

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique.

جامعة جيجل
كلية العلوم الطبيعية والحياة
المكتبة
رقم الجرد : 16-A2



Université de Jijel
Faculté des sciences exactes et sciences
de la nature et de la vie
Département de Biologie Moléculaire
et Cellulaire

جامعة جيجل
كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة
والحياة
قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de fin d'Etudes pour l'obtention du Diplôme
des Etudes Supérieures en Biologie
Option : Microbiologie

Intitulé

**Biodégradation du phénol par les
*Pseudomonas***

Membres Jury :

Examinateur : M^{me} BEN HAMADA W

Encadreur : M^{lle} ADJEROUD Nawel

Présenté par :

BOUDENDOUNA Asma

BOUKRIKA Mounira



Année universitaire : 2009/2010

Remerciements

Au terme de notre travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères et les plus profonds, tout d'abord à Dieu le tout puissant pour le courage et la volonté qu'il nous a prodigué, clé de réussite dans nos études.

Nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire plus particulièrement :

A notre encadreur M^{elle} ADJEROUD NAWEL qui nous a proposé ce sujet de recherche pour ses conseils et ses orientations et sa compréhension.

À M^{me} BEN HAMADA pour l'honneur qu'il nous a accordé pour avoir accepté d'examiner et juger ce travail

Enfin nos respects à tous les enseignants de l'institut de biologie_ université de Jijel_

Mounira & Asma

Liste des abréviations

ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
ARNr	:	Acide Ribonucléique ribosomiaux
C	:	Carbone
CH₄	:	Methane
Cl	:	Chlore
CO₂	:	Dioxyde de carbone
g/l	:	Gramme par litre
H	:	Hydrogène
H₂O	:	L'eau
HAP	:	Les hydrocarbures polys cycliques aromatiques
Kj/mol	:	Kilo joule par mole
Mg	:	Magnesium
mg/kg	:	Milligramme par Kilogramme
OGM	:	Organismes génétiquement modifiés
UV	:	Ultra violet

Liste de figures

Figure1: Différents types des hydrocarbures polycycliques aromatiques.....	3
Figure2: L'acide hydroxybénzène (phénol).....	4
Figure3: Spectre UV du phénol	5
Figure4: L'oxydation du phénol.....	6
Figure5: Dégradation aérobie du phénol.....	15
Figure6: Biodégradation du phénol par <i>Pseudomonas</i> sp.CF600.....	18
Figure7: Dégradation aérobie du phénol par <i>Pseudomonas putida</i>	19
Figure8: Etapes de clivage Méta de la dégradation du phénol par <i>Pseudomonas cepacea</i>	21
Figure9: Dégradation du phénol par la voie métabolique réductrice proposée par Evan 1996.....	23
Figure10: Dégradation anaérobie du phénol par la souche <i>Pseudomonas</i> K172 sp (sous des conditions dénitrifiantes.....	24

Liste de tableaux

Tableau 1: Les constantes physiques du phénol	5
Tableau 2: Les paramètres de dégradation des hydrocarbures.....	11
Tableau 3: Différents microorganismes capable de dégrader le phénol.....	12
Tableau 4: Microorganismes dégradants le phénol	15
Tableau 5: Quelques contaminants potentiellement convenables pour la bioremédiation	27

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I: Les hydrocarbures	
I-1- Définition.....	2
I-2- L'origine des hydrocarbures.....	2
I-3- Les hydrocarbures aromatiques.....	3
Chapitre II : Les phénols	
II-1- Définition.....	4
II-2- Structure chimique.....	4
II-3- Propriété physique.....	4
II-3-1- Structure de la molécule du phénol	4
II-3-2- Constants physiques.....	5
II-3-3- Spectroscopie UV visible.....	5
II-3-4- L'oxydation.....	6
II-4- Présence dans l'environnement et différents usages.....	6
II-5- Effets toxiques du phénol	7
II-5-1-Effet sur l'environnement.....	7
II-5-2- Toxicité du phénol.....	8
II-5-2-1- Chez l'homme.....	8
II-5-2-2- Chez l'animal.....	8
Chapitre III: Mécanisme de la biodégradation	
III-1- La biodégradation.....	9
III-2-Les facteurs affectant la biodégradation.....	9
III-2-1- L'effet de température.....	9
III-2-2- L'effet de pH.....	10
III-2-3- L'aération	10
III-3- Les microorganismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures.....	11
III-4- Les Pseudomonas.....	12
III-4-1- Taxonomie.....	13
III-4-2- Habitat et croissance.....	13
III-4-3- Morphologie.....	13
III-4-4- Caractères énergétiques.....	13
III-4-5- Caractères biochimiques.....	14
III-4-6-Production des pigments.....	14

III-4-7- Intérêt écologique.....	14
III-5- Dégradation du phénol par <i>Pseudomonas</i>	14
III-5-1-Les types de dégradation des hydrocarbures.....	14
III-5-2-La dégradation aérobie du phénol.....	15
III-5-2-1- Chez les espèces: <i>pseudomonas putida</i> , <i>P putida F1</i> , <i>P. putida mt-2</i> , <i>P.sp CF600</i> .	16
III-5-2-2-Chez l'espèce <i>Pseudomonas cepacia</i>	20
III-5-3-Dégradation anaérobie du phénol.....	22
Chapitre IV: Bioremédiation et biotechnologie	
IV-1- Définition de bioremédiation.....	25
IV-2- Définition des OGM.....	25
IV-3- Cas réels de biodégradation par les souches OGM.....	25
IV-4- rôle du génie génétique dans la biodégradation du phénol	27
Conclusion	28

INTRODUCTION

Introduction :

Depuis les années 1960 a paru une abondante littérature scientifique sur les biodégradations lorsque les chercheurs, au départ incrédules, se sont aperçus que de nombreux produits organiques jugés toxiques ou rébarbatifs comme le benzène, les phénols, le pétrole brut et autres étaient effectivement dégradés activement par les microorganismes (Pelmont, 2005).

Une grande diversité de microorganismes peut dégrader les polluants organiques dont les hydrocarbures et leurs produits de dégradation, ces derniers deviennent de nouvelles sources de carbone et donneurs d'électrons pour la synthèse cellulaire (Gaujous, 1993).

Les phénols et leurs dérivés homologues ou substitués sont des polluants, et comme certaines autres substances aromatiques, elles peuvent être également sujettes à une dégradation biologique, dans ces conditions spécifiques. A partir de divers milieux, et notamment d'une flore spécifique appartenant principalement à la famille des *Pseudomonacées*.

Les *Pseudomonas* sont des bactéries aérobies strictes avec un métabolisme strictement respiratoire et sont des chimioorganotrophes. Ce genre comprend un très grand nombre d'espèces, la plupart sont des saprophytes (Arris, 2008).

La biodégradation d'un composé organique par des agents biologiques (généralement bactériens) a comme seul rejet des produits simples tels que H_2O , CO_2 , CH_4 , H_2 , $Cl...$, on parle de minéralisation dans ce cas, puisque la biodégradation des substances est totale avec formation uniquement de produits inorganiques, mais encore des métabolites simples tels que les acides organiques.

La toxicité du phénol pose des problèmes sérieux aux spécialistes de l'environnement, nombre d'entre eux se sont penchés sur la question de processus de métabolisation des produits phénoliques (Pelmont, 2005).

Les objectifs sont donc de ressortir l'effet toxique du phénol sur l'environnement et les êtres vivants, de mettre l'accent sur la méthode de l'élimination qui est une élimination biologique par la biodégradation et de montrer la capacité des *Pseudomonas* à utiliser différents mécanismes pour dégrader le phénol, dont l'amélioration se fait par le génie génétique et la biotechnologie.

CHAPITRE : I

I- les hydrocarbures:

I-1 - Définition:

Les hydrocarbures sont des composés organiques contenant seulement du carbone et de l'hydrogène et hautement insoluble dans l'eau, les hydrocarbures de faible poids moléculaire sont gazeux, tandis que ceux d'un poids moléculaire plus élevé sont liquides, ou solides, à la température ambiante (Michael et John, 2007). Le carbone et l'hydrogène peuvent former des molécules saturées, linéaires ou cycliques, et parmi les molécules cycliques, certaines grâce à un type particulier d'insaturation ont des propriétés particulières qui les font classer à part. (Manahan, 2007).

On distingue donc trois types d'hydrocarbures:

1. Les hydrocarbures saturés à chaîne ouverte ou cyclique.
2. Les hydrocarbures insaturés à double ou triple liaison et qui peuvent aussi être cycliques ou acycliques.
3. Les hydrocarbures aromatiques monocycliques ou polycycliques (Lefebvre, 1986).

Les hydrocarbures regroupent différents produits pétroliers (pétrole brut, pétrole raffiné, kérosène, essences, fuel, lubrifiants, huiles à moteurs (Jeannot *et al*, 2001).

Les hydrocarbures aromatiques constituent généralement 10% à 30% des hydrocarbures totaux du pétrole (Soltani, 2004).

Les hydrocarbures déversés dans l'environnement subissent une série de transformations aboutissant à plus ou moins long terme à leur disparition totale ou partielle. Les transformations microbiennes par les microorganismes sont à elles seules à l'origine de la disparition de la majeure partie des hydrocarbures (Arris, 2008), car ces microorganismes, principalement les bactéries utilisent les hydrocarbures comme substrats de croissance (Scriban, 1999). On ne connaît pas de microorganismes utilisateurs de n'importe quel hydrocarbure dans n'importe quel milieu. Chaque espèce a des exigences spécifiques: longueur de chaîne, ramification, insaturation (Pelmont, 2005).

I-2- L'origine des hydrocarbures:

Les hydrocarbures dans l'environnement peuvent avoir trois origines principales:

- Les rejets industriels et urbains, sources d'hydrocarbures pétrolières ou pyrolytiques
- Les végétaux aquatiques (phytoplancton, marophytes) et organismes hétérotrophiques (zooplanctons, bactérioplancton)
- Les végétaux supérieurs terrestres via la matière organique détritique des sols, résultat du

drainage des bassins versants (Hnatiuc, 2002).

I-3- Les hydrocarbures aromatiques :

Les composés aromatiques étaient déjà présents dans la biosphère depuis les temps les plus anciens puis qu'ils sont présents dans le pétrole et dans la houille, ils ont été détectés dans de nombreux sédiments géologiques antérieurs au combrien (Pelmont, 2005).

Les hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques, comme le phénol ou pyridine, sont des produits issus de l'industrie chimique utilisés soit comme substrats soit comme intermédiaires dans les synthèses chimiques, les hydrocarbures poly-aromatiques sont également formés lors de la combustion d'énergies fossiles et ce sont des constituants naturels de ces produits à l'état brut, le benzène, le toluène, les xylènes ainsi que d'autres composés aromatiques de bas poids moléculaires sont des solvants industriels utilisés notamment pour la fabrication des peintures .

En générale les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcènes et ne représentent que 10% à 30% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (Soltani, 2004), ces hydrocarbures sont caractérisés par un rapport C/H plus élevé que celui que l'on observe dans les autres hydrocarbures, ils possèdent toutes les caractéristiques de contenue dans leur molécule un cycle hexagonal à six atome de carbone chacun lié à un seul autre carbone, le plus simple des hydrocarbures aromatiques est le benzène, sa formule brut C_6-H_6 (Lefebore, 1986).

On peut classer les hydrocarbures aromatiques en deux classes: les hydrocarbures monocycliques aromatiques et les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) (figure1). Ces derniers diffèrent essentiellement entre eux par le nombre de noyaux benzéniques ainsi que par leur arrangement spatial (Laurent *et al*, 2005).

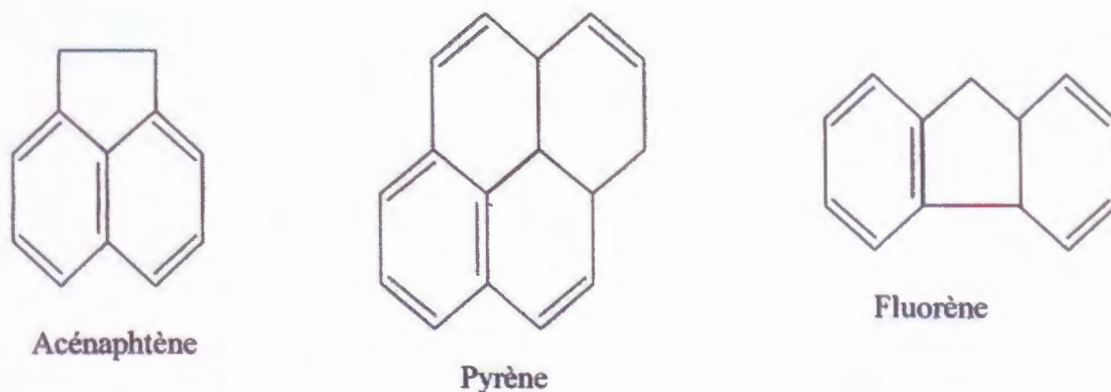


Figure 01: Différents types d'hydrocarbures polycycliques aromatiques (Laurent *et al*, 2005).

CHAPITRE : II

II- Les phénols:

II- 1- Définition:

Plusieurs milliers des composés phénoliques ont été caractérisés jusqu'à aujourd'hui bien qu'ils étaient très diversifiés, ils ont en commun, la présence d'un ou plusieurs fonctions hydroxyles (Jean *et al*, 2005).

Les phénols sont des composés aromatiques hydroxylés comprenant le phénol et ces substitués tels les chlorophénols (mono, di, tri, tétra, penta...), les nitrophénols, les crésols et les diméthylphénols ou xylols (Jeannot *et al*, 2001).

II-2- Structure chimique:

Le phénol ou hydroxybenzène est l'un des composés phénoliques les plus simples, qui sont des dérivés de l'acide benzéniques et ont une formule de base de type C_6-C_1 (figure2), le phénol est un produit de synthèse pur; il se présente à la température cristallisée (Pascal *et al*, 2006)

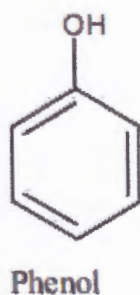


Figure 2: L'acide hydroxybenzène (phénol) (Pascal *et al*, 2006).

A l'heure actuelle est préparé par oxydation de l'isopropylbenzène ou Cunene par l'oxygène de l'air (procédé de Hock). Le sous – produit de la réaction est la propanone (acétone) qui est également un produit important utilisé notamment comme solvant. Ce procédé particulièrement avantageux illustre une des caractéristiques de la chimie industrielle moderne (Arris, 2008).

II- 3- Propriétés physiques:

II-3-1- Structure de la molécule du phénol:

L'énergie de la résonance évaluée grâce à la réaction d'hydrogène vaut 167 KJ/mol. Elle est donc plus élevée que pour le benzène (150KJ/mol). On interprète ce résultat par la participation d'un doublet non liant de l'atome d'oxygène à la résonance. Les mesures aux rayons X montrent

que la molécule est plane se qui autorise une délocalisation maximale. Cette participation à la délocalisation électronique se traduit aussi par le raccourcissement de la longueur de la liaison C-O et par l'augmentation de l'énergie de cette liaison par rapport à celle d'un alcool comme le cyclohexane (Hart et Conia, 2002).

II-3-2- Constantes physiques:

Les températures de changement d'état des phénols sont plus élevées que celle des hydrocarbures de même masse molaire. On l'interprète par le fait que ces composés sont associés par liaison hydrogène intermoléculaire. Le phénol lui-même est solide à la température ordinaire (Arris, 2008).

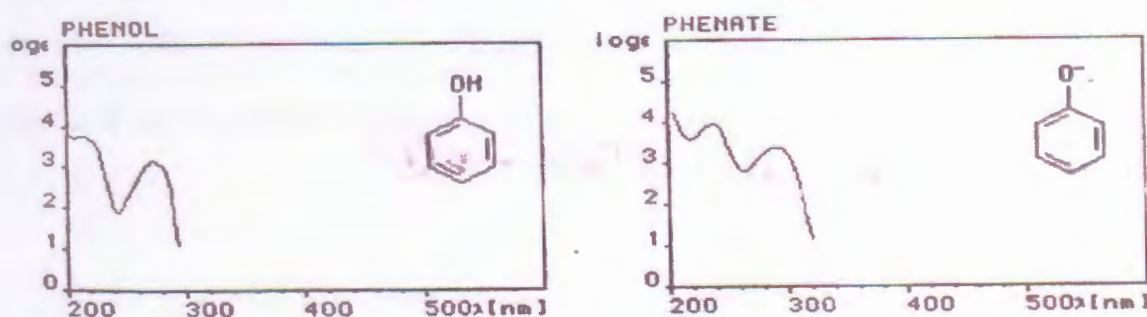
Tableau 1: Les constantes physiques du phénol (La miscibilité avec l'eau dépend de la température. Elle est totale si $T > 63^\circ$) (Arris, 2008).

TF ($^\circ\text{C}$)	TE ($^\circ\text{C}$)	s/H ₂ O (g/L) (20 $^\circ\text{C}$)
41	181	93

TF: température de fusion, TE: température d'ébullition, s : solubilité.

II-3-3- Spectroscopie UV visible:

Le phénol absorbe dans l'ultra violet.(Figure3) Ses solutions sont incolores. La déprotonation et le passage à l'ion phénolate provoquent un effet bathochrome (déplacement de la bande d'absorption vers les grandes longueurs d'ordre) et hyperchrome (renforcement de l'intensité de l'absorption) (William Johnson, 2003).



a : avant absorption

b : après absorption

Figure3 : Spectre UV du phénol (William Johnson, 2003).

II-3-4- L'oxydation:

L'oxydation du phénol peut avoir lieu sous l'action de très nombreux oxydants: Fe, O, etc. Symbolisés par (O). Elle conduit à la formation de radicaux phénoxyes relativement stables, qui évoluent pour donner par couplage des produits complexes souvent colorés, dont la structure est mal définie (figure 4). C'est la raison pour la quelle le récipient contenant du phénol doivent être soigneusement conservés) à l'abri de l'air (Hart et Conia, 2002).

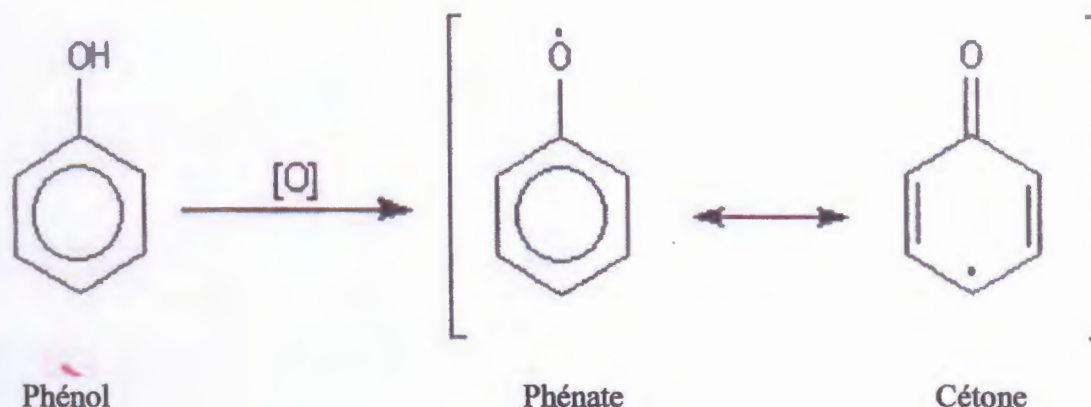


Figure 4: L'oxydation du phénol (Hart et Conia, 2002).

II-4- Présence dans l'environnement et différents usages :

Le phénol est à la fois un composé chimique fabriqué et une substance naturelle. Quand il est pur, c'est un solide blanc à incolore. Vous pouvez goûter et sentir le phénol a des concentrations plus faibles que celle qui sont associées avec des effets toxiques et dangereux. Le phénol s'évapore plus lentement que l'eau, et une quantité modérée peut former une solution avec l'eau (Anselmo et Novais, 1984).

Le phénol et leur dérivés sont largement utilisés dans diverses branches industrielles, dans la production résines phénoliques dans la fabrication du nylon et autre fibre synthétique, la fabrication du papier et de pulpe, et il est aussi utilisé dans les slimicides (produits chimiques qui tuent les bactéries et moisissures dans les vases), comme désinfectant, et dans la préparation médicinale telle que les lotions de bains de bouche et de maux de gorge (Site I).

Egalement utilisé dans la chimie pétrolière et dans l'industrie de raffinage d'houille. Les phénols proviennent également de la dégradation des insecticides, organophosphorés, et des herbicides chlorophenoxyacides ainsi que de la transformation des composés organiques naturels comme les lignines, les tannins et les acides humiques (Jeannot et al, 2001).

Le phénol lui même a des vertus antiseptiques et inhibe fortement le développement de la microflore à une concentration supérieure à 0,05 g/l et tue la bactérie à une concentration d'environ 2 g/l si elle n'est pas adaptée au phénol.

Les composés phénoliques sont particulièrement nombreux dans le règne végétale et appartiennent à la chimie de la lignine, des tannins et des flavonoïdes, aussi retrouvés aussi dans les lichens et les champignons, ils font souvent office d'agents protecteurs, en aident les végétaux à se défendre contre les bactéries et les champignons.

depuis des temps immémoriaux, les organismes aérobies se sont habitués à synthétiser, modifier et dégrader les composés phénoliques naturels à l'aide de stratégies performants, il est aussi fort heureusement biodégradable à l'abri de l'oxygène moléculaire (Pelmont, 2005).

II-5- Effets toxiques du phénol:

II-5-1- Effet sur l'environnement:

Le phénol est considéré comme un polluant prioritaire. Les phénols synthétiques étant plus toxiques que ceux existant à l'état naturel, la réduction des émissions s'impose. Les personnes manipulant du phénol doivent notamment éviter le contact cutané et l'inhalation de ces produits. Il pénètre rapidement dans l'organisme par toutes les voies. Les intoxications industrielles résultent de contact cutanés et d'exposition aux vapeurs, qui pénètrent dans l'organisme non seulement par voie pulmonaire mais également à travers la peau intacte (Arris, 2008.Agency, 2008).

Dans le milieu aquatique:

Le phénol peut rester dans l'eau une semaine ou plus. Le phénol est plus lourd que l'eau et tend à se déposer. Il se dissout lentement et, même dilué, continue de former des solutions toxiques. En raison de sa forte toxicité dans l'eau, le phénol figure dans la catégorie risque de pollution de l'eau (Arris, 2008).

Dans l'atmosphère:

Lorsque de faibles et uniques doses sont libérées. Le phénol est rapidement éliminé de l'atmosphère (généralement la moitié est éliminé en moins d'une journée). Les vapeurs de phénol sont plus lourdes que l'air et forment des mélanges explosifs sous l'effet de la chaleur. Le phénol s'oxyde à l'air, et ce processus d'oxydation est accéléré par la lumière ou par des impuretés à effet catalytique (Agency, 2008).

Dans les sols:

Le phénol peut rester dans le sol seulement 2 à 5 jours. Dans le sol il subit une dégradation microbienne aérobie ou anaérobie, de sorte que l'effet d'accumulation reste limité. L'accumulation est fonction de la présence de minéraux argileux (forte affinité avec l'oxyde d'aluminium) (Arris, 2008. Agency, 2008).

II-5-2- Toxicité du phénol:

II-5-2-1-Chez l'homme:

La plupart du phénol qui peut être inhalé ou ingéré entre dans la circulation sanguine, une moindre dose peut circuler dans le sang s'il y'a un contact avec la peau. Une exposition de courte durée au phénol dans l'air peut causer une irritation respiratoire, des maux de tête et des brûlures aux yeux. Les gens qui ont été exposés à de fortes doses de phénol sur la peau ont des brûlures dermiques, une altération du foie, un changement de couleurs des urines, des battements de cœur irréguliers et certains meurent. L'ingestion d'une concentration élevée de phénol peut résulter en brûlures internes et aussi la mort. Une dose orale de 140 mg/kg est considérée comme la dose létale minimale (Agency, 2008; Bruce, 1990).

II-5-2-2 - Chez l'animal:

L'inhalation de l'air avec des niveaux élevés de phénol peut causer des irritations des pommons, les expositions induisent des tremblements du muscle, une perte de coordination, cette exposition à haute concentration à partir de l'atmosphère pour plusieurs semaines provoque des paralysies sévères altérations au cœur, foie, reins et pommons, et dans certain cas la mort (Agency, 2008; Bruce, 1990).

CHAPITRE : III



III- Mécanisme de la biodégradation

III-1- La biodégradation:

On peut donner au terme biodégradation le sens général de tout processus à médiation biologique qui entraîne la conversion d'une substance organique en dérivés ultimes organiques et inorganiques chimiquement distincts de la substance initiale.

La biodégradation se fait dans les milieux aérobies et anaérobies grâce à des microorganismes environ au nombre de 200, principalement des bactéries et des champignons (Pelmont, 2005), ces microorganismes possèdent la capacité de dégrader, de transporter, et d'accumuler une gamme énorme de composés y compris les composés hydrocarbonés par exemple les hydrocarbures poly aromatiques, substances pharmaceutiques, radionucléides et métaux lourds. Beaucoup de ces substances sont considérées (pour les êtres humains) comme étant des polluants (Jeannot *et al*, 2001).

La biodégradation des composés organiques est accomplie par des enzymes produites par les microorganismes, les substances dégradées doivent être transportées dans les cellules (Bayard, 1993), et passent à travers l'enveloppe cellulaire jusqu'au cytoplasme.

Trois modes de transport des hydrocarbures sont généralement considérés:

- 1- L'interaction des cellules avec les hydrocarbures dissous dans la phase aqueuse par les facteurs de solubilisations extracellulaires.
- 2- L'interaction des cellules avec les hydrocarbures émulsifiés par les agents actifs de surface appelés biosurfactants.
- 3- Le contact direct des cellules avec les hydrocarbures (Soltani, 2004).

La biodégradation est fonction de la nature et des propriétés de la molécule considérée, propriété dont dépendent les interactions molécules/environnement (biodisponibilité) et les interactions molécules/microorganismes (biodégradabilité) (Scriban, 1989).

III-2- Les facteurs affectant la biodégradation

L'efficacité d'une technique de biodégradation mise en œuvre pour décontaminer un site précis, va dépendre de nombreux facteurs, qui devront être pris en compte lors de la conception de l'opération (Lecomte, 1998). Parmi ces facteurs on cite le type de microorganismes et les caractères physiques et chimiques des milieux (la température, le pH, la salinité, les éléments nutritifs et l'oxygène disponible (Atlas, 1981).

III-2-1- L'effet de température

La température peut avoir une influence néfaste sur l'activité microbienne qui va ralentir. Si la température chute significativement dans les opérations de biodécontamination, le processus sera pénalisé en hiver, et même complètement stoppé si la température descend au dessous de 0°C (Lecomte, 1998)

La biodégradation du phénol a été significativement inhibée à 30c°, lorsque la température augmente, à partir de 30 - 34°C aucune dégradation du phénol a été observé en raison de la détérioration des cellules (Khazi *et al*, 2010).

Pour la biodégradation du phénol par *Pseudomonas pictorum* la température optimale est 30°C (Gurusamy *et al*, 2007).

III-2-2- L'effet du pH:

L'environnement interne de toutes les cellules vivantes est environ neutre, la plupart des organismes ne peuvent pas tolérer un pH inférieur à 4 ou supérieure à 9, a pH inférieur à 4 ou supérieur à 9 ; des valeur de pH acide ou basique peuvent pénétrer dans les cellules plus facilement, par ce qu'ils ont tendance a exister sous une forme non dissociée dans ces conditions et de pénétrer dans les cellules. Le pH optimum pour la dégradation du phénol est égal à 7,0 pour *Pseudomonas putida* NICM 2171(Khazi *et al*, 2010).

III-2-3- L'aération :

Les microorganismes utilisent l'oxygène avant tout comme l'accepteur terminal d'électrons, le niveau d'oxygène dissous est le facteur clé qui détermine le taux de dégradation de la matière organique qui change dans les conditions de croissance aérobie (Khazi *et al*, 2010). L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures aromatiques par les bactéries et les champignons, inclue l'oxydation de ces substrats par l'intérimaire d'oxydroxylases et d'oxygénases, pour les quelles l'oxygène moléculaire est indispensable. Les conditions anaérobies sont par la suite nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne.

Les hydrocarbures dans l'environnement théoriquement nécessitent 3,5 g d'oxygène pour l'oxydation complète d'1g de pétrole, Zobell a conclu que la quantité d'oxygène dissoute dans 320 ml d'eau de mer est nécessaire pour l'oxydation de 11g de pétrole brut (Soltani, 2004)



Tableau 2: Les paramètres de dégradation des hydrocarbures (Agarry *et al*, 2008).

Paramètres	Condition nécessaire pour l'activité microbienne	Valeur optimale de dégradation d'hydrocarbures
Humidité	25-28 % de la capacité de rétention en eau de la matrice	30-90 %
pH	5,5-8,8	6,5-8
Contenu en O ₂	Aérobie, espace pore minimum de 10 %	10-40 %
Température	15-45°C	20-30°C

III -3- Les microorganismes impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures :

Les microorganismes impliqués dans la biodégradation sont appelés hydrocarbonoclastes cette propriété a été mise en évidence dès 1946 par Zobell, Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter. Ces derniers sont capables d'utiliser les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie, elles sont ubiquistes, on peut les retrouver dans l'eau, le sol, et même dans les écosystèmes extrême comme les désertes les sources chaudes. Beaucoup de bactéries sont capables de dégrader les hydrocarbures, parmi les quelles les *Pseudomonas*, les Mycobactéries, les Actinomycètes et les Cyanobactéries. Les levures et les champignons filamenteux sont aussi capables de se développer à partir de ces produits, Les espèces efficaces appartiennent aux groupes suivants: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Condida*, *Rhodotorula*, *Tricodarma*, *Mortiella*. Quelques espèces d'origine marine sont privilégiées dans le cas de pollution marine: *Corollos-pora*, *Dendryphiella*, *Luborthia*, *Varicosporino*. (Soltani, 2004 ; Perry *et al*, 2004)

On ne connaît pas de microorganismes utilisateurs de n'importe quel hydrocarbures dans n'importe quel milieu, chaque espèce a des exigences spécifiques; longueur de chaîne, ramification, insaturation (Fattal, 2004).

Le phénol, un hydrocarbure aromatique est dégradé par divers microorganismes, qui l'utilisent le phénol comme seule source de carbone pour la croissance, parmi les divers microorganismes *Pseudomonas putida* est l'organisme le plus populaire de la dégradation du phénol (Khazi *et al*, 2010), le tableau (3) résume différents microorganismes capables de dégrader le phénol.

Tableau 3: Différents microorganismes capable de dégrader le phénol (Martin *et al*, 1998).

Source	Genres	Espèces	
Bactéries	<i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Alcaligenes xyloxydans</i> y 234	
	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter sp</i> <i>Arthrobacter citrus</i> <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> A6	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Pseudomonas pictorum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4996 <i>Pseudomonas</i> CC 7CC AB 19095	
	<i>Cyanobacterium</i>	<i>Cyanobacterium synechococcus</i>	
	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus brevis</i>	
	Champignons	<i>Conidia</i>	<i>Conidia tropicalis</i> NICM 3556
		<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium sp</i>
		<i>Graphium</i>	<i>Graphium sp</i> FIB4
		<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus awwamori</i> NRRL 3112
	Levures	<i>Phanerochaete</i>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<i>Rhodococcus</i>		<i>Rhodococcus erythropolis</i> UPV-1	
<i>Rhodotorula</i>		<i>Rhodotorula ceatinivora</i>	
<i>Trichosporom</i>		<i>Trichosporom cutaneul</i> R57	

III-4- Les *Pseudomonas*:

La famille des *Pseudomonadaceae* correspond à des bacilles chimioorganotrophes, aérobies, droits ou légèrement incurvés, à flagelles polaires dont les genres principaux sont: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Zygomonas*, *Xanthomonas*.

Le genre *Pseudomonas* est le genre type de la famille *Pseudomonadaceae*, ce genre a été découvert en 1894 par Migula (Michael et John, 2007; Maryline, 2007).

III-4-1- Taxonomie:

Selon la classification de Bergey's; le genre *Pseudomonas* fait partie de l'embranchement des Gracilicutes qui regroupe des bactéries en forme bâtonnets au cocci aérobies ou microaérophiles à Gram négatif. Le genre fait partie de la famille de *Pseudomonadaceae* et renferme de nombreuses espèces.

La classification phylogénique classe le genre *Pseudomonas* dans le domaine Eubacteria des Gracilicutes à Gram négatif, dans la classe des *Proteobacteria*, sous classe σ (gamma), ordre des *Pseudomonales*, famille de *Pseudomonadaceae* et faisant partie du genre *Pseudomonas* avec de nombreuses espèces (Delawas et Trébaol, 2003).

III- 4-2- Habitat et croissance:

Les *Pseudomonas* vivent en saprophyte dans le sol, l'eau et les milieux humides comme les eaux douces, les eaux thermales, peu dans les eaux stagnantes et dans les habitations dans les robinetteries (robinets, siphons d'évier.....) ou les réservoirs d'eaux de pluies. Le genre est très souvent retrouvé dans les hôpitaux et du fait de sa résistance aux antibiotiques est souvent incriminé dans les infections nosocomiales, il est capable de synthétiser une entérotoxine et des enzymes pathogènes comme la phospholipase ou la collagénase.

Chez l'homme *Pseudomonas aeruginosa* se trouve dans la flore de la muqueuse nasale et comme flore de contamination sur la peau, elle peut également se trouver dans la flore intestinale, chez les personnes immunodéprimées elles ont souvent nosocomiales et parfois graves (septicémie, infection des brûlures.....) (Carip, 2008).

Le genre *Pseudomonas* a des besoins nutritionnels très limités, se développe à pH neutre, à des températures mésophiles (Michael et John, 2007).

III-4-3- Morphologie:

Les *Pseudomonas* ont la forme de bâtonnets rigides, droits, avec des extrémités arrondies, non capsulés, non sporulés, elles sont très mobiles et se déplacent en ligne droite, avec un léger frétillement, à condition que la tension partielle d'oxygène du milieu soit suffisante (Jeannot et al, 2001 ; Léon et Michel, 1982).

III-4-4- Caractères énergétiques:

Les *Pseudomonas* ont la capacité d'utiliser une très grande variété de composés organiques comme source de carbone et d'énergie, toutes les *Pseudomonas* sont aérobies strictes, a métabolisme respiratoire, jamais fermentaire, bien qu'elles puissent produire des petites quantités

d'acides à partir de glucose en condition aérobie, elles peuvent utiliser les nitrates comme accepteurs d'électrons et l'arginine comme source d'énergie en conditions aérobies (Jeannot et al, 2001 ; Léon et Michel, 1982).

III-4-5- Caractères biochimiques :

La plupart des *Pseudomonas* sont capables de dégrader complètement de nombreux composés cycliques aromatiques et d'acidifier le glucose en aérobiose (León et Michel, 1982).

III-4-6- La production de pigments:

La production de pigments hydrosolubles diffusant dans les milieux de cultures est l'une des caractéristiques les plus spectaculaire des *Pseudomonas*.

Deux types de pigments hydrosolubles peuvent être produits : des pigments fluorescents et des pigments phénaziniques non fluorescents. Les pigments jaune-vert fluorescents, globalement désignés sous le nom de pyoverdines, sont solubles dans l'eau et non dans le chloroforme. Diverses bactéries peuvent synthétiser des pigments phénaziniques, et l'on connaît une trantaine de variétés de ses pigments. Chez les *Pseudomonas* les producteurs de phénazines appartiennent essentiellement aux espèces *P. aeruginosa* et *P. cepacia*, et à quelques biotypes de *P. fluorescens*. Dans la cellule, la voie de biosynthèse des phénazines est branchée sur la voie de synthèse normale des aminoacides cycliques (León et Michel, 1982).

III-4-7- Intérêt écologique :

Les *Pseudomonas* sont des microorganismes écologiquement importants dans les sols et l'eau et sont probablement responsables de la dégradation de nombreux composés solubles issus de la décomposition des végétaux et des animaux dans les habitats oxyques, ils sont également capables de dégrader de nombreux composés xénobiotiques (non naturels) tels que des pesticides et d'autre produits chimiques toxiques, et sont donc des agents importants de bioremediation de l'environnement. (Michael et John, 2007).

III-5- Dégradation du phénol par les *Pseudomonas*:

III-5-1- Les types de dégradation des hydrocarbures:

La dégradation des hydrocarbures par les microorganismes dans des conditions aérobies est bien connue depuis plus d'un siècle, la présence d'oxygène moléculaire est indisponible pour l'activation enzymatique initiale des hydrocarbures (Gibson, 1984), les techniques aérobies sont relativement simples comparées aux méthode de cultures anaérobies, de plus les procédés aérobies ont été considéré les plus efficaces et faciles d'application (Labrecque, 2003).

Certains hydrocarbures peuvent être dégradés dans des conditions d'anaérobies lorsque l'oxygène est absent, ou ne se trouve qu'en faible quantité, le nitrate, le fer le sulfate et le carbone peuvent, dans l'ordre, servir d'accepteurs d'électrons terminaux. Plusieurs hydrocarbures tels que les alcanes, les alcènes et les hydrocarbures cycliques aromatiques (benzène, toluène, éthyle et propyl) sont dégradés dans ces conditions (Haryama *et al*, 1999).

Le phénol est toxique pour l'homme et les mammifères, mais également, facilement dégradé par les bactéries et les champignons, les bactéries peuvent minéraliser le phénol dans les deux cas aérobie et anaérobie.

La dégradation anaérobie peut se dérouler sous des conditions de la méthanogénèse, la dénitrification, la réduction ionique et la réduction du sulfate, après la formation du catéchol, la voie aérobie de dégradation du phénol par les champignons et les bactéries est similaire à la voie de la dégradation du benzène. (Martin *et al*, 1998)

En raison de la présence répandue du phénol dans l'environnement de nombreux microorganismes utilisent le phénol comme seule source de carbone et d'énergie (Khazi *et al*, 2010). Le tableau 4 montre quelques genres et espèces bactériennes capables de dégrader le phénol dans différentes conditions d'aérobie et d'anaérobie.

Tableau 04: Microorganismes dégradants le phénol (Martin *et al*, 1998)

Microorganismes	Condition
<i>Acinetobacter johinso</i>	Aérobie
<i>Alcaligenes sp</i>	Aérobie
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Aérobie
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Aérobie
<i>Clostridium hydroxybenzoicum</i>	Anaérobie
Culture mixte	Aérobie
Sulfate- réduction mixte	Anaérobie
<i>Pseudomonas</i>	Aérobie

III-5-2 La dégradation aérobie du phénol:

La dégradation aérobie du phénol a été étudiée au début du 19^{ème} siècle (Khazi *et al*, 2010), la première étape est l'oxydation en catéchol comme intermédiaire suivie d'un clivage du cycle à chaque position ortho (Agarry *et al*, 2008) (rupture de la liaison entre les deux groupements

hydroxyle) ou méta (rupture d'une liaison entre un carbone portant un groupement hydroxyle et le carbone immédiatement voisin ne portant pas de groupement hydroxyle) selon la souche (Soltani, 2004). De nombreuses bactéries, champignons et levures sont capables d'effectuer le métabolisme de dégradation du phénol ou il est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie notamment *Pseudomonas putida*, bactérie qui a été connue pour sa capacité à se dégrader le phénol (Muftah *et al*, 2001).

Les microorganismes qui utilisent le phénol par la voie aérobie sont : *Acinetobacter*, *Pseudomonas sp*, *Candida tropicalis* et la plus part des eucaryotes (Khazi *et al*, 2010).

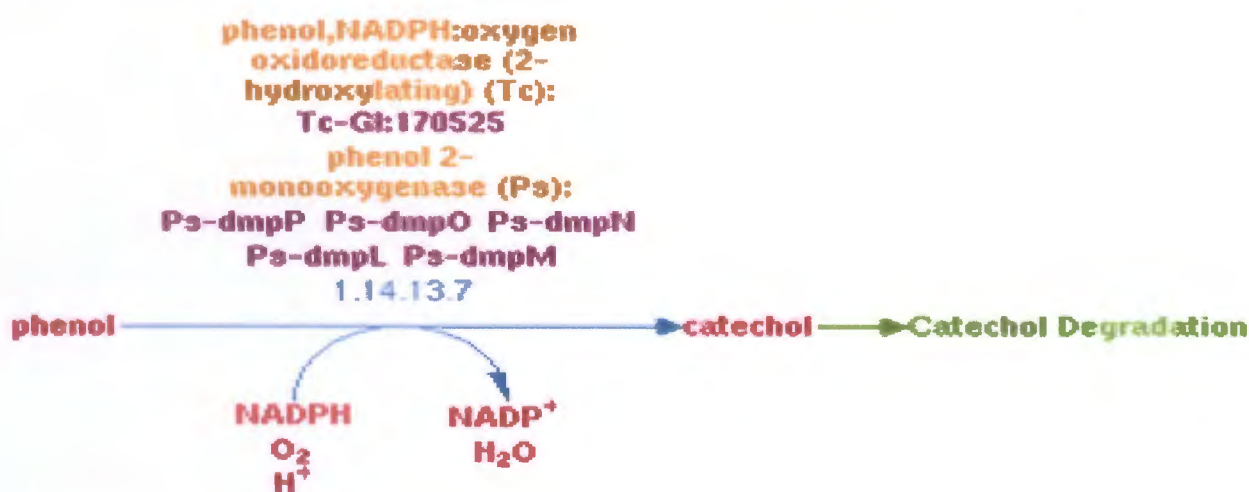


Figure 5: Dégradation aérobie du phénol (Kukor *et al*, 2001)

III-5-2-1- Chez les espèces : *Pseudomonas putida*, *P.putida* F1, *P.putida* mt-2, *P. sp* CF600:

De nombreux types des bactéries aérobies notamment *Pseudomonas putida* sont capables de consommer des composés aromatiques comme seule source de carbone et d'énergie, *pseudomonas putida* est sous forme de tige, Gram négatif, c'est une bactérie qui a été connue pour sa capacité à dégrader des solvants organiques, en particulier elle a une efficacité élevée dans l'élimination du phénol (Muftah *et al*, 2001). Les premières étapes de dégradation du phénol est la formation de catéchol, ce dernier est clivé par la voie de clivage méta les résultats de dégradation sont confirmés dans la figure : 7 (Masanosi *et al*, 1994).

La dégradation bactérienne du phénol dans des conditions d'aérobie commence par la formation du catéchol, ce dernier peut être encore dégradé par la voie de clivage méta ou ortho l'enzyme qui effectue cette réaction est: le phénol hydroxylase (Martin *et al*, 1998).

La voie de méta clivage du catéchol est l'une des principales voies de la dégradation des composés aromatiques, son importance a été bien démontrée chez de nombreuses espèces de

Pseudomonas (Haryam *et al*, 1990), le catéchol lui même est un intermédiaire dans la dégradation de beaucoup différents composés aromatiques, non seulement pour le phénol, mais aussi pour le toluate, le benzoate, le naphtalène et le salicylate.

Dans cette voie, le noyau aromatique du catéchol est clivé par l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase adjacente aux deux hydroxyles catéchols, le produit de ce clivage est le 2-hydroxymuconate-6-semialdéhyde qui peut être métabolisé en deux voies, dans la variante décrite dans cette voie, il est hydrolysé par la semialdéhyde-2hydroxymuconic hydrolase, générant l'intermédiaire important 2-oxopenténoate en une seule étape (Diaz, 1995).

Le 2-oxopenténoate est métabolisé en pyruvate et en acétaldéhyde (et éventuellement, l'acetyl-CoA) par l'action successive des enzymes hydratase-2-oxopenténoate, aldolase 4-hydroxy-2-oxovalérate et acétaldéhyde déshydrogénase (Acylation), les deux dernières enzymes forment un complexe bifonctionnel aldolase-déshydrogénase, ce qui facilite le transfert de l'acétaldéhyde toxique (Powlowski *et al*, 1993).

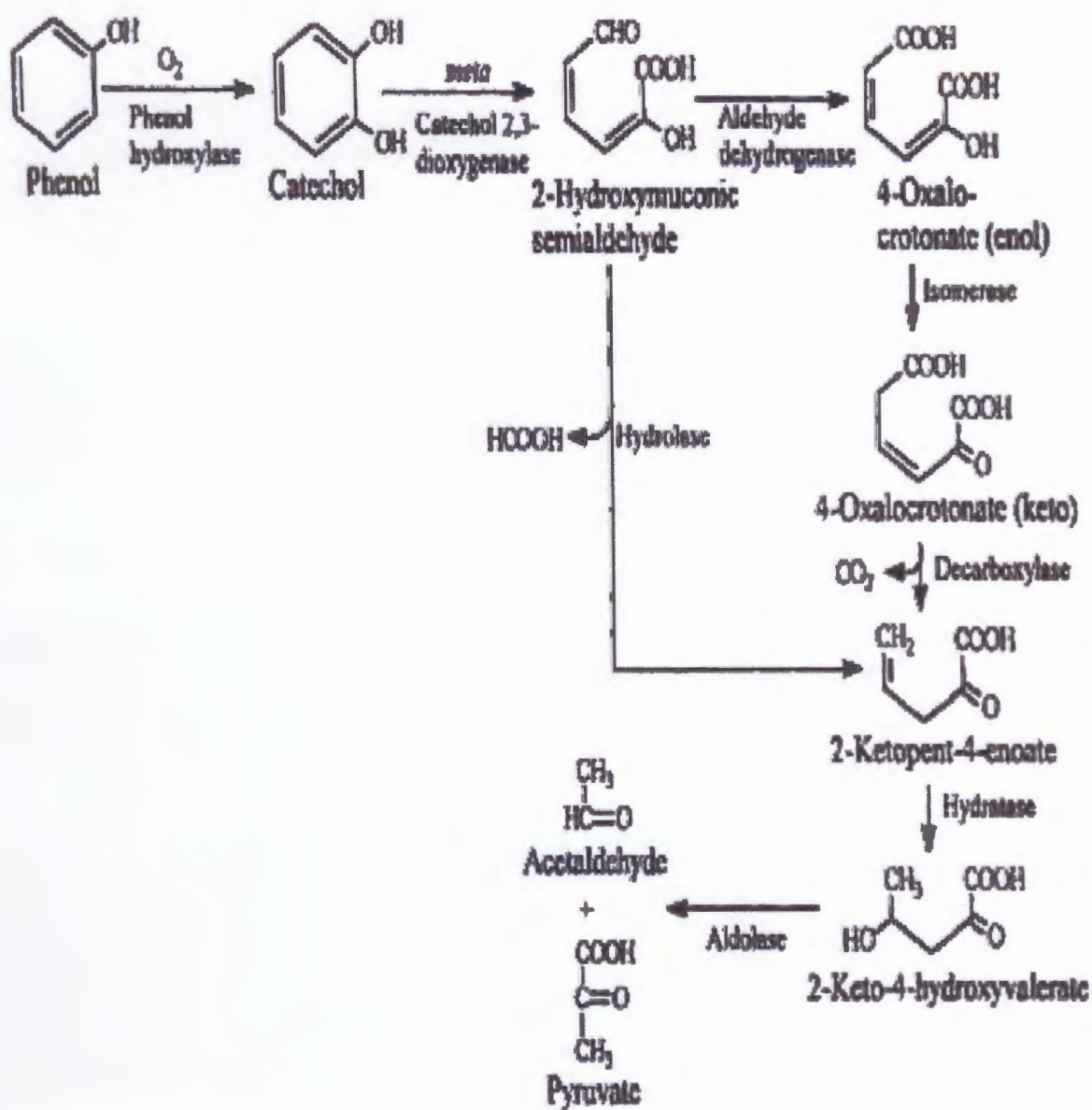


Figure 7 : Dégradation aérobie du phénol par *pseudomonas putida* (Martin *et al*, 1998)

III- 5-3- La dégradation anaérobie du phénol :

En utilisant le nitrate comme accepteur terminal d'électrons, Bakker (1977) a montré que le phénol était dégradé en acide n-caproïque par une culture mixte.

Bakker a conclu que le cycle aromatique du phénol était réduit pour former le cyclohexanone, avant d'être dégradé en composés aliphatiques.

Balba et Evans (1980) ont distingués deux cas principaux:

*Quand le phénol marqué au C₁₄: le phénol a été métabolisé rapidement et les produits marqués suivants ont été détecté dans le milieu de culture : le cyclohexane, le 2-hydroxydo-hexanone, l'adipate, le succinate, le propionate et l'acétate, confirmant une voie métabolique réductrice (Gaujous,1993) (figure 9).

*Quand le phénol n'est pas marqué et le CO₂ marqué au C₁₄: la formation du benzoate radioactif a été observée ce résultat indique que la dégradation du phénol passe probablement par la carboxylation du phénol (Joroslaw, 2000).

La biodégradation anaérobie du phénol se produit par une carboxylation suivie par une déshydroxylation (réaction de réduction) et désaromatisation (Agarry *et al* ,2008).

Tszech et Fuchs (1987), ont proposé que sous des conditions dénitrifiantes, la carbixylation du phénol en 4-hydroxybenzoate appelé "Klobe shield carboxylation", a été la première étape dans la dégradation du phénol.

L'étude détaillée sur la voie métabolique du phénol dans des conditions de dénitrification par la souche "*Pseudomonas* K172" sp a été réalisée en anaérobiose. Elle commence par une phosphorylation dépendante du Mn²⁺ pour donner le phénol phosphate, après la carboxylation .

Le 4- hydroxybenzoate formé est activé en 4-hydroxybenzoateCoA suivie par une deshydroxylation réductrice en benzoate CoA qui est converti par la suite en acétyl-CoA.

La première étape de la dégradation du phénol par *Pseudomonas fluorescense* a été la carboxylation en 4-hydroxybenzoate, comme décrit pour la souche *Pseudomonas* K172 sp, il a été observé que le taux de croissance a été très faible, le 4-hydroxybenzoate peut être détecté, le CO₂ est nécessaire pour le métabolisme anaérobie du phénol dans des conditions dénitrifiantes (figure 10) (Martin *et al*, 1998).

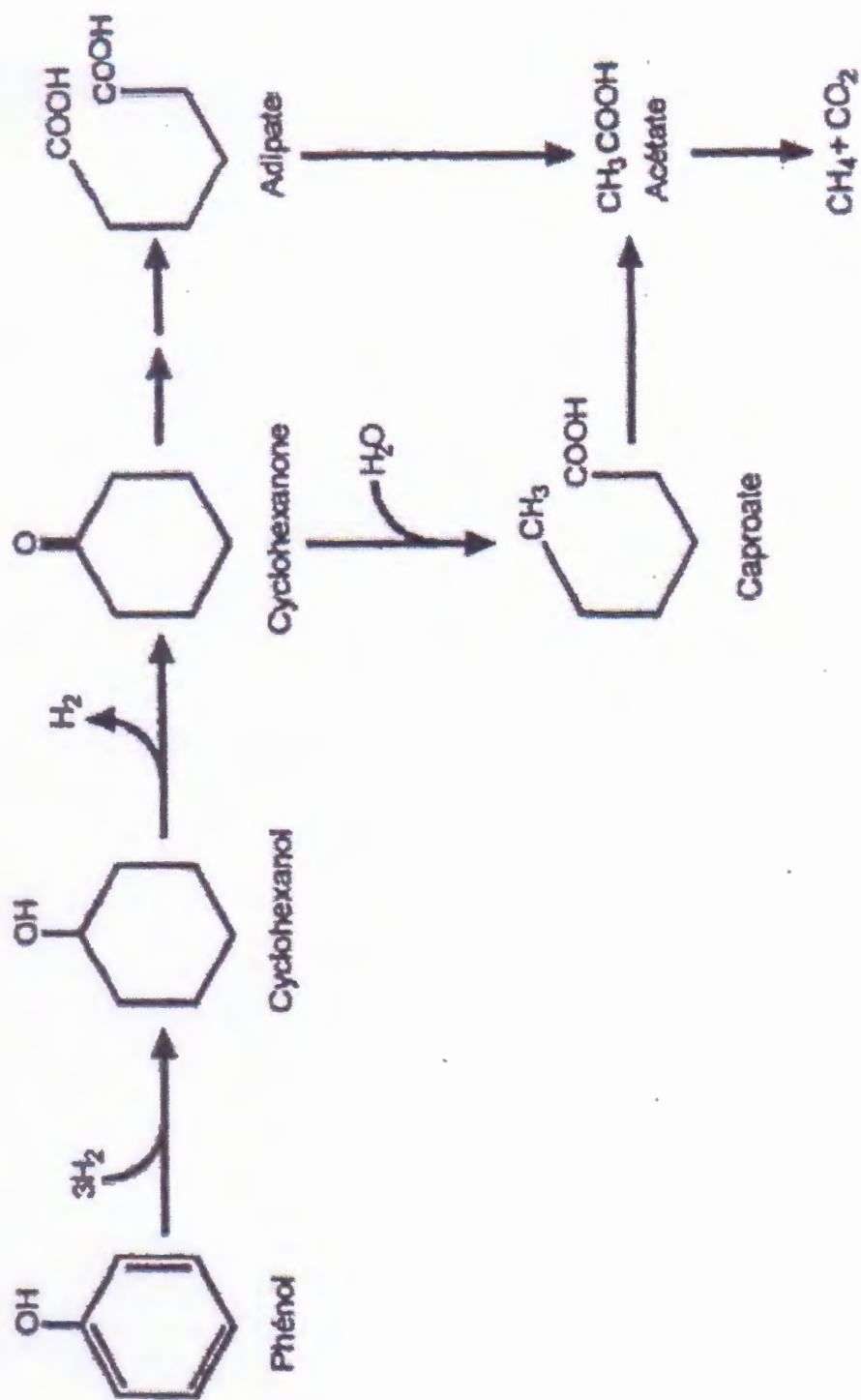


Figure9: Dégénération du phénol par la voie métabolique réductrice proposée par Evan (1996) (Joroslaw, 2000).

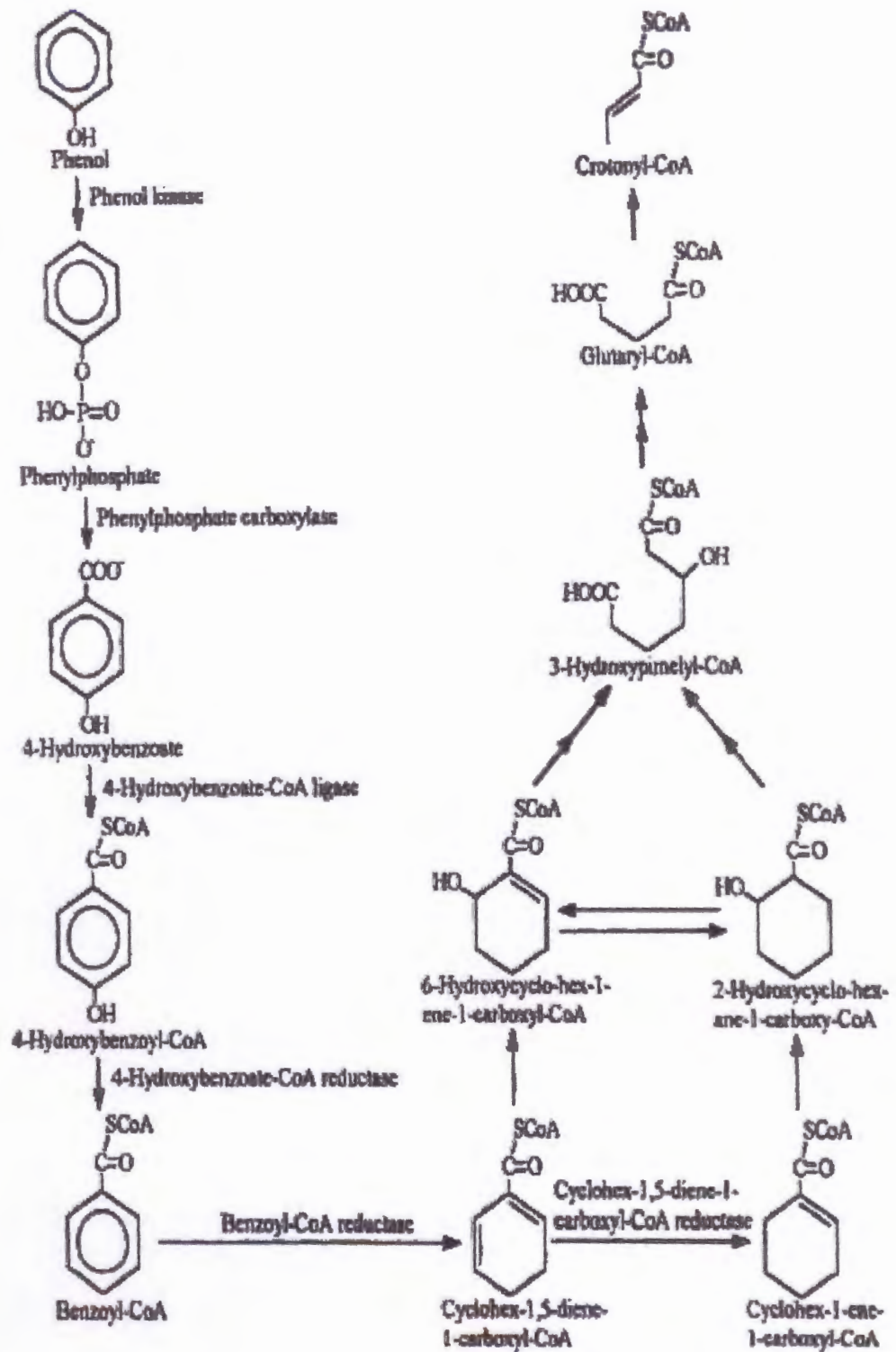


Figure 10 : Dégradation anaérobie du phénol par la souche *pseudomonas* K172. sp (Sous des conditions dénitrifiants) (Martin *et al* ,1998).

CHAPITRE : IV

IV- Bioremédiation et biotechnologie:

IV-1- Définition de bioremédiation:

De manière général, les biotechnologies classiques mettant en oeuvre des microorganismes, sont applicables pour le traitement des déchets organiques dits « biodégradables », des nouvelles biotechnologies peuvent s'appliquer au traitement de certains polluants minéraux, bien que des études complémentaires restent encore nécessaires pour en démontrer la faisabilité industrielles.

La bioremédiation ou dépollution biologique est définie par l'utilisation d'organismes vivants pour détruire les polluants environnementaux, les applications des méthodologies de cette dépollution sont par de nombreux aspects, des extensions de la technologie efficace de traitement des eaux usées, d'égouts ou industrielles (Charissou *et al*, 2009).

Donc la bioremédiation est l'usage des organismes vivants à l'origine des microorganismes pour dégrader les contaminants de l'environnement (Vidali, 2001).

Les genres aérobies tels les *Pseudomonas*, ont été soumis à plusieurs études et leur souplesse d'utiliser une étendue large de substances aromatiques les font d'attrayants organismes pour usage dans les applications du traitement de l'eau de gaspillage (Charissou *et al*, 2010).

IV-2- Définition des OGM:

L'OGM ou " organisme génétiquement modifié" est un organisme à l'exception des êtres humains, dont le matériel génétique a été altéré par un processus qui ne se produit pas naturellement par croisement et /ou recombinaison naturelle.

A partir de cette définition, il est à considérer qu'un OGM (Charissouet *et al*, 2010) est tout organisme obtenu par des techniques de recombinaison de l'acide nucléique impliquant la formation de nouvelles combinaisons de matériel génétique par des techniques impliquants l'incorporation directe dans un organisme de matériaux héréditaires préparés à l'extérieur de l'organisme et en fin par des techniques de fusion cellulaire ou d'hybridation (Zhao *et al*, 2005).

IV-3- Cas réels de biodégradation par les souches OGM:

Traditionnellement, les études portant sur la biodégradation ont été initiées par la sélection d'un ou plusieurs microorganismes capable de dégrader des polluants cibles, cependant, les méthodes conventionnelles ont permis l'isolement que d'une fraction limitée de microorganismes dégradeurs présents dans l'environnement, de plus beaucoup d'organismes isolés ont montré des cinétiques de dégradation qui diffèrent de celles observées dans leur habitat naturels Par exemple, les methanotrophes cultivées en laboratoires montrent des constantes de saturation pour

l'oxydation du méthane qui sont 1 à 3 fois plus que celles observées dans les sols (Charissouet *et al*, 2010)

*** Exemple 1:**

Pour la première fois. « L'U.S Environmental Protection Agency » a autorisé l'utilisation d'une souche OGM pour une étude de terrain d'une durée de deux ans, elle a été conduite en lysimètre, des cylindres d'acier galvanisés recouvert d'une résine époxydique (de 4m de haut et d'un diamètre de 2,5m) enterrés verticalement et fermés par un couvercle d'acier inoxydable, ces lysimètres ont été remplis de terre artificiellement contaminée par le naphtalène (1g/kg), l'anthracène (100mg/kg) et du phenanthène (100mg/kg) et inclus avec la souche HK44 de *Pseudomonas fluorescence*, la souche contient un plasmide porteur de gènes codant pour les enzymes d'une voie de dégradation du naphtalène, un gène *LUX* codant pour une luciférase est fusionné à ces genes cataboliques, le résultat le plus marquant de cette étude a été le constant de la survie et de l'activité des bactéries pendant au moins 666 jours (Charissou *et al*, 2009).

***Exemple 2:**

Un étude rapporte l'isolement et la caractérisation réussie d'une nouvelle bactérie dégradant le phénol (*Pseudomonas sp*) isolée à partir d'une zone industrielle de Cubatao-Brésil en utilisant une technique d'enrichissement de la culture, la séquence du gène ARNr16s a révélé que la souche appartenait au groupe Gamma des *Proteobacteria*, avec une identité de 98% séquence du gène ARNr 16s de *Pseudomonas aeruginosa*, la souche à Gram négatif, aérobie, mobile, uréase et oxydase positive, les propriétés ci-dessus de la souche sont conformes a son classement dans le genre *Pseudomonas*, *Pseudomonas sp* , pourrait croître en aérobiose sur un certain nombre de composés aromatiques, tels que le phénol, le catéchol...etc

Le potentiel de dégradation du phénol de l'isolement a été mesuré par inoculation de culture pure dans le milieu minéral contenant différentes concentrations de phénol variant de 100 a 1800 mg/l dans un réacteur discontinu et le taux de disparition du phénol a été suivi à des intervalles de temps réguliers. La croissance bactérienne est complètement inhibée et pas de biodégradation a été observé pour une concentration de phénol supérieur à 2000 mg. La bactérie tolérant le phénol, la plus connue est *Pseudomonas putida* MTCC 1194 qui tolère jusqu'à 1000 mg/l de phénol.

En résumé, l'étude précédente a permis la description d'une nouvelle bactérie dégradant de fortes concentrations de phénol, ces résultats montrent que cette souche a un niveau élevé de tolérance à la toxicité du phénol, et elle a donc des applications potentielles dans le traitement biologique des eaux usées industrielles ou dans la biorestauration in situ des sols contaminés par le phénol (Ingrid *et al*, 2008).

Exemple 3:

Une autre méthode est l'utilisation de cellules de bactéries OGM tuées avant leur mise en contact avec la matrice polluée. L'ADN étant stable dans l'environnement, ces cellules mères mortes peuvent transférer des plasmides à d'autres organismes, de plus, si de telles cellules ne peuvent évidemment se multiplier dans l'environnement, elles pourraient y libérer des enzymes ou porter à leur surface des molécules capables de dégrader ou d'absorber des polluants (Strong *et al*, 2000)

Tableau 5 : Quelques contaminants potentiellement convenables pour la bioremédiation (Vidali, 2001).

Classe de contaminants	Exemples spécifiques	Aérobic	Anaérobic	Sources plus potentielles
Phénol chloré	Pentachlorophénol		+	-Traitement du bois de construction. -Décharges d'ordures.
Les hydrocarbures aromatiques	Naphthalence Anthracene Fluorene Pyrene benzoapyrene	+		-Production de l'huile et stockage. -Sites de travail du gaz. -Installation du port. -Jardins ferroviaires. -La fabrication chimique.

IV-4- le rôle du génie génétique dans la biodégradation:

L'amélioration génétique des souches microbiennes a des nombreuses applications et offre de belles perspectives dans les industries diverses .la génie génétique discipline d'avenir alors que se confirme l'essor des biotechnologies fait largement appel aux données de la génétique microbienne, les méthodes de la génétique et de la biologie moléculaire permettent aujourd'hui de construire des souches de microorganismes utilisables a des fins de biodégradation. Il convient cependant de distinguer les souches OGM, leur matériel génétique a été modifié par des processus qui ne se produisent pas dans la nature(Zhao *et al*, 2005).les bactéries génétiquement modifiées puissent être utilisées dans les traitement par bioremédiation en cuves , elles ne

peuvent pas être inoculées dans des environnements pollués pour dégrader les composés toxiques.

Les plasmides de dégradation des hydrocarbures sont transférés généralement par transformation et conjugaison comme le cas d'E.coli qui est à l'origine incapable de dégrader le toluène, mais après une transformation par le plasmide TOL devient dégradative pour le toluène (Nasir, 2000). Un autre exemple de la transformation des gènes dans le même genre bactérien, le *Pseudomonas putida* RKJ1 est capable de dégrader la naphtalène et le salicylate, *Pseudomonas putida* RKJ5 avait perdu son pouvoir de dégradation et son activité, après une conjugaison entre les deux souches bactérienne, on obtient une souche RKJ5 dégradative pour le naphtalène (Samanta et Jain, 2000).

Conclusion

Conclusion :

La biodégradation par les microorganismes et en particulier les bactéries est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement. Le genre *Pseudomonas* est l'un des agents les plus populaires dans la dégradation des hydrocarbures. La biodégradation du phénol par les *Pseudomonas* est un processus très efficace pour l'élimination de polluants phénoliques, ceci d'une importance majeure pour la préservation environnementale puisque une mauvaise gestion de phénol conduit à des pollutions qui peuvent avoir des impacts graves sur la santé humaine et sur l'environnement.

Les *Pseudomonas* utilisent plusieurs mécanismes de biodégradation soit en présence ou en absence d'oxygène.

La biodégradation du phénol dépend de plusieurs facteurs: la température, le pH et l'oxygénation, qui une fois contrôlés peuvent améliorer le processus de biodégradation.

La biodégradation par les microorganismes est un processus efficace pour la bioremédiation de l'environnement.

Pour l'évolution de la biodégradation beaucoup des travaux génétiques tentent d'améliorer les capacités de microorganismes à dégrader les hydrocarbures en général et le phénol en particulier. Les OGM constituent un véritable exemple dans le domaine de la bioremédiation.

Référence:

- Agarry A.O et Durojaije B.O**, 2008. microbial degradation of phenols-sd.
- Agency for toxic substances and disease Registry (ATSDR)**, 2008. Toxicological profile for phenol, Arlanta, GA: U.S. Department of hearth and Human Services, Public Hearth Service.
- Ansehmo A.M et Novais**, 1984. Isolation and sélection of phénol degrading microorganismes from. An industriel effluent, biotechnol. Letti, 9:601-606.Sd
- Arris .S**, 2008. Étude expérimentale de l'élimination des polluants organiques et inorganiques par adsorption sur des sous produits de céréales, thèse de doctorant université de constantine.
- Bayard R**, 1993-evaluation de la biodégradation des déchets solidifié, mémoire de DEA, instituant national des sciences appliquées de Lyon
- Bruce R et Santodonato .j**, 1987- summary review on the health effects associated with phenol toxicol, Ind. Health.Sd
- Delawas C et Trébaol B.**2003. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux – réglementation- prélèvements- analyses .Ed .TEC et DOC,Londres-paris- New York . Paris.
- Carip C**, 2008. microbiologie hygiène (bases microbiologiques de la diététique, Ed .TEC et DOC (paris).
- Charissou A, Lejeune.ph.**2009.etat de l'art sur les potentialites des techniques de bioaugmentation dans le traitement des dechets ,Sediments et sols pollues. Sd. Chimie du pétrole, Edition .TECHNIP, paris.
- Diaz E.T**, 1995. Identification of fonctional residues in a 2-hydroxymuconic semialdehyde hydrolase, Sd.
- Fattal P**, 2008. Pollution des cotes par les hydrocarbures presses universitaires de Rennes, Sd.
- Gaujous D**, 1993, la pollution des milieux aquatiques. Ed .Lavoisier.p (195)
- Gibson D.T**, 1984. microbial degradation of organic compounds, Ed .NUNOD
- Gurusammy. A, Laiy .L et Juin. F**, 2007. biodegradation of phenol by *Pseudomonas pictorum* on immobilized with chitine, African journal of biotechnology, Vol 6(3) pp-296-303
- Hart. H et Conia. J**, 2002. introduction a la chemine organique, DEBOECH 1ere édition
- Haryam et Rekiki .M**, 1990. The Meta cleaving operon of Tol dégradative plasmide PWWO compris 13 gens .Sd.
- Haryama .S, Kishira .Y, et Shutsurbo. K**, 1999. petroleum biodégradation in marine environnements J.molee microbial. Biotechnol.sd.
- Hnatiuc .E**, 2002. procédés électriques de mercure et de traitement des polluants, Ed.Lavoisier (TEC ET DOC).

- Jeannot. R, Bemière. B et Chivon. S**, avec la collaboration de Augustin. F, Darmendriale. D ,2001.guide méthodologiques pour l'analyse des sols pollués .Sd.
- Jeau. Jacques, Annie. F et Christian. J**, 2005.les composes phénoliques des végétaux, **Johoslaw .L**, thèse de 2000.isolement et étude d'une souche bactérienne transformât.
- Khazi M.B, Avavind. R et Vivuthagiri.T**, 2010.recert advances in the biodegradation of phenol, Asiary-EXO-BIOL-SCI, vol 1(2)-2010:219-234.
- Kukor JJ et Obsen RH**, 1991.Genetec organization and regulation of a Meta cleavage pathway for catechol by *Pseudomonas sp* .Sd.
- Labrecque M.H**, 2003.etude de la capacité de deux souches de levures à dégrader le xylène, maîtrise en microbiologie agricole, université Laval. Sd.
- Laurent C, Feid .T, et Laurent .F**, 2005.contamination des sols (transfert des sols vers les animaux, Edition .EDP. Sciences /ADEM.
- Lecomte. P**, 1998.les sites pollués, Edition .Tec et Doc, paris.
- Lefebore. G**, 1986.Notion de chimie du pétrole, ED:TECHNIP, paris efebore G, 1986-nosion de **Léon. M et Michel .V**, 1982.bactériologie médicale.Ed. Printed France
- Ingrid R, Louise H, Elen A et Marinalva M**, 2008.Biodegradation de haut concentration du phénol dans les eaux usées par *Pseudomonas sp* isolés d'une zone industrielle .
- Manhan S.E**, 2007.environnement science and technology, Edition .Taylor and Francis, New York.
- Marlyne**, 2007.Protection de la vigne contre *Botrytis cinerea* et stimulation des mécanismes de défense a l'aide de bactéries issues du Vignoble champignons. Sd.
- Martin. H, Van .A et Sytze.K**, 1998.handbook on biodegradation and biological treatment of hazardonsororganic, Sd.
- Masanosi .F et Michihiko .L**, 1994.wastwater treatment using genetically engineered microorganism, Sd.
- Michael.T et John. M**, 2007.Brock biologie des microorganisms. Sd.
- Nasir R.B**, 2000.bacteriological and genetic study on *Pseudomonas spp* utilizing hydrocarbon compound .M, sc, these university of Baghdad.
- Pascal. S et Manchado. V**, 2006.les polyphénols en agroalimentaire Edition
- Pelmont. J**, 2005-biodégradation et métabolisme, Ed. EDP. France
- Perru J, Staby J.T, et Loy .S**, 2004.microbiologie, Edition .Dunod. Paris.
- Powlowski, Sahlam .L et Shingler**, 1993.purification and proprités of the physically associated
- Samanta S.K et Jain R.K**, 2000.Evidance for plasmid-mediated chemotaxis of *Pseudomonas putida* to words naphthalene and salicylate Can J.Microbiol.
- Scriban. R**, 1993.biotechnologie 4eme Edition.Ed.Lavoisier (TOC et DOC), p (731).

Soltani .M, 2004.distribution lipidiques et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram négatives hydrocarbonuclastes, variation en fonction de la source de carbone, thèse de doctorat, université de paris 6.

Strong L.C,Mctavich .H, Sadowsky M.J et Wackett L.P, 2000.Remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *E coli* mexpressing atrazine chlorhydrolase,Environnemental microbiology 2,2000.

Vidali M, 2001.Bioremediation, an overvieww.Puve Appl-Chem, Vol 73, No 7, pp1163-1172.Sd

William Johnson .A, 2003.Invitation à la chimie organique. DEBOECH 1^{ère} édition.

Zhao .H, Ang E.L et Obbord J.P, 2005. Recent. Advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via bimolecular engineering. Enzyme and microbial technologie .Sd.



Présenté par :

Boudendouna Asma
Boukrika Mounira

Date de Soutenance : 29/ 06/ 2010

Titre : Biodégradation du phénol par les *Pseudomonas*.

Résumé :

Les hydrocarbures aromatiques sont parmi les contaminants les plus répandus dans l'environnement car ils sont utilisés en grandes quantités en industrie bien que toxiques pour de nombreux organismes. La meilleure méthode pour éliminer ces polluants est les traitements biologiques tel que la biodégradation et la bioremediation. De nombreuses bactéries notamment les *Pseudomonas* sont capables d'utiliser le phénol comme source de carbone et d'énergie. Actuellement des nouvelles biotechnologies utilisées comme les OGM pour améliorer la dégradation des composés phénoliques par les bactéries.

Mots clé : hydrocarbures aromatiques, phénol, *Pseudomonas*, biodégradation, bioremediation.

Abstract:

Aromatic hydrocarbons are among the most extended contaminants in the environment due to their large industrial use besides their toxic effects towards several organisms. The best method to eliminate these pollutants is the biological treatment such as biodegradation and bioremediation. Many bacteria including *Pseudomonas* are capable of using phenol as a source of carbon and energy. Currently new biotechnologies such as genetic modification are used to improve the degradation of phenolic compounds by bacteria.

Key words: aromatic hydrocarbons, phenol, *Pseudomonas*, biodegradation, bioremediation.

ملخص:

تعتبر الهيدروكربونات العطرية من بين الملوثات الأكثر إنتشارا في البيئة لأنها تستعمل بكثرة في الصناعة بالإضافة إلى أنها سامة لعديد من الكائنات . الطريقة المثلى لإزالة هذه الملوثات هي المعالجة البيولوجية مثل التحلل الحيوي و المعالجة الحيوية . عدد كبير من البكتيريا خاصة *Pseudomonas* قادرة على استعمال الفينول كمصدر للكربون والطاقة . حاليا توجد تكنولوجيات حيوية تستعمل فيها OGM لتحسين تحلل المركبات الفينولية بواسطة البيكتيريا .

الكلمات المفتاحية: الهيدروكربونات العطرية، الفينول، *Pseudomonas* ، التحلل الحيوي، المعالجة الحيوية