



HAL
open science

Accumulation et toxicité du cadmium chez les bactéries Gram négatives : rôle des enveloppes bactériennes

Pascale Bauda

► **To cite this version:**

Pascale Bauda. Accumulation et toxicité du cadmium chez les bactéries Gram négatives : rôle des enveloppes bactériennes. Sciences de l'environnement. Université Paul Verlaine - Metz, 1986. Français. NNT : 1986METZ003S . tel-01775695

HAL Id: tel-01775695

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775695>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE DE DOCTORAT
PRÉSENTÉE LE 18 FÉVRIER 1986 PAR
PASCALE BAUDA

ACCUMULATION ET TOXICITE DU CADMIUM
CHEZ LES BACTÉRIES GRAM NÉGATIVES :
RÔLE DES ENVELOPPES BACTÉRIENNES

MEMBRES DU JURY : J.C. BLOCK, PRÉSIDENT

P. VASSEUR
J. REMACLE
A. BOUDOU
C. DESHAYES

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE -METZ	
N° inv.	1986 0065
Cote	S/M ₃ 86/3
Loc	Magasin

Ce travail a fait l'objet d'un contrat avec le Ministère de l'Environnement, Mission des Etudes et de la Recherche (contrat n° 83037).

Monsieur Jean-Claude BLOCK, Président de ce Jury a été l'instigateur de ce travail et en a assuré la direction. Sa rigueur intellectuelle et ses conseils avisés m'ont permis de mener à bien ce travail. Je tiens à lui exprimer ici, un témoignage de mon amitié et ma sincère gratitude.

Je suis particulièrement sensible à la présence dans mon Jury de Messieurs Jean REMACLE, Alain BOUDOU et Christian DESHAYES et les remercie pour s'être déplacés afin de juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur Luc MARCHAL, du Laboratoire de Microscopie Electronique du Professeur GRIGNON, qui m'a fait bénéficier de son expérience et m'a ainsi permis de conforter mes résultats analytiques.

Je suis reconnaissante à Messieurs Christophe MOUVET, Claude CROCHARD et Michel RIBETTE pour leur collaboration scientifique et matérielle à ce travail.

Madame Paule VASSEUR, Monsieur Paul LEHR et Monsieur Jean-François FERARD ont suivi avec bienveillance le déroulement de mes travaux. Leur attitude critique et leurs encouragements ont été un soutien précieux.

Je n'aurais garde d'oublier Monsieur Armand MAUL pour sa contribution à la partie statistique de ce mémoire, ainsi que Mesdames Marie-Andrée DOLLARD, Chantal BOUZZENDORFER et Claudine RAST pour leur collaboration technique et avisée.

Enfin, je tiens également à témoigner mon amitié et mes encouragements à Jairo de FALLA, Pascal GARSOT, Jean-Pierre HUSSENOT, Jean-Pierre FLAMBEAU, Véronique THARREAU ainsi qu'à tous les camarades de laboratoire qui ont su à des titres divers m'apporter leur aide.

1 - INTRODUCTION

La toxicité du cadmium, en particulier au niveau rénal et osseux, ainsi que sa concentration dans les organismes vivants le long des chaînes alimentaires font que ce métal est bien connu des toxicologues.

Par contre, les mécanismes d'accumulation au niveau cellulaire sont loin d'être explicités surtout chez les procaryotes. Compte tenu de l'importance des rejets industriels dans l'environnement, nous avons choisi d'étudier l'accumulation et la toxicité du cadmium chez une population bactérienne pour au moins trois raisons :

1. Le compartiment bactérien est l'un des plus importants de la biosphère, et les bactéries sont associées à des milieux très divers (eau, sol, air).
2. Les populations bactériennes constituent des "systèmes" réactifs capables d'accumuler (Drapeau et al., 1983) et parfois de transformer les métaux (Summers et Silver, 1978).
3. Enfin, les bactéries constituent le premier maillon de la plupart des chaînes alimentaires, à ce titre leur susceptibilité aux toxiques est un facteur important à connaître et à comprendre pour la protection de l'Homme et de son environnement.

A ces raisons s'ajoute le fait que les boues de stations d'épuration, essentiellement constituées de bactéries, accumulent les métaux de manière non sélective en quantités importantes (Sterritt et Lester, 1981 ; Maeda et Azumi, 1982). Cette accumulation est intéressante en termes d'épuration en métaux mais elle limite la valorisation agricole des boues produites.

L'objectif de cette étude est, au travers d'une démarche fondamentale, d'appréhender chez une population bactérienne gram négative les mécanismes d'accumulation et de toxicité du cadmium. Le choix d'une population gram négative a été guidé par le fait que ces bactéries sont les plus représentées dans l'environnement. Le choix du cadmium a été conditionné par la toxicité de cet élément en tant que rejet industriel et les travaux antérieurs du laboratoire concernant l'accumulation et la toxicité du cadmium chez les algues (Truhaut et al., 1980).

Au terme d'une analyse bibliographique concernant le cadmium et ses propriétés, l'accumulation du métal par les bactéries et enfin les mécanismes de toxicité et de résistance développés par les populations bactériennes, nous avons cherché expérimentalement à répondre à plusieurs questions.

Tout d'abord quelles étaient les caractéristiques de l'accumulation du cadmium par une population bactérienne gram négative ?

Ainsi, la vitesse d'accumulation du métal, son énergie dépendance, la spécificité de l'accumulation et la toxicité du métal ont été étudiées chez *Pseudomonas fluorescens*.

Ces premiers travaux suggéraient que l'accumulation du cadmium était en partie un processus d'adsorption.

Quelles étaient donc les structures bactériennes périphériques capables d'adsorber le cadmium ? Ces structures avaient-elles un effet protecteur vis à vis de la toxicité du métal ?

Pour répondre à ces questions, le rôle des exopolysaccharides, de la membrane externe et du peptidoglycane sur l'accumulation et la toxicité du cadmium ont été déterminés indirectement sur divers modèles bactériens.

Enfin, nous nous sommes demandés quels étaient les groupements chimiques fixateurs de cadmium au sein des bactéries et dans ce cadre les groupements carboxyles ont été plus particulièrement étudiés.

2 - ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. LE CADMIUM : RESSOURCES NATURELLES

Les ressources en cadmium d'origine naturelle sont difficiles à estimer essentiellement parce que le minerai de cadmium a peu d'intérêt commercial de telle sorte que la répartition du métal a été très peu étudiée. Il semble, toutefois, que le cadmium soit réparti uniformément dans les différents minéraux de la croûte terrestre à une concentration moyenne comprise entre 0,15 et 0,2 ppm. L'espèce la plus représentée est le sulfure de cadmium (Cd S) qui, selon le type de réseau cristallin, forme la greenockite (réseau hexagonal), l'hawleyite (réseau cubique), la xanthochroite (système amorphe). Les oxydes et les carbonates de cadmium existent aussi, ainsi que la saukovite, un sulfure mixte de cadmium et de mercure (BABICH et STOTZKY, 1978). L'érosion de la croûte terrestre entraîne un relargage du cadmium dans les sols, les systèmes aquatiques, mais cette étape importante du cycle global du cadmium ne constitue toutefois qu'un apport mineur aux concentrations mesurées dans l'environnement. L'activité volcanique, par contre, est considérée comme une des sources naturelles du cadmium majeure dans l'atmosphère. Ainsi, une étude des éléments traces émis par le Mont ETNA en SICILE, a permis d'estimer à 10 tonnes/an le cadmium libéré dans l'atmosphère, sous forme particulaire, sans prendre en compte le cadmium à l'état gazeux (HUTTON, 1983).

2.1.1. Autres sources

Les principales sources de cadmium dans l'environnement ne sont pas liées à l'exploitation du cadmium en tant que telle, mais résultent d'activités telles que l'extraction des métaux non ferreux, essentiellement le zinc, le cuivre, et le plomb auxquels le cadmium est très souvent associé sous forme de sulfure (HISCOCK, 1983), la combustion des combustibles fossiles, etc... ce qui en rend l'estimation difficile (KORTE, 1983).

Le tableau 1 rapporte les valeurs concernant les rejets de cadmium dans la communauté européenne par secteur d'activité (HUTTON, 1983).

Tableau 1. Principaux rejets de cadmium dans les divers compartiments de la Communauté Européenne, exprimés en tonnes/an.

ND : non déterminé d'après HUTTON (1983).

SOURCE	COMPARTIMENT		
	AIR	TERRE	EAU
Activité volcanique	20	ND	ND
Production des métaux non ferreux :			
zinc et cadmium	20	200	50
cuivre	6	15	ND
plomb	7	40	20
Matériaux contenant du cadmium	3	90	108
Production de fer et d'acier	34	349	ND
Combustion des combustibles fossiles :			
charbon	8	390	ND
pétrole et gaz	0.5	14.5	-
Boues activées	2	130	33
Engrais phosphatés	-	346	62

En ce qui concerne les utilisations du cadmium proprement dit, la consommation mondiale, entre 1970 et 1979, fluctuait autour de 10 000 tonnes/an et concernait pour :

- 30 % l'industrie des pigments
- 15 % les stabilisants
- 10 % les batteries
- 10 % la galvanoplastie
- 10 % les alliages
- 15 % les traitements de surfaces.

Si cette consommation aujourd'hui ne semble augmenter que très lentement (moins de 2 % par an), l'utilisation industrielle du zinc et du cadmium ce dernier siècle a tout de même entraîné une contamination de l'environnement telle que la concentration en cadmium a doublé dans le blé et a triplé dans les reins des suédois entre 1916 et 1972 (KORTE, 1983).

2.2. CLASSIFICATION ET PROPRIETES

Les points de fusion et d'ébullition du cadmium sont respectivement 321°C et 765°C, ce qui est faible par rapport à la plupart des autres métaux. Dans la classification périodique des éléments, le cadmium avec le zinc et le mercure forme le groupe II B des métaux de transition. Toutes les couches électroniques sont saturées, sauf la plus externe qui possède seulement deux électrons. Ainsi, la seule forme stable du cadmium possède une électrovalence de 2.

Les composés du cadmium : sulfure (Cd S), carbonate (Cd CO_3) et oxyde (Cd O) sont légèrement solubles dans l'eau. La forme hydroxyde (Cd OH_2) est par contre pratiquement insoluble (BOURG, 1984), cette formation d'hydroxyde entraîne la précipitation du cadmium en solution aqueuse à pH alcalin.

La spéciation chimique des métaux en phase aqueuse dépend principalement de la force ionique, du pH et de la température du milieu, elle peut être calculée si l'on suppose que le système est thermodynamiquement clos (ce qui est faux en présence de matériaux adsorbants) (BOURG, 1984). Les composés alkylés, du type $\text{R}_2 \text{Cd}$ ou R Cd Cl , où R est un hydrocarbure aliphatique, peuvent être syn-

thétisés au laboratoire ou par les bactéries (SUMMERS et SILVER, 1978). Mais, à la différence des dérivés alkylés du mercure, ceux du cadmium sont instables, de ce fait ils ne semblent pas constituer un risque pour les systèmes biologiques (JACOBSON et TURNER, 1980). D'autres critères que la position dans la classification périodique des éléments ont été envisagés pour classer les métaux.

Ainsi le cadmium est souvent rangé dans la catégorie des "métaux lourds" ou encore "métaux traces" sans toutefois que ces termes aient été précisément définis. Par contre, la situation d'un élément sur l'échelle de dureté des ions métalliques, basée sur la capacité de former des liaisons avec F^- , est plus intéressante car elle laisse présager de l'affinité pour les molécules biologiques (AHR-LAND, 1958, modifiée par PEARSON, 1963). Sur cette échelle, le cadmium se situe parmi les ions doux (ne formant pas de liaison avec F^-) mais capables de former des liaisons très fortes avec CN^- , RS^- , SH , NH_2 et les groupements imidazoles, c'est-à-dire des groupements comprenant des atomes de soufre et d'azote.

Une classification plus récente présentée sur la figure 1 subdivise les métaux en trois classes : la classe A englobe les métaux ayant une affinité pour l'oxygène, la classe B comprend ceux qui ont une affinité pour l'azote et le soufre et enfin une troisième classe, dite intermédiaire, dans laquelle le cadmium est classé, qui correspond aux éléments ayant une affinité à la fois pour l'oxygène, l'azote et le soufre (NIEBOER et RICHARDSON, 1980).

L'intérêt de ce type de classification est qu'elle permet de prévoir les sites de fixation potentiels des métaux au sein du matériel biologique. Ainsi, des études cristallographiques ont permis de déterminer les sites de fixation des métaux dans les protéines selon leur appartenance à la classe A ou B (Tableau 2).

Les métaux de la classe intermédiaire peuvent interagir avec tous les groupements fonctionnels cités dans le tableau 2. L'appartenance du cadmium à cette classe en fait un ligand potentiel des protéines, des phospholipides, des polysaccharides et des acides nucléiques.

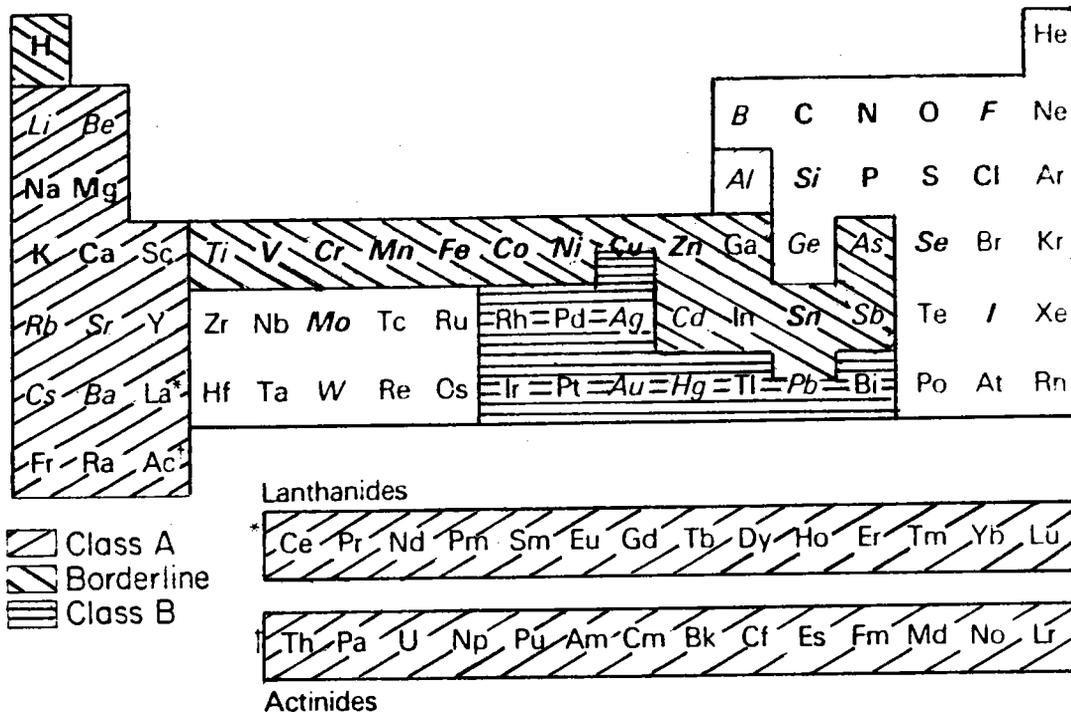


Figure 1. Classification périodique des éléments montrant la disposition des métaux et métalloïdes dans les classes A, B et intermédiaires (d'après NIEBOER et RICHARDSON, 1980).

Tableau 2. Sites de fixation des métaux dans les protéines (d'après NIEBOER et RICHARDSON, 1980) basés sur les travaux de BLUNDELL et JOHNSON (1976), BLUNDELL et JENKINS (1977), HODGSON (1977) et MARZILLI (1977).

Groupements fonctionnels ayant de l'affinité pour les métaux de la classe A		Groupements fonctionnels ayant de l'affinité pour les métaux de la classe B	
Carboxyle	$\text{R} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{O}$	thiol	- SH
Carbonyle	$\text{R} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{OR} \quad \text{R} - \text{NH} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{R}$	disulfure	- S - S -
Alcool	$\text{R} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{OH}$	thioether	- S - R
Phosphate	$\text{R} - \text{OPO}_3^{2-}$	amine	- NH ₂
Phosphodiester	$\text{R} - \text{O} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{P} - \text{OR}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{O}^-$	hétérocycles azotés : imidazole, bases nucléotidiques	

2.3. ACCUMULATION DU CADMIUM PAR LES BACTERIES

2.3.1. L'accumulation des métaux par les microorganismes est influencée par de nombreux facteurs physico-chimiques et biologiques.

L'accumulation des métaux par les bactéries a été souvent rapportée durant cette dernière décennie. Toutefois, l'hétérogénéité des résultats obtenus reflète la diversité des paramètres intervenant dans la bioaccumulation des métaux et la difficulté à bien les contrôler. Ces paramètres peuvent être répartis d'une manière simple en trois groupes qui, cependant, ne sont pas indépendants les uns des autres. Ce sont :

- 1 - Les paramètres liés au microorganisme
- 2 - Les paramètres liés au métal
- 3 - Les paramètres liés au milieu.

2.3.1.1. Paramètres liés au microorganisme

Les bactéries sont capables d'accumuler les métaux et même de les concentrer. Cette propriété peut s'exprimer par un facteur de concentration qui correspond au rapport du cadmium fixé par les bactéries (en $\mu\text{g/g}$ poids sec) sur le cadmium ajouté en solution (en mg/l). Les facteurs de concentration du cadmium obtenus avec diverses souches bactériennes ont été portés dans le tableau 3. Ainsi, les valeurs rapportées peuvent varier d'un facteur 100 en fonction de la souche bactérienne testée : de 151 chez *Alcaligenes eutrophus* pour la plus faible valeur à 51 200 chez *Pseudomonas cepacia*.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette variabilité : la taille du microorganisme, sa charge électrique périphérique, sa composition chimique et son activité physiologique. Les tailles de microorganismes reportées dans le tableau 3 montrent qu'il n'existe pas de corrélation simple entre la taille des bactéries et le facteur de concentration du cadmium. Par contre, l'importance de la composition chimique des enveloppes cellulaires a été mise en évidence par une étude comparative de la fixation de 15 métaux par des parois extraites à partir d' *Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis* . Les résultats révélaient une fixation approximativement dix fois supérieure avec les parois de

Tableau 3. Facteur de concentration du cadmium par différentes populations bactériennes (rapport : $\frac{\text{Cd fixé } \mu\text{g/g poids sec}}{\text{Cd en solution mg/l}}$).

Souche bactérienne	Facteur de concentration du cadmium	Références	Taille moyenne des microorganismes étudiés
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	151	SIMON <u>et al.</u> , 1985	0,5 μm sur 1,8 à 2,6 μm
<i>Escherichia coli</i>	1760	DRAPEAU <u>et al.</u> 1983	1,1 à 1,5 μm sur 2,0 à 3,0 μm
Population bactérienne mixte	1260	REMACLE, 1981	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2260	DRAPEAU <u>et al.</u> 1983	0,5 à 0,7 μm sur 1,5 à 3,0 μm
	2500	STRANDBERG <u>et al.</u> , 1981	0,5 à 0,7 μm sur 1,5 à 3,0 μm
<i>Pseudomonas cepacia</i>	51200		0,8 à 1,0 μm sur 1,6 à 3,2 μm
<i>Salmonella pullorum</i>	1580	DRAPEAU <u>et al.</u> , 1983	0,7 à 1,5 μm sur 2,0 à 5,0 μm
<i>Salmonella typhimurium</i>	3600	" "	0,7 à 1,5 μm sur 2,0 à 5,0 μm
<i>Shigella sonnei</i>	740	" "	
<i>Staphylococcus aureus</i>	5360	" "	ϕ : 0,8 à 1,0 μm
<i>Streptococcus faecalis</i>	1440	" "	ϕ : 0,5 à 1,0 μm
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3020	" "	0,5 à 0,8 μm sur 1 à 3 μm

B. subtilis (BEVERIDGE et MURRAY, 1976 ; BEVERIDGE et KOVAL, 1981), à titre d'exemple 0,035 μ moles/g de paroi contre 0,399 μ moles/g de paroi dans le cas du calcium.

Les modifications de l'état physiologique des bactéries peuvent alors expliquer les variations des facteurs de concentrations présentés dans le tableau 3. En effet, les modifications de l'état physiologique sont corrélées avec des modifications d'activité métabolique, mais aussi avec des modifications de composition chimique des enveloppes susceptibles de modifier la charge électrique superficielle (RANDLE et al., 1969). Dans ces conditions, les différences rapportées dans le tableau 3 tiennent sûrement à la fois de la nature des microorganismes et de l'absence de standardisation des cultures bactériennes réalisées par les différents auteurs. D'ailleurs, dans la plupart des travaux publiés, le paramètre croissance bactérienne dans des milieux contenant des concentrations différentes en métaux n'est pris en compte qu'en terme de biomasse et l'état physiologique des cellules bactériennes n'est pas considéré.

2.3.1.2. Les paramètres liés au métal

Chaque métal a des propriétés propres relatives à son rayon ionique, son rayon hydraté, sa valence, sa charge électrique, qui le rangent dans la classe A, B ou intermédiaire de la classification de NIEBOER et RICHARDSON (1980). De plus, la concentration, la nature du sel utilisé et les diverses espèces chimiques du métal présentes en solution, contrôlent partiellement sa toxicité.

Ces divers facteurs n'ont pas été systématiquement étudiés, en outre il est pratiquement impossible de les faire varier indépendamment l'un de l'autre : faire varier la concentration en métal ajouté ou le sel métallique modifie la spéciation chimique du métal en solution. En effet, pour un métal et son sel donné, et à une concentration donnée, la spéciation dépend des facteurs du milieu comme le pH, la température, la force ionique, le potentiel d'oxydo-réduction, et la présence d'adsorbants (BOURG, 1984).

Toutefois, une augmentation de la concentration en métal ajouté dans un milieu donné entraîne une augmentation du métal accumulé par les bactéries présentes dans ce milieu (CHOPRA, 1975 ; DOYLE et al., 1975 ; HOUBA et REMACLE, 1982).

Cependant, l'état physiologique étant rarement pris en considération, il est difficile dans ces conditions de déduire l'influence de la concentration en métal sur l'accumulation de ce métal par les bactéries sans émettre à nouveau certaines réserves. Les auteurs sont contraints aujourd'hui de réaliser des études de spéciation dans leurs conditions expérimentales de façon à connaître le plus précisément possible les caractéristiques du métal en solution.

2.3.1.3. Les paramètres du milieu

Ces paramètres ont une influence au niveau de la bactérie en lui imposant un taux de croissance, une composition chimique et une charge électrique périphérique, mais aussi en ce qui concerne le pH, la température, la force ionique et la présence d'adsorbants, au niveau de la spéciation.

a) Effets du pH

La figure 2 présente le diagramme d'équilibres tension - pH du système cadmium - eau à 25°C. Dans ce diagramme l'hydroxyde $\text{Cd}(\text{OH})_2$ apparaît comme la forme thermodynamiquement la plus stable des oxydes de cadmium pour des pH supérieurs à 7. Toutefois, ce type de diagramme n'est valable qu'en absence de substances pouvant former avec le cadmium des complexes solubles et des sels insolubles (POURBAIX, 1963).

En réalité, la plupart des anions complexent Cd^{2+} (NIEBOER et RICHARDSON, 1980 ; JACOBSON et TURNER, 1980). C'est le cas des Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, mais aussi NH_3 et HCN . Par contre, un grand nombre de sels sont peu, sinon pas solubles. Parmi eux il faut citer les carbonates, les cyanures, les phosphates et les sulfures.

Aussi, l'effet du pH sur l'accumulation du cadmium par les bactéries résulte à la fois d'un effet sur les bactéries (modification de la charge électrique périphérique) et sur la spéciation du métal d'autre part. Ainsi, la fixation bactérienne du cadmium est facilitée à pH alcalin car des sites de fixation périphériques anioniques préalablement occupés par des protons se trouvent disponibles. Cet effet pH, a été mis en évidence chez les bactéries par MARQUIS et al. (1976) et chez les algues par STARY et al. (1984) sur des parois isolées. De la même manière, il a été rapporté qu'une acidification du milieu entraîne un relargage des métaux retenus au niveau d'une boue activée (GOULD et GENETELLI, 1984 ; ADAMS et SANDERS, 1984).

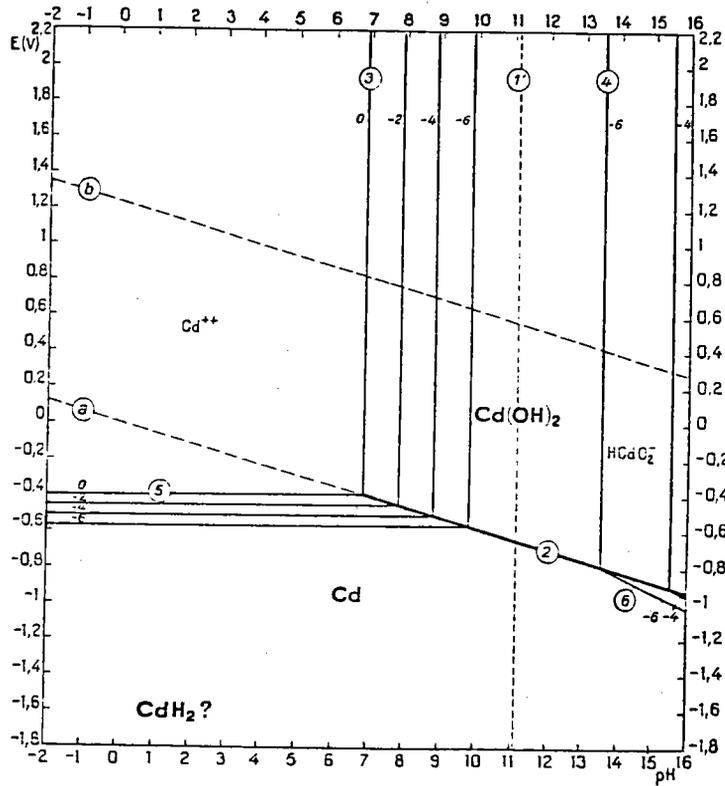


Figure 2. Diagramme d'équilibres tension-pH du système cadmium-eau à 25°C, (d'après POURBAIX, 1963).

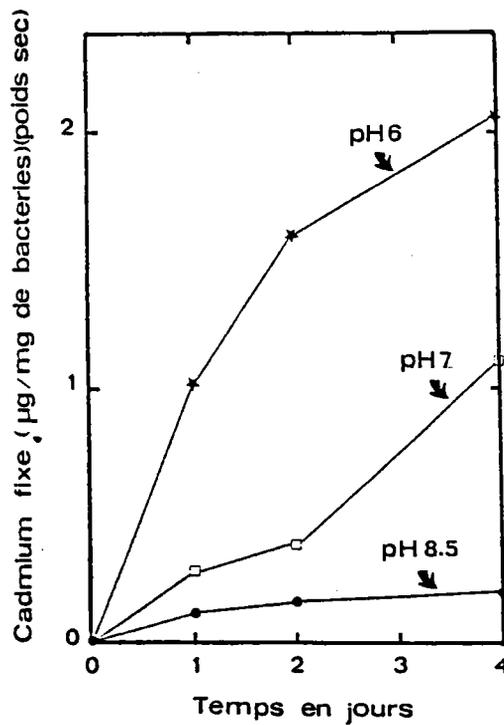


Figure 3. Influence du pH sur la cinétique de fixation du cadmium à 23°C, par *Pseudomonas sp.* (d'après TITUS et PFISTER, 1982).

Par contre, à cet effet se superpose celui du pH sur la spéciation du cadmium qui se traduit par la formation d'hydroxyde de cadmium insoluble présent en quantité maximale à pH 11 (POURBAIX, 1963).

Il n'est donc pas surprenant que l'effet global du pH sur la fixation du cadmium par les bactéries soit controversé. Ainsi, dans un domaine de pH allant de 6 à 8,5, la fixation du cadmium par *Pseudomonas sp.* diminue quand le pH augmente (Figure 3), alors que NORBERG et PERSSON (1984) ont observé une augmentation de 45 % du cadmium fixé par *Zoogloea ramigera* 115 pour une augmentation du pH de 5,5 à 8. Ce résultat est confirmé par les travaux de SIMON (communication personnelle) sur *Alcaligenes eutrophus* dans un domaine de pH compris entre 3 et 7,5. Dans aucun des cas étudiés un pH optimum pour l'accumulation du cadmium n'a pu être observé.

b) Effets de la température

En ce qui concerne l'influence de la température, les résultats rapportés sont plus homogènes. En général une augmentation de la quantité de métal fixée et de la vitesse de fixation avec la température est observée dans un domaine de température allant de 4 à 35°C (TITUS et PFISTER, 1982). Par contre, la fixation diminuerait pour des températures atteignant 50°C (AJMAL et al., 1982). L'effet de la température sur la bioaccumulation est probablement à relier aux modifications de fluidité membranaire et de vitesse des réactions métaboliques.

c) Effets de la force ionique et des molécules complexantes

L'étude de l'accumulation du cadmium par *Zoogloea ramigera* 115 réalisée dans deux milieux de force ionique différente n'a pas permis de mettre en évidence un quelconque effet de la force ionique sur la bioaccumulation du métal (NORBERG et PERSSON, 1984).

Par contre, dans les études de bioaccumulation et de toxicité des métaux, la présence dans le milieu de molécules capables de complexer ces métaux est un processus important. La nature de ces molécules est extrêmement diverse. La complexation du cadmium a été observée avec les argiles (BABICH et STOTZKY, 1978 ; TITUS et PFISTER, 1982 ; KUREK et al., 1982), avec les acides humiques et fulviques (POMMERY et al., 1985 ; TITUS et PFISTER, 1982), avec d'autres polyacides synthétiques comme l'acide polygalacturonique ou l'acide polymétacry-

lique (JELLINECK et SANGAL, 1972), ou avec les molécules contenues dans les milieux nutritifs habituellement utilisés en bactériologie (RAMAMOORTHY et KUSHNER, 1975).

Un effet protecteur a pu être mis en évidence lorsque le métal est complexé par les argiles et les acides humiques (BABICH et STOTZKY, 1978). De même, la toxicité du cadmium vis à vis des bactéries et des levures est diminuée en présence de cystéine, de glutamate et d'aspartate (TYNECKA et al., 1975 ; STRANDBERG et al., 1981), de citrate ou d'E.D.T.A. (PICKETT et DEAN, 1979).

L'hypothèse la plus probable, pour expliciter cet effet, fait appel à une complexation entre les ions cadmium et les groupements thiols ou carboxyliques des molécules considérées.

Que peut-on conclure à l'issue de ce chapitre ?

Tout d'abord, les paramètres contrôlant l'accumulation des métaux par les bactéries sont multiples. Ces paramètres sont, de plus, difficiles à contrôler, rarement indépendants et par conséquent, il est difficile de les classer par ordre d'importance. Toutefois, l'ensemble des informations rapportées dans la littérature confirme un effet protecteur en présence de matériaux ou molécules ayant la propriété de complexer les métaux. Il reste à savoir si ces observations sont dues à l'incapacité des molécules complexées à s'accumuler ou seulement à réagir avec les cibles sensibles de la cellule.

2.3.2. La fixation du cadmium par les bactéries : un processus rapide et biphasique.

Les études cinétiques de l'accumulation des métaux par les bactéries peuvent être conduites selon deux approches différentes.

La première consiste à mesurer la cinétique d'accumulation du métal par des microorganismes dans un milieu totalement dépourvu d'éléments nutritifs de façon à travailler sur une population non proliférante, afin d'éliminer de l'étude le paramètre croissance, et de limiter les phénomènes de complexation entre métaux et molécules nutritives.

Dans le second type d'approche, c'est l'accumulation du métal par une population bactérienne en croissance qui est mesurée. Dans ce cas, les auteurs rapportent systématiquement les quantités de métal fixé au poids de la biomasse pour permettre les comparaisons. Mais cette dernière approche comporte toutefois deux inconvénients majeurs : premièrement, plus la quantité de métal accumulé est importante, pour une population bactérienne donnée, plus l'estimation du poids sec de la population bactérienne est surestimée ; la quantité de métal fixé rapportée à un poids sec de cellules est donc, elle, sous-estimée. Cette erreur peut être importante quand on sait que le métal accumulé par les bactéries peut atteindre 10 à 15 % du poids sec de celles-ci (STRANDBERG et al., 1981). Le second inconvénient provient du fait, qu'en aucun cas, le paramètre état physiologique n'est pris en compte. Or, son importance dans la bioaccumulation des métaux a été discutée dans le paragraphe 1.1. de ce chapitre. Il semble donc plus simple d'éliminer le paramètre croissance bactérienne dans les études d'accumulation des métaux. C'est pourquoi, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'analyse des travaux réalisés sur des bactéries en suspension non proliférante.

En premier point, l'accumulation du cadmium est un phénomène rapide : 72 à 86 % du cadmium accumulé pendant 4 heures par *Pseudomonas fluorescens* est fixé pendant la première heure (BAUDA et BLOCK, 1985), 60 % de ce même métal accumulé en 6 h. par *Paracoccus sp.* est également fixé après une heure de contact (KUREK et al., 1982). Selon SIMON et al. (1985), la fixation du cadmium par *Alcaligenes eutrophus* est maximale après 15 minutes de contact avec le métal.

L'allure biphasique des cinétiques de bioaccumulation du cadmium est la deuxième constatation consécutive à l'observation des représentations graphiques des courbes d'accumulation. Toutefois, certains obtiennent un plateau (SIMON et al., 1985 ; KAO et al., 1982) alors que d'autres observent une fixation de cadmium plus lente à vitesse constante : $2,5 \mu\text{g/h}/10^9$ bactéries (BAUDA et BLOCK, 1985) ou $4,2 \mu\text{g/h/g}$ de cellules (poids sec) selon KUREK et al. (1982).

La rapidité du processus de bioaccumulation du cadmium tel qu'il est décrit ici et son allure biphasique ne semblent pas relever d'un mécanisme particulier aux bactéries ou au cadmium puisque des observations similaires ont été faites pour l'accumulation de l'uranium par les levures (STRANDBERG et al., 1981), l'accumulation du plomb par *P. atlantica* (HARVEY et LECKIE, 1985),

ou encore pour la fixation du chrome par des érythrocytes humains (BEYERSMANN et al., 1984).

Il convient toutefois d'y opposer les résultats de FLATAU et al. (1984) selon lesquels le cadmium est accumulé par un *Pseudomonas* marin pendant 19 heures à la vitesse constante de 77 $\mu\text{g/h/g}$ de bactéries (poids sec). Par contre, la même étude réalisée sur des bactéries traitées aux cyanures ou à l'éthanol (Figure 4) produit une cinétique biphasique classique comme celles décrites auparavant. Il n'est malheureusement pas possible d'en déduire un mécanisme d'accumulation du métal pour au moins deux raisons :

- l'action des cyanures ou de l'éthanol entraîne des modifications autres que la suppression du métabolisme bactérien. L'éthanol par exemple solubilise en partie la membrane externe (DAVIES et al., 1983),
- aucune donnée n'est fournie sur une éventuelle croissance des bactéries non traitées durant la durée de l'expérimentation.

Quelles hypothèses peut-on poser à partir de ces observations quant au mécanisme de bioaccumulation des métaux ?

La majorité des auteurs supposent que la première partie de la cinétique correspondrait à un processus d'adsorption du métal à la périphérie cellulaire. En ce qui concerne la seconde, deux hypothèses sont plausibles : soit une saturation de sites d'adsorption, en cas d'obtention d'une phase plateau, soit l'intervention d'un mécanisme d'accumulation autre que l'adsorption.

Cependant, en aucun cas les études cinétiques ne sauraient préciser la nature des mécanismes de bioaccumulation du cadmium qui ont été démontrés ou proposés. Par d'autres études nous allons, successivement, les aborder dans le paragraphe suivant.

2.3.3. Mécanismes d'accumulation

Avant de faire le point sur les processus impliqués dans la fixation et le transport du cadmium, il est préférable d'effectuer un rappel sur la structure des enveloppes bactériennes afin de mieux comprendre les interactions possibles entre ces structures et les métaux. Ensuite, l'accumulation du cadmium par adsorption et les mécanismes de transport susceptibles d'être impliqués seront envisagés.

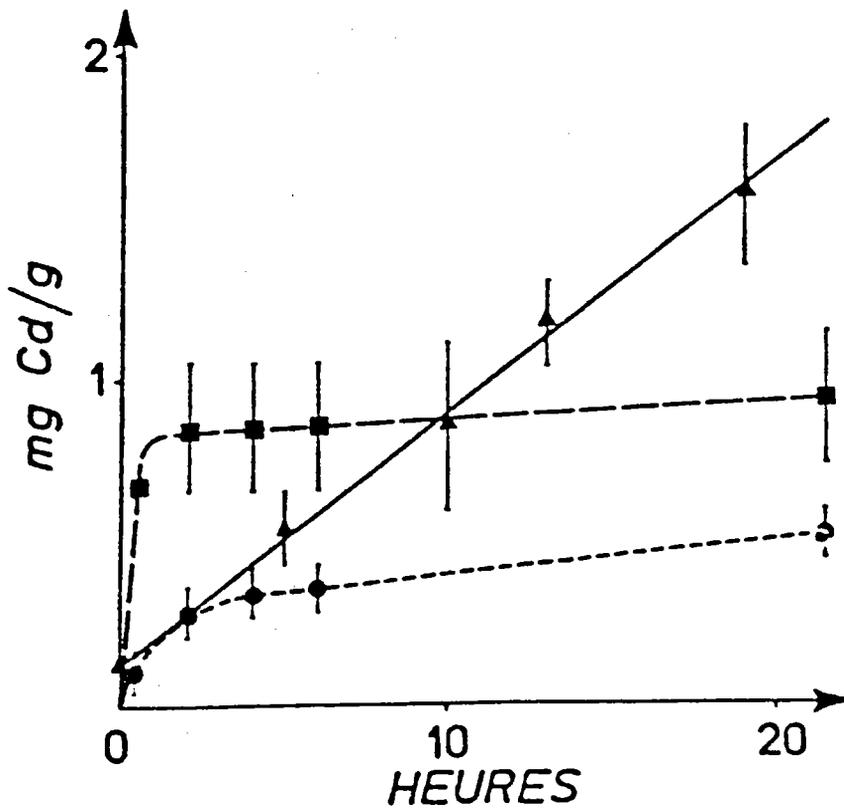


Figure 4. Accumulation du cadmium (mg/g de poids sec de bactéries) par la souche vivante (▲-▲) la souche tuée à l'éthanol (■-■) et la souche tuée au cyanure de potassium (●-●). Les barres représentent les déviations standard (d'après FLATAU et al., 1984).

2.3.3.1. La structure des enveloppes bactériennes

A quelques rares exceptions près, toutes les bactéries sont entourées par une paroi quelquefois qualifiée d'exosquelette puisqu'elle maintient la forme de la bactérie dans un environnement fortement hypotonique. Toutefois, cette terminologie s'avère insuffisante dans le monde bactérien puisque le rôle de la paroi n'est pas limité à un simple rempart contre la forte osmolarité du compartiment intracellulaire. En effet, les bactériologistes lui accordent aujourd'hui la qualité de délimiter autour de la cellule bactérienne un micro environnement capable, non seulement de percevoir les variations survenant dans un environnement plus large, mais aussi de se modifier, en fonction des variations du milieu (BEVERIDGE, 1984).

Ainsi, certaines des modifications de la paroi ont été décrites comme par exemple celles qui concernent la nature des acides gras ou encore la nature et le contenu en protéines de la membrane externe en fonction de la phase de croissance (RANDLE et al., 1969) ou de la composition du milieu (OP DEN KAMP et VAN DEENEN, 1969).

Les enveloppes des bactéries gram négatives observées en microscopie électronique présentent une organisation plus complexe que celles des bactéries gram positives. En effet, si les bactéries gram positives ne sont entourées à l'extérieur de leur membrane cytoplasmique que par une épaisse (250 Å) couche de peptidoglycane et d'acides teichoïques, au moins 4 structures différentes et un compartiment peuvent être différenciés chez les bactéries gram négatives (Figure 5).

D'une manière générale, en partant du cytoplasme et enfermant complètement celui-ci on trouve :

- a) la membrane plasmique
- b) l'espace périplasmique ou périplasme
- c) le peptidoglycane
- d) la membrane externe
- e) les exopolysaccharides.

a) La membrane cytoplasmique

Globalement, la membrane cytoplasmique est constituée d'un mélange

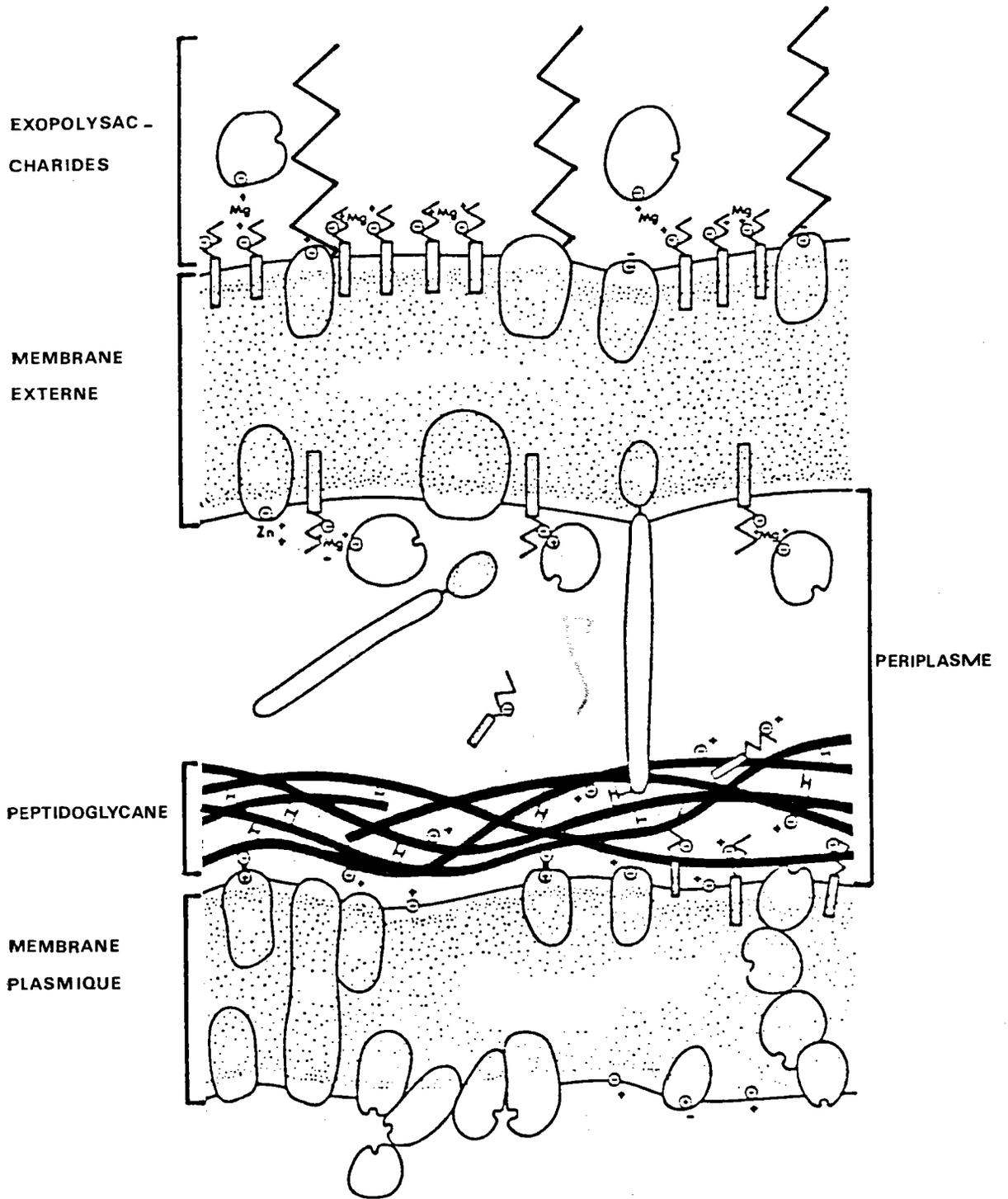


Figure 5. Les enveloppes des bactéries gram négatives.

protéines-lipides, les protéines représentant 50 à 70 % du poids sec de la membrane bactérienne soit 10 à 20 % de plus que pour les cellules eucaryotes. A la différence des membranes de cellules eucaryotes, les membranes bactériennes ne possèdent pas de stérols et la gamme des phospholipides rencontrés est plus restreinte. La figure 6 donne quelques exemples de ces phospholipides. Les résidus notés R dans la figure 6 sont des acides gras, les plus communs possèdent de 10 à 20 atomes de carbone, les chaînes ayant 15 à 19 atomes de carbone étant prédominantes (ROGERS et al., 1980). Quatre types d'acides gras peuvent être différenciés chez les bactéries :

1. les chaînes monoinsaturées non ramifiées
2. les chaînes ramifiées
3. les chaînes saturées non ramifiées
4. les chaînes comportant des cyclopropanes.

Alors qu'ils sont présents chez les cellules eucaryotes, les acides gras polyinsaturés n'ont jamais été détectés à ce jour dans les membranes bactériennes.

Deux modes d'association des protéines à la membrane ont été décrits pour les protéines dites membranaires : on distingue les protéines intrinsèques ou intégrales qui sont profondément enchassées dans la bicouche lipidique et les protéines extrinsèques ou périphériques localisées à la surface de la membrane sur laquelle elles sont fixées par des liaisons faibles, principalement ioniques, faisant intervenir des cations divalents comme le magnésium.

Parmi les protéines membranaires ont été identifiées des enzymes comme celles de la chaîne respiratoire (HADDOCK et JONES, 1977), des enzymes de biosynthèse des constituants de la paroi (SALTON, 1971), des A.T.P. ases (HAROLD et BAARDA, 1969 ; SIMONI et POSTMA, 1975), des enzymes transporteuses (KABACK, 1972 ; HAMILTON, 1975), ainsi que des protéines de structures pouvant former des pores ou des canaux au travers de la membrane (WILLIAMS, 1981). Un diagramme représentant la localisation des enzymes membranaires est présenté sur la figure 7.

Actuellement, le modèle en mosaïque fluide de SINGER et NICHOLSON (1972) est le plus communément admis pour décrire la structure membranaire.

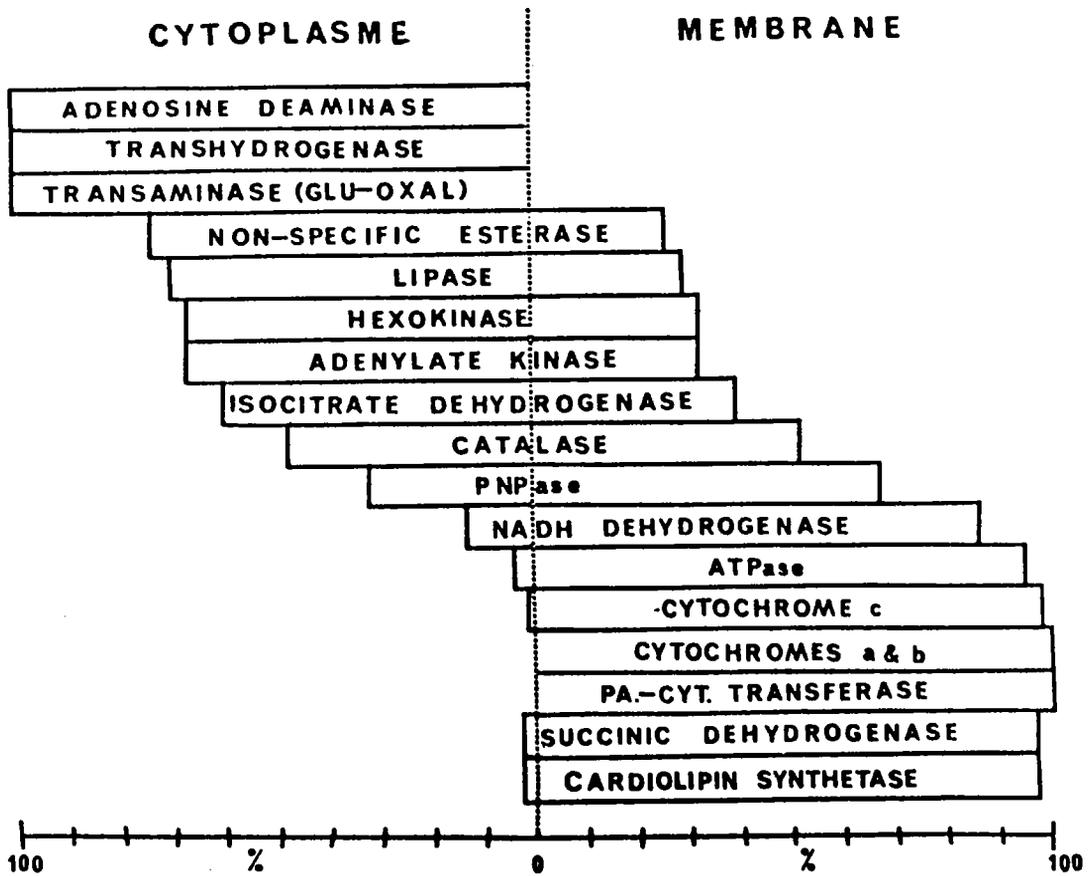


Figure 7. Histogramme illustrant la distribution des enzymes entre les fractions cytoplasmiques et membranaires de *Micrococcus lysodeikticus* (d'après SALTON, 1971).

Dans ce modèle, essentiellement basé sur des considérations thermodynamiques, l'arrangement des phospholipides et des protéines est tel que le système possède une énergie minimum. Ainsi, ces molécules ne sont pas liées par des liaisons covalentes, mais par des liaisons faibles (liaisons de type hydrophobes surtout, puis des liaisons de Van der Waals, des liaisons électrostatiques, et des liaisons hydrogènes), ce qui permet aux lipides de se déplacer à la surface membranaire à une vitesse de l'ordre de 10^{-8} cm²/sec. En d'autres termes, une molécule peut se déplacer d'une extrémité à l'autre de *Escherichia coli* en une à deux secondes. Les protéines membranaires aussi peuvent migrer latéralement dans la membrane à une vitesse toutefois 100 fois plus faible que celle des lipides. Un autre type de mouvement, couramment appelé "flip-flop" permet aux lipides de traverser la membrane ; ce mouvement mis en évidence sur des membranes artificielles, est considéré comme infiniment lent, voire absent dans les membranes naturelles, ce qui permettrait d'expliquer plus aisément l'origine des membranes asymétriques sur leur face externe et interne.

b) Le peptidoglycane

Parmi les enveloppes bactériennes le peptidoglycane est la structure rigide maintenant la forme de la cellule.

Composée de sucres et de peptides, comme son nom l'indique, cette macromolécule est constituée d'un réseau de polysaccharides en chaînes linéaires reliés entre eux par de courtes unités peptidiques. Cette structure, formant un filet extrêmement ramifié, dense et rigide tout autour de la cellule, est capable à elle seule de maintenir la forme de la cellule puisque les autres enveloppes bactériennes sont des structures membranaires fluides.

L'unité de base du peptidoglycane est composée de 3 éléments (Figures 8 et 9) :

1. Un disaccharide de N - acétylglucosamine (NAG) et d'acide N - acétyl muramique (NAM) liés par une liaison glycosidique de type $\beta 1 - 4$.
2. Un térapeptide dont la composition varie suivant la souche bactérienne considérée. Ce térapeptide est atypique pour deux raisons : d'une part parce qu'il comporte des acides aminés de conformation D, généralement

absents des protéines, d'autre part à cause de la présence de certaines liaisons peptidiques originales, comme chez *Staphylococcus aureus*, la présence d'une liaison peptidique qui implique le carboxyle en γ d'un résidu glutamate.

c) L'espace périplasmique

L'espace périplasmique, caractéristique des bactéries gram négatives, constitue un compartiment aqueux sans structure définie situé entre la membrane plasmique et la membrane externe (Figure 5).

L'espace périplasmique contient essentiellement des protéines intervenant dans la fixation et le transport de sucres et d'acides aminés (HAMILTON, 1975) ainsi que quelques enzymes comme la phosphatase alcaline. La présence de ces chimiorécepteurs et enzymes dans l'espace périplasmique constitue peut-être un avantage sélectif pour les bactéries gram négatives.

d) La membrane externe

L'enveloppe la plus externe, couramment nommée membrane externe, possède une structure membranaire composée de phospholipides, très similaires à ceux de la membrane plasmique, de lipopolysaccharides et de protéines, ces dernières représentant approximativement 50 % de la masse de la membrane externe. Parmi les caractéristiques qui différencient cette membrane de la membrane plasmique, il faut souligner que :

1. Peu d'espèces protéiques ont été mises en évidence dans la membrane externe, mais celles-ci sont présentes en grande quantité ; pour cette raison elles sont appelées protéines majeures. Les activités enzymatiques sont rares.
2. Les phospholipides sont pratiquement exclusivement distribués à la surface interne de la membrane alors que les lipopolysaccharides sont surtout présents à la surface externe. Seule l'extrémité lipidique du lipopolysaccharide ou lipide A constitue la partie externe de la bicouche lipidique, la partie polysaccharidique est orientée vers l'extérieur de la bactérie.

La structure générale d'une molécule de lipopolysaccharide est donnée dans la figure 10. Le lipopolysaccharide est un constituant spécifique de la mem-

brane externe et, en tant que tel, il intervient dans certaines propriétés de cette membrane. Ainsi la partie variable du lipopolysaccharide consiste en un enchaînement d'oligosaccharides, dont certains comme le 2-céto, 3-déoxy-octonate (KDO en système anglo-saxon) sont des marqueurs spécifiques de la membrane externe.

Cet enchaînement d'oligosaccharides est responsable de la spécificité antigénique des bactéries. Le lipopolysaccharide est également supposé intervenir dans les processus d'adhésion des bactéries entre elles, sur un support ou sur une cellule hôte.

Les protéines de la membrane externe n'ont pas été étudiées chez toutes les espèces bactériennes, c'est pourquoi nous ne parlerons que des protéines majeures mises en évidence chez *Escherichia coli* dont l'organisation est schématisée dans la figure 11. Ainsi, une lipoprotéine a été isolée en quantité importante et a pu être caractérisée comme un agent de liaison entre la membrane externe et le peptidoglycane sous-jacent.

La membrane externe présente en fait les propriétés d'une barrière de perméabilité empêchant le passage des sucres neutres et des oligopeptides dont le poids moléculaire est supérieur à 700. Elle permet le passage des petites molécules hydrophiles de poids moléculaire inférieur à 600 comme le glucose, le saccharose et les acides aminés. Ce passage de petites molécules hydrophiles est assuré grâce à la présence de protéines spécialisées : les porines dont les sous-unités forment des canaux au travers de la membrane (NAKAE et al., 1979). L'insertion de porines dans des vésicules lipidiques artificielles a permis de vérifier l'augmentation de la perméabilité aux sucres de faible poids moléculaire.

Ainsi, la protéine Omp A mise en évidence chez *E. coli*, est une protéine transmembranaire qui, sans présenter toutes les propriétés d'une porine, facilite toutefois la perméabilité aux acides aminés et à certains peptides. Les mutants défectifs en protéine Omp A présentent une membrane externe instable et n'autorisant pas la conjugaison. Cependant, ces quelques observations ne permettent pas encore clairement d'établir le rôle de cette protéine dans la membrane externe (NIKAIDO et VAARA, 1985).

Des protéines réceptrices spécifiques de sucres simples, de cofacteurs, nucléosides ou de métaux traces comme le fer ont pu être détectées dans le cas où ces molécules étaient en très faible concentration dans le milieu.

De même, quelques rares enzymes ont été localisées au niveau de la mem-

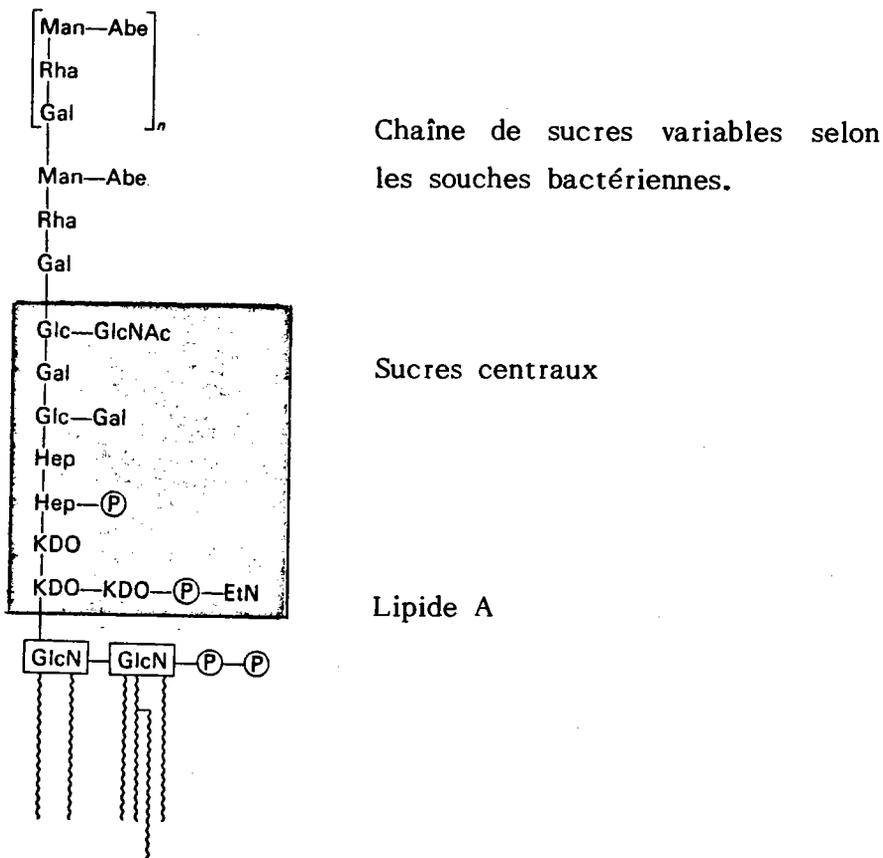


Figure 10. Représentation d'une molécule de lipopolysaccharide. La séquence de sucres est celle de *Salmonella typhimurium*. Abréviations utilisées : Abe, abéquose ; EtN, éthanolamine ; Gal, galactose ; Gpc, glucose ; GpcN, glucosamine ; Gpc NAc, N-acétyl-glucosamine ; Hep, heptulose ; KDO, 2-céto, 3-déoxyoctonate ; Man, mannose ; Rha, L-rhamnose (d'après STRYER, 1981).

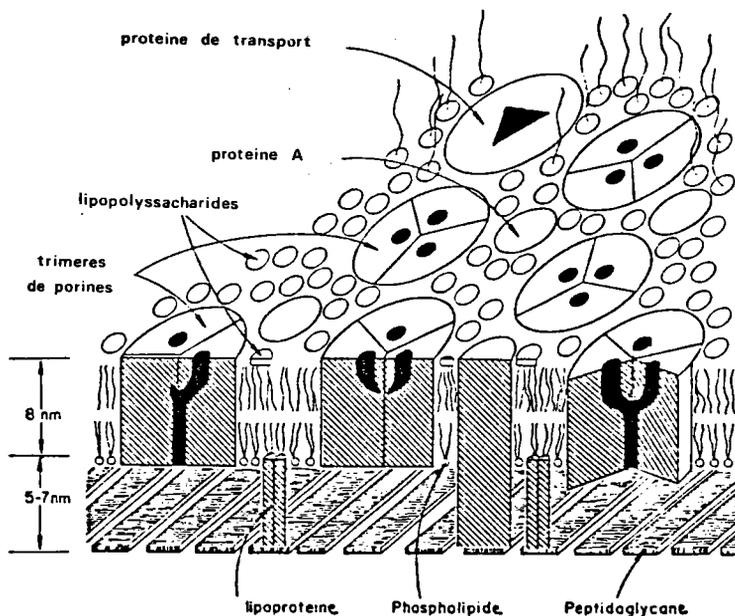


Figure 11. Modèle schématique de la structure de la membrane externe d'*Escherichia coli* et de *Salmonella typhimurium*. (D'après VAARA et NIKAIDO, 1984, dans NIKAIDO et VAARA, 1985).

brane externe d'*Escherichia coli* ; parmi celles-ci une phospholipase, qui interviendrait dans la libération de protéines bactériennes sécrétées comme la colicine (CHAPON et al., 1984), et des protéases.

e) Les exopolysaccharides

Les exopolysaccharides constituent la quatrième structure bactérienne et la plus périphérique ; toutefois, leur présence n'est pas systématique. Elle dépend de plusieurs facteurs comme la nature de la souche bactérienne, l'état physiologique des bactéries, la composition du milieu et plus particulièrement le rapport C/N. En effet, la production d'exopolysaccharides serait favorisée par un rapport C/N élevé (WILKINSON, 1958) et elle aurait lieu préférentiellement lorsque les bactéries sont en phase stationnaire (EAGON, 1956).

La production d'exopolysaccharides par une bactérie entraîne la formation d'une capsule, c'est-à-dire d'une zone périphérique fortement hydratée ayant une épaisseur de plusieurs dizaines de μm . Le relargage d'exopolysaccharides dans le milieu (WILKINSON, 1958) par perte du site protéique de fixation des polysaccharides à la paroi (SUTHERLAND, 1977) ou par coupure de la chaîne polysaccharide est parfois observé.

En ce qui concerne la nature chimique de ces exopolymères, là encore elle dépend de la nature de la souche considérée, de son état physiologique et de la composition du milieu. Ainsi, des hexoses neutres, des polyols, des sucres aminés, méthylés, des acides uroniques, ces différentes espèces chimiques étant organisées en homopolysaccharides ou en hétéropolysaccharides, ont été identifiés à la périphérie cellulaire (SUTHERLAND, 1977 ; UHLINGER et WHITE, 1983).

L'importance des exopolysaccharides a été montrée dans les processus d'aggrégation des cellules entre elles ou sur un support (ROBINSON et al., 1985) ainsi que dans l'adsorption des métaux (BROWN et LESTER, 1982).

2.3.3.2. Accumulation par adsorption

Les phénomènes d'adsorption des ions métalliques à la surface des bactéries ont été largement observés et décrits sans toujours apporter une réponse précise quant aux mécanismes impliqués. D'une manière générale, deux écoles de pensée coexistent.

La première défend une approche chimique du processus selon laquelle les métaux réagiraient avec des entités chimiques de surface par échange d'ions ou par formation de liaisons covalentes. Les phénomènes physiques comme les forces électrostatiques sont pris en compte dans un facteur de correction.

La seconde école par contre interprète l'adsorption en termes d'interactions électrostatiques, de charges de surface et d'interactions ions-solvant. Un facteur de correction intervient prenant en compte les autres interactions plus faibles, telles que les forces de Van der Waals (BOURG, 1984).

Les processus d'adsorption sont généralement caractérisés par l'obtention d'isothermes d'adsorption, initialement utilisés pour décrire l'adsorption des gaz sur des solides. Toutefois, l'expérience a montré que ces représentations pouvaient être étendues à l'adsorption des ions en solution aqueuse sur des solides. Plus particulièrement, l'isotherme de Freundlich a souvent été employé pour décrire l'équilibre entre le métal adsorbé par des bactéries et le métal restant en solution.

L'isotherme de Langmuir est moins intéressant dans ce type d'études puisqu'il nécessite d'admettre que tous les sites d'adsorption ont une probabilité identique d'adsorber un métal donné, ce qui est faux lorsque l'adsorbant est aussi complexe qu'une bactérie.

Ainsi, des isothermes de Freundlich ont été obtenus pour l'adsorption du cadmium par *Pseudomonas fluorescens* (BAUDA et BLOCK, 1985) par *Klebsiella aerogenes* (BROWN et LESTER, 1982a) (Figure 12) et aussi par des populations bactériennes mixtes (GAID, 1981 ; BROWN et LESTER, 1982a ; FRISTOE et NELSON, 1983 ; RUDD et al., 1984).

L'obtention d'un isotherme n'explique cependant pas les zones de fixation du métal. Aussi des travaux particuliers ont cherché à mettre en évidence la part prise par les différentes enveloppes dans l'accumulation.

D'une part, FRIEDMAN et DUGAN (1968) ont observé que la fixation de métaux par *Zoogloea ramigera* 115, souche productrice d'une importante capsule de polysaccharides, était deux fois plus importante que celle mesurée chez *Zoogloea ramigera* 116M, souche non productrice de capsule.

La participation de la capsule bactérienne dans la fixation des métaux a, par la suite, été confirmée. Ainsi, dans le cas du cadmium, des isothermes d'adsorption ont été obtenus en utilisant comme adsorbant des exopolysaccharides

extraits et purifiés (BROWN et LESTER, 1982a ; RUDD et al., 1984) (Figure 13).

D'autre part, l'importance de la paroi bactérienne dans la fixation d'un grand nombre de métaux, autres que le cadmium, a été montrée en utilisant des parois extraites et partiellement purifiées de microorganismes gram positifs (BEVERIDGE et al., 1982 ; MARQUIS et al., 1976) et gram négatifs (BEVERIDGE et KOVAL, 1981).

Reconnaissant la nature anionique des enveloppes bactériennes, certains auteurs ont assimilé la paroi bactérienne à une résine échangeuse de cations (MARQUIS et al., 1976 ; BEVERIDGE, 1984 ; BUCKLIN et REUSCH, 1986).

Ainsi a été étudiée la rétention de métaux par la membrane externe d' *Escherichia coli* K12 (HOYLE et BEVERIDGE, 1983) et par le peptidoglycane de *Bacillus subtilis* (MATTHEWS et al., 1979) ainsi que par le peptidoglycane d' *E. coli* K12 (HOYLE et BEVERIDGE, 1984).

Toutefois, si les travaux, réalisés sur des structures extraites pour un grand nombre de métaux, fournissent une littérature intéressante et abondante, ils n'en demeurent pas moins trop hétérogènes, selon les métaux et les souches bactériennes étudiées, pour permettre un classement des structures périphériques fixatrices de métaux.

Dans le cas du cadmium, les données sont extrêmement pauvres. Cependant, les phénomènes d'adsorption étant peu spécifiques, il est probable que le cadmium possède aussi une certaine capacité à se fixer au niveau des enveloppes bactériennes comme il le fait au niveau des exopolysaccharides. Mais l'affinité du cadmium pour les différentes structures ou les différents sites d'adsorption étant une caractéristique de ce métal, elle ne peut être déduite de la littérature concernant d'autres métaux.

Nous nous permettons cependant de signaler quelques travaux, intéressants pour leur approche originale de la bioaccumulation des métaux, même si le cadmium ne fait pas partie des métaux étudiés. Ainsi certains auteurs se sont attachés à déterminer la nature des sites de fixation des métaux dans les structures pariétales des bactéries. Schématiquement, deux axes principaux ont été considérés prenant en compte, soit les groupements phosphates, soit les groupements carboxyles, ces deux types de groupements fonctionnels étant en grande partie responsa-

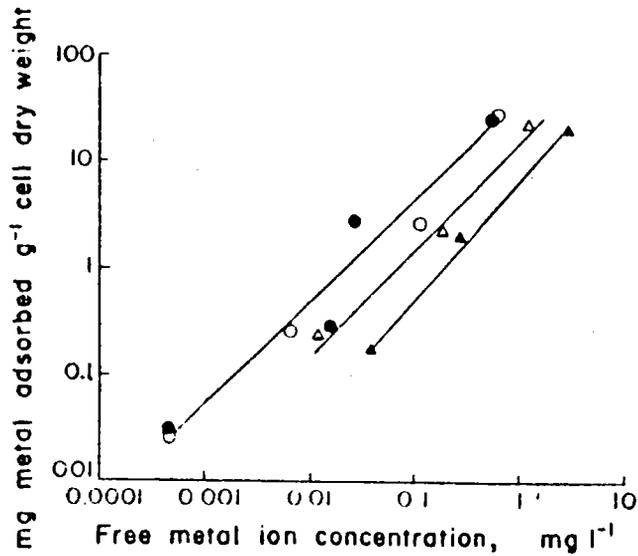


Figure 12. Isothermes de Freundlich montrant la relation existant entre les métaux : ● cadmium, ○ manganèse, ▲ nickel, Δ cobalt adsorbés par *K.aerogenes* et le métal en solution. D'après BROWN et LESTER (1982a).

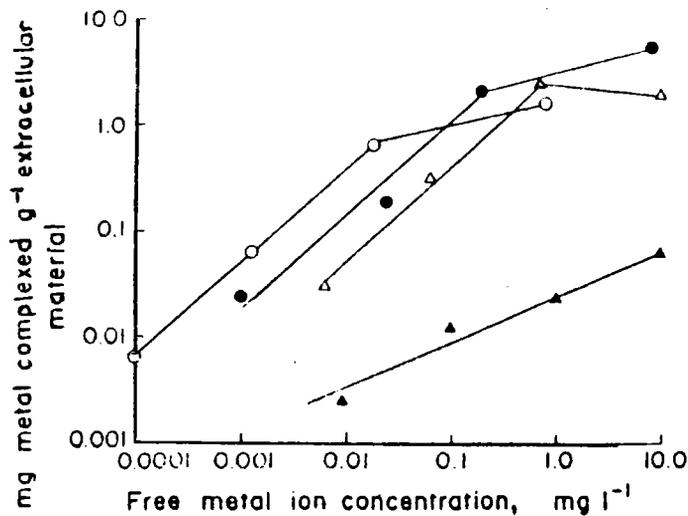


Figure 13. Isothermes de Freundlich montrant la relation entre les métaux : ○ cadmium, Δ nickel, ● cobalt, ▲ manganèse complexés par les exopolymères extraits à partir de boues activées et le métal en solution. D'après BROWN et LESTER (1982a).

bles de l'anionité des enveloppes bactériennes. DOYLE et al. (1980) ainsi que BEVERIDGE et MURRAY (1980) ont mis en évidence, par un blocage chimique des groupements carboxyles, l'intervention de ces groupements dans la fixation des métaux (Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Ca^{++} , Mn^{++} , Fe^{++} , Ni^{++} , Cu^{++} , Au^{++}). Curieusement, ces mêmes auteurs n'ont pas observé de différences significatives dans la rétention de métaux par des parois dont les groupements aminés auraient été substitués par des groupements carboxyles.

La recherche concernant les groupements phosphates comme sites d'adsorption des métaux est plus riche en enseignements. En effet, l'affinité du cadmium pour les phosphates avait été remarquée depuis plusieurs décennies et utilisée dans une méthode de purification des phospholipides par des sels de cadmium (GARIBOBO, communication personnelle, 1985).

Plus récemment, POKORNY (1983) a proposé un mécanisme d'interaction basé sur des données de résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore ^{31}P .

Le cadmium pénétrerait la sphère hydratée du groupement phosphate et s'engagerait à la place d'une molécule d'eau dans une liaison hydrogène avec l'atome d'oxygène non engagé du groupement phosphate (Figure 14). La substitution de la molécule d'eau serait possible par le cadmium, l'argent et le sodium mais impossible pour Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} et Zn^{2+} .

L'utilisation de la RMN du ^{31}P sur des structures biologiques a montré l'interaction des phosphates de la membrane externe d'*Escherichia coli* K12 avec l'euporium, un métal paramagnétique (FERRIS et BEVERIDGE, 1984). Par cette même méthode, ces auteurs ont aussi observé une interaction entre les phosphates du lipopolysaccharide d'*E. coli* K12 et le manganèse (FERRIS et BEVERIDGE, communication personnelle, 1985).

L'adsorption semble donc être un mécanisme général d'accumulation des métaux puisqu'elle a été mesurée pour divers métaux et au niveau de plusieurs structures bactériennes. Cependant, il reste à savoir si la fixation du cadmium par les bactéries est restreinte à un simple phénomène de surface ou s'il y a pénétration intracellulaire du métal. L'apparition de phénomènes toxiques chez les bactéries exposées au cadmium ne permet pas de répondre directement à cette question puisque la toxicité du cadmium peut s'exprimer aux niveaux périphérique, membranaire et intracellulaire. En effet, l'action toxique du cadmium est envisageable sur les protéines transporteuses et les enzymes de l'espace péri-

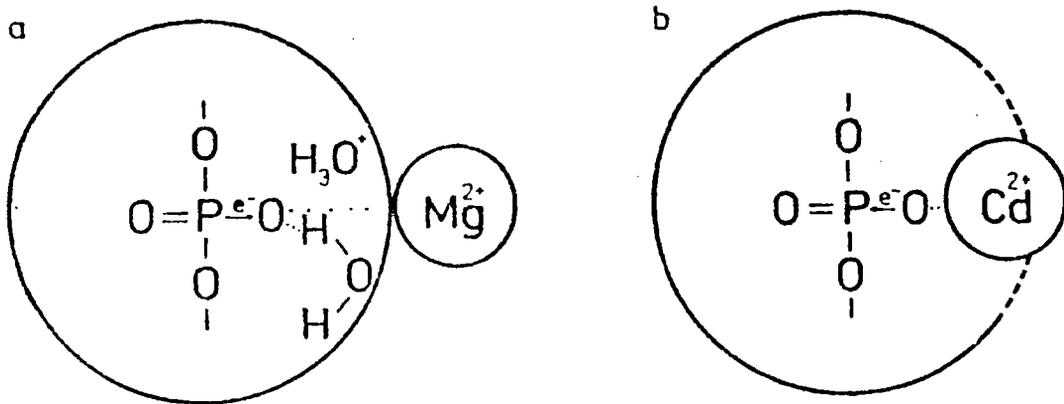


Figure 14. Modèles d'interactions des phosphates avec les métaux : au contraire du cadmium, le magnésium n'est pas capable de pénétrer le rayon hydraté du groupement phosphate et de se substituer à une molécule d'eau pour établir une liaison hydrogène avec l'oxygène (d'après PO-KORNY, 1983).

plasmique, ainsi qu'au niveau des enzymes membranaires et de la perméabilité membranaire sans même traverser cette membrane, et atteindre le compartiment intracellulaire de la cellule bactérienne.

Bien que certains auteurs aient décrit l'accumulation intracellulaire du Cd, l'étude de la localisation cellulaire du métal par les méthodes classiques fournit des résultats contestables. Par exemple, le fractionnement de la bactérie en ses diverses structures afin de doser le métal fixé au niveau de chacune d'elles est une approche qui donne des résultats biaisés. En effet, il peut y avoir déplacement des ions fixés consécutivement, d'une part au passage des cellules dans un milieu dépourvu de cadmium, et d'autre part à la rupture des cellules, dégageant ainsi des nouveaux sites d'adsorption pour le métal.

Par contre, si une méthode d'observation directe de la localisation du métal sur des coupes cellulaires est choisie, il faudra une méthode de détection spécifique du métal, ainsi qu'une technique de préparation des échantillons qui empêche la migration du métal et la déformation des structures, ce qui n'a pas encore été clairement démontré jusqu'à aujourd'hui.

Il est raisonnable, tout d'abord, de répertorier les divers mécanismes de transport des ions métalliques connus à ce jour puisque le passage ou la localisation membranaire du cadmium semblent nécessaires à l'expression de sa toxicité.

Ensuite, les résultats concernant plus particulièrement le transport du cadmium seront discutés.

2.3.3.3. Comment les métaux pénètrent-ils dans les cellules ?

Les membranes plasmiques bactériennes comme toutes les membranes biologiques constituent une forte barrière de perméabilité sélective. Cette barrière sert principalement à réguler le volume cellulaire, maintenir le pH intracellulaire et la composition ionique dans un domaine étroit de façon à conserver un environnement favorable aux activités enzymatiques. La membrane plasmique intervient également en concentrant dans le milieu intracellulaire des molécules énergétiques ou utiles à l'édification des composants cellulaires.

Il existe donc des mécanismes susceptibles de transporter les molécules et les ions à travers la membrane plasmique. Ces mécanismes sont dits actifs ou passifs selon que la variation d'énergie libre de la molécule ou de l'ion transporté est positive ou négative.

Ainsi, un transport passif, possédant une variation d'énergie libre négative pour la molécule transportée, aura lieu spontanément. Au contraire, un transport actif aura une variation d'énergie libre positive pour la molécule transportée et nécessitera un apport d'énergie.

La variation d'énergie libre dépend du rapport de concentration de la molécule ou de l'ion transporté de part et d'autre de la membrane ainsi que du potentiel membranaire s'il s'agit d'une molécule chargée.

L'apport d'énergie peut provenir de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP, c'est le cas de la pompe sodium-potassium des cellules animales. Ce système de transport, le premier transport actif mis en évidence par SKOU en 1957 (dans Stryer 1981), catalyse la sortie de 3 ions Na^+ de la cellule et l'entrée de 2K^+ au prix de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP.

Un système A.T.P. asique a également été décrit pour le transport du calcium dans les cellules musculaires (De MEIS et VIANNA, 1979, dans Stryer, 1981).

Toutefois, l'énergie nécessaire à un transport peut aussi provenir d'un gradient ionique. Par exemple, le gradient de sodium présent chez la plupart des cellules animales contrôle le symport du glucose (passage simultané du sodium et du glucose) (STRYER, 1981).

En fait, il semble que la plupart des symports et antiports des cellules animales soient contrôlés par le gradient transmembranaire en sodium de ces cellules, lui-même généré par le système A.T.P. asique sodium-potassium dépendant.

Chez les bactéries, c'est généralement un gradient de protons qui est le moteur des divers symports et antiports (STRYER, 1981). Ces observations vérifient la théorie énoncée par MITCHEL (1966) selon laquelle la source d'énergie pourrait être une force protomotrice sous la forme d'un gradient transmembranaire de protons. Par exemple, le transport du lactose par la lactose perméase chez les bactéries est couplé à un transfert de protons du milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Le moteur de ce transport est le gradient transmembranaire de protons, généré par la chaîne respiratoire (Figure 15).

Il existe chez les bactéries un autre mécanisme de transport qui consiste à modifier la molécule transportée au cours du processus de transport pour l'empêcher de ressortir ensuite. Ainsi, le système phosphotransférase, comprenant

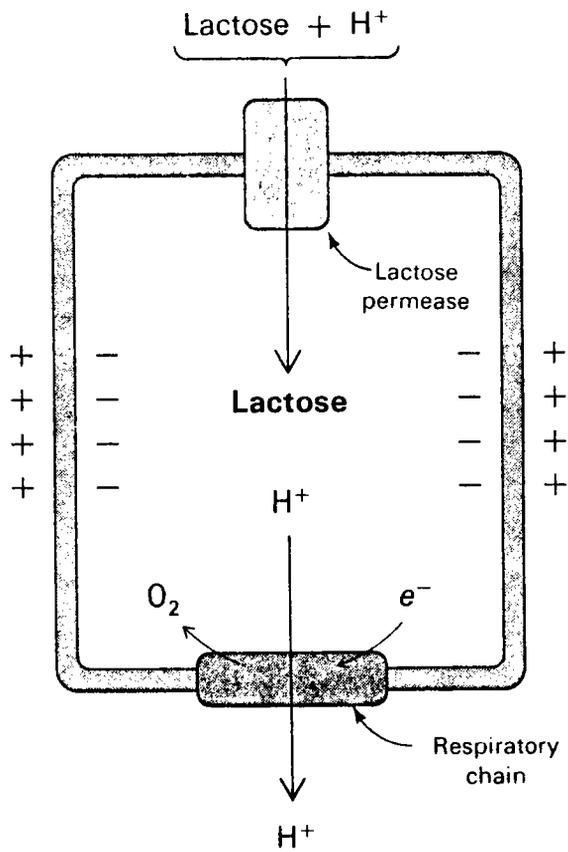


Figure 15. Schématisation du mode de transport de certains sucres et acides aminés chez les bactéries (d'après STRYER, 1981).

3 enzymes et une petite protéine transporteuse de groupements PO_4^{2-} phosphoryle le glucose en glucose 6(P) et assure simultanément le passage du glucose dans le milieu intracellulaire. Le phosphoénolpyruvate intervient comme donneur de phosphate dans ce mode de transport du glucose.

a) Transports actifs

Des processus de transports actifs ont donc été répertoriés dans divers types cellulaires procaryotes et eucaryotes, pour divers molécules et ions et à l'aide de différents "moteurs".

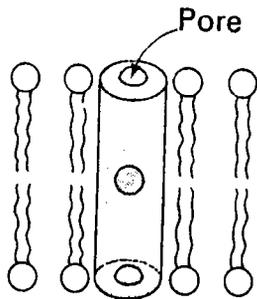
Dans le cas particulier du passage membranaire des ions cadmium chez les bactéries, un mécanisme de transport actif a été décrit par TYNECKA et al. (1981a) chez *Staphylococcus aureus*. Le cadmium emprunterait le système de transport actif spécifique du manganèse pour pénétrer dans le compartiment intracellulaire et son transport serait contrôlé par le gradient transmembranaire de protons issu de la phosphorylation oxydative ou chaîne respiratoire en aérobie et par l'hydrolyse de l'A.T.P. en anaérobie.

b) Transports passifs médiatés

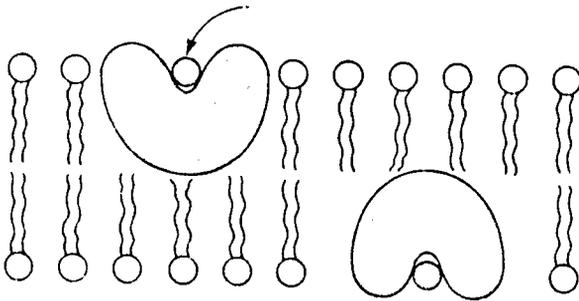
En ce qui concerne les transports passifs, deux systèmes peuvent opérer. D'une part, des pores ou canaux aqueux traversant la structure membranaire hydrophobe permettent le passage d'ions ou de petites molécules polaires à travers les membranes. Ainsi les porines, protéines trimériques, forment des pores ayant un diamètre moyen de 10 Å dans la membrane externe des bactéries gram négatives. Ce type de transport passif, sans apport extérieur d'énergie, nécessite par contre la présence d'une ou plusieurs molécules souvent de nature protéique, capables de former un canal hydrophyle dans la membrane hydrophobe.

D'autre part, un second type de transport médiaté a été découvert en étudiant le mécanisme d'action de certains antibiotiques dits de transport. Ces antibiotiques agissent comme transporteurs de molécules ou d'ions qu'ils complexent et transportent d'une face à l'autre de la membrane en se déplaçant eux-mêmes au sein de la bicouche phospholipidique qui forme les membranes.

Ces deux types de transports, dits médiatés, sont illustrés sur la figure 16. Il est important de noter que les transports médiatés répertoriés à ce jour, fonctionnent via la formation de pores ou canaux hydrophyles et qu'ils n'ont



Formation d'un canal



Ion transporté par un transporteur

Figure 16. Diagramme illustrant deux modes de transport passif médiaté
- par formation d'un "canal" dans la bicouche lipidique
- par une molécule transporteuse
(d'après STRYER, 1981).

jamais été décrits pour les métaux.

Enfin la dernière catégorie de transport passif n'est pas à proprement parlé un système de transport, puisqu'il correspond à une diffusion simple.

c) Diffusion simple

Dans un processus qui ne nécessite ni énergie, ni molécules transporteuses, le passage de molécules ou d'ions au travers de la membrane est dû au mouvement propre de ces molécules entraînant l'égalisation des concentrations en molécules transportées de part et d'autre de la membrane. Selon GUTKNECHT (1981), le mercure traverserait les bicouches lipidiques par diffusion sous la forme du complexe neutre Hg Cl_2 à une vitesse de $1,3 \cdot 10^{-2} \text{ cm} \cdot \text{sec}^{-1}$. Cette vitesse mesurée sur un système membranaire plan et artificiel correspond à 20 fois la perméabilité à l'eau et 10^6 fois la perméabilité aux ions sodium, potassium ou chlorures.

En ce qui concerne le cadmium, quelques études ont été effectuées sur des systèmes membranaires artificiels, soit plans (BLM : black ou bilayer lipid membranes), soit vésiculaires (MLV : multilayer lipid vesicles).

Trois faits importants ont ainsi été démontrés : d'une part, le cadmium réagit avec les têtes polaires des phospholipides (BELMONTE et al., 1972) ; cette interaction modifie les propriétés membranaires, en particulier le diagramme de phase des lipides est modifié au profit de l'état gel et d'une phase de coexistence des deux états gel -liquide (CAFFREY et FEIGENSON, 1984) ; d'autre part, l'augmentation de la température de transition des lipides en présence de cadmium a aussi été rapportée par BEVAN et al. (1983) mais curieusement ces auteurs ont observé en parallèle une augmentation de la perméabilité en présence de cadmium. Cette dernière conclusion est douteuse puisque les auteurs n'ont pas effectué de contrôle de la fusion des vésicules pendant la mesure de la perméabilité.

Enfin, le cadmium est capable au même titre que le calcium d'induire des fusions de vésicules (LIAO et PRESTEGARD, 1980).

Ces divers effets du cadmium sur les structures membranaires artificielles rendent difficile la mesure du passage membranaire de ce métal.

Toutefois, une étude récente a été réalisée sur des membranes plasmiques

isolées d'erythrocytes humains et d'hépatocytes de rat par SORENSEN et al. (1985). Ces auteurs ont montré que la fluidité membranaire était fortement diminuée en présence de cadmium, 50 à 500 μM (3 fois plus qu'en présence de calcium).

Ces dernières observations tendent à montrer que la diffusion simple du cadmium à travers la composante phospholipidique de la membrane plasmique est un processus mineur.

2.4. MECANISMES DE TOXICITE ET DE RESISTANCE AU CADMIUM

2.4.1. Toxicité du cadmium chez les bactéries

La toxicité du cadmium a été mesurée essentiellement sur la croissance bactérienne, la respiration ou l'activité déshydrogénasique, et certaines activités enzymatiques.

Il est malheureusement très difficile de comparer les résultats de la littérature d'un point de vue quantitatif. En effet, les effets toxiques sont rarement exprimés de manière homogène en termes de CI 50 (concentration inhibitrice à 50 %) ou de CL 50 (concentration létale à 50 %).

De plus, un trop grand nombre de paramètres différent d'une étude à l'autre, pour permettre la comparaison des résultats quantitatifs. Toutefois, des tendances observées peuvent être confrontées.

Ainsi, lorsque la croissance bactérienne est mesurée en présence de cadmium ajouté à des concentrations inférieures à 0,5 μM , une augmentation de la phase de latence est observée durant laquelle le nombre de cellules revivifiables sur gélose diminue (MITRA et al., 1975 ; MOROZZI et al., 1982). Par contre, aucune variation du taux de croissance n'est observée, lorsque la croissance débute, pour des concentrations en cadmium ajouté comprises entre 0,5 et 50 μM .

Plus précisément, PICKETT et DEAN en 1979 ont rapporté chez *Bacillus* une augmentation linéaire du temps de latence proportionnelle à la concentration en métal avec cependant un plateau pour des concentrations en cadmium comprises entre 0,1 et 0,2 M. Selon les auteurs, ce plateau pourrait correspondre à la coexistence de deux catégories de cibles dont l'affinité pour le cadmium serait différente. Par contre, les mêmes auteurs, travaillant sur un *Pseudomonas* isolé de l'environnement, avaient observé une croissance normale pour des concentrations en cadmium inférieures à 17 μM et une forte diminution de la production de biomasse pour des concentrations plus importantes.

Chez *Pseudomonas fluorescens*, la phase de latence est augmentée, le taux de croissance et la biomasse produite en phase stationnaire sont diminués lorsque la concentration en cadmium ajouté est comprise entre 8,9 et 89 μM . La CI 50 est approximativement la même pour les trois paramètres mesurés : voisine de 27 μM en cadmium ajouté (BAUDA et BLOCK, 1985). Mc ENTEE et al. (1986) ont de même montré que la phase de latence de *Alcaligenes* était augmentée pour des concentrations en cadmium ajouté supérieures à 2,5 mM.

D'une manière générale, retenons que l'effet toxique du cadmium s'exprime au niveau de la croissance bactérienne le plus souvent en termes d'augmentation du temps de latence et parfois d'inhibition du taux de croissance et de la biomasse produite en phase plateau.

L'effet du cadmium mesuré par BABICH et STOTZKY (1977) sur la croissance de quelques bactéries gram + et gram - n'a pas permis de mettre en évidence des comportements identiques ou différents de ces deux groupes. Vraisemblablement, l'hétérogénéité au sein des groupes de bactéries masque les éventuelles différences de sensibilité entre bactéries gram + et gram -. Par contre, selon JAKUBCZAK et al. (1981), les bactéries gram + seraient plus sensibles à l'action du cadmium que les bactéries gram - (Tableau 4).

Cette observation est peut-être à rapprocher des observations de BEVERIDGE et MURRAY (1976) et BEVERIDGE et KOVAL (1981) montrant une accumulation des métaux par les parois gram positives 10 fois supérieures à celle observée par des parois gram négatives. La comparaison de la répartition cellulaire du cadmium chez des souches bactériennes sensibles et résistantes à ce métal a montré que 3 fois plus de cadmium s'accumulait dans le cytoplasme des bactéries sensibles (REMACLE et al., 1982). La localisation du métal toxique serait donc intracellulaire. Toutefois il est impossible de préciser si la répartition cellulaire du cadmium observée chez les bactéries sensibles est la cause ou la conséquence de leur sensibilité.

D'autres activités métaboliques que la croissance ont parfois été étudiées. Par exemple, la respiration est un processus métabolique inhibé en présence de cadmium.

L'inhibition peut être mesurée par comparaison des échanges gazeux (consommation d'O₂, ou production de CO₂) (ZWARUM, 1973) ou mesures des ac-

Tableau 4. Concentrations minimales inhibitrices de quelques toxiques minéraux (en mg/l) vis à vis de 18 bactéries (d'après JAKUBCZAK et al., 1981).

TOXIQUES BACTERIES	HgCl ₂	Cu(SO ₄) ₂	Cr ₂ O ₃	Cd(NO ₃) ₂	Ca(CH ₃ CO ₂) ₂
<u>ENTEROBACTERIES</u>					
Escherichia coli	0,5	2	5	10	20
Citrobacter freundii	0,2	30	10	1	15
Klebsiella oxytoca	0,5	4	10	30	10
Klebsiella ozoenae	0,2	1	10	2	5
Providencia sp.	0,1	10	5	20	10
Yersinia enterocolitica	0,5	15	10	20	5
<u>AUTRES BACTERIES GRAM-</u>					
Aeromonas hydrophila	0,5	10	5	2	30
Vibrio NAG	0,1	5	1	20	1
Pseudomonas aeruginosa	0,1	10	10	50	30
Alteromonas putrefaciens	0,01	5	0,1	0,1	1
Acinetobacter calcoaceticus	0,1	60	15	15	15
Chromobacterium violaceum	0,1	15	0	25	10
<u>BACTERIES GRAM +</u>					
Bacillus subtilis	0,05	10	60	0,1	10
Bacillus cereus	0,05	20	100	1	10
Micrococcus roseus	0,01	5	30	0,1	1
Streptococcus faecalis	0,1	15	2	0,1	10
Staphylococcus oxford	0,1	2	200	1	10
Sarcina lutea	0,5	5	40	1	2

tivités déshydrogénasiques (CENCI et al., 1985). Les deux méthodes semblent produire des résultats équivalents chez *E. coli* puisque ZWARUM (1973) observe une inhibition de la production de CO₂ à partir d'une concentration en cadmium ajouté de 50 µm, et que l'activité déshydrogénasique est inhibée de 32 % en présence de cadmium ajouté 80 µM (CENCI et al., 1985).

Curieusement, des processus biologiques sont parfois activés par la présence de cadmium. Ainsi, LAMANNA et al. (1973, dans BABICH et STOTZKY, 1977) ont observé une stimulation de la croissance de *Lactobacillus acidophilus* en présence de cadmium ajouté à la concentration de 0,17 mM. Certaines activités enzymatiques sont parfois activées par le métal à faible concentration. Par exemple, l'activation d'une A.T.Pase mitochondriale a été rapportée en présence de concentrations en cadmium ajouté inférieures à 1 mM ; par contre, en présence de concentrations supérieures, l'activité A.T.Pasique était inhibée (RAUCHOVA et DRAHOTA, 1979). Selon les auteurs, le cadmium à faible dose agirait comme un analogue du magnésium, cofacteur de l'enzyme.

Chez les cellules eucaryotes, des effets mutagènes, cancérigènes et tératogènes du cadmium ont été décrits (DEGRAEVE, 1981 ; KAZANTZIS, 1984) et parfois mis en doute (MALCOLM, 1979). En ce qui concerne les microorganismes et plus particulièrement les bactéries, les effets toxiques du cadmium au niveau génétique ont été étudiés principalement chez *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. Si ces travaux ont montré l'inhibition de la transformation par l'ADN chez *Bacillus subtilis* en présence de cadmium (GROVES et al., 1974), ils n'ont pas permis de mettre en évidence des effets mutagènes ou cancérigènes pour ce métal, tout au plus une capacité à provoquer des lésions au niveau du DNA (DEGRAEVE, 1981 ; ZASUKHINA et al., 1977).

Dans le paragraphe suivant, les mécanismes de toxicité du cadmium décrits ou proposés chez les bactéries ont été répertoriés.

2.4.2. Mécanismes de toxicité du cadmium chez les bactéries

Le cadmium est en fait susceptible d'agir à plusieurs niveaux simultanément dans la cellule bactérienne : au niveau membranaire, sur les activités enzymatiques et avec les acides nucléiques.

a) Effets sur les membranes

Ainsi, l'adsorption du cadmium au niveau des têtes polaires des phospholipides organisés en structure membranaire a été décrite (BELMONTE et al., 1972). L'adsorption du cadmium sur les surfaces membranaires est très certainement une étape préliminaire aux phénomènes de fusions membranaires observés sur des vésicules lipidiques artificielles en présence de cadmium (LIAO et PRESTEGARD, 1980).

Un effet du cadmium sur la fluidité membranaire est possible puisque l'on observe, en présence de ce métal, des modifications des diagrammes de phases de phospholipides isolés : la température de transition augmente en faveur d'une large plage de coexistence des 2 phases gel-liquide (CAFFREY et FEIGENSON, 1984).

b) Effets sur les activités enzymatiques

De nombreuses activités enzymatiques sont modifiées en présence de cadmium, comme par exemple celle de la phosphatase alcaline (CHLEBOWSKI et al., 1977). La phosphatase alcaline est une métallo-enzyme possédant du zinc dans son site actif, et le remplacement du zinc par le cadmium a été observé par diffraction des rayons X, avec quelques modifications de la conformation de l'enzyme (SOWADSKI et al., 1981).

L'analogie zinc-cadmium n'est pas la seule décrite dans la littérature puisque chez les cellules eucaryotes des analogies cadmium-magnésium (RAUCHOVA et DRAHOTA, 1979) et cadmium-calcium (FORSEN et al., 1979) ont été rapportées.

La β galactosidase et les déshydrogénases (CENCI et al., 1985 ; KATAYAMA-HIRAYAMA, 1986) sont aussi inhibées en présence de cadmium.

Dans le cas général, l'inhibition serait due à la capacité qu'ont les protéines de complexer le cadmium au niveau de leurs groupements fonctionnels amines, carboxyles, alcool et surtout thiols (JACOBSON et TURNER, 1980 ; NIEBOER et RICHARDSON, 1980) puisque Katayama-Hirayama (1986) montre une récupération de l'état physiologique habituel par addition de composés thiols.

c) Effets sur les acides nucléiques

En ce qui concerne les acides nucléiques, BLUNDELL et WILD (1969) ont observé chez *Escherichia coli* une inhibition de la synthèse d'A.R.N. supé-

rieure à celle de la synthèse protéique en présence de cadmium. La replication ou (et) la transcription de l'A.D.N. seraient donc des processus plus sensibles au cadmium que la traduction. MITRA et BERNSTEIN (1977) ont observé des ruptures simple-brin dans l'ADN d'*E.coli* exposée au cadmium.

La toxicité génétique du cadmium peut provenir d'une interaction métal-acides nucléiques ou (et) d'une interaction métal-enzymes du métabolisme des acides nucléiques. En effet, si le cadmium peut se complexer au niveau des protéines, il est également susceptible de réagir avec les atomes d'azote des bases puriques et pyrimidiques d'une part, mais aussi avec les atomes d'oxygène des groupements phosphates du squelette "sucre-phosphate" des acides nucléiques. Selon JACOBSON et TURNER (1980), la complexation du cadmium au niveau des phosphates stabiliserait la structure en double hélice de l'ADN, tandis que la complexation au niveau des bases aurait un effet déstabilisant sur cette structure.

De plus, la complexation du métal a été observée in vitro au niveau de certains ADN de transfert dont le comportement électrophorétique était modifié en présence de cadmium (HIATT et JACOBSON, 1980) et sur l'ADN (MITRA, 1985, communication personnelle).

Cependant, ces processus de complexation entre cadmium et acides nucléiques n'ont pu être observés in vivo, ce qui rend plus probable l'hypothèse de la toxicité génétique du cadmium par inhibition des enzymes du métabolisme de ces acides.

2.4.3. Mécanismes de résistance au cadmium

Les bactéries développent parfois des mécanismes de résistance aux métaux qui commencent à être explicités.

Six mécanismes principaux de résistance au cadmium ont été décrits chez les bactéries ; ce sont : la fixation du métal à la périphérie cellulaire, l'accommodation, la synthèse de molécules intracellulaires qui piègent le métal, la précipitation de complexes métalliques insolubles, une accumulation de métal diminuée et la méthylation.

a - Les exopolymères protègent les bactéries vis à vis des métaux

BITTON et FREIHOFER (1978) ont mesuré la toxicité du cadmium chez

2 souches de *Klebsiella aerogenes* dont une est un mutant produisant peu d'exopolysaccharides par rapport au sauvage. La souche capsulée produisait quatre fois plus de bactéries revivifiables sur gélose que le mutant après 7 h de contact avec du cadmium ajouté à la concentration de 89 μM .

Une protection a également été observée lorsque des exopolysaccharides extraits et partiellement purifiés sont ajoutés à la solution de cadmium une heure avant l'introduction de bactéries mutantes sans capsule (Figure 17).

L'effet protecteur des exopolysaccharides et des exopolymères en général provient vraisemblablement de la capacité de ces molécules à complexer les métaux (STERRITT et LESTER, 1980, 1983 ; GAID, 1981 ; BROWN et LESTER, 1982a et b). Le mécanisme serait donc similaire à celui reporté pour d'autres complexants comme le citrate, l'aspartate, l'EDTA (PICKETT et DEAN, 1979), les argiles (BABICH et STOTZKY, 1978 ; TITUS et PFISTER, 1982 ; KUREK et al., 1982) et les acides humiques (TITUS et PFISTER, 1982).

b - L'accommodation

MITRA et al. (1975) ont observé chez *E. coli* en présence de cadmium 0,2 μM les anomalies de croissance suivantes :

- le temps de latence est anormalement long (augmentation de 18 h par rapport au témoin),
- 84 à 95 % des cellules prélevées en début de phase de latence ne forment pas de colonies sur gélose,
- pendant cette phase, de grandes vacuoles intracellulaires se forment, la densité optique de la culture est constante et il n'y a pas d'incorporation de thymidine tritiée, donc pas de synthèse d'ADN bien que le nombre de bactéries capables de former des colonies sur gélose augmente,
- lorsque la phase de croissance exponentielle est atteinte, les vacuoles ont disparu, le taux de croissance des cellules est identique à celui du témoin sans cadmium ainsi que la production de biomasse en phase stationnaire.

De plus, ces auteurs comme Mc ENTEE et al. (1986) avec *Alcaligenes*, ont remarqué qu'une exposition préalable au métal diminue l'allongement du temps de latence. Cependant, cette capacité est graduellement perdue au fur et à mesure que les cellules se divisent dans un milieu dépourvu de métal.

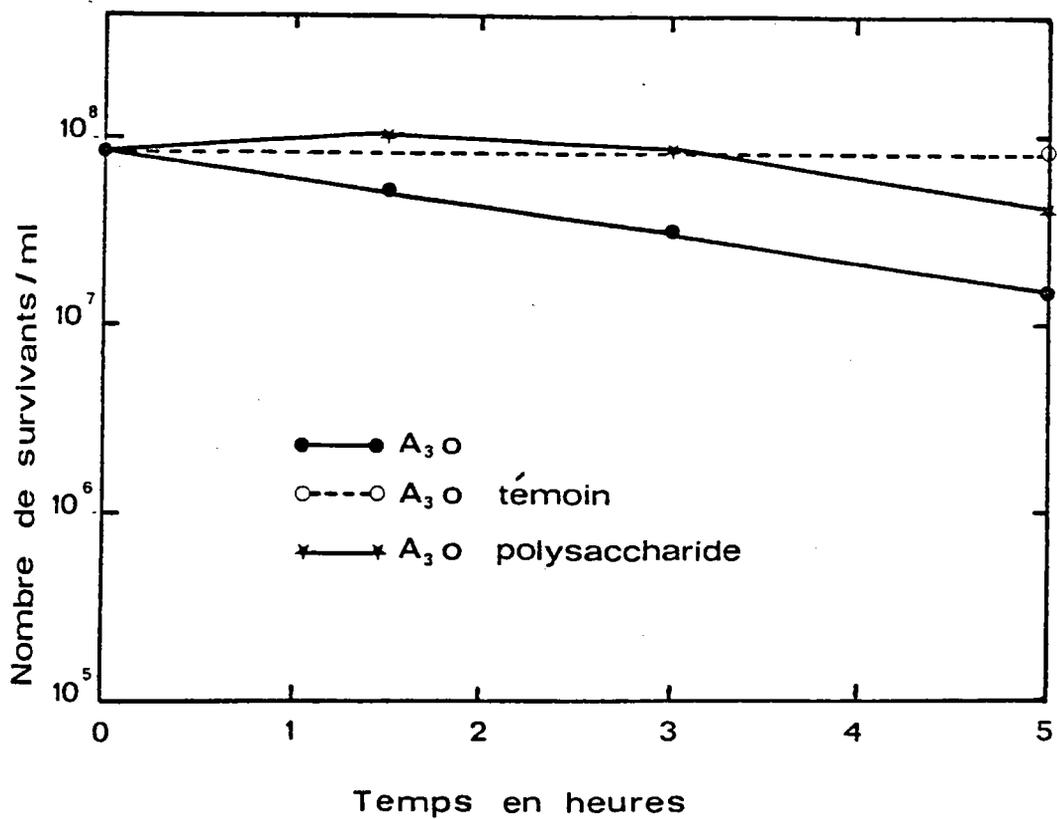


Figure 17. Effet des polysaccharides capsulaires sur la toxicité du cadmium (10 mg/l) chez *Klebsiella aerogenes* K54 A3(0) (d'après BITTON et FREIHOFER, 1978).

Enfin, immédiatement après le contact avec le cadmium, des ruptures simple-brin ont été observées au niveau de l'ADN de *Escherichia coli*. La réparation de ces ruptures nécessiterait l'intervention d'une DNA ligase (MITRA et BERNSTEIN, 1977).

Ces observations suggèrent qu'un processus inductible permet la réparation durant la phase de latence des lésions (vacuoles et ruptures simple-brin de l'ADN) provoquées par le cadmium. Ce processus a été appelé "accommodation" par les auteurs et des études ont été entreprises afin d'en élucider le mécanisme moléculaire. Ainsi, des mesures d'incorporation de leucine tritiée réalisées pendant l'accommodation ont montré une forte synthèse protéique en fin de phase de latence. L'essentiel de la radioactivité a été retrouvé au niveau de deux types de protéines de poids moléculaires apparents 55000 et 65000. Une des protéines accumule le cadmium et est absente chez les bactéries non exposées au métal, l'autre correspondrait à une protéine classique du métabolisme, mais synthétisée en quantité plus importante chez les bactéries accommodées (MITRA, 1984).

Il est possible que la ou les protéines accumulant le cadmium agissent comme des métallothionéines, bien qu'elles n'en possèdent apparemment pas le poids moléculaire, mais la compréhension de l'accommodation nécessite toutefois de plus amples investigations.

c - La synthèse de métallothionéines ou pièges à cadmium

Les métallothionéines sont des protéines de faible poids moléculaire (≈ 10000 d) dont la synthèse est induite en présence de métaux.

Elles tirent leur nom de leur capacité à fixer ces métaux, généralement le cadmium, le cuivre et le zinc, grâce à leur richesse en acides aminés soufrés : elles contiennent en moyenne 8 % de soufre ; par contre, elles ne comportent pas d'acides aminés aromatiques (KAGI et VALLEE, 1961).

Ces protéines ont été mises en évidence chez des organismes très variés, essentiellement eucaryotes : mammifères (KAGI et VALLEE, 1961), champignons (LERCH, 1980), crustacés (BROUWER et BROUWER-HOEXUM, 1984), poissons (HAUX et al., 1984).

Récemment, trois métallothionéines ont été isolées chez *Pseudomonas putida* cultivé en présence de cadmium (HIGHAM et al., 1984).

La première, de poids moléculaire 6700 d est synthétisée en phase exponentielle, la seconde (6900 d) en fin de phase exponentielle et la dernière (3600 d) est

produite en phase stationnaire.

Enfin, Mc ENTEE et al. (1986) ont isolé chez une souche d'*Alcaligenes* résistante au cadmium, une protéine membranaire de poids moléculaire 34500 d dont la synthèse est induite par le cadmium à des concentrations supérieures à 0,1 mM.

d - Formation de complexes du cadmium insolubles

Le métal est parfois accumulé sous forme de complexes insolubles vraisemblablement non toxiques pour les bactéries. La nature des complexes formés dépend étroitement de la composition du milieu. Ainsi, dans un milieu non carencé, AIKING et al. (1982) ont rapporté la précipitation de sulfures de cadmium chez *Klebsiella aerogenes* sous forme de granules intracellulaires denses aux électrons ayant un rapport Cd/S constant.

Par contre, en conditions sulfates limitants, l'accumulation du cadmium est contrebalancée par une accumulation de phosphore inorganique. Lorsque les phosphates sont limitants, les sulfures constituent la forme prédominante d'accumulation du cadmium.

Les deux formes d'accumulation sont observées dans un milieu carencé en glucose (Tableau 5) (AIKING et al., 1984) ; elles permettent aux bactéries de s'adapter à des concentrations toxiques.

La complexation du cadmium au niveau de polyphosphates a été évoquée chez *Pseudomonas putida* pendant la phase de latence, c'est-à-dire avant que la forme de réserve constituée par les polyphosphates ne soit épuisée.

e - Certaines bactéries résistent aux métaux parce qu'elles accumulent moins

La faible accumulation du cadmium est une stratégie de résistance qui a tout d'abord été décrite par CHOPRA (1971) chez une souche de *Staphylococcus aureus*. Cette souche possède un plasmide qui code pour la résistance aux antibiotiques du groupe des pénicillines et à certains ions métalliques comme le cadmium et le mercure. Le phénomène de résistance est apparemment dû à une fixation de cadmium 15 fois plus faible chez la souche résistante (Figure 18).

La synthèse protéique présente la même sensibilité au métal chez les deux souches, et des sphéroplastes (cellules sans peptidoglycane) préparés à partir de bactéries résistantes, conservent leur résistance et leur affinité pour les cations en général. Par contre, la résistance est perdue lorsque les bactéries sont traitées au toluène (CHOPRA, 1975). Le toluène n'entraîne pas de relargage de matériel

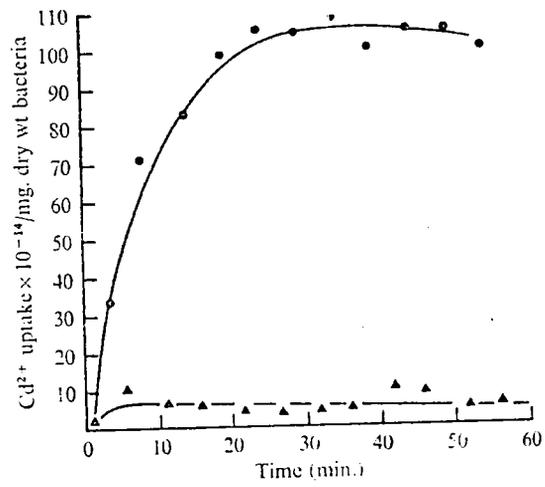


Figure 18. Fixation du cadmium par une souche résistante ▲ et sensible ● au cadmium de *Staphylococcus aureus* (d'après CHOPRA, 1971).

protéique ou lipidique, mais il modifierait les interactions entre molécules membranaires et éventuellement l'orientation de ces molécules au sein de la structure membranaire.

Les résultats de CHOPRA suggèrent une diminution de l'accumulation intracellulaire du métal par un dispositif membranaire.

Chez une autre souche de *Staphylococcus aureus* un mécanisme actif d'expulsion du cadmium a été proposé. Cette résistance est portée par un plasmide et deux gènes nommés Cad A et Cad B sont impliqués.

Le gène Cad A, responsable d'une accumulation de cadmium 100 fois plus faible chez les bactéries résistantes que chez les bactéries sensibles, code pour un système d'efflux spécifique des ions cadmium. Par ce mécanisme d'efflux, la sortie d'un ion Cd^{2+} serait couplée à l'entrée de 2 protons (Figure 19).

Selon les expérimentations réalisées en présence de substances découplantes et de ionophores, l'antiport $\text{Cd}^{2+}/2\text{H}^+$ serait énergie-dépendant (TYNECKA et al., 1981a et b) et efficace pour des concentrations en métal inférieures à $100\ \mu\text{M}$.

Par contre, la signification du gène Cad B est beaucoup plus floue. La résistance codée par ce gène n'entraîne pas une accumulation moindre du métal chez les bactéries porteuses du plasmide. Selon PERRY et SILVER (1982), ce locus coderait pour un facteur protéique inductible complexant le cadmium : peut-être une métallothionéine.

Les plasmides de résistance aux antibiotiques et aux métaux sont courants chez les souches de *Staphylococcus aureus*, certains comme le plasmide PII 147 portent les deux gènes Cad A et Cad B, alors que d'autres comme le plasmide PI 258 ne portent que le locus Cad A (SMITH et NOVICK, 1972).

Plus récemment, un mutant de *Bacillus subtilis* résistant au cadmium a été isolé (LADDAGA et SILVER, 1985). Cette résistance n'est pas codée par un plasmide et semble due à une accumulation moindre du cadmium par le mutant.

La résistance aux métaux par une accumulation moindre ne serait donc pas un processus restreint aux bactéries porteuses de plasmides puisque certaines souches peuvent l'acquérir par mutation. Ainsi, si la stratégie développée est la même dans les deux cas, les moyens employés pour y arriver peuvent être différents.

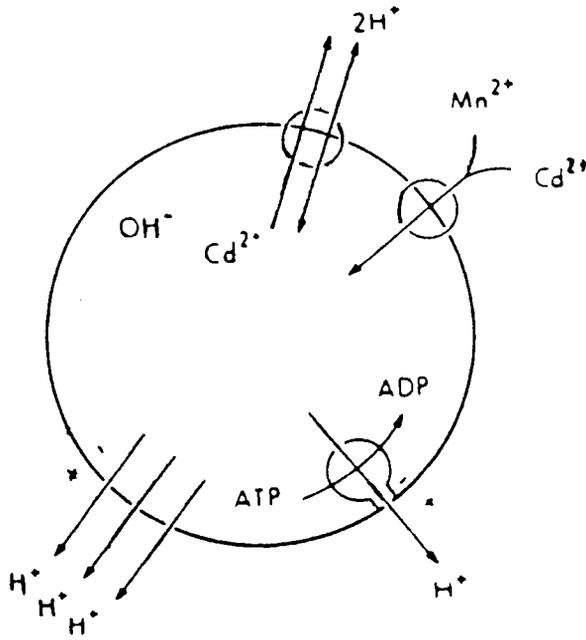


Figure 19. Schématisation des mécanismes d'accumulation et d'efflux du cadmium chez *Staphylococcus aureus* (d'après TYNECKA et al., 1981).

f - Certaines bactéries volatilisent le cadmium en méthyle de cadmium

La méthylation du cadmium par les bactéries apparaît comme une réaction parasite de la méthylation du mercure, elle-même parasite de la méthylation de la cobalamine dans le processus de synthèse de la méthionine.

Ainsi, un *Pseudomonas*, isolé à partir des sédiments de la Chesapeake Bay, capable de méthyler le mercure en présence de cobalamine, était aussi capable de transformer le cadmium en une forme volatile (SUMMERS et SILVER, 1978). En outre, l'exposition de cette forme volatile au mercure entraîne l'apparition de méthylmercure suggérant que la forme volatile est bien du cadmium méthylé.

Toutefois, ce mécanisme n'est pas considéré comme un mécanisme commun de détoxification du cadmium.

Il est bien évident que, parmi les mécanismes de résistance aux métaux décrits dans ce paragraphe, certains peuvent être développés simultanément par une même population bactérienne.

La compréhension des mécanismes de résistance au cadmium est tout à fait intéressante puisque d'une manière indirecte elle renseigne sur la localisation et la forme du métal toxique. Ainsi, des mécanismes de résistance comme l'efflux ou la synthèse de métallothionéine sont une preuve indirecte de la présence du métal au niveau intracellulaire.

Cette revue bibliographique sur l'accumulation et la toxicité du cadmium chez les bactéries nous fait découvrir à la fois la diversité et l'adaptabilité du monde bactérien, mais aussi l'incapacité dans laquelle nous sommes de formuler un schéma clair décrivant à la fois le mode d'accumulation du métal et sa toxicité.

Aussi, il nous a paru intéressant d'associer les deux types d'approches dans le cas particulier du rôle des structures bactériennes périphériques, afin de préciser les premières étapes de l'accumulation du métal et le rôle protecteur de ces structures.

3 - MATERIEL ET METHODES

3.1. SOUCHES BACTERIENNES ET MILIEUX DE CULTURE

Quatre souches bactériennes ont été utilisées dans cette étude.

Pseudomonas fluorescens (I.P. 6326) a été choisi comme représentant des bactéries gram négatives car cette souche est largement distribuée dans l'environnement et elle fait l'objet d'un test de toxicité sur bactéries.

Klebsiella aerogenes K54 A3 et K54 A3 (0) respectivement fort et faible producteur d'exopolysaccharides nous ont semblé constituer un outil adéquat pour étudier l'influence des exopolysaccharides sur l'accumulation et la toxicité du cadmium. Ces souches ont été fournies gracieusement par le Professeur J.P. Duguid (Université de Dundee, Ecosse).

Enfin, *Alteromonas haloplanktis* (ATCC 19855) est le microorganisme ayant permis à Forsberg et al. (1970) de mettre au point une méthode de préparation de muréinoplastes et de protoplastes. En comparant les protoplastes de *P. fluorescens* à ceux de *A. haloplanktis* nous avons voulu comparer l'efficacité de la méthode chez ces deux souches.

Pseudomonas fluorescens a été cultivé à 30°C avec agitation dans du bouillon nutritif peptoné, pH 6,9 (bio Mérieux 51101). *Klebsiella aerogenes* K54 A3 et son mutant K54 A3 (0) ont été cultivés à 37°C sous agitation dans un milieu liquide (BITTON et al., 1976) permettant chez le sauvage la production d'une importante capsule :

NaCl : 0,2 %, $K_2 SO_4$: 0,1 %, $Mg SO_4, 7H_2O$: 0,02 %, $Ca CO_3$: 1 %, $F_2 SO_4$: 0,0001 %, Bactopeptone : 0,1 %, Saccharose : 1 %.

Alteromonas haloplanktis a été cultivé à 35°C dans un milieu liquide contenant du bouillon nutritif peptoné (0,8 %) et de l'extrait de levure (0,5 %) dans une solution saline : NaCl : 0,22 M, $Mg Cl_2$: 0,026 M, K Cl : 0,01 M et $Fe_2 SO_4 (NH_2)_2 SO_4 6H_2O$: 0,1 mM.

Les souches ont été conservées sur tubes de gélose inclinés (bio Mérieux 51381 pour *P. fluorescens*). Pour les deux souches de *Klebsiella* et pour *A. haloplanktis*, leurs milieux respectifs décrits ci-dessus ont été utilisés additionnés de 15 g d'agar (Difco 140-01). Un repiquage a été effectué tous les deux mois.

3.2. COURBES DE CROISSANCE

Les courbes de croissance en milieu liquide ont été tracées par enregis-

trement de la densité optique de la culture en fonction du temps, à l'aide d'un biophotomètre (Bonet Maury) comportant six cuves de mesures thermostatées et possédant un système d'agitation continue.

L'utilisation du biophotomètre a permis de mesurer simultanément l'effet de 5 concentrations différentes en cadmium sur la croissance de *P. fluorescens* par comparaison avec un témoin dépourvu de cadmium.

De la même manière, deux concentrations en cadmium ont pu être testées et comparées à des témoins sans cadmium simultanément pour les deux souches de *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0).

3.3. PREPARATION DES MUREINOPLASTES ET DES PROTOPLASTES

Des muréinoplastes (bactéries sans membrane externe) et des protoplastes ont été préparés à partir des cultures de *P. fluorescens* et *A. haloplanktis* en phase stationnaire âgées de 24 heures, selon la méthode de Forsberg et al. (1970).

Les bactéries séparées du milieu de culture par centrifugation à 16300 g pendant 20 min à 4°C, étaient lavées deux fois par centrifugation et remises en suspension dans un volume égal au volume initial, d'une solution Na Cl 0,5 M stérile.

Les bactéries récoltées après les 2 lavages ont été appelées bactéries entières ou témoins.

Les muréinoplastes ont été préparés à partir des bactéries témoins centrifugées à 35000 g à 4°C pendant 20 min.

Les surnageants étaient éliminés et les culots rassemblés étaient resuspendus dans du saccharose 0,5 M ($\frac{1}{4}$ du volume initial). La suspension bactérienne dans le saccharose était agitée pendant 30 min à 25°C puis centrifugée de nouveau à 35000 g pendant 20 min. Le lavage de 30 min dans le saccharose 0,5 M a été répété quatre fois successives. A cette étape, la plupart des cellules bactériennes avaient perdu leur membrane externe, devenant des muréinoplastes, c'est-à-dire des cellules entourées uniquement de leur membrane cytoplasmique et d'une couche de peptidoglycane.

Les protoplastes ont été préparés à partir des muréinoplastes en suspension dans le saccharose 0,5 M et dilués au dixième dans du tampon tris-HCl pH8.

Du lysozyme (SIGMA L6876) a été ajouté à la concentration finale de 100 µg/ml, et la suspension a été agitée à 25°C jusqu'à ce que les cellules qui

avaient une forme en bâtonnet deviennent sphériques. Les changements de morphologie cellulaire ont été observés au microscope à contraste de phase (Leitz Dialux).

3.4. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Des aliquotes des suspensions de bactéries entières, muréinoplastes et protoplastes ont été centrifugés à 11000 g pendant 10 min à 4°C. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans du glutaraldéhyde à 2,5 % dans du tampon cacodylate 0,1 M de pH 7,2 et ont été maintenues à 4°C pendant 1 heure. Après cette étape de fixation, les bactéries ont été lavées deux fois par centrifugation et remise en suspension dans du tampon cacodylate 0,1 M.

Les cellules bactériennes ont été déshydratées par passage dans des bains successifs d'alcool éthylique de concentration croissante, puis incluses dans de l'épon 812.

Des coupes fines ont été obtenues avec un ultramicrotome puis contrastées par une solution aqueuse d'acétate d'uranyl à 2 %. Pour l'observation des coupes, un microscope électronique SIEMENS 102 a été utilisé (Laboratoire de Microscopie Electronique du Professeur G. GRIGNON, Faculté de Médecine, Université de NANCY).

3.5. RESPIROMETRIE

La respiration a été suivie pour comparer la sensibilité au cadmium de bactéries entières, muréinoplastes et protoplastes d'une part, et celle de bactéries dont les groupements carboxyles ont été bloqués ou non.

La diminution de la pression partielle en oxygène a été mesurée dans une chambre étanche de 30 ml thermostatée à 25°C possédant un système d'agitation.

Avant introduction dans la chambre de mesure, le bouillon nutritif contenant les bactéries était saturé en oxygène par un bullage d'air pendant 10 min à 25°C.

La pression partielle en oxygène dans la chambre a été mesurée pendant 10 min par une électrode à oxygène (Radiometer) et la consommation d'oxygène par les bactéries a été calculée comme suit :

$$C.O_2 = V\alpha \frac{pO_2^i - pO_2^f}{t_f - t_i}$$

ou $C.O_2$ est la consommation d'oxygène

V est le volume de la chambre de mesure

α est le coefficient de solubilité de l'oxygène dans l'eau, à 25°C et à la pression atmosphérique (mg O_2 /1/torr)

pO_2^i est la pression partielle en oxygène initiale (torr)

pO_2^f est la pression partielle en oxygène finale (torr)

$t_f - t_i$ est le temps pendant lequel la consommation d'oxygène a été mesurée ≈ 10 min.

Les mesures ont été effectuées sur trois aliquotes dans chaque expérimentation.

3.6. DOSAGE DES HEXOSAMINES

Avant le dosage proprement dit, les bactéries ont été hydrolysées dans de l'HCl 6N à 105°C pendant 3 heures. La réaction a été stoppée, après refroidissement, par neutralisation de la suspension avec NaOH 6N. Le volume de chaque hydrolysate a été complété à 10 ml avec de l'eau distillée stérile et une centrifugation à 2500 g pendant 15 min a été réalisée pour éliminer la fraction insoluble.

Le contenu en hexosamines a été déterminé par la méthode d'ELSON-MORGAN modifiée par MONTREUIL et SPIK (1963).

Les chlorures atténuant la coloration, la gamme étalon a été préparée à partir de D glucosamine (Merck 4113) à une concentration en chlorure de sodium identique à celle de l'hydrolysate.

Dans des tubes de 50 ml, préalablement traités à l'acide chlorhydrique 5 %, ont été successivement introduits 2 ml de la solution à doser, 1 ml d'une solution d'acétyl-acétone (acétyl acétone 14 % (Merck 9600) vol/vol, carbonate de sodium anhydre (Merck 6392) 1,25 N) et 1 ml d'eau distillée. Les tubes ont été agités pendant 15 sec, bouchés et placés pendant 10 min dans un bain-marie bouillant. Les tubes ont ensuite été refroidis dans la glace et 5 ml d'alcool absolu ont été ajoutés. Après 15 sec d'agitation, les tubes ont été placés dans un bain-marie à 75°C pendant 5 min. Le réactif d'Ehrlich (p. diméthylamino-benzaldéhyde, Merck 3058, 5,32 % pds/vol dans de l'acide chlorhydrique pur concentré), 1 ml par tube, a alors été ajouté lentement et les tubes ont été maintenus

pendant 15 min à 75°C. Les tubes ont ensuite été refroidis et de nouveau 5 ml d'alcool absolu par tube ont été introduits. Les tubes ont été agités pendant 30 sec et placés pendant 30 min à l'obscurité. La coloration rose a été lue à 520 nm.

Une gamme étalon et des réactifs neufs ont été préparés lors de chaque dosage car un glissement des courbes de dosage a parfois été observé (Figure 20). Les résultats ont été exprimés en μg de glucosamine par bactérie.

La précision de la méthode a été déterminée en dosant 3 fois un même hydrolysate bactérien. Cette détermination a été réalisée 3 fois avec des réactifs différents et rapportée à 3 gammes étalon (Tableau 5). Cette précision était toujours inférieure à 5 %.

Les hexosamines ont ainsi été dosées sur des aliquotes de muréinoplastes et de protoplastes ajustés à un même nombre de cellules par numération directe sous microscope à contraste de phase avec un hémocytomètre.

Ainsi, les concentrations en hexosamines obtenues étaient directement comparables, et le pourcentage d'hexosamines encore présent dans les protoplastes a pu être déterminé.

Dans les différentes préparations de protoplastes, ce pourcentage exprimant l'efficacité de la digestion enzymatique du peptidoglycane par le lysozyme, variait entre 2 et 30 % du contenu dosé dans les muréinoplastes correspondants chez *P. fluorescens* et *A. haloplanktis*.

3.7. DOSAGE DES EXOPOLYSACCHARIDES

La quantité d'exopolysaccharides présents chez *Klebsiella aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0) a été estimée par un dosage des sucres neutres totaux. Les dosages ont été effectués directement sur les suspensions bactériennes par la méthode au phénol - sulfurique de DUBOIS et al. (1956) modifiée par MONTREUIL et SPIK (1963).

Des volumes de 1 ml de suspension bactérienne et 1 ml d'une solution de phénol à 5 % ont été mélangés dans des tubes très propres. Puis 5 ml d'acide sulfurique concentré (Merck 731) ont été rapidement ajoutés à l'aide d'une pipette. Les tubes étaient ensuite agités pendant 15 sec, maintenus à 110°C pendant 5 min et conservés pendant 30 min à l'obscurité, à température ambiante.

Tableau 5 : Détermination de la précision du dosage des hexosamines par la méthode d'Elson Morgan modifiée par Montreuil et Spik (1963).

Equation de la droite de régression servant de référence	Coefficient de corrélation	D O 520 nm	µg de glucosamine	\bar{M}	σ
$y = 0,005 x - 0,0272$	0,9972	0,138	33,04	31,77	1,14
		0,130	31,44		
		0,127	30,84		
$y = 0,0049 x - 0,0148$	0,9998	0,143	32,20	33,22	0,94
		0,149	33,43		
		0,152	34,04		
$y = 0,0052 x - 0,0074$	0,9957	0,154	31,04	31,10	1,06
		0,160	32,19		
		0,149	30,08		

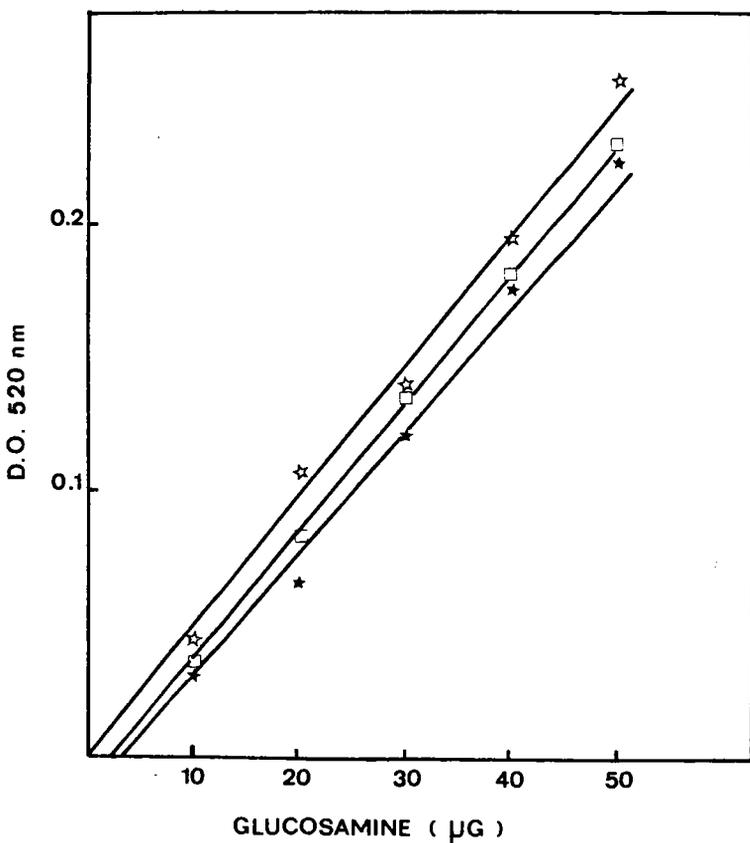


Figure 20: Trois gammes étalon en glucosamine dosées par la méthode de Montreuil et Spik (1963):

Avant lecture au spectrophotomètre, les tubes ont été centrifugés à 2500 g pendant 10 min pour sédimenter les débris bactériens. L'absorbance de la coloration jaune-orangée caractéristique a été mesurée à 492 mn (maximum d'absorption pour les hexoses).

Les valeurs obtenues pour des gammes de concentration en glucose traitées dans les mêmes conditions et préparées extemporanément ont été rapportées (Figure 21).

Les résultats ont été exprimés en µg d'équivalents de glucose par bactérie. La précision de la méthode a été déterminée en dosant 3 fois une suspension bactérienne. Cette détermination a été triplée avec des réactifs différents et rapportée à 3 gammes étalon préparées simultanément (Tableau 6). La précision était toujours inférieure à 7 %.

Une corrélation a été observée entre cette méthode et le dosage des charges électronégatives à la périphérie cellulaire par le bleu alcyan (LEYVAL, communication personnelle, 1982) ce qui tend à prouver qu'elle est utilisable pour doser les sucres périphériques.

3.8. BLOCAGE DES GROUPEMENTS CARBOXYLES

Les groupements carboxyles de *P. fluorescens* ont été bloqués selon la méthode décrite par DOYLE et al. (1981).

La réaction théorique de blocage des carboxyles est résumée sur la figure 22. Elle est obtenue en présence de deux réactifs : le 1 éthyl -3, 3'diméthylaminopropyl carbodiimide et l'éthanolamine à pH acide.

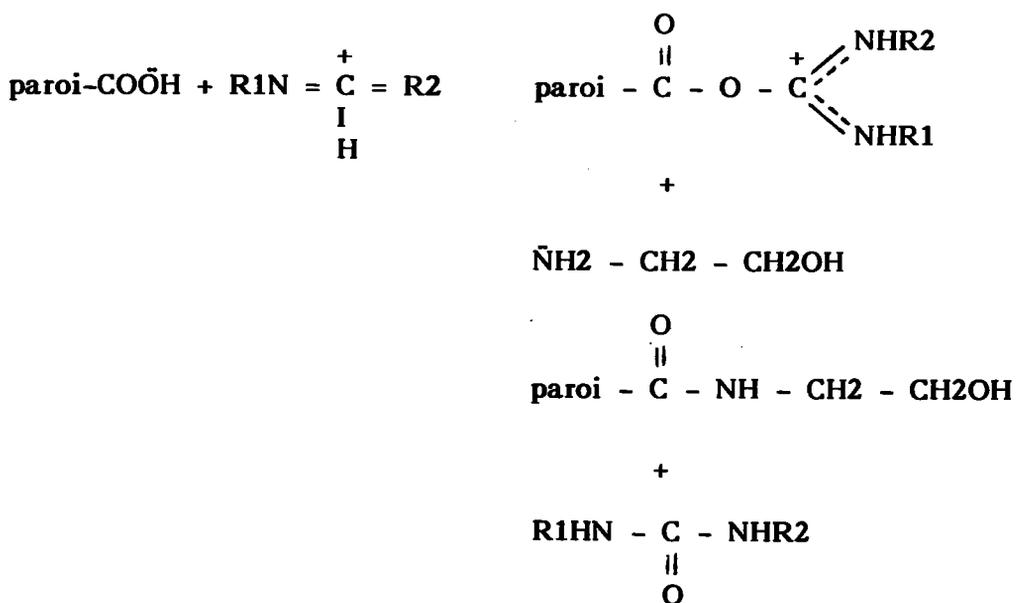


Figure 22 : Schéma général de la réaction de blocage des groupements carboxyles.

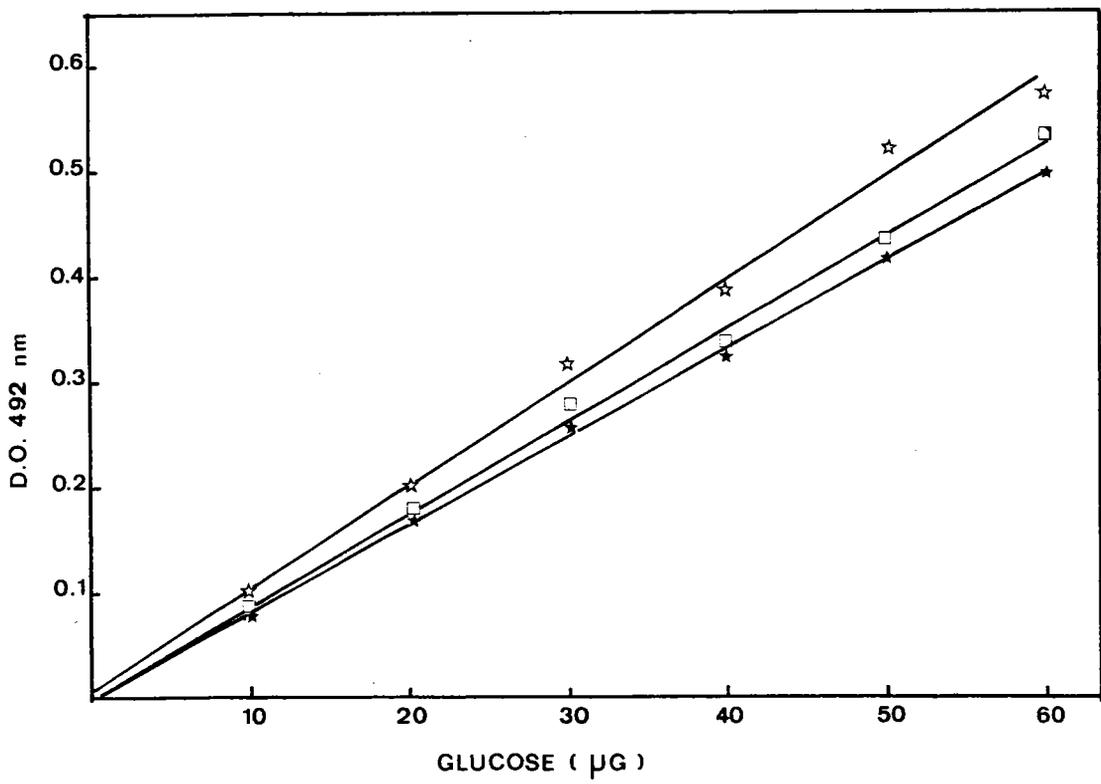


Figure 21: Trois gammes étalon en glucose dosées par la méthode au phénol sulfurique.

Tableau 6 : Détermination de la précision du dosage des exopolysaccharides par la méthode au phénol sulfurique de Dubois et al. (1956) modifiée par Montreuil et Spik (1963).

Equation des droites de régression servant de référence	Coefficient de corrélation	D O 492 nm	µg d'équivalent glucose	\bar{M}	σ
$y = 0,0086 x + 0,0057$	0,9972	0,120 0,133 0,135	13,29 14,80 15,03	14,37	0,94
$y = 0,0091 x - 0,007$	0,9947	0,149 0,148 0,153	17,14 17,03 17,58	17,25	0,29
$y = 0,0082 x + 0,0029$	0,9932	0,134 0,146 0,143	15,99 17,45 17,08	16,84	0,76

Les bactéries en phase stationnaire âgées de 24 h ont été lavées deux fois par centrifugation à 2500 g et remises en suspension dans de l'eau distillée stérile (la moitié du volume initial).

Les culots de la troisième centrifugation ont été rassemblés et resuspendus dans une solution de Ca Cl_2 0,2 M pH 4,8, de façon à obtenir une densité bactérienne de 10^{10} à 10^{11} U.F.C.. ml^{-1} De l'éthanolamine 0,5 M et du 1 éthyl - 3 , 3'diméthylaminopropyl carbodiimide 0,2 M ont été ajoutés à la suspension.

Le mélange a été agité, et le pH ajusté à 4,8. L'erlen contenant la suspension et les réactifs de blocage a ensuite été maintenu durant 6 h à 22°C sous agitation.

Deux types de témoins ont été préparés : (i) les bactéries en suspension dans du Ca Cl_2 0,2 M à pH 4,8 ont été maintenues durant 6 h à 22°C sous agitation, mais sans les réactifs de blocage, (ii) ou bien, les réactifs de blocage ont été ajoutés à la suspension bactérienne, mais le pH du mélange a été ajusté à 7, limitant partiellement le développement de la réaction de blocage.

La réaction terminée, les bactéries ont été lavées deux fois par centrifugation à 2500 g pendant 10 min et remises en suspension dans un même volume d'une solution saline stérile (Na Cl 0,85 %).

Les suspensions de bactéries dont les carboxyles ont été bloqués et les bactéries témoins ont ensuite été dialysées durant 12 h à 4°C contre la solution saline stérile (Na Cl 0,85 %).

3.9. NUMERATIONS BACTERIENNES

Les numérations bactériennes ont été effectuées par comptage sur boîte de Pétri des bactéries revivifiabiles sur gélose (bio Mérioux 51381) après une incubation de 24 h. Pour les quatre souches utilisées, une correspondance entre l'absorbance à 620 nm des suspensions bactériennes et le nombre d'unités formant colonie (U.F.C.) a été déterminée.

3.10. PREPARATION DU MATERIEL

Dans toutes les expérimentations, la vaisselle ayant contenu du cadmium

a été lavée dans un bain d'acide chlorhydrique technique à 5 %, et rincée trois fois à l'eau déminéralisée puis à l'eau distillée, de manière à désorber le cadmium éventuellement fixé sur les parois.

Les expérimentations réalisées en conditions stériles ont été conduites avec du matériel et des solutions autoclavées à 125°C pendant 20 min.

3.11. DOSAGES DU CADMIUM

Le cadmium a été dosé par trois méthodes selon les expérimentations : spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme, radioactivité et électrode spécifique.

a) Le cadmium non accumulé par les bactéries a été dosé en duplicat sur les surnageants, après élimination des bactéries par centrifugation, en spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme (PERKIN ELMER 305 B). Les conditions expérimentales de ce dosage sont données dans le tableau 7.

b) Le cadmium radioactif (^{109}Cd) accumulé par les bactéries a été compté, après filtration des bactéries sur des filtres de porosité 0,45 μm (millipore type HAWP). Les filtres ont été séchés, introduits dans des fioles de comptage, additionnés de 0,5 ml d'acide formique pour permettre le comptage de la radioactivité intracellulaire, et laissés pendant 10 min à température ambiante. Ensuite 15 ml de liquide scintillant (BECKMAN HP/b Ready Solv) ont été ajoutés. La radioactivité a été comptée dans un compteur à scintillation liquide (LKB 1211 Minibeta). Chaque fiole a été comptée trois fois successives pendant 5 min. Une correspondance entre ci et cpm a été établie de façon à exprimer les résultats en μmoles de cadmium accumulé.

c) Le cadmium libre en solution, sous forme d'ions Cd^{2+} , a été mesuré dans des conditions de température et pH standardisées par un analyseur d'ions (Orion Research Ionalyser 901) équipé avec une électrode au cadmium (Orion Research 94 48). La force ionique des solutions ou suspensions contenant du cadmium était ajustée à 2 % de Na NO_3 5 M.

3.12. DETERMINATION DE L'INCERTITUDE SUR L'ACCUMULATION DU $^{109}\text{CADMIUM}$

Les expérimentations visant à déterminer l'accumulation de ^{109}Cd dans

Tableau 7 : Conditions expérimentales du dosage du cadmium par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme (l'absorbance est mesurée à 229 nm).

Phase	température °C	temps (s)	montée en température (s)	gaz stop
SECHAGE	150	30	2	
MINERALISATION	350	25	7	
ATOMISATION	1950	3	2	25 s

différentes conditions ont généralement été reconduites trois fois. Dans chacune de ces expérimentations, le comptage de la radioactivité a été répété trois fois successives pendant 5 min, et a permis de déterminer une incertitude sur le comptage lui-même.

Toutefois, nos conditions expérimentales ne permettaient pas, pour des raisons pratiques, de préciser systématiquement l'incertitude sur les valeurs obtenues pour l'accumulation du ^{109}Cd . Cette incertitude a été déterminée par une expérimentation indépendante.

A partir d'une culture bactérienne en phase exponentielle, 3 x 1 ml ont été prélevés et répartis dans 3 erlens A, B et C contenant une même quantité de milieu nutritif neuf et stérile, comme pour les erlens préparés pour mesurer la cinétique d'accumulation du ^{109}Cd .

Le bruit de fond a été mesuré sur un aliquote de 0,5 ml pour chacun des erlens puis le cadmium marqué a été ajouté à chaque erlen (8,9 μM , 50 ci/mole).

Des mesures du $^{109}\text{Cadmium}$ accumulé par les bactéries ont été réalisées simultanément sur chacun des trois erlens de manière à déterminer la variation intergroupe.

De la même manière, la radioactivité accumulée par les bactéries d'un même erlen a été comptée sur trois prélèvements simultanément de manière à déterminer la variation intragroupe.

Chaque comptage de radioactivité a été répété 3 fois successives. Les transformées logarithmiques des résultats bruts ont été portées dans le tableau 8.

Le calcul de l'incertitude sur la détermination du ^{109}Cd accumulé par les bactéries a été basé sur un échantillonnage à 3 niveaux :

1er niveau	p = 1	erlen contenant la suspension bactérienne
2ème niveau	q = 1	prélèvement de 500 μl dans l'erlen
3ème niveau	r = 3	comptage de radioactivité

Il a été supposé comme hypothèse de départ que la variable suit une loi Log normale, c'est-à-dire $y = \text{Log}_{10}X$.

Tableau 8 : Résultat du dosage de ^{109}Cd après transformation logarithmique des données brutes en cpm.

ERLEN (échantillon) (p)	PRELEVEMENT (sous échantillon) (q)	DOSAGE REPETITION (r)		
		1	2	3
A	A1	1,170	1,025	0,982
	A2	1,204	1,086	1,114
	A3	1,009	1,127	1,140
B	B1	1,049	1,121	1,009
	B2	1,140	1,152	1,240
	B3	0,944	1,033	1,064
C	C1	1,114	1,215	1,140
	C2	1,187	1,330	1,301
	C3	1,225	1,182	1,215

La variance $\sigma^2_{\bar{y}}$ de la moyenne arithmétique \bar{y} des logarithmes décimaux de la radioactivité accumulée par les bactéries est donnée par la formule suivante :

$$\sigma^2_{\bar{y}} = \frac{\sigma^2_{\text{inter}}}{p} + \frac{\sigma^2_{\text{intra}}}{pq} + \frac{\sigma^2_{\text{comptage}}}{pqr}$$

(d'après SNEDECOR et COCHRAN, 1957),

où σ^2_{inter} , σ^2_{intra} et $\sigma^2_{\text{comptage}}$ désignent les composantes de la variance analytique correspondant à chacun des trois niveaux d'échantillonnage.

L'estimation des composantes de variance a été présentée dans le tableau 9. Auparavant, l'égalité des variances a été vérifiée par le test de Cochran.

COMPOSANTE DE VARIANCE	VALEUR ESTIMEE	
$\sigma^2_{\text{COMPTAGE}}$	0,0042	(15,1 %)
σ^2_{INTRA}	0,0039	(14,1 %)
σ^2_{INTER}	0,052	(17,1 %)

Tableau 9 : Estimation des composantes de variance.

La variance $\sigma^2_{\bar{y}}$ est calculée à partir des composantes de variance et donne la valeur $\sigma^2_{\bar{y}} = 0,0105$

et $\sigma_x = 0,2359$ ce qui correspond à un coefficient de variation sur X de 23,3 % donné par la table de la loi Log-Normale.

4 - RESULTATS

Le présent chapitre rapporte les résultats des expérimentations. Sept parties principales peuvent en être dégagées et vont être présentées successivement :

- 4.1. Cinétiques d'accumulation du cadmium par *P. fluorescens*.
- 4.2. Spécificité de l'accumulation.
- 4.3. Effets du cadmium sur la croissance de *P. fluorescens* en milieu liquide.
- 4.4. Recherche d'un transport actif du cadmium chez *P. fluorescens*.
- 4.5. Rôle des exopolysaccharides dans l'accumulation et la toxicité du cadmium chez *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0).
- 4.6. Rôle des enveloppes bactériennes dans l'accumulation et la toxicité du cadmium chez *P. fluorescens* et *A. haloplanktis*.
- 4.7. Rôle des groupements fonctionnels carboxyliques dans l'accumulation et la toxicité du cadmium chez *P. fluorescens*.

4.1. CINETIQUES D'ACCUMULATION DU CADMIUM PAR *P. FLUORESCENS*

L'accumulation du cadmium par *P. fluorescens* a tout d'abord été étudiée sous son aspect cinétique. Des cinétiques d'accumulation du cadmium (solutions à 17,8 μM) ont été réalisées avec 3 suspensions de densités bactériennes différentes.

Le protocole suivant a été réalisé.

Une population bactérienne en fin de phase exponentielle de croissance a été utilisée et préparée comme suit : 10 ml de bouillon nutritif peptoné (bio Mérieux 51101) ont étéensemencés à partir d'un tube de gélose incliné âgé de 24 h, puis incubés à 30°C pendant 8-10 heures.

Le contenu de ce tube était ensuite introduit aseptiquement dans un erlenmeyer contenant 500 ml de milieu neuf et stérile.

Après 14 heures de culture à 30°C sous agitation, les bactéries en fin de phase exponentielle de croissance étaient récupérées par centrifugation à 2500 g pendant 10 min, lavées deux fois dans du tampon tris 0,1 M - Na Cl 0,1 M stérile pH 7,3 ($\frac{1}{4}$ du volume initial), formant ainsi une suspension bactérienne contenant 10^8 à 10^9 bactéries .ml⁻¹.

Pour étudier l'influence de la densité bactérienne sur la cinétique d'accumulation du cadmium chez *P. fluorescens*, les trois populations bactériennes ne différant entre elles que par leur densité cellulaire : $1,5 \times 10^6$, $1,5 \times 10^7$ et $1,5 \times 10^8$ U.F.C. .ml⁻¹ ont été préparées par dilution dans du tampon tris-Na Cl à partir de cette suspension.

Dans des tubes de plastique (Labo Express Service 1230) de 10 ml des aliquotes de suspensions bactériennes (1,5 ml) ont été additionnés à 1,5 ml d'une solution de chlorure de cadmium, préparée dans de l'eau distillée, de façon à produire une concentration finale en cadmium dans les tubes de 17,8 µm.

Après agitation, ces suspensions bactériennes ont été réparties en triplicats dans des tubes séparés (3 ml/tube) puis incubés immédiatement à 30°C, avec agitation.

Après respectivement 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 5 h de temps de contact avec le métal, 3 tubes ont été prélevés et centrifugés à 2500 g pendant 5 min pour sédimenter les bactéries.

Le cadmium resté en solution a été dosé deux fois sur les surnageants par spectrophotométrie d'absorption atomique.

La fixation du cadmium sur les parois des tubes de plastique pendant la durée de l'expérimentation a été préalablement mesurée et estimée comme une quantité négligeable car toujours inférieure à 6×10^{-4} µg de cadmium par tube.

Le cadmium accumulé par les bactéries a été calculé par différence entre le cadmium ajouté, dosé sur des tubes sans bactéries, et le cadmium dosé sur les surnageants après élimination des bactéries. Des tubes sans cadmium ont été utilisés pour vérifier par numération sur gélose en début et en fin de cinétique l'absence de croissance bactérienne pendant la durée de l'expérience.

Les résultats bruts et les pourcentages de fixation du cadmium obtenus sont reportés en annexe 1. Les cinétiques obtenues sont représentées sur la figure 23.

Les trois courbes correspondant aux trois densités bactériennes ont une allure identique montrant une accumulation du métal par les bactéries maximales après 15 minutes de contact. Par contre, au-delà de 15 minutes de contact, la quantité de métal retenue par les bactéries n'évolue pratiquement plus.

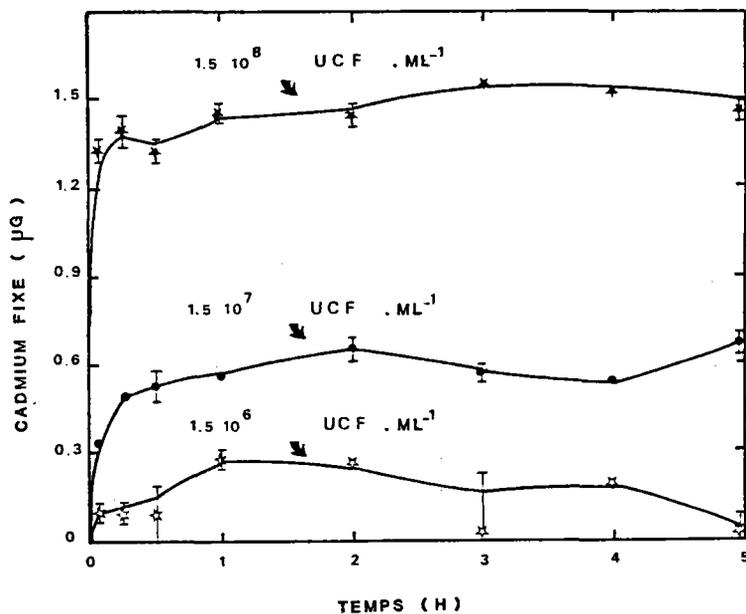


Figure 23 : Cinétiques d'accumulation du cadmium par *P. fluorescens* pour trois densités bactériennes différentes.

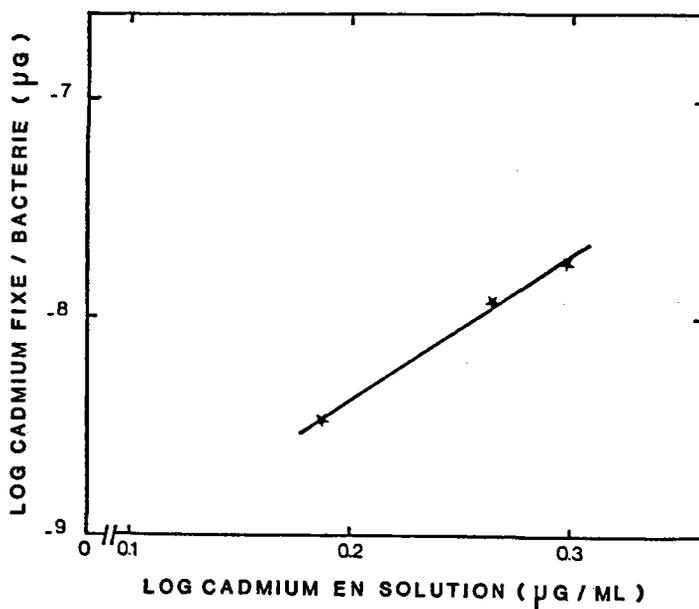


Figure 24 : Isotherme d'adsorption de Freundlich pour l'accumulation du cadmium par *P. fluorescens*.

La comparaison des trois cinétiques montre que l'accumulation du cadmium augmente avec la densité bactérienne et les valeurs obtenues pour la fixation du cadmium par les bactéries en fin de cinétique ont été utilisées pour tracer un isotherme d'adsorption de type Freundlich (Figure 24).

L'obtention d'une relation linéaire entre le métal fixé par les cellules et le métal restant en solution prouve que l'adsorption est un des mécanismes d'accumulation du métal chez *P. fluorescens*.

Dans ces conditions, la quantité maximale de cadmium fixé est approximativement 1,5 µg pour 10^8 U.F.C. ce qui correspond à 25,8 % du cadmium ajouté fixé par les bactéries.

Nous avons voulu déterminer si l'accumulation du cadmium par *P. fluorescens* était, comme la plupart des phénomènes d'adsorption, un processus non spécifique.

4.2. SPECIFICITE DE L'ACCUMULATION DU ^{109}Cd CHEZ *P. FLUORESCENS*

Afin de déterminer si l'accumulation du cadmium était due à un mécanisme spécifique aux ions cadmium ou si la pénétration de ce métal dépendait de l'accumulation d'autres ions, des effets compétitifs du calcium, du magnésium, du zinc et du manganèse sur l'accumulation du cadmium ont été recherchés.

Les concentrations en cations divalents ajoutées ont été choisies à priori deux fois supérieures à la concentration en cadmium utilisée, c'est-à-dire $8,9\mu\text{M} \times 2$.

L'accumulation de ^{109}Cd par *P. fluorescens* a été mesurée en fonction du temps en présence de cations divalents (Ca, Mg, Zn et Mn) ajoutés au milieu. 145 µl d'une solution de cadmium ($614\mu\text{M}$, 50 ci/mole) et 100 µl d'une solution de cations divalents 1,78 mM préparée dans l'eau distillée ont été préalablement mélangés puis ajoutés à une suspension bactérienne en phase exponentielle dans du bouillon nutritif peptoné neuf (volume final 10 ml). Dans les erlens témoins, les 100 µl de cations divalents en solution ont été remplacés par 100 µl d'eau distillée.

Des aliquots de 0,5 ml ont été prélevés 1, 4, 7, 10, 13, 16 et 19 min après l'addition des métaux. Ces prélèvements de suspensions bactériennes ont été filtrés sur des membranes filtrantes en cellulose (Millipore type HAWP, porosité : $0,45\mu\text{m}$) préalablement humidifiées avec de l'eau distillée. Les filtres ont

ensuite été lavés avec 10 ml d'eau distillée et la radioactivité retenue mesurée en scintillation liquide.

Le bruit de fond a été déterminé en mesurant l'activité des suspensions bactériennes avant l'addition du cadmium marqué. De plus, la rétention du cadmium marqué sur les filtres a été évaluée au préalable en filtrant 0,5 ml d'une solution de cadmium marqué $8,9 \mu\text{M}$, 50 ci/mole. Le cadmium retenu sur les filtres variait entre 0,1 et 0,04 % de la radioactivité totale déposée.

La radioactivité perdue durant la filtration a été estimée par comparaison entre la radioactivité totale contenue dans le prélèvement de suspensions bactériennes (0,5 ml) comptée directement, et la somme des radioactivités comptées après filtration et lavage sur le filtre et dans le filtrat d'un prélèvement identique. Ainsi, il a été montré que la radioactivité perdue était toujours inférieure à 10 %.

Le contenu en Ca, Mg, Zn et Mn du bouillon nutritif peptoné a été analysé par spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme par le Laboratoire Départemental d'Hygiène de METZ.

Cette analyse révèle que le milieu utilisé contient déjà une forte concentration en Ca et Mg. Ainsi, seule l'addition de zinc et de manganèse augmente considérablement la concentration de ces éléments dans le milieu d'un facteur 8,7 et 94,7 respectivement (Tableau 10).

Les résultats reportés dans les figures 25 et 26 montrent que l'accumulation du ^{109}Cd est diminuée d'un facteur 1,2 et 1,4 par le calcium et le magnésium respectivement selon le rapport, après intégration, des surfaces délimitées par les cinétiques. Ces valeurs ne sont pas suffisantes pour conclure à un effet de ces ions sur l'accumulation de cadmium, étant donné l'incertitude sur les mesures de 23 % estimées indépendamment (chapitre 3.12. page 73).

L'introduction de zinc dans le milieu nutritif ne modifie pas l'accumulation du cadmium par *P. fluorescens* (Figure 27) alors que les ions Mn^{2+} produisent une inhibition de l'accumulation de ce même métal d'un facteur 2,4 (Figure 28).

Aussi, la fixation bactérienne du cadmium n'est pas un processus spécifique des ions cadmium puisqu'elle peut être diminuée en présence de manganèse. L'étude de plusieurs doses est toutefois nécessaire pour conclure quant à l'effet du calcium et du magnésium.

Tableau 10 : Concentrations en cations divalents utilisées dans les expériences de compétition avec le cadmium.

METAL	CONCENTRATIONS DANS LE MILIEU NUTRITIF (μM)	CONCENTRATIONS APRES ADDITION DU METAL (μM)	FACTEUR D'AUGMENTATION
Ca	70.5	88	1.2
Mg	36	54	1.5
Zn	2.3	20	8.7
Mn	0.19	18	94.7

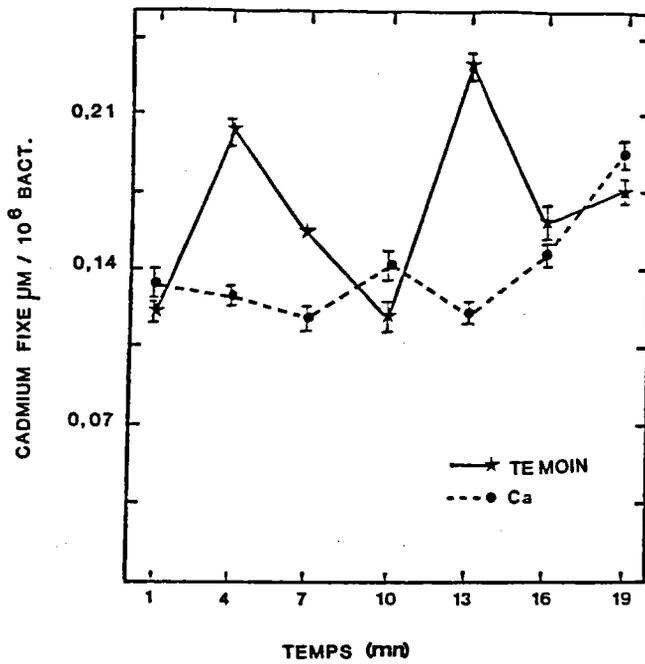


Figure 25 : Accumulation de ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de Ca ($17,8 \mu\text{M}$) ajouté dans le milieu.

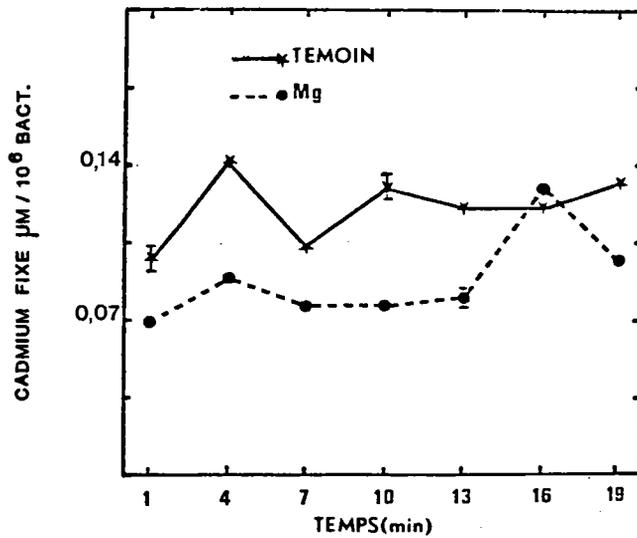


Figure 26 : Accumulation de ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de Mg ($17,8 \mu\text{M}$) ajouté dans le milieu.

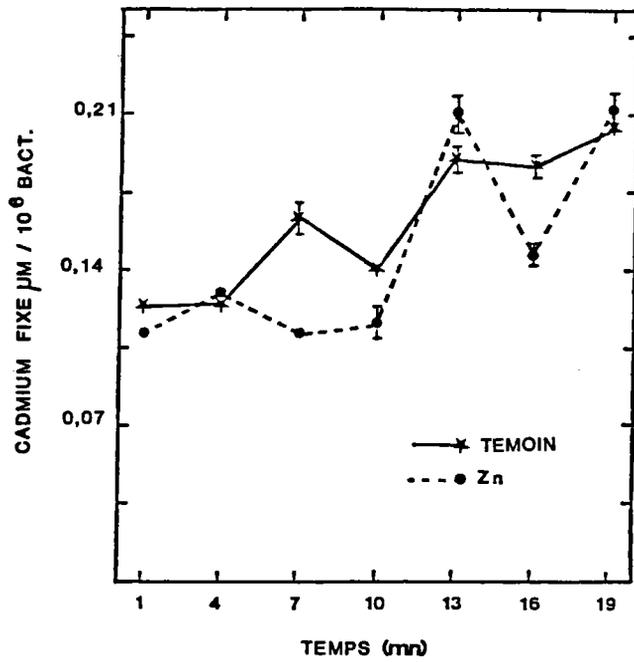


Figure 27 : Accumulation de ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de Zn ($17,8 \mu\text{M}$) ajouté dans le milieu.

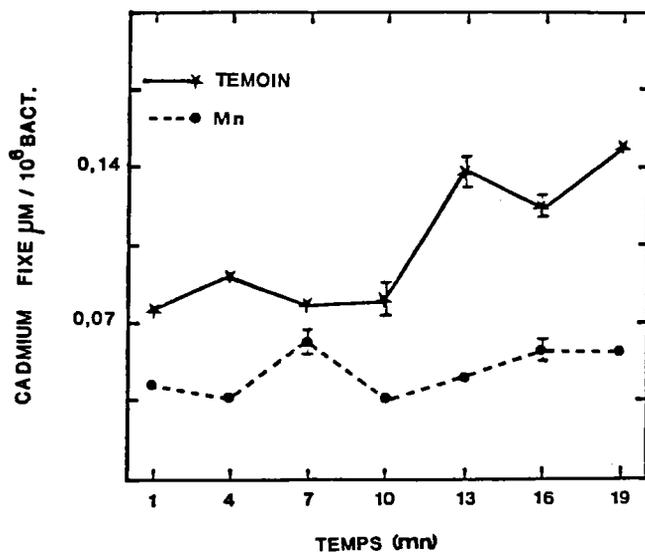


Figure 28 : Accumulation de ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de Mn ($17,8 \mu\text{M}$) ajouté dans le milieu.

Même si l'adsorption non spécifique est un des mécanismes d'accumulation du cadmium, il est vraisemblable que la totalité du métal ne reste pas à la périphérie de la bactérie mais qu'une partie du métal parvient au niveau cellulaire où il est susceptible d'occasionner des perturbations.

Dans ce sens, nous avons cherché à évaluer les effets toxiques du cadmium sur la croissance de *P. fluorescens*.

4.3. EFFETS DU CADMIUM SUR LA CROISSANCE DE *P. FLUORESCENS* EN MILIEU LIQUIDE

Les effets du cadmium sur la croissance bactérienne ont été déterminés par comparaison des courbes de croissance obtenues en présence de concentrations en cadmium allant de 8,9 à 89 μM .

La croissance de *P. fluorescens* en milieu liquide a été mesurée dans un biophotomètre à six cuves, à 30°C sous agitation pendant 48 h.

Six concentrations différentes en cadmium 0 ; 8,9 ; 26,7 ; 44,4 ; 71,2 et 89 μM ont été utilisées pour déterminer une concentration inhibitrice à 50 % (CI 50).

Du bouillon nutritif peptoné dilué au 1/2 a été employé pour permettre l'enregistrement complet des courbes de croissance de *P. fluorescens* (densité optique en fonction du temps) l'appareil ne traçant les courbes que sur une échelle fixe comprise entre 0 et 1 en densité optique.

Comme l'indique la figure 29, la phase de latence augmente avec la concentration en métal, cependant que le taux de croissance et la production de biomasse en phase stationnaire sont diminués.

Les concentrations inhibitrices à 50 % (C.I.50) ont été déterminées pour chacun des trois paramètres de la croissance affectés par le cadmium. Dans ces trois cas, les C.I.50 obtenues pour les paramètres de la croissance étudiés sont comprises entre 27 et 31 μM .

La mesure d'une toxicité pour la croissance bactérienne en présence de cadmium suggère la localisation du métal au niveau intracellulaire ou, tout au moins, au niveau membranaire. Il existe donc vraisemblablement un mécanisme permettant au cadmium de traverser la membrane plasmique et nous avons cherché à savoir si ce mécanisme était énergie-dépendant.

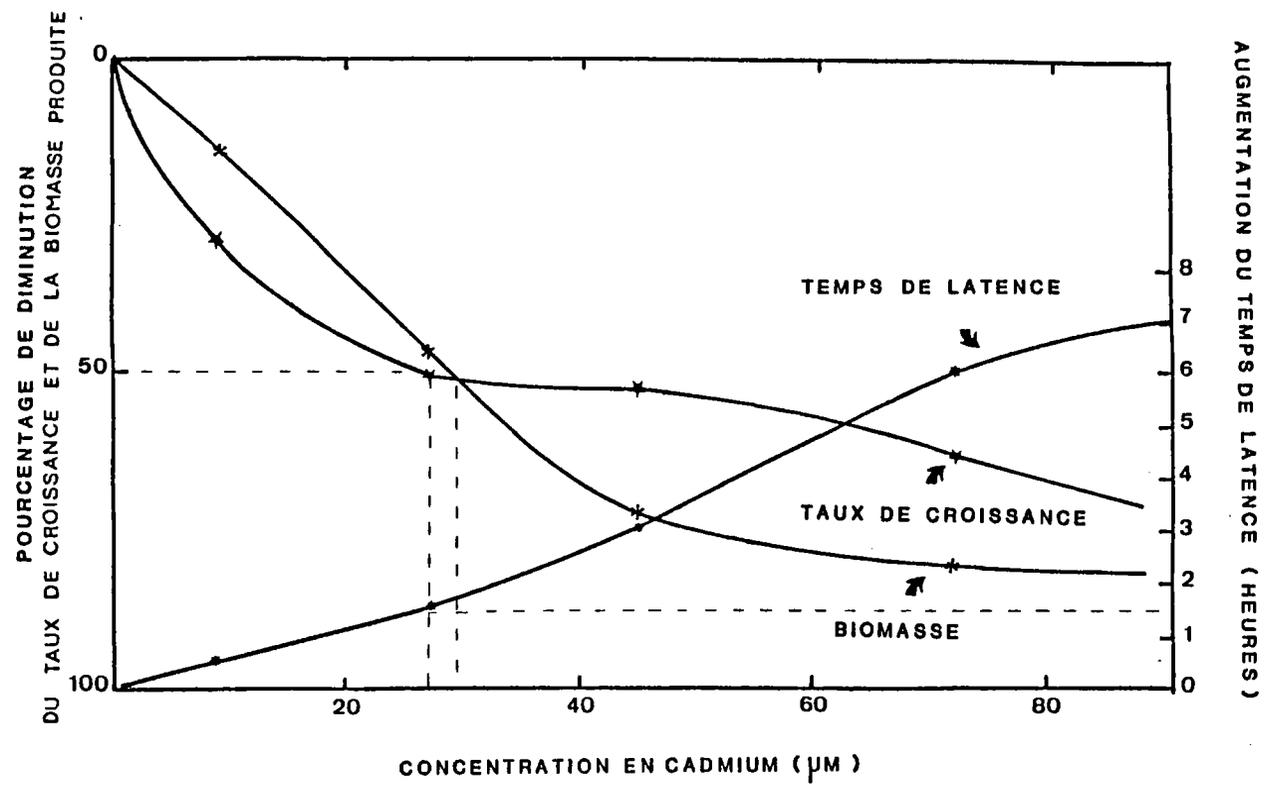


Figure 29 : Effets du cadmium sur la croissance de *P. fluorescens*. La phase de latence chez le témoin sans cadmium était de 1,5 h.

4.4. RECHERCHE D'UN TRANSPORT ACTIF POUR LE CADMIUM CHEZ *P. FLUORESCENS*

L'effet d'inhibiteurs métaboliques, de la température, et des éléments nutritifs a été considéré afin de mettre en évidence l'éventuelle dépendance énergétique de l'accumulation du cadmium par *P. fluorescens*.

Des bactéries en phase exponentielle de croissance ont été obtenues après 3 subcultures successives en milieu liquide, dont la première était ensemencée à partir d'un tube de gélose incliné âgé de 24 h, incubées à 30°C pendant respectivement 2 x 24 h et 5 h.

La culture obtenue avait toujours une densité optique à 620 nm comprise entre 0,2 et 0,3.

A partir de cette culture, deux aliquotes de 1 ml ont été prélevés, introduits dans deux erlenmeyers de 25 ml et dilués au 1/10 dans du milieu nutritif neuf, stérile.

a) Effet de la température

L'effet de la température sur l'accumulation de cadmium ^{109}Cd par *P. fluorescens* a été étudié en mesurant la radioactivité accumulée par les bactéries à 30°C et à 4°C. Les suspensions bactériennes ont été équilibrées dans un bain-marie thermostaté à 30°C ou dans un bain glacé avec agitation pendant 5 min avant l'addition de cadmium radioactif.

La solution de cadmium marqué a été préparée à partir d'une solution stock à $100 \mu\text{ci.ml}^{-1}$, obtenue en complétant à 5 ml avec de l'eau distillée du ^{109}Cd $500 \mu\text{ci}$, A.S. 5ci.g^{-1} , dans HCl 0,5 N, NEZ O58 fourni par NEN France, et diluée avec du cadmium froid de façon à obtenir dans l'erien une activité spécifique de 50 ci/mole et une concentration finale en cadmium de $8,9 \mu\text{M}$.

Des fractions de 0,5 ml ont été prélevées dans chacun des deux erlens portés à 4°C et à 30°C, 1, 4, 7, 10, 13, 16 et 19 min après l'addition de cadmium marqué. Ces prélèvements ont été filtrés sur filtres (Millipore HAWP, porosité $0,45 \mu\text{m}$), rincés par 10 ml d'une solution de cadmium froid ($8,9 \mu\text{M}$) et traités comme décrit précédemment (Chapitre 3.11.).

Les cinétiques de fixation obtenues à 4 et à 30°C (Figure 30) montrent que l'effet de la température est peu reproductible. Après avoir vérifié l'égalité

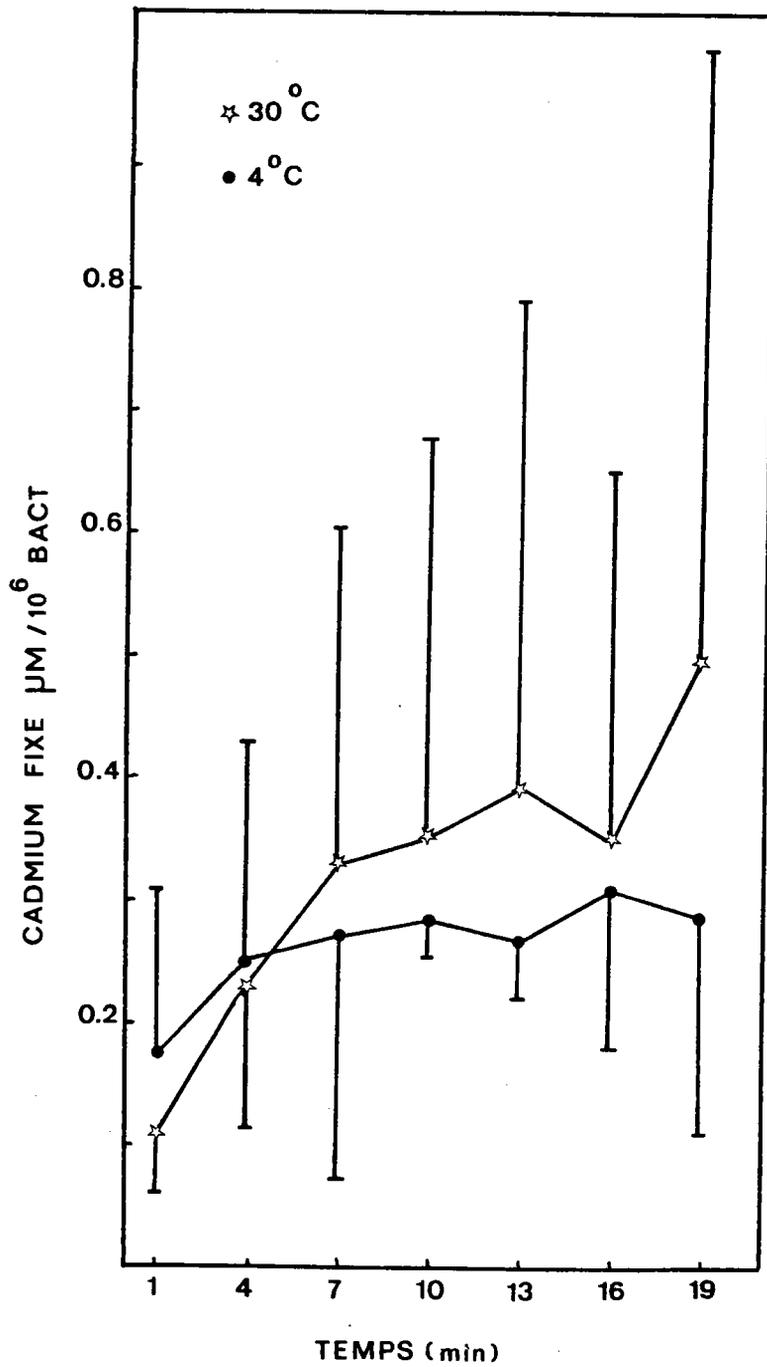


Figure 30 : Cinétiques d'accumulation de ^{109}Cd à 4°C et à 30°C par *P. fluorescens*. (Les moyennes de 3 expérimentations sont représentées, les demi écarts-types pour ces 3 expérimentations sont figurés).

des variances sur 3 expérimentations par le test de Hartley, une analyse de variance a été réalisée à partir des résultats bruts donnés en annexe 2.

Ce traitement statistique montre (Tableau 11) qu'il n'existe pas de différence significative d'accumulation du cadmium à 4°C ou à 30°C, ni d'ailleurs en fonction du temps sur une durée de 20 min.

Le manque de reproductibilité auquel nous sommes confrontés est certainement dû à l'impossibilité de produire des suspensions bactériennes parfaitement standardisées ainsi qu'aux effets multiples de la température. Il est en effet parfaitement démontré que la température influence non seulement l'activité métabolique et la composition chimique, mais aussi la fluidité membranaire. En outre, une préincubation de 10 min est peut-être insuffisante pour provoquer chez les bactéries des modifications nettes d'activité métabolique.

b) Influence des inhibiteurs métaboliques

Deux types d'inhibiteurs métaboliques ont été utilisés : le dinitrophénol (DNP) qui est un découplant de la phosphorylation oxydative, supprimant le gradient de protons transmembranaire, et le dicyclohexyl carbodiimide (DCCD) qui est un inhibiteur de l'activité ATPasique.

Deux erlens identiques contenant une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance dans du bouillon nutritif peptoné neuf ont été préparés comme cela a été décrit dans le paragraphe a) de ce chapitre concernant l'effet de la température. Dix minutes avant l'addition de cadmium marqué, 0,1 ml d'une solution de dinitrophénol (DNP) 100 mM dans l'éthanol ont été ajoutés dans l'un des erlens de façon à obtenir une concentration finale en DNP de 1 mM. Dans le second erlen un même volume d'éthanol a été ajouté.

Les deux erlens ont ensuite été agités dans un bain-marie thermostaté à 30°C pendant 10 min. Après cette incubation, du cadmium marqué était introduit dans chacun des deux erlens, de façon à obtenir 50 ci/mole et 8,9 μM en cadmium.

Des prélèvements de 0,5 ml ont été effectués dans chacun des erlens, avec ou sans inhibiteur 1, 4, 7, 10, 13, 16 et 19 min après l'addition du cadmium marqué. Ces prélèvements ont ensuite été filtrés sur membranes filtrantes d'une porosité de 0,45 μm , puis rincés avec 10 ml d'une solution de cadmium froid (8,9 μM). Les filtres ont ensuite été traités pour comptage de la radioactivité en scintillation liquide comme décrit précédemment dans le chapitre 3.11.

Tableau 11 : Résultats d'analyse de variance, réalisée à partir des valeurs obtenues pour l'accumulation du cadmium (μ moles/ 10^6 bactéries) par *P. fluorescens* à 30°C et à 4°C (valeurs portées en annexe 2).

Source de variance	Somme des carrés	degrés de liberté	- carré moyen	F calculé	P
Temps	0,246	6	0,041	0,634	> 0,5
Température	0,038	1	0,038	0,593	> 0,5
Temps-Température	0,071	6	0,012	0,182	> 0,975
Résiduelle	1,812	28	0,065		
Totale	2,168	41			

Deux erlens ont été préparés en parallèle contenant la suspension bactérienne dans du milieu nutritif en présence et en absence de DNP comme les erlens précédents. Mais du cadmium froid a été ajouté au lieu du cadmium marqué de façon à obtenir dans chacun des erlens une concentration en cadmium de 8,9 μM .

Sur le contenu de ces erlens des numérations bactériennes sur gélose (bio Mérieux 51381) ont été effectuées au début et à la fin de l'étude de fixation du métal par *P. fluorescens* avec et sans DNP.

Une deuxième série d'expérimentations a été réalisée avec du dicyclohexyl carbodiimide (DCCD), dissout dans du méthanol, employé comme inhibiteur métabolique à une concentration finale de 100 μM .

Les effets de l'éthanol et du méthanol sur la croissance bactérienne ont été étudiés séparément en mesurant l'évolution de la croissance par la densité optique à 620 nm après addition d'éthanol ou de méthanol (1 %) à des cultures de *P. fluorescens* en phase exponentielle. Ces essais n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les courbes de croissance obtenues avec et sans solvant, et mesurées pendant 90 min après l'addition du solvant.

Nos résultats montrent que l'accumulation de cadmium radioactif par les bactéries en présence de DNP (1 mM) et de DCCD (100 μM) ajouté dans le milieu nutritif est fortement réduite.

En effet, la radioactivité retenue sur les filtres, calculée par intégration des graphes, diminue de 50 à 80 % en présence de DNP (Figure 31) et la diminution est de 40 à 70 % lorsque du DCCD est ajouté à la suspension bactérienne (Figure 32).

Les résultats bruts correspondant à 3 expérimentations conduites avec le DNP et le DCCD sont reportés en annexes 3 et 4. Une analyse de variance effectuée sur ces résultats, montre que la diminution de l'accumulation du cadmium observée en présence d'inhibiteurs métaboliques est significative (Tableaux 12 et 13). Par contre, l'évolution de l'accumulation en fonction du temps n'est pas significative. L'égalité des variances a été vérifiée au préalable par le test de Hartley.

Avant de conclure à un transport actif du cadmium chez *P. fluorescens*, nous avons voulu vérifier si la présence de DNP ou de DCCD diminuait par comple-

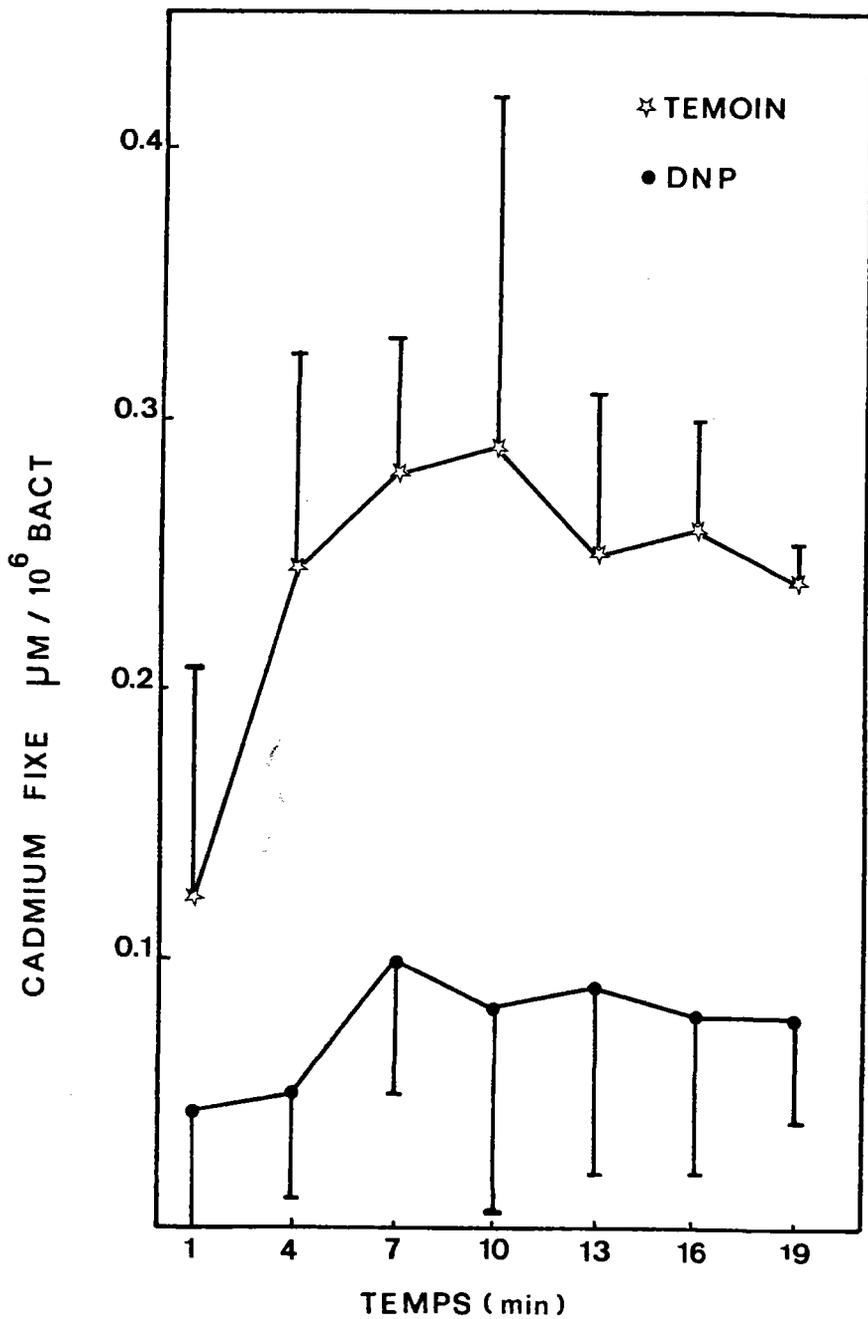


Figure 31 : Cinétiques d'accumulation du ¹⁰⁹cadmium par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de DNP (1 mM). (La moyenne de 3 expérimentations est représentée, les demi écarts-types correspondants ont été figurés).

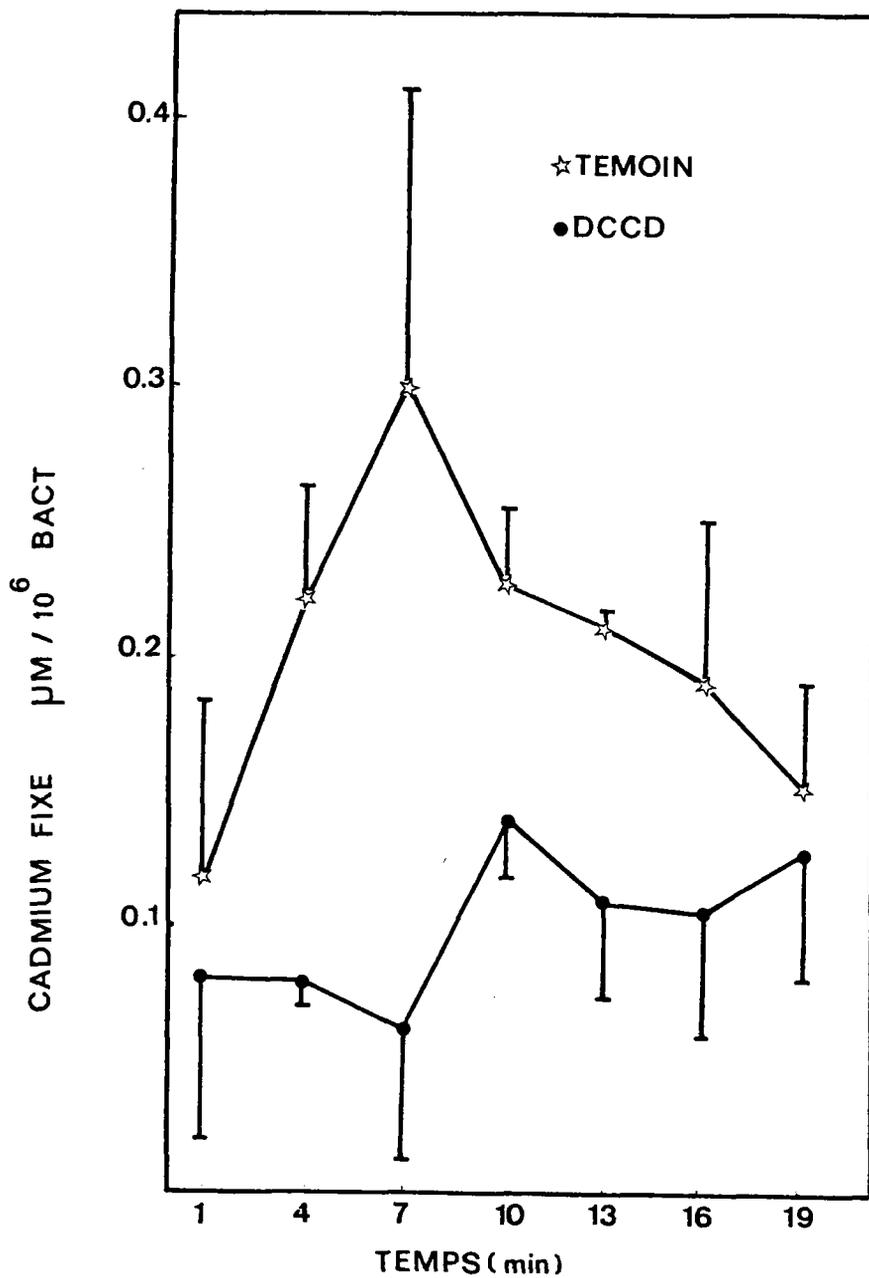


Figure 32 : Cinétiques d'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de DCCD (100 μM). (La moyenne de 3 expérimentations et les demi écarts-types correspondants ont été représentés).

Tableau 12 : Résultats d'analyse de variance, réalisée à partir des valeurs obtenues pour l'accumulation de cadmium ($\mu\text{moles}/10^6$ bactéries) par *P. fluorescens* en présence et en absence de DNP 1 mM (valeurs portées en annexe 3).

Source de variance	Somme des carrés	degrés de liberté	carré moyen	F calculé	P
Temps	0,047	6	0,008	1,700	0,157
DNP	0,290	1	0,290	62,987	< 0,001
Temps - DNP	0,016	6	0,003	0,590	> 0,5
Résiduelle	0,129	28	0,005		
Totale	0,482	41			

Tableau 13 : Résultats d'analyse de variance, réalisée à partir des valeurs obtenues pour l'accumulation du cadmium ($\mu\text{moles}/10^6$ bactéries) par *P. fluorescens* en présence et en absence de DCCD 100 μM (valeurs portées en annexe 4).

Source de variance	Somme des carrés	degrés de liberté	carré moyen	F calculé	P
Temps	0,036	6	0,006	2,224	0,070
DCCD	0,095	1	0,095	34,798	< 0,001
Temps - DCCD	0,048	6	0,008	2,962	0,022
Résiduelle	0,076	28	0,003		
Totale	0,256	41			

xation la quantité de cadmium en solution disponible pour les bactéries. En effet, comme le suggère l'isotherme de Freundlich, précédemment tracé, pour l'accumulation du cadmium par *P. fluorescens*, une étroite dépendance existe entre le cadmium accumulé par les bactéries et le métal restant en solution.

c) Complexation du cadmium par les inhibiteurs métaboliques

La capacité du DNP et du DCCD à complexer les ions Cd^{2+} a été estimée par comparaison des concentrations en Cd^{2+} libres mesurées par un analyseur équipé avec une électrode spécifique des ions cadmium, en présence et en absence d'inhibiteurs.

Ainsi, plusieurs solutions de cadmium (8,9 μM ; 89 μM ; 0,89 mM ; 8,9 mM) préparées dans du bouillon nutritif peptoné, en présence ou en absence de DNP ou DCCD, ont été analysées pour leur contenu en ions Cd^{2+} libres. Les concentrations en DNP et DCCD ajoutées étaient respectivement 1 mM et 100 μM . Les solutions à doser ont été préparées en triplicat. La méthode et le matériel utilisés ont été décrits dans le chapitre 3.9.

Trois expérimentations ont été menées avec chacun des inhibiteurs (Figure 33). La comparaison des gammes de concentration en cadmium mesurées en absence ou en présence d'inhibiteurs montre une diminution du signal enregistré par le ionomètre lorsque le DNP et le DCCD sont ajoutés dans le milieu.

Le traitement statistique des résultats bruts donnés en annexe 5 montre qu'il existe une différence significative entre les concentrations en Cd^{2+} libres mesurées en présence et en absence d'inhibiteurs métaboliques.

A titre d'exemple, les résultats d'analyse de variance comparant la complexation du cadmium avec ou sans DCCD sont figurés dans le tableau 14. L'égalité des variances a été vérifiée au préalable par le test de Hartley.

Ainsi, nos résultats permettent d'estimer qu'approximativement 60 % du métal d'une solution 8,9 μM en cadmium sont complexés par du DNP (1 mM) ou du DCCD (100 μM). Ce pourcentage a été déterminé par extrapolation de la concentration en cadmium en présence d'inhibiteur à 180 mV, valeur correspondant à 8,9 μM en cadmium pour le témoin.

Par conséquent, cette observation interdit de conclure à l'existence d'un transport actif pour le cadmium à la seule vue des résultats obtenus en présence

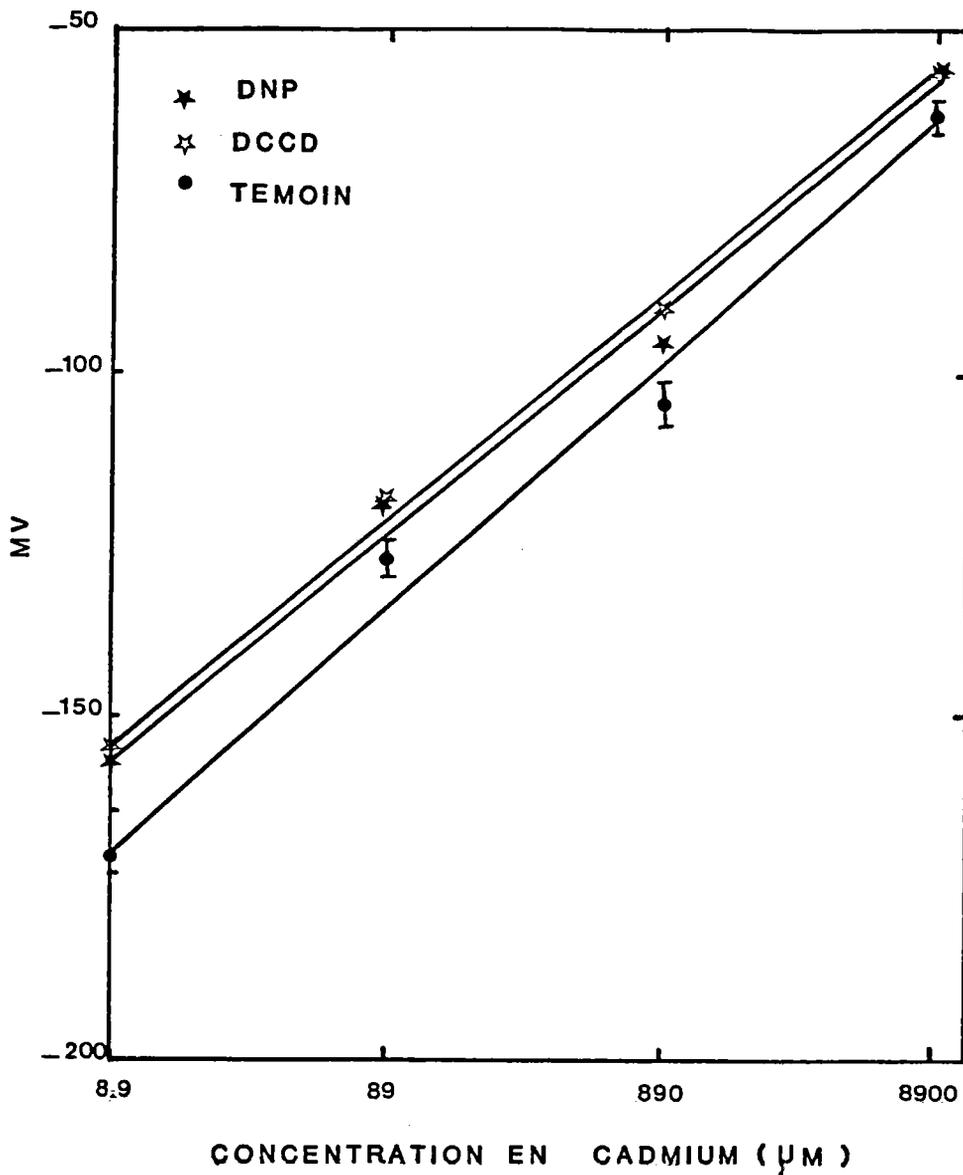


Figure 33 : Dosage des ions Cd^{2+} dans du milieu peptoné en absence (témoin) et en présence de DNP (1 mM) ou de DCCD (100 µM) à l'aide d'un ionomètre équipé d'une électrode spécifique.

Tableau 14 : Résultats d'analyse de variance, réalisée à partir des valeurs obtenues pour la complexation du cadmium par le DCCD (valeurs portées en annexe 5).

Source de variance	Somme des carrés	degrés de liberté	carré moyen	F calculé	P
Concentration	33 651	3	11 217	1 409	< 0,001
DCCD	436	1	436	54	< 0,001
Concentration-DCCD	26,31	3	8,77	1,102	0,378
Résiduelle	127	16	7,9		
Totale	34 242	23			

d'inhibiteurs métaboliques. En effet, l'inhibition de l'accumulation du cadmium par les bactéries en présence de DNP ou de DCCD est du même ordre de grandeur que la complexation du métal par ces deux inhibiteurs.

d) Détermination de l'influence des éléments nutritifs sur l'accumulation du cadmium par les bactéries

Afin d'éliminer le biais lié à l'emploi d'inhibiteurs métaboliques complexant le métal, des cinétiques d'accumulation du cadmium marqué ont été mesurées comparativement dans du milieu nutritif et dans une solution saline (Na Cl 0,85%).

Une culture bactérienne en phase exponentielle était centrifugée à 2500 g pendant 15 min à température ambiante. La moitié des bactéries a été resuspendue dans du bouillon nutritif peptoné stérile, et l'autre moitié dans une solution saline stérile (Na Cl 0,85 %).

A partir d'une solution mixte ^{112}Cd - ^{109}Cd , du cadmium froid a été ajouté aux 2 suspensions de manière à obtenir dans chacune d'elles une concentration de $8,9 \mu\text{M}$ en ions Cd^{2+} libres. Des aliquotes de 0,5 ml ont ensuite été prélevés à intervalles réguliers et traités comme mentionné précédemment. Les résultats obtenus, présentés sur la figure 34, montrent une évolution parallèle des deux types d'essais.

De plus, du fait des incertitudes liées aux mesures (23 %) et au recouvrement des courbes, les cinétiques d'accumulation obtenues en présence ou en absence d'éléments nutritifs peuvent être considérées comme identiques.

Au terme de ces trois types d'essais (effet de la température, des inhibiteurs métaboliques, et des éléments nutritifs), il ne nous est pas possible de mettre en évidence un mécanisme de transport actif du cadmium chez *P. fluorescens*. Par contre, l'adsorption non spécifique du cadmium à la périphérie cellulaire semble être l'une des composantes importantes de l'accumulation du métal.

Les structures bactériennes périphériques sont susceptibles d'intervenir dans la fixation du cadmium en tant que structures accumulatrices de métal, mais elles sont aussi peut-être susceptibles de protéger la cellule bactérienne vis à vis de la toxicité des métaux.

Pour cette raison, nous avons étudié le double rôle (accumulation et protection) des "enveloppes" bactériennes successivement pour les exopolysaccharides, la membrane externe et le peptidoglycane.

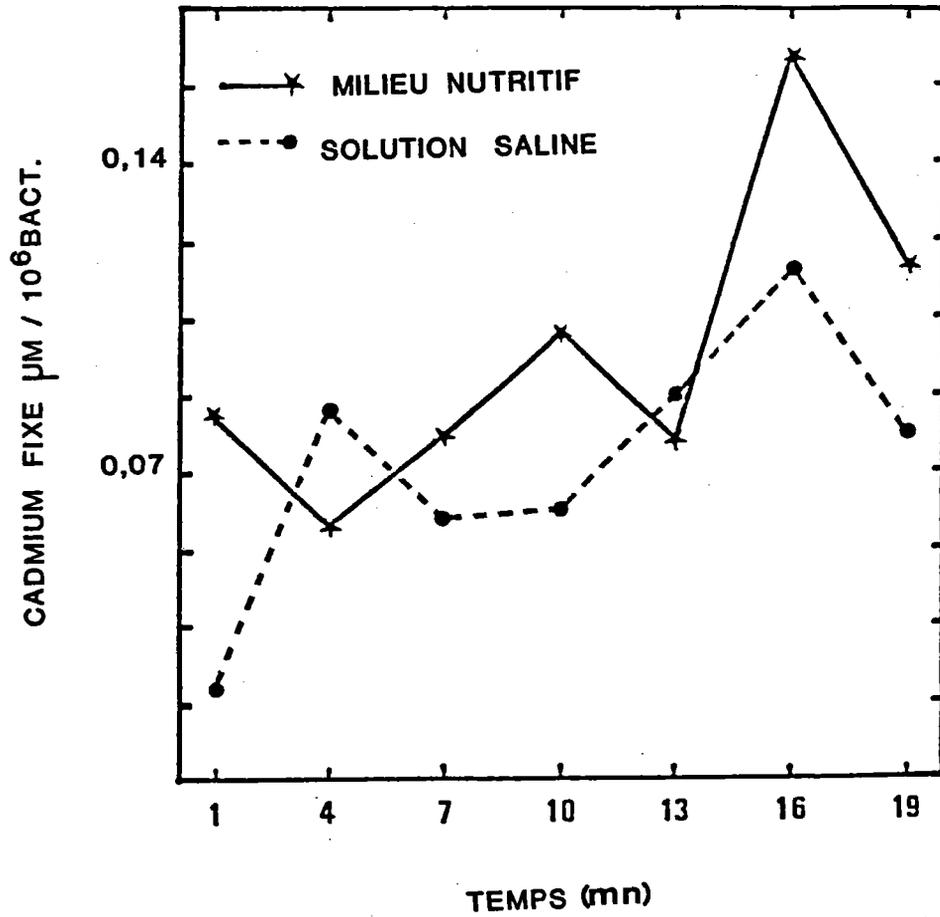


Figure 34 : Influence des éléments nutritifs sur l'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens*.

Un seul essai a été réalisé.

Les mesures ont été répétées trois fois.

4.5. ROLE DES EXOPOLYSACCHARIDES DANS L'ACCUMULATION ET LA TOXICITE DU CADMIUM CHEZ *K. AEROGENES* K54 A3 ET K54 A3 (0)

La fixation du cadmium au niveau des exopolysaccharides a été estimée par comparaison de l'accumulation du métal chez *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0), respectivement fort et faible producteur d'exopolysaccharides.

L'accumulation a été déterminée sur des suspensions d'une même quantité de cellules de ces deux souches dans du tampon phosphate stérile pH 7 et mis en contact avec des solutions de chlorure de cadmium préparées dans de l'eau distillée de manière à obtenir des concentrations finales en cadmium 0,1 ; 1 et 10 mg/l (respectivement 0,89, 8,9 et 89 μM).

Les erlens renfermant les bactéries et le métal ont été placés sur un agitateur rotatif réglé sur 100 rpm pendant 1 heure à 4°C. Trois aliquotes de 3 ml pour chaque concentration en métal ont ensuite été prélevés et centrifugés à 2500 g pendant 10 min pour éliminer les bactéries.

La concentration en cadmium dans les surnageants a été déterminée deux fois par spectrophotométrie d'absorption atomique. Les résultats de deux expérimentations sont présentés dans le tableau 15. Pour de faibles concentrations en cadmium : 0,1 et 1 mg/l, la souche sauvage K54 A3, productrice d'une capsule, accumule 2 à 8 fois plus de métal que la souche mutante K54 A3 (0). Par contre, pour une concentration en cadmium ajouté de 10 mg/l la tendance semble inversée, puisque la souche mutante faible productrice d'exopolysaccharides fixe 2 à 3 fois plus de métal que la souche sauvage.

Ces résultats ont été exprimés sous forme d'isothermes de Freundlich (Figure 35). Les graphes obtenus montrent que la fixation du cadmium par *K. aerogenes* K54 A3 peut être décrite par un processus d'adsorption. La saturation des sites d'adsorption du cadmium n'est pas observée pour des concentrations en cadmium ajouté allant jusque 10 mg/l (89 μM).

Au contraire, les résultats obtenus avec la souche mutante K54 A3 (0) n'ont pas permis d'obtenir une relation linéaire entre le cadmium fixé par les bactéries et le métal restant en solution. En d'autres termes, l'adsorption du cadmium par la souche mutante n'a pu être observée dans le domaine de concentration étudié.

L'influence des exopolysaccharides sur la sensibilité de la croissance bactérienne au cadmium a été estimée à partir des deux souches K54 A3 et K54 A3 (0). Deux séries d'expérimentations ont été réalisées selon que les bactéries

Tableau 15 : Fixation du cadmium par *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0). (Les valeurs sont exprimées en $\mu\text{g} \cdot 10^{-6}$ bactéries). Les écarts-types sur 3 déterminations sont donnés entre parenthèses.

Expérience n°	Souche bactérienne	Eq. glucose $\mu\text{g}/10^7$ bact	Concentration en cadmium ajouté (mg/l)		
			0,10	1,0	10
1	K54 A3 (0)	11,5	8,8 (0,9)	25,8 (0,1)	837,6 (90,2)
	K54 A3	100,7	24,9 (0,1)	39,4 (0,3)	446,2 (18,6)
2	K54 A3 (0)	14,3	11,2 (0,01)	11,8 (0,3)	1035,5 (29,6)
	K54 A3	91,0	19,9 (0,2)	85,8 (0,2)	276,1 (42,9)

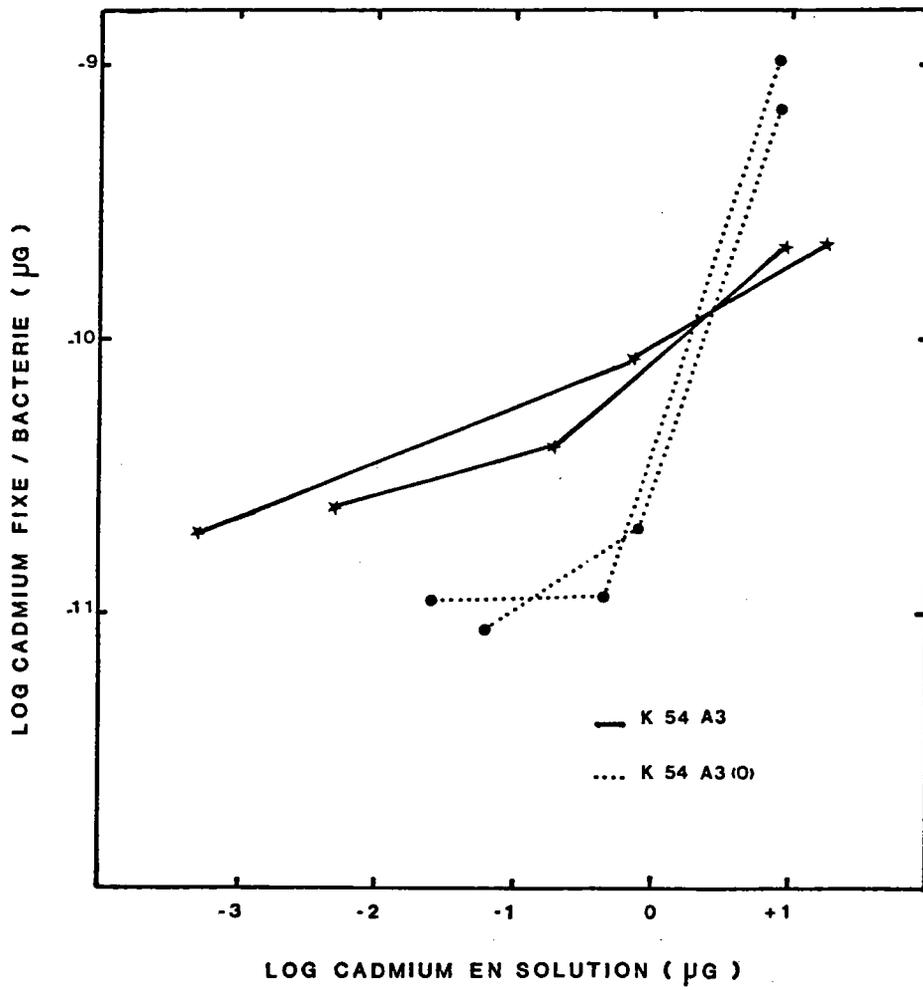


Figure 35 : Isothermes d'adsorption du cadmium par *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0).

étaient cultivées dans du bouillon nutritif peptoné dilué ou dans le surnageant du milieu saccharose - Ca CO_3 décrit par BITTON et al. (1976).

Les productions d'exopolysaccharides dans les deux types de milieu nutritif sont reportées pour les deux souches dans le tableau 16.

La croissance des deux souches en présence de cadmium a été mesurée pendant 48 heures. Trois concentrations en cadmium comprises entre 0 et $44,5 \mu\text{M}$ ont été choisies pour étudier simultanément l'inhibition de la croissance chez *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0) à 37°C .

Pour permettre l'enregistrement complet des courbes de croissance, la croissance des deux souches de *K. aerogenes* a été mesurée dans du bouillon nutritif peptoné dilué au 1/2 et dans le surnageant du milieu liquide, décrit par BITTON et al. (1976) ; ce milieu formant un précipité de carbonate de calcium.

Dans nos conditions expérimentales, la souche sauvage K54 A3 produit 1,4 à 1,8 fois plus d'exopolysaccharides que la souche mutante. La différence apparente de production d'exopolysaccharides entre les deux types de milieu nutritif utilisés provient du fait que la culture, dans le cas du milieu CaCO_3 - saccharose, est réalisée uniquement sur le surnageant du milieu pour ne pas être gênée par les précipités de CaCO_3 .

Les mesures réalisées (Tableau 17) révèlent que la sensibilité au cadmium des deux souches est plus faible dans le bouillon nutritif peptoné que dans le surnageant du milieu saccharose - CaCO_3 , ce qui pourrait s'expliquer par la plus forte production de sucres dans le milieu peptoné observée au tableau 13.

En effet, la croissance de la souche sauvage n'est pas modifiée en présence de cadmium ajouté à la concentration de $17,8 \mu\text{M}$ dans le milieu peptoné alors qu'elle l'est en milieu saccharose CaCO_3 .

Cependant, quel que soit le milieu nutritif utilisé, les trois paramètres habituellement mesurés (retard de la phase exponentielle, diminution du taux de croissance, diminution de la biomasse produite en 48 h) sont affectés d'une manière plus importante pour la souche mutante faible productrice d'exopolysaccharides que pour la souche sauvage.

Par exemple, en présence de cadmium $17,8 \mu\text{M}$ ajouté dans le milieu saccharose - CaCO_3 , le taux de croissance de la souche sauvage (initialement de $0,75 \text{ h}^{-1}$) est diminué de 31,1 % alors que celui de la souche mutante (initialement de $0,79 \text{ h}^{-1}$) est diminué de 47,4 %. De la même manière, la phase de latence initialement de 1,5 h chez les deux souches est allongée de 8,5 h chez le mutant contre 4,5 h chez le sauvage en présence de $17,8 \mu\text{M}$ de cadmium.

Tableau 16 : Production d'exopolysaccharides en milieu liquide chez *K. aerogenes*
K54 A3 et K54 A3 (0).

Souches bactériennes	Milieu nutritif	Exopolysaccharides $\mu\text{g eq.glucose.}10^{-7}$ bact.
K54 A3	bouillon nutritif peptoné	5,23
	milieu saccharose Ca CO ₃	1,00
K54 A3 (0)	bouillon nutritif peptoné	2,84
	milieu saccharose Ca CO ₃	0,73

Tableau 17 : Effets du cadmium sur la phase de latence, le taux de croissance, et la production de biomasse de *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0) en milieu peptoné et en milieu Saccharose-Ca CO₃.

		SOUCHE K54 A3		SOUCHE K54 A3 (0)	
Cadmium ajouté (μM)		17,8	44,5	17,8	44,5
Milieu peptoné	Retard de phase exponentielle (h)	0	0	1	1,5
	* Diminution du taux de croissance (%)	0	1,4	60,5	65,4
Milieu Saccharose-Ca CO ₃	Retard de phase exponentielle (h)	4,5	33,5	8,5	35,5
	** Diminution du taux de croissance (%)	31,1	62,2	47,4	66,7
Milieu Saccharose-Ca CO ₃	Diminution de la biomasse (%) produite en 48 h	14,3	31,4	30	62,9

* Les taux de croissance des témoins sans cadmium étaient de 1,45 et 1,62 h⁻¹ respectivement pour les souches K54 A3 et K54 A3 (0).

**Les taux de croissance des témoins sans cadmium étaient de 0,75 h⁻¹ et 0,79 h⁻¹ respectivement pour les souches K54 A3 et K54 A3 (0).

Lorsque la concentration en cadmium ajouté est de 44,5 M, la différence de sensibilité entre les deux souches s'estompe comme si le filtre formé par les polysaccharides était saturé ; ce qui, par ailleurs, s'accorderait bien avec les résultats obtenus sur la figure 35 où les isothermes d'adsorption se croisent pour les fortes concentrations en cadmium.

Les exopolysaccharides constituent un exemple d'accumulation non toxique du cadmium ; en est-il de même pour les structures pariétales : membrane externe et peptidoglycane ?

4.6. ROLE DES ENVELOPPES BACTERIENNES DANS L'ACCUMULATION ET LA TOXICITE DU CADMIUM CHEZ *P. FLUORESCENS* ET *A. HALOPLANKTIS*

Des cellules entières, des muréinoplastes et des protoplastes de *P. fluorescens* et *A. haloplanktis* ont été utilisés dans un test d'accumulation du cadmium afin de comparer leur capacité à accumuler le métal.

L'expérimentation a été répétée 3 fois avec *P. fluorescens* et une fois avec *A. haloplanktis*.

Des électronographies des bactéries entières, de muréinoplastes en formation et de protoplastes, ont été reportées sur les figures 36, 37, 38 et 39 pour *P. fluorescens*.

Les résultats pour l'accumulation du cadmium (concentrations ajoutées de 0,1 à 10 mg.l⁻¹) par ces trois types de cellules au cours de trois expérimentations (2 avec *P. fluorescens* et 1 avec *A. haloplanktis*), ont été portés dans le tableau 18. Dans le tableau 19 sont donnés les résultats d'une expérimentation conduite chez *P. fluorescens* en présence de 0,005 à 5 mg/l en cadmium. Les deux essais rapportés dans le tableau 19 avec *P. fluorescens* illustrent la difficulté de reproduire de manière identique plusieurs essais. Toutefois, des tendances sont tout de même observables.

Ainsi, les chiffres des tableaux 18 et 19 montrent l'augmentation de l'accumulation du métal en fonction de la concentration ajoutée ; cependant, le facteur de bioconcentration $\frac{\text{cadmium fixé par bactérie en } \mu\text{g}}{\text{cadmium ajouté en solution en mg/l}}$ demeure du même ordre de grandeur, en moyenne : 1,8 avec un écart-type de 2,6.

Les résultats de 3 expérimentations ont été représentés sous forme d'isothermes de Freundlich (Figure 40).



Figure 36 : Electronographie de *Pseudomonas fluorescens* ; G x 20 000.



Figure 37 : Electronographie de muréinoplaste en formation montrant le décollement de la membrane externe de *P. fluorescens* ; G x 150 000.



Figure 38 : Electronographie de muréinoplaste montrant l'arrachage de la membrane externe de *P. fluorescens* ; G x 150 000.



Figure 39 : Electronographie de protoplaste de *P. fluorescens* (quelques fragments de membrane externe subsistent) ; G x 150 000.

Tableau 18 : Cadmium accumulé en $\mu\text{g} \cdot 10^{-8}$ bactéries (les écarts-types sur 3 déterminations sont donnés entre parenthèses ; ND : valeur non déterminée ; NR : essai non représenté dans la figure 40).

Type bactérien	Souche bactérienne	Essai	Concentrations en cadmium ajouté (mg/l)		
			0,1	1	10
Bactéries entières	<i>A. haloplanktis</i>	C3	0,04 ($2,8 \cdot 10^{-4}$)	0,30 ($2,4 \cdot 10^{-4}$)	2,22 (1,29)
	<i>P. fluorescens</i>	C2	0,11 ($3,9 \cdot 10^{-3}$)	0,77 (10^{-2})	11,10 (0,78)
	<i>P. fluorescens</i>	NR	0,02 ($2,2 \cdot 10^{-3}$)	0,67 ($1,8 \cdot 10^{-2}$)	1,33 (0,13)
Muréinoplastes	<i>A. haloplanktis</i>	M3	0,03 ($4,6 \cdot 10^{-6}$)	0,41 ($2 \cdot 10^{-4}$)	2,00 (0,047)
	<i>P. fluorescens</i>	M2	0,52 ($1,7 \cdot 10^{-3}$)	7,48 (0,43)	45,42 (4,70)
	<i>P. fluorescens</i>	NR	0,09 ($1,5 \cdot 10^{-3}$)	0,71 ($1,5 \cdot 10^{-2}$)	ND
Protoplastes	<i>A. haloplanktis</i>	P3	0,05 ($3,9 \cdot 10^{-6}$)	0,54 ($2 \cdot 10^{-4}$)	1,98 (0,045)
	<i>P. fluorescens</i>	P2	0,80 ($8,7 \cdot 10^{-3}$)	8,25 ($8,2 \cdot 10^{-2}$)	37,43 (1,31)
	<i>P. fluorescens</i>	NR	0,07 ($2,1 \cdot 10^{-3}$)	0,45 ($4,2 \cdot 10^{-3}$)	1,60 ($1,7 \cdot 10^{-2}$)

Tableau 19 : Cadmium accumulé par *P. fluorescens* ($\mu\text{g}/10^8$ bact.) (Les écarts-types sur 3 déterminations sont donnés entre parenthèses ; les valeurs correspondent à l'essai C2, M2, P2 sur la figure 40).

Type bactérien	Concentrations en cadmium ajouté (mg/l)			
	0,005	0,05	0,5	5
Bactéries entières	0,0006 ($4 \cdot 10^{-5}$)	0,0037 ($3 \cdot 10^{-5}$)	0,0088 (0)	0,10 (0,01)
Muréinoplastes	0,0002 ($9 \cdot 10^{-5}$)	0,0019 ($2 \cdot 10^{-4}$)	0,014 ($7 \cdot 10^{-4}$)	0,26 ($7 \cdot 10^{-3}$)
Protoplastes	0,0005 ($3 \cdot 10^{-5}$)	0,0027 ($5 \cdot 10^{-5}$)	0,019 (10^{-5})	0,21 (0,009)

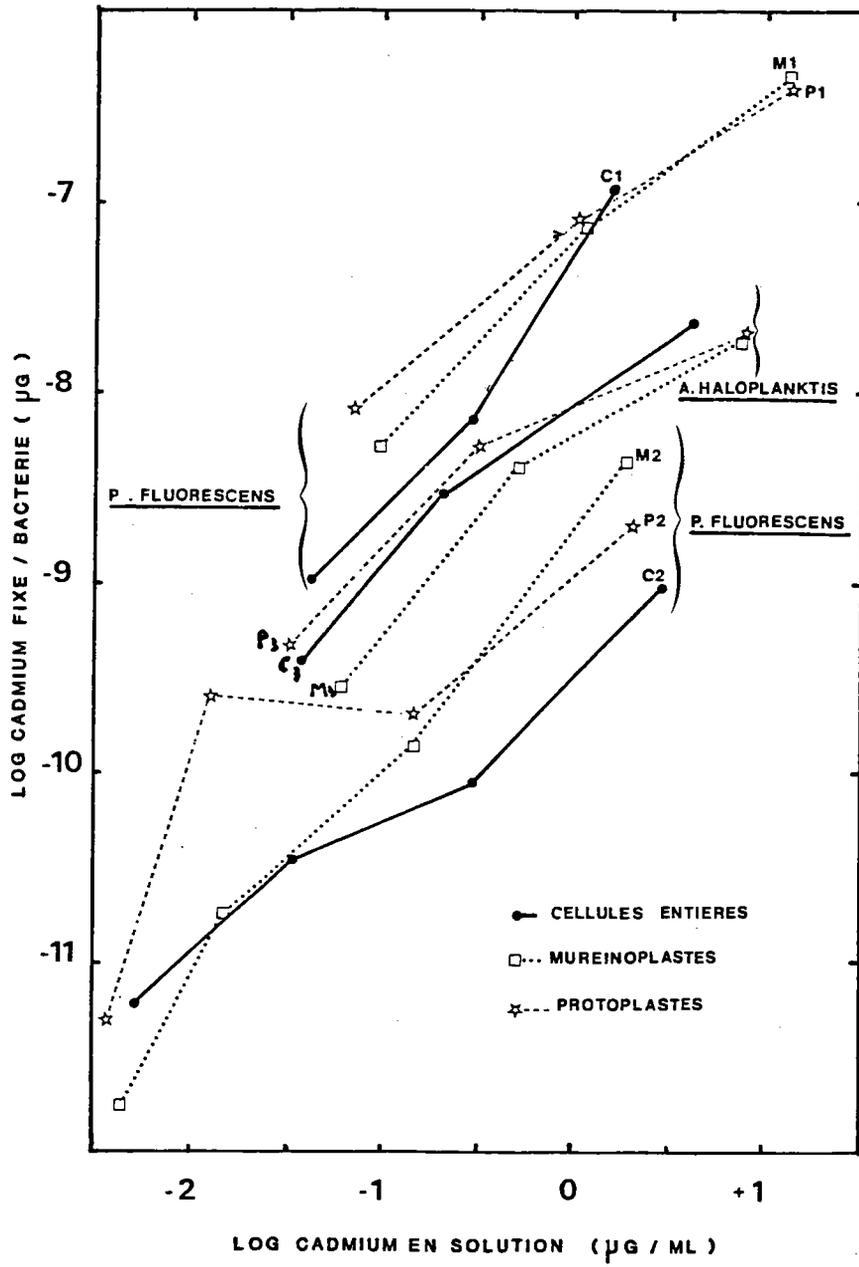


Figure 40 : Isothermes d'adsorption du cadmium par des bactéries entières, muréinoplastes et protoplastes préparés à partir de *P. fluorescens* et *A. haloplanktis*.

Tous les graphes rapportés dans la figure 40 peuvent être considérés comme des droites significatives à 99 % excepté celui obtenu pour l'accumulation de cadmium par des protoplastes de *P. fluorescens* et désigné par P2 dans la figure.

Ces résultats suggèrent que les 3 types de cellules testés sont capables d'adsorber les ions cadmium à leur périphérie.

Dans aucun des cas, une zone de saturation des sites d'adsorption du métal n'est observée pour des concentrations en cadmium ajouté allant jusqu'à 10 mg/l (89 μ M).

Malheureusement, la comparaison des résultats de deux expérimentations similaires conduites avec *P. fluorescens* (Tableau 18) ne nous permet pas de classer les enveloppes bactériennes selon leur capacité à accumuler le cadmium, puisque une différence significative dans l'accumulation du métal par les 3 types cellulaires testés ne peut être montrée.

Au cours des mêmes essais, la sensibilité au métal des trois types cellulaires a été déterminée par comparaison des activités respiratoires spécifiques mesurées par respirométrie en absence et en présence de 1 mg/l en cadmium ajouté (8,9 μ M). Le cadmium a été ajouté 10 min avant la mesure elle-même, pendant la saturation en oxygène des suspensions thermostatées à 25°C. La consommation d'oxygène en mg O₂/l/mn/Torr a été calculée et ramenée au nombre de cellules, déterminé par comptage microscopique avec un hémocytomètre, formulant ainsi une activité respiratoire spécifique. La comparaison des activités respiratoires spécifiques obtenues en présence et en absence de cadmium ont permis d'établir pour chaque forme bactérienne un pourcentage d'inhibition de la respiration. Chaque mesure a été effectuée sur 3 aliquotes de suspension bactérienne.

Les activités respiratoires spécifiques ont été exprimées en mg d'O₂. min⁻¹.10⁻¹¹ bactéries et sont rapportées dans les tableaux 20 et 21 respectivement pour *P. fluorescens* et *A. haloplanktis*.

Pour ces 2 souches la comparaison des résultats obtenus avec les cellules entières, les muréinoplastes et les protoplastes, en absence de cadmium ajouté, révèle une diminution importante de l'activité respiratoire spécifique au fur et à mesure que les enveloppes sont éliminées. En particulier, l'activité respiratoire spécifique des protoplastes correspond respectivement à 19,4 et 19,6 % de l'activité des

Tableau 20 : Activité respiratoire des muréinoplastes et protoplastes de *P. fluorescens* en présence de cadmium (* mg O₂/l/min x 10⁻⁴, les écarts-types sur 3 déterminations sont donnés entre parenthèses ; ** mg O₂/min/10¹¹ bact.).

CELLULES	Cd ajouté (mg/l)	Consommation d'oxygène *	Activité respiratoire spécifique ** (A.R.S.)	% de diminution de A.R.S.
Témoins (cellules entières)	0	6,37 (0,19)	2,42	19,5
	1	5,13 (0,11)	1,95	
Muréinoplastes	0	3,91 (0,09)	1,47	43,5
	1	2,21 (0,035)	0,83	
Protoplastes	0	1,37 (0,19)	0,47	44,6
	1	0,75 (0,21)	0,26	

Tableau 21 : Activité respiratoire des muréinoplastes et protoplastes de *A. haloplanktis* en présence de cadmium (* mg O₂/l/min x 10⁻⁴, les écarts-types sur 3 déterminations sont donnés entre parenthèses ; ** mg O₂/min/10¹¹ bact.).

CELLULES	Cd ajouté (mg/l)	Consommation d'oxygène *	Activité respiratoire spécifique ** (A.R.S.)	% de diminution de A.R.S.
Témoins (cellules entières)	0	16,4 (1,3)	6,1	4,9
	1	15,7 (1,2)	5,8	
Muréinoplastes	0	10,1 (0,6)	2,6	42,3
	1	5,8 (0,3)	1,5	
Protoplastes	0	4,0 (0,24)	1,2	57,5
	1	1,7 (0,17)	0,51	

cellules entières de *P. fluorescens* et *A. haloplanktis*. Cette diminution de l'activité respiratoire indique probablement un "stress" des cellules au cours de la préparation des protoplastes et la perte de matériel périplasmique.

L'ajout de 1 mg.l^{-1} de cadmium ($8,9 \text{ } \mu\text{M}$) entraîne une diminution de l'activité spécifique respiratoire de 19,5 % pour les cellules entières de *P. fluorescens* alors que la respiration des muréinoplastes correspondants est inhibée de 43,5 %.

Les résultats obtenus avec *A. haloplanktis* permettent de calculer une inhibition de 4,9 % et de 42,3 % pour les cellules entières et les muréinoplastes respectivement.

Les protoplastes de *P. fluorescens* ont une sensibilité au cadmium qui ne diffère pratiquement pas de celle observée pour les muréinoplastes puisque leur activité respiratoire spécifique est inhibée de 44,6 %.

Toutefois, parmi les formes bactériennes testées, les protoplastes demeurent tout de même la forme la plus sensible au métal, en particulier chez *A. haloplanktis* la respiration des protoplastes est diminuée de 57,5 % contre 42,3 % pour les muréinoplastes.

Nous avons montré que les structures membranaires et le peptidoglycane des bactéries gram négatives sont des structures capables d'accumuler le cadmium au niveau de sites privilégiés. Ces sites peuvent être principalement les groupements phosphates, présents au niveau des deux membranes, et les groupements carboxyles, présents au niveau du peptidoglycane et des protéines membranaires. Aussi, nous avons décidé d'étudier l'influence de ces derniers sur l'accumulation et la toxicité du cadmium chez *P. fluorescens* puisque nous disposons d'une méthode simple de blocage chimique de ces groupements décrite par DOYLE et al. (1980) pour des parois bactériennes extraites et purifiées.

4.7. ROLE DES GROUPEMENTS CARBOXYLES DANS L'ACCUMULATION ET LA TOXICITE DU CADMIUM CHEZ *P. FLUORESCENS*

Afin d'estimer l'importance des groupements carboxyles dans le processus d'accumulation du cadmium marqué, des essais ont été réalisés d'une part sur des bactéries intactes et d'autre part sur des bactéries chimiquement modifiées au niveau des carboxyles.

La réaction de blocage des carboxyles est une réaction qui nécessite à la fois un pH acide et la présence de deux réactifs : un carbodiimide et de l'éthanolamine à des concentrations de 0,2 et 0,5 M respectivement. Ces deux paramètres pH et réactifs sont susceptibles d'entraîner des modifications au niveau de la bactérie modifiée concernant la charge électrique, la composition chimique et la physiologie. Ces modifications pouvant interférer avec l'accumulation et la toxicité du cadmium, nous avons réalisé trois types d'essais.

Essais de type 1 - La cinétique d'accumulation du métal par des bactéries modifiées a été comparée à celle de témoins non soumis à l'effet des réactifs de blocage (éthanolamine et carbodiimide). Trois essais ont été réalisés notés 1-1, 1-2 et 1-3.

Essais de type 2 - La cinétique d'accumulation du métal par des bactéries modifiées a été comparée à celle de témoins soumis aux réactifs de blocage à pH neutre. Trois essais ont été réalisés notés 2-1, 2-2 et 2-3.

Essais de type 3 - Des bactéries mortes, modifiées ou non, ont été comparées pour l'accumulation de ^{109}Cd après 1 heure de contact avec le métal. Les témoins ont été soumis aux réactifs de blocage à pH neutre. Trois essais ont été réalisés notés 3-1, 3-2 et 3-3.

Le protocole utilisé pour mesurer l'accumulation du cadmium par des bactéries vivantes dont les groupements carboxyles ont été bloqués ou non est décrit brièvement ci-après.

Les bactéries modifiées ou non en suspension dans NaCl 0,85 % ont été ajustées à une même densité (DO à 620 nm).

Elles ont ensuite été diluées dans du milieu nutritif stérile de façon à obtenir 10^6 et 10^7 U.F.C..ml⁻¹ puis thermostatées à 30°C et agitées. Avant l'addition de la radioactivité, 0,5 ml ont été prélevés et filtrés pour la mesure du bruit de fond. Puis, 1 ml d'une solution mixte ^{109}Cd - ^{112}Cd a été ajouté de façon à obtenir dans les suspensions bactériennes une concentration finale en cadmium 8,9 µM avec une activité spécifique de 500 ci/mole.

Des aliquotes de 0,5 ml ont été prélevés et filtrés, 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 30, 45 et 60 min après l'addition du cadmium et la radioactivité retenue sur les filtres a été déterminée.

L'expérimentation a été répétée 3 fois pour les essais de types 1 et 2.

Le protocole de blocage des groupements carboxyles sur des bactéries mortes est décrit ci-après.

Les bactéries ont été tuées par addition de cyanure de potassium 25 mM en concentration finale, à une suspension bactérienne en phase stationnaire préalablement lavée deux fois dans de l'eau distillée stérile. La suspension dans le cyanure a été agitée pendant 3 heures à 30°C. A la fin de cette période d'incubation une numération des bactéries sur gélose a été effectuée afin de vérifier l'effet létal du cyanure. Les bactéries ont ensuite été lavées deux fois par centrifugation à 2500 g pendant 10 min et remises en suspension dans de l'eau distillée stérile. Après la dernière centrifugation, les bactéries ont été suspendues dans un volume de 10 ml d'eau distillée stérile et dialysées pendant 12 h à 4°C contre 2 l d'eau distillée stérile. La moitié de cette population bactérienne a subi la réaction de blocage des groupements carboxyles alors que l'autre moitié a été mise en contact pendant une durée similaire avec les réactifs de blocage, mais à un pH de 7 défavorisant la réaction de blocage. La réaction et les témoins ont été réalisés en triplicats. Sur chacune de ces 6 suspensions bactériennes, l'accumulation de métal a été mesurée 10 fois après 1 heure de contact avec le ^{109}Cd (8,9 μM , 500 ci/mole). Les moyennes et les écarts-types sur 10 mesures ont été calculés et comparés.

La figure 41 montre la moyenne des 3 essais de type 1, les demi écarts-types sur les 3 essais ont été représentés. Les résultats bruts sont donnés en annexe 6. Le traitement statistique de ces résultats (Tableau 22) montre qu'il n'existe pas de différence significative entre l'accumulation des bactéries modifiées et des témoins préparés en absence des réactifs de blocage (l'égalité des variances ayant été vérifiée par le test de Hartley).

Le second type d'essais a été réalisé afin d'éviter l'éventuelle interférence liée à l'emploi des réactifs de blocage eux-mêmes. La moyenne de 3 essais et les demi écarts-types correspondants sont représentés sur la figure 42. Les résultats bruts sont portés en annexe 7. D'une manière générale, l'accumulation du cadmium en fonction du temps est plus régulière, particulièrement après les 20 premières minutes de contact et l'accumulation du métal est toujours supérieure chez les bactéries témoins à celle des bactéries modifiées. Le traitement statistique des résultats montre qu'il existe une différence significative d'accumulation du cadmium entre les bactéries modifiées et les bactéries témoins préparées en présence des réactifs

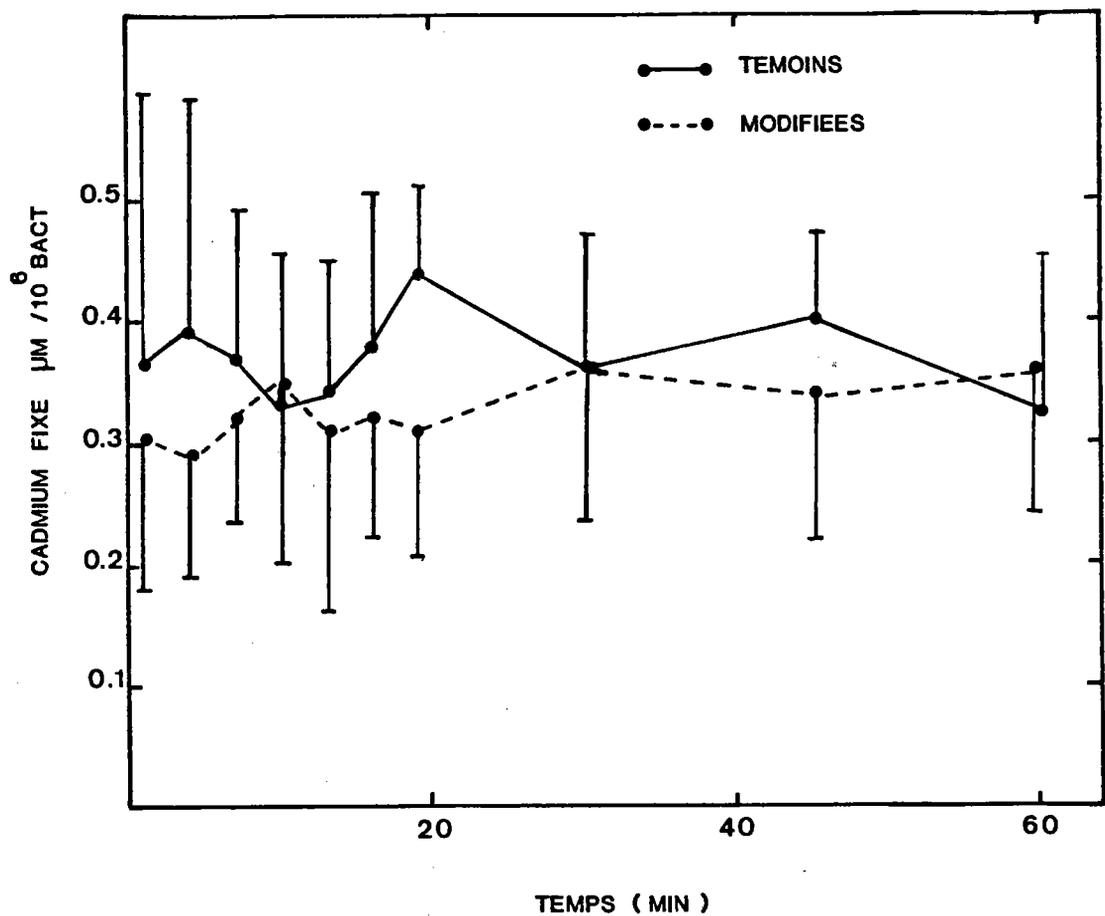


Figure 41 : Cinétique d'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens* dont les groupes carboxyles ont été bloqués. Les bactéries témoins n'ont pas été exposées aux réactifs de blocage. (La moyenne de 3 expérimentations et les demi écarts-types correspondants ont été représentés). (Essais de type 1).

Tableau 22 : Résultats d'analyse de variance, réalisée à partir des valeurs obtenues pour l'accumulation du cadmium par des bactéries témoins préparées à pH acide en absence des réactifs de blocage (essais de type 1). (Valeurs portées en annexe 6).

Source de variance	Somme des carrés	degrés de liberté	carré moyen	F calculé	P
Temps	0,013	9	0,001	0,085	> 0,5
Blocage des carboxyles	0,027	1	0,027	1,611	0,209
Temps-blocage	0,036	9	0,004	0,239	> 0,5
Résiduelle	0,622	40	0,017		
Totale	0,737	59			

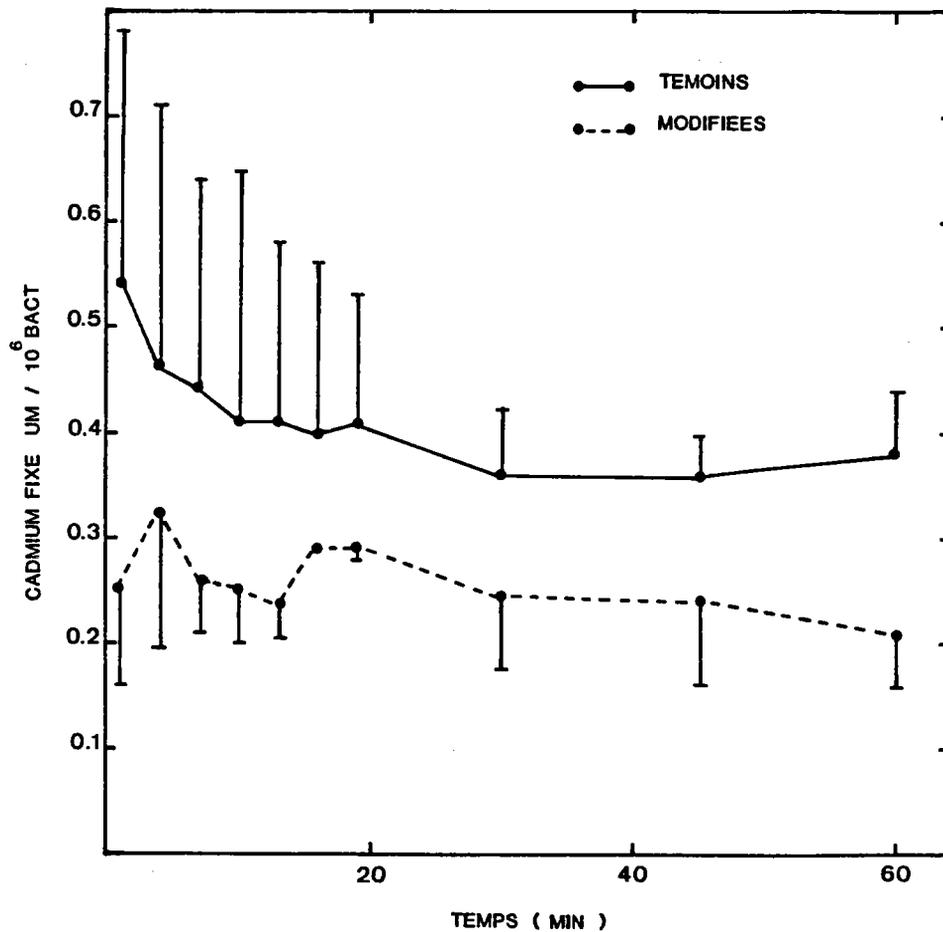


Figure 42 : Cinétiques d'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens* dont les groupements carboxyles ont été bloqués. Les bactéries témoins ont été exposées aux réactifs de blocage à pH neutre. (La moyenne de 3 expérimentations et les demi écarts-types correspondants ont été représentés). (essais de type 2).

de blocage à pH neutre (Tableau 23), l'égalité des variances ayant été vérifiée par le test de Hartley. En d'autres termes, les bactéries accumulent en moyenne $0.26 \mu\text{ moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries contre $0.42 \mu\text{ moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries chez les témoins, soit une différence de 38 %.

Le troisième type d'essais a été conduit afin d'évaluer l'interférence éventuelle de la physiologie cellulaire sur l'accumulation du métal par des bactéries chimiquement modifiées ou non. Le pourcentage moyen de survivants après traitement au cyanure pour les trois essais notés 3-1, 3-2 et 3-3 était de $0,02 \pm 0,008$.

Les résultats des 3 essais sont présentés sous forme d'histogrammes traduisant la quantité de cadmium fixé en $\mu\text{ moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries après 1 h de contact (Figure 43). Un quatrième histogramme noté \bar{M} a été tracé correspondant à la moyenne des trois essais. Un test de comparaison de deux moyennes dans le cas de grands échantillons effectué sur l'ensemble des résultats des 3 essais a confirmé par ailleurs que ces moyennes étaient significativement différentes. Ce troisième type d'essais confirme les résultats de l'essai 2, à savoir que l'accumulation du cadmium est significativement diminuée par le blocage des groupements carboxyles, de $0.40 \mu\text{ moles}$ à $0.34 \mu\text{ moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries soit une diminution de 15 %.

Dans les essais de types 1 et 2, la sensibilité au cadmium des bactéries modifiées ou non a été examinée en parallèle par des mesures respirométriques. La même nomenclature des essais a été conservée.

Les bactéries dont les groupements carboxyles ont été modifiés, et les bactéries témoins en suspension dans une solution saline (NaCl 0,85 %) ont été diluées dans 600 ml de milieu nutritif stérile de façon à obtenir 10^7 à 10^8 UFC $\cdot\text{ml}^{-1}$ par ajustement des D.O. à 620 nm. Les suspensions ont été maintenues à 4°C avant d'être utilisées pour effectuer des mesures d'activité respiratoire en présence et en absence de cadmium ($8,9 \mu\text{M}$) ajouté 10 min avant la mesure proprement dite. Chaque mesure a été effectuée sur trois aliquotes croisés entre eux.

Ainsi, les valeurs obtenues pour la consommation d'oxygène dans les 3 essais de type 1 notés 1-1, 1-2 et 1-3 ont été portées dans le tableau 24. Ces valeurs présentent une forte variation intra-essai liée vraisemblablement à l'étalement sur une journée des mesures respirométriques effectuées. Cependant, malgré

Tableau 23 : Résultats d'analyse de variance réalisée à partir des valeurs obtenues pour l'accumulation du cadmium par des bactéries témoins préparées à pH neutre en présence des réactifs de blocage (essais de type 2). (Valeurs portées en annexe 7).

Source de variance	Somme des carrés	degrés de liberté	carré moyen	F calculé	P
Temps	0,067	9	0,007	0,437	> 0,5
Blocage des carboxyles	0,369	1	0,369	21,745	< 0,001
Temps-blocage	0,040	9	0,004	0,259	> 0,5
Résiduelle	0,679	40	0,017		
Totale	1,154	59			

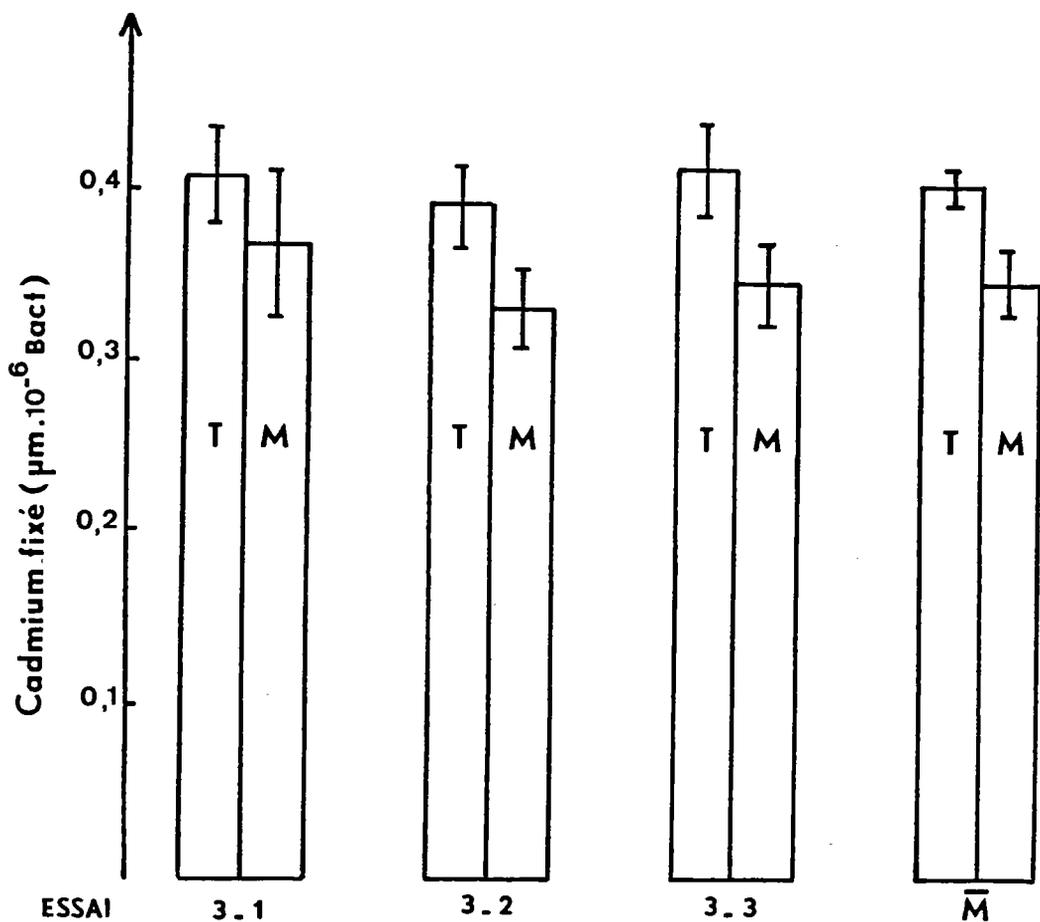


Figure 43 : Accumulation du ¹⁰⁹Cd par *P. fluorescens* inactivé par du cyanure : comparaison de bactéries dont les groupements carboxyles ont été bloqués (bactéries modifiées : M) et de bactéries non traitées (témoins : T).

des écarts-types importants, les tendances, en termes de pourcentage moyen d'inhibition de la respiration, sont reproduites dans les 3 essais et montrent une sensibilité au cadmium 2 à 3 fois plus importante pour les bactéries modifiées par rapport aux témoins, significative au seuil de 5 %.

Cependant, ces résultats sont pondérés par les essais 2-1, 2-2 et 2-3, dont les résultats ont été portés dans le tableau 25 et pour lesquels une différence significative au seuil de 5 % pour la sensibilité au cadmium des bactéries modifiées ou non n'a pu être mise en évidence.

La comparaison des sensibilités au cadmium dans les essais de types 1 et 2 (portées dans les tableaux 24 et 25) indique l'importance de l'effet des réactifs de blocage sur la sensibilité des cellules au métal.

Tableau 24 : Respiration de l'oxygène (mg O₂/min/10¹¹ bact.) par *P. fluorescens* exposés ou non au cadmium : comparaison de bactéries dont les groupements carboxyles ont été bloqués (bactéries modifiées) et de bactéries non modifiées (témoins). (essais de type 1). Les écarts-types sont donnés entre parenthèses.

Essais	Bactéries	Concentration en cadmium (μM)		Inhibition de la respiration %
		0	8,9	
1-1	Témoins	13,13	10,5	20,0
		16,78	14,53	13,4
		15,83	12,50	21,0
				$\bar{m} = 18,1 (4,1)$
	Modifiées	2,50	1,25	50,0
		3,78	2,50	33,9
5,35		4,78	10,7	
			$\bar{m} = 31,5 (19,7)$	
1-2	Témoins	8,00	7,74	3,2
		7,87	5,71	27,5
		11,74	10,14	13,6
				$\bar{m} = 14,8 (12,2)$
	Modifiées	0,73	0,29	60,3
		0,43	0,33	23,3
0,63		0,30	52,4	
			$\bar{m} = 45,3 (19,5)$	
1-3	Témoins	0,33	8,33	10,7
		1,57	1,33	15,3
		2,00	1,77	11,5
				$\bar{m} = 12,5 (2,4)$
	Modifiées	3,00	2,23	25,7
		1,47	1,03	29,9
1,67		1,17	29,9	
			$\bar{m} = 28,5 (2,4)$	

Tableau 25 : Respiration de l'oxygène (mg O₂/min/10¹¹ bact.) par *P. fluorescens* exposés ou non au cadmium : comparaison de bactéries dont les groupements carboxyles ont été bloqués (bactéries modifiées) et de bactéries non modifiées (témoins). (essais de type 2). Les écarts - types sont donnés entre parenthèses.

Essais	Bactéries	Concentration en cadmium (M)		Inhibition de la respiration %	
		0	8,9		
2-1	Témoins	1,11	0,71	36,0	
		0,26	0,21	19,2	
		0,60	0,50	16,7	
					$\bar{m} = 24,0 (10,5)$
	Modifiées	0,37	0,26	30,7	
		0,29	0,26	10,3	
0,29		0,23	20,7		
				$\bar{m} = 20,6 (10,2)$	
2-2	Témoins	2,22	1,15	48,2	
		0,53	0,36	32,1	
		0,60	0,44	26,7	
					$\bar{m} = 35,7 (11,2)$
	Modifiées	0,73	0,42	42,5	
		0,76	0,45	40,8	
0,75		0,65	13,3		
				$\bar{m} = 32,2 (16,3)$	
2-3	Témoins	0,88	0,45	48,9	
		0,30	0,24	20,0	
		0,38	0,28	26,3	
					$\bar{m} = 31,7 (15,2)$
	Modifiées	0,44	0,19	56,8	
		0,19	0,15	21,0	
0,28		0,21	25,0		
				$\bar{m} = 34,3 (19,6)$	

5 - DISCUSSION

L'accumulation par une bactérie du cadmium, comme de tout autre métal, résulte d'un ensemble de mécanismes complémentaires, plus ou moins connus, plus ou moins compliqués comme l'adsorption, la désorption, le transport, la diffusion, les complexations et les transformations.

Ainsi, la figure 44 montre que le cadmium en solution peut être adsorbé à la périphérie cellulaire et pénétrer dans la cellule bactérienne. Le métal est susceptible d'être piégé au niveau de toutes les structures bactériennes puisque la plupart des molécules biologiques comme les protéines, les phospholipides et les acides nucléiques sont capables de le complexer. Le métal peut aussi former des complexes inorganiques insolubles, être transformé et être expulsé de la cellule, tous ces mécanismes entraînant parfois une diminution ou une augmentation de toxicité.

Toutefois, de nombreuses inconnues persistent parmi lesquelles la réversibilité des processus mentionnés, le ou les mécanismes permettant au métal d'atteindre le niveau intracellulaire, le rôle des enveloppes bactériennes dans l'accumulation du métal et dans la protection des cellules, la localisation privilégiée du métal toxique. La réponse à ces questions nécessite d'explorer l'accumulation globale du métal (aspect cinétique, influence de la concentration en métal, spécificité), les structures accumulatrices de métal, les mécanismes de transport et d'étudier en parallèle la toxicité du métal.

5.1. L'ACCUMULATION DU CADMIUM PAR LES BACTERIES

Au premier abord la fixation des métaux est un processus rapide qui se traduit par un processus d'adsorption. En effet, la cinétique d'accumulation du cadmium par *P. fluorescens* est un processus biphasique : la première phase rapide permet, après une heure de contact, la fixation de 82 à 100 % du métal accumulé en 4 heures. Elle est suivie d'une phase d'accumulation lente qui traduit vraisemblablement un phénomène de saturation et un mécanisme d'accumulation différent de celui observé pendant la première heure de contact avec le métal.

Ces observations sont en accord avec les travaux de KUREK et al. (1982) et de plus elles sont retrouvées pour d'autres métaux et d'autres microorganismes (STRANDBERG et al., 1981).

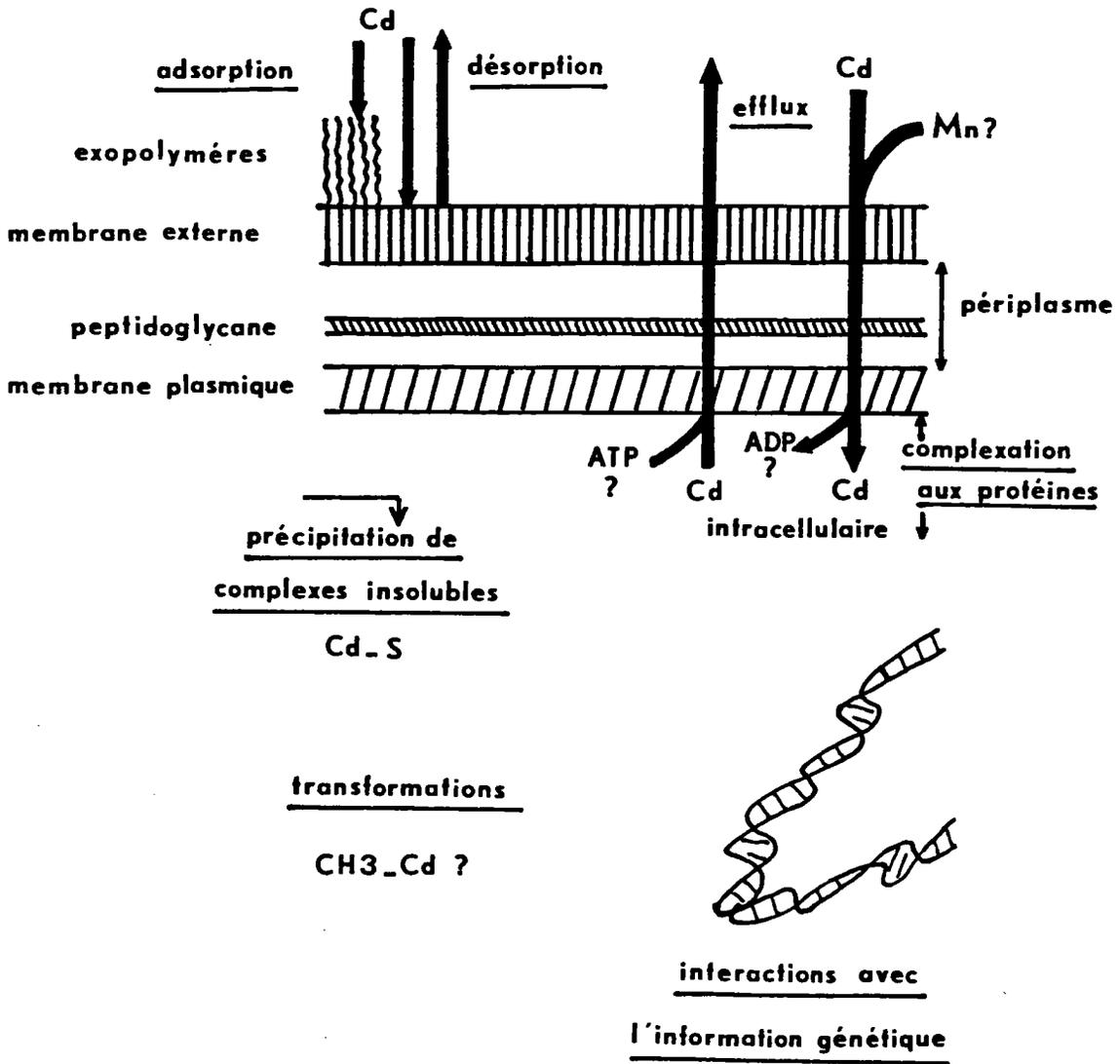


Figure 44 : Schéma général regroupant les divers mécanismes d'accumulation du cadmium.

Comme cela a été dit dans le paragraphe 2.3.2. (chapitre 2), la confrontation des résultats de la littérature à un niveau quantitatif est gênée par un manque d'homogénéité dans l'expression des résultats et surtout par l'absence de standardisation dans la conduite des cultures bactériennes. Or, l'état physiologique des bactéries est un paramètre dont l'importance a déjà été décrite (paragraphe 2.3.1.1.), et illustrée par les différences d'accumulation de cadmium entre bactéries mortes et vivantes (KUREK et al., 1982 ; FLATAU et al., 1984).

Afin de déterminer le réel effet de l'état physiologique des bactéries sur la fixation des métaux, l'emploi de cultures synchrones et la réalisation d'essais à différents temps de culture permettraient une approche intéressante.

D'une manière tout aussi caractéristique, l'accumulation du cadmium par les bactéries peut être décrite comme un phénomène de surface. En effet, la description par un isotherme de Freundlich de la fixation du cadmium par *P. fluorescens* ou *K. aerogenes* suggère l'adsorption du métal à la périphérie cellulaire, comme cela a déjà été rapporté par BROWN et LESTER (1982a).

La comparaison de ces isothermes d'adsorption obtenus avec des souches sauvages et des souches mutantes d'une même espèce, déficientes pour la production d'exopolysaccharides, comme nous l'avons fait avec *K. aerogenes*, traduit l'importance des structures exocellulaires dans l'accumulation des métaux.

La capacité d'adsorption de la souche sauvage, forte productrice d'exopolysaccharides, n'est pas saturée en présence de concentrations en cadmium ajouté allant jusque 89 μM . Dans certains cas, le croisement des isothermes d'adsorption montre une accumulation du métal plus importante et inattendue chez le mutant en présence de 89 μM en cadmium ajouté. Des isothermes se croisant peuvent aussi être tracés à partir des résultats de FRIEDMAN et DUGAN (1968) pour l'accumulation du cobalt, du cuivre et du nickel pour deux souches, capsulées ou non, de *Zoogloea ramigera*.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'accumulation du métal par la souche mutante, faible productrice d'exopolysaccharides.

D'une part, l'accumulation se traduirait par un isotherme de type S pour lequel, selon la classification de GILES et al. (1960), plus le soluté est adsorbé, plus l'adsorption est facile. Cette définition implique l'existence d'interactions entre les ions adsorbés et les ions libres, un tel mécanisme a été proposé, sur la base de données de microscopie électronique, par BEVERIDGE et MURRAY (1976) pour la fixation d'ions Au^{2+} sur des parois bactériennes isolées.

D'autre part, la seconde hypothèse suppose que la première partie de l'isotherme (pour des concentrations en cadmium ajouté allant jusque 8,9 μM dans nos essais) corresponde à la saturation des sites d'adsorption les plus périphériques de la souche K54 A3 (0). De ce fait, pour des concentrations supérieures en métal ajouté, l'accumulation observée correspondrait à la formation de complexes avec d'autres constituants cellulaires.

En ce qui concerne la spécificité de l'accumulation du cadmium par *P. fluorescens*, nous avons observé une diminution de l'accumulation en présence de calcium, magnésium et manganèse ajoutés. Toutefois, étant donnée l'incertitude des mesures d'accumulation de ^{109}Cd , seul l'effet inhibiteur du manganèse est significatif, comme l'ont rapporté TYNECKA et al. (1981) avec *Staphylococcus aureus* et HART et al. (1979) avec une algue.

Ces résultats demandent à être confirmés en testant une gamme de concentrations en cations divalents ajoutés. Ils ne peuvent être explicités par les simples caractéristiques physiques des ions, puisque Ca et Cd ont le même rayon ionique, Cd et Zn ont la même couche électronique périphérique et Cd, Zn et Mn appartiennent à la catégorie des ions intermédiaires dans la classification de NIEBOER et RICHARDSON (1980).

5.2. STRUCTURES BACTERIENNES CAPABLES D'ACCUMULER LE CADMIUM

Les propriétés de l'ion cadmium rapportées dans le chapitre 2.2. font que cet ion, classé parmi les ions intermédiaires dans la classification de NIEBOER et RICHARDSON (1980), est capable d'être complexé à un grand nombre de molécules biologiques et pratiquement toutes les structures bactériennes sont susceptibles d'accumuler ce métal. Toutefois, l'importance relative des différentes structures bactériennes périphériques: exopolysaccharides, membrane externe, peptidoglycane et membrane plasmique dans l'accumulation des métaux n'est pas connue.

- a) Les exopolysaccharides extraits et partiellement purifiés ou non ont été étudiés en tant que structure accumulatrice de métaux (CORPE, 1975 ; BROWN et LESTER, 1980). Il a été montré que la fixation des métaux, au niveau de ces polymères extraits, peut être décrite par un isotherme traduisant l'adsorption des métaux au niveau de ces structures (RUDD et al., 1984 ; BROWN et

LESTER, 1982a). Des souches bactériennes et leur mutant déficient dans la production d'exopolysaccharides ont été utilisés pour estimer indirectement l'importance de cette structure périphérique dans l'accumulation des métaux. La fixation de cadmium chez *K. aerogenes* K54 A3 est deux fois supérieure à celle du mutant en présence de cadmium ajouté 8,9 μM , ainsi que le confirment FRIEDMAN et DUGAN (1968) pour l'accumulation du cuivre, nickel, cobalt et fer par *Zoogloea ramigera* 115 et 116 M.

Il est cependant faux de parler du rôle des exopolysaccharides au sens strict du terme dans l'accumulation des métaux puisque des analyses de ces structures ont montré qu'elles comportaient une proportion non négligeable de protéines et d'acides nucléiques (BROWN et LESTER, 1980), le terme exopolymère semble plus approprié en la circonstance.

- b) L'importance des enveloppes pariétales des bactéries gram négatives : membrane externe et peptidoglycane, dans l'accumulation du cadmium a été estimée indirectement en comparant la fixation du métal au niveau de bactéries entières, de muréinoplastes et de protoplastes. Il est intéressant de comparer ces structures, dont on sait qu'elles ont chez *P. fluorescens* une masse équivalente, (FALLA, 1986, communication personnelle) pour leur capacité à fixer les métaux. Deux souches bactériennes : *P. fluorescens* et *A. haloplanktis* produisent des résultats similaires. Toutefois, il est impossible de classer ces enveloppes bactériennes selon leur capacité à fixer le cadmium, à cause de la non reproductibilité des expérimentations et du chevauchement des isothermes obtenus. Le manque de reproductibilité est souvent constaté dans les expérimentations utilisant un matériel biologique, imparfaitement standardisé et dans notre cas, la situation est aggravée par les multiples étapes du protocole de préparation des protoplastes.

En fait, l'adsorption du métal par les bactéries entières, les muréinoplastes ou les protoplastes, est du même ordre de grandeur. Ceci résulte vraisemblablement de la fixation d'une partie du métal au niveau de sites rendus accessibles par l'élimination des structures périphériques. Par contre, les travaux de GAUTHIER et al. (communication personnelle, Toulouse, 1986) semblent indiquer une plus forte accumulation de métaux par les protoplastes de *A. haloplanktis* que par les cellules entières.

Dans d'autres cas, la membrane externe et le peptidoglycane ont été étudiés pour leur capacité à fixer les métaux en tant que structures préalablement

extraites et purifiées.

Cette approche, même si elle interdit toute extrapolation à une situation dans laquelle les bactéries auraient été exposées au métal, fournit des informations intéressantes sur les propriétés des structures isolées. Ainsi, BEVERIDGE (1984) rapporte que des parois extraites d'*E. coli* se comportent comme des résines échangeuses de cations dans lesquelles le peptidoglycane fixerait 2 à 3 fois plus de métal (Na, K, Mg, Ca, Mn) rapporté au poids sec de structure, que la membrane externe de ce même microorganisme.

Il serait intéressant de pouvoir comparer les membranes plasmiques et externes par rapport à l'accumulation du métal, mais les interactions métaux-membranes sont généralement considérées en terme de transport et non en terme d'accumulation.

- c) Parmi les groupements fonctionnels capables de complexer les ions cadmium figurent les groupements thiols, phosphates et carboxyles, ces derniers étant les plus faciles à étudier grâce aux méthodes décrites par DOYLE et al. (1980) et BEVERIDGE et MURRAY (1980).

L'importance des groupements carboxyles dans l'accumulation du cadmium a été estimée en comparant la fixation de métal par des bactéries intactes et par des bactéries modifiées dont les groupements carboxyles ont été chimiquement bloqués. Bien que non significatives dans certaines de nos expérimentations, les tendances observées ont toujours été dans le sens d'une accumulation de métal moindre pour les bactéries modifiées. Cette observation a été faite également sur des bactéries mortes afin d'éliminer l'influence d'une éventuelle modification du métabolisme due à la réaction de blocage, sur l'accumulation du métal. Nos résultats confirment ceux obtenus par BEVERIDGE et MURRAY (1980) et DOYLE et al. (1980) pour l'accumulation d'autres métaux par des parois isolées de bactéries gram positives.

Il est cependant difficile d'estimer quantitativement la part des groupements carboxyles dans l'accumulation du cadmium par les bactéries entières puisque le rendement de la réaction de blocage n'est pas connu et que le nombre de groupements carboxyles chimiquement modifiés par cette réaction n'a pas été déterminé.

5.3. Y-A-T-IL UN PROCESSUS ACTIF D'ACCUMULATION DU CADMIUM CHEZ LES BACTERIES ?

En d'autres termes moins scientifiques, doit-on parler d'empoisonnement ou de suicide des bactéries au cadmium ?

Pour répondre à ce type de question, plusieurs stratégies sont envisageables, parmi lesquelles l'effet de la température, des inhibiteurs métaboliques et des nutriments peuvent être étudiés.

La température n'est pas un critère de choix pour distinguer la dépendance énergétique de l'accumulation des métaux, puisqu'elle intervient dans la fluidité des systèmes membranaires en la diminuant à basse température (PRINGLE et CHAPMAN, 1981). Nos propres essais ont montré que l'effet de la température n'est pas reproductible, et n'autorisent pas à conclure quant à un quelconque effet de ce facteur sur l'accumulation du métal par les bactéries.

TYNECKA et al. (1981) ont évalué l'effet des inhibiteurs métaboliques pour démontrer l'existence d'un transport actif du cadmium chez *Staphylococcus aureus*. Leurs résultats, tout comme ceux de SILVER et KRALOVIC (1969) pour le transport du manganèse chez *Candida utilis*, sont fort discutables. En effet, nos propres expérimentations ont démontré le pouvoir complexant des inhibiteurs métaboliques vis à vis du cadmium qui modifie la concentration en ions libres et très certainement les processus d'accumulation des métaux.

Ainsi, de nombreux résultats concernant le transport actif de métaux ont besoin d'être confirmés en présence d'une quantité équivalente en ions métalliques libres avec et sans inhibiteurs métaboliques.

Nos résultats concernant l'effet des éléments nutritifs sur l'accumulation du cadmium chez *P. fluorescens* n'ont pas permis de mettre en évidence l'énergie dépendance de l'accumulation du cadmium chez cette bactérie qui, d'une manière assez raisonnable, ne semble pas travailler activement à sa propre intoxication.

5.4. OÙ S'EXPRIME LA TOXICITE DU CADMIUM ?

Les premières cibles potentielles du cadmium sont peut-être les enzymes et les transporteurs localisés au niveau de l'espace périplasmique.

La membrane plasmique considérée, par opposition à la paroi, comme une structure cellulaire à part entière, comporte certainement des cibles sensibles

au métal sous forme d'enzymes (perméases, enzymes de la chaîne respiratoire, etc...). A cet égard, en présence de cadmium, la respiration de l'oxygène par les bactéries est diminuée chez *P. fluorescens* ou chez *A. haloplanktis* et cet effet est confirmé par les travaux de ZWARUM (1973).

De même, la croissance bactérienne est modifiée en présence de cadmium et des modifications sont observées au niveau de la phase de latence qui augmente, alors que le taux de croissance et la biomasse produite en phase plateau diminuent. La modification simultanée de ces 3 paramètres de croissance en présence de cadmium dans nos essais avec *P. fluorescens* s'oppose aux résultats de MOROZZI et al. (1982), présentant exclusivement une augmentation du temps de latence en présence de métal de 0,5 à 50 μ M.

Les exopolysaccharides agissent, vis à vis de la toxicité du métal, comme un filtre qui possède la capacité de retenir les métaux, et protègent les cellules bactériennes. En effet, nous avons montré que la croissance de la souche *K. aerogenes* K54 A3 est moins affectée par le cadmium que celle du mutant entouré d'une mince capsule.

De même, en utilisant les mêmes souches bactériennes BITTON et FREIHOFER (1978) ont obtenu 20 fois plus de survivants, après exposition des bactéries au cadmium, chez la souche sauvage comparativement au mutant.

Peut-on mettre en évidence pour la membrane externe et le peptidoglycane un effet de "filtre" similaire à celui observé pour les exopolymères ? Nos mesures respirométriques réalisées sur bactéries entières, muréinoplastes et protoplastes, montrent un effet protecteur de la membrane externe et, à un degré moindre du peptidoglycane, vis à vis de la toxicité du cadmium.

Le rôle protecteur de la membrane externe est certainement davantage lié au piégeage du métal par adsorption, plutôt qu'à une barrière de perméabilité aux ions cadmium puisque la membrane externe permet le passage des petites molécules hydrophiles (NAKAE et NAKAE, 1982). Par contre, les groupements phosphates des phospholipides et des lipopolysaccharides (FERRIS et BEVERIDGE, 1984) et les groupements carboxyles et thiols des protéines (JACOBSON et TURNER, 1980 ; DOYLE et al., 1980) sont capables de complexer les cations divalents.

Cependant, le "stress" imposé aux bactéries au cours de la préparation des différents types de cellules (bactéries entières, muréinoplastes et protoplastes) modifie l'état physiologique, comme le montre la diminution de l'activité respira-

toire spécifique, et par contre-coup peut-être leur sensibilité aux toxiques. Ainsi, étant dans l'impossibilité de dissocier ces deux paramètres (plus grande sensibilité aux toxiques liée à l'absence d'enveloppes, ou liée à la modification de l'état physiologique) les conclusions doivent rester prudentes.

Les groupements carboxyles, comme nous avons pu le montrer sur des cellules entières de *P. fluorescens*, interviennent dans l'accumulation du cadmium. Ces observations renforcent celles obtenues par BEVERIDGE et MURRAY (1980) et DOYLE et al. (1980) sur des parois bactériennes extraites.

Par contre, nous avons observé que le blocage des groupements carboxyles ne modifiait pas significativement la toxicité du cadmium vis à vis de *P. fluorescens*. Cela laisse penser que la présence de ces sites de fixation ne freine pas la pénétration du cadmium à l'intérieur de la cellule.

Dans ces conditions, il apparaît très important de différencier systématiquement les aspects accumulation et toxicité des métaux. Et, à titre d'exemple, des structures non essentielles pour la bactérie en termes d'activités métaboliques comme les exopolysaccharides et le peptidoglycane ont des comportements totalement différents. Ces deux structures sont ainsi capables de fixer du métal, mais seuls les exopolysaccharides semblent jouer un rôle prépondérant dans la protection de la cellule bactérienne vis à vis des métaux.

Ce hiatus entre capacité d'accumulation et de protection renforce l'intérêt des études relatives au rôle des enveloppes cellulaires dans la relation bactérie - métal.

6 - CONCLUSIONS

L'objectif de cette étude était de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation des métaux par les bactéries gram négatives dans le cas particulier du cadmium et plus précisément de faire le lien entre l'accumulation du métal, sa localisation et sa toxicité.

Les résultats présentés et discutés dans ce travail nous autorisent à tirer les conclusions suivantes quant à la fixation et à la toxicité du cadmium chez les bactéries gram négatives.

- a) Une population de *P. fluorescens* en phase exponentielle de croissance ($1,5 \cdot 10^8$ UFC $\cdot \text{ml}^{-1}$) accumule une quantité de cadmium par bactérie voisine de 10^{-8} μg ($0,009 \times 10^{-8}$ μmoles) ce qui correspond à 25 % du métal ajouté en solution ($0,053$ μmoles) accumulé par les bactéries.
- b) L'accumulation du cadmium par les bactéries peut être décrite par un isotherme d'adsorption de type Freundlich traduisant ainsi la fixation superficielle du métal.
- c) La toxicité du cadmium sur la croissance bactérienne s'exprime en termes de diminution du taux de croissance, de diminution de la biomasse produite en phase plateau, d'augmentation du temps de latence. Les CI 50 pour ces trois paramètres sont équivalentes et voisines de 27 μM .
- d) L'accumulation du cadmium chez *P. fluorescens* est un processus non spécifique qui n'a pu être montré ni température, ni énergie-dépendant, au contraire de ce qui a été rapporté par TYNECKA et al. (1981) chez *Staphylococcus aureus*.
- e) Les exopolysaccharides bactériens interviennent dans l'accumulation des métaux mais ils protègent aussi les cellules vis à vis de l'action toxique du cadmium. C'est l'exemple le plus frappant d'une accumulation non toxique de métal permettant bien de distinguer sites de fixation et sites sensibles dont la modification par le métal se traduit par un effet toxique.
- f) De la même manière, la comparaison de bactéries entières, muréinoplastes et protoplastes, pour l'accumulation du cadmium a permis de mettre en évidence une capacité d'adsorption du métal quasi équivalente par la membrane externe,

le peptidoglycane et la membrane plasmique. Des mesures respirométriques, effectuées sur ces trois types de cellules, ont montré apparemment un effet protecteur de la membrane externe et à un degré moindre celui du peptidoglycane chez *P. fluorescens* et *A. haloplanktis*.

- g) Le blocage chimique des groupements carboxyles chez *P. fluorescens* a montré que ces groupements sont capables de complexer et, par voie de conséquence, de retenir le cadmium. Par contre, dans ce cas, un effet protecteur vis à vis de la toxicité du cadmium n'a pu être observé.

Notre étude sur le rôle des enveloppes bactériennes dans l'accumulation et la toxicité du cadmium s'est voulue d'approche relativement fondamentale. Cependant, quelques-unes de nos observations ont un intérêt réel pour certaines applications industrielles.

La première concerne l'épuration des eaux et l'élimination des métaux par voie biologique.

Dans ce cadre, la production d'exopolysaccharides, possédant une capacité réelle de fixation des métaux et, capables de limiter les effets toxiques, constitue un paramètre intéressant à favoriser dans un réacteur biologique de traitement des eaux.

De plus, l'indépendance énergétique de l'accumulation du métal simplifie la conduite d'un réacteur industriel puisque, a priori, il n'est pas nécessaire d'ajouter des molécules nutritives pour favoriser l'accumulation.

Notre connaissance des sites d'accumulation des métaux au niveau de molécules biologiques (phospholipides, protéines, acides nucléiques), constitutrices de la paroi, de la membrane plasmique et du cytoplasme des bactéries, tend à montrer toutefois que la récupération et la valorisation des métaux par voie biologique est utopique. La technicité et les moyens nécessaires pour récupérer le métal piégé au sein de ces structures organiques sont à l'évidence prohibitifs.

La seconde application concerne les tests d'écotoxicité utilisant des bactéries.

En effet, les bactéries bien que faciles à mettre en oeuvre sont peu employées dans des tests d'écotoxicité en raison de leur relativement faible sensibilité aux toxiques en général, et ceci même si elles présentent un grand nombre d'avantages parmi lesquels : abondance et répartition dans des milieux très divers, faible coût, réponse rapide, etc...

Ce problème de faible sensibilité des bactéries aux toxiques tient sans doute à plusieurs raisons : difficulté à enregistrer les modifications métaboliques de quelques cellules bactériennes suite à un effet toxique ; forte efficacité des systèmes de réparation des lésions de la cellule ; bonne protection de la cellule par la paroi... Une solution à ce problème réside alors partiellement dans la mise au point de tests réalisés à partir de bactéries dépourvues d'exopolysaccharides et même de paroi. Il est certes difficile d'imaginer que des tests puissent être basés sur des protoplastes préparés expérimentalement. Toutefois, l'emploi de bactéries déficientes pour la production de la paroi, ou de mutants sans paroi mériterait de plus amples investigations.

7 - BIBLIOGRAPHIE

- ADAMS T. McM. et J.R. SANDERS - 1984. The effects of pH on the release to solution of zinc, copper and nickel from metal-loaded sewage sludges. Environ. Pollut. (Series B), 8, 85-99.
- AHRLAND S., CHAM I. et N.R. DAVIS - 1958. The relative affinities of ligands to atoms for acceptor molecules and ions. Quart. Rev., 12, 265-276.
- AIKING H., KOK K., VAN HEERIKHUIZEN H. et J. VAN'T RIET - 1982. Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. Appl. Environ. Microbiol., 44, 938-944.
- AIKING H., STIJNMAN A., VAN GARDEREN C., VAN HEERIKHUIZEN H. et J. VAN'T RIET - 1984. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. Appl. Environ. Microbiol., 47, 374-377.
- AJMAL M., AHMAD A. et A.A. NOMANI - 1982. Microbial uptake of cadmium and its effects on the biochemical oxygen demand at various temperatures. Water Res., 16, 1611-1614.
- BABICH H. et G. STOTZKY - 1977. Sensitivity of various bacteria, including Actinomycetes and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. Appl. Environ. Microbiol., 33, 681-695.
- BABICH H. et G. STOTZKY - 1978. Effects of cadmium on the biota, influence of environmental factors. Adv. Appl. Microbiol., 23, 55-117.
- BAUDA P. et J.C. BLOCK - 1985. Cadmium biosorption and toxicity to laboratory-grown bacteria. Environ. Technol. Letters, 6, 445-454.
- BELMONTE A.A., SWARBRICK J., JENSEN R.G. et D.T. GORDON - 1972. Biological implications of cadmium-phospholipid monolayers. Lipids, 7, 490-491.
- BEVAN D.R., WORRELL W.J. et K.D. BARFIELD - 1983. The interaction of Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Hg^{2+} with phospholipid bilayer vesicles. Colloids and Surfaces, 6, 365-376.

- BEVERIDGE T.J. et R.G.E. MURRAY - 1976. Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 127, 1502-1518.
- BEVERIDGE T.J. et R.G.E. MURRAY - 1980. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 141, 876-887.
- BEVERIDGE T.J. et J.F. KOVAL - 1981. Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K12. Appl. Environ. Microbiol., 42, 325-335.
- BEVERIDGE T.J., FORSBERG C.W. et R.J. DOYLE - 1982. Major sites of metal binding in *Bacillus licheniformis* walls. J. Bacteriol., 150, 1438-1448.
- BEVERIDGE T.J. - 1984. Mechanisms of the binding of metallic ions to bacterial walls and the possible impact on microbial ecology. Chapter Bioconversion of inorganic materials. in Microbial Ecology, KLUG M.J. et C.A. REDDY (eds), American Society for Microbiology, Washington, 601-607.
- BEYERSMANN D., KÖSTER A. et B. BUTTNER - 1984. Model reactions of chromium compounds with mammalian and bacterial cells. Toxicol. Environ. Chem., 8, 279-286.
- BITTON G., HENIS Y. et N. LAHAV - 1976. Influence of clay minerals, humic acid and bacterial capsular polysaccharide on the survival of *Klebsiella aerogenes* exposed to drying and heating in soils. Plant and soil, 45, 65-74.
- BITTON G. et V. FREIHOFFER - 1978. Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*, Microb. Ecol., 4, 119-125.
- BLUNDELL M.R. et D.G. WILD - 1969. Inhibition of bacterial growth by metal salts. A survey of effects on the synthesis of ribonucleic acid and protein. Biochem. J., 115, 207-211.
- BOURG A.C.M. - 1984. Adsorption of trace elements by suspended particulate matter in aquatic systems. Manuscript prepared for the special task group on "Trace elements in natural waters" of the analytical chemistry division (Commission V.6) of the International Union of Pure and Applied Chemistry.

- BRADLEY G. - 1985. Bacterial outer membranes studies of outer membrane structure and function give an understanding of bacterial interactions with their environment and provide models for more complex systems. Biologist, 32, 49-51.
- BROUWER M. et T. BROUWER-HOEXUM - 1984. Cadmium accumulation by the blue crab, *Callinectes sapidus* : involvement of hemocyanin and characterization of cadmium binding proteins. Mar. Environ. Res., 14, 71-88.
- BROWN M.J. et J.N. LESTER - 1980. Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. Appl. Environ. Microbiol., 40, 179-185.
- BROWN M.J. et J.N. LESTER - 1982a. Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge. I Effects of metal concentrations. Water Res., 16, 1539-1548.
- BROWN M.J. et J.N. LESTER - 1982b. Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge. II Effects of mean cell retention time. Water Res., 16, 1549-1560.
- BUCKLIN R.C. et V.M. REUSCH - 1986. Distribution of negative charge on the cell wall of *Streptococcus sanguis* 34. Proceedings of the 86th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 23-28 march.
- CAFFREY M. et G.W. FEIGENSON - 1984. Influence of metal ions on the phase properties of phosphatidic acid in combination with natural and synthetic phosphatidyl cholines : An X-ray diffraction study using synchrotron radiation. Biochem., 23, 323.
- CENCI G., MOROZZI G. et G. CALDINI - 1985. Injury by heavy metals in *E. coli*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 34, 188-195.
- CHAPON C., MICHAELIS S., PUGSLEY A., RAIBAUD D., SCHWARTZ M. et C. WANDERSMAN - 1984. La sécrétion des protéines chez les bactéries à gram négatif. Colloque CNRS. Recherches fondamentales en amont des biotechnologies, Paris, le 19 Novembre.
- CHLEBOWSKI J.F., ARMITAGE I.M. et J.E. COLEMAN - 1977. Allosteric interactions between metal ion and phosphate at the active sites of alkaline phosphatase as determined by ^{31}P NMR and ^{113}Cd NMR. J. Biol. Chem., 252, 7053-7061.

- CHOPRA I. - 1971. Decreased uptake of cadmium by a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol., 63, 265-267.
- CHOPRA I. - 1975. Mechanism of plasmid-mediated resistance to cadmium in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents and Chemother., 7, 8-14.
- CORPE W.A. - 1975. Metal binding properties of surface materials from marine bacteria. Dev. Ind. Microbiol., 16, 249-255.
- DAVIES J.A., ANDERSON I.K., BEVERIDGE T.J. et H.C. CLARK - 1983. Chemical mechanisms of the gram stain and synthesis of a new electron opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain. J. Bacteriol., 156, 837-845.
- DEGRAEVE N. - 1981. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. Mutation Res., 86, 115-135.
- DOYLE J.J., MARSHALL R.T. et W.H. PFANDER - 1975. Effects of cadmium on the growth and uptake of cadmium by microorganisms. Appl. Microbiol., 29, 562-564.
- DOYLE R.J., MATTHEWS T.H. et U.N. STREIPS - 1980. Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. J. Bacteriol., 143, 471-480.
- DRAPEAU A.J., LAURENCE R.A., HARBEC P.S., SAINT-GERMAIN G. et N.G. LAMBERT - 1983. Bioaccumulation de métaux lourds chez certains microorganismes. Sciences et Techniques de l'Eau, 16, 359-363.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A. et F. SMITH - 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., 28, 350-356.
- EAGON R.G. - 1956. Studies on polysaccharide formation by *P. fluorescens*. Can. J. Microbiol., 2, 673-676.
- FERRIS F.G. et T.J. BEVERIDGE - 1984. Binding of a paramagnetic metal cation to *Escherichia coli* K12. FEMS Microbiology Letters, 24, 43-46.

- FLATAU G.N., CLEMENT R.L. et M.J. GAUTHIER - 1984. Fixation du cadmium par une Pseudomonadacee marine vivante ou tuée par l'éthanol ou le cyanure de potassium. Chemosphère, 13, 1397-1400.
- FORSBERG C.N., COSTERTON J.W. et R.A. MAC LEOD - 1970. Quantitation, chemical characteristics, and ultrastructure of the three outer cell wall layers of a gram negative bacterium. J. Bacteriol., 104, 1354-1368.
- FORSEN S., THULIN E. et H. LASA - 1979. ^{113}Cd NMR in the study of calcium binding proteins : troponin C. F.E.B.S. Letters, 107, 123-137.
- FRIEDMAN B.A. et P.R. DUGAN - 1968. Concentration and accumulation of metallic ions by the bacterium *Zoogloea*. Dev. Ind. Microbiol., 9, 381-388.
- FRISTOE B.R. et P.O. NELSON - 1983. Equilibrium chemical modelling of heavy metals in activated sludge. Water Res., 17, 771-778.
- GAID K. - 1981. Modes d'élimination de composés sur filtres : cas d'un support consommable et non adsorbant. Thèse es sciences, Université de Rennes, 375 pages, Série B, n° 344, n° série 200.
- GILES C.H., MAC EWAN T.H., NAKHWA S.N. et D. SMITH - 1960. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of specific areas of solids. J. Chem. Soc., 3973-3993.
- GOULD M.J. et E.J. GENETELLI - 1984. Effects of competition on heavy metal binding by anaerobically digested sludges. Water Res., 18, 123-126.
- GROVES D.J., WILSON G.A. et F.E. YOUNG - 1974. Inhibition of transformation of *Bacillus subtilis* by heavy metals. J. Bacteriol., 120, 219-226.
- GUTKNECHT J. - 1981. Inorganic mercury (Hg^{2+}) transport through lipid bilayer membranes. J. Membrane Biol., 61, 61-66.
- HADDOCK B.A. et C.W. JONES - 1977. Bacterial respiration. Bacteriol. Rev., 41, 47-99.

- HAMILTON W.A. - 1975. Energy coupling in microbial transport. Adv. Microb. Physiol., 12, 1-53.
- HAROLD F.M. et J.R. BAARDA - 1969. Inhibition of membrane-bound adenosine triphosphatase and of cation transport in *Streptococcus faecalis* by N, N' dicyclohexylcarbodiimide. J. Biol. Chem., 244, 2261-2268.
- HART B.A., BERTRAM P.E. et B.D. SCAIFE - 1979. Cadmium transport by *Chlorella pyrenoidosa*. Environ. Res., 18, 327-335.
- HARVEY R.W. et J.O. LECKIE - 1985. Sorption of lead onto two gram-negative marine bacteria in sea water. Mar. Chem., 15, 333-344.
- HAUX C., OLSSON P.E., THORSEN I. et L. FÖRLIN - 1984. Partial isolation and purification of cadmium binding proteins from rainbow trout liver. Mar. Environ. Res., 14, 456-458.
- HIATT Y.S. et K.B. JACOBSON - 1980. Interaction of metal ions with t RNA : effects of cadmium, zinc and magnesium ions on chromatographic behaviour of tyrosine and leucine t RNA species. Toxicol. Appl. Pharmacol., 56, 116-126.
- HIGHAM D.P., SADLER P.J. et M.D. SCAWEN - 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. Science, 225, 1043-1046.
- HISCOCK S.A. - 1983. Trends in the uses of cadmium (1970-1979). Ecotox. Environ. Safety, 7, 25-32.
- HOUBA C. et J. REMACLE - 1982. Factors influencing toxicity of cadmium to *Tetrahymena pyriformis*: particulate or soluble form and degree of complexation. Environ. Pollut., 28, 35-43.
- HOYLE D. et T.J. BEVERIDGE - 1983. Binding of metallic ions to the outer membrane of *E. coli*. Appl. Environ. Microbiol., 46, 749-752.
- HOYLE D. et T.J. BEVERIDGE - 1984. Metal binding by the peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K.12. Can. J. Microbiol., 30, 204-211.

- HUTTON M. - 1983. Sources of cadmium in the environment. Ecotox. Environ. Safety, 7, 9-24.
- JACOBSON K.B. et J.E. TURNER - 1980. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. Toxicol., 16, 1-37.
- JAKUBCZAK E., DELMAERE H. et H. LECLERC - 1981. Sensibilité de bactéries du milieu aquatique à quelques substances toxiques. Colloque Inserm 106: Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique, 93-104.
- JELLINECK H.H.G. et J.P. SANGAL - 1972. Complexation of metal ions with natural polyelectrolytes removal and recovery of metal ions from polluted waters. Water Res., 6, 305-314.
- KABACK H.R. - 1972. Transport across isolated bacterial cytoplasmic membranes. Biochim. Biophys. Acta, 265, 367-416.
- KAGI J.H.Z. et B.L. VALLEE - 1961. Metallothioneine : a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex. J. Biol. Chem., 236, 2435-2442.
- KAO J.F., HSIEH L.P., CHENG S.S. et C.P. HUANG - 1982. Effect of EDTA on cadmium in activated sludge systems. J. Water Poll. Control Fed., 54, 1118-1126.
- KATAYAMA-HIRAYAMA K. - 1986. Inhibition of the activities of β galactosidase and deshydrogenases of activated sludge by heavy metals. Water Res., 20, 491-494.
- KAZANTZIS G. - 1984. Mutagenic and carcinogenic effects of cadmium. Toxicol. Environ. Chem., 8, 267-278.
- KORTE F. - 1983. Ecotoxicology of cadmium : general overview. Ecotox. Environ. Safety, 7, 3-8.
- KUREK E., CZABAN J. et J.M. BOLLAG - 1982. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. Appl. Environ. Microbiol., 43, 1011-1015.

- LADDAGA R.A. et S. SILVER - 1985. Cadmium uptake in *E. coli* K12. J. Bacteriol., 162, 1100-1105.
- LERCH K. - 1980. Copper metallothionein, or copper binding protein from *Neurospora crassa*. Nature, 284, 368-370.
- LIAO M.J. et J.H. PRESTEGARD - 1980. Ion specificity in fusion of phosphatidic acid phosphatidyl choline mixed lipid vesicles. Biochim. Biophys. Acta, 601, 453-461.
- MAC ENTEE J.D., WOODROW J.R. et A.V. QUIRK - 1986. Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp. Appl. Environ. Microbiol., 51, 515-520.
- MAEDA Y. et T. AZUMI - 1982. Accumulation of heavy metals by activated sludge. J. Ferment. Technol., 60, 545-550.
- MALCOLM D. - 1979. Cadmium as a carcinogen. Mod. Pharmacol. Toxicol., 15, 173-180.
- MARQUIS R.E., MAYZEL K. et E.L. CARTENSEN - 1976. Cation exchange in cell walls of gram-positive bacteria. Can. J. Microbiol., 22, 975-982.
- MATTHEWS T.H., DOYLE R.J. et V. STREIPS - 1979. Contribution of peptidoglycane to the binding of metal ions by the cell wall of *Bacillus subtilis*. Current Microbiol., 3, 51-53.
- MITCHELL P. - 1966. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biol. Rev., 41, 445-502.
- MITRA R.S., GRAY R.H., CHIN B. et I.A. BERNSTEIN - 1975. Molecular mechanisms of accommodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd²⁺. J. Bacteriol., 3, 1180-1188.
- MITRA R.S. et I.A. BERNSTEIN - 1977. Nature of the repair process associated with the recovery of *Escherichia coli* after exposure to Cd²⁺. Biochem. Biophys. Res. Com., 74, 1450-1455.
- MITRA R.S. - 1984. Protein synthesis in *Escherichia coli* during recovery from exposure to low levels of Cd²⁺. Appl. Environ. Microbiol., 5, 1012-1016.

- MONTREUIL J. et G. SPIK - 1963. Microdosage des glucides. Monographie n° 1 : Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. Monographies n° 1 du laboratoire de chimie biologique de la Faculté des Sciences de Lille.
- MOROZZI G., CENCI G. et G. CALDINI - 1982. The tolerance of an environmental strain of *Escherichia coli* to some heavy metals. Zbl. Bakt. Hyg., 1 Abt. Orig. B176, 55-62.
- NAKAE T., ISHII J. et M. TOKUNAGA - 1979. Subunit structure of functional porine oligomers that form permeability channels in the outer membrane of *E. coli* J. Biol. Chem., 254, 1457-1461.
- NAKAE R. et T. NAKAE - 1982. Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother., 22, 554-559.
- NIEBOER E. et D.H.S. RICHARDSON - 1980. The replacement of the non-descript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. Pollut., (série B), 1, 3-26.
- NIKAIDO H. et M. VAARA - 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev., 49, 1-32.
- NORBERG A.B. et H. PERSSON - 1984. Accumulation of heavy metal ions by *Zoogloea ramigera*. Biotech. Bioeng., 26, 239-246.
- OP DEN KAMP J.A.F. et L.L.M. VAN DEENEN - 1969. Bacterial phospholipids and membranes in Structural and functional aspects of lipoproteins in living systems TRIA E. et A.M. SCANU (eds). Academic Press Inc., NEW YORK, 227-325.
- PEARSON R.C. - 1963. Hard and soft acids and bases. J. Ame. Chem. Soc., 85, 3533-3539.
- PERRY R.D. et S. SILVER - 1982. Cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicles. J. Bacteriol., 150, 973-976.
- PICKETT A.W. et A.C.R. DEAN - 1979. Cadmium and zinc sensitivity and tolerance in *Bacillus subtilis* subsp. *niger* and in a *Pseudomonas* sp. Microbios, 24, 51-64.

- POKORNY J. - 1983. Ein model für die wechselwirkung zwischen metallionen und der phosphatgruppe. Biologia, 38, 289-292.
- POMMERY J., IMBENOTTE M. et F. ERB - 1985. Relation entre toxicité et formes libres de quelques métaux traces. Environ. Pollut., 9, 127-136.
- POURBAIX M. - 1963. Atlas d'équilibres d'électrochimie à 25°C. Gauthier - Villars (Eds), Paris.
- PRINGLE M.J. et D. CHAPMAN - 1981. Effects of low temperatures on biological membranes. Morris G.S. et A. Clarke (Eds), Academic Press, New York, 21-37.
- RAMAMOORTHY S. et D.J. KUSHNER - 1975. Binding of mercuric and other heavy metal ions by microbial growth media. Microb. Ecol., 2, 162-176.
- RANDLE C.I., ALBRO P.W. et J.C. DITTMER - 1969. The phosphoglyceride composition of gram negative bacteria and the changes in composition during growth. Biochem. Biophys. Acta, 187, 214-220.
- RAUCHOVA H. et Z. DRAHOTA - 1979. Activation of the beef heart mitochondrial ATPase by cadmium ions. Int. J. Biochem., 10, 735-738.
- REMACLE J. - 1981. Cadmium uptake by freshwater bacterial communities. Water Res., 25, 67-71.
- REMACLE J., HOUBA C. et J. NINANE - 1982. Cadmium fate in bacterial microcosms. Water Air Soil Pollut., 18, 455-465.
- ROBINSON R.W., ALDRICH H.C., HURST S.F. et A.S. BLEISWEIS - 1985. Role of the cell surface of *Methanosarcina mazei* in cell aggregation. Appl. Environ. Microbiol., 49, 321-327.
- ROGERS H.J., PERKINS H.R. et J.B. WARD - 1980. Microbial cell walls and membranes. Chapman and Hall (Eds), London.
- RUDD T., STERRIT R.M. et J.B. WARD - 1984. Formation and conditional stability constants of complexes formed between heavy metals and bacterial

- extracellular polymers. Water Res., 18, 379-384.
- SALTON M.R.J. - 1971. Bacterial Membranes. C.R.C. Crit. Rev. Microbiol., 1, 161-197.
- SILVER S. et M.L. KRALOVIC - 1969. Manganese accumulation by *Escherichia coli* : evidence for a specific transport system. Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 640-645.
- SIMON C., REMACLE J. et M. MERGEAY - 1985. Cadmium immobilization by a resistant microbial strain and its derivatives, ecological and applied implications. Proceedings of the international Congress Heavy metals in the environment. Athènes, septembre.
- SIMONI R.D. et P.W. POSTMA - 1975. The energetics of bacterial active transport. Ann. Rev. Biochem., 44, 523-554.
- SMITH K. et R.P. NOVICK - 1972. Genetic studies on plasmid linked cadmium resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 112, 761-772.
- SORENSEN E.M.B., ACOSTA D. et D.G. NEALON - 1985. Effects of cadmium and calcium on the fluidity of plasma membrane. Toxicol. Letters, 25, 319-326.
- SOWADSKI J.M., FOSTER B.A. et H.N. WYCKOFF - 1981. Structure of alkaline phosphatase with zinc, magnesium, cobalt or cadmium in the functional metal sites. J. Molec. Biol., 150, 245-272.
- STARY J., KRATZER K. et J. PRASILOVA - 1984. Cumulation of anionic species on algal cells. Toxicol. Environ. Chem., 9, 109-113.
- STERRITT R.M. et J.N. LESTER - 1980. Interactions of heavy metals with bacteria. Sci. Tot. Environ., 14, 5-17.
- STERRITT R.M. et J.N. LESTER - 1981. Concentrations of heavy metals in forty sewage sludges in England. Water, Air, Soil Pollut., 14, 125-131.

- STERRITT R.M. et J.N. LESTER - 1983. Mechanisms of heavy metal concentration into sewage sludge. 3rd International symposium. Processing and use of sewage sludge. Brighton, septembre - L'Hermite P. et H. Ott (Eds).
- STRANDBERG G.N., SHUMATE J.E. et J.R. PARROTT - 1981. Microbial cells as biosorbents for heavy metals : accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol., 41, 237-245.
- STRYER L. - 1981. Biochemistry (second edition). W.H. Freeman and co (Eds) San Francisco.
- SUMMERS A.D. et S. SILVER - 1978. Microbial transformations of metals. Ann. Rev. Microbiol., 32, 637-672.
- SUTHERLAND I.W. - 1977. Surface carbohydrates of the prokaryotic cells. Academic Press, London.
- TITUS J.A. et R.M. PFISTER - 1982. Effects of pH, temperature, and Eh on the uptake of cadmium by bacteria and an artificial sediment. Bull. Environm. Contam. Toxicol., 28, 697-704.
- TRUHAUT R., FERARD J.F. et J.M. JOUANY - 1980. Cadmium I.C.50 determinations on *Chlorella vulgaris* involving different parameters. Ecotox. Environ. Safety, 4, 215-223.
- TYNECKA Z., ZAJAC J. et Z. GOS - 1975. Plasmid-dependent impermeability barrier to cadmium ions in *Staphylococcus aureus*. Acta Microbiol. Pol., 7, 11-20.
- TYNECKA Z., GOS Z. et J. ZAJAC - 1981a. Reduced cadmium transport determined by a resistance plasmid in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 147, 305-312.
- TYNECKA Z., GOS Z. et J. ZAJAC - 1981b. Energy dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 147, 313-319.

- UHLINGER D.J. et D.C. WHITE - 1983. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. Appl. Environ. Microbiol., 45, 64-70.
- WILKINSON J.F. - 1958. The extracellular polysaccharides of bacteria. Bacteriol. Rev., 22, 46-73.
- WILLIAMS R.J.P. - 1981. Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes. Phil. Trans. R. Soc. Lond., 294, 57-74.
- ZASUKHINA G.D., SINELSHIKOVA T.A., LVOVA G.N. et Z.S. KIRKOVA - 1977. Molecular-genetic effects of cadmium chloride. Mutation Res., 45, 169-174.
- ZWARUM A.A. - 1973. Tolerance of *Escherichia coli* to cadmium. J. Environ. Qual., 2, 353.

8 - ANNEXES

Annexe 1 : Résultats bruts et pourcentages de fixation du cadmium par *P. fluorescens* (expérimentation 4.1).

Temps (heures)	Densités bactériennes (U.F.C. .ml ⁻¹)								
	1,5 . 10 ⁸			1,5 . 10 ⁷			1,5 . 10 ⁶		
	Cd restant en solution (mg/l)	σ	Cd fixé en %	Cd restant en solution (mg/l)	σ	Cd fixé en %	Cd restant en solution (mg/l)	σ	Cd fixé en %
0	2,02	0,04	0	2,02	0,04	0	2,02	0,04	0
0,083	1,57	0,037	22,3	1,90	0,012	6,0	1,98	0,029	2,0
0,25	1,55	0,045	23,3	1,85	0,014	8,4	1,99	0,022	1,5
0,5	1,58	0,033	21,8	1,84	0,051	9,0	1,99	0,083	1,5
1	1,53	0,024	24,3	1,83	0,017	9,4	1,92	0,025	5,0
2	1,54	0,031	23,8	1,80	0,028	10,9	1,93	0,004	4,5
3	1,50	0,012	25,8	1,83	0,022	9,4	2,1	0,200	0
4	1,51	0,008	25,3	1,84	0,012	9,0	1,95	0,005	3,5
5	1,53	0,029	24,3	1,79	0,025	11,4	2,03	0,045	0

Annexe 2 : Cadmium fixé en $\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries en fonction du temps à 30°C et à 4°C. Les valeurs pour 3 expérimentations différentes, les moyennes et les écarts-types sur ces valeurs ont été reportés.

Temps (min)	Cd fixé à 30°C ($\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bact.)	\bar{M}	σ	Cd fixé à 4°C ($\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bact.)	\bar{M}	σ
1	0,12 0,15 0,05	0,11	0,05	0,08 0,33 0,10	0,17	0,14
4	0,25 0,35 0,10	0,23	0,12	0,14 0,45 0,15	0,25	0,18
7	0,21 0,65 0,14	0,33	0,28	0,155 0,50 0,16	0,27	0,20
10	0,25 0,72 0,09	0,35	0,33	0,245 0,30 0,31	0,285	0,03
13	0,16 0,85 0,15	0,39	0,40	0,29 0,30 0,21	0,27	0,05
16	0,21 0,70 0,15	0,35	0,30	0,25 0,50 0,19	0,31	0,16
19	0,225 1,13 0,15	0,50	0,50	0,145 0,50 0,23	0,29	0,18

Annexe 3 : Cadmium fixé en $\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries en fonction du temps, en présence et en absence de DNP 1 mM. (Les valeurs pour 3 expérimentations différentes ont été reportées, ainsi que les moyennes et les écarts-types sur ces valeurs).

Temps (min)	Cd accumulé par le Témoin ($\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bact)	\bar{M}	σ	Cd accumulé en présence de DNP ($\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bact)	\bar{M}	σ
1	0,155 0,025 0,19	0,12	0,09	0,025 0,01 0,10	0,045	0,05
4	0,20 0,34 0,195	0,245	0,08	0,03 0,02 0,10	0,05	0,04
7	0,315 0,22 0,315	0,28	0,05	0,035 0,12 0,14	0,10	0,05
10	0,195 0,44 0,24	0,29	0,13	0,04 0,035 0,18	0,085	0,08
13	0,18 0,27 0,29	0,25	0,06	0,06 0,04 0,175	0,09	0,07
16	0,21 0,28 0,29	0,26	0,04	0,05 0,04 0,15	0,08	0,06
19	0,24 0,225 0,255	0,24	0,015	0,06 0,05 0,12	0,08	0,04

Annexe 4 : Cadmium fixé en $\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries en fonction du temps, en présence et en absence de DCCD 100 μM . Les valeurs pour 3 expérimentations différentes ont été reportées ainsi que les moyennes et les écarts-types sur ces valeurs.

Temps (min)	Témoin	\bar{M}	σ	DCCD	\bar{M}	σ
1	0,12 0,185 0,04	0,115	0,07	0,035 0,06 0,145	0,08	0,06
4	0,23 0,26 0,17	0,22	0,045	0,07 0,07 0,09	0,08	0,01
7	0,365 0,175 0,37	0,30	0,11	0,07 0,125 0,02	0,07	0,05
10	0,25 0,235 0,19	0,225	0,03	0,14 0,16 0,175	0,16	0,02
13	0,21 0,21 0,20	0,21	0,006	0,11 0,15 0,08	0,11	0,035
16	0,23 0,12 0,21	0,19	0,06	0,105 0,15 0,06	0,105	0,045
19	0,17 0,17 0,10	0,15	0,04	0,08 0,14 0,18	0,13	0,05

Annexe 5 : Ions Cd^{2+} libres exprimés en mV dans des gammes de concentrations en cadmium préparées dans du bouillon nutritif peptoné, en présence ou en absence de DNP (1 mM) et de DCCD (100 μM). Les écarts-types sont donnés entre parenthèses.

Milieu	Concentration en cadmium ajouté (μM)			
	8.9	89	890	8900
Cadmium dans le milieu peptoné	- 174,6	- 131,3	- 107,3	- 64,3
	- 166,0	- 126,4	- 102,4	- 61,6
	- 163,5	- 124,2	- 101,2	- 60,0
\bar{M} (σ)	- 168 (4,7)	- 127 (3,0)	- 104 (2,6)	- 62 (1,8)
Cadmium dans le milieu peptoné + DNP	- 156,0	- 119,0	- 91,8	- 57,3
	- 154,3	- 117,9	- 90,8	- 56,5
	- 153,7	- 117,1	- 90,6	- 55,5
\bar{M} (σ)	- 155 (1,0)	- 118 (0,8)	- 91 (0,5)	- 56 (0,7)
Cadmium dans le milieu peptoné + DCCD	- 156,8	- 119,9	- 96,5	- 56,2
	- 155,8	- 119,0	- 95,8	- 55,5
	- 155,5	- 118,8	- 95,6	- 55,0
\bar{M} (σ)	- 156 (0,5)	- 119 (0,5)	- 96 (0,4)	- 56 (0,5)

Annexe 6 : Cadmium fixé en $\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries en fonction du temps par des bactéries témoins, préparées à pH acide en absence des réactifs de blocage, et par des bactéries modifiées (essais de type 1 - protocole du chapitre 4.7).

Temps (min)	Cd accumulé par les bactéries témoins	\bar{M}	σ	Cd accumulé par les bactéries modifiées	\bar{M}	σ
1	0,295 0,18 0,62	0,365	0,22	0,34 0,17 0,395	0,30	0,12
4	0,27 0,28 0,61	0,39	0,19	0,3 0,18 0,38	0,29	0,10
7	0,38 0,24 0,48	0,37	0,12	0,29 0,25 0,42	0,32	0,09
10	0,28 0,23 0,475	0,33	0,13	0,36 0,20 0,50	0,35	0,15
13	0,34 0,225 0,45	0,34	0,11	0,26 0,20 0,48	0,31	0,15
16	0,36 0,27 0,52	0,38	0,13	0,27 0,26 0,43	0,32	0,095
19	0,38 0,41 0,52	0,44	0,07	0,31 0,21 0,42	0,31	0,105
30	0,31 0,28 0,48	0,36	0,11	0,23 0,36 0,48	0,36	0,125
45	0,415 0,315 0,46	0,40	0,07	0,27 0,26 0,48	0,34	0,12
60	0,20 0,315 0,46	0,325	0,13	0,28 0,30 0,50	0,36	0,12

Annexe 7 : Cadmium fixé en $\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries en fonction du temps par des bactéries témoins préparées à pH neutre en présence des réactifs de blocage, et par des bactéries modifiées (essais de type 2 - protocole du chapitre 4.7).

Temps (min)	Cd accumulé par les bactéries témoins	\bar{M}	σ	Cd accumulé par les bactéries modifiées	\bar{M}	σ
1	0,27 0,62 0,73	0,54	0,24	0,29 0,31 0,15	0,25	0,09
4	0,325 0,31 0,75	0,46	0,25	0,30 0,47 0,205	0,325	0,13
7	0,31 0,34 0,67	0,44	0,20	0,28 0,30 0,21	0,26	0,05
10	0,315 0,24 0,68	0,41	0,17	0,26 0,30 0,20	0,25	0,05
13	0,32 0,30 0,60	0,41	0,17	0,265 0,22 0,22	0,235	0,03
16	0,31 0,30 0,58	0,40	0,16	0,29 0,30 0,29	0,29	0,006
19	0,33 0,34 0,55	0,41	0,12	0,30 0,29 0,28	0,29	0,01
30	0,32 0,34 0,43	0,36	0,06	0,285 0,29 0,16	0,245	0,07
45	0,325 0,35 0,41	0,36	0,04	0,275 0,30 0,15	0,24	0,08
60	0,32 0,43 0,40	0,38	0,06	0,27 0,175 0,18	0,21	0,05

9 - RESUME

Les bactéries constituent un compartiment de l'environnement extrêmement important d'un point de vue quantitatif, mais surtout d'un point de vue qualitatif puisque ces microorganismes, qui sont le point de départ de la plupart des chaînes alimentaires, sont capables d'accumuler, de dégrader ou de transformer des molécules toxiques. Ces réactions ne sont pas sans conséquences pour l'environnement. En effet, l'exemple de la méthylation des métaux par une population bactérienne responsable dans le cas du mercure d'une toxicité pour l'homme (maladie de Minnamata) et dans le cas du cadmium d'une détoxification par volatilisation, illustre de manière frappante le rôle actif de ces microorganismes. Une étude approfondie des mécanismes mis en jeu par les bactéries dans les réactions d'accumulation et de transformation des molécules toxiques comme les métaux largement rejetés dans l'environnement, devrait permettre dans certains cas de limiter la potentialisation d'un toxique et peut-être de mieux utiliser le "savoir-faire" bactérien.

Dans cette optique, nous avons choisi d'étudier les mécanismes d'accumulation du cadmium, choisi comme modèle, par des bactéries gram négatives et plus particulièrement le rôle des enveloppes bactériennes dans l'accumulation et la toxicité du métal.

Notre travail s'est déroulé en sept phases distinctes :

- 1 - Etude des cinétiques d'accumulation du cadmium par *P. fluorescens*.
- 2 - Spécificité de l'accumulation du métal.
- 3 - Mesure de la toxicité du métal sur la croissance bactérienne.
- 4 - Recherche d'un mécanisme actif de transport du cadmium.

Ces quatre premières phases constituent une approche globale de l'accumulation du cadmium chez *P. fluorescens*. Les trois phases suivantes cherchent à caractériser les structures et les sites accumulateurs de cadmium ainsi que leur relation avec la toxicité de ce métal.

- 5 - Rôle des exopolysaccharides dans l'accumulation et la toxicité du cadmium.
- 6 - Rôle des enveloppes bactériennes dans l'accumulation et la toxicité du cadmium.
- 7 - Rôle des groupements carboxyles dans l'accumulation et la toxicité du cadmium.

Une étude générale de l'accumulation du cadmium par *Pseudomonas fluorescens* a tout d'abord été réalisée sur des suspensions non proliférantes de ce microorganisme.

Des études cinétiques, sur une durée de 5 heures, de la fixation du métal, par les bactéries en fin de phase exponentielle, ont été conduites en présence de 2 mg/l en cadmium ajouté (CdCl_2). Les dosages du métal restant en solution par spectrophotométrie d'absorption atomique ont mis en évidence des cinétiques d'accumulation du métal biphasiques. La première phase étant une phase courte (15 min) d'accumulation rapide ($0,17 \times 10^{-8}$ $\mu\text{g}/\text{min}/\text{bact.}$), et la seconde étant une phase plus longue (plusieurs heures) de faible accumulation ($0,44 \times 10^{-11}$ $\mu\text{g}/\text{min}/\text{bact.}$).

En considérant cette seconde phase comme un état d'équilibre, les valeurs obtenues en fin d'étude cinétique pour l'accumulation du métal par 3 concentrations bactériennes différentes d'une même population ont été interprétées en terme d'isotherme d'adsorption de type Freundlich. Ainsi, l'obtention d'une relation linéaire entre le cadmium fixé par bactérie et la concentration en cadmium restant en solution montre qu'une partie du métal est dans un premier temps adsorbé à la périphérie cellulaire. Ces résultats sont confirmés par les travaux de BROWN et LESTER (1982) sur souche pure et par ceux de RUDD et al. (1984) sur boues activées.

L'adsorption d'ions métalliques par les bactéries a souvent été décrite comme un processus non spécifique et, selon BEVERIDGE (1984), la paroi bactérienne fonctionne comme une résine échangeuse de cations. Afin de mettre en évidence la non spécificité de l'accumulation du cadmium chez *P. fluorescens*, des effets compétiteurs du calcium, du magnésium, du zinc et du manganèse ont été recherchés pour la fixation de cadmium marqué. L'addition du cation divalent à tester a été effectuée simultanément à l'addition du cadmium marqué, ^{109}Cd , à la suspension bactérienne en phase exponentielle dans du bouillon nutritif peptoné.

Un effet inhibiteur sur l'accumulation du cadmium (diminution de 60 %) a été observé en présence de manganèse ajouté à une concentration 94 fois supérieure à la concentration du milieu témoin. Ces essais ont montré la non spécificité de l'accumulation du cadmium puisque cette accumulation est diminuée en présence de manganèse, confirmant ainsi les résultats de TYNECKA et al. (1981) sur *Staphylococcus aureus* et ceux de HART et al. (1979) sur les algues. Par contre, l'absence d'effet du zinc testé à une concentration 9 fois supérieure à celle du milieu initial est plus singulière puisqu'une analogie cadmium-zinc a souvent été décrite (NIEBOER et RICHARDSON, 1980).

L'adsorption non spécifique du métal à la périphérie cellulaire est certes l'un des aspects de la fixation du cadmium par les bactéries, mais elle n'empêche pas le métal d'atteindre des cibles plus internes membranaires et/ou cytoplasmiques et de provoquer une toxicité.

Une toxicité du cadmium sur la croissance de *P. fluorescens* en milieu liquide s'exprime à la fois en termes de diminution du taux de croissance et de la production de biomasse en phase plateau ainsi qu'en termes d'augmentation de la phase de latence. La concentration inhibitrice à 50 % (CI 50) pour ces 3 paramètres de la croissance est équivalente et voisine de 27 μM .

L'effet toxique du cadmium est très probablement dû à la fraction intracellulaire ou tout au moins membranaire du métal. Il existe donc un mécanisme susceptible de permettre le passage membranaire des ions cadmium. Nous avons recherché si ce mécanisme était consommateur d'énergie pour la cellule bactérienne. Plusieurs méthodes ont été utilisées parmi lesquelles l'effet de la température, d'inhibiteurs métaboliques et d'éléments nutritifs.

Dans un premier temps, les cinétiques d'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens* réalisées comparativement à 4°C et 30°C, n'ont pas permis de mettre en évidence un quelconque effet de la température sur l'accumulation du métal. Cependant, la température n'est pas un critère idéal pour caractériser un transport énergie dépendant puisque ce facteur est susceptible de modifier la composition et la fluidité membranaire (PRINGLE et CHAPMAN, 1981) et l'emploi d'inhibiteurs métaboliques semble plus approprié.

Ainsi, deux inhibiteurs métaboliques ont été utilisés : le dinitrophénol (D.N.P.) inhibiteur du gradient transmembranaire de protons et le dicyclohexyl carbodiimide (DCCD) inhibiteur de l'activité ATPasique. En présence de DNP 1 mM, une diminution de 50 à 80 % du ^{109}Cd accumulé a été obtenue. De la même manière, la quantité de ^{109}Cd accumulée par *P. fluorescens* était diminuée de 40 à 70 % en présence de DCCD 100 μM . Toutefois, il est apparu que ces observations résultaient avant tout de la complexation du cadmium par les inhibiteurs métaboliques eux-mêmes, complexation mesurée au moyen d'une électrode spécifique des ions Cd^{2+} libres en solution (dans nos conditions expérimentales, 60 % du métal ajouté était complexé au DNP ou au DCCD). De ce fait, ces résultats ne nous autorisent pas à conclure à un transport actif du cadmium chez *P. fluorescens* et mettent en cause les travaux de TYNECKA et al. (1981) qui rapportent l'existence d'un transport actif du cadmium chez *Staphylococcus aureus* dans des conditions expérimentales ou 90 % du métal ajouté est sous forme com-

plexée aux inhibiteurs métaboliques. En ce qui concerne nos expérimentations, un troisième type d'essai a été réalisé comparant l'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence et en présence de molécules nutritives (apportées par un bouillon peptoné). Ce type d'essai réalisé après ajustement des concentrations en ions Cd^{2+} libres, n'a pas permis de mettre en évidence l'énergie dépendance de l'accumulation du cadmium chez *P. fluorescens*.

En l'absence d'un transport énergie dépendant, les enveloppes bactériennes sont susceptibles de jouer un rôle privilégié en termes à la fois de piégeage du cadmium et de protection des cellules contre la toxicité du métal. Aussi, nous avons tenté d'évaluer ce double rôle pour les exopolysaccharides, la membrane externe et le peptidoglycane des bactéries gram négatives.

L'influence des exopolysaccharides a été évaluée avec *Klebsiella aerogenes* K54 A3 et son mutant K54 A3 (0), souches respectivement fortes et faibles productrices d'exopolysaccharides. La production d'exopolysaccharides étant fondamentalement le seul critère différenciant les deux souches de *Klebsiella*, la comparaison des quantités de métal retenues par ces deux souches illustre, pour des concentrations en cadmium ajouté de 0.1 et 1 mg.l^{-1} , la capacité des exopolysaccharides à fixer le cadmium.

Au-delà de 1 mg.l^{-1} en cadmium ajouté, le mutant faible producteur d'exopolysaccharides accumule plus de cadmium que la souche sauvage. Parallèlement, des essais d'inhibition de la croissance de ces deux souches de *Klebsiella* ont permis de déterminer, sur deux milieux nutritifs différents, la plus faible sensibilité de la souche sauvage (7 fois plus d'exopolysaccharides) au cadmium.

Il a donc été démontré, en accord avec les travaux de BITTON et FREIHOFFER (1978) que les exopolysaccharides sur le modèle *Klebsiella aerogenes* ont un rôle accumulateur du cadmium avec, a contrario, pas d'effets toxiques secondaires.

L'importance des autres enveloppes bactériennes (membrane externe et peptidoglycane) dans ces processus d'accumulation et de toxicité a été déterminée indirectement par des tests comparatifs sur des bactéries entières (notées C), des bactéries sans membrane externe appelées muréinoplastes (M) et des protoplastes (P) préparés selon la méthode de FORSBERG et al. (1970). Nous avons appliqué cette méthode de préparation à des cellules de *P. fluorescens* ainsi qu'à des cellules d'*Alteromonas haloplanktis*.

Dans tous les cas, les résultats présentés sous forme d'isothermes de Freundlich mettent en évidence, par l'obtention de relations linéaires entre le métal fixé par bactérie et le métal restant en solution, l'adsorption du cadmium à la périphérie cellulaire des trois types de bactéries (C, M et P) i.e. au niveau de la membrane externe, du peptidoglycane et de la membrane plasmique. Toutefois, la comparaison de ces isothermes entre eux n'a pas permis de mettre en évidence une différence d'accumulation entre les 3 types de cellules testés même à des concentrations en cadmium ajouté comprises entre $5 \mu\text{g.l}^{-1}$ et 5mg.l^{-1} . A ce propos il est vraisemblable que les étapes d'extraction des enveloppes bactériennes génèrent des sites d'adsorption du métal qui ne l'étaient pas auparavant.

En parallèle, la sensibilité au cadmium (1mg.l^{-1} en métal ajouté) a été évaluée sur les bactéries entières, muréinoplastes et protoplastes, par des mesures d'activités respiratoires spécifiques. Chez les deux souches étudiées *P. fluorescens* et *A. haloplanktis* le plus fort pourcentage d'inhibition de la respiration est observé pour les protoplastes 44,6 % et 57,5 % respectivement. Par contre, il semble que la membrane externe soit l'enveloppe la plus protectrice vis à vis de la toxicité du cadmium, la respiration des bactéries entières étant diminuée de 19,5 % et 4,9 % et celle des muréinoplastes de 43,5 % et 42,3 % pour *P. fluorescens* et *A. haloplanktis* respectivement. Il est toutefois difficile dans ces observations de faire la part entre l'effet des enveloppes éliminées et le "stress" subi par les cellules lors de leur préparation.

Quels sont les sites de fixation du cadmium ?

Selon la littérature, les groupements phosphates présents dans les structures membranaires et les groupements carboxyles du peptidoglycane et des protéines participent à la fixation du métal (FERRIS et BEVERIDGE, 1984 ; DOYLE et al., 1980).

L'influence de ces derniers a été déterminée en bloquant chimiquement les carboxyles à pH acide par un carbodiimide et une amine primaire (éthanolamine) selon la méthode utilisée par DOYLE et al. (1980) sur des parois isolées et purifiées.

Ainsi, la fixation de ^{109}Cd par les bactéries modifiées (sites carboxyliques bloqués) est significativement plus faible (38 % de diminution) que celle des bactéries témoins montrant la participation des groupements carboxyles dans l'accumulation du cadmium chez *P. fluorescens*, cette observation est confirmée sur des bactéries préalablement tuées par un traitement au cyanure. Par contre, les mesures respirométriques effectuées en parallèle ne permettent pas d'observer une différence de sensibilité au cadmium chez les bactéries modifiées ou non.

Ce travail a permis d'expliciter en partie les mécanismes d'accumulation du cadmium chez des bactéries gram négatives *P. fluorescens*, *K. aerogenes* et *A. haloplanktis*. En particulier, il illustre dans le cas des enveloppes bactériennes le hiatus existant entre l'accumulation et la toxicité d'un métal et la nécessité d'apprécier systématiquement ce double aspect.

De plus, la démonstration d'une accumulation du métal par les bactéries, rapide, non spécifique, non énergie dépendante, importante au niveau des exopolysaccharides; qui ont simultanément un rôle de filtre protecteur, peut trouver une application directe dans l'optimisation de réacteurs industriels destinés à l'épuration des eaux chargées en métaux.

SOMMAIRE

1 - INTRODUCTION.....	2
2 - ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	5
2.1. Le cadmium : ressources naturelles.....	6
2.1.1. Autres sources.....	6
2.2. Classification et propriétés.....	8
2.3. Accumulation du cadmium par les bactéries.....	12
2.3.1. L'accumulation des métaux par les microorganismes est influencée par de nombreux facteurs physico- chimiques et biologiques.....	12
2.3.1.1. Les paramètres liés au microorganisme.....	12
2.3.1.2. Les paramètres liés au métal.....	14
2.3.1.3. Les paramètres du milieu.....	15
a) Effets du pH.....	15
b) Effets de la température.....	17
c) Effets de la force ionique et des molécules complexantes....	17
2.3.2. La fixation du cadmium par les bactéries : un pro- cessus rapide et biphasique.....	18
2.3.3. Mécanismes d'accumulation.....	20
2.3.3.1. La structure des enveloppes bactériennes.....	22
a) La membrane cytoplasmique.....	22
b) Le peptidoglycane.....	27
c) L'espace périplasmique.....	29
d) La membrane externe.....	29
e) Les exopolysaccharides.....	32
2.3.3.2. Accumulation par adsorption.....	32
2.3.3.3. Comment les métaux pénètrent-ils dans les cellules ?.....	38
a) Transports actifs.....	41
b) Transports passifs médiatés.....	41
c) Diffusion simple.....	43
2.4. Mécanismes de toxicité et de résistance au cadmium.....	44
2.4.1. Toxicité du cadmium chez les bactéries.....	44

2.4.2. Mécanismes de toxicité du cadmium chez les bactéries	47
a) Effets sur les membranes	48
b) Effets sur les activités enzymatiques	48
c) Effets sur les acides nucléiques.....	48
2.4.3. Mécanismes de résistance au cadmium	49
a) Les exopolymères protègent les bactéries vis à vis des métaux.....	49
b) L'accommodation	50
c) La synthèse de métallothionéines ou pièges à cadmium	52
d) Formation de complexes du cadmium insolubles	53
e) Certaines bactéries résistent aux métaux parce qu'elles accumulent moins	53
f) Certaines bactéries volatilisent le cadmium en méthyle de cadmium.....	57
3 - MATERIEL ET METHODES	58
3.1. Souches bactériennes et milieux de culture.....	59
3.2. Courbes de croissance	59
3.3. Préparation des muréinoplastes et des protoplastes.....	60
3.4. Microscopie électronique.....	61
3.5. Respirométrie.....	61
3.6. Dosage des hexosamines	62
3.7. Dosage des exopolysaccharides	64
3.8. Blocage des groupements carboxyles	67
3.9. Numérations bactériennes	68
3.10. Préparation du matériel.....	68
3.11. Dosages du cadmium	69
3.12. Détermination de l'incertitude sur l'accumulation du ¹⁰⁹ Cadmium ..	69
4 - RESULTATS	74
4.1. Cinétiques d'accumulation du cadmium par <i>P. fluorescens</i>	75
4.2. Spécificité de l'accumulation du ¹⁰⁹ Cd chez <i>P. fluorescens</i>	78
4.3. Effets du cadmium sur la croissance de <i>P. fluorescens</i> en milieu liquide	83
4.4. Recherche d'un transport actif pour le cadmium chez <i>P. fluorescens</i>	85

a) Effet de la température	85
b) Influence des inhibiteurs métaboliques	87
c) Complexation du cadmium par les inhibiteurs métaboliques	93
d) Détermination de l'influence des éléments nutritifs sur l'accumulation du cadmium par les bactéries.....	96
4.5. Rôle des exopolysaccharides dans l'accumulation et la toxicité du cadmium chez <i>K. aerogenes</i> K54 A3 et K54 A3 (0)	98
4.6. Rôle des enveloppes bactériennes dans l'accumulation et la toxicité du cadmium chez <i>P. fluorescens</i> et <i>A. haloplanktis</i>	104
4.7. Rôle des groupements carboxyles dans l'accumulation et la toxicité du cadmium chez <i>P. fluorescens</i>	112
5 - DISCUSSION	124
5.1. L'accumulation du cadmium par les bactéries	125
5.2. Structures bactériennes capables d'accumuler le cadmium	128
5.3. Y-a-t'il un processus actif d'accumulation du cadmium chez les bactéries ?.....	131
5.4. Où s'exprime la toxicité du cadmium ?.....	131
6 - CONCLUSIONS.....	134
7 - BIBLIOGRAPHIE.....	138
8 - ANNEXES	152
9 - RESUME	160

LISTE DES ANNEXES

- Annexe 1 : Résultats bruts et pourcentages de fixation du cadmium par *P. fluorescens* (expérimentation 4.1).
- Annexe 2 : Cadmium fixé en $\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries en fonction du temps à 30°C et à 4°C. Les valeurs pour 3 expérimentations différentes, les moyennes et les écarts-types sur ces valeurs ont été reportés.
- Annexe 3 : Cadmium fixé en $\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries en fonction du temps, en présence et en absence de DNP 1 mM. (Les valeurs pour 3 expérimentations différentes ont été reportées, ainsi que les moyennes et les écarts-types sur ces valeurs).
- Annexe 4 : Cadmium fixé en $\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries en fonction du temps, en présence et en absence de DCCD 100 μM . Les valeurs pour 3 expérimentations différentes ont été reportées ainsi que les moyennes et les écarts-types sur ces valeurs.
- Annexe 5 : Ions Cd^{2+} libres exprimés en mv dans des gammes de concentrations en cadmium préparées dans du bouillon nutritif peptoné, en présence ou en absence de DNP (1 mM) et de DCCD (100 μM).
- Annexe 6 : Cadmium fixé en $\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries en fonction du temps par des bactéries témoins, préparées à pH acide en absence des réactifs de blocage, et par des bactéries modifiées (essais de type 1 - protocole du chapitre 4.7).
- Annexe 7 : Cadmium fixé en $\mu\text{moles} \cdot 10^{-6}$ bactéries en fonction du temps par des bactéries témoins préparées à pH neutre en présence des réactifs de blocage, et par des bactéries modifiées (essais de type 2 - protocole du chapitre 4.7).

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Classification périodique des éléments montrant la disposition des métaux et métalloïdes dans les classes A, B et intermédiaires (d'après NIEBOER et RICHARDSON, 1980).
- Figure 2 : Diagramme d'équilibres tension-pH du système cadmium-eau à 25°C, (d'après POURBAIX, 1963).
- Figure 3 : Influence du pH sur la cinétique de fixation du cadmium à 23°C, par *Pseudomonas sp.* (d'après TITUS et PFISTER, 1982).
- Figure 4 : Accumulation du cadmium (mg/g de poids sec de bactéries) par la souche vivante (▲—▲) la souche tuée à l'éthanol (■—■) et la souche tuée au cyanure de potassium (●—●). Les barres représentent les déviations standard (d'après FLATAU et al., 1984).
- Figure 5 : Les enveloppes des bactéries gram négatives.
- Figure 6 : Structure des phospholipides des membranes bactériennes (d'après ROGERS et al., 1980) (R = chaîne d'acide gras).
- Figure 7 : Histogramme illustrant la distribution des enzymes entre les fractions cytoplasmiques et membranaires de *Micrococcus lysodeikticus* (d'après SALTON, 1971).
- Figure 8 : Diagramme schématique illustrant la structure du peptidoglycane, d'après STRYER (1981).
- Figure 9 : Unité de base du peptidoglycane chez *Staphylococcus aureus* - d'après STRYER (1981).
- Figure 10 : Représentation d'une molécule de lipopolysaccharide. La séquence de sucres est celle de *Salmonella typhimurium*. Abréviations utilisées : Abe, abéquose ; EtN, éthanolamine ; Gal, galactose ; GPc, glucose ; GpcN, glucosamine ; GPc NAc, N-acétyl-glucosamine ; Hep, heptulose ; KDO, 2-céto, 3-déoxyoctonate ; Man, mannose ; Rha, L-rhamnose (d'après STRYER, 1981).

- Figure 11 : Modèle schématique de la structure de la membrane externe d'*Escherichia coli* et de *Salmonella typhimurium*. (D'après VAARA et NIKAIDO, 1984, dans NIKAIDO et VAARA, 1985).
- Figure 12 : Isothermes de Freundlich montrant la relation existant entre les métaux : cadmium, manganèse, nickel, cobalt adsorbés par *K. aerogenes* et le métal en solution. D'après BROWN et LESTER (1982a).
- Figure 13 : Isothermes de Freundlich montrant la relation entre les métaux : cadmium, nickel, cobalt, manganèse complexés par les exopolymères extraits à partir de boues activées et le métal en solution. D'après BROWN et LESTER (1982a).
- Figure 14 : Modèles d'interactions des phosphates avec les métaux : au contraire du cadmium, le magnésium n'est pas capable de pénétrer le rayon hydraté du groupement phosphate et de se substituer à une molécule d'eau pour établir une liaison hydrogène avec l'oxygène (d'après PO-KORNY, 1983).
- Figure 15 : Schématisation du mode de transport de certains sucres et acides aminés chez les bactéries (d'après STRYER, 1981).
- Figure 16 : Diagramme illustrant deux modes de transport passif médiaté - par formation d'un "canal" dans la bicouche lipidique - par une molécule transporteuse (d'après STRYER, 1981).
- Figure 17 : Effet des polysaccharides capsulaires sur la toxicité du cadmium (10 mg/l) chez *Klebsiella aerogenes* K54 A3 (0) (d'après BITTON et FREIHOFER, 1978).
- Figure 18 : Fixation du cadmium par une souche résistante et sensible au cadmium de *Staphylococcus aureus* (d'après CHOPRA, 1971).
- Figure 19 : Schématisation des mécanismes d'accumulation et d'efflux du cadmium chez *Staphylococcus aureus* (d'après TYNECKA et al., 1981).

- Figure 20 : Trois gammes étalon en glucosamine dosées par la méthode de Montreuil et Spik (1963).
- Figure 21 : Trois gammes étalon en glucose dosées par la méthode au phénol sulfurique.
- Figure 22 : Schéma général de la réaction de blocage des groupements carboxyles.
- Figure 23 : Cinétiques d'accumulation du cadmium par *P. fluorescens* pour trois densités bactériennes différentes.
- Figure 24 : Isotherme d'adsorption de Freundlich pour l'accumulation du cadmium par *P. fluorescens*.
- Figure 25 : Accumulation de ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de Ca ($17,8 \mu\text{M}$) ajouté dans le milieu.
- Figure 26 : Accumulation de ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de Mg ($17,8 \mu\text{M}$) ajouté dans le milieu.
- Figure 27 : Accumulation de ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de Zn ($17,8 \mu\text{M}$) ajouté dans le milieu.
- Figure 28 : Accumulation de ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de Mn ($17,8 \mu\text{M}$) ajouté dans le milieu.
- Figure 29 : Effets du cadmium sur la croissance de *P. fluorescens*. La phase de latence chez le témoin sans cadmium était de 1,5 h.
- Figure 30 : Cinétiques d'accumulation de ^{109}Cd à 4°C et à 30°C par *P. fluorescens*. (Les moyennes de 3 expérimentations sont représentées, les demi écarts-types pour ces 3 expérimentations sont figurés).
- Figure 31 : Cinétiques d'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de DNP (1 mM). (La moyenne de 3 expérimentations est représentée, les demi écarts-types correspondants ont été figurés).

- Figure 32 : Cinétiques d'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens* en absence (témoin) et en présence de DCCD (100 μM). (La moyenne de 3 expérimentations et les demi écarts-types correspondants ont été représentés).
- Figure 33 : Dosage des ions Cd^{2+} dans du milieu peptoné en absence (témoin) et en présence de DNP (1 mM) ou de DCCD (100 μM) à l'aide d'un ionomètre équipé d'une électrode spécifique.
- Figure 34 : Influence des éléments nutritifs sur l'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens*. Un seul essai a été réalisé. Les mesures ont été répétées trois fois.
- Figure 35 : Isothermes d'adsorption du cadmium par *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0).
- Figure 36 : Electronographie de *Pseudomonas fluorescens* ; G x 20 000.
- Figure 37 : Electronographie de muréinoplaste en formation montrant le décollement de la membrane externe de *P. fluorescens* ; G x 150 000.
- Figure 38 : Electronographie de muréinoplaste montrant l'arrachage de la membrane externe de *P. fluorescens* ; G x 150 000.
- Figure 39 : Electronographie de protoplaste de *P. fluorescens* (quelques fragments de membrane externe subsistent) ; G x 150 000.
- Figure 40 : Isothermes d'adsorption du cadmium par des bactéries entières, muréinoplastes et protoplastes préparés à partir de *P. fluorescens* et *A. haloplanktis*.
- Figure 41 : Cinétique d'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens* dont les groupements carboxyles ont été bloqués. Les bactéries témoins n'ont pas été exposées aux réactifs de blocage. (La moyenne de 3 expérimentations et les demi écarts-types correspondants ont été représentés). (Essais de type 1).

Figure 42 : Cinétiques d'accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens* dont les groupements carboxyles ont été bloqués. Les bactéries témoins ont été exposées aux réactifs de blocage à pH neutre. (La moyenne de 3 expérimentations et les demi écarts-types correspondants ont été représentés). (Essais de type 2).

Figure 43 : Accumulation du ^{109}Cd par *P. fluorescens* inactivé par du cyanure : comparaison de bactéries dont les groupements carboxyles ont été bloqués (bactéries modifiées : M) et de bactéries non traitées (témoins : T).

Figure 44 : Schéma général regroupant les divers mécanismes d'accumulation du cadmium.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : Principaux rejets de cadmium dans les divers compartiments de la Communauté Européenne, exprimés en tonnes/an. ND : non déterminé. D'après HUTTON (1983).
- Tableau 2 : Sites de fixation des métaux dans les protéines (d'après NIEBOER et RICHARDSON, 1980) basés sur les travaux de BLUNDELL et JOHNSON (1976), BLUNDELL et JENKINS (1977), HODGSON (1977) et MARZILLI (1977).
- Tableau 3 : Facteur de concentration du cadmium par différentes populations bactériennes (rapport : $\frac{\text{Cd fixé } \mu\text{g/g poids sec}}{\text{Cd en solution mg/l}}$).
- Tableau 4 : Concentrations minimales inhibitrices de quelques toxiques minéraux (en mg/l) vis à vis de 18 bactéries (d'après JAKUBCZAK et al., 1981).
- Tableau 5 : Détermination de la précision du dosage des hexosamines par la méthode d'Elson Morgan modifiée par Montreuil et Spik (1963).
- Tableau 6 : Détermination de la précision du dosage des exopolysaccharides par la méthode au phénol sulfurique de Dubois et al. (1956) modifiée par Montreuil et Spik (1963).
- Tableau 7 : Conditions expérimentales du dosage du cadmium par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme (l'absorbance est mesurée à 229 nm).
- Tableau 8 : Résultat du dosage de ^{109}Cd après transformation logarithmique des données brutes en cpm.
- Tableau 9 : Estimation des composantes de variance.
- Tableau 10 : Concentrations en cations divalents utilisées dans les expériences de compétition avec le cadmium.

Tableau 11 : Résultats d'analyse de variance, réalisée à partir des valeurs obtenues pour l'accumulation du cadmium ($\mu\text{moles}/10^6$ bactéries) par *P. fluorescens* à 30°C et à 4°C (valeurs portées en annexe 2).

Tableau 12 : Résultats d'analyse de variance, réalisée à partir des valeurs obtenues pour l'accumulation de cadmium ($\mu\text{moles}/10^6$ bactéries) par *P. fluorescens* en présence et en absence de DNP 1 mM (valeurs portées en annexe 3).

Tableau 13 : Résultats d'analyse de variance, réalisée à partir des valeurs obtenues pour l'accumulation du cadmium ($\mu\text{moles}/10^6$ bactéries) par *P. fluorescens* en présence et en absence de DCCD 100 μM (valeurs portées en annexe 4).

Tableau 14 : Résultats d'analyse de variance, réalisée à partir des valeurs obtenues pour la complexation du cadmium par le DCCD (valeurs portées en annexe 5).

Tableau 15 : Fixation du cadmium par *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0). (Les valeurs sont exprimées en $\mu\text{g} \cdot 10^{-6}$ bactéries). Les écarts-types sur 3 déterminations sont donnés entre parenthèses.

Tableau 16 : Production d'exopolysaccharides en milieu liquide chez *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0).

Tableau 17 : Effets du cadmium sur la phase de latence, le taux de croissance, et la production de biomasse de *K. aerogenes* K54 A3 et K54 A3 (0) en milieu peptoné et en milieu Saccharose- Ca CO_3 .

Tableau 18 : Cadmium accumulé en $\mu\text{g} \cdot 10^{-8}$ bactéries (les écarts-types sur 3 déterminations sont donnés entre parenthèses ; ND : valeur non déterminée ; NR : essai non représenté dans la figure 40).

Tableau 19 : Cadmium accumulé par *P. fluorescens* ($\mu\text{g}/10^8$ bact.) (Les écarts-types sur 3 déterminations sont donnés entre parenthèses ; les valeurs correspondent à l'essai C2, M2, P2 sur la figure 40).

Tableau 20 : Activité respiratoire des muréinoplastes et protoplastes de *P. fluorescens* en présence de cadmium (* mg O₂/l/min x 10⁻⁴, les écarts-types sur 3 déterminations sont donnés entre parenthèses ; ** mg O₂/l/min/10¹¹ bact.).

Tableau 21 : Activité respiratoire des muréinoplastes et protoplastes de *A. haloplanktis* en présence de cadmium (* mg O₂/l/min x 10⁻⁴, les écarts-types sur 3 déterminations sont donnés entre parenthèses ; ** mg O₂/min/10¹¹ bact.).

Tableau 22 : Résultats d'analyse de variance, réalisée à partir des valeurs obtenues pour l'accumulation du cadmium par des bactéries témoins préparées à pH acide en absence des réactifs de blocage (essais de type 1). (Valeurs portées en annexe 6).

Tableau 23 : Résultats d'analyse de variance réalisée à partir des valeurs obtenues pour l'accumulation du cadmium par des bactéries témoins préparées à pH neutre en présence des réactifs de blocage (essais de type 2). (Valeurs portées en annexe 7).

Tableau 24 : Respiration de l'oxygène (mg O₂/min/10¹¹ bact.) par *P. fluorescens* exposés ou non au cadmium : comparaison de bactéries dont les groupements carboxyles ont été bloqués (bactéries modifiées) et de bactéries non modifiées (témoins). (essais de type 1).

Tableau 25 : Respiration de l'oxygène (mg O₂/min/10¹¹ bact.) par *P. fluorescens* exposés ou non au cadmium : comparaison de bactéries dont les groupements carboxyles ont été bloqués (bactéries modifiées) et de bactéries non modifiées (témoins). (essais de type 2).