* (CMN) ; notamment au genre *Rhodococcus*, c'est le cas de la souche *Rhodococcus* Q15 capable d'utiliser une large gamme des alcanes (C10 à C 21) et à des températures allant de 0° à 30°. De plus, les alcanes à très longue chaînes (> C20) sont également dégradés par les microorganismes, mais l'utilisation de ces substrats solides à température ambiante a été moins étudiée.

En revanche, les alcanes de plus courte chaîne sont toxiques et plus difficilement biodégradables, ils agissent comme des solvants vis-à-vis des membranes (Whyte *et al.*, 1998).

8.1.2. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques

La dégradation bactérienne aérobie des hydrocarbures est initiée généralement par l'action d'une dioxygénase (incorporation de deux atomes d'oxygène) qui attaque un des noyaux aromatiques conduisant à la formation d'un *cis*-dihydrodiol. Ce dernier est ensuite déshydraté en catéchol, un intermédiaire central de la biodégradation aérobie des composés aromatiques, qui va subir le clivage du noyau aromatique. Cette ouverture se passe entre les deux groupements hydroxyles (*ortho*-fission) ou entre un carbone hydroxylé et un carbone non substitué (*mé*ta-fission) et va aboutir à la formation de composés simples (succinate, pyruvate) pouvant entrer dans le métabolisme central des bactéries.

Cette biodégradation directe a lieu pour les hydrocarbures de faible poids moléculaire. Cependant, peu de bactéries peuvent utiliser les HAPs de masse moléculaire élevée comme unique source de carbone et d'énergie. Ainsi, la biodégradation des hydrocarbures de haute masse moléculaire se fait généralement par co-métabolisme (Fang *et al.*, 2013).

8.2. Voies biologiques bactérienne anaérobies

8.2.1. Biodégradation des hydrocarbures saturés

La dégradation des alcanes est tout aussi pertinente, étant donné qu'ils sont quantitativement les plus importants composants d'hydrocarbures. Plusieurs bactéries anaérobies capables de dégrader les n-alcanes avec 6 carbones ou plus, en particulier l'hexadécane (C16), en utilisant du sulfate ou du nitrate comme accepteurs d'électrons ont été isolés (**Grossi et al., 2008**). Les deux principaux mécanismes de dégradation anaérobie des n-alcanes décrits, impliquent des réactions biochimiques qui diffèrent totalement de celles employées dans le métabolisme aérobie des hydrocarbures (**Grossi et al., 2008**). La première implique l'activation au niveau du carbone subterminal de l'alcane par l'addition de fumarate, de manière analogue à la formation de benzyle succinate pendant la dégradation anaérobie du toluène (**Callaghan et al., 2006**), mais d'autres réactions sont complètement différentes impliquant une déshydrogénation et hydratation (**Widdel and Rabus, 2001**). Le deuxième mécanisme est la carboxylation (**Callaghan et al., 2009**), principalement développé à partir de la souche sulfato-réductrices (*Desulfococcus oleovorans*Hxd3) (**So et al., 2003**).

8.2.2. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques

Les molécules d'hydrocarbures se dégradent et servent des donneurs d'électrons qui sont capturés par un accepteur d'électrons externe, tels que le nitrate, le sulfate ou le fer. Deux étapes initiales ont été proposées dans le mécanisme de dégradation anaérobie : la carboxylation et l'hydroxylation, dans ce cas, le potentiel redox devient un facteur critique dans la détermination de la diversité métabolique des populations microbiennes dans les sols, sédiments et systèmes aquifères. Néanmoins, les hydrocarbures lourds tels que le Pyrène, le Benzo(a)Anthracène et le Benzo(a)Pyrène semblent difficilement dégradables en conditions anaérobies (**Jourdain et Charissou, 2007**).

Plusieurs études ont montré la biodégradation des hydrocarbures aromatiques en anaérobiose. Cependant, la majorité des souches isolées dégradent essentiellement les BTEX (mono-aromatiques) et le naphthalène. Ces souches appartiennent aux Alpha-, aux Béta-, aux Gamma-, aux Delta-protéobactéries ou aux Firmicutes. La dégradation des hydrocarbures aromatiques a été démontrée en condition de dénitrification, sulfato-, ferri-réduction et photosynthèse anoxygénique (**Musat et al., 2009**).

8.3. Voies biologiques fongiques (Figure 8)

Les champignons du sol de type micromycètes sont capables de dégrader les composés aromatiques suivant deux types de voies métaboliques (**Peng et al., 2008**).

Les champignons lignolytiques excrètent trois types d'enzymes solubles, les lignine peroxydases, les manganèse-peroxydases, ou les phénol-oxydases, ainsi que des enzymes produisant du peroxyde d'hydrogène, ces enzymes sont impliquées dans la dégradation de la lignine, un polymère constitué de structures phénoliques (**Haritash et Kaushik, 2009**) ayant une faible spécificité du substrat, elles attaquent aussi les HAP, y compris quand ils sont piégés dans la matrice du sol. L'attaque de l'un des noyaux aromatiques libère un composé hydroxylé, puis conduit à la production de quinones par oxydation radicalaire (**Martin, 2011**).

Les champignons non-lignolytiques utilisent des mono-oxygénases de type cytochrome P450 pour insérer un atome d'oxygène dans un cycle aromatique et former un époxyde très réactif. Celui-ci réagit avec l'eau pour former un aromatique hydroxylé. Les arènes hydroxylés sont souvent oxydés une seconde fois pour former des *trans*-dihydrodiols. Lorsqu'elle est partielle, la dégradation des hydrocarbures par les champignons génère des composés phénoliques, des tétralones, des quinones, ou des diol-époxydes eux-mêmes très réactifs (**Meulenberg et al., 1997**).

La majorité des champignons est capable d'attaquer les hydrocarbures de haut poids moléculaire produisant des intermédiaires plus solubles et plus réactifs, qui sont potentiellement métabolisables par certaines bactéries aérobies (**Boonchan et al., 2000**).

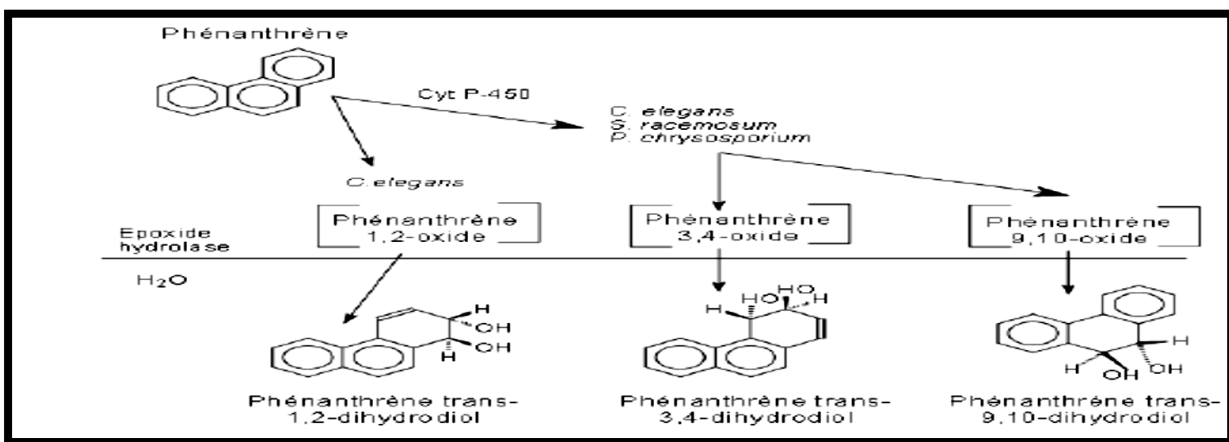


Figure 8 : Métabolisme du phénanthrène par différents espèces de champignons (**Sutherland et al., 1995**) .

9. Facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures dans l'environnement :

Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales (**Leahy et Colwelli, 1990**). Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont :

9.1. Structure et nature du milieu récepteur

Les bioprocédés s'appliquent à une grande variété de sol. Pour cela, il est donc nécessaire de connaître la structure et la nature de sol pour prévoir le comportement des polluants et les conséquences possibles de la pollution (**Lemiere et al., 2001**).

9.2. Nature du polluant - Composition chimique des hydrocarbures

Les composés pétroliers diffèrent par leur susceptibilité à l'attaque microbienne. Ainsi, la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les hydrocarbures aromatiques légers, les hydrocarbures aromatiques à haut poids moléculaire et les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible (**Soltani, 2004**).

La biodégradabilité des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition ; à une température déterminée, un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole lourd (**Atlas, 1975**). En général, ils sont classés selon leur sensibilité aux attaques microbiennes de la manière suivante : n-alcanes > alcanes ramifiés > aromatiques à faible poids moléculaire > alcanes cycliques > aromatiques à haut poids moléculaire > stéranes- hopanes (**Van Hamme et al., 2003**).

9.3. Facteurs microbiologiques

La diversité microbienne est un facteur déterminant pour la plasticité des communautés en milieu naturel comme pour faire face à un apport de pétrole (**Sauret, 2011**). Les microorganismes, qui ont la faculté de métaboliser les hydrocarbures pétroliers sont essentiellement des bactéries et des champignons et sont les acteurs principaux de la biodégradation environnementale (**Leahy et Colwell, 1990**). Les bactéries représentent moins de 0,1% de la communauté microbienne indigène en milieu non pollué, mais peuvent représenter près de 100% dans les milieux pollués par des déversements d'hydrocarbures, que ces déversements soient d'origine naturelle ou anthropique (**Yakimov et al., 2003**). La fraction de la communauté microbienne totale représentée par les bactéries utilisant les hydrocarbures comme source de carbone (**Dash et al., 2013**).

Les hydrocarbures à faible poids moléculaire sont considérés comme des composés toxiques pour les microorganismes à cause de leur grande solubilité et par conséquent leur concentration très élevée dans les phases aqueuses. L'action toxique du polluant peut provoquer un ralentissement de l'activité de la microflore du sol (**Colin, 2000**).

9.4. Facteurs environnementaux

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent affecter, positivement ou négativement, le métabolisme microbien. Il s'agit essentiellement de la température, ressources en oxygène, élément

nutritif, salinité, humidité, pression et des rayonnements UV. Ce sont des paramètres importants dans la réponse des communautés microbiennes aux hydrocarbures et ont une influence sur leur biodégradation (**Hassaine, 2016**)

9.4.1. Influence de la température

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes (**Leahy et Colwell, 1990**). Une diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (**Sikkema et al., 1995**).

9.4.2. Influence de l'oxygène

Bien que la biodégradation des hydrocarbures puisse s'effectuer en condition anaérobie et aérobie, la biodégradation aérobie présente un rendement beaucoup plus élevé. Une réduction de la concentration en oxygène entraîne donc une réduction de l'efficacité de la biodégradation (**Oliveira et al., 2015**).

9.4.3. Influence des éléments nutritifs

Les hydrocarbures pétroliers, riches en carbone et en énergie, ne contiennent pas de concentrations significatives d'autres nutriments (tels que l'azote et le phosphore), (**Leahy et Colwell, 1990**) , ces derniers sont parmi les nutriments nécessaires la croissance microbienne et à la biodégradation. L'azote est nécessaire dans la synthèse des protéines cellulaires des bactéries, Le phosphore est utilisé pour la synthèse des membranes cellulaires, les acide nucléiques et l'ATP (**Gautier, 2007**). Le rejet des hydrocarbures dans les environnements qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentrations, conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables pour la croissance microbienne (**Leahy et Colwell, 1990**). Donc ce sont des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sols (**Mohn et Stewart, 2000**).

9.4.4. Effet de la salinité

Les variations de salinité modifient la structure et la diversité des communautés microbiennes indigènes en sélectionnant pour des espèces halophiles ou halotolérantes. Ceci peut avoir un effet indirect sur la biodégradation des hydrocarbures dans les milieux de transition comme les milieux

estuariens en ajoutant un facteur de sélection supplémentaire sur les communautés indigènes (Oliveira *et al.*, 2015).

9.4.5. Effet du pH

Les valeurs extrêmes du pH ont des effets négatifs sur la dégradation des hydrocarbures par les microorganismes. Les bactéries hétérotrophes et les champignons ont une croissance idéale lorsque le pH est proche de la neutralité (Leahy et Colwell, 1990).

9.4 .6. Effet des UV

Les rayonnements UV sont des facteurs peuvent influencer la biodégradation des composés pétrolier. Lorsqu'un rayonnement pénètre dans les cellules des microorganismes, il se produit des interaction caractérisées par des échanges d'énergie entre les rayonnements et l'ADN bactérienne. La capacité des microorganismes à s'adapté à la dégradation des hydrocarbures s'explique par avantage des modification au niveau d'ADN (<https://www.u-picardie.fr/beauchamp/duce/mignot.htm>).

10. Amélioration de pouvoir de biodégradation des microorganismes par mutagénèse

La molécule d'ADN est une structure dynamique sujette à de constants changements. Ces variations sont consécutives, d'une part à des erreurs spontanées, d'autre part à des lésions de l'ADN induites par des agents physiques ou chimiques (UV, radiations ionisantes) (Iarmarcovai, 2008).

La mutation a été utilisée comme technique d'amélioration de la déformation dans de nombreux domaines de recherche et c'est un moyen essentiel et souvent le plus direct et le moins coûteux d'améliorer les microorganismes pour spécifique application, a rapporté que la mutagenèse améliore la performance de l'organisme et la qualité du produit avec moins de propriétés indésirables. Des souches bactériennes et fongiques améliorées ont été largement développées par mutation en utilisant des agents physiques ou chimiques (Dwivedi *et al.*, 2017).

Des mutations peuvent être induites dans le matériel génétique par exposition à des agents physiques ou chimiques. L'irradiation UV est l'une des stratégies physiques la plus fréquemment employée et l'un des moyens les plus simples et les plus commodes pour obtenir des mutants dans divers organismes, y compris les bactéries (Benchouk, 2017).

L'utilité de tout mutagène en amélioration des bactéries dépend non seulement de l'efficacité mutagénique, de la relation entre la fréquence de mutation et la dose, mais aussi de l'efficacité mutagénique, et de la production de changements désirables libres sans association avec les changements non désirés, Cette proportion peut être altérée par la variation des facteurs modificateurs (Mao *et al.*, 2015).

Les mutations induites sont celles qui apparaissent suite à un traitement par des mutagènes, c'est-à-dire des agents de l'environnement qui augmentent le taux de mutation. Contrairement aux mutations spontanées qui apparaissent en l'absence de mutagènes avec un faible taux de mutation (Chlyah et Demarly, 1993).

Ibrahim et Al-Ghamdi, 2019 ont montré que la mutagenèse des champignons par rayonnement UV augmente leur capacité de dégradation des micropolluants, c'est le cas de la souche mutante *Aspergillus niger* qui a montré une efficacité de dégradation du phénol, proportionnelle aux temps d'exposition au rayonnement UV, ces résultats ont montré que la souche mutante *Aspergillus niger*, a plus de tolérance que la souche sauvage.

10.1. La mutagenèse

La mutagenèse consiste en l'introduction volontaire de mutations par l'action d'agents mutagènes chimiques ou physiques dans une séquence ADN afin de déduire des informations sur le rôle des gènes, à partir de l'analyse des effets de ces mutations (Dupont, 2001).

Une mutation apparaît donc lorsque des nucléotides seront ajoutés, supprimés, remplacés par d'autres, inversés ou transposés vers de nouvelles positions cette dernière est augmentée par des rayons UV, les radiations ionisantes et par certains composés chimiques (mutagènes).

La modification *in vitro* de la séquence en acides aminés d'une protéine permet d'évaluer l'importance de ces acides aminés dans la fonction de la protéine (winter *et al.*, 2004).

10.2. Mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles font généralement référence à des modifications concernant des paires de bases uniques de l'ADN ou un petit nombre de paires de bases adjacentes. Les mutations ponctuelles sont classées selon leur nature moléculaire (Rachel, 2007), donc les mutations ponctuelles correspondent à la substitution d'une base par une autre (SNP pour Single Nucleotide Polymorphism) ou à l'insertion/délétion d'une ou plusieurs bases (Wielgoss *et al.*, 2011). Les substitutions n'ont pas la même probabilité : par exemple, chez les bactéries, il a été montré que les transitions G→A et C→T sont les mutations ponctuelles plus fréquentes (Hildebrand *et al.*, 2010).

10.3. Types de mutations ponctuelles (Figure 9)

Parmi les mutations ponctuelles :

- a) Le changement d'une base par une autre base, c'est une mutation par substitution
- Si une base purique est remplacée par une autre base purique ou une pyrimidine par une pyrimidine: c'est une substitution par transition.

- Si une purine remplace une pyrimidine ou l'inverse, c'est une substitution par transvasions.

b) Les délétions/insertion : perte d'une base (délétion) ou gain d'une base (insertion), ce type de mutation provoque un décalage dans le cadre de lecture (**Saidi-Ouahrani, 2018**).

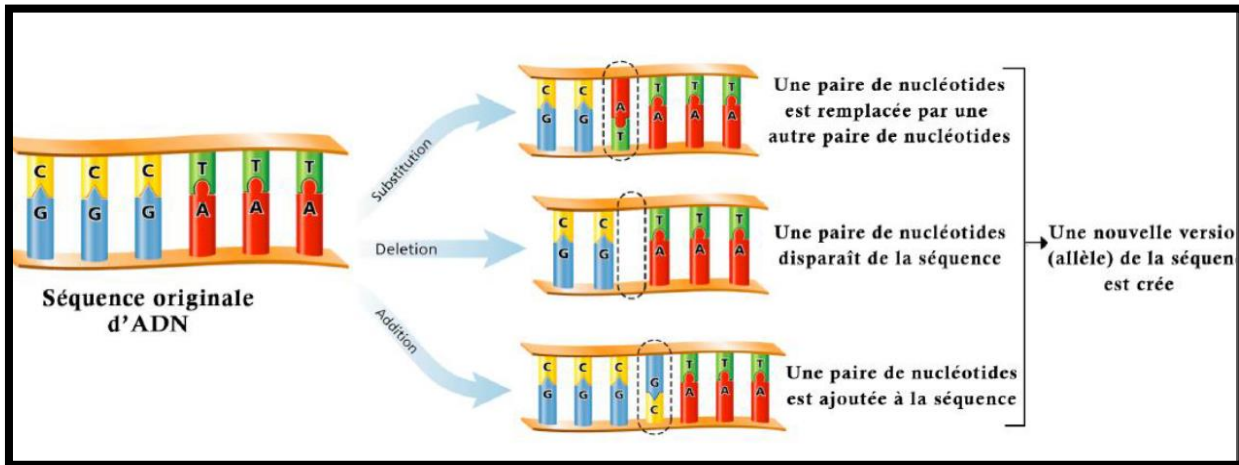


Figure 9: types de mutation ponctuelles (<http://www.sommeillesvt.sitew.com/fs/root/7vrf0-chapitre4>)

10.4. Les agents mutagènes

Les agents mutagènes (rayons X, UV, agents chimiques... etc.) sont généralement caractérisés par une spécificité ou une préférence mutationnelle à propos du site et de la nature des bases modifiées : ces sites préférentiels sont appelés des points chauds (hot spot) (**Rachel, 2007**).

10.4.1. Les agents chimiques

❖ Les analogues des bases

Ce sont des composés chimiques ressemblent aux bases azotées et ont des propriétés d'appariement différentes : leur incorporation dans l'ADN lors de la réplication conduit à la substitution de bases.

- Le bromo-uracile (BU), semblable à T (Br remplace CH₃), s'apparie à A. Il a une forte tendance à se tautomériser en « enol ». Elle s'apparie alors à G.

L'aminopurine, analogue de A s'apparie avec T et cause des transitions de A-T en G-C ou l'inverse (<http://accens-lyon.fr/biotic/genetic/mutation/html/mutagen.htm>)

❖ Les Agents intercalants

Ces agents sont des molécules plates qui ressemblant aux paires de bases et sont capables de s'insérer entre les bases azotées empilées ou adjacents dans la molécule double hélice d'ADN.

Ces agents mutagènes peuvent provoquer des insertions ou des délétions d'une seule paire de nucléotides (**Rachel, 2007**).

❖ Les agents désaminant

La désamination de la cytosine en uracile (la fonction amine NH_2 est remplacée par une fonction hydroxyle OH) en milieu aqueux avec libération d'ammoniaque, cette cytosine initiale devenue uracile lors de la réplication suivante, va être appariée à une adénine ; la paire initiale C-G est donc à terme remplacée par une paire U-A, puis T-A (**Beaumont, 1987**).

● L'Acide nitrique :

L'acide nitrique (HNO_2) est un catalyseur de diverses réactions: le détachement du groupe NH_3 (déamination) et l'isomérisation amènent ainsi à la transformation de la cytosine en uracile, de l'adénine en hypoxanthine et de la guanine en xanthine

(<http://www.embryology.ch/francais/kchromaber/popupchromaber/00objectif/mfmutagen/physikal.html>)

❖ Les agents alkylant

Sont des mutagènes qui ne s'incorporent pas à l'ADN mais altèrent une base en une forme qui provoque le mauvais appariement. Il s'agit de réactifs capables d'entraîner des méthylations, éthylations ou alkylations supérieures au niveau des bases mais aussi à celui des groupements phosphate (**Griffiths et al., 1997**).

● L'éthyl-méthane sulfonate (EMS): il ajoute un groupe éthyle en de nombreuses positions sur les quatre bases, le pouvoir mutagène provient surtout de l'addition sur l'oxygène en position 6 de la guanine, qui forme la O-6-alkylguanine. Celle-ci s'apparie de manière illégitime avec la thymine, ce qui donne surtout des transitions GC – AT (**Guiraud, 1993**).

10.4.2. Les agents physiques

❖ Rayons ionisants

Les rayons ionisants (rayons X, rayonnement alpha ou gamma des substances radioactives) sont des rayonnements riches en énergie, qui transfèrent une partie de leur énergie aux molécules irradiées, qui en sont ainsi modifiées. Les rayons X, par exemples, induisent des cassures des chromosomes (<http://www.embryology.ch/francais/kchromaber/popupchromaber/00objectif/mfmutagen/physikal.html>) .

❖ Rayons non ionisants

Les rayons UV sont fréquemment utilisés au laboratoire pour induire des mutations et son mécanisme d'action est le plus connu (Nicklin *et al.*, 2000) (Figure 10). Les conséquences les plus graves de l'exposition à la lumière UV, sont les modifications de l'ADN, molécule qui porte toutes les informations nécessaires à la vie des cellules et des individus (Angulo, 2004). Les UV peut provoquer la fusion de deux thymines situées l'une à côté de l'autre sur un brin d'ADN (on parle de dimère de thymine). Les UV peut provoquer également la fusion d'une cytosine située l'une à côté de l'autre sur les brins d'ADN (on parle alors de dimère Thymine- cytosine). La formation de dimère provoque une incapacité de ces nucléotides de se lier avec leur base complémentaire située sur le brin complémentaire de la molécule d'ADN. Cette absence d'appariement provoque l'arrêt de l'ADN polymérase lors de la réplication (Turner, 1999).

Mais dans certains cas, l'ADN polymérase peut poursuivre la synthèse mais commet des erreurs d'appariement (<https://www.maxicours.com/se/cours/les-agents-mutagenes/>)

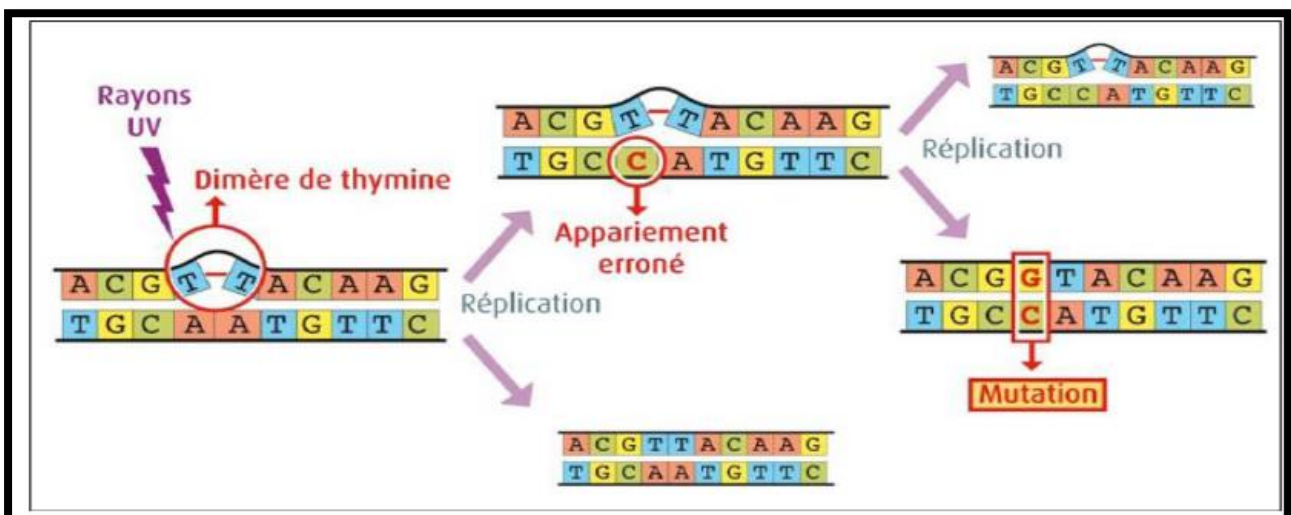


Figure 10 : Action des radiations comme les UV (<https://www.maxicours.com/se/cours/les-agents-mutagenes/>)

Les radiations ultraviolettes sont classées en trois groupes en fonction de la longueur d'onde :

- Les UVA (320-400 nm). Ce sont les moins énergétiques. Ils induisent cependant des modifications de l'ADN de manière indirecte.
- Les UVB (280-320 nm). Ils pénètrent profondément dans les tissus et sont directement absorbés par l'ADN. Ils induisent la formation de dimère de pyrimidine. La plus grande partie du pouvoir cancérigène de la lumière solaire est due aux UVB.
- Les UVC (200-280 nm). Ce sont les plus énergétiques. Ils sont cependant absorbés par la couche d'ozone et n'atteignent pas la surface de la Terre. Ils forment des modifications similaires aux UVB sur l'ADN (<https://www.bioutils.ch/protocoles/7-mutagenese-par-luv>).

Le rayonnement UV est couramment utilisé pour générer des souches mutantes de micro-organismes. Il est moins énergétique que les rayons X et gamma (rayonnements ionisants), mais ses longueurs d'onde ont été préférentiellement absorbées par les nucléotides de l'ADN et par les acides aminés aromatiques des protéines, il a donc des effets biologiques et génétiques importants (**Dwivedi et al., 2017**).

10.5. L'amélioration de pouvoir de dégradation des hydrocarbures par mutagenèse

La biodégradation des hydrocarbures a été largement étudiée et de nombreuses souches microbiennes ont été isolées pour leur capacité à métaboliser les hydrocarbures avec des taux de dégradation variables (**Benchouk, 2017**).

Différents groupes de micro-organismes ont été isolés à partir des sites contaminés par les hydrocarbures et identifiés, ils sont capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers en les utilisant comme seules sources de carbone et d'énergie (**Tabatabaee et Assadi, 2013**).

L'amélioration génétique par mutagenèse des souches étudiées dégradantes les hydrocarbures a rapporté des mutants présentant une capacité plus importante ou réduite de dégradation de pétrole et de diesel (**Benchouk, 2017**).

De nombreux articles ont rapporté que la mutagenèse UV a un effet positif sur l'augmentation de la capacité de biodégradation des micropolluants par des souches bactériennes ou fongiques (**Ibrahim et Al-Ghamdi, 2019**).

Les radiations UV les plus efficaces sont celles de longueur d'onde comprise entre 200 et 300 nm, et qui correspondent au maximum d'absorption des acides nucléiques (**Guiraud, 1993**), qui est connu pour induire une mutation spécifique d'un gène pour améliorer la capacité de dégradation des microorganismes et peut être utilisée pour le développement de nouvelles stratégies de remédiation (**Dwivedi et al., 2017**).

La capacité des microorganismes à s'adapter à la dégradation des micropolluants s'explique d'avantage par des modifications géniques (**Leahy et Colwell, 1990**).

Naveen Kumar et al., 2010 ont rapporté que la mutagenèse a induit une augmentation de l'activité de dégradation du pétrole par trois bactéries : *Micrococcus*, *Staphylocoque* et *Pseudomonas*.

La bioremédiation des sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers dans différentes conditions a été menée en utilisant principalement des bactéries gram négatives comme *Pseudomonas*, qui est le genre de bactéries le plus prometteur dans ce domaine (**Dwivedi et al., 2017**).

10.6. Amélioration de la biodégradation des hydrocarbures par *Pseudomonas sp.* Par mutation induite par les ultraviolets

Le genre *Pseudomonas* est le groupe bactérien majoritaire spécifique adapté à la pollution aux hydrocarbures, il a la capacité de métaboliser (en culture simple) certains hydrocarbures récalcitrants (alcane ramifiés tel le Pristane (*n*-C19) à 35.11% et les aromatiques lourds tels le Benzo[a]Pyrène (*n*-C20) à 33.93% et de comptabiliser (en consortium) les différentes fractions du pétrole brut à 50.44% pour les saturés et à 30.42% pour les aromatiques polycycliques.

Dans une étude réalisée par (**Das et Mukherjee, 2007**), deux souches (*Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*) ont été isolées à partir d'un échantillon du sol contaminé par du pétrole provenant du Nord-Est de l'Inde. Ces études ont montré que les bactéries *Pseudomonas* sont capables de baser leur métabolisme exclusivement sur la dégradation des hydrocarbures bien que de nombreuses sources de carbone plus facilement métabolisables soient disponibles dans l'environnement (**Juhasz et al., 2000**).

L'identification génétique des bactéries isolées qui appartiennent aux genres *Pseudomonas* en utilisant une méthode de séquençage des gènes codant l'ARNr 16S, a été déterminé. Des arbres phylogénétiques ont été élaborés (**Guermouche m'rassi, 2014**).

Le séquençage du gène codant l'ARNr 16S offre un outil de choix pour l'identification génétique des bactéries, car cette région contient un nombre important de gènes régulateurs impliqués dans le métabolisme et persiste très stable et à l'abri des mutations (**Benchouk, 2017**).

Dans une autre étude par **Whyte et al., 1997** et **Sutton et al., 2011**, qui ont isolé des bactéries dégradant les hydrocarbures dans des sols arctiques contaminés par le pétrole et ont caractérisé deux souches, identifiées comme *Pseudomonas sp* capables de dégrader les n-alcane C5 à C12, le toluène et le naphthalène . Les résultats obtenus indiquent la capacité de *Pseudomonas sp* d'utiliser les hydrocarbures comme seule source d'énergie et de carbone.

Ces résultats ont permis d'autres part, d'évaluer la biodégradation de pétrole brut par les bactéries isolée à partir d'un échantillon du sol contaminé par les hydrocarbures et traités par les rayonnements UV, et indiquent que, la mutagenèse par l'exposition à l'UV a mené a des augmentations de pourcentages de dégradation de pétrole par les *Bacillus sp* et les *Pseudomonas sp* et des diminutions pour les autres mutants (**Whyte et al., 1997 ; Sutton et al., 2011**).

Certains chercheurs montrent que *pseudomonas sp* .dégrade le pétrole mieux que d'autre espèce isolés avec un pourcentage le plus élevé de dégradation de 92,3% suivi par les souches *Bacillus* (**Chithra et Hema Shenpagam, 2014**).

Das et Mukherjee, 2007 ; Salam et al., 2011; ont rapporté que plusieurs souches de *Pseudomonas* isolées à partir des sols contaminés, sont capables de pousser et de dégrader les hydrocarbures pétroliers donc remédier les sols contaminés par les hydrocarbures .

Les résultats obtenus par **Rahmen et al., 2002** aussi montrent que les souches *Pseudomonas sp.* représentent les plus grandes concentrations bactériennes et les plus grandes capacités de dégradation les hydrocarbures.

Les *Pseudomonas* sont capables de baser leur métabolisme exclusivement sur la dégradation des hydrocarbures bien que de nombreuses sources de carbone plus facilement métabolisables soient disponibles dans l'environnement (**Juhasz et al., 2000**). La capacité de *Pseudomonas sp.* d'utiliser les hydrocarbures a été expliquée par la production de biosurfactants lipidiques pour la dégradation des alcanes (**sutton et al., 2011 ; Rocha et al., 2011**).

CONCLUSION

La pollution du sol par les hydrocarbures a un impact écologique et des conséquences négatives sur le système écologique et la biodiversité des être vivants.

Les voies d'élimination chimiques et physiques de la pollution par les hydrocarbures ont leurs limites du fait de leurs coûts ou de leurs impacts secondaire sur l'environnement. La voie biologique est actuellement en plein essor et suscite de très nombreux travaux de part le monde entier.

Pour cela, des microorganismes indigènes sont stimulés à dégrader les hydrocarbures pétroliers ou bien des microorganismes déjà adaptés à la dégradation de ces composés sont introduit dans le sol.

Ce travail porte sur une étude bibliographique de la bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures pétroliers et l'amélioration de cette biodégradation par mutation induite par les rayons ultraviolets.

Le genre *Pseudomonas* est le plus connue pour être utilisé dans la biodégradation des hydrocarbures à cause de sa production des biosurfactants , qui solubilisent les hydrocarbures hydrophobes adsorbés sur les particules des sols et les rendant, par conséquent, plus disponibles pour les autres bactéries et faciliter, par la suite, leur dégradation.

Plusieurs recherches ont montré que la mutagenèse via UV a un effet positif sur l'augmentation de la capacité de biodégradation des micropolluants par des souches bactériennes ou fongiques.

Les radiations UV les plus efficaces sont celles de longueur d'onde comprise entre 200 et 300 nm, et qui correspondent au maximum d'absorption des acides nucléiques, qui est connu pour induire une mutation spécifique d'un gène pour améliorer la capacité de dégradation des microorganismes et peuvent être utilisée pour le développement des nouvelles stratégies de remédiation.

**LES REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

1. **Abdely, C. (2007).** Bioremédiation/phytoremédiation. Thèse de doctorat. Tunisie : Université de Tunisie .
2. **Acevedo, F., Pizzul, L., del Pilar Castillo, M., Cuevas, R. and Diez, M.C. (2011).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracozyllum discolor*. *Journal of hazardous materials*, 185(1), p 212-219.
3. **Angulo, J.F. (2004).** Le soleil, indispensable mais dangereux ami. CLEFS CEA-N°49.
4. **Atlas, R.M. (1981).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1), p 180.
5. **Atlas, R.M. (1975).** Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Applied microbiology*, 30(3), p 396-403.
6. **Ballerini, D. and Vandecasteele, J.P. (1999).** La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. *Biotechnologie*, coordinateur R. Scriban, 5ème édition, Edition Tech et Doc, 1999, p 835-865.
7. **Bandara, U.C., Yapa, P.D. and Xie, H. (2011).** Fate and transport of oil in sediment laden marine waters. *Journal of Hydro-environment Research*, 5(3), p 145-156.
8. **Barriuso, E., Calvet, R., Schiavon, M. and Soulas, G. (1996).** Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Etude et gestion des sols*, 3(4), p 279-296.
9. **Beaumont, S. (1987).** Biologie moléculaire cour, exercice, annales et QCM corrigés. Ed. Dunod, paris ,318 p.
10. **Benahmed, M. (2017).** Effet des précipitations sur la distribution du Zn et du Pb issus de retombées atmosphériques dans le sol : Cas de la fonderie de Tiaret (ALFET). Thèse de doctorat en sciences : Sciences de l'environnement. Algérie : Université Djillali Liabes de sidi bel abbes, 135 p.
11. **Benchouk, A. (2017).** Bioremédiation des sols pollués de pétrole par les micro-organismes indigènes et amélioration génétique de leur pouvoir. Thèse de doctorat : Microbiologie appliquée. Algérie : Université Iben Badis Mostaganem, 135p.
12. **Berthe-Corti, L. and Höpner, T. (2005).** Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 219(1-2), p 171-189 .
13. **Bidaud, C. (1998).** Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué. Thèse de doctorat : Génie des Procédés, 229 p.

14. **Bogan, B.W., Lamar, R.T., Burgos, W.D. and Tien, M. (1999).** Extent of humification of anthracene, fluoranthene, and benzo [α] pyrene by *Pleurotus ostreatus* during growth in PAH-contaminated soils. *Letters in Applied Microbiology*, 28(4), p 250-254.
15. **Boonchan, S., Britz, M.L. and Stanley, G.A. (2000).** Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), p 1007-1019.
16. **Bouchez Naïtali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y. and Vandecasteele, J.P. (1999).** Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), p 421-428.
17. **Brillas, E., Sirès, I. et Oturan, M.A. (2009).** Electro-Fenton process and related electrochemical technologies based on on Fenton's reaction chemistry. *Chem. Rev.*, 109, p 6570-6631.
18. **Callaghan, A.V., Gieg, L.M., Kropp, K.G., Suflita, J.M. and Young, L.Y. (2006).** Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), p 4274-4282.
19. **Carmona, M. and Díaz, E. (2005).** Iron-reducing bacteria unravel novel strategies for the anaerobic catabolism of aromatic compounds. *Molecular microbiology*, 58(5), p 1210-1215.
20. **Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y.H., Grimont, P., Saliot, A. and Oudot, J. (2004).** Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in microbiology*, 155(7), p 587-595.
21. **Champagnat, A. et Adria, J. (1974).** *Pétrole et protéine*. Ed, Dion, p 32-35.
22. **Chen, S.H. and Aitken, M.D. (1999).** Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environmental science & technology*, 33(3), p 435-439.
23. **Chithra, S. et Hema Shenpagam, N. (2014).** Isolation and identification of oil degrading bacteria from oil contaminated soil and comparison of their bioremediation potential. *Gjra-Global Journal for Research Analysis*. 3 (8), p 181-184.
24. **Chlyah, H. and Demarly, Y. (1993).** Le progrès génétique passe t-il par le repérage et l'inventaire des gènes?. *John Libbey Eurotext*.
25. **Colin, F. (2000).** Approche spatiale de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires, cas de l'atrazine dans le bassin versant du Sousson (Gers, France). Thèse de doctorat : Sciences de l'Eau. France, Université Engref Montpellier, 233 p.

26. **Colombano, S., Guerin, V., Saada, A., Hiez, D. and Bomer, H. (2008).** Journée Technique d'information et de retour d'expérience de la gestion des sols pollués. Les Diagnostiques-Objectifs, enjeux & moyens. Gouvernement de France. Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie. [En ligne]. http://www.developpement durable.gouv.fr/IMG/pdf/etude_de_cas_TAUW.pdf (page consultée le 20 Octobre 2020).
27. **Colombano, S., Saada, A., Victoire, E., Guerin, V., Zornig, C., Amalric, L., Blessing, M., Widory, D., Hube, D. et Blanc, C. avec la collaboration de Honrado J-C. et Gassiat B. (2014).** Nature des produits pétrolier et origine du vieillissement : tentative de l'identification de la source via la prise en compte des impacts et l'analyse de l'age approximatif des déversements, 163 p.
28. **Dachs, J., Lohmann, R., Ockenden, W.A., Méjanelle, L., Eisenreich, S.J. and Jones, K.C. (2002).** Oceanic biogeochemical controls on global dynamics of persistent organic pollutants. *Environmental science & technology*, 36(20), p 4229-4237.
29. **Das, K. and Mukherjee, A.K. (2007).** Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource technology*, 98(7), p 1339-1345.
30. **Dash, H.R., Mangwani, N., Chakraborty, J., Kumari, S. and Das, S. (2013).** Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(2), p 561-571.
31. **De, S., Pramanik, S.K., Williams, A.L. and Dutta, S.K. (2004).** Toxicity of polychlorobiphenyls and its bioremediation. *International Journal of Human Genetics*, 4(4), p 281-290.
32. **Dupont, J.Y. (2001).** Mutation, mutagenèse et réparation de l'ADN. A partir d'un article de Beth A. Montelone, Division of Biology, Kansas State University.
33. **Dupuis, A. and Ucan-Marin, F. (2015).** Analyse documentaire de la toxicologie aquatique des huiles de pétrole: un aperçu des propriétés du pétrole et de ses effets sur le biote aquatique. Canadian Science Advisory Secretariat= Secrétariat canadien de consultation scientifique.
34. **Dwivedi, A., Kumar, A. and Bhat, J.L. (2017).** Effect Of UV Radiation On The Growth And Petroleum Hydrocarbon Degradation Ability Of Bacteria. *Octa Journal of Environmental Research*, 5(1).
35. **Eckford, R., Cook, F.D., Saul, D., Aislabie, J. and Foght, J. (2002).** Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated Antarctic soils. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), p 5181-5185.

-
36. Fang, X., Thornton, C., Scheffler, B.E. and Willett, K.L. (2013). Benzo [a] pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development. *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(1), p 40-50.
37. Fardeau, M.L., Cayol, J.L., Magot, M. and Ollivier, B. (1994). Hydrogen oxidation abilities in the presence of thiosulfate as electron acceptor within the genus *Thermoanaerobacter*. *Current Microbiology*, 29(5), p 269-272.
38. Fingas, M. (2012). *The basics of oil spill cleanup*. CRC press.
39. Fréjaille, R.M. (2009). *Le corpus en analyse terminologique de domaines composites et interdisciplinaires. Passeurs de mots, passeurs d'espoir*, p593-604.
40. Gabet, S. (2004). *Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique*. Thèse de doctorat : Chimie et Microbiologie de l'Eau. Université de Limoges, 177 p.
41. Garrett, R.M., Pickering, I.J., Haith, C.E. and Prince, R.C. (1998). Photooxidation of crude oils. *Environmental Science & Technology*, 32(23), p 3719-3723.
42. Gautier, C. (2007). *Biodégradation des hydrocarbures en milieu poreux insaturé*. thèse de doctorat : Physique-chimie. France : Université de Pau et des Pays de l'Adour, 249 p.
43. Gong, Y., Zhao, X., Cai, Z., O'reilly, S.E., Hao, X. and Zhao, D. (2014). A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Marine pollution bulletin*, 79(1-2), p16-33.
44. Goswami, P. and Singh, H.D. (1991). Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(1), p1-11.
45. Griffiths, A. J. F., Miller, J. M., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. et Gelbert, W. M. (1997). *Introduction à l'analyse génétique*. Ed. DE BOECK université, 915 p.
46. Grimberg, S.J., Stringfellow, W.T. and Aitken, M.D. (1996). Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of a nonionic surfactant. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), p 2387-2392.
47. Grossi, V., Cravo-Laureau, C., Guyoneaud, R., Ranchou-Peyruse, A. and Hirschler-Réa, A. (2008). Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: a summary. *Organic Geochemistry*, 39(8), p 1197-1203.
48. Guermouche M'rassi, A. (2014). *Caractérisation moléculaire des bactéries impliquées dans la biodégradation des hydrocarbures*. Thèse de doctorat. Algérie : Université d'Oran, 153 p.
49. Guiraud, J. P. (1993). *Génétique microbienne*. Technique et documentation LAVOISIER, 290 p.

50. **Habe, H. and Omori, T. (2003).** Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(2), p 225-243.
51. **Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. and Shutsubo, K. (1999).** Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), p 63-70.
52. **Haritash, A.K. and Kaushik, C.P. (2009).** Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous materials*, 169(1-3), p 1-15.
53. **Hassaine, A. (2016).** Biodégradation des Hydrocarbures (Pétrole brut et Kérosène) par la Microflore Microbienne des Eaux de la région de Skikda. Thèse de doctorat : Biologie végétale. Algérie : Université Badji Mokhtar – Annaba ,189 p
54. **Hateb, A., Mbengue, M., Noubatare, N., Faye S. et Niang, Y. (2012).** Pollution du sol par les pesticides et les engrais, 19 p .
55. **Hazen, T.C . (2010).** Cometabolic bioremediation.
56. **Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R. and Widdel, F. (1998).** Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(5), p 459-473.
57. **Heitkamp, M.A., Franklin, W. and Cerniglia, C.E. (1988).** Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(10), p 2549-2555.
58. **Hongwei, Y., Zhanpeng, J., Shaoqi, S. and Tang, W.Z. (2002).** INT–dehydrogenase activity test for assessing anaerobic biodegradability of organic compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(3), p 416-421.
59. **Hildebrand, F., Meyer, A. and Eyre-Walker, A. (2010).** Evidence of selection upon genomic GC-content in bacteria. *PLoS Genet*, 6(9), p.e1001107.
60. **Iarmarcovai, G . (2008) .** Mutagenèse et cancérogenèse. Sens public.
61. **Ibrahim, A.G. and Al-Ghamdi, L.S. (2019) .** Bioremediation of Phenol by Mutated and Immobilized *Aspergillus* and *Penicillium* Species. *Notulae Scientia Biologicae*, 11(4), p 410-416.
62. **Jeannot, R., Lemièrre, B., Chiron, S., Augustin, F. et Darmendrail, D. (2000).** Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement. France.
63. **Johnsen, A.R., Wick, L.Y. and Harms, H. (2005).** Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental pollution*, 133(1), p 71-84.
64. **Jourdain, M.J. et Charissou, A.M. (2007).** Etat des connaissances sur le devenir de polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitements : Identification des composés « métabolites » et des cinétiques , 147 p.

65. Juhas, M., Van Der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W. and Crook, D.W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. FEMS microbiology reviews, 33(2), p 376-393 .
66. Juhasz, A.L. and Naidu, R . (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. International biodeterioration & biodegradation, 45(1-2), p 57-88.
67. Jullien, D. (1997). La recherche des polluants dans les sols. Paris, France .
68. Khelil -Radji, F .Z .A . (2015). Evaluation du potentiel hydrocarbonoclaste des bactéries marines isolées de la côte oranaise. Thèse de doctorat : Sciences de l'environnement. Algérie : Université d'Oran , 163 p .
69. Klimkiewicz-Pawlas, A. and Maliszewska-Kordybach, B. (2003). Effect of anthracene and pyrene on dehydrogenases activity in soils exposed and unexposed to PAHs. Water, Air, and Soil Pollution, 145(1-4), p 169-186.
70. Kumar, B.L. and Gopal, D.S. (2015). Effective role of indigenous microorganisms for sustainable environment. 3 Biotech, 5(6), p 867-876.
71. Leahy, J.G. and Colwell, R.R .(1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 54(3), p 305-315.
72. Lecomte, P. (1995). Les sites pollués, traitement des sols et des eaux souterraines. Édition Lavoisier, TEC & DOC, p. 198.
73. Lefebvre, G. (1987). Chimie des hydrocarbures, édition Technip, Paris, p 9-60.
74. Lemièrre, B., Seguin, J.J., Le Guern, C., Guyonnet, D., Baranger, P., Saada, A., Darmendrail, D., Conil, P., Bodénan, F., Fauconnier, D. and Hubé, D. (2001). Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. BRGM éditions, 300, 132 p.
75. Mairif, S. (2014). Contribution à l'étude de l'effet toxique des pesticides à usage domestique utilisé en Algérie. Thèse de doctorat. Algérie : Université 8 Mai 1945-Guelma ,115 p .
76. Malayri, B. E. (1995). Décontamination des sols contenant des métaux lourds à l'aide de plantes et de microorganismes. Thèse de doctorat : Biologie végétale. France : Université Henri Poincaré - Nancy 1 , 99 p .
77. Mao, Z., Yu, C. and Xin, L. (2015). Enhancement of phenol biodegradation by *Pseudochrobactrum sp.* through ultraviolet-induced mutation. International journal of molecular sciences, 16(4), p 7320-7333.

- 78. Marchand, M., Caprais, J.C., Corre, S., Jacq, E. and Hussein, D . (1994).** Utilisation des hydrocarbures par la microflore bactérienne du site hydrothermal du bassin de Guaymas (Golfe de Californie). *Oceanologica Acta*, 17(2), p 177-189.
- 79. Martin, F. (2011).** Exploration de la biodiversité bactérienne dans un sol pollué par les hydrocarbures: analyse par marquage isotopique du potentiel métabolique et de la dynamique des communautés impliquées dans la dégradation. Thèse de doctorat : Chimie Biologie. Université de Grenoble, 249 p.
- 80. Mersch, J., Dubost, N. and Pihan, J.C. (1993).** Comparaison de plusieurs supports analytiques inertes et biologiques pour apprécier la contamination métallique de la retenue du site électronucléaire de Cattenom, France. In *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology* (Vol. 29, No. 3, p 325-337). EDP Sciences.
- 81. Meulenberg, R., Rijnaarts, H.H., Doddema, H.J. and Field, J.A . (1997).** Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiology Letters*, 152(1), p 45-49.
- 82. Miyasaka, T., Asami, H. and Watanabe, K. (2006).** Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation*, 17(3), p 227-235.
- 83. Mohn, W.W. and Stewart, G.R. (2000).** Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(8-9), p 1161-1172.
- 84. Musat, F., Galushko, A., Jacob, J., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Wilkes, H., Schink, B. and Rabus, R. (2009).** Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology*, 11(1), p 209-219.
- 85. Neff, J.M., Ostazeski, S., Gardiner, W. and Stejskal, I. (2000).** Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(7), p 1809-1821.
- 86. Nicklin, J., Graeme-cook, K., Paget,T., Killington,R. (2000).** L'essentiel en microbiologie. Port Royal livres. Berti edition, p113-121.
- 87. Nicolas, G., Gaëlle, T-Bouchet., Paule-Émilie, G., Alexandre, O. et Félix, D. (2015).** Hydrocarbures Pétroliers : Caractéristiques, Devenir Et Criminalistique Environnemental, 41 p.
- 88. Noel, C. (2014).** Suivi de la biodégradation des hydrocarbures par le couplage des mesures géophysiques électriques du sol (polarisation provoquée) et des analyses des gaz (concentration du CO₂ et isotopie du carbone). Thèse de doctorat : Sciences de la Terre et de l'Atmosphère. France : Université d'Orléans, 255 p .

89. **Odokuma, L.O. and Dickson, A.A . (2003).** Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forest soil. *Global Journal of Environmental Sciences*, 2(1), p 29-40.
90. **Oliveira, V., Gomes, N.C., Almeida, A., Silva, A.M., Silva, H. and Cunha, Â . (2015).** Microbe-assisted phytoremediation of hydrocarbons in estuarine environments. *Microbial ecology*, 69(1), p 1-12.
91. **Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S. and Yao, Q.H. (2008).** Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS microbiology reviews*, 32(6), p 927-955.
92. **Prince, R.C., Garrett, R.M., Bare, R.E., Grossman, M.J., Townsend, T., Suflita, J.M., Lee, K., Owens, E.H., Sergy, G.A., Braddock, J.F. and Lindstrom, J.E. (2003).** The roles of photooxidation and biodegradation in long-term weathering of crude and heavy fuel oils. *Spill Science & Technology Bulletin*, 8(2), p 145-156 .
93. **Rachel, V. (2007) .** Génétique moléculaire , 97 p .
94. **Radović, J.R., Domínguez, C., Laffont, K., Díez, S., Readman, J.W., Albaigés, J. and Bayona, J.M. (2012).** Compositional properties characterizing commonly transported oils and controlling their fate in the marine environment. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(12). p 3220-3229.
95. **Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I.M . (2002).** Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource technology*, 85(3), p 257-261.
96. **Rivière, J. L. (1998).** Les sites pollués : Traitement des sols et des eaux souterraines. Edt Lavoisier Tec et Doc, Paris, p 204.
97. **Rocha, C.A., Pedregosa, A.M. and Laborda, F. (2011).** Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. *AMB express*, 1(1), p 1-10.
98. **Roger, P. et Jacq, V. (2000).** Introduction à la bioremédiation des sols, des eaux et de l'air , 99 p
99. **Rouidi, S. (2014).** Évaluation de la contamination par les hydrocarbures des sédiments superficiels (fluviaux et marins) de la région de Skikda (nord-est algérien). *Analyses statistiques . thèse de doctorat : Biologie Végétale et Environnement. Algérie: Université Badji Mokhtar – Annaba ,163 p.*
100. **Saidi-Ouahrani, N. (2018).** Les mutations ponctuelles . Université USTO. FSNV. SOCLC. L2. Matière : Génétique, 9 p .

- 101. Saint-Denis, M. and Sycot, V.D.D.R. (1909).** Synthèse des connaissances sur les impacts environnementaux et les risques sanitaires de l'incinération, de la méthanisation, et des centres de stockage.
- 102. Salam, L.B., Obayori, O.S., Akashoro, O.S. and Okogie, G.O. (2011).** Biodegradation of bonny light crude oil by bacteria isolated from contaminated soil. *Int J Agric Biol*, 13(2), p 245-50.
- 103. Samanta, S.K., Singh, O.V. and Jain, R.K. (2002).** Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *TRENDS in Biotechnology*, 20(6), p 243-248.
- 104. Sardrood, B.P., Goltapeh, E.M. and Varma, A. (2013).** An introduction to bioremediation. In *Fungi as bioremediators*, Springer, Berlin, Heidelberg, p 3-27.
- 105. Sauret, C. (2011).** Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière. Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des polluants. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie.
- 106. Scott, C.C. and Finnerty, W.R. (1976).** A comparative analysis of the ultrastructure of hydrocarbon-oxidizing micro-organisms. *Microbiology*, 94(2), p 342-350.
- 107. Seo, J.S., Keum, Y.S. and Li, Q.X. (2009).** Bacterial degradation of aromatic compounds. *International journal of environmental research and public health*, 6(1), p 278-309.
- 108. Sikkema, J., de Bont, J.A. and Poolman, B. (1994).** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of biological Chemistry*, 269(11), p 8022-8028.
- 109. Singh, H. (2006).** Mycoremediation: fungal bioremediation. John Wiley & Sons.
- 110. Si-Zhong, Y., Hui-Jun, J., Zhi, W., Rui-Xia, H.E., Yan-Jun, J.I., Xiu-Mei, L.I. and Shao-Peng, Y.U. (2009).** Bioremediation of oil spills in cold environments: a review. *Pedosphere*, 19(3), p 371-381.
- 111. So, C.M., Phelps, C.D. and Young, L.Y. (2003).** Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), p 3892-3900.
- 112. Solano-Serena, F., Marchal, R. and Vandecasteele, J.P. (2001).** Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement: de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants. *Oil & Gas Science and Technology*, 56(5), p 479-498.
- 113. Soltani, M. (2004).** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de doctorat : chimie analytique. France : Université Paris 6, 284 p.
- 114. Speight, J. G. (2014).** *The Chemistry and Technology of Petroleum – Fifth Edition*. CRC Press, États-Unis, 984 p.

- 115. Surchamp, A. (2016)** . Emissions potentielles de polluants organiques persistants à partir du milieu urbain et par les activités de traitement des déchets: impact sur la qualité de l'air au voisinage des sources. Thèse de doctorat de Géosciences : Sciences de la Terre. France :Université Pierre et Marie Curie - Paris VI ,325 p .
- 116. Sutherland, J.B., Raffi, F., Khan, A. A. et Cerniglia, C.E. (1995)**. Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. In Microbial Transformation and degradation of toxic organic chemicals. Edited by Young, L.L and C.E. Cerniglia. Wiley-Liss. New York.
- 117. Sutton, N.B., Grotenhuis, J.T.C., Langenhoff, A.A. and Rijnaarts, H.H. (2011)**. Efforts to improve coupled in situ chemical oxidation with bioremediation: a review of optimization strategies. Journal of Soils and Sediments, 11(1), p 129-140 .
- 118. Syakti, A.D. (2004)**. Biotransformation des hydrocarbures pétroliers et effets sur les acides gras phospholipides de bactéries hydrocarbonoclastes marines. Thèse de doctorat. France : Université de Droit, d'Economie et des Sciences (Aix Marseille III) .
- 119. Tabatabaee, M.S. and Assadi, M.M . (2013)** . Vacuum distillation residue upgrading by an indigenous *Bacillus cereus*. Journal of Environmental Health Science and Engineering, 11(1), p 18.
- 120. Técher, D. (2011)**. Réhabilitation de sols pollués par des HAP grâce aux bactéries associées à la rhizosphère de *Miscanthus x giganteus*. Thèse de doctorat : Toxicologie de l'environnement. France . Université Paul Verlaine de Metz , 307 p.
- 121. Turner, P. C. (1999)**. L'essentiel en biologie moléculaire. Ed. BERTI, 345 p.
- 122. Van der Meer, J.R. and Sentschilo, V. (2003)**. Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. Current opinion in biotechnology, 14(3), p 248-254.
- 123. Van Der Meer, J.R., De Vos, W.M., Harayama, S. and Zehnder, A.J . (1992)**. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 56(4), p 677-694 .
- 124. Van Hamme, J.D., Singh, A. and Ward, O.P. (2003)**. Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and molecular biology reviews, 67(4), p 503-549.
- 125. Wang, R.F., Wennerstrom, D., Cao, W.W., Khan, A.A. and Cerniglia, C.E. (2000)**. Cloning, Expression, and Characterization of the *katG* Gene, Encoding Catalase-Peroxidase, from the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium *Mycobacterium sp.* Strain PYR-1. Applied and Environmental Microbiology, 66(10), p 4300-4304.
- 126. Wang, W., Wang, L. and Shao, Z. (2010)**. Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (*alkB*) genes in the subtropical seawater of Xiamen Island. Microbial Ecology, 60(2), p 429-439.

127. Whyte, L.G., Bourbonniere, L. and Greer, C.W. (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalène (nah) catabolic pathways. Applied and environmental microbiology, 63(9), p 3719-3723.
128. Whyte, L.G., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonnière, L., Inniss, W.E. and Greer, C.W. (1998). Biodegradation of Variable-Chain-Length Alkanes at Low Temperatures by a Psychrotrophic *Rhodococcus* sp. Applied and environmental microbiology, 64(7), p 2578-2584.
129. Widdel, F. and Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. Current opinion in biotechnology, 12(3), p 259-276.
130. Wielgoss, S., Barrick, J.E., Tenaillon, O., Cruveiller, S., Chane-Woon-Ming, B., Médigue, C., Lenski, R.E. and Schneider, D. (2011). Mutation rate inferred from synonymous substitutions in a long-term evolution experiment with *Escherichia coli*. G3: Genes, Genomes, Genetics, 1(3), p 183-186 .
131. Winter, P. C., Hickey, G.I., Fletcher, H.L. (2000). L'essentiel en génétique. Port Royal livres. BERTI Editions, p 101-115.
132. Yakimov, M.M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N. (2003). *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 53(3), p 779-785.

Web graphie :

- Site web 1 : <https://www.u-picardie.fr/beauchamp/duce/mignot.htm> (consulté le 27/10/2020)
- Site web 2 : <http://www.sommeillesvt.sitew.com/fs/root/7vrf0-chapitre4> (consulté le 19/05/2020).
- Site web 3: <http://accs.ens-lyon.fr/biotic/genetic/mutation/html/mutagen.htm> (consulté le 03/06/2020).
- Site web 4:
<http://www.embryology.ch/francais/kchromaber/popupchromaber/00objectif/mfmutagen/physikal.html> (consulté le 07/06/2020).
- Site web 5: <https://www.maxicours.com/se/cours/les-agents-mutagenes/> (consulté le 15/06/2020).
- Site web 6: <https://www.bioutils.ch/protocoles/7-mutagenese-par-luv> (consulté le 15/06/2020).

Année universitaire : 2019/2020

**Présenté par : MERABET Hadjer
KITA Maroua**

Etude de bioremédiation des sols pollués par les hydrocarbures et son amélioration par mutagenèse.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Ecologie microbienne

Résumé

En raison de leur persistance et génotoxicité, les hydrocarbures pétroliers présentent un problème environnemental majeur. Plusieurs techniques ont été mises en évidence pour lutter contre cette pollution, parmi ces techniques, la bioremédiation qui se base sur l'utilisation de microorganismes pour transformer ces composés en formes moins dangereuses ou non dangereuses avec moins d'apport de produits chimiques et d'énergie. La biodégradation des hydrocarbures a été largement étudiée et de nombreuses souches microbiennes ont été isolées en raison de leur capacité à métaboliser les hydrocarbures avec des taux de dégradation variables. Ils sont capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers en les utilisant comme seules sources de carbone et d'énergie. L'amélioration génétique par mutagenèse via les rayons ultraviolets, de souches dégradantes des hydrocarbures a rapporté des mutants présentant une capacité plus importante de dégradation de pétrole et de diesel.

La bioremédiation des sols contaminés par des hydrocarbures pétroliers dans différentes conditions a été menée en utilisant principalement des bactéries Gram négatives comme *Pseudomonas*, qui est le genre de bactéries le plus prometteur dans ce domaine. La capacité de *Pseudomonas sp.* d'utiliser les hydrocarbures a été expliquée par la production de biosurfactants lipidiques pour la dégradation des alcanes.

Mots clés : pollution, hydrocarbures pétroliers, bioremédiation, mutation, les ultraviolets.

Jury d'évaluation :

Président du jury : OULMI Lamia (MCB- UFM Constantine).

Rapporteur : ZERMANE Férial (MAA- UFM Constantine).

Examineur : GUERGOURI Ibtissem (MAA- UFM Constantine).

Date de soutenance : 30/09/2020