

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 محمد الصديق بن يحيى - جيجل

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie Appliquée
et des Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الميكروبيولوجيا التطبيقية
وعلوم التغذية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème

**Effet du diclofénac, anti-inflammatoire non-stéroïdien, sur la
croissance des bactéries isolées du sol**

Membres de Jury :

Présidente : Dr. MOUSSAOUI S.

Examinatrice : M^{me} AMIRA S.

Encadreur : Dr. OULED HADDAR H.

Présenté par :

DELLACHE Dounia

HANNOUF Ibtissem

Année Universitaire 2018 – 2019

Numéro d'ordre (bibliothèque) : /...

➤ **Remerciement :**

En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés et accomplir ce modeste travail.

Nous tenons tout particulièrement à exprimer nos plus vifs remerciements et notre profonde gratitude à notre encadreur, Madame Houria OULED HADDAR, Docteur à l'université Mohammed Seddik Benyahia- JIJEL, qui nous a fait l'honneur d'assurer la direction de ce travail, et qui a su faire preuve de patience, d'indulgence et de compréhension tout au long de la période du travail, nous permettant ainsi de mener à bien ce mémoire.

Nous lui sommes très reconnaissantes.

Nous tenons à adresser nos remerciements sincères à Madame Samyia AMIRA qui nous a honoré de présider le jury de ce mémoire. Qu'elle reçoive toute notre gratitude et notre respect.

Nous remercions également Docteur Sagia Moussaoui, (Chef de département de microbiologie appliquée et sciences alimentaires), pour avoir accepté d'examiner ce travail et participer au jury du mémoire.

Nous exprimons aussi toute notre gratitude à : Mohammed SIFOUR, Professeur à l'université de JIJEL, Professeur Kamal HARROUCHE, Docteur Salima AISSAOUI, Docteur Amel AIT-MEDDOUR, Docteur Mohamed Tahar BOUBEZARI, Monsieur Tarek KHENNOUF et Monsieur Yazid RAHMOUNE, pour leur aide d'une manière ou d'une autre à accomplir ce travail, leurs conseils, leurs encouragements, leur disponibilité et leur soutien immense aux moments les plus difficile.

Nous remercions tous les ingénieurs et les techniciens du laboratoire de département de la microbiologie appliquée et sciences alimentaires : Lynda DERRI, Rim TALEB et Badra BOUFANCHOCHA, pour l'aide technique, académique et scientifique qui nous ont apporté durant toute la durée de notre travail.

Nos plus profonds remerciements vont à nos parents pour leur aide, leur compréhension, leur soutien, ainsi que pour leurs encouragements sans cesse. Qu'ils trouvent, dans la réalisation de ce travail, l'aboutissement de leurs efforts ainsi que l'expression de notre plus affectueuse gratitude.

œ Dédicace :



*Je dédie ce travail à mes parents,
Qu'ils trouvent ici toute ma Gratitude
pour leur Soutien tout au long de mes
études,*

*A mes sœurs et mes frères, que Dieu les
bénisse,*

*A toute la famille DELLACHE et
GHOULA*

*A tous mes Collègues et mes Amis
A tous ceux que j'aime.*

Dounia DELLACHE

œ Dédicace :



*A mes parents à qui je dois tout,
A toute la famille HANNOUF et
BOUCHAGOUR,*

*A mes professeurs au cours de ces années
d'études,*

A tous ceux qui croient en moi,

*Que ce travail soit l'accomplissement de
vos vœux tant allégués, et le fruit de votre
soutien infaillible.*

Ibtissem HANNOUF

Sommaire :

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	[1]

Partie I : Synthèse bibliographique

I. Emergence des produits pharmaceutiques dans l'environnement.....	[3]
II. Provenance et comportement des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans l'environnement.....	[4]
III. Mode d'action et métabolisme du Diclofénac et de l'Ibuprofène.....	[7]
IV. Impacts des anti-inflammatoires non-stéroïdiens sur l'environnement et les organismes.....	[9]
V. Mécanismes d'élimination des anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	[11]
V.1. Mécanismes conventionnels d'élimination.....	[11]
V.1.1. La sorption.....	[11]
V.1.2. Hydrolyse et photodégradation.....	[12]
V.1.3. Procédés d'oxydation avancée (POAs).....	[13]
V.1.4. Ozonation.....	[13]
V.2. Mécanismes d'élimination biotique.....	[14]
V.2.1. La biodégradation.....	[14]
V.2.2. Utilisation des bioréacteurs à membrane (MBR).....	[15]
V.2.3. Les biofilms.....	[16]

Partie II : Matériel et méthodes

I. Matériel et réactifs.....	[17]
I.1. Matériel biologique.....	[17]
I.2. Substance d'essai.....	[17]
I.4. Solvants de l'HPLC.....	[17]
I.5. Milieux de culture.....	[18]
II. Méthodes.....	[18]
II.1. Réalisation de l'échantillonnage.....	[18]
II.2. Phase d'adaptation.....	[19]
II.3. Isolement des souches.....	[19]
II.4. Purification des souches.....	[19]

II.5. Conservation des souches isolées.....	[20]
II.6. Caractérisation phénotypique et biochimique des isolats bactériens.....	[20]
II.6.1. Etude macroscopique.....	[20]
II.6.2. Etude microscopique.....	[20]
II.6.3. Tests biochimiques.....	[20]
II.7. Screening des souches bactériennes aptes à dégrader le Diclofénac.....	[22]
II.8. Effet de la variation du pH sur la croissance de la souche S2 en présence du Diclofénac	[23]
II.9. Effet de la variation de la concentration du Diclofénac sur la croissance de la soucheS2	[24]
II.10. Test de biodégradation du Diclofénac en tant que source unique de carbone et d'énergie par la souche S2 et D16	[24]
II.11. Analyse du Diclofénac par chromatographie liquide à haute performance (HPLC).....	[25]

Partie III : Résultats et Discussion

I. Isolement et identification des bactéries dégradant le Diclofénac.....	[26]
I.1. Caractérisation phénotypique et biochimique des isolats bactériens.....	[26]
I.1.1. Observation macroscopique.....	[26]
I.1.2. Observation microscopique.....	[28]
I.1.3 Résultats des tests biochimiques.....	[28]
II. Screening des souches bactériennes aptes à dégrader le Diclofénac.....	[30]
III. Effet de la variation du pH sur la croissance bactérienne de la souche S2 en présence du Diclofénac.....	[33]
IV. Effet de la variation de la concentration du Diclofénac sur la croissance bactérienne de la souche S2.....	[35]
V. Test de biodégradation du Diclofénac en tant que source unique de carbone et d'énergie par les souches S2 et D16.....	[38]
Conclusion	[43]
Références bibliographiques	[45]
Annexes	

AINS_s : Anti-Inflammatoires Non-Stéroïdiens

BFC : Facteur de Bioconcentration

CBZ : Carbamazépine

COX : Cyclo-Oxygénases

DCF : Diclofénac

DO : Densité Optique

EC50 : Concentration Effective pour tuer 50% de population

HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance

IBP : Ibuprofène

K_d : Coefficient de distribution solide-eau

K_{oc} : Coefficient de distribution normalisé de partition matière organique/eau

STEP : Station d'Épuration des Eaux usées

KTP : kétofène

logD : Coefficient de partage octanol-eau corrigé

logK_{ow} : Coefficient octanol-eau

MBR : Bioréacteur à membrane

MMM : Milieu Minéral Minimum

NAP : Naproxène

OH : Radical Hydroxyle

POA : Procédés d'Oxydation Avancée

POP : Polluant Organique Persistant

pKa : Constante de dissociation

Rpm : Révolution par minute

t_{1/2} : Demi-vie

4'-OH-DCF : 4'-hydroxydiclofénac

5 -OH-DCF : 5-hydroxydiclofenac

μ : Taux de croissance

Figure 1. Voies d'entrée des polluants émergents dans l'environnement	[5]
Figure 2. Structure chimique de diclofénac.....	[8]
Figure 3. Structure chimique de l'ibuprofène.....	[8]
Figure 4. Métabolisation de l'ibuprofène.....	[8]
Figure 5. Principaux métabolites du diclofénac lors de la phase I et II du métabolisme.....	[9]
Figure 6. La galerie biochimique API 20E.....	[21]
Figure 8. Cinétique de croissance des neuf souches isolées en fonction du temps sur milieu MMM en présence du DCF à 10 mg.L ⁻¹	[32]
Figure 9. Effet de la variation du pH sur la croissance de la souche S2 sur milieu MMM additionné de 10 mg.L ⁻¹ de DCF.....	[34]
Figure 10. Effet de la variation de la concentration du DCF sur la croissance de la souche S2.....	[36]
Figure 11. Biodégradation du diclofénac (DCF) par <i>Aeromonas salmonicida</i> S2 et <i>Citrobacter youngae</i> D16.....	[38]
Figure 12. Taux d'élimination du DCF par biodégradation.....	[39]
Figure 16. Chromatogrammes de la biodégradation du DCF par <i>Aeromonas salmonicida</i> S2.....	[40]
Figure 17. Chromatogrammes de la biodégradation du DCF par <i>Citrobacter youngae</i> D16.....	[41]

Tableau 1. Emergence et concentration de quelques produits pharmaceutiques dans différents milieux aquatiques.....	[4]
Tableau 2. Propriétés physico-chimiques du diclofénac et de l’ibuprofène.....	[7]
Tableau 5. Sources des échantillons collectés.....	[18]
Tableau 6. Caractéristiques macroscopiques des neuf isolats.....	[27]
Tableau 7. Aspects microscopique des souches isolées.....	[28]
Tableau 8. Caractéristiques biochimiques des neufs isolats.....	[29]

Une attention scientifique particulière a été dédiée à la présence des produits pharmaceutiques dans l'environnement, qui est devenue un sujet de préoccupation accrue durant ces dernières décennies, en raison des effets indésirables connus ou suspectés associés à ces composés, pouvant engendrer des problèmes sérieux par leur influence sur la santé de l'Homme et la biocénose (**Spongberg et Witter, 2008 ; Wojcieszynska et al., 2014 ; Thelusmond et al., 2018**).

Les produits pharmaceutiques contiennent des substances actives, leur utilisation est destinée à la prévention, le diagnostic ou le traitement des maladies ainsi que pour restaurer, corriger ou modifier des fonctions organiques. Lors de la consommation des produits pharmaceutiques, la plupart d'entre eux n'est pas totalement métabolisée dans le corps humain et leur excrétion constitue l'une des principales sources de résidus pharmaceutiques dans l'environnement, ainsi connus comme micro-polluants émergents, allant du microgramme au nanogramme par litre (**Kümmerer, 2009 ; Monteiro et Boxall, 2010**).

Les contaminants émergents englobent une large gamme de produits chimiques synthétiques, dont les produits pharmaceutiques. Ces derniers arrivent des matrices environnementales via une multitude d'activités humaines, y compris l'élimination illicite des médicaments non utilisés ou expirés, rejets des industries pharmaceutiques, effluents des hôpitaux, médicaments vétérinaires, égouts municipaux et les stations d'épuration des eaux usées (**Grossberger et al., 2014 ; Marchlewicz et al., 2016 ; Bessa et al., 2017**). Vachement

Les traitements conventionnels dans les stations d'épuration des eaux usées paraissent inefficaces pour l'élimination complète des traces de contaminants pharmaceutiques émergents (**Cruz-Morató et al., 2013**), et cela affecte beaucoup les pratiques qui envisagent la réutilisation des eaux usées traitées comme alternative intéressante, dans l'irrigation et la recharge des eaux souterraines dans les zones arides et les régions semi-arides, et cela conduit à une accumulation de ces contaminants dans les sols (**Grossberger et al., 2014 ; Schmidt et Redshaw, 2015**).

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens en vente libre, tels que le Diclofénac, l'Ibuprofène et le Naproxène, figurent parmi les contaminants émergents les plus étudiés et les plus rencontrés à des concentrations pertinentes dans l'environnement (**Vieno et Sillanpää, 2014 ; Petrie et al., 2015**).

Petrie et al., (2015) affirment que la situation est alarmante, compte tenu du fait que ces contaminants n'apparaissent pas individuellement dans l'environnement, mais plutôt sous forme d'un mélange complexe toxique, qui pourrait conduire à des effets synergiques indésirables.

Plusieurs études menées avec succès en peu de temps sur la détection, l'impact et le devenir des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans le sol existent. Pour l'élimination, des techniques telles que la phytoremédiation, la dégradation photocatalytique, la phototransformation et des procédés d'oxydation avancés, y compris l'ozonation, ont été utilisées pour éliminer ces contaminants dans l'environnement (**Glick, 2010**).

L'objectif primordial de ce travail repose sur le constat que les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont biodégradables par la biomasse microbienne tellurique, et consiste à isoler et purifier des souches bactériennes telluriques capables de dégrader, transformer ou accumuler le diclofénac qui est constamment présent dans l'environnement. L'isolement sera précédé par une phase d'adaptation de la communauté bactérienne au médicament. L'objectif comporte également une évaluation de l'effet du pH et de la concentration du substrat sur la croissance d'une souche sélectionnée et une estimation de la biodégradabilité par HPLC.

I. Emergence des produits pharmaceutiques dans l'environnement :

Bien que ces substances pharmaceutiques aient été appelées "contaminants émergents", leur découverte semblait susciter peu d'inquiétude. Cependant, les produits pharmaceutiques, en tant que classe de substances polluantes, ont fait l'objet d'une attention particulière pour deux raisons : tout d'abord, une étude sur la féminisation du poisson dans les rivières britanniques a identifié l'éthinylesradiol (EE) à quelques nanogrammes par litre, comme facteur contributif à cet effet, deuxièmement, il a été reconnu que les données sur l'écotoxicologie des produits pharmaceutiques étaient très rares, avec peu de données sur les effets chroniques (**Taylor et senac, 2014**).

Des recherches intensives ont été réalisées sur la présence d'une large gamme de produits pharmaceutiques dans l'environnement (l'eau de rivière, l'eau de mer et les eaux usées). Aux États-Unis, par exemple, en 1976 l'acide clofibrique a été détecté dans les eaux usées traitées à des concentrations comprises entre 0,8 et 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (**Janssen et al., 2002**).

On constate que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS_s) s'inscrivent parmi les groupes médicamenteux les plus vendus comparativement aux autres, avec des prescriptions journalières qui dépassent les 30 millions. Le Diclofénac (DCF) et l'Ibuprofène (IBP) prédominent et marquent 45% des ventes mondiales (**Schmidt et Redshaw, 2015 ; Sarker et al., 2018 ; Thelusmond et al., 2018**).

La disponibilité en vente libre a permis l'automédication parentale pour leurs enfants, qui à son tour, a conduit à un abus d'utilisation des substances pharmaceutiques avec un taux de 59,4% (**Bi et al., 2000**). Une enquête réalisée par **Bound et Voulvoulis en 2005**, sur les habitudes de la population américaine en matière d'élimination des médicaments, a révélé que seulement 1,4% des personnes interrogées avaient rendu les médicaments non utilisés à la pharmacie, alors que 54% les avaient jetés et 35,4% les avaient jetés dans l'évier ou les toilettes, ce qui explique leur détection constante dans les eaux usées et les biosolides. L'inefficacité des traitements classiques des eaux usées pour éliminer ces contaminants émergents, attire une attention particulière sur leurs effets écologiques non souhaités, qui restent en grande partie inconnus (**Li et al., 2017**).

Les concentrations de quelques produits pharmaceutiques dans différents milieux aquatiques sont illustrées dans le **tableau 1**.

Tableau 1. Emergence et concentration de quelques produits pharmaceutiques dans différents milieux aquatiques.

Produits pharmaceutiques	Concentration (ng.L⁻¹)	Lieu	Milieu aquatique	Référence
Triméthoprime	18	Californie	Eaux souterraines	Van Stempvoort et al., 2013
Ciprofloxacine	499	Italie	STEP	Al Aukidy et al., 2012
Naproxéne	80,5	Espagne	Eaux douces et rivières	Calderón-Preciado et al., 2011 López-Serna et al., 2012
Ibuprofène	11900	New Mexico	STEP	Brown et al., 2006
Diclofénac	740	Espagne	STEP	Martín et al., 2012
Carbamazépine	21000	Taiwan	STEP	Sim et al., 2011

STEP : Station d'épuration des eaux usées.

II. Provenance et comportement des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans l'environnement :

L'évaluation précise de l'impact des AINS_s sur l'environnement est devenue difficile, à cause de l'existence d'une multitude de sources d'intrants dans l'environnement sans données quantitatives évidentes, concernant leur distribution relative et leurs sources d'émission, bien que, les humains et les animaux traités avec des AINS_s, constituent la principale source de contamination des ressources en eau potable. Ces produits une fois ingérés et métabolisés (composés natifs et/ou métabolites), ils sont excrétés dans l'urine et les matières fécales, et empruntent le réseau d'égouts comme voie de traitement des eaux usées urbaines, jusqu'à la station d'épuration des eaux usées (STEP), ou pour les ménages ruraux, directement évacués dans des fosses septiques (**Mompelat et al., 2009 ; Facey et al., 2018**).

De manière différente, le rejet direct des AINS_s vétérinaires dans l'environnement peut se produire par application en aquaculture (pisciculture), mais également indirectement, par le biais d'animaux traités localement, et principalement par ruissellement et lessivage dans les champs et du fumier épandu vers les champs de bétail. L'élimination inadéquate de ces médicaments inutilisés ou périmés, jetés directement dans les toilettes ou dans les sites d'enfouissement, ainsi que les résidus de médicaments résultant d'accidents de fabrication peuvent également être considérés comme des points de contamination potentiels importants (Mompelat et al., 2009).

Les eaux usées sont considérées comme l'une des sources d'entrée des AINS_s les plus importantes dans l'environnement aquatique. La **figure 1** montre qu'elles sont générées par de nombreuses voies telles que les hôpitaux, les industries et les ménages et rejetées après dans le système d'égout (Marchlewicz et Wojcieszynska, 2015).

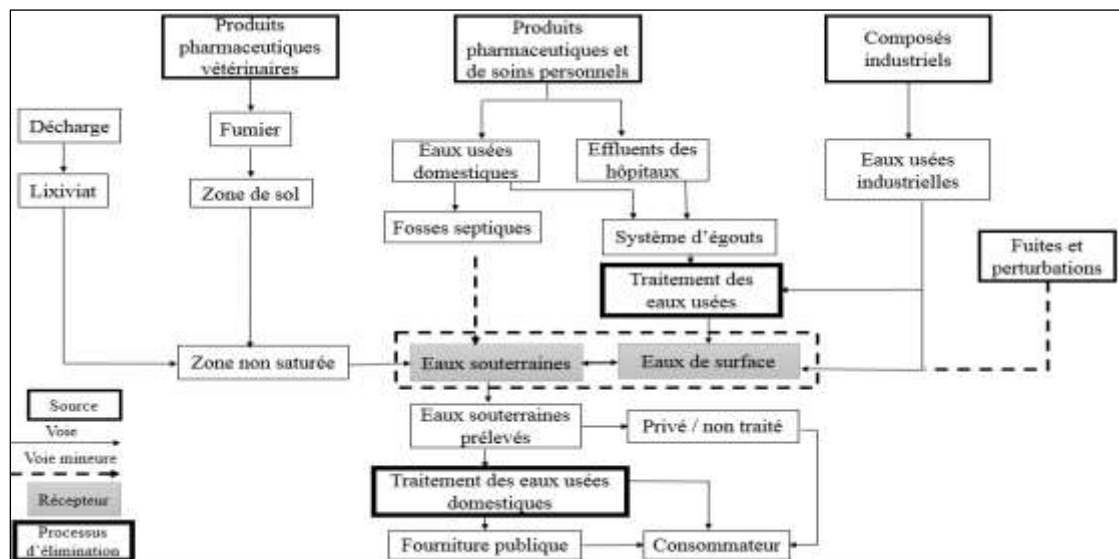


Figure 1. Voies d'entrée des polluants émergents dans l'environnement
Gavrilescu et al., (2015).

La biodégradation et la sorption sont deux processus fondamentaux qui déterminent le destin ultime des produits pharmaceutiques, lors de leur infiltration dans le sol et dans la zone insaturée. De même, la teneur en humidité, la température, le carbone organique, le pH, et la bioactivité du sol, sont impliqués dans la détermination de l'ampleur de l'adsorption qui pourrait être la technique d'élimination des AINS_s de l'eau la plus prometteuse, en raison de sa simplicité opérationnelle et sa rentabilité, ainsi que l'absence de polluants secondaires générés (Drillia et al., 2005 ; Monteiro et Boxall, 2009 ; Martínez-Hernández et al., 2016 ; Sarker et al., 2018).

Les composés de poids moléculaire élevé et de coefficient octanol-eau ($\log K_{ow}$) > 5 sont plus facilement adsorbés par les sédiments et éliminés par coagulation. Au contraire, ceux avec $\log K_{ow} < 2,5$ ont une faible sorption et sont susceptibles de rester facilement dans l'eau de surface ou dans le sol. Le DCF (légèrement soluble dans l'eau) et l'IBP ont un $\log K_{ow}$ qui est supérieur à 4, montrant une affinité importante pour le sol et les sédiments, ce qui leur permet d'être éliminés par sorption à la boue activée, avec un taux de 5% pour les boues secondaires et de 5 à 15% pour boues primaires concernant le DCF (Li, 2014 ; Vieno et Sillanpää, 2014).

De nombreux produits pharmaceutiques ne sont pas facilement biodégradables dans les eaux naturelles et leur biodégradabilité peut prendre plusieurs mois, surtout en conditions anaérobies (Buerge et al., 2006 ; Kujawa-Roeleveld et al., 2008).

La biodégradation du DCF, s'est avérée lente ou presque inexistante, avec une constante de dégradation biologique (K_{biol}) $< 0,1$. L'utilisation du champignon *Trametes versicolor*, pour une bioremédiation de 42 jours, a augmenté le taux d'élimination du DCF de 22% à 61%. (Rodríguez-Rodríguez et al., 2012 ; Suárez et al., 2012).

Dans l'eau, le NAP et le kétofène (KTP) sont efficacement éliminés par dégradation photocatalytique, phototransformation ou procédés d'oxydation avancée, y compris l'ozonation, cette dernière, élimine 90% du DCF (Ternes et al., 2002 ; Sarker et al., 2018).

Le phénomène de bioconcentration du DCF a été observé chez les organismes aquatiques sauvages à divers niveaux trophiques, tels que les moules (*Anodonta*), le poisson-chat jaune (*Pelteobagrus fulvidraco*), et au niveau de différents organes de la daurade (*Abramis brama*) (bile, reins, muscles) à une concentration de 148 ng.mL^{-1} dans la bile. Une exposition chronique à cet AINS peut entraîner des effets néfastes, tels que le stress oxydatif chez la moule (*Mytilus galloprovincialis*), endommagement des tissus chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), effets œstrogéniques et génotoxiques chez le medaka japonais (*Oryzias latipes*) (Lu et al., 2018).

La dégradation des deux AINSs, le DCF et l'IBP dans le sol, est conditionnée par leur demi-vie ($t_{1/2}$), qui peut varier significativement des jours jusqu'à des années. Des propriétés physico-chimiques du composé, telles que : la lipophilie, la solubilité, le K_{ow} , la constante de dissociation (pKa), le coefficient de partition matière organique/eau (K_{oc}) et le coefficient de distribution eau-solide (K_d), le coefficient de partage octanol-eau corrigé (log D) sont remis en question (**tableau 2**), et déterminent le devenir de ces contaminants dans l'environnement (**Jjemba, 2006 ; Monteiro et Boxall, 2009 ; Yamamoto et al., 2009**).

Tableau 2. Propriétés physico-chimiques du diclofénac et de l'ibuprofène.

Propriétés physicochimiques	Diclofénac	Ibuprofène	Référence
Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)	318,14	206,3	Ferrari et al., 2003 Pacheco et al., 2007
Solubilité (mg.L ⁻¹)	2,4	21	Hoeger et al., 2008
pKa	4,15	4,91	Monteiro et Boxall, 2010
log K_{ow}	4,51	3,97	Monteiro et Boxall, 2010
log D	1,90	2,48	Scheytt et al., 2005(a)
log K_d	1,26 - 2,18	1,00 - 1,78	Pal et al., 2010

III. Mode d'action et métabolisme du Diclofénac et de l'Ibuprofène:

Les AINSs, du point de vue chimique, constituent une classe médicamenteuse hétérogène, malgré cette diversité, ils ont tous en commun le fait de contrer les symptômes de la réaction inflammatoire. Ils sont prescrits lors du traitement de l'arthrite, spondylarthrite ankylosante, douleur musculaire aiguë et autres symptômes associés à une inflammation, et la voie orale constitue la voie usuelle de leur administration. La classe des dérivés aryl-carboxyliques, est celle qui comprend les composés les plus commercialisés, tels que le diclofénac, le fenoprofène, le kétoprofène, l'acide méfénamique, l'indométacine, le naproxène et l'ibuprofène (**Blain, 2000 ; Bateman, 2012 ; Bueno et al., 2012 ; Pillon, 2014 ; Li, 2017**).

Les différents AINS_s agissent essentiellement sur l'activité cyclooxygénase des deux isoenzymes : la prostaglandine endoperoxyde H synthase-1 (aussi nommée cyclooxygénase- 1, COX-1) et la prostaglandine endoperoxyde H synthase-2 ou cyclooxygénase-2 (COX-2), en les inhibant d'une façon non spécifique et à des puissances distinctes, ce qui entraîne une baisse des prostaglandines (PG) et de thromboxane, en conduisant à une diminution des effets de l'inflammation. Le DCF (2- (2, 6-dichloranilino) acide phénylacétique) (**figure 2**), qui a des effets marqués sur les deux isoenzymes, et l'IBP (α -methyl-4-(2-methylpropyl) acide acétique benzène) (**figure 3**), qui est classé en 3^{ème} place dans le monde comme l'AINS le plus consommé, sont métabolisés suivant deux phases successives I et II (**Buser et al., 1999 ; Chiolero et al., 2000 ; Tang, 2003 ; Marchlewicz et al., 2016**).

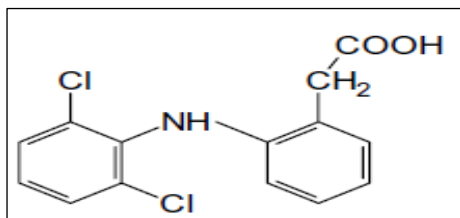


Figure 2. Structure chimique du diclofénac (Scheytt et al., 2005).

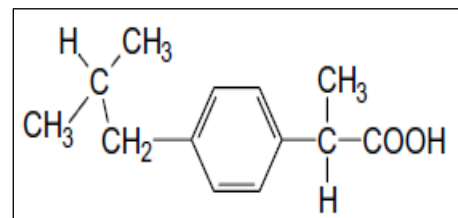


Figure 3. Structure chimique de l'ibuprofène

La phase I, comprend une oxydation ou une hydrolyse avec l'ajout d'un groupement fonctionnel, tandis que la phase II, comporte une conjugaison avec l'attachement d'une molécule polaire (acide glucuronique, un sulfate, un acétate ou un acide aminé), et il en résulte des métabolites plus polaires et par conséquent ils sont plus hydrosolubles (**Khetan et Collins, 2007**). Lors de la phase I du métabolisme de l'ibuprofène, un groupe OH s'attache à ce dernier, la conversion de ce métabolite en un conjugué glucuronide aura lieu en phase II, comme le montre la **figure 4**.

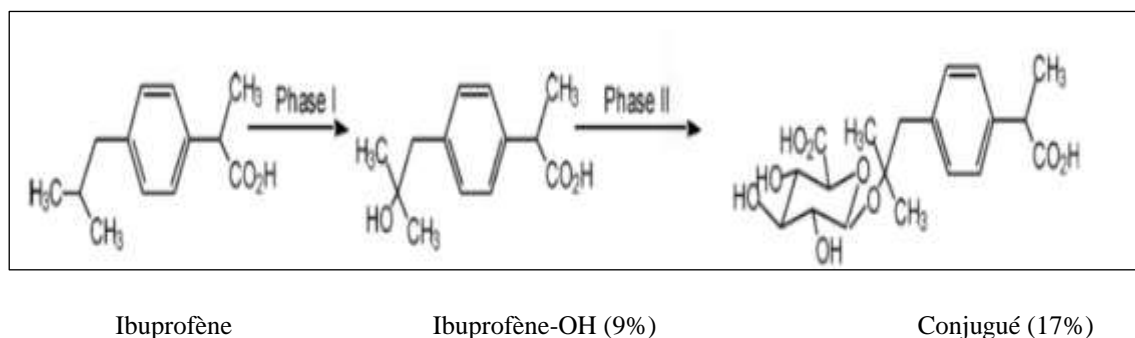


Figure 4. Métabolisation de l'ibuprofène (**Khetan et Collins, 2007**).

Khetan et Collins, (2007) ont signalé que moins de 10% de la quantité d'IBP ingérée est excrétée dans les urines sans aucun changement. Ses principaux métabolites sont l'hydroxy- et le carboxy-ibuprofène et l'acide carboxy-hydratropique, ces métabolites étant inactifs (**Heberer, 2002**).

La majorité de la dose administrée du DCF est métabolisée dans le corps humain et seulement 1% restante est excrétée comme DCF non métabolisé (inchangé). Suivant la voie métabolique du DCF, six métabolites de la phase I ont été détectés dans le plasma humain, les urines et/ou les matières fécales. Les métabolites du DCF retrouvés dans l'urine humaine sont identiques après administration topique et orale.

Le 4'-OH-DCF et 5-OH-DCF, comme le montre la **figure 5**, représentent les principaux métabolites du DCF. Ils sont principalement excrétés sous forme conjuguée. Les 3'-hydroxy-DCF et les 4',5-dihydroxy-DCF font également partie des métabolites importants, les deux restants, 3'-OH-4'-OCH₃-DCF et 4'-OH-3'-OCH₃-DCF sont excrétés dans l'urine seulement à l'état de traces (**Vieno et Sillanpää, 2014**).

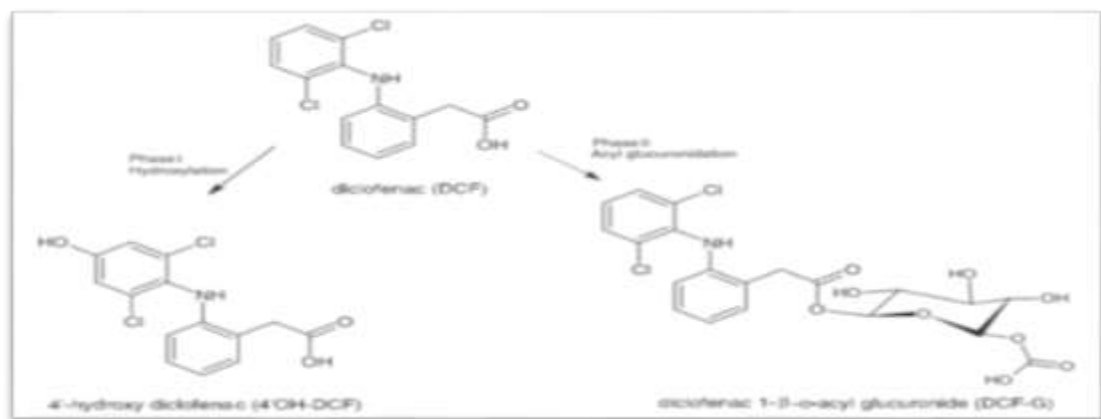


Figure 5. Principaux métabolites du diclofénac lors de la phase I et II du métabolisme (Lee et al., 2012).

IV. Impacts des anti-inflammatoires non-stéroïdiens sur les organismes et l'environnement :

La faible volatilité des produits pharmaceutiques indique que leur distribution dans l'environnement se fera principalement par transport aqueux, mais également par dispersion dans la chaîne alimentaire (**Ibeh et al., 2018**).

Le DCF et l'IBP sont fréquemment détectés sous forme de traces de contaminants émergents, qui peuvent agir négativement sur de nombreuses espèces non ciblées et provoquent un risque toxique pour les écosystèmes. La plupart des études sur les effets toxiques du DCF étaient axées sur ses effets néfastes sur les organismes aquatiques, notamment les bactéries, les algues, les mollusques, les crustacés et les poissons.

Le DCF a été classé dans la liste de surveillance de l'Union Européenne (UE) et avait déjà affecté de manière nuisible plusieurs espèces environnementales à une concentration $<1 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Schwaiger et al., 2004 ; Bartikaova et al., 2016 ; Jiang et al., 2017 ; Zanuri et al., 2017 ; Ibeh et al., 2018).

Selon Miao et al., (2004), le premier cas signalé des produits pharmaceutiques ayant provoqué des dommages écologiques majeurs dans l'environnement terrestre, était celui de l'extinction des vautours due à la consommation de carcasses contenant des résidus de DCF. Une exposition au DCF à $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$, affectait les processus biochimiques de la lentille, plante de la famille des *Fabaceae*, de même, une concentration de $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ avait un impact négatif sur les poissons d'eau douce (Schwaiger et al., 2004).

Des études d'écotoxicité standard ont rapporté des valeurs de CE50 (la concentration efficace médiane) pour le DCF, entre 15 et 68 mg.L^{-1} pour l'inhibition du taux de croissance moyen des algues, et entre 23 et 72 mg.L^{-1} pour l'immobilisation de *Daphnia magna*. Une exposition de 14 jours de *Daphnia magna* à l'IBP à des concentrations de 20 , 40 et 80 mg.L^{-1} , avait des effets significatifs sur la reproduction totale des daphnies. La reproduction est diminuée avec l'augmentation de la concentration du médicament et est totalement arrêtée à 80 mg.L^{-1} (Marchlewicz et al., 2015 ; Nkoom et al., 2019).

Le DCF peut aussi causer des dommages aux œufs des poissons ou aux embryons lorsqu'il est transféré de la mère aux œufs. L'injection de 12 ng/œuf de DCF dans les œufs du poisson medaka japonais (*Oryzias latipes*), conduisait à une diminution du taux de survie des embryons à 67% , un développement oculaire anormal a été signalé dans 9% des cas, et un développement retardé dans 24% des cas (Heckmann et al., 2007).

L'écotoxicité d'un AINS lorsqu'il se présente seul dans l'environnement est relativement faible. Selon **Cleuvers, (2004)**, une exposition prolongée à des concentrations élevées ou à un mélange d'AINS_s, augmente considérablement la toxicité, et affecte négativement les organismes terrestres et aquatiques (**Aziz et al., 2017**).

D'autre part, les études écotoxicologiques sur l'impact des AINS_s à usage humain sur les systèmes végétaux sont rares. Un certain nombre de chercheurs étudiaient la prise potentielle de produits pharmaceutiques à usage humain dans différentes plantes cultivées, dans le but d'évaluer l'exposition potentielle humaine. Cependant, l'impact potentiel sur les plantes, pourrait avoir des conséquences sur la productivité et sur la sécurité alimentaire, car la santé humaine peut être menacée par la consommation à long terme d'eau potable contenant des traces de produits pharmaceutiques (**Quinn et al., 2008 ; Schmidt et Redshaw, 2015**).

V. Mécanismes d'élimination des anti-inflammatoires non stéroïdiens :

La survenue des AINS_s dans le sol résulte de l'épandage de biosolides et de l'irrigation par les eaux usées municipales traitées. Selon de nombreuses juridictions, ces pratiques constituent une source précieuse d'éléments nutritifs pour la production végétale. Néanmoins, elles peuvent provoquer une contamination et une accumulation des AINS_s dans le sol et les eaux souterraines par le biais de l'infiltration et la détérioration consécutive de l'eau potable (**Drillia et al., 2005**).

L'élimination des AINS_s comprend principalement la sorption, la transformation chimique (oxydation) et bioconversion (**Xu et al., 2010 ; Lin et Gan, 2011 ; Al-Rajab et al., 2015 ; Graouer-Bacart et al., 2016 ; Pino-Otín et al., 2017 ; Li et al., 2017**).

V.1. Mécanismes conventionnels d'élimination :

V.1.1. La sorption :

La disparition d'une substance n'indique pas nécessairement sa dégradation biologique ou photochimique. Une voie importante et efficace pour l'élimination des AINS_s lors de leur infiltration dans le sol, est bien la sorption. Elle est dépendante de l'étendue des espèces neutres et ioniques présentes ainsi que des caractéristiques des groupes fonctionnels. De multiples facteurs contrôlent le processus de sorption (la

lipophilie, l'acidité du composé et les conditions ambiantes : pH, force ionique, température, agents complexants, propriétés de la boue) (**Martínez-Hernández et al., 2016 ; Biel-Maeso et al., 2019**).

Dans l'ensemble, la sorption s'exprime par l'adsorption et l'absorption, et est estimée par la valeur K_d . Lorsque $\log K_d < 2,7$; la sorption est considérée comme négligeable. Pour une sorption efficace, le $\log K_d$ doit être supérieur à 2,5. L'adsorption fait intervenir des interactions électrostatiques, des groupements chimiques chargés positivement qui interagissent avec les surfaces des microorganismes chargées négativement. Les substances non polaires ont tendance à être adsorbés sur les boues contrairement à celles polaires qui restent dans la phase aqueuse. L'adsorption dans les boues des STEPs peut être améliorée (50 à 90%), grâce à l'utilisation de coagulants lors de la phase de décantation tels que les sels de fer et d'aluminium (**Bendz et al., 2005 ; Carballa et al., 2008 ; Vieno et Sillanpää, 2014**).

Dans l'adsorption, les groupes aliphatiques et aromatiques du composé interagissent de manière hydrophobe avec la membrane cellulaire lipophile des microorganismes et la fraction lipidique de la boue. Il a été démontré que le DCF a un potentiel de sorption faible à modéré, et 60% du DCF présent dans les eaux usées peuvent être éliminés par sorption. Le NAP et l'IBP peuvent subir la sorption au cours du traitement conventionnel des eaux usées (y compris l'utilisation de boues activées), et présentent un taux d'élimination élevé avec une efficacité allant de 60% à 100%. (**Ternes et al., 2004 ; Scheytt et al., 2005(b) ; Marchlewicz et al., 2016 ; Biel-Maeso et al., 2019**).

V.1.2. Hydrolyse et photodégradation :

La photodégradation est un procédé d'élimination des AINS, dans les eaux de surfaces. C'est une voie principale d'atténuation naturelle, qui implique une transformation chimique d'un composé, et elle est induite par la lumière directe ou indirecte. Toutefois, il convient de souligner que l'élimination de ces composés est une transformation qui conduit à la formation de plusieurs sous-produits indésirables voire même toxiques, plutôt qu'à une minéralisation (**Cruz-Morató et al., 2013 ; Li, 2014 ; Koumaki et al., 2017**).

La photolyse directe engage une absorption directe des photons lumineux par les polluants conduisant à des réactions chimiques, cette absorption n'est possible que lorsque le polluant possède des fonctions chimiques (**Andreozzi et al., 2003 ; Mathon et al., 2015**). Les études d'**Iovino et al., 2017**, ont montré que la photolyse UV directe est très efficace pour l'élimination du DCF, qui réagit rapidement avec les radicaux OH, une durée de traitement de 1 minute était suffisante pour obtenir une dégradation du DCF proche de 60%.

La photolyse indirecte implique des photosensibilisants naturels autres que les polluants tels que : le nitrate et les acides humiques, qui absorbent la lumière et deviennent excités électroniquement. Ces intermédiaires chimiques très réactifs, réagissent ensuite directement avec certaines molécules organiques, qui dégradent certains micropolluants. Le DCF présent dans l'environnement est généralement dégradé par photolyse à 273 nm à différents pH (**Andreozzi et al., 2003 ; Mathon et al., 2015 ; Poirier-Larabie et al., 2016**).

V.1.3. Procédés d'oxydation avancée (POAs) :

L'oxydation chimique vise la minéralisation des contaminants en dioxyde de carbone, eau et produits inorganiques ou, au moins, leur transformation en produits inoffensifs.

Ces procédés détruisent les polluants en phase aqueuse, et se basent sur l'intermédiaire d'espèces hautement réactives principalement les radicaux OH. Pour le traitement des eaux usées, les POAs utilisent des réactifs coûteux comme H₂O₂ et/ou O₃, et il est donc évident que leur application ne doit pas remplacer, chaque fois possible, les traitements plus économiques comme la biodégradation (**Andreozzi et al., 1999 ; Klavarioti et al., 2009**).

V.1.4. Ozonation :

Plusieurs études ont montré l'inefficacité de la chloration pour l'élimination des produits pharmaceutiques. Tandis que, l'ozonation, l'adsorption sur charbon actif et l'osmose inverse peuvent être efficaces.

L'ozonation a été utilisée traditionnellement dans le traitement de l'eau potable, afin de contrôler les odeurs et le goût, aussi pour la désinfecter, et dans certains cas même pour la désinfection des eaux usées, et est connue pour être un traitement efficace pour la destruction des produits pharmaceutiques.

Une caractéristique clé de l'ozone est sa décomposition en radicaux OH, eux à leur tour sont des agents oxydants plus puissants que l'ozone lui-même, induisant une oxydation indirecte ou s'attaquent sélectivement à certains groupes fonctionnels de molécules organiques par un mécanisme électrophile (**Klavarioti et al., 2009 ; Paucar et al., 2019**).

La réaction du DCF avec l'ozone implique une hydroxylation pour former une gamme de sous-produits. Le DCF a été effectivement dégradé en deçà de la limite de détection par ozonation, et a été complètement dégradé à une dose d'ozone de 2,3 mg.L⁻¹ (**Beltrán et al., 2009 ; Alharbi et al., 2016**).

V.2. Mécanismes d'élimination biotique :

V.2.1. La biodégradation :

Il a été démontré que la biodégradation était le mécanisme prédominant selon lequel les produits pharmaceutiques sont principalement éliminés dans les systèmes de traitement des eaux usées (**Almeida et al., 2013**).

La dégradation microbienne est une transformation biologique utile pour détoxifier les eaux usées et les environnements pollués. Divers micro-organismes sont impliqués, principalement les bactéries, parmi lesquelles 300 espèces peuvent être présentes. Le groupe des hétérotrophes prédominant, ces derniers se nourrissent principalement par assimilation de ces polluants en tant que substrats de croissance, ce qui conduit à leur transformation dans le sol en composés moins complexes, leur minéralisation complète ou leur biodégradation en d'autres produits de transformation (**Farooqi et al., 2008 ; Martínez-Hernández et al., 2016**).

Lorsque les composés organiques sont convertis en molécules chimiques inorganiques simples telles que l'eau ou le dioxyde de carbone (CO₂), ce processus de biodégradation est appelé « biominéralisation » ou « biodégradation normale », tant que ces molécules sont utilisées comme substrats de croissance par des microorganismes. Cependant, une biodégradation complète ne se produit pas toujours. Dans certains cas, la biodégradation conduit à la synthèse de molécules intermédiaires, que les micro-organismes ne peuvent plus assimiler, là de nouveaux micro-organismes interviennent pour les biodégrader (**Gauthier, 2010**).

L'élimination biologique des produits pharmaceutiques dans les stations de traitement des eaux usées municipales est probablement due à l'activité cométabolique.

Cela signifie que les composés pharmaceutiques ne peuvent être dégradés qu'en présence obligatoire d'un substrat primaire (substrat supportant la croissance). Le co-métabolisme se produit via des enzymes sécrétées par les bactéries qui décomposent les grosses molécules organiques en monomères suffisamment petits pour être ingérés (**Vieno et Sillanpää, 2014**).

Le DCF et l'IBP sont les plus couramment et abondamment détectés dans les influents et les effluents des STEP_s. Plusieurs études ont signalé la biodégradation des deux composés dans les STEP_s, avec des efficacités d'élimination différentes. En fonction des concentrations d'influents et des facteurs de fonctionnement, l'élimination se situe entre 0 et 100%. Il est nécessaire d'isoler des microorganismes ayant une grande capacité de dégradation de ces médicaments. Cependant, jusqu'à présent, seules quelques souches de bactéries pures capables de dégrader le DCF ou l'IBP ont été décrites (**Marchlewicz et al., 2016**).

L'objectif des études réalisées par **Langenhoff et al., (2013)**, était d'isoler des microorganismes dégradant les AINS_s et de caractériser leur efficacité de dégradation. L'IBP a été choisi comme modèle d'AINS pour effectuer la caractérisation cinétique à partir d'une des cultures pures. Ils ont trouvé que seuls deux microorganismes isolés de la boue activée pouvaient utiliser l'IBP, *Nocardia* sp., et *Sphingomonas* Ibu-2, et il a été rapporté que 75% de 300 mg.L⁻¹ du DCF est dégradé en trois semaines par une culture bactérienne enrichie.

V.2.2. Utilisation des bioréacteurs à membrane (MBR) :

Le bioréacteur à membrane (MBR) est l'une des technologies de pointe qui suscite l'intérêt depuis 25 ans. La technologie MBR intègre la dégradation biologique de la matière organique y compris les produits pharmaceutiques, présents dans les eaux usées avec la filtration sur membrane (**Radjenović et al., 2009**).

En ce qui concerne la capacité de dégradation biologique, les MBR équipés de membranes de micro- ou ultrafiltration immergées, ont des performances plus intéressantes par rapport à un traitement classique par les boues activées (**Sipma et al., 2010**). En outre, dans une étude de **Radjenović et al., (2009)**, 56% de l'élimination du métabolite humain du DCF, a été observée dans un MBR à échelle de laboratoire, contre seulement 26% dans le traitement par boues activées.

Moreira et al., (2018) ont signalé que la biomasse du MBR était capable de transformer 40% du DCF en 25 jours ; deux métabolites ont été identifiés comme produits finaux de biotransformation. Pareillement, **Palyzová et al., (2018)** ont rapporté la biotransformation du DCF ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) par *Raoultella* sp., mais cette capacité n'a été atteinte qu'après modification de la souche par mutagenèse chimique.

V.2.3. Les biofilms :

Dans l'environnement, il existe une diversité importante de bactéries, douées de capacités spécialisées de métabolisation et de minéralisation de nombreux produits pharmaceutiques. Par conséquent, la technologie de bioremédiation tire partie de ces biofilms microbiens naturels pour concevoir des systèmes plus efficaces permettant de surmonter les limitations actuelles, et ainsi de détoxifier et de recycler les AINS_s dans l'environnement (**Hultberg et al., 2016**).

Les biofilms sont des assemblages de populations uniques ou multiples, attachées à des surfaces abiotiques ou biotiques par le biais de substances polymères extracellulaires. La bioremédiation est également facilitée par le transfert accru de gènes entre organismes de biofilms, les microorganismes ont de meilleures chances d'adaptation et de survie (en particulier pendant les périodes de stress) car les cellules sont protégées au sein de la matrice (**Edwards et Kjellerup, 2013**).

Marco-Urrea et al., (2010) ont montré que, les réacteurs à biofilm se révélaient plus utiles que les boues activées traditionnelles, pour éliminer plusieurs AINS_s, tels que le DCF et l'IBP, et que dans des conditions aérobies, des biofilms des sédiments de rivières transformaient de manière extensive le DCF en p-benzoquinone imine de 5- OH diclofénac, qui n'était pas davantage dégradé, dans un processus apparemment co-métabolique.

Dans l'ensemble, bien que l'atténuation naturelle soit l'un des processus essentiels pour éliminer les AINS_s dans l'environnement, le résultat n'est pas satisfaisant. Certains d'entre eux peuvent être partiellement éliminés par atténuation naturelle, tandis que d'autres sont résistants à la dégradation et persistent dans l'environnement, comme le DCF ce qui peut présenter un risque pour la vie aquatique ou pour l'Homme (**Li et al., 2017**).

L'intégralité de notre travail a été réalisée au laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie ainsi qu'au laboratoire de Recherche Scientifique de l'Université de JIJEL, durant la période Avril-Juin de l'année 2019.

Matériel et méthodes :

I. Matériel et réactifs :

I.1. Matériel biologique :

La souche bactérienne identifiée *Citrobacter youngae* D16, a été fournie par Dr. Salima AISSAOUI du laboratoire de toxicologie moléculaire de l'Université de JIJEL. Cette bactérie a été préalablement isolée à partir d'un compost ménager de la région de KAOUS (JIJEL), utilisée dans la dernière partie de cette étude comme souche de référence.

I.2. Substance d'essai :

Les tests de biodégradation ont été réalisés sur le principe actif du médicament « Diclofénac », pur à 99 % sous forme de poudre blanche, fourni par l'unité de recherche du groupe pharmaceutique SAIDAL- Alger.

L'éthanol a été utilisé pour solubiliser le DCF, après le volume a été complété par de l'eau distillée, afin de préparer la solution mère du DCF à une concentration finale de 10 mg.ml⁻¹, qui a été par la suite stérilisée en utilisant des filtres millipores de 0.22 µm, recouverte par du papier aluminium et conservée à 4°C jusqu'à utilisation.

I.3. Solvants de l'HPLC :

- Acétonitrile (PROLABO).
- Eau.

I.4. Milieux de culture :

Les différents milieux de culture utilisés sont :

-Le milieu minéral minimum (MMM) préparé au laboratoire comme suit :

FeSO₄ ·7H₂O (0.013 g.L⁻¹), CaCl₂ ·2H₂O (0.013 g.L⁻¹), MgSO₄ ·7H₂O (0.25 g.L⁻¹), Na₂HPO₄ (7.5g.L⁻¹), KH₂PO₄ (5.0 g.L⁻¹), NH₄NO₃ (5.0 g.L⁻¹), extrait de levure (0.25 g.L⁻¹), l'agar-agar (15 g seulement dans le cas de la gélose MMM), eau distillée (1000 ml), le pH du milieu a été ajusté à 7 et l'autoclavage a été effectué à une température de 120°C pendant 15 minutes (Aissaoui et al., 2017).

- Gélose à l'œuf confectionnée au laboratoire comme suit :

La gélose nutritive a été additionnée d'une émulsion de jaune d'œuf stérile dilué au ½ en eau physiologique (concentration finale 10%, soit 2.5 ml pour 25 ml de milieu) (Joffin et Leyral, 2006).

II. Méthodes :

II.1. Réalisation de l'échantillonnage :

Quatre échantillons de sol ont été prélevés à partir du compost ménager de la région « Taher », et de la couche superficielle des terres agricoles de la wilaya de Jijel, plus précisément des régions « Jimar » et « Bouachir » (**tableau 5**), en période du mois de Mars 2019. Par la suite ils ont été collectés dans des sacs, et directement acheminés au laboratoire de recherche scientifique de l'université de Jijel.

L'échantillonnage a été effectué à des endroits divers, dans l'esprit d'isoler une variété de bactéries telluriques capables de réaliser une biodégradation des AINS_s.

Tableau 5. Sources des échantillons collectés.

Echantillons	Régions
Compost n° 1	Jimar
Compost n° 2	Bouachir
Compost n° 3	Bouachir
Compost n° 4	Taher

II.2. Phase d'adaptation :

Les médicaments utilisés lors de l'étape de l'adaptation, sont :

- Le diclofénac (DCF) : Rapidus[®], sous forme de comprimés pelliculés de diclofénac potassique de 50 mg, industrie du médicament ELKENDI.
- L'ibuprofène (IBP) : XYDOL[®] 200, sous forme de comprimés pelliculés de 200 mg, MERINAL laboratoires.

Chaque échantillon de compost a été mis dans un erlenmeyer, puis additionné des deux AINS_s, le DCF (3 comprimés) et l'IBP (2 comprimés). Un peu d'eau a été rajouté aux erlenmeyers dans le but d'humidifier les échantillons avant d'être recouverts par du papier aluminium. L'humidification des échantillons a été faite chaque 7 jours pendant une période de deux mois (Aissaoui et al., 2017).

II.3. Isolement des bactéries :

Dans des conditions d'asepsie, une série de dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) a été exécutée à partir de la solution mère préalablement préparée, en mettant 1g du compost dans 9 ml d'eau physiologique stérile. Après homogénéisation, 1 ml a été prélevé de la solution mère et introduit dans un tube contenant 9 ml d'eau physiologique ce qui nous a donné la dilution 10^{-1} . A partir de cette dernière, les dilutions 10^{-2} et 10^{-3} ont été effectuées.

Dans des conditions d'asepsie totale, 0.1 ml de la dilution 10^{-3} de chaque échantillon a étéensemencé d'une façon uniforme, par étalement à l'aide d'un râteau sur la surface du milieu solide : Milieu MMM additionné du DCF à une concentration finale de 10 mg.L^{-1} . Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h.

II.4. Purification des bactéries :

C'est une étape primordiale et très délicate, qui requête beaucoup de temps, puisqu'il s'agit d'un prélèvement qui abrite des milliers de microorganismes, et c'est de la pureté des cultures que va dépendre du reste du travail taxonomique.

Après l'étape de l'isolement sur milieu MMM, les colonies obtenues ont été prélevées et repiquées sur gélose nutritive (GN) préalablement coulée et séchée. L'ensemencement a été réalisé par la méthode de stries serrées. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h.

Le repiquage est refait sur milieu gélosé (GN) jusqu'à l'obtention des souches pures ayant des caractéristiques homogènes (aspect, couleur).

Une coloration de Gram s'est avérée indispensable pour la confirmation de la pureté des isolats.

II.5. Conservation des bactéries isolées :

Après avoir isolé les souches bactériennes capables d'utiliser le DCF comme seule source de carbone et d'énergie, nous passons à leur conservation dans des tubes à essai contenant le milieu GN inclinée. Les bactéries ont étéensemencées sur la pente des tubes par la méthode des stries serrées. Après incubation à 37°C, et dès l'apparition d'une bonne croissance bactérienne, les tubes sont placés dans un réfrigérateur à 4°C (Saidi et al., 2002).

II.6. Caractérisation phénotypique et biochimique des bactéries isolées :

Pour s'orienter pendant l'identification des 9 isolats, il faut exploiter les caractères de différenciation des genres bactériens. Une multitude de tests complémentaires à effectuer le long de l'étape de caractérisation pour pouvoir à la fin identifier les bactéries et aboutir à une taxonomie universelle.

II.6.1. Etude macroscopique :

Permet une distinction des bactéries les unes des autres selon des critères : la forme des colonies, la surface, l'opacité, le contour, consistance, etc...

II.6.2. Etude microscopique :

La coloration de Gram est une coloration différentielle, qui a été réalisée pour mettre en évidence les propriétés de la paroi, et les utiliser pour distinguer et classer les bactéries en Gram + (bien colorées en violet) ou Gram - (colorées en rose), tout en s'appuyant sur une observation microscopique.

II.6.3. Tests biochimiques :

L'étude biochimique nous oriente sur le métabolisme suivi par les bactéries étudiées et les enzymes qu'elles possèdent.

Donc elle permet de vérifier si la bactérie possède une enzyme particulière (ex : oxydase, catalase et lécithinase) ou si des molécules simples ou complexes sont dégradées (ex : sucres, gélatine).

- Le test de la catalase a été effectué. Il consiste à révéler la présence de l'enzyme catalase qui s'exprime par une effervescence et un dégagement d'O₂ (**Larpent, 1985**).
- Le test classique de la recherche de l'enzyme cytochrome oxydase ou oxydase consiste à déposer le disque imprégné de réactif sur une lame, prélever une colonie parfaitement isolée (plusieurs si petites colonies) et l'écraser sur le disque pendant une dizaine de secondes, la souche est oxydase+ si il y a apparition d'une couleur rose/violette (**Larpent, 1985**).
- L'API 20E est un système standardisé pour l'identification, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, comportant 20 microtubes qui contiennent 20 substrats déshydratés (le système de l'API 20E est résumé dans la **figure 6**). Les microtubes ont été inoculés avec une suspension bactérienne de chaque isolat. (Le principe de chaque test de l'API 20E a été expliqué, voir annexe 2).
 - **Préparation de l'inoculum bactérien :** Pour chaque souche, des cultures jeunes ont été préparées dans 10 ml de bouillon nutritif, incubés à 37 °C pendant 18h.

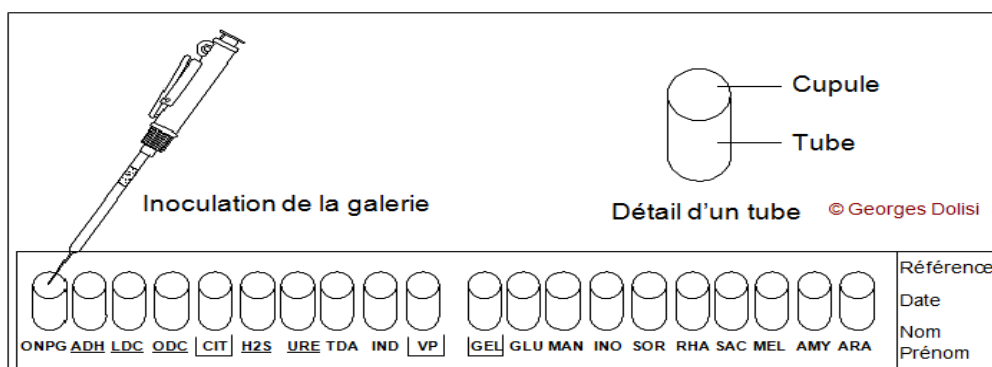


Figure 6. La galerie biochimique API 20E.

- La nitrate réductase a été recherchée sur bouillon nitraté. La lecture se fait après 24h d'incubation à 37°C, en ajoutant le N1 et le N2. Une coloration rouge signale la présence de nitrites dans le milieu, donc nitrate réductase positive au stade nitrites. S'il n'y a pas de changement de couleur, on ajoute le zinc comme révélateur (réducteur minéral). La présence d'une couleur rouge indique une réaction négative, en cas d'une absence de cette couleur, la bactérie est nitrate réductase positive au stade azote (**Larpent, 1985**).
- Le milieu mannitol mobilité a été utilisé pour rechercher simultanément la mobilité et la fermentation du mannitol, l'ensemencement a été fait par piqûre centrale. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24h. La mobilité se traduit par une diffusion tout au long de la strie, et la fermentation du Mannitol entraîne le virage du milieu au jaune (**Larpent, 1985**).
- La recherche de l'enzyme lécithinase a été faite sur gélose à l'œuf. Le jaune d'œuf est un substrat complexe composé de lécithine, de triglycérides et d'une lipoprotéine. Il permet donc de chercher les trois enzymes : la lécithinase, la lipase et les lipoprotéases (**Delarras, 2007**). On s'intéresse à chercher uniquement la lécithinase. L'ensemencement a été réalisé par une strie à la surface du milieu, et les boîtes ont été par la suite incubées à 37°C pendant 24h. La présence d'un trouble dont les limites d'une zone transparente autour de la strie indique un résultat positif.

II.7. Screening des souches bactériennes aptes à dégrader le Diclofénac :

C'est un test réalisé au préalable pour l'étude de la biodégradation, dans le but de sélectionner les souches bactériennes les plus performantes, qui se développent dans le milieu MMM où le DCF est la seule source disponible de carbone organique.

Pour la préparation de l'inoculum : des cultures jeunes de 18h ont été préparées pour les 9 souches dans 5 ml de bouillon nutritif (incubation à 37°C). Les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation (3000 rpm/20 min), le culot a été lavé deux fois par de l'eau physiologique stérile, puis suspendues dedans.

Un ml des suspensions de cellules bactériennes a été ajouté à des flacons contenant 19 ml du milieu MMM et du DCF à une concentration finale de 10 mg.L⁻¹.

Les échantillons ont été incubés dans des conditions d'agitation (Agitateur-incubateur) (150 rpm) à 37°C, et l'absorbance a été mesurée à 600 nm et suivie chaque 24h pendant 4 jours, pour estimer la croissance des cellules (**Marchlewicz et al., 2016**).

➤ **Calcul du Taux de croissance :**

Pour calculer le taux de croissance nous avons utilisé l'équation suivante :

$$\text{Taux de croissance } (\mu) = \frac{1}{DO_0} \times \frac{(DO_t - DO_0)}{T_t - T_0}$$

μ : le taux de croissance.

DO_t : densité optique dans une valeur du temps.

DO_0 : densité optique du temps initial.

T_t : le temps après l'incubation.

T_0 : le temps initial.

II.8. Effet de la variation du pH sur la croissance de la souche S2 en présence du Diclofénac :

La souche S2 a été sélectionnée par screening comme celle la plus performante, et la plus convenable pour réaliser le reste des tests. Le but de cette expérience est de déterminer le pH optimum dans lequel la souche d'intérêt résiste et donne une croissance maximale.

Pour une série de flacons contenant 9 ml de milieu MMM, le pH a été ajusté pour chaque flacon à des valeurs précises : pH 6 ; pH 6,5 ; pH 7 ; pH 7,5 et pH 8, par l'ajout de HCL 1M ou de NaOH 1M.

Une culture jeune de 18h de la souche S2 a été centrifugée à 3000 rpm/20 min. Le culot a été lavé deux fois par de l'eau physiologique stérile et suspendu dedans.

Un ml de la suspension bactérienne a été ajouté dans chaque flacon, et le DCF a été additionné à une concentration de 10 mg.L⁻¹

Tous les échantillons ont été incubés dans l'agitateur-incubateur (150 rpm) à 37°C, le suivi de la densité optique (DO) a été fait pendant 4 jours (mesure chaque 24h) à une longueur d'onde égale à 600 nm.

II.9. Effet de la variation de la concentration du Diclofénac sur la croissance de la souche S2 :

Cet essai a été réalisé dans le but d'évaluer l'effet de différentes concentrations (10 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹, 30 mg.L⁻¹, 40 mg.L⁻¹ et 50 mg.L⁻¹) de DCF, sur la croissance bactérienne et déterminer la concentration maximale tolérée par la souche S2.

La souche S2 a été cultivée dans 10 ml de bouillon nutritif (BN) à 37°C pendant 18h. Les cellules ont été récupérées par centrifugation à 3000 rpm/20 min, par la suite lavées deux fois par de l'eau physiologique stérile et suspendues dedans. Un ml de la suspension a été ajouté à une série de flacons contenant 9 ml du milieu MMM et différentes concentration du DCF variant de 10 mg.L⁻¹ à 50 mg.L⁻¹ (incubation à 37°C pendant 24h).

La croissance bactérienne a été estimée par mesure de la DO à 600 nm en t_{0h}, t_{24h}, t_{48h} et t_{72h}.

II.10. Test de biodégradation du Diclofénac en tant que source unique de carbone et d'énergie par la souche S2 et D16 :

Dans cette expérience, des erlenmeyers de 250 ml ont été utilisés dans des conditions d'asepsie totale pour un volume de 20 ml de MMM, inoculé avec 5 % d'une culture jeune de la souche bactérienne testée (S2) et la souche de référence D16 (séparément), lavées deux fois avec l'eau physiologique stérile et suspendues dedans. Le DCF a été ajouté au milieu à la concentration finale de 10 mg.L⁻¹ en tant que source unique de carbone organique.

Les Erlenmeyers ont été couverts par du papier aluminium pour éliminer l'effet de la photodégradation et fermés par le coton et la gaze pour assurer l'aération. L'incubation se fait dans l'agitateur-incubateur à 37°C et 150 rpm.

Des mesures de la DO à 600 nm ont été réalisées chaque 24h pendant 3 jours, dont le but est de suivre la croissance bactérienne au fur et à mesure que la biodégradation du DCF se déroule. Parallèlement, un échantillon de 2 ml a été prélevé pour l'analyse du DCF résiduel par HPLC, et ce après microfiltration à travers des filtres millipores à 0.22µm (Larcher et Yargeau, 2011 ; Aissaoui et al., 2017).

II.11. Analyse du Diclofénac par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) :

Elle permet l'identification, la séparation et le dosage de composés chimiques dans un mélange, même à des traces grâce à sa précision.

Pour l'analyse, l'appareil de l'HPLC équipé d'une colonne C-18 apolaire inversée, une pompe (LC-20 AT), un dégazeur (DGU -20A3), un détecteur UV-visible (SPD- 20AV) et un enregistreur (CR 8A) a été employé. Un mélange d'acétonitrile et d'eau (85 : 15% V : V) a servi comme phase mobile avec un débit de 1ml/min. Une seringue spécifique de 20 µl a été utilisée pour l'injection du DCF, et la concentration a été déterminée à une longueur d'onde de 270 nm (**Dhaneshwar et Bhusari, 2010**).

En utilisant l'équation (**Zwiener et Frimmel, 2003**) en dessous, le pourcentage de dégradation du DCF a été calculé :

$$\text{Taux d'élimination (\%)} = \frac{c_0 - c_i}{c_0} (100)$$

C_0 : la surface du pic de médicament en T_0

C_i : la surface du pic de médicament en T

Une courbe d'étalonnage externe a été réalisée avant le dosage par HPLC, à partir des solutions de concentrations connues de DCF (une gamme de 5 mg.L⁻¹ à 25 mg.L⁻¹). Une mesure du paramètre sur l'échantillon (DCF) a été effectuée, et par la suite comparée à la courbe d'étalonnage. Cette méthode s'emploie lorsque le volume injecté est précis (comme le cas dans notre expérience), ainsi qu'elle présente une facilité de mise en œuvre. L'exploitation du coefficient de corrélation linéaire R^2 permet de donner des résultats directement proportionnels à la concentration du DCF (quantité de la substance à analyser), et corriger l'écart à la linéarité.

I. Isolement et identification des bactéries dégradant le Diclofénac :

L'ensemencement sur le milieu MMM gélosé additionné de DCF (10 mg.L⁻¹) comme seule source de carbone, nous a permis d'isoler neuf colonies distinctes qui ont fait l'objet de ce travail.

I.1.Caractérisation phénotypique et biochimique des isolats bactériens :

I.1.1. Observation macroscopique :

L'observation de la morphologie coloniale des neuf isolats, nous a permis d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

Les différents critères sur lesquels on s'est basé pour faire la distinction entre les neuf isolats, sont mentionnés dans le **tableau 6**.

Tableau 6. Observation macroscopique des neuf isolats.

Isolats	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Critères									
Forme coloniale	Ronde	Ronde	Ronde	Punctiforme	Envahissante	Punctiforme	Punctiforme	Irrégulière	Envahissante
Taille	Moyenne	Petite	Petite	Petite	Moyenne	Petite	Petite	Petite	Moyenne
Couleur	Crème	Blanche	Blanche	Jaune	Blanche	Saumon	Blanche	Blanche	Blanche
Contour	Régulier	Régulier	Régulier	Régulier	Irrégulier	Régulier	Régulier	Irrégulier	Irrégulier
Élévation	Convexe	Plane	Elevée	Plane	Convexe	Convexe	Plane	Elevée	Convexe
Opacité	Opaque	Translucide	Translucide	Opaque	Translucide	Translucide	Transparente	Transparente	Opaque
Consistance	Grasse	Grasse	Crémeuse	Grasse	Gluante	Grasse	Gluante	Crémeuse	Crémeuse
Aspect	Lisse	Lisse	Lisse	Lisse	Granuleux	Granuleux	Granuleux	Granuleux	Lisse

I.1.2. Observation microscopique :

Après avoir purifié les différents isolats, une observation au microscope optique a été réalisée après une coloration de Gram, les cellules ont la forme de coque ou de bacille colorés en violet (Gram+) ou en rose (Gram-). L'observation se fait en lumière blanche, éclairage direct de la préparation (grossissement : objectif x100) (voir annexe). Les résultats montrent qu'il existe deux isolats Gram- avec la forme bacille (S2 et S3), et les sept isolats restant sont des Gram+ avec des formes ; bacilles (S1 et S6), coques (S7, S8 et S9) et coccobacille (S5) (**tableau 7**). On note aussi que l'isolat S6 présente des spores (voir annexe 3).

Tableau 7. Aspect microscopique des souches isolées.

Isolats	Gram	Forme cellulaire
S1	+	Bacille
S2	-	Bacille
S3	-	Bacille
S4	+	Coque
S5	+	Coccobacille
S6	+	Bacille
S7	+	Coque
S8	+	Coque
S9	+	Coque

I.1.3 Résultats des tests biochimiques :

En ce qui concerne les résultats des tests biochimiques effectués sur les isolats par le biais du système API 20E et les tests complémentaires (voir annexe 4), sont regroupés dans le **tableau 8**.

Tableau 8. Caractéristiques biochimiques des neuf isolats.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
Catalase	-	+	+	+	+	+	-	-	+
ONPG	-	-	+	-	+	-	+	+	-
ADH	-	-	+	-	+	-	+	+	-
LDC	-	-	-	-	+	-	-	-	-
ODC	-	-	+	-	+	-	-	-	-
CIT	-	-	+	-	+	+	+	+	-
H₂S	-	-	-	-	-	-	+	+	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	+	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	+	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	+	-	-	-	-
GEL	-	+	+	-	+	+	-	-	+
GLU	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MAN	-	-	+	+	+	-	+	+	-
INO	-	-	+	+	+	-	+	+	-
SOR	-	-	+	+	+	-	+	+	-
RHA	-	-	+	+	+	-	+	+	-
SAC	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MEL	-	-	+	+	+	-	+	+	-
AMY	-	-	+	+	+	-	+	+	-
ARA	-	-	+	+	+	-	+	+	-
Mobilité	+	+	+	-	+	-	-	-	+
NR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lécithinase	-	-	+	-	+	-	+	-	-

+ Résultat positif, - Résultat négatif.

Affiliation :

L'identification d'une bactérie consiste à définir son appartenance à une espèce. L'ensemble des tests biochimiques réalisés, constitue un kit d'identification.

En fonction du profil de réponses observé, on estime la probabilité d'appartenance à chaque espèce. L'identification reste, cependant présomptive et non confirmative.

Suivant les clés de détermination (**Figure 7**) (voir annexe 5), et le logiciel « APIDENT » qui est un logiciel permettant l'identification des bacilles Gram-, on suspecte l'appartenance de trois souches aux espèces suivantes :

- La souche S2 : a été identifiée comme *Aeromonas salmonicida* à 62,6 %.
- La souche S3 : a été identifiée comme *Enterobacter sakazakii* à 99,3%.
- La souche S6 : a été identifiée comme *Bacillus* sp.

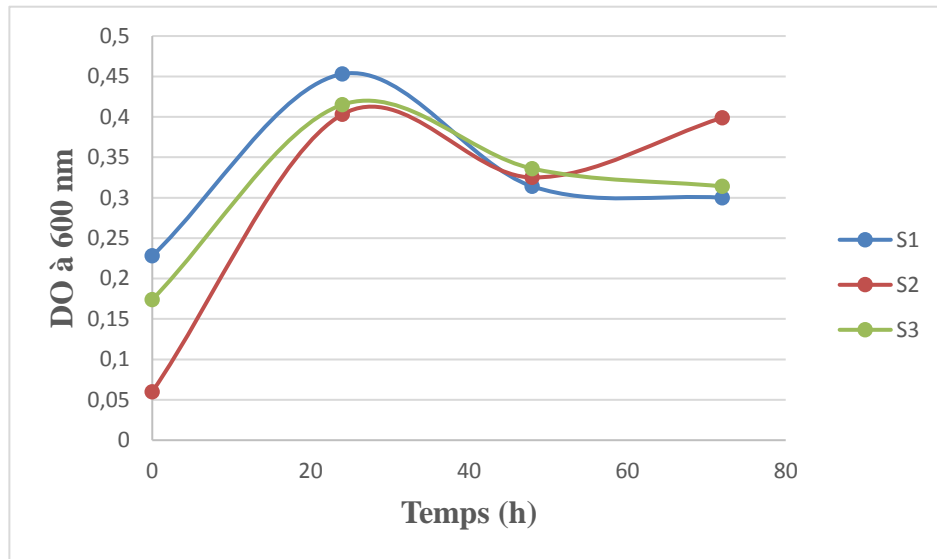
Le reste des isolats n'a pas pu être identifié à cause du manque des moyens (non disponibilité des disques à oxydase).

II. Screening des souches bactériennes aptes à dégrader le Diclofénac :

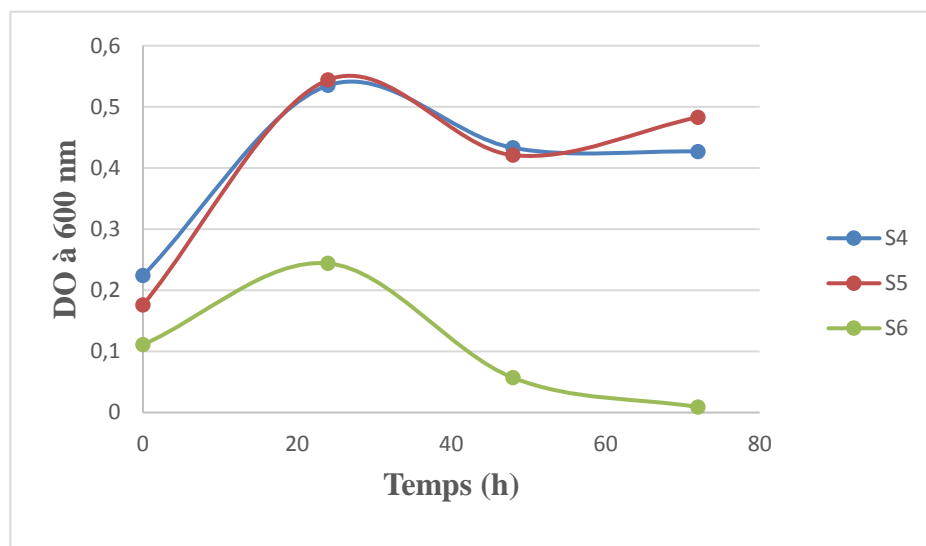
Ce test a été exécuté dans le but de sélectionner efficacement une souche, ayant une aptitude à croître et à se développer, dans le milieu MMM en présence de 10 mg.L⁻¹ de DCF comme seule source de carbone et d'énergie. La croissance a été suivie par mesure de la DO à 600 nm pendant 3 jours, et les résultats sont présentés dans **la figure 8**.

Les valeurs de la DO obtenues (**Tableau 9**) (voir annexe 6), ont montré que l'ensemble des souches sont capables de se multiplier en présence du DCF, donc probablement utiliser le DCF à une concentration de 10 mg.L⁻¹ comme seule source de carbone et d'énergie.

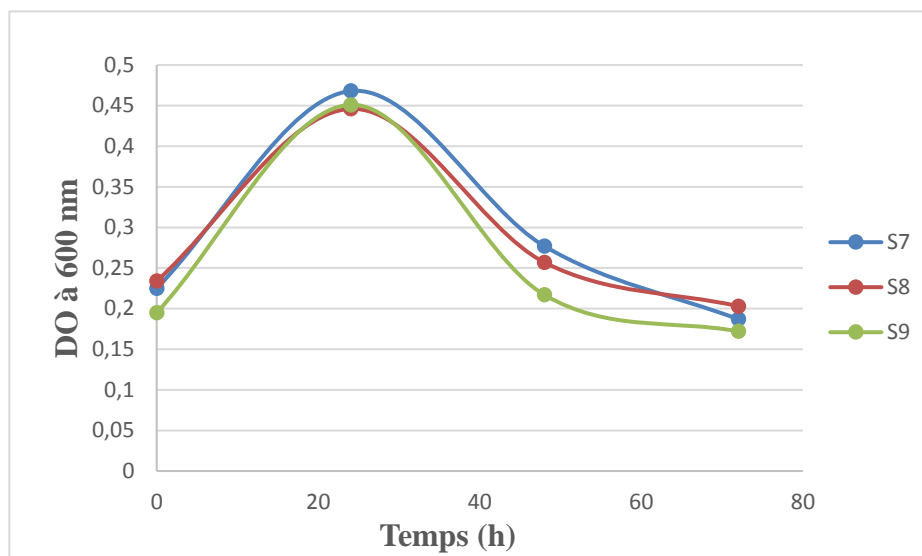
La croissance bactérienne est directement liée à l'utilisation de la source de carbone et d'énergie, qui est le facteur important étudié dans cette expérience. Donc le fait que, les bactéries isolées sont capables de croître dans le milieu MMM contenant le DCF, indique qu'elles ont probablement la capacité de résister et/ou de métaboliser le DCF ainsi que ses dérivés, ils sont alors probablement aptes à le biodégrader.



(a)



(b)



(c)

Figure 8. Cinétique de croissance des neuf souches isolées en fonction du temps sur milieu MMM en présence du DCF à 10 mg.L⁻¹ à 37°C.

(a) : les souches S1, S2 et S3, (b) : les souches S4, S5 et S6,

(c) : les souches S7, S8 et S9.

D'après la **figure 8**, on observe une faible densité optique en temps 0 pour toutes les souches isolées, les valeurs sont entre 0,06 et 0,23, suivie d'une multiplication progressive des neuf souches durant les premiers temps d'incubation, jusqu'à atteindre une valeur maximale après 24h d'incubation : 0,453 ($\mu_1 = 0,041 \text{ h}^{-1}$), 0,403 ($\mu_2 = 0,238 \text{ h}^{-1}$), 0,415 ($\mu_3 = 0,057 \text{ h}^{-1}$), 0,535 ($\mu_4 = 0,057 \text{ h}^{-1}$), 0,544 ($\mu_5 = 0,087 \text{ h}^{-1}$), 0,244 ($\mu_6 = 0,049 \text{ h}^{-1}$), 0,468 ($\mu_7 = 0,044 \text{ h}^{-1}$), 0,446 ($\mu_8 = 0,037 \text{ h}^{-1}$), 0,451 ($\mu_9 = 0,054 \text{ h}^{-1}$). *Aeromonas salmonicida* S2 exhibe un maximum de croissance par rapport aux autres souches avec un taux de croissance égale à 0,238 h⁻¹. Les taux de croissance sont mentionnés dans le **tableau 10** (voir annexe 6).

Une légère diminution de la croissance bactérienne est observée à 48h, suivie d'une stabilisation jusqu'à 72h. L'absence de la phase de latence est due à l'acclimatation des bactéries présentes dans le compost qui a été enrichi dans les mêmes conditions expérimentales, donc les souches ont adapté un système enzymatique nécessaire pour la dégradation de ce micropolluant (DCF).

Ce contexte a été confirmé par d'autres chercheurs, en évoquant sur la nécessité de l'étape d'enrichissement, et qu'au cours de laquelle les communautés microbiennes commencent à exprimer des enzymes capables de décomposer ces produits pharmaceutiques cibles. Un temps de rétention des boues supérieur à 150 jours est nécessaire pour atteindre 70% de la dégradation du DCF, dans un réacteur avec un taux de charge compris entre 2,5 et 10 mg.L⁻¹ par jour. Un autre exemple rapporte qu'après une période d'acclimatation de 6,5 mois, une dégradation de CBZ et de DCF par enrichissement respectif a été observée. il atteint une dégradation de 62% de CBZ et de 78% de DCF, correspondant à une dégradation 0,15 ml.L⁻¹ par jour et de 0,19 mg.L⁻¹ par jour du substrat, respectivement (**Bessa et al., 2017**).

Le ralentissement de la croissance bactérienne, peut être expliqué probablement par un épuisement du milieu de culture en éléments nutritifs d'où le substrat (DCF) est devenu limitant, et aussi à cause d'une accumulation des métabolites secondaires (dérivés de dégradation du DCF), qui peuvent avoir un effet toxique au fur et à mesure de la métabolisation du substrat, alors que la stabilité de la multiplication cellulaire pourrait être due à une compensation entre mort cellulaire et division.

En se référant aux résultats obtenus, nous avons sélectionné la souche *Aeromonas salmonicida* S2 comme souche expérimentale pour compléter le reste des tests, vu qu'elle présente une bonne croissance avec un taux de croissance de 0,238 h⁻¹ ainsi qu'une forte stabilité dans le milieu MMM en présence de DCF.

III. Effet de la variation du pH sur la croissance bactérienne de la souche S2 en présence du Diclofénac :

Etant donné que divers paramètres physicochimiques influencent sur l'efficacité de la dégradation du DCF, il est essentiel d'optimiser ces facteurs afin de rendre le processus plus efficace et applicable en pratique.

La croissance bactérienne de la souche *Aeromonas salmonicida* S2 a été déterminée à différentes valeurs de pH variant de 6 à 8 par mesure de l'absorbance à 600 nm (**Tableau 11**) (voir annexe 6).

Les résultats obtenus sont représentés par les courbes de la **figure 9**.

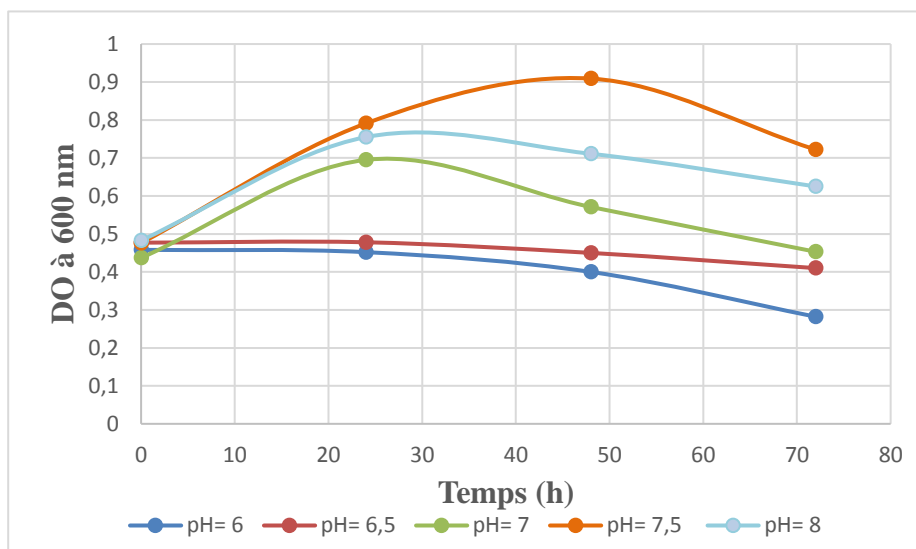


Figure 9. Effet de la variation du pH sur la croissance de la souche S2 sur milieu MMM additionné de 10 mg.L⁻¹ de DCF.

En observant les courbes dans la **figure 9**, on peut dire que l'efficacité de la biodégradation du DCF augmente rapidement avec l'augmentation du pH, jusqu'à pH 7,5.

Les résultats obtenus ont montré que la croissance maximale (DO = 0,909) a été atteinte à un pH de 7,5, tandis qu'à un pH de 6, la croissance bactérienne était beaucoup plus faible (DO = 0,400). On observe aussi que la croissance bactérienne marque une stabilité à pH 6 et 6,5.

Nos résultats concordent avec ceux de **Shen et al., (2015)**, ces auteurs ont trouvé que les valeurs de pH ont eu un effet significatif sur l'efficacité de la dégradation des xénobiotiques. L'étude est basée sur l'évaluation de l'effet de la variation du pH (de 5,0 à 10,0), sur la dégradation de la pyridine dans le MMM par la souche isolée NJUST18 qui a été identifiée comme étant *Rhizobium* sp.. La dégradation de la pyridine réalisée en 102 et 105 heures était optimale à un pH de 7,0 et 8,0 respectivement. À un pH initial de 5,0 et 6,0, une phase de latence prolongée a été observée, probablement en raison de l'effet inhibiteur de l'acidité sur l'activité des enzymes intracellulaires de la bactérie. De faibles performances de dégradation de la pyridine à pH acide ont également été observées par **Li et al., (2017)**.

Les résultats de notre expérience ont indiqué qu'un pH neutre à légèrement alcalin pourrait convenir à la dégradation du DCF par la souche S2.

Il est à noter que le pKa du DCF indique qu'il existe partiellement sous forme dissociée dans l'eau (en forme d'anion). Le degré d'ionisation influence sur la biodisponibilité des molécules, leur réactivité chimique et physique et par conséquent, leur devenir dans l'environnement. Les produits pharmaceutiques acides, tels que le DCF (avec une valeur de pKa de 4,1 à 4,9), se présentent sous forme d'ions à pH neutre. Par conséquent, ils ne sont pas facilement adsorbés par les boues et restent dans la phase aqueuse ; une adsorption limitée pourrait se produire à faible pH. L'absence de l'adsorption et l'élimination abiotique du DCF a confirmé que toute diminution de la concentration en composé cible pourrait être attribuée exclusivement à l'activité biologique (Vieno et Sillanpää, 2014, Aissaoui et al., 2017).

La biosorption peut arriver, cela signifie que la réduction de la concentration du DCF dans les échantillons microbiologiquement actifs, n'est pas due à l'activité biologique (biodégradation). Cette hypothèse peut être confirmée par un test d'adsorption.

IV. Effet de la variation de la concentration du Diclofénac sur la croissance bactérienne de la souche S2 :

Le but de cette expérience est, d'estimer l'effet qu'exerce le DCF sur la croissance de la souche *Aeromonas salmonicida* S2, et de déterminer la concentration maximale du DCF tolérée par la souche.

Une gamme de différentes concentrations croissantes de DCF a été utilisée, en partant de 10 mg.L⁻¹ jusqu'à 50 mg.L⁻¹. Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau 12** (Voir annexe 6) et la **figure 10**.

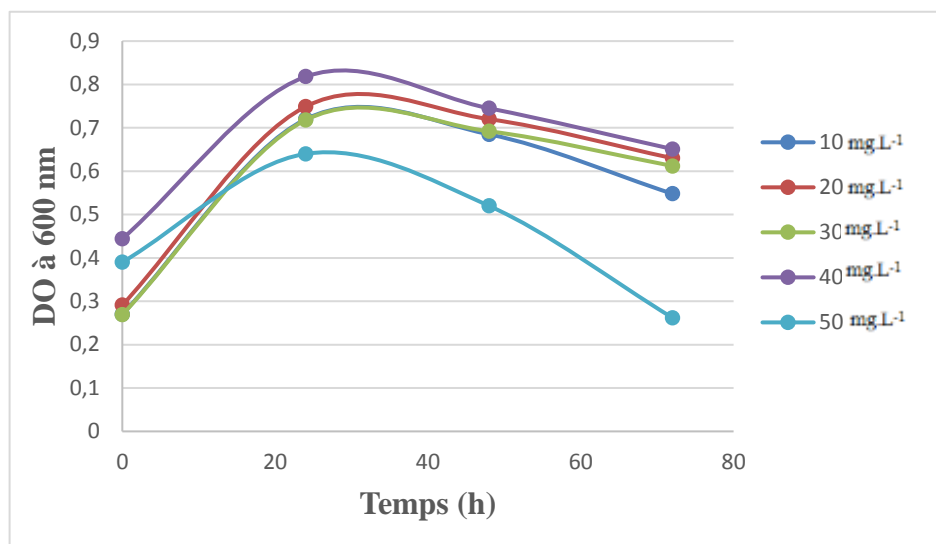


Figure 10. Effet de la variation de la concentration du DCF sur la croissance de la souche S2.

Selon la **figure 10**, on remarque qu'il y a une croissance en présence du DCF à différentes concentrations testées, certaines sont plus importantes que d'autres, ce qui indique que le DCF pourrait favoriser la croissance des bactéries résistantes, et qu'il pourrait être dégradé par la bactérie.

Une augmentation graduelle de la croissance de la souche S2 durant les premières heures, a été observée jusqu'à atteindre son maximum à 24h. La concentration de 40 mg.L⁻¹ de DCF, marque la DO la plus élevée (0,818). Quant à la plus forte concentration de DCF (50 mg.L⁻¹), elle a noté la moindre valeur de DO (0,640), cela indique une faible croissance cellulaire par rapport aux autres concentrations, et cela peut être expliqué par l'effet inhibiteur du DCF, comme rapporté par **Aissaoui et al., (2017)**, qu'à très fortes concentrations (50-100 mg.L⁻¹), le DCF peut inhiber la croissance des bactéries Gram positif et Gram négatif.

Concernant les concentrations 10, 20 et 30 mg.L⁻¹ de DCF, la croissance bactérienne est qualifiée moyenne, avec des valeurs de DO de 0,72, 0,749 et 0,718, respectivement.

Il est clairement montré qu'à partir de 24h jusqu'à 72h, une diminution continue de la croissance cellulaire en présence de 10, 20, 30, 40 et 50 mg.L⁻¹ de DCF ait lieu, cette réduction de la croissance pourrait s'expliquer par l'épuisement du substrat, et l'accumulation des métabolites générés lors de la dégradation du DCF.

Les concentrations des produits pharmaceutiques dans l'environnement se situent principalement dans la fourchette de $\text{ng}\cdot\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; toutefois, certains chercheurs ont signalé des niveaux plus élevés dans les effluents des hôpitaux et des fabricants de produits pharmaceutiques allant jusqu'à plusieurs $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. De ce fait, l'effet du DCF à différentes concentrations élevées ($10\text{-}1000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) a été testé afin de déterminer la concentration maximale tolérable par les bactéries, ils ont trouvé que plus cette valeur sera élevée, plus la souche sera compétente (Aissaoui et al., 2017). Des recherches ont abordé l'impact du DCF ainsi que du CBZ sur les communautés microbiennes du sol. Certains phylotypes sont apparus bénéficier du DCF alors que d'autres ont été affectés négativement (Thelusmond et al., 2018).

Une hypothèse plausible pour la diminution de la croissance bactérienne, est la toxicité du DCF sur les populations bactériennes. Les données sur la toxicité varient d'un produit pharmaceutique à un autre. Toutefois, le DCF semble être le composé présentant la toxicité aiguë la plus élevée dans la classe des AINS_s. En outre, les produits de transformation microbienne de produits pharmaceutiques peuvent présenter une toxicité accrue par rapport au composé d'origine (Fent et al., 2006 ; Kot-Wasik et al., 2007).

La souche *Bacillus thuringiensis* B1 (2015b) a été adaptée à la dégradation de $20\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'IBP dans 6 jours. Cependant, $46,56\%$ des $25\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'IBP a été dégradé par cette souche pendant 20 jours. D'autres chercheurs ont observé une intensification de la dégradation du NAP et de l'IBP par des boues activées en présence du lait en poudre utilisé comme substrat de croissance. Dans d'autres études, le glucose a été utilisé comme source de carbone et d'énergie, et il en est résulté une amélioration significative de l'activité de dégradation des AINS_s. Simultanément, la diminution de la croissance n'a pas été observée. Les champignons *Trametes versicolor*, *Irpex lacteus*, *Ganoderma lucidum* et *P. chrysosporium*, sont capables de dégrader l'IBP. Tous, à l'exception de *P. chrysosporium*, ont dégradé $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'ibuprofène à des niveaux non détectables (Marchlewicz et Wojcieszńska, 2015 ; Marchlewicz et al., 2016).

V. Test de biodégradation du Diclofénac en tant que source unique de carbone et d'énergie par les souches S2 et D16 :

Ce test porte sur la biodégradation du DCF par les souches sélectionnées : La souche *Aeromonas salmonicida* S2 et une souche de référence isolée à partir du compost ménager et identifiée préalablement comme *Citrobacter youngae* D16.

Le test a été réalisé pendant 48 h dans l'obscurité, afin d'éviter la dégradation du substrat par voie photochimique. La croissance bactérienne a été suivie par mesure de la DO après chaque 24h (t_0 , t_{24} et t_{48}), et la concentration du DCF résiduelle a été mesurée par HPLC tout en déduisant le taux d'élimination. La **figure 11** montre les résultats obtenus de la biodégradation.

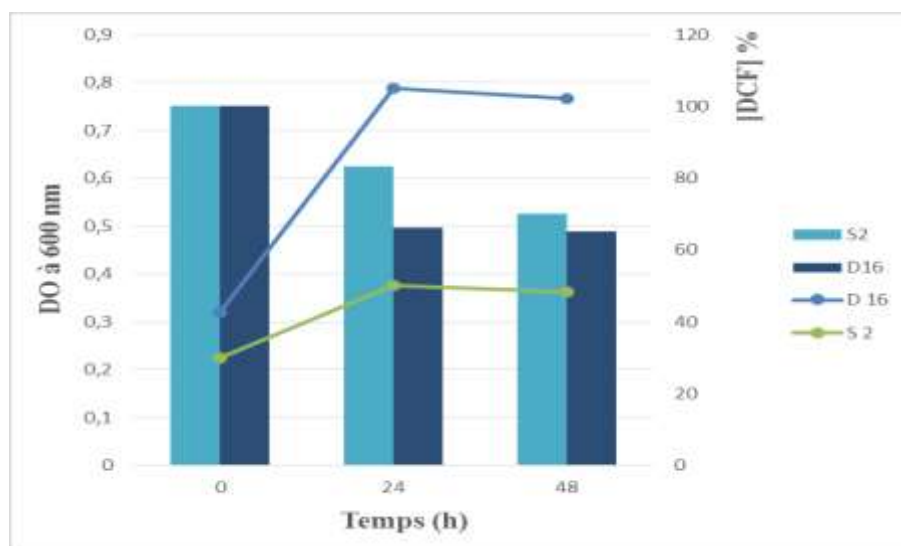


Figure 11. Biodégradation du diclofénac (DCF) par *Aeromonas salmonicida* S2 et *Citrobacter youngae* D16.

La **figure 11**, montre qu'il y a une croissance pour les deux souches (*Aeromonas salmonicida* S2 et *Citrobacter youngae* D16) présentes dans le milieu MMM contenant 10 mg.L^{-1} de DCF comme unique source de carbone et d'énergie, cela indique que ces souches ont la capacité à l'utiliser et/ou le dégrader.

On remarque que la croissance des deux souches augmente en fonction du temps. Les mesures de la DO pour *Aeromonas salmonicida* S2 correspondent à 0,224 en t_0 , 0,376 en t_{24h} et 0,362 en t_{48h} , alors que pour *Citrobacter youngae* D16, 0,319 en t_0 , 0,787 en t_{24h} et 0,766 en t_{48h} .

La croissance bactérienne a atteint son maximum après 24h, ces résultats indiquent que le médicament favorise la croissance des deux souches S2 et D16 ce qui confirme nos résultats précédents, donc la concentration 10 mg.L^{-1} du DCF n'a aucun effet négatif sur les deux souches. Les résultats de la biodégradation du DCF par les deux bactéries S2 et D16 ainsi que le taux d'élimination du DCF, sont résumés dans le **tableau 13** (Voir annexe 6). La **figure 12** montre le taux d'élimination du DCF par biodégradation.

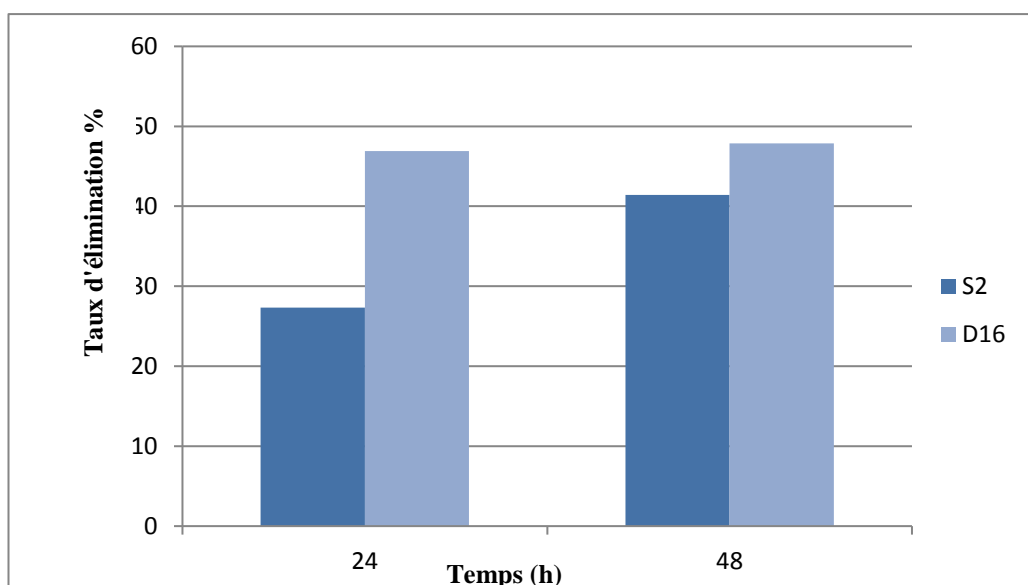


Figure 12. Taux d'élimination du DCF par biodégradation.

La **figure 12** montre un ralentissement léger de la croissance bactérienne a été observé durant la période entre t_{24h} et t_{48h} pour les deux souches, cela peut être dû à la diminution du substrat (DCF) dans le milieu. Le taux d'élimination du DCF en 48h par *Aeromonas salmonicida* S2 été de 41,43 %, et de 47,85 % pour *Citrobacter youngae* D16. Pour confirmer nos résultats précédents, la méthode d'HPLC a été utilisée pour détecter les pics qui peuvent résulter de la biodégradation du DCF par la souche S2 et la souche D16.

D'après les résultats des chromatogrammes obtenus (les résultats sont montrés dans les **figures 13, 14 et 15**) (voir annexe 6), un seul pic a été observé en t_0 qui correspond au DCF (10 mg.L^{-1}), avec un temps de rétention égal à environ 1,8 min (voir les chromatogrammes dans l'annexe). On remarque que la concentration de départ de DCF (10 mg.L^{-1}) présente dans le milieu MMM inoculé séparément avec la souche S2 et D16, a diminué en fonction du temps. Ce qui prouve que la souche S2 et D16 ont utilisé le DCF pour leur développement dans le milieu MMM.

Pour *Aeromonas salmonicida* S2, la concentration résiduelle du DCF a été de $8,33 \text{ mg.L}^{-1}$ et $6,99 \text{ mg.L}^{-1}$ en t_{24h} et t_{48h} , respectivement. Concernant *Citrobacter youngae* D16, la concentration était égale à $6,61 \text{ mg.L}^{-1}$ en t_{24h} et à $6,52 \text{ mg.L}^{-1}$ en t_{48h} (**figure 16 et 17**).

En même temps, nous avons remarqué l'apparition de nouveaux pics correspondant probablement à de nouveaux métabolites issus de la biodégradation du DCF, avec les différents temps de rétention suivants : 1,634 et 2,104 en présence de *Aeromonas salmonicida* S2, et 1,649 et 2,039 en présence de *Citrobacter youngae* D16.

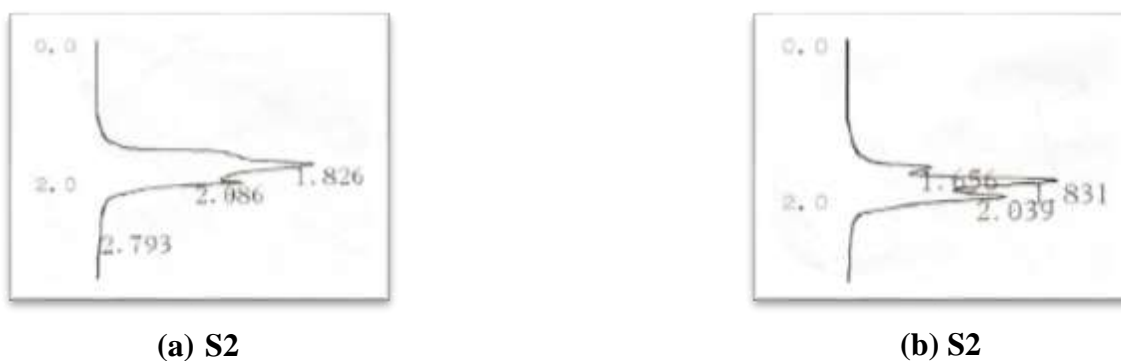


Figure 16. Chromatogrammes de la biodégradation du DCF par *Aeromonas salmonicida* S2.

(a) en t_0 , (b) en t_{48h} .



Figure 17. Chromatogrammes de la biodégradation du DCF par *Citrobacter youngae* D16.

(a) en t0, (b) en t48h.

D'autres chercheurs ont examiné les produits de transformation biologique du DCF par *Enterobacter cloacae*, et ils ont trouvé que cinq métabolites ont été produits (non identifiés) (Aissaoui et al., 2017). De même, pour le cas d'une biomasse dans une usine de traitement des eaux usées, lorsqu'elle a été exposée au DCF, jusqu'à 20 produits de transformation ont été détectés (Jewell et al., 2016). D'autres ont découvert trois produits de transformation de DCF (5- hydroxydiclofénac, DCF décarboxylée et nitroso DCF) en utilisant les effluents des eaux usées (Poirier-Larabie et al., 2016).

En règle générale, le DCF est peu biodégradable, ce qui se traduit souvent par des faibles taux d'élimination lors du traitement biologique des eaux usées (Vieno et Sillanpää, 2014). Une élimination rapide du DCF (<7 jours) a été observée dans des conditions aérobies, et les phylotypes des Protéobactéries, Gemmatimonadales et Actinobactéries étaient significativement plus abondants pendant la biodégradation du DCF (Thelusmond et al., 2018).

L'élimination biologique du DCF peut se produire par métabolisme ou par co-métabolisme (Vieno et Sillanpää, 2014). La dégradation cométabolique du DCF peut être la voie d'élimination biologique prédominante. Le cométabolisme est la transformation d'un substrat non utilisé pour la croissance en présence d'un substrat de croissance. Le terme « substrat non lié à la croissance » décrit des composés incapables de soutenir la croissance des cellules en tant que source unique de carbone (Nguyen et al., 2019).

La souche *Brevibacterium* sp. D4 était capable de biodégrader 35% de 10 mg.L⁻¹ de DCF comme seule source de carbone ; l'alimentation périodique avec de l'acétate comme source supplémentaire de carbone a permis d'améliorer la biodégradation jusqu'à des niveaux allant jusqu'à 90%, avec une augmentation concomitante du taux de biodégradation (**Bessa et al., 2017**).

Par ailleurs, la concentration de DCF a diminué d'environ 90% après 3 jours de traitement et le DCF a été complètement disparu après 6 jours de traitement. Ces résultats indiquent que le traitement fongique élimine efficacement le DCF. De plus, il a été confirmé que *Phanerochaete sordida* YK-624 avait presque complètement éliminé la toxicité létale du DCF vis-à-vis du crustacé *Thamnocephalus platyurus* d'eau douce après 6 jours de traitement (**Hata et al., 2010**).

L'une des voies de dégradation de l'IBP la plus complète a été caractérisée chez *Sphingomonas* Ibu-2, qui est capable d'utiliser l'IBP comme source de carbone et d'énergie, tout en se basant sur des analyses génétiques (un groupe de cinq gènes : ipfABDEF, codants pour les enzymes potentiellement impliquées dans le catabolisme de l'ibuprofène) (**Marchlewicz et al., 2015**).

Bacillus thuringiensis B1 (2015b), présente la capacité de dégrader 5 mg.L⁻¹ d'IBP en 2 jours et de petites quantités de NAP, une diminution de la densité optique des cultures bactériennes a été observée. Cela indique que ces composés ne sont pas suffisants comme source de carbone. On sait qu'une source de carbone supplémentaire peut améliorer la capacité de dégradation de la souche en augmentant la biomasse. *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 est connue pour métaboliser une large gamme de composés aromatiques y compris le NAP. La nature aromatique du NAP, ainsi que le potentiel de dégradation de la souche KB2, suggère *S. maltophilia* KB2 en tant que candidat possible à la transformation et/ou dégradation de ce médicament (**Marchlewicz et al., 2016 ; Moreira et al., 2018**).

Cette étude a été effectuée dans le but d'étudier l'impact que présentent quelques substances pharmaceutiques de la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens, notamment le diclofénac, sur la croissance des bactéries isolées du sol.

Neuf isolats de bactéries cultivées sur milieu MMM gélosé additionné de DCF à une concentration de 10 mg.L⁻¹ ont été isolés. Une étape de purification a été réalisée par repiquage successif des bactéries sur milieu gélosé (GN).

Seulement trois bactéries ont pu être identifiées à cause du manque de moyens (non disponibilité des disques à oxydase qui présente un test clé dans l'identification). En utilisant le logiciel « APIDENT » et la clé dichotomique de différenciation des bacilles à Gram positif, la souche S2 a été identifiée à 62,6 % comme *Aeromonas salmonicida*, la souche S3 à 99.3 % comme *Enterobacter sakazakii* et la souche S6 comme *Bacillus* sp.

Le screening des bactéries aptes à dégrader le DCF a été réalisé sur milieu MMM liquide contenant 10 mg.L⁻¹ de DCF. La souche *Aeromonas salmonicida* S2 a été sélectionnée comme souche expérimentale pour compléter le reste des tests vu qu'elle présente une bonne croissance avec un taux de 0.238 h⁻¹ ainsi qu'une forte stabilité dans le milieu MMM en présence du DCF comme source unique de carbone et d'énergie.

L'effet de la variation du pH sur la croissance de la souche S2 en présence du DCF a été étudié. Les résultats obtenus ont montré que la croissance maximale (DO = 0,909) a été atteinte à un pH de 7,5. Pour le test de l'effet de la variation de la concentration du DCF sur la croissance bactérienne de la souche S2, nous avons remarqué que la croissance est maximale en présence de 40 mg.L⁻¹ de DCF, marquant la DO la plus élevée (0.818).

La biodégradation du DCF en tant que source unique de carbone et d'énergie a été étudiée pour deux souches, notre souche *Aeromonas salmonicida* S2 et *Citrobacter youngae* D16 (Souche de référence) par HPLC. Le DCF (10 mg.L⁻¹) est partiellement biodégradé en 48h, avec un taux d'élimination de 41.43% et de 47.85% pour la souche S2 et D16, respectivement.

L'inoculum obtenu par enrichissement à partir du sol héberge des bactéries capables de dégrader le micropolluant DCF (AINS), qui peuvent potentiellement jouer un rôle dans l'amélioration des traitements des eaux usées contenant ces produits pharmaceutiques, et augmenter leur efficacité en termes d'élimination, et de même les utiliser pour le processus de bioremédiation de l'environnement. Néanmoins, il serait intéressant de poursuivre ce travail, notamment de faire l'identification des bactéries isolées par des techniques de biologie moléculaire et utiliser une méthode analytique couplée à un spectrophotomètre de masse pour pouvoir identifier les métabolites issus de la biodégradation.

A

- Achilleos, A., Hapeshi, E., Xekoukoulotakis, N. P., Mantzavinos, D., et Fattakassinou, D. (2010).** UV-A and solar photodegradation of ibuprofen and carbamazepine catalyzed by TiO₂. *Separation Science and Technology*, 45(11): 1564-1570.
- Aissaoui, S., Ouled-Haddar, H., Sifour, M., Harrouche, K., et Sghaier, H. (2017).** Metabolic and co-metabolic transformation of diclofenac by *Enterobacter hormaechei* D15 isolated from activated sludge. *Current microbiology*, 74(3) : 381-388.
- Al Aukidy, M., Verlicchi, P., Jelic, A., Petrovic, M., et Barcelò, D. (2012).** Monitoring release of pharmaceutical compounds: occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Science of the Total Environment*, 438 : 15-25.
- Alharbi, S. K., Price, W. E., Kang, J., Fujioka, T., et Nghiem, L. D. (2016).** Ozonation of carbamazepine, diclofenac, sulfamethoxazole and trimethoprim and formation of major oxidation products. *Desalination and Water Treatment*, 57(60) : 29340-29351.
- Almeida, B., Oehmen, A., Marques, R., Brito, D., Carvalho, G., et Crespo, M. B. (2013).** Modelling the biodegradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by activated sludge and a pure culture. *Bioresource Technology* , 133 : 31-37.
- Al-Rajab, A. J., Sabourin, L., Lapen, D. R., et Topp, E. (2015).** Dissipation of triclosan, triclocarban, carbamazepine and naproxen in agricultural soil following surface or sub-surface application of dewatered municipal biosolids. *Science of the Total Environment*, 512 : 480-488.
- Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A., et Marotta, R. (1999).** Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53(1): 51-59.
- Andreozzi, R., Raffaele, M., et Nicklas, P. (2003).** Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50(10) :1319-1330.

Aziz, K. H. H., Miessner, H., Mueller, S., Kalass, D., Moeller, D., Khorshid, I., et Rashid, M. A. M. (2017). Degradation of pharmaceutical diclofenac and ibuprofen in aqueous solution, a direct comparison of ozonation, photocatalysis, and non-thermal plasma. *Chemical Engineering Journal*, 313 : 1033-1041.

B

Bagheri, A. M. I. N., Mahvi, A. H., Nabizadeh, R. A. M. I. N., Dehghani, M. H., Mahmoudi, B., Akbari-Adergani, M., et Yaghmaeian, K. (2017). Rapid destruction of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac using advanced nano-Fenton process in aqueous solution. *Acta Medica Mediter*, 33 : 879-883.

Bártíková, H., Podlipná, R., et Skálová, L. (2016). Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*, 144 : 2290-2301.

Bateman, D. N. (2012). Non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Medicine*, 40(3): 140.

Beltrán, F. J., Pocostales, P., Alvarez, P., et Oropesa, A. (2009). Diclofenac removal from water with ozone and activated carbon. *Journal of Hazardous Materials*, 163(2-3): 768-776.

Bendz, D. et al. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden. *Journal of hazardous materials*, 122: 195-204.

Bessa, V. S., Moreira, I. S., Tiritan, M. E., et Castro, P. M. L. (2017). Enrichment of bacterial strains for the biodegradation of diclofenac and carbamazepine from activated sludge. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120 : 135-142.

Bi, P., Tong, S., et Parton, K. A. (2000). Family self-medication and antibiotics abuse for children and juveniles in a Chinese city. *Social science & medicine*, 50(10): 1445-1450.

Biel-Maeso, M., González-González, C., Lara-Martín, P. A., et Corada-Fernández, C. (2019). Sorption and degradation of contaminants of emerging concern in soils under aerobic and anaerobic conditions. *Science of The Total Environment*, 666 : 662-671.

Blain H. (2000). Les anti inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs sélectifs de la cyclo-oxygénases 2. Intérêt et perspectives et al mouvement thérapeutique. *La revue de médecine interne*, 21: 978-88.

Bound, J. P., & Voulvoulis, N. (2005). Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environmental health perspectives* 113(12) : 1705-1711.

Brown, K. D., Kulis, J., Thomson, B., Chapman, T. H., et Mawhinney, D. B. (2006). Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Science of the Total Environment*, 366(2-3): 772-783.

Bueno, M. M., Gomez, M. J., Herrera, S., Hernando, M. D., Agüera, A., et Fernández-Alba, A. R. (2012). Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: two years pilot survey monitoring. *Environmental Pollution*, 164 : 267-273.

Buerge, I. J., Buser, H. R., Poiger, T., et Müller, M. D. (2006). Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters. *Environmental science & technology*, 40(23): 7242-7250.

Buser, H. R., Poiger, T., et Müller, M. D. (1999). Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Environmental science & technology*, 33(15) : 2529-2535.

C

Calderón-Preciado, D., Matamoros, V., et Bayona, J. M. (2011). Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network. *Science of the total environment*, 412: 14-19.

Carballa, M. et al. (2008). Determination of the solid-water distribution coefficient (K_d) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge. *Water research*, 42:287-95.

Chiolero, A., Würzner, G., et Burnier, M. (2000). Les inhibiteurs sélectifs de la cyclooxygénase de type 2 : moins d'effets rénaux que les anti-inflammatoires non stéroïdiens classiques?. *Néphrologie*, 21(8): 425-430.

Cleuvers, M. (2004). Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and environmental safety*, 59(3): 309-315.

Cruz-Morató, C., Ferrando-Climent, L., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., Marco-Urrea, E., Vicent, T., et Sarrà, M. (2013). Degradation of pharmaceuticals in non-sterile urban wastewater by *Trametes versicolor* in a fluidized bed bioreactor. *Water research*, 47(14): 5200-5210.

D

Daneshvar, A., Svanfelt, J., Kronberg, L., Prévost, M., et Weyhenmeyer, G. A. (2010). Seasonal variations in the occurrence and fate of basic and neutral pharmaceuticals in a Swedish river–lake system. *Chemosphere*, 80(3) : 301-309.

Delarras C., 2007. Microbiologie Pratique Pour Le Laboratoire D'analyses Ou De Contrôle Sanitaire, 1ère édition, Paris : Edition tec et doc, 476 p.

Drillia, P., Stamatelatou, K., & Lyberatos, G. (2005). Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. *Chemosphere*, 60(8): 1034-1044.

E

Edwards, S. J., et Kjellerup, B. V. (2013). Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(23): 9909-9921

F

Facey, S. J., Nebel, B. A., Kontny, L., Allgaier, M., et Hauer, B. (2018). Rapid and complete degradation of diclofenac by native soil microorganisms. *Environmental technology and innovation*, 10: 55-61.

Farooqi, I. H., Basheer, F., et Ahmad, T. (2008). Studies on biodegradation of phenols and m-cresols by upflow anaerobic sludge blanket and aerobic sequential batch reactor. *Global Nest Journal*, 10: 39-46.

Fent H.; Gomez E.; Leclerc M.; Casellas C. (2006). Devenir des médicaments dans l'environnement. *Environnement, Risques et Santé*. 5: 243-247.

Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodriguez-Roda, I., Rodriguez-Mozaz, S., et Barceló, D. (2012). Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 438: 404-413.

Ferrari, B. et al. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and environmental safety*, 55:359-370.

G

Garric, J. et al. (2006). Impact de médicaments à usage humain sur les organismes aquatiques d'eau douce. *Environnement, Risques & Santé*, Vol. 5, n°4, juillet-août 2006: 290-295.

Gauthier, H., Yargeau, V., et Cooper, D. G. (2010). Biodegradation of pharmaceuticals by *Rhodococcus rhodochrous* and *Aspergillus niger* by co-metabolism. *Science of the Total Environment*, 408(7) : 1701-1706.

Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S., et Fava, F. (2015). Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. *New biotechnology*, 32(1): 147-156.

Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology advances*, 28 (3): 367-374.

Graouer-Bacart, M., Sayen, S., et Guillon, E. (2016). Adsorption and co-adsorption of diclofenac and Cu (II) on calcareous soils. *Ecotoxicology and environmental safety*, 124: 386-392.

Grossberger, A., Hadar, Y., Borch, T., et Chefetz, B. (2014). Biodegradability of pharmaceutical compounds in agricultural soils irrigated with treated wastewater. *Environmental pollution* , 185 : 168-177.

H

Hata, T., Kawai, S., Okamura, H., et Nishida, T. (2010). Removal of diclofenac and mefenamic acid by the white rot fungus *Phanerochaete sordida* YK-624 and identification of their metabolites after fungal transformation. *Biodegradation*, 21(5) : 681-689.

Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology letters*, 131:5-17.

Heckmann, L. H., Callaghan, A., Hooper, H. L., Connon, R., Hutchinson, T. H., Maund, S. J., et Sibly, R. M. (2007). Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology letters*, 172(3): 137-145.

Hoegera B., Dietricha D-R., Schmida D., Hartmannb A. et Hitzfeldc B. (2008). Distribution of intraperitoneally injected diclofenac in brown trout (*Salmo trutta* f. *fario*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71 (2): 412-418.

Hultberg, M., Olsson, L. E., Birgersson, G., Gustafsson, S., et Sievertsson, B. (2016). Microalgal growth in municipal wastewater treated in an anaerobic moving bed biofilm reactor. *Bioresource technology*, 207, 19-23.

Hyun, I., et Tesar, P. (2011). Stem cells: Cloning advance calls for careful regulation. *Nature*, 478(7367) : 36.

I

Ibeh, O. O., Faluyi, J. O., et Dinnie, H. (2018). Genotoxicity evaluation of a pharmaceutical effluent from Owerri, Nigeria, using the *Allium cepa* assay. *Afr J Environ Sci Technol*, 5 : 10-17.

Iovino, P., Chianese, S., Canzano, S., Prisciandaro, M., et Musmarra, D. (2017). Photodegradation of diclofenac in wastewaters. *Desalination and Water Treatment*, 61, 293-297.

J

Janssen, P. H., Yates, P. S., Grinton, B. E., Taylor, P. M., et Sait, M. (2002). Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5) : 2391-2396.

Jewell, K. S., Falås, P., Wick, A., Joss, A., et Ternes, T. A. (2016). Transformation of diclofenac in hybrid biofilm–activated sludge processes. *Water research*, 105 : 559-567.

Jiang, C., J., Hu, H., Ma, H., Gao, X., et Ren, H. (2017). Impact of selected non-steroidal anti-inflammatory pharmaceuticals on microbial community assembly and activity in sequencing batch reactors. *PloS one*, 12(6): 179-236.

Jjemba, P.K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 63:113-30.

Joffin, J. N., et Leyral, G. (2006). Microbiologie Technique Tome 1” Dictionnaire des techniques”. *Bordeaux, France, centre régional de documentation d'Aquitaine.*

K

Khalaf, S., Shoqeir, J. H., Scrano, L., Karaman, R., & Bufo, S. A. (2018). Photodegradation using TiO₂-activated borosilicate tubes. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.

Khetan, S.K. et Collins, T.J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to Green Chemistry. *Chemical reviews*, 107: 2319-64.

Klavarioti, M., Mantzavinos, D., et Kassinos, D. (2009). Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment international*, 35(2): 402-417.

Kot-Wasik A.; Debska J. and Namies´nik J. (2007). Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products. *Analytical Chemistry*. 26(6): 557-568.

Koumaki, E., Mamais, D., et Noutsopoulos, C. (2017). Environmental fate of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water/sediment systems. *Journal of hazardous materials*, 323: 233-241.

Kujawa-Roeleveld, K., Schuman, E., Grotenhuis, T., Kragic, D., Mels, A., et Zeeman, G. (2008, November). Biodegradability of human pharmaceutically active compounds (PhAC) in biological systems treating source separated wastewater streams. In *Proceeding of the IWA international conference Sanitation Challenge* (pp. 19-21).

Kümmerer, K. (2009). The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use—present knowledge and future challenges. *Journal of environmental management*, 90(8): 2354-2366.

L

Langenhoff, A., Inderfurth, N., Veuskens, T., Schraa, G., Blokland, M., Kujawa-Roeleveld, K., et Rijnaarts, H. (2013). Microbial removal of the pharmaceutical compounds ibuprofen and diclofenac from wastewater. *BioMed research international*, 2013.

Larcher, S., et Yargeau, V. (2011). Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(1) : 211-218.

Larpent, J. P. (1985). Manuel pratique de microbiologie.

Lee, H.-J. et al. (2012). Enzymatic and microbial transformation assays for the evaluation of the environmental fate of diclofenac and its metabolites. *Chemosphere*, 87: 969-74.

Li, W. C. (2014). Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental pollution*, 187: 193-201.

Li, X., He, Q., Li, H., Gao, X., Hu, M., Li, S., Zhai, Q., Jiang, Y., et Wang, X. (2017). Bioconversion of non-steroidal anti-inflammatory drugs diclofenac and naproxen by chloroperoxidase. *Biochemical engineering journal*, 120: 7-16.

Lin, K., et Gan, J. (2011). Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere*, 83(3): 240-246.

López-Serna, R., Petrović, M., et Barceló, D. (2012). Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin (NE Spain). *Science of the total environment*, 440: 280-289.

Lu, G., Xie, Z., et Zhang, Z. (2018). Effects of dissolved organic matter, feeding, and water flow on the bioconcentration of diclofenac in crucian carp (*Carassius auratus*). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(8): 7776-7784.

M

Ma, D., Liu, G., Lv, W., Yao, K., Zhang, X., et Xiao, H. (2014). Photodegradation of naproxen in water under simulated solar radiation: mechanism, kinetics, and toxicity variation. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(13): 7797-7804.

Marchlewicz, A., Domaradzka, D., Guzik, U., et Wojcieszynska, D. (2016). *Bacillus thuringiensis* B1 (2015b) is a gram-positive bacteria able to degrade naproxen and ibuprofen. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(6): 197.

Marchlewicz, A., Guzik, U., et Wojcieszynska, D. (2015). Over-the-counter monocyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs in environment sources, risks, biodegradation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(10): 355.

Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G., et Vicent, T. (2010). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3): 836-842.

Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of hazardous materials*, 239: 40-47.

Martínez-Hernández, V., Meffe, R., López, S. H., et de Bustamante, I. (2016). The role of sorption and biodegradation in the removal of acetaminophen, carbamazepine, caffeine, naproxen and sulfamethoxazole during soil contact: A kinetics study. *Science of The Total Environment*, 559: 232-241.

Mathon, B., Choubert, J. M., Miège, C, et Coquery, M. (2015). Photodégradation de micropolluants organiques dans les eaux usées traitées. Rapport bibliographique. Irstea-ONEMA.

Miao, X. S., Bishay, F., Chen, M., et Metcalfe, C. D. (2004). Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environmental science & technology*, 38(13) : 3533-3541.

Mompelat, S., Le Bot, B., et Thomas, O. (2009). Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment international*, 35(5): 803-814.

Monteiro, S. C., et Boxall, A. B. (2009). Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12): 2546-2554.

Monteiro, S. C., et Boxall, A. B. (2010). Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment. In *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 53-154). Springer, New York, NY.

Moreira, I. S., Bessa, V. S., Murgolo, S., Piccirillo, C., Mascolo, G., et Castro, P. M. (2018). Biodegradation of Diclofenac by the bacterial strain *Labrys portucalensis* F11. *Ecotoxicology and environmental safety*, 152: 104-113.

N

Nguyen, L. N., Nghiem, L. D., Pramanik, B. K., et Oh, S. (2019). Cometabolic biotransformation and impacts of the anti-inflammatory drug diclofenac on activated sludge microbial communities. *Science of the Total Environment*, 657 : 739-745.

Nkoom, M., Lu, G., Liu, J., Dong, H., et Yang, H. (2019). Bioconcentration, behavioral, and biochemical effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(6): 5704-5712.

P

Pacheco, D. P., Manrique, Y. J., et Martínez, F. (2007). Thermodynamic study of the solubility of ibuprofen and naproxen in some ethanol+ propylene glycol mixtures. *Fluid Phase Equilibria*, 262(1-2) : 23-31.

Pal, A., Gin, K.Y., Lin, A.Y., Reinhard, M. (2010). Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total Environ*, 408: 6062-6069.

Palyzová, A., Zahradník, J., Marešová, H., Sokolová, L., Kyslíková, E., Grulich, M., et Kyslík, P. (2018). Potential of the strain *Raoultella* sp. KDF8 for removal of analgesics. *Folia microbiologica*, 63(3): 273-282.

Paucar, N. E., Kim, I., Tanaka, H., et Sato, C. (2019). Ozone treatment process for the removal of pharmaceuticals and personal care products in wastewater. *Ozone: Science & Engineering*, 41(1): 3-16.

Petrie, B., Barden, R., et Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water research*, 72: 3-27.

Pillon, F. (2014). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens. *Actualités pharmaceutiques*, 53(534): 43-46.

Pino-Otín, M. R., Muñiz, S., Val, J., et Navarro, E. (2017). Effects of 18 pharmaceuticals on the physiological diversity of edaphic microorganisms. *Science of the Total Environment*, 595: 441-450.

Poirier-Larabie, S., Segura, P. A., et Gagnon, C. (2016). Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions. *Science of the total environment*, 557: 257-267.

Q

Quinn, B., Gagné, F., et Blaise, C. (2008). An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the total environment*, 389 : (2-3) : 306-314.

R

Radjenović, J., Petrović, M., et Barceló, D. (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water research*, 43(3): 831-841.

Rodil, R., Quintana, J. B., Concha-Graña, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., et Prada-Rodríguez, D. (2012). Emerging pollutants in sewage, surface and drinking water in Galicia (NW Spain). *Chemosphere*, 86(10) : 1040-1049.

Rodríguez-Rodríguez, C. E., Jelić, A., Pereira, M. A., Sousa, D. Z., Petrović, M., Alves, M. M., Barcelo, D., Caminal, G., et Vicent, T. (2012). Bioaugmentation of sewage sludge with *Trametes versicolor* in solid-phase biopiles produces degradation of pharmaceuticals and affects microbial communities. *Environmental science & technology*, 46(21) : 12012-12020.

S

Saidi, N., Guessas, B., Bensalah, F., Badis, A., Hadadji, M., Henni, D. E., et Kihal, M. (2002). Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait cru de chèvre des régions arides. *J. Alg. Reg. Arides*, 1, 01-11.

Sarker, M., Song, J. Y., et Jhung, S. H. (2018). Adsorptive removal of anti-inflammatory drugs from water using graphene oxide/metal-organic framework composites. *Chemical Engineering Journal*, 335: 74-81.

Scheytt, T., Mersmann, P., Lindstädt, R., et Heberer, T. (2005a). 1-Octanol/water partition coefficients of 5 pharmaceuticals from human medical care: carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, and propyphenazone. *Water, air, and soil pollution*, 165(1-4): 3-11.

Scheytt, T., Mersmann, P., Lindstädt, R., et Heberer, T. (2005b). Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments. *Chemosphere*, 60(2): 245-253.

Schmidt, W., et Redshaw, C. H. (2015). Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 112: 212-222.

Shen, J., Zhang, X., Chen, D., Liu, X., et Wang, L. (2015). Characteristics of pyridine biodegradation by a novel bacterial strain, *Rhizobium* sp. NJUST18. *Desalination and Water Treatment*, 53(7) : 2005-2013.

Schwaiger, J., Ferling, H., Mallow, U., Wintermayr, H., et Negele, R. D. (2004). Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 68(2): 141-150.

Sim, W. J., Lee, J. W., Lee, E. S., Shin, S. K., Hwang, S. R., et Oh, J. E. (2011). Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere*, 82(2): 179-186.

Sipma, J., Osuna, B., Collado, N., Monclús, H., Ferrero, G., Comas, J., et Rodríguez-Roda, I. (2010). Comparison of removal of pharmaceuticals in MBR and activated sludge systems. *Desalination*, 250(2) : 653-659.

Spongberg, A. L., et Witter, J. D. (2008). Pharmaceutical compounds in the wastewater process stream in Northwest Ohio. *Science of the total environment*, 397(1-3): 148-157.

T

Tang, W. (2003). The metabolism of diclofenac-enzymology and toxicology perspectives. *Current drug metabolism*, 4(4): 319-329.

Taylor, D., et Senac, T. (2014). Human pharmaceutical products in the environment–The “problem” in perspective. *Chemosphere*, 115 : 95-99.

Ternes T-A., Herrmann N., Bonerz M., Siegrist H. et Joss A. (2004). Determination of Kd-values for pharmaceuticals and musk fragrances in sewage sludge. *Water Research*. 38: 4075-4084.

Ternes, T. A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H. J., Haist-Gulde, B., et Zulei-Seibert, N. (2002). Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environmental science & technology*, 36(17): 3855-3863.

Thelusmond, J. R., Kawka, E., Strathmann, T. J., et Cupples, A. M. (2018). Diclofenac, carbamazepine and triclocarban biodegradation in agricultural soils and the microorganisms and metabolic pathways affected. *Science of the Total Environment*, 640: 1393-1410.

V

Van Stempvoort, D. R., Roy, J. W., Grabuski, J., Brown, S. J., Bickerton, G., et Sverko, E. (2013). An artificial sweetener and pharmaceutical compounds as co-tracers of urban wastewater in groundwater. *Science of the Total Environment*, 461: 348-359.

Vieno, N., et Sillanpää, M. (2014). Fate of diclofenac in municipal wastewater treatment planta review. *Environment international*, 69: 28-39.

W

Wojcieszynska, D., Domaradzka, D., Hupert-Kocurek, K., et Guzik, U. (2014). Bacterial degradation of naproxen–Undisclosed pollutant in the environment. *Journal of environmental management*, 145 :157-161.

X

Xu, J., Wu, L., Chen, W., et Chang, A. C. (2010). Leaching potential of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in soils. *Environmental toxicology and chemistry*, 29(4): 800-807.

Y

Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., et Sekizawa, J. (2009). Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water research*, 43(2): 351-362.

Z

Zanuri, N. B. M., Bentley, M. G., et Caldwell, G. S. (2017). Assessing the impact of diclofenac, ibuprofen and sildenafil citrate (Viagra®) on the fertilisation biology of broadcast spawning marine invertebrates. *Marine environmental research*, 127:126-136.

Annexe 1 :

Tableau 3. Les composants de la gélose nutritive (GN).

Constituants g.L ⁻¹	Milieu de culture
	Gélose nutritive
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Peptone tryptique	5
Chlorure de Sodium	5
Agar-agar	15-20
pH	7,2

Tableau 4. Les composants du bouillon nutritif (BN).

Constituants g.L ⁻¹	Milieu de culture
	Bouillon nutritif
Extrait de viande	5
Extrait de levure	2
Peptone tryptique	10
Chlorure de Sodium	5
pH	7,2

Annexe 2 :

Les tests de l'API 20E :

- ▶ **Mise en évidence de la production d'acétyl-méthyl-carbinol (acétoïne) :** ce test est effectué sur le milieu Clark et Lubs. L'incubation se fait à 37°C pendant 24h. La révélation se fait après l'ajout de 0,5 ml d'une solution alcoolique d' α -naphthol (VP1) et 0,5 ml d'une solution aqueuse de soude à 16% (VP2). Une coloration rouge présente un résultat positif.
- ▶ **Mise en évidence de la production d'indole :** la culture est effectuée dans une eau peptonée exempte d'indole ou dans le milieu Urée-indole. La lecture se fait après incubation à 37°C pendant 24h, l'indole produit est révélé par le réactif de Kovacs. Le virage du milieu au rose fuschia (rouge), indique une réaction positive.
- ▶ **Recherche d'une Tryptophane désaminase (TDA) :** ce test est effectué sur le milieu urée-indole, les résultats sont obtenus après 24h d'incubation à 37°C. La lecture se fait après l'ajout de quelques gouttes de perchlorure de fer en milieu acide (réactif TDA). L'apparition d'une couleur rouge brun indique la présence de l'enzyme dans le milieu.
- ▶ **Mise en évidence de l'uréase :** cette mise en évidence est effectuée sur le milieu urée-indole, et la révélation se fait après incubation à 37°C pendant 24h. Le virage de couleur au rouge violacé indique la présence de l'uréase.
- ▶ **Utilisation du citrate comme seule source de carbone :** ce test est réalisé sur le milieu de Simmons. La lecture se fait après incubation à 37°C pendant 24h à 5 jours. Une culture bactérienne abondante avec bleuissement du milieu démontre l'utilisation de citrate.
- ▶ **Recherche des décarboxylases (arginine-dihydrolase : ADH ; ornithine-décarboxylase : ODC ; lysine-décarboxylase : LDC) :** Ensemencer le milieu Moëller additionné d'un acide aminé correspondant (arginine, ornithine ou lysine) avec une goutte de suspension bactérienne. Agiter (si le tube n'est pas plein le recouvrir de vaseline stérile). Fermer le tube entièrement afin de créer une anaérobiose relative. La lecture a lieu après 24h d'incubation à 37°C. Le virage alcalin (violet) du milieu indique la présence de ces enzymes.
- ▶ **La production de sulfure d'hydrogène (H₂S) :** Le sulfure d'hydrogène réagit avec les ions (Fe⁺⁺⁺) du citrate de fer ammoniacal, pour former un précipité de sulfure de fer noir. Ainsi : Une bactérie H₂S⁺ présente un précipité noir, par contre une bactérie H₂S⁻ : pas de précipité noir.

► **Milieu d'ONPG** : Ce test permet de rechercher la présence d'une enzyme intracellulaire β -galactosidase (ONPG hydrolase) qui permet l'hydrolyse du lactose en glucose et galactose, le développement d'une coloration jaune traduit la présence de cette enzyme.

► **Etude de la voie d'attaque des glucides** : ce test est effectué sur le milieu MEVAG afin de déterminer le type de métabolisme glucidique (fermentaire ou oxydative). Ce milieu contient un indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol qui permet d'apprécier le type de dégradation du glucide (glucose, arabinose ...) qui libère des acides et éventuellement des gaz. Il vire au jaune en milieu acide, sinon il conserve la couleur verte du milieu où il vire au bleu en cas d'alcalinisation. Donc à la fin de l'incubation, on observe le changement de couleur du milieu pour déterminer le type oxydatif ou fermentatif.

► **Milieu gélatinase** : La gélatinase est une protéase : c'est une enzyme qui hydrolyse le collagène (gélatine) en acides aminés ou en peptides. On met en présence des bactéries et un morceau de gélatine renfermant de petites particules. Incubation à 37°C pendant 24h à 48h. La liquéfaction d'un morceau de gélatine lorsqu'il est mis en présence de bactéries traduit donc la synthèse d'une gélatinase.

Annexe 5 :

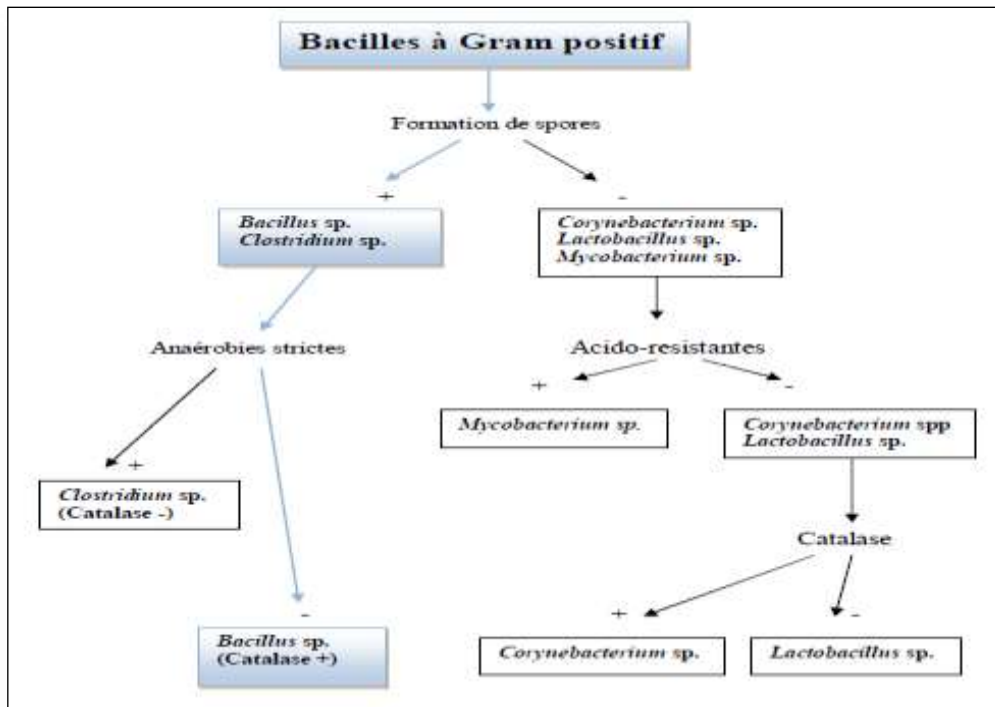


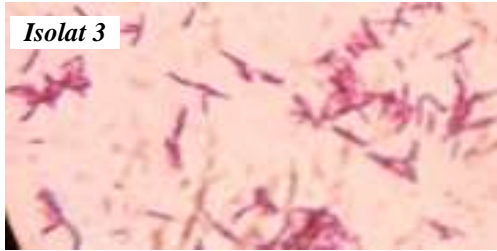



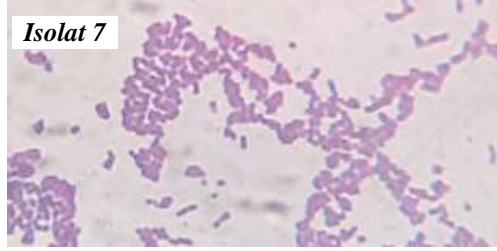
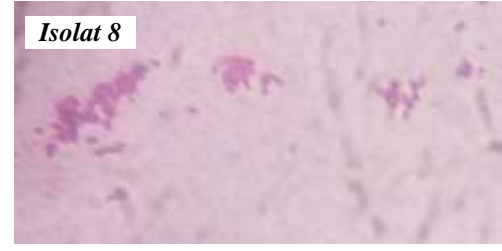
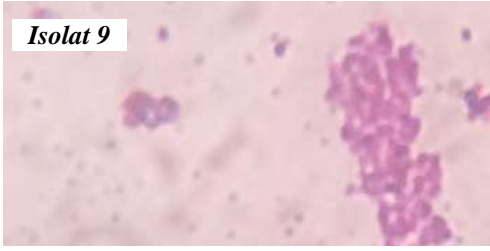


Figure 7. Clés dichotomiques de différenciation des bacilles à Gram positif.

Annexe 3 :

<p><i>Isolat 1</i></p> 	<p><i>Isolat 2</i></p> 
<p><i>Isolat 3</i></p> 	<p><i>Isolat 4</i></p> 
<p><i>Isolat 5</i></p> 	<p><i>Isolat 6</i></p> 
<p><i>Isolat 7</i></p> 	<p><i>Isolat 8</i></p> 
<p><i>Isolat 9</i></p> 	
<p>Photographies de l'aspect microscopique (coloration de Gram) des bactéries isolées (Gx100).</p>	
<p>Planche N° 1</p>	

Annexe 4 :



Isolat 1



Isolat 2



Isolat 3



Isolat 4



Isolat 5



Isolat 6



Isolat 7



Isolat 8



Isolat 9

Photographies des résultats des API 20E des neuf isolats.

Planche N° 2

Annexe 6 :

Tableau 9. Cinétique de croissance des neuf souches en présence de 10 mg.L⁻¹ du DCF.

DO à 600 nm				
Temps (h)	T= 0	T= 24	T= 48	T= 72
Souches				
S1	0,228	0,453	0,314	0,300
S2	0,060	0,403	0,325	0,399
S3	0,174	0,415	0,336	0,314
S4	0,224	0,535	0,433	0,427
S5	0,176	0,544	0,421	0,483
S6	0,111	0,244	0,057	0,009
S7	0,225	0,468	0,277	0,187
S8	0,234	0,446	0,257	0,203
S9	0,195	0,451	0,217	0,172

Tableau 10. Taux de croissance pour les neuf souches.

Souche	Taux de croissance μ (h⁻¹)
S1	0,041
S2	0,238
S3	0,057
S4	0,057
S5	0,087
S6	0,049
S7	0,044
S8	0,037
S9	0,054

Tableau 11. Effet de la variation du pH sur la croissance bactérienne de la souche *Aeromonas salmonicida* S2.

Temps (h)	DO à 600 nm				
	pH= 6	pH= 6,5	pH= 7	pH= 7,5	pH=8
T = 0	0,458	0,677	0,437	0,476	0,483
T = 24	0,452	0,478	0,695	0,791	0,755
T = 48	0,400	0,450	0,571	0,909	0,711
T = 72	0,282	0,410	0,453	0,722	0,625

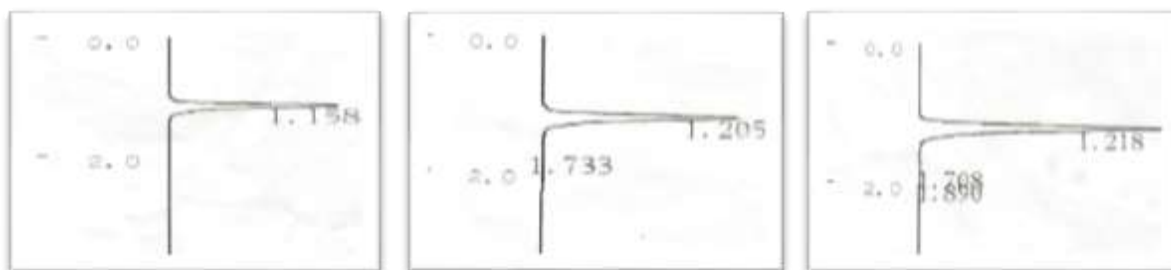
Tableau 12. Effet de la variation des concentrations du DCF sur la croissance de la souche *Aeromonas salmonicida* S2.

Temps (h)	DO à 600 nm				
	10 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	30 mg.L ⁻¹	40 mg.L ⁻¹	50 mg.L ⁻¹
T = 0	0,270	0,291	0,269	0,444	0,390
T = 24	0,720	0,749	0,718	0,818	0,640
T = 48	0,685	0,720	0,692	0,745	0,520
T = 72	0,548	0,630	0,612	0,651	0,262

Tableau 13. Biodégradation et taux d'élimination du DCF par *Aeromonas salmonicida* S2 et *Citrobacter youngae* D16.

Temps (h)	<i>Aeromonas salmonicida</i> S2		<i>Citrobacter youngae</i> D16	
	DO à 600 nm	Taux d'élimination (DCF) %	DO à 600 nm	Taux d'élimination (DCF) %
T= 0	0,224	0	0,319	0
T= 24	0,376	27,34	0,787	46,91
T= 48	0,362	41,43	0,766	47,85

Annexe 7 :



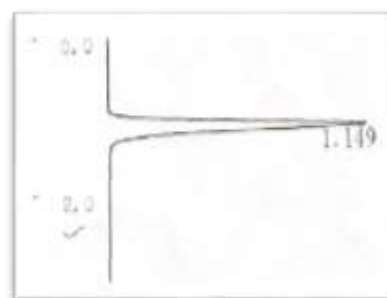
5 mg.L⁻¹

10 mg.L⁻¹

15 mg.L⁻¹

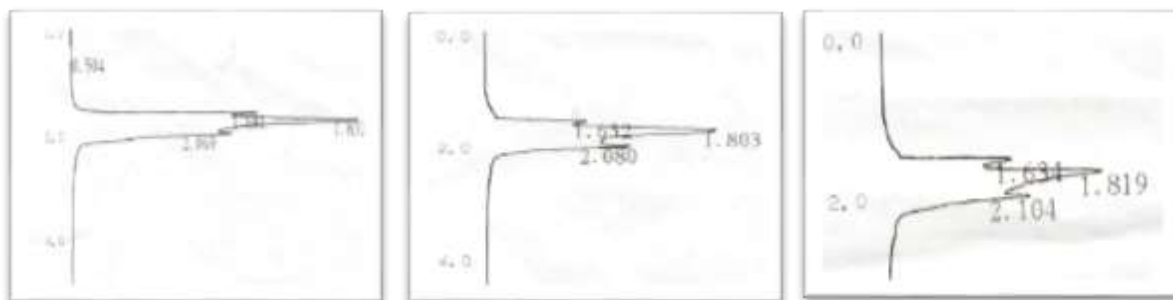


20 mg.L⁻¹



25 mg.L⁻¹

Figure 13. Chromatogrammes d'HPLC représentant la courbe d'étalonnage de DCF à des concentrations de 5, 10, 15, 20 et 25 mg.L⁻¹.

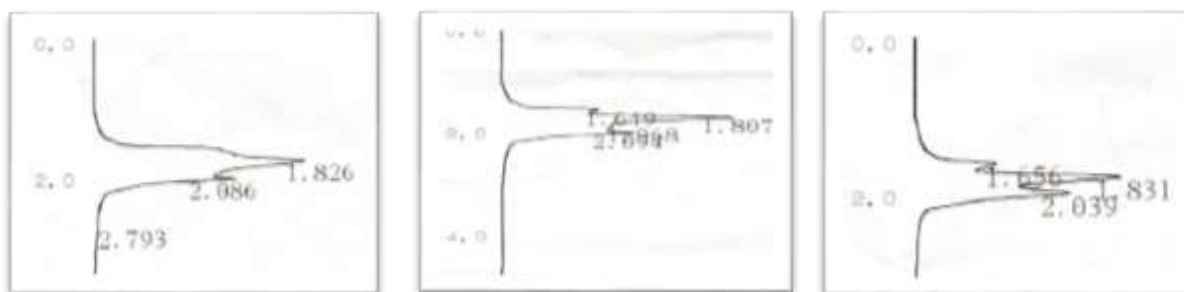


Biodégradation t₀

Biodégradation t₂₄

Biodégradation t₄₈

Figure 14. Chromatogrammes d'HPLC obtenus après le test de biodégradation de 10 mg.L⁻¹ de DCF par *Aeromonas salmonicida* S2.



Biodégradation t₀

Biodégradation t₂₄

Biodégradation t₄₈

Figure 15. Chromatogrammes d'HPLC obtenus après le test de biodégradation de 10 mg.L⁻¹ de DCF par *Citrobacter youngae* D16.

Annexe 8 :

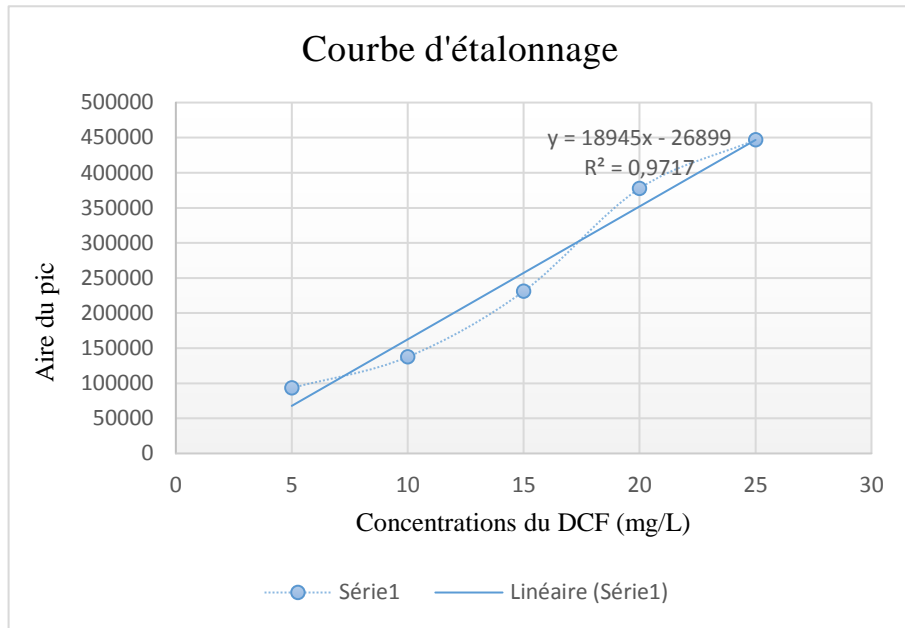


Figure 18. Courbe d'étalonnage du DCF

Réalisé par :

- Dellache Dounia
- Hannouf Ibtissem

Présidente : Dr. Moussaoui Sagia**Examinatrice :** M^{me} Amira Samyia**Encadreur :** Dr. Ouled Haddar Houria**Thème****Effet du diclofénac, anti-inflammatoire non-stéroïdien, sur la croissance des bactéries isolées du sol.****Résumé**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS_s) tels que le diclofenac et l'ibuprofène sont souvent détectés dans l'environnement en traces et considérés comme micropolluants persistants. La biodégradation du DCF par des bactéries isolées du sol, a été étudiée afin d'évaluer son devenir dans l'environnement. Les résultats ont révélé que 9 bactéries isolées étaient capables de se développer en présence du DCF en tant que source unique de carbone et d'énergie. La biodégradation du DCF a été évaluée à l'aide des souches bactériennes *Aeromonas salmonicida* S2 isolée à partir d'un compost ménager et *Citrobacter youngae* D16 utilisé comme souche de référence. Les résultats de la biodégradation confirmés par HPLC, ont montré que ces bactéries étaient capables de dégrader le DCF avec des taux d'élimination différents, 41.43% en présence d'*Aeromonas salmonicida* S2 et 47.85% en présence de *Citrobacter youngae* D16.

Mots clés : AINS_s, diclofénac, biodégradation, *Aeromonas salmonicida*, *Citrobacter youngae*.

Abstract

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) such as diclofenac and ibuprofen are often detected at trace in environment and considered as persistent micropollutants. The biodegradation of DCF by bacteria isolated from soil has been studied to evaluate its fate in the environment. The results revealed that 9 isolated bacteria were able to grow in the presence of DCF as a single source of carbon and energy. The biodegradation of DCF was evaluated using *Aeromonas salmonicida* S2 bacterial strain isolated from household compost and *Citrobacter youngae* D16 used as a standard strain. The biodegradation results, confirmed by HPLC, showed that these bacteria were able to degrade DCF with different elimination rates, 41.43% in the presence of *Aeromonas salmonicida* S2 and 47.85% in the presence of *Citrobacter youngae* D16.

Key word: NSAID_s, diclofenac, biodegradation, *Aeromonas salmonicida*, *Citrobacter youngae*.

الملخص

غالبا ما يتم اكتشاف مضادات الالتهاب اللاسترويدية مثل الديكلوفيناك و الايبوبروفين في البيئة، و تعتبر من الملوثات الدقيقة. تمت دراسة التحلل البيولوجي لل DCF بواسطة بكتيريات معزولة من التربة من أجل تقييم مصيره في البيئة حيث كشفت النتائج أن 9 بكتيريات معزولة كانت قادرة على النمو في وجود ال DCF كمصدر وحيد للكربون و الطاقة. تم تقييم التحلل البيولوجي لل DCF باستخدام سلالات البكتيريا *Aeromonas salmonicida* S2 المعزولة من السماد المنزلي و البكتيريا *Citrobacter youngae* D16 المستخدمة كمرجع. أظهرت نتائج التحلل البيولوجي الذي أكدته HPLC ، أن هذه البكتيريا كانت قادرة على تحليل ال DCF بمعدلات التخلص المختلفة 41.43 % في وجود *Aeromonas salmonicida* S2 و 47.85 % في وجود *Citrobacter youngae* D16 .

الكلمات المفتاحية : مضادات الالتهاب اللاسترويدية، ديكلوفيناك، التحلل البيولوجي، *Aeromonas salmonicida* S2 ، *Citrobacter youngae* D16

Synthèse bibliographique

Introduction générale

Matériel et méthodes

Résultats et discussion

Références bibliographiques

Annexes

Conclusion