



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

117
9045
EX

THESE

Présentée devant l'Université de METZ
pour obtenir le Diplôme de Doctorat d'Université

Spécialité : Toxicologie

par

Jairo Alberto FALLA-ANGEL

soutenue le 26 Juin 1990



**ROLE DES ENVELOPPES BACTERIENNES
DANS L'ACCUMULATION DES METAUX
(Cd²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺)**

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv	19900245
Cote	S1M3 90/11
Loc	Magasin

Membres du Jury : J.C. Block, Président
J. Schwartzbrod, Rapporteur
P. Vasseur, Rapporteur
G. Flatau
J.M. Meyer

Le travail exposé dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie du Centre des Sciences de l'Environnement (Université de Metz).

Je tiens à remercier tout d'abord Monsieur le Professeur Jean-Claude Block, Directeur du Laboratoire de Microbiologie, qui m'a proposé ce sujet de thèse et qui m'a suivi de très près durant tout mon travail.

Je remercie également Madame le Professeur J. Schwartzbrod, Mademoiselle le Professeur P. Vasseur, Monsieur le Professeur G. Flatau, Monsieur le Professeur J.M. Meyer, d'avoir accepté de faire partie de mon jury et je leur exprime toute ma reconnaissance pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Que Madame P. Bauda veuille trouver ici l'expression de ma reconnaissance pour avoir suivi cette étude avec beaucoup d'attention et m'avoir prodigué de bons conseils.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur E. Petit pour sa contribution à une partie de cette thèse, pour son dévouement et sa collaboration.

Je remercie très sincèrement tous mes collègues du C.S.E. et du Laboratoire d'Ecologie, et plus particulièrement Madame M.A. Dollard et Madame C. Bouzzendorfer pour leur total dévouement.

1. INTRODUCTION

L'accumulation des métaux par les cellules bactériennes est un phénomène largement reconnu, dont les mécanismes sont relativement mal élucidés.

Les enveloppes cellulaires, structures très complexes, frontières entre le milieu extra et intracellulaire, jouent obligatoirement un rôle fondamental dans cette accumulation. Elles représentent à la fois une zone de fixation et une barrière partielle à la pénétration des ions métalliques et leur capacité/comportement sont relativement mal connus.

Ainsi il est apparu nécessaire d'évaluer :

- a) la capacité d'accumulation de métaux, cadmium, nickel, cuivre et zinc (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) de trois structures isolées (membrane externe, peptidoglycane, membrane cytoplasmique) à partir d'une bactérie ubiquiste environnementale *Pseudomonas fluorescens*
- b) les sites de fixation de ces métaux
- c) la fraction d'ions métalliques maximale extractible à partir de bactéries et
- d) la possibilité d'extraction des métaux fixés à une biomasse bactérienne (boues activées d'une station d'épuration d'eaux usées urbaines).

L'analyse bibliographique (Chapitre 2) de ce document présente la classification, l'origine, la forme et la distribution dans l'environnement des quatre métaux utilisés dans ce travail ; les structures bactériennes mises en cause dans l'accumulation des métaux et leur isolement ; les mécanismes connus d'accumulation et leur expression mathématique ; enfin les techniques d'extraction des métaux fixés aux biomasses.

La phase expérimentale proprement dite (Chapitre 3) s'articule au terme d'une présentation du matériel et méthodes utilisés, selon quatre volets :

- mise au point d'un protocole de séparation des enveloppes (membrane externe, peptidoglycane et membrane cytoplasmique) de *Pseudomonas fluorescens* utilisé comme modèle
- accumulation de métaux (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) par chacune de ces structures et expression des résultats selon le modèle de Scatchard afin de classer les métaux et les structures selon leur affinité relative

- mise en évidence par blocage chimique, du rôle des groupements carboxyliques dans cette fixation

- extraction par l'acide nitrilotriacétique (N.T.A.) des métaux (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), à partir de biomasses contaminées en laboratoire après ou pendant croissance (*Pseudomonas fluorescens*) ou sur le terrain (boues activées des stations d'épuration de METZ et BORDEAUX).

Après discussion des résultats (Chapitre 4), les conclusions (Chapitre 5) tentent de faire ressortir le double rôle des enveloppes bactériennes, quasiment à part égale, de site de fixation et de barrière à l'extraction du métal.

2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

L'analyse bibliographique a pour objet principal de présenter les métaux étudiés, cadmium, nickel, cuivre et zinc (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), leurs différentes classifications, leur production et leur consommation, leur présence dans l'environnement (aquatique et boues de stations d'épuration).

Le deuxième volet de cette analyse concerne le matériel biologique utilisé et plus précisément les structures impliquées dans la biosorption des métaux, leur isolement, (dans notre cas les enveloppes bactériennes de *Pseudomonas fluorescens*) ainsi que les mécanismes de la biosorption. Finalement sont analysées les capacités d'accumulation des enveloppes bactériennes, les facteurs qui influencent cette accumulation, et l'extraction des métaux par des agents chimiques.

2.1. LES METAUX

Le cadmium, le nickel, le cuivre et le zinc (métaux bivalents appartenant à la classe intermédiaire selon NIEBOER et RICHARDSON, 1980) ont été retenus dans notre étude.

2.1.1. Place dans la classification des éléments métalliques et spéciation

A l'heure actuelle, trois classifications principales ont été établies pour évaluer les propriétés physico-chimiques des métaux : MENDELEIEV, AHRLAND, et NIEBOER et RICHARDSON.

La plus ancienne est celle de MENDELEIEV. Le classement repose sur le numéro atomique de chaque élément qui traduit de fait la valence d'un ion métallique et la capacité d'accepter des électrons d'une molécule ou d'un groupe donneur. Dans la classification périodique des éléments, le cadmium et le zinc appartiennent au groupe IIB, le nickel au groupe VIII et le cuivre au groupe IB. Pour le cadmium et le zinc toutes les couches électroniques sont saturées, sauf la plus externe qui possède seulement 2 électrons. Dans le cas du cuivre, cette couche possède seulement un électron, et pour le nickel, les deux dernières couches sont insaturées avec respectivement 16 et 2 électrons. La forme stable du Cd, du Zn, et du Ni se caractérise par une électrovalence de 2, le Cu, quant à lui, présente 2 formes stables d'électrovalence 1 et 2.

Une deuxième classification a été envisagée pour classer les métaux, à partir d'autres critères que la position dans le tableau théorique périodique des éléments.

Ainsi le cadmium, le zinc, le nickel et le cuivre ont été souvent classés dans la catégorie des "métaux lourds" ou encore dans celle des "métaux traces" sans avoir jamais défini précisément ces termes. Par contre le travail de AHRLAND (1958) modifié par PEARSON (1963), classe les éléments selon la dureté des ions métalliques. Le principe repose sur la capacité de former des liaisons avec F^- ou OH^- et autres anions oxygénés. Cette classification est plus intéressante parce qu'elle permet de présager de l'affinité des métaux pour les molécules biologiques. Ainsi selon la classification des acides de LEWIS présentée par PEARSON (1963), le cadmium se situe parmi les ions doux capables de former des liaisons très fortes avec CN^- , RS^- , SH^- , RNH_2 , mais ne formant pas de liaisons avec F^- . Le Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} se situent dans une classe intermédiaire.

Enfin la troisième classification, proche de la précédente, et la plus récente, est celle de NIEBOER et RICHARDSON (1980). Le principe repose sur l'affinité du métal pour un type de ligand. Ainsi sur la figure 1 les métaux sont répartis en trois classes A, B et intermédiaire. Les métaux appartenant à la classe A se lient préférentiellement aux macromolécules et aux ligands qui possèdent des atomes d'oxygène. En général, les ligands préférés de la classe A sont : F^- , O^{2-} , OH^- , H_2O . La classe B comprend ceux qui ont une affinité pour l'azote et le soufre. Les ligands préférés par les métaux de la classe B sont : H^- , I^- , R^- (CH_3 , CH_3CH_2 , etc...), CN^- , CO , S^{2-} , RS^- . La classe intermédiaire dans laquelle le Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sont classés, correspond aux éléments qui ont une affinité à la fois pour l'oxygène et pour le soufre et pour l'azote (Tableau 1). Les membres de la classe B et ceux de la classe intermédiaire sont comparables en charge et en taille et produisent les mêmes complexes.

La différence entre les membres de la classe A et les membres de la classe intermédiaire a été établie en utilisant la protéine concavaline A, laquelle présente deux sites de fixation S_1 et S_2 ; la classe A se fixe au site S_2 tandis que les membres de la classe intermédiaire se fixent au site S_1 .

La différence entre la classe B et la classe intermédiaire est moins évidente, mais elle a été établie en utilisant le D-pénicillamate, chélateur possédant plusieurs sites actifs (S^- , NH_2 , O^-).

INDICE DE COVALENCE

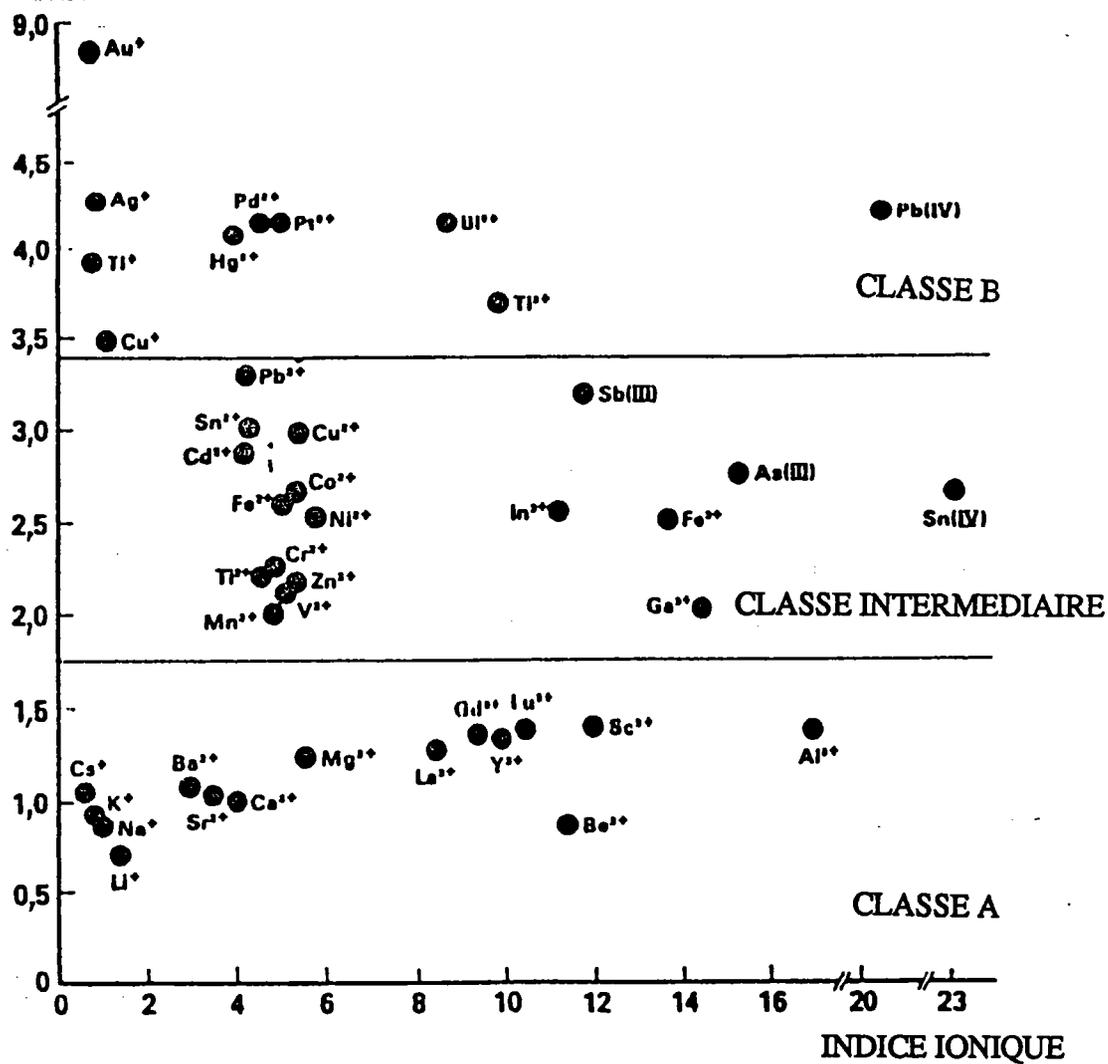


Figure 1 : Classification des ions métalliques en trois classes, selon leur indice ionique et l'indice de covalence ; d'après NIEBOER et RICHARDSON (1980).

Tableau 1 : Affinité des différents types de ligands susceptibles de se retrouver dans les systèmes biologiques (d'après NIEBOER et RICHARDSON, 1980).

Ligands préférentiels des métaux de la classe A	Ligands préférentiels des métaux intermédiaires	Ligands préférentiels des métaux de la classe B
$F^{-}, O^{2-}, OH^{-}, H_2O$ $CO_3^{2-}, SO_4^{2-}, ROSO_3^{-}, NO_3^{-}$ $HPO_4^{2-}, -O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{P}-O- \text{ etc.}$ $ROH, \overset{\overset{O}{\parallel}}{R}CO^{-}, -\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-, ROR$	$Cl^{-}, Br^{-}, N_3^{-}, NO_2^{-}$ $SO_3^{2-}, NH_3, N_2, RNH_2 >$ $R_2NH, R_3N, =N-, -CO-\bar{N}-R$ O_2, O_2^{-}, O_2^{2-}	$H^{-}, I^{-}, R^{-}, CN^{-}$ $CO, S^{2-}, RS^{-}, R_2S, R_3As$

Tableau 2 : Sites de fixation des métaux dans les protéines (d'après NIEBOER et RICHARDSON, 1980).

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

Les sels de cadmium sont très solubles dans l'eau, en particulier le chlorure (1400 g/l à 20°C), le nitrate (1090 g/l à 0°C) et le sulfate (755 g/l à 0°C). Par contre, les hydroxydes et les carbonates sont insolubles ce qui entraîne une précipitation du cadmium lors d'une élévation de pH (BOURG, 1984 ; L'A.F.E.E., 1978). Avec l'anhydride sulfureux ou le sulfure de sodium, le cadmium précipite pour donner un sulfate de cadmium insoluble, jaune, ce qui en fait un représentant des métaux dits "lourds".

Le cadmium présente également des propriétés catalytiques, ses dérivés agissant comme catalases et peroxydases dans un certain nombre de réactions biologiques, telle la polymérisation des oléfines.

b) Le nickel

Le nickel (Ni) est un élément de numéro atomique 28 et de masse atomique 58,71. Le produit naturel est formé de 5 isotopes stables d'abondance en pourcentage variable.

Le nickel est connu depuis des siècles à l'état d'alliage, notamment avec le "packfung" chinois (50,66% Cu ; 13,18% Ni ; le reste étant constitué de zinc ou d'étain). Ce métal divalent est gris-blanc et peut prendre un beau poli. Le nickel est malléable, mais cassant quand il contient du soufre. Le point de fusion le plus probable est 1455°C (pour un nickel à 99,84%). Le point d'ébullition est 2430°C (sous 30 mm Hg) et 3075°C sous 760 mm Hg.

Le nickel présente surtout les valences 2 et 3, très rarement les valences 1 et 4. A côté de ses sels habituels il entre dans la constitution de nombreux complexes (on en connaît plus de 3000) comme l'hydruure NiH_2 et le nickel-carbonyle $\text{Ni}(\text{CO})_4$. Le nickel est remarquable à cause de ses propriétés catalytiques et notamment pour réaliser des hydrogénations, des dés-hydrogénations, des oxydations. La valence (II), la plus fréquente, est caractérisée par un cation Ni^{2+} vert et diversement hydraté. Sous cette valence, le nickel se rapproche beaucoup du cobalt, du fer, du zinc, du manganèse et du cuivre divalents. Les sels simples sont verts et présentent dans l'eau une bande d'absorption dans l'ultraviolet vers 390 nm et une autre bande dans le rouge vers 680 nm. Parmi les sels les plus importants on peut citer l'oxyde salin Ni_3O_4 , le chlorure vert $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, et le sulfure NiS .

L'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide nitrique étendu, l'acide phosphorique, l'eau régale, l'acide chromique, les solutions d'alu-ferrique attaquent plus ou moins vite le nickel (AUGER *et al.*, 1970).

c) Le cuivre

Le cuivre (Cu) est l'élément chimique de numéro atomique 29, de masse atomique 63,54 et de volume atomique $7,12 \text{ cm}^3$. Il a deux isotopes : ^{63}Cu , ^{65}Cu . Sa valence peut être de 1 ou 2.

Le cuivre est l'un des métaux le plus anciennement connu. Cette antériorité du cuivre, malgré la rareté relative de ses minerais, est due à l'existence de cuivre natif à la surface du sol et à la relative facilité de réduction du métal à partir de ses minerais oxydés ou sulfurés.

La masse volumique du cuivre est $8,94 \text{ g/cm}^3$ à 20°C , sa chaleur massique $0,092 \text{ kcal/kg}$ de 0 à 100°C , sa température de fusion 1083°C , sa température d'ébullition 2310 à 2325°C sous 760 mm Hg et sa conductibilité thermique $335 \text{ Kcal.m/m}^2\text{.h.}^\circ\text{C}$.

Le cuivre est caractérisé par une faible réactivité chimique. Son potentiel normal d'oxydation $\text{Cu} \rightarrow \text{Cu}^{2+}$ est de $0,340 \pm 0,001 \text{ V}$ à 25°C . La chaleur d'oxydation du cuivre en Cu_2O est de $38,5 \text{ cal/mole}$ (606 cal/g de cuivre). Les principaux états d'oxydation du cuivre dans ses composés sont +1 et +2.

Il se combine facilement avec les halogènes. Il révèle une affinité particulière pour le soufre et pour le sélénium. Il ne réagit pas avec l'azote, même à haute température. Il ne se combine pas directement avec le carbone mais peut remplacer l'hydrogène dans l'acétylène pour donner de l'acétylure cuivreux Cu_2C_2 ou cuivrique CuC_2 .

Moins électropositif que l'hydrogène, le cuivre est dissous uniquement par les acides oxydants comme les acides nitriques et sulfuriques, avec la formation de sels cuivriques.

Les composés cuivreux (Cu^+) sont incolores et tous insolubles dans l'eau. Toutefois, quelques-uns peuvent être portés en solution à l'état de complexes. Les composés cuivriques (Cu^{2+}) dérivés des acides forts sont solubles dans l'eau et complètement dissociés dans les solutions diluées. L'ion Cu^{2+} hydraté est coloré en bleu et cette coloration est également présente dans la plupart des sels cuivriques hydratés.

Le chlorure cuivrique CuCl_2 s'obtient en dissolvant l'oxyde ou le carbonate dans l'acide chlorhydrique ; le sel anhydre est jaune, le sel hydraté bleu, la solution concentrée verte.

Le cuivre peut se combiner pour former des composés type : CuSO_4 , Cu_2O_2 , CuCO_3 , $\text{Cu}(\text{OH})_2$ = l'azurite, le chryocolle $\text{CuSiO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, la malachite $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$, la bornite Cu_5FeS_4 ... (AUGER *et al.*, 1970).

d) Le zinc

Le zinc (Zn) est un métal blanc bleuâtre de densité 7,14, de numéro atomique 30, de masse atomique 65,38, de masse volumique 7133 Kg/m^{-3} à 25°C . Sa température de fusion est de $419,5^\circ\text{C}$ et sa température d'ébullition 907°C . Il possède 5 isotopes stables, d'abondance en pourcentage variable.

Le zinc en solution, ainsi que ses composés, se trouvent toujours à l'état d'oxydation +2. En solution aqueuse, le zinc a tendance à former des complexes covalents avec les molécules d'eau pour donner des ions tétrahydratés. Lorsque la solution devient basique, l'hydroxyde de zinc $\text{Zn}(\text{OH})_2$ précipite. En solution fortement basique, ce composé se dissout en donnant l'ion zincate qui peut exister sous les formes ZnO_2^{2-} ou H ZnO_2^- . Dans certaines combinaisons chimiques comme le sulfure, le sélénure, le tellure et l'oxyde, la plupart des liaisons formées sont covalentes.

Le zinc se combine avec différents éléments dont principalement :

- les halogènes (chlorure, bromure, iodure très solubles dans l'eau, fluorure insoluble dans l'eau)
- l'oxygène (oxyde, hydroxyde, peroxyde)
- le soufre (sulfure, sulfate)
- le phosphore (orthophosphate)
- le carbone (carbonate très répandu dans la nature sous forme de calamine et smithsonite)
- le silicium (orthosilicate).

L'ion zinc forme également un grand nombre de complexes avec les composés organiques. Il présente un caractère nettement amphotère.

En milieu non oxydant, les acides attaquent le zinc à une vitesse qui dépend de la pureté du zinc, mais l'acide nitrique attaque le zinc quelle que soit sa pureté (AUGER *et al.*, 1970).

2.1.2. Production et consommation

a) Cadmium

La production du cadmium est liée à celle du zinc (95%), et un peu moins à celle du plomb et du cuivre (5%). Pour une tonne de zinc produite, on obtient 3,4 kg de cadmium. La quantité de cadmium produite a considérablement augmenté au cours du XXe siècle, et il en résulte que les métallurgies du zinc, du plomb et du cuivre produisent, à elles seules, tout le cadmium utilisé industriellement dans le monde.

La récupération du cadmium, comme sous-produit de ces métallurgies, était, dans le passé, moins soignée que de nos jours à cause des importantes demandes du marché et de son prix (environ 12 fois celui du zinc). Les principales utilisations du cadmium sont : le cadmia-ge, la fabrication de colorants, de piles (Cd-Ni), de plastiques et d'alliages.

Les fumées et les poussières qui proviennent du grillage et du frittage des concentrés, ainsi que des opérations de réduction, contiennent en plus des teneurs assez importantes de cadmium, du plomb, du zinc, de l'arsenic ainsi que d'autres éléments. Ces matériaux sont oxydés et lessivés avec des solutions acides dans lesquelles le cadmium est précipité, puis raffiné en le refondant avec la soude caustique pour éliminer le zinc et les autres impuretés encore présentes.

Dans les procédés électrolytiques d'extraction du zinc, de ses minerais, le cadmium présent est récupéré, dans la phase de purification de solutions à électrolyser, par cémentation avec de la poussière de zinc. Le produit obtenu dissous est électrolysé dans des bacs munis de cathodes d'aluminium et d'anodes insolubles en plomb contenant 1% d'argent. Le cadmium déposé à la cathode, ainsi obtenu, est à nouveau fondu, et le métal résultant a une pureté de 99,95%.

Les projections faites à partir de divers indicateurs économiques (BEAUJEU-GARNIER *et al.*, 1988 ; CHALMIN et GOMBEAUD, 1988) montrent que la demande globale de cadmium sera peu modifiée dans le futur, mais que les utilisations, par contre, vont changer. Les secteurs capables d'accroître leurs besoins en cadmium sont en particulier la fabrication de batteries (cadmium-nickel) et de pigments (HISCOCK, 1983). D'autres utilisations, encore peu importantes, seront liées au développement des nouvelles sources d'énergie, comme par exemple le sulfure de cadmium qui entre dans la composition de cellules photovoltaïques et des barres de cadmium (métal) utilisées dans le contrôle des réacteurs nucléaires par suite de leur grande capacité d'absorption des neutrons.

Les pays les plus industrialisés produisent à l'heure actuelle 12 à 15000 tonnes de cadmium par an, mais les besoins mondiaux de cadmium métal ont déjà augmenté de 30% en 1986. En 1987 la consommation a été estimée à 16000 tonnes contre une production mondiale de l'ordre de 15000 tonnes.

Alors que les principaux centres de production de cadmium recouvrent les zones où le zinc est extrait et fondu, le cadmium est essentiellement utilisé dans les pays industrialisés. Ses principaux utilisateurs sont les Etats Unis, la Belgique, la R.F.A., le Japon, le Royaume Uni et la France. Ces pays représentent plus de 80% de la consommation du monde occidental.

En France la consommation de cadmium a suivi un courant de progression très important, surtout dans les usages pour les accumulateurs avec une nette augmentation dans la consommation mais un affaiblissement dans la production.

b) Nickel

Dans la métallurgie, le choix du procédé d'extraction du nickel est principalement déterminé par la nature du minerai de départ. On peut avoir à préparer de petites quantités de nickel, notamment pour servir de catalyseur. Il est alors possible de dissocier au-dessus de 180°C du nickel-carbonyle (c'est une phase de préparation industrielle). Le nickel-Raney est préparé en fabriquant un alliage nickel-aluminium à poids égaux, puis en le pulvérisant et en l'attaquant au-dessus de 100°C par une solution de soude à 30%. Quel que soit le mode de préparation, le nickel est sensible à l'action de divers "poisons" : soufre, sélénium, tellure, arsenic, antimoine, bismuth, zinc, mercure, plomb, halogènes, ammoniac. Inversement, des oxydes comme ThO_2 , Al_2O_3 , Cr_2O_3 , améliorent l'activité catalytique du nickel ou permettent un déclenchement rapide des réactions.

L'emploi du nickel comme élément de base pour la fabrication d'alliages est connu depuis 1905. Parmi les nombreux alliages de nickel on peut distinguer deux groupes : les alliages non ferreux et les alliages ferreux. Les alliages à base de nickel peuvent être obtenus soit par fusion (dans l'air, dans une atmosphère de gaz inerte ou dans le vide) dans des fours, soit selon le procédé plus récent de frittage.

Les alliages de nickel sont obtenus dans les formes normales des demi-produits et des coulées et ils peuvent être travaillés selon les procédés habituels.

Que ce soit en matière de production minière, ou après traitement des minerais, de production de mattes de nickel et de ferronickel, les deux principaux pays producteurs sont le Canada et la Nouvelle-Calédonie. Les mattes et les ferronickels élaborés en Nouvelle-Calédonie sont, dans leur majorité, expédiés vers la France qui ne dispose sur son territoire métropolitain d'aucune ressource en minerais de nickel ; les mattes de Nouvelle-Calédonie contiennent plus de 75% de nickel.

61% de la production de nickel sont destinés à la métallurgie ferreuse, dont 59% pour les aciers inoxydables, réfractaires ou de construction ; la consommation reste toujours concentrée dans les grands pays industrialisés qui représentent plus de 90% de la consommation totale. Le nickel métal est utilisé dans la production d'aciers, de fontes alliées, de demi-produits en métaux non ferreux, dans la galvanoplastie et dans la production de flans monétaires.

L'année 1987 a connu la plus forte progression du prix du nickel. La demande en provenance des aciers spéciaux inoxydables représente 55% des débouchés du nickel. En 1987, on estime que la production d'aciers spéciaux du monde occidental aura atteint 8,95 millions de tonnes ; la production d'aciers spéciaux a augmenté de 3% chaque année. En 1987, les besoins des aciers spéciaux auront fait passer, dans les pays occidentaux, la demande du nickel de 547 000 tonnes à 610 000 tonnes.

Dans ces conditions, tout au long de l'année, l'écart entre la demande et la production n'a cessé de croître. Alors que les excédents avaient atteint 15 000 tonnes en 1986, le déficit était estimé à 40 000 tonnes pour l'année 1987.

c) Le cuivre

Généralement, l'extraction du cuivre se fait à partir de minerais sulfurés, 50% à partir de la chalcocite et 25% environ à partir de la chalcopyrite. Le minerai concentré contenant 15 à 30% de cuivre est quelquefois grillé afin d'éliminer une partie du soufre et de certains éléments contaminants tels que l'arsenic, l'antimoine ou le bismuth. Dans la métallurgie du cuivre existe une série de réactions : fusion pour matte, transformation de la matte, affinage thermique, affinage électrolytique, pour obtenir finalement des formes sous lesquelles le cuivre est commercialisé.

Les différentes qualités commerciales de cuivre se distinguent essentiellement par leurs teneurs résiduelles en oxygène et en phosphore qui déterminent leurs possibilités d'emploi et de mise en oeuvre. Ce sont par exemple les : cuivres raffinés contenant de l'oxygène, surtout

utilisés en électrotechnique et mécanique, les cuivres affinés désoxydés au phosphore ; cette forme se prêtant particulièrement bien aux opérations de matriçage, d'emboutissage, de soudage ou en mécanique pour les applications ne nécessitant pas une conductivité électrique très élevée : les cuivres raffinés exempts d'oxygène, cuivres faiblement alliés, cuivres alliés : laiton avec du zinc, bronzes avec de l'étain, cupro-aluminiums, cupro-nickels...

La consommation mondiale de cuivre, en hausse de 4%, a atteint 8,6 Mt. La production n'ayant augmenté que de 0,3%, elle entraîne une diminution dans les stocks. 1987 a été, pour le cuivre, la quatrième année consécutive de déficit (d'environ 90 000 tonnes). En moyenne de 1964 à 1973, le rythme annuel de progression de la demande a atteint dans les pays industrialisés 9,9% ; aux Etats Unis et dans les nouveaux pays industrialisés l'augmentation fut encore plus forte : 16,9%.

d) Le zinc

Le zinc est un métal couramment répandu sur le globe. Il se trouve pratiquement toujours au niveau des gisements de plomb. Les principaux minerais de zinc sont la blende, la sphérolite (sulfures) et la calamine. La teneur moyenne en zinc de la lithosphère est de 1 ppm environ.

Le zinc est utilisé dans la production de demi-produits : zinc laminé, feuilles, bandes de fils ; pour la galvanisation dans l'industrie automobile dans la protection contre la corrosion ; dans la production des alliages de fonderie ; dans la production de produits chimiques et divers.

Au cours de 1987, la demande mondiale de métal a augmenté de 100 Kt, pour s'établir à 5 Mt, contre 4,92 Mt en 1986. La production a suivi ce mouvement, puisqu'elle est estimée à 5,2 Mt en 1987. Par contre la consommation de zinc de première fusion sur le marché français a été inférieure de 13 031 tonnes en 1987 par rapport à 1986, soit une réduction de 5%.

2.1.3. Concentrations des métaux trouvés dans l'eau ou les écosystèmes aquatiques

La présence des métaux dans les écosystèmes aquatiques est liée à des phénomènes naturels et/ou anthropiques.

En effet la contamination des eaux continentales superficielles résulte de la pollution directe des cours d'eau (rejets industriels), mais aussi des précipitations et des retombées résultant de la contamination atmosphérique, et des ruissellements des eaux sur les sols entraînant les polluants accumulés en surface... De fait, toutes les émissions des métaux dans l'atmosphère se retrouvent à plus ou moins long terme, pour une certaine part, dans les eaux.

L'estimation quantitative objective de la contamination des eaux par les métaux est très difficile comparativement à une approche qualitative, car la répartition des métaux dans l'environnement est extrêmement hétérogène, et de plus les chiffres rapportés dans la littérature prennent rarement en compte les différents états ou/et formes physico-chimiques de ces éléments : formes dissoutes, formes non dissoutes finement dispersées ou colloïdes, formes non dissoutes grossièrement dispersées ou particulaires, formes liées aux sédiments, formes fixées par les organismes aquatiques.

Dans les eaux naturelles, ces formes dépendent du pH, de la nature et de la qualité des matières en suspension, de la forme ionique (salinité), de l'espèce chimique en jeu, de la température du milieu, et leur stabilité dépend du potentiel d'oxydoréduction environnant.

Ainsi, par exemple, le cuivre est associé principalement à la matière organique ou colloïdes organiques, avec les carbonates, cyanures, aminoacides, polypeptides et substances humiques (STIFF, 1971). Le cadmium existe entièrement associé aux formes ioniques et le zinc peut se trouver sous formes ioniques labiles ou sous formes stables inorganiques (FLORENCE, 1977).

Les différentes espèces métalliques présentes dans l'eau en fonction des conditions physico-chimiques du milieu sont rapportées dans le tableau 3. Au cours des années, l'étude des espèces métalliques a mieux pris en compte le rôle joué par les facteurs de l'environnement. Ainsi l'évolution des données présentées dans le tableau 3 laisse voir que les auteurs, de ZIRINO et YAMAMOTO (1972) à MOUVET et BOURG (1983), se sont intéressés chaque fois à des variables plus nombreuses et complexes pour approcher d'une manière plus fidèle le problème de la spéciation des métaux. Toutefois, pour la plupart des métaux, les formes adsorbées prédominent dès qu'il y a présence de matière en suspension.

En ce qui concerne la salinité, HAHNE et KROONTJE (1973) montrent le rôle des ions Cl^- sur les métaux (les complexes CdCl^+ se forment à partir d'une concentration de 10^{-3}M en Cl^- et pour le zinc de 10^{-2}M). ZIRINO et YAMAMOTO (1972) ont élargi cette recherche en étudiant la spéciation des métaux dans l'eau de mer vis-à-vis des anions (Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} , OH^-) ; le Cd^{2+} réagissant préférentiellement avec Cl^- , le Cu^{2+} et le Zn^{2+} avec OH^- et Cl^- .

Tableau 3 : Exemple des études de spéciation chimique des métaux dans l'eau.

Auteurs et conditions physico-chimiques	Pourcentages des espèces métalliques			
	Cd	Ni	Cu	Zn
ZIRINO et YAMAMOTO, 1972 dans l'eau de mer pH=7,0 25°C	CdCl ₂ =51 CdSO ₄ =0,5 CdCl ₃ =6 CdHCO ₃ ⁺ =0,2 CdCl ⁺ =39 Cd ²⁺ =2,5 Cd(CO ₃) =0,1	-	CuCl ₂ =0,25 CuSO ₄ =6 CuOH ⁺ =2,5 CuHCO ₃ ⁺ =7 CuCl ⁺ =4,5 Cu(OH) ₂ =20 CuCO ₃ =30 Cu ²⁺ =30	ZnCl ₂ =8 ZnSO ₄ =10 Zn(OH) ₂ =1 ZnHCO ₃ ⁺ =3,2 ZnCl =19 ZnCl ₄ =1,5 ZnCO ₃ =1,7 ZnCl ₃ ⁻ =3,4 ; Zn ²⁺ =51
MANTOURA <u>et al.</u> ,1978 dans l'eau douce	Cd ²⁺ =90 CdOH ⁺ =4 Cd-humus =3	-	-	-
MOUVET et BOURG, 1983 dans l'eau de la MEUSE pH = 7,8 T = 45°C Force ionique = 0,005 matières en suspension 60mg/l acides humiques = 5,35µM HCO ₃ ⁻ = 1,88mM Cl ⁻ = 0,82mM SO ₄ ⁻² = 0,500mM Na ⁺ = 0,61mM Ca ²⁺ = 1,05mM Mg ²⁺ = 0,247mM	-	Ni ²⁺ =15 Ni(OH) ⁺ =0,1 NiCO ₃ =8,8 NiHCO ₃ ⁺ =6,4 NiSO ₄ =0,8 Ni-adsor. = 65	Cu ²⁺ =0,3 CuOH ⁺ =0,1 CuOH ₂ =6,4 CuCO ₃ =4,4 CuHCO ₃ ⁺ =87 Cu-adsor. = 87	Zn ²⁺ =11,7 Zn(OH) ⁺ =0,1 ZnCO ₃ =2,7 ZnHCO ₃ ⁺ =1,2 ZnSO ₄ =0,6 Zn-adsor. = 79

A partir des études de SUNDA et al. (1978) et ENGEL et FOWLER (1979), la relation entre la salinité et la formation des complexes a été montrée, notamment dans la formation des chlorures (de Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}).

Le pH est un facteur physico-chimique important ainsi que la composition du milieu. Ainsi la teneur en CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^- , PO_4^{3-} , BO_3^- ou en substances organiques type : amino acides, protéines, acides humiques et autres métabolites, modifient la forme chimique du métal en solution (SIPOS et al., 1979). D'autres auteurs ont étudié les mêmes relations de complexation avec des chélateurs type EDTA, NTA, DTPA et leur influence sur le comportement chimique des métaux (RASPOR et al., 1977) ou la relation entre les cations métalliques et les groupes fonctionnels COOH des composés aromatiques (STUMM et MORGAN, 1970).

Les exemples de mesures réalisées sur le terrain sont nombreuses et mettent en évidence que la phase particulaire sédimentée est riche en métaux. Ainsi pour la Seine et le Rhin des concentrations en cadmium de 0,5 - 4 $\mu\text{g/l}$ (Seine) et 1,5 - 6,5 $\mu\text{g/l}$ (Rhin) ont été trouvées dans l'eau contre des concentrations plus importantes trouvées dans les vases de ces mêmes fleuves 0,05 - 0,15 $\mu\text{g/g}$ (Seine) et 5,6 - 83,3 $\mu\text{g/g}$ (Rhin). De même pour le zinc, COLLIN (1976) rapporte que la concentration dans les vases de certaines rivières alsaciennes et lorraines est au moins 20 fois plus importante que celle de l'eau. Pour le cuivre et le nickel, la teneur naturelle dans les eaux courantes est faible (de l'état de traces à 50 $\mu\text{g/l}$ maximum). Par contre, VERNET et al. (1978) ont étudié les teneurs de ces micropolluants minéraux dans les sédiments de rivières suisses, du Rhône français et de ses principaux affluents, trouvant ainsi des concentrations de l'ordre de 25 $\mu\text{g/g}$ et 50 $\mu\text{g/g}$ pour le cuivre et le nickel respectivement.

Les méthodologies utilisées pour séparer les formes libres dans les eaux naturelles, ou fixées, ont une importance considérable puisque chacune d'entre elles n'explore pas obligatoirement et ne donne pas la même information. Selon les auteurs, il est possible de distinguer les formes décantables/non décantables, dialysables/non dialysables, etc...

La méthode de dialyse, étudiée principalement par HART et DAVIES (1977), BENES et STEIMES (1974), a été employée pour estimer la répartition des métaux dans les eaux naturelles. Dans le tableau 4 cette répartition est établie en pourcentage de métal dialysable par rapport à la quantité totale du métal.

Tableau 4 : Pourcentages de répartition de la fraction dialysable et non dialysable de cadmium, cuivre, zinc (HART et DAVIES, 1977).

Echantillon	Elément	Concentration totale de métal en µg/l	Concentration de métal dialysable µg/l	% de métal dialysable
I YARRA river, 1975	Cd(II)	0,50 ± 0,07	0,42 ± 0,01	84
	Cu(II)	3,55 ± 0,14	1,47 ± 0,12	41,4
	Zn(II)	84 ± 20	17 ± 1,3	20,2
II YARRA river, 1976	Cd(II)	0,30 ± 0,005	0,24 ± 0,01	80
	Cu(II)	6,3 ± 0,23	1,5 ± 0,12	23,9
	Zn(II)	71 ± 2	14,8 ± 0,2	20,8
III DANDENOG creek, 1976	Cd(II)	0,35 ± 0,01	0,22 ± 0,005	62,8
	Cu(II)	5,5 ± 0,35	3 ± 0,2	54,5
	Zn(II)	45 ± 2	5,7 ± 0,14	12,6

Parmi les trois métaux, le cadmium se retrouve en grande quantité dans la fraction dialysable (environ 75%) suivi par le cuivre (45%) puis le zinc (17%). Malgré la différence d'origine de chacun des trois échantillons, la même tendance de répartition est présentée pour les trois métaux.

Un autre exemple de répartition est celle qui concerne la distribution des métaux (fractions décantables et non décantables) dans les effluents arrivant à une station d'épuration (COLIN et LE GUILLOU, 1980).

Tableau 5 : Pourcentages de répartition des métaux dans les différentes fractions d'effluents ; moyennes (et valeurs limites entre parenthèses) (COLIN et LE GUILLOU, 1980).

Eléments	Fractions %		
	Matières solides décantables	Matières solides colloïdales	Phase liquide
Cd(II)	6 (0-15,3)	43 (0-80)	51 (10-100)
Ni(II)	4,5 (0-12,7)	24 (0-93,6)	71 (50-100)
Cu(II)	20 (1,5-56)	33,6 (0-58,5)	47,3 (6,6-85)
Zn(II)	40,3 (12-96)	12,6 (0-54)	49 (3-85)

Comme le montre le tableau 5, les quatre métaux considérés se trouvent principalement dans la phase liquide, puis sous forme de matières colloïdales et seule une petite quantité existe sous forme décantable. Une étude plus approfondie sur la répartition de ces métaux dans les effluents au cours du temps a été faite par ROBERT *et al.* (1977) et OLIVIER et COSGROVE (1974), montrant une variation au cours du temps des niveaux de concentration mais peu de la répartition.

La preuve d'une contamination strictement anthropique des eaux environnementales par les métaux est relativement difficile à faire. En effet, les limites entre les niveaux de contamination naturelle et anthropique (industrielles et domestiques) sont très variables. De rares tentatives ont été faites pour essayer d'évaluer le niveau de contamination des eaux naturelles ; ainsi dans le tableau 6 quelques résultats sont présentés à ce sujet.

Les mesures ont été faites à partir des prélèvements d'eaux superficielles ou lacs dans des zones non exposées à des contaminations d'origine industrielle ou domestique. Toutes ces contaminations d'origine naturelle sont au niveau de traces.

Tableau 6 : Concentrations en Cd(II), Zn(II), Cu(II) mesurées dans les eaux naturelles de certaines rivières et lacs par différents auteurs et exprimées en µg/l.

Eléments	DURUM <u>et al.</u>, 1971	VAN DER WEIJDEN, 1973	MATHIS et KEVERN, 1975	COLLIN, 1976	WATER QUALITY CRITERIA , 1976
Cd(II)	1 - 10	1E-2 - 3	9E-1 - 1	0 - 2	-
Zn(II)	10 - 50	-	-	15 - 20	-
Cu(II)	-	-	-	-	50

Dans l'eau de mer les concentrations en métaux sont généralement plus basses que celles observées en eau douce (SIMPSON, 1981).

PATEL *et al.* (1985) ont fait une évaluation de la contamination par différents métaux dans la zone de BOMBAY HARBOUR des années 1976-1980 ; BALLS (1985), dans les eaux de la côte nord-ouest européenne ; LAUMOND *et al.* (1984) dans les eaux de la partie ouest de la Méditerranée ; et COSTA *et al.* en 1988 dans la zone côtière du Portugal. L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 7. Ainsi les concentrations mesurées en pleine mer sont généralement basses car la plupart du métal rejeté dans la mer se dépose sur les sédiments marins, et moins de 1% du total resterait en solution. Les régions les plus exposées sont évidemment les estuaires et les baies très enclavées et plus particulièrement des zones situées près des côtes.

Lorsqu'il y a contamination d'origine anthropique "évidente", les chiffres mesurés peuvent devenir très élevés. En ce qui concerne les eaux usées, les métaux entrent dans ces eaux à partir de sources variées, surtout domestiques et industrielles (LESTER, 1983). Quelques exemples ont été donnés par KLEIN *et al.* (1974) analysant les concentrations de Cu, Cr, Ni, Zn, Cd, dans les eaux usées de diverses industries de la ville de New York (Tableau 8).

En général, toutes les industries nommées sont une source assez importante de contamination des eaux usées, mais c'est le traitement des fourrures, tanneries et blanchisseries qui les contamine en grande quantité.

Le chrome est l'élément le plus retrouvé et le cadmium celui qui est apporté en moindre quantité. De plus, il est important d'analyser les pourcentages de répartition des métaux amenés par une contamination d'origine anthropique ou naturelle, arrivant dans les effluents bruts à l'entrée d'une station d'épuration où la distinction est faite, métal par métal, entre les différentes sources d'apport et en distinguant les quantités totales et les quantités dissoutes (Tableau 9).

Tableau 7 : Concentrations en Cd (II), Cu (II) et Zn (II) trouvées dans différentes zones maritimes de différentes mers et exprimées en µg/l.

Auteurs et années	Zone	Cd(II)	Ni(II)	Cu(II)	Zn(II)
PATEL et al., 1976-1980	Bombay Harbour	0,1	0,5	16 ± 10	27 ± 10
KREMLING et PETERSON, 1981	Mer Méditerranée	0,017 ± 0,007	-	0,21 ± 0,07	0,40 ± 0,16
BALLS et al ., 1985	Côte du Nord-Ouest Européen	0,01 - 1,4	-	0,24 - 1,9	-
COSTA et al., 1988	Côte du Portugal	-	0,3	0,9	1,5

Tableau 8 : Concentrations en Cu (II), Cr (III), Ni (II), Zn (II), et Cd (II) trouvées dans les eaux usées des différentes industries de la ville de New York (KLEIN et al., 1974).

INDUSTRIES	Nombre d'industries testées	Nombre d'échantillons	Concentrations moyennes mg/l				
			Cu(II)	Cr(III)	Ni(II)	Zn(II)	Cd(II)
Traitement de viande	16	53	0,15	0,15	0,07	0,46	0,011
Traitement de graisse	4	16	0,22	0,21	0,28	3,89	0,006
Traitement de poisson	1	4	0,24	0,23	0,14	1,59	0,014
Boulangerie	3	8	0,15	0,33	0,43	0,28	0,002
Mélange d'aliments	4	16	0,35	0,15	0,11	1,11	0,006
Brasserie	2	43	0,41	0,06	0,04	0,47	0,005
Boissons douces	3	12	2,04	0,18	0,22	2,99	0,003
Glaces	1	3	2,7	0,05	0,11	0,78	0,031
Textiles-Colorants	22	65	0,37	0,82	0,25	0,5	0,03
Fourrure-Tannerie	6	28	7,04	20,14	0,74	1,73	0,115
Mélange chimique	10	23	0,16	0,28	0,1	0,8	0,027
Blanchisserie	4	14	1,7	1,22	0,1	1,75	0,134
Lavage de voitures	39	39	0,18	0,14	0,19	0,92	0,018

Tableau 9 : Pourcentages de répartition des métaux dans les effluents bruts arrivant à la station d'épuration (AMMANN *et al.*, 1979).

Eléments métalliques	(%) de la fraction dissoute par rapport aux métaux totaux	Origine de la fraction dissoute (%)		
		Effluents Industriels	Effluents domestiques	Eaux de ruissellement
Cd	43,2	4	22	74
Cu	90,1	4	18	78
Fe	1,4	5	11	84
Mn	31,3	5	26	69
Pb	50,4	5	21	75
Zn	18,8	5	70	25
Cr	22,1	11	12	77
Ni	61,9	25	22	53
Hg	-	30	33	37

La répartition entre métaux dissous et métaux liés aux matières en suspension est très dépendante de la nature des métaux. Mais dans la plupart des cas (exception faite du zinc), les eaux de ruissellement constituent le principal apport des métaux présents dans la fraction dissoute.

De nombreuses publications rapportent des valeurs de concentrations en éléments métalliques des effluents urbains bruts. L'utilité de ces valeurs s'avère en pratique limitée du fait de l'étendue des fourchettes de concentrations indiquées, résultant notamment du raccordement aux égouts urbains d'effluents d'activités industrielles ou artisanales. Il est bien nécessaire de distinguer, comme le font PATTERSON et KODUKULA (1984), les stations traitant des effluents purement domestiques et celles qui admettent des rejets industriels.

En conclusion il est intéressant de comparer les fourchettes de concentration des effluents urbains à celles de différentes eaux superficielles et l'eau de mer (Tableau 10).

Tableau 10 : Concentrations en Cd (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II) trouvées dans les eaux superficielles, des mers et des effluents urbains (WILSON, 1976).

Eléments	Eau de mer µg/l (I)	Eau de rivière en µg/l				Effluents urbains µg/l (V)
		(I)	(II)	(III)	(IV)	
Cd(II)	0,05	-	0,08	-	-	2 -10
Ni(II)	2	0,3	0,2 -20	0,0 -7,1	0,3	30 -1600
Cu(II)	3	5	0,6 -400	0,83 -105	7	40 -660
Zn(II)	5	10	0,2 -1000	0,215	20	230 -8940

- (I) RILEY et CHESTER (1971)
- (II) BOWEN (1966)
- (III) DURUM et HAFFTY (1963)
- (IV) TUREKIAN (1971)
- (V) OLIVER et COSGROVE (1974)

Eu égard à la très forte variabilité des résultats obtenus (Tableau 10), il est de fait quasi impossible de différencier les milieux par leur niveau de contamination, mais il est évident que la contamination est plus importante dans un milieu plus proche de l'homme ; c'est le cas des effluents urbains.

2.1.4. Métaux dans les boues de station d'épuration

Les traitements biologiques des eaux usées urbaines amènent à récupérer deux types de "boue" :

a) Les boues de décantation primaire, qui correspondent aux particules des eaux brutes récupérées dans le décanteur primaire.

b) Les boues de décantation secondaire, qui correspondent à la biomasse formée dans le bassin d'aération et récupérées dans le décanteur secondaire.

Ces deux types de boues sont mélangées dans l'installation de traitement des boues, pour donner ce qu'on appelle : des boues mixtes (Figure 2).

Dans certaines stations de petite capacité, l'étape de décantation primaire est supprimée et les effluents sont envoyés directement dans le bassin avec aération prolongée. La totalité des boues est alors extraite d'un seul décanteur. Les boues représentent un mélange d'une phase liquide et d'une phase solide entre lesquelles la répartition des métaux a été quelquefois étudiée.

La composition des boues a été étudiée par LEVI-MINZI et al. (1980) montrant ainsi la complexité du mélange de matière organique, et du même coup, la multiplicité des interactions métaux-matière organique représentée par : les graisses, les cires, les huiles, les résines, les polyoses hydrosolubles, l'hémicellulose, la cellulose, protéines acides résistantes, lignine-humus.

En ce qui concerne plus particulièrement les boues digérées, d'autres auteurs se sont intéressés à la répartition des métaux dans ces boues et ont évalué les fractions dissoutes, particulaires et colloïdales de ces métaux (GOULD et GENTELLI, 1975 ; LESTER et al., 1983 ; STERRIT et LESTER, 1985). Un exemple est donné dans le tableau 11.

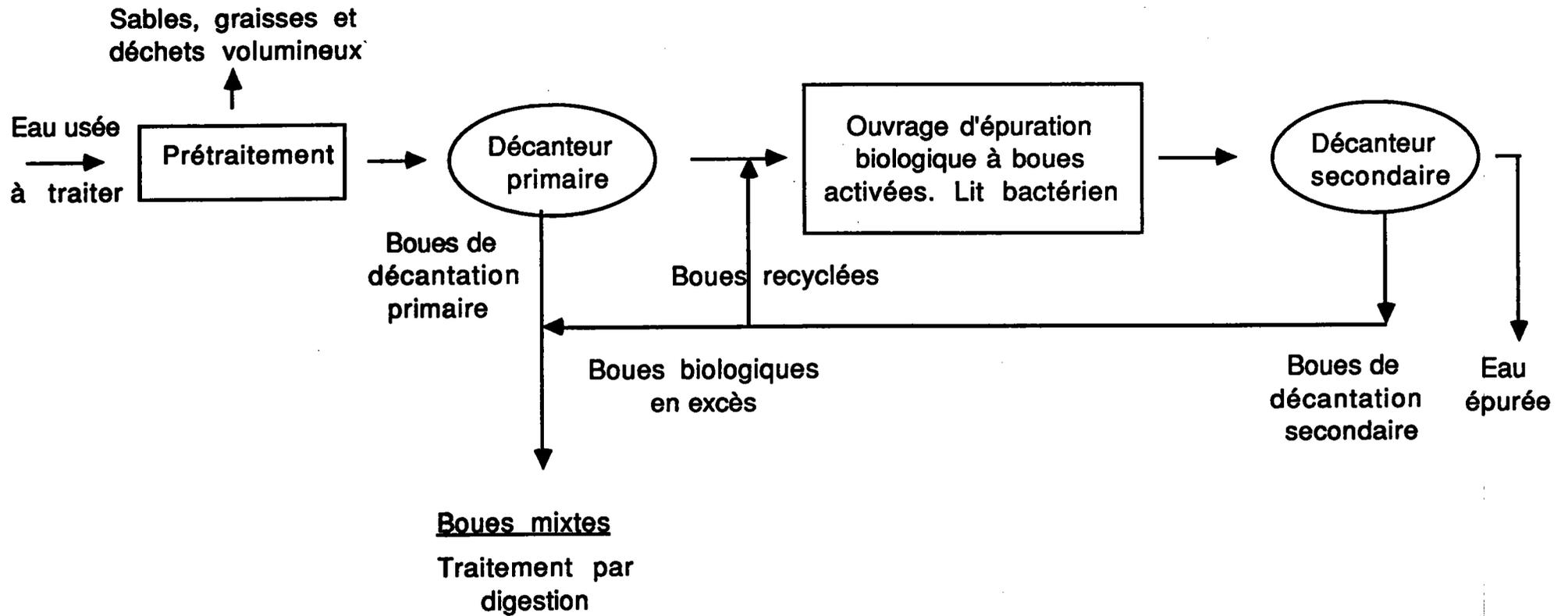


Figure 2.: Schéma d'une station d'épuration biologique

Tableau 11 : Répartition des métaux d'une boue digérée anaérobie en fonction des fractions granulométriques (GOULD et GENTELLI, 1975).

Elément	Fraction particulaire > 100µm	Fraction colloïdale (0,002 à 0,6) µm	Fraction dissoute < 0,002 µm
Cd(II)	90,4	1,4 (8,2)	-
Cu(II)	92,9	0,1 (6,9)	0,1
Ni(II)	95	5 (5)	-
Zn(II)	91,5	0,04 (8,4)	0,06

Il apparaît nettement que les métaux sont liés majoritairement à la fraction granulométrique la plus grossière.

HAYES et THEIS (1976-1978), combinant les techniques de tamisage et d'élutriation, distinguent ces métaux liés à la fraction minérale insoluble, la fraction organique extracellulaire, et à la fin une fraction intracellulaire (Tableau 12).

Tableau 12 : Pourcentages de répartition des métaux entre les phases solides minérales et les phases organiques extra et intracellulaires (HAYES et THEIS, 1976).

Elément	Total (mg/l)	%Soluble	%Insoluble	%Extracellulaire	%Intracellulaire
Cr(VI)	63,2	0,1	16,6	0,2	75,8
Cr(III)	76,5	0,1	31,5	0,15	69
Cu(II)	18,6	0,15	53	0,7	48,7
Ni(II)	6,38	4,4	54,8	1,1	34,8

Ces résultats montrent la prédominance d'une localisation intracellulaire pour le chrome et le cuivre, et d'un lien privilégié à la fraction minérale pour le nickel, phénomène qui peut être lié directement à la nature du métal.

2.1.5. Normes européennes et françaises des concentrations maximales admissibles des métaux dans les eaux et boues

Devant les concentrations de plus en plus importantes de métaux retrouvés dans l'environnement (milieu aquatique et boues de stations d'épurations), de nombreux organismes nationaux et internationaux ont instauré des normes de protection de l'environnement.

Actuellement, les concentrations maximales admissibles en Cd, Ni, Cu et Zn, au niveau international, européen (CCE) et français (AFNOR) sont présentées dans le tableau 13 pour l'eau de boisson, les effluents urbains et pour les boues.

De ces quatre éléments, le cadmium est le plus limité en Europe et en France tant pour les contaminations des eaux que pour les boues de stations d'épuration ; le classement est le suivant : $Cd^{2+} > Ni^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+}$.

2.2 STRUCTURE DES ENVELOPPES BACTERIENNES

A quelques rares exceptions près, toutes les bactéries sont entourées par une paroi ou exosquelette dont l'une des fonctions est le maintien de la forme de la bactérie dans un environnement, généralement fortement hypotonique. Le rôle de la paroi est de protéger la cellule contre le milieu environnant, ou contre la forte osmolarité du compartiment intracellulaire, mais aussi de maintenir autour de la cellule un microenvironnement susceptible d'influencer un environnement plus large, de délimiter un espace (espace périplasmique) capable de percevoir les variations du milieu extérieur (BEVERIDGE, 1981 ; FERRIS et BEVERIDGE, 1985 ; SALTON, 1987). La nature de cette paroi est spécifique aux bactéries et représente l'une des différences fondamentales entre les procaryotes et les eucaryotes (STANIER, 1970).

Sous l'influence des paramètres environnementaux, l'activité et l'état physiologique de la cellule sont quelquefois altérés. Certaines modifications de la paroi ont été décrites avec des changements des éléments la composant ou du rapport entre ces éléments. Par exemple, chez les bactéries gram négatives, la production des acides gras, des phospholipides et des protéines-pigments peut être modifiée par la simple addition de fer dans le milieu. De même, la diminution ou l'augmentation de la concentration en protéines enzymatiques ont été observées. Ces variations se traduisent parfois par un changement au niveau de la résistance cellulaire aux antibiotiques et autres toxiques (RANDLE *et al.*, 1969 ; OP DEN KAMP *et*

Tableau 13 : Concentrations maximales admissibles en Europe et en France en Cd (II), Cu (II), Zn (II).

Elément	Eaux de surface Conseil des Communautés Européennes, 1980 (KIRK et LESTER, 1984)	Effluents urbains Ministère de l'Environnement français, 1985	Eau de boisson au niveau européen KIRK et LESTER, 1984	Boues Normes françaises 1985
	mg/l	mg/l	mg/l	mg/kg matière sèche
Cd(II)	0,005	0,2	0,005	20
Ni(II)	0,05	5	0,05	200
Cu(II)	0,05	2	0,05	1000
Zn(II)	3	5	5	3000

VAN DEENEN, 1969 ; MEYER et al., 1978-1979 ; HIRAMATSU et MASXI, 1980 ; YOSHIMURA et NIKAIDO, 1982).

La majorité de bactéries répond d'une façon presque univoque à la coloration de gram qui permet d'apprécier indirectement la structure et la composition chimique de la paroi (DAVIS et al., 1983 ; BEVERIDGE et DAVIS, 1983).

Les structures bactériennes sont relativement bien connues aujourd'hui (pour les bactéries gram négatives et gram positives) et le détail sur la composition et la relation entre les enveloppes a été élucidé à l'aide des analyses biochimiques et du microscope électronique. C'est ainsi que quelques auteurs ont pu donner des détails précis sur la taille des enveloppes, l'espace les séparant, et définir exactement leurs composés chimiques (DE PETRIS, 1967 ; SALTON, 1971).

Les enveloppes des bactéries gram négatives, observées entre autres en microscopie électronique, présentent une organisation plus complexe que celle des bactéries gram positives.

2.2.1. Bactéries gram positives

La paroi des bactéries gram positives s'organise sous forme d'une seule couche épaisse d'environ 25 nm de peptidoglycane (Figure 4), structurée ou non par des polymères type : polysaccharides, acides téichuroniques ou téichoïques et quelquefois protéines liées ou non par covalence à ce peptidoglycane (BEVERIDGE, 1984 ; DOYLE et al., 1973).

a) Le peptidoglycane chez les bactéries gram positives est un polymère qui représente de 30-50% en poids sec de la paroi. Il est responsable du maintien de la forme, de la rigidité et de la protection de la cellule. Chimiquement il est constitué (Figure 5) par une série répétitive et linéaire des dimères (β 1-4-N- acétylglucosamines) reliés par des térapeptides courts produisant des groupements muranyl carboxyliques (ROGERS et al., 1980).

D'autres composés se trouvent liés directement au peptidoglycane des bactéries gram positives :

b) Les acides téichoïques (organisés perpendiculairement à la paroi, sont des polymères composés de ribitol phosphate ou glycérolphosphate, lié aux groupements alcool des résidus polyol) et les acides téichuroniques (formés par un groupe d'acides polysaccharidiques qui chez certaines bactéries gram positives peuvent remplacer l'acide téichoïque, particulièrement quand les microorganismes sont cultivés en absence de phosphates). Ces acides téichuroniques sont constitués de proportions équimolaires de N- acétylgalactosamine et d'acide D-glycuronique (ROGERS *et al.*, 1980).

c) D'autres polymères sont associés à la paroi et présentent des régions hydrophobiques et hydrophiliques, d'où leur nom d'amphiphiles comme par exemple l'acide lipotéichoïque.

Une grande partie des bactéries gram positives possède, au niveau de la paroi, des polysaccharides neutres, lesquels sont généralement des hétéropolymères de 2 à 4 amino sucres différents qui sont dans la plupart des cas utilisés comme marqueurs antigéniques.

Des protéines sont liées à la paroi. Certaines présentent une activité enzymatique (par exemple les hydrolases). Généralement ces protéines sont du type T, R et M et elles sont en plus faibles quantités que dans la paroi des gram négatives ; quelquefois ces protéines peuvent être excrétées à l'extérieur de la cellule. D'autres protéines (Pe) comme le montre la figure 4, se trouvent à la surface, organisées en forme régulière et ordonnée, connues sous la dénomination de couche S.

Le glycocalix traduit l'existence d'une couche externe plus ou moins dense, plus ou moins organisée, très souvent composée de polymères polysaccharidiques, mais aussi dans certains cas polypeptidiques (SAVAGE et FLETCHER, 1985).

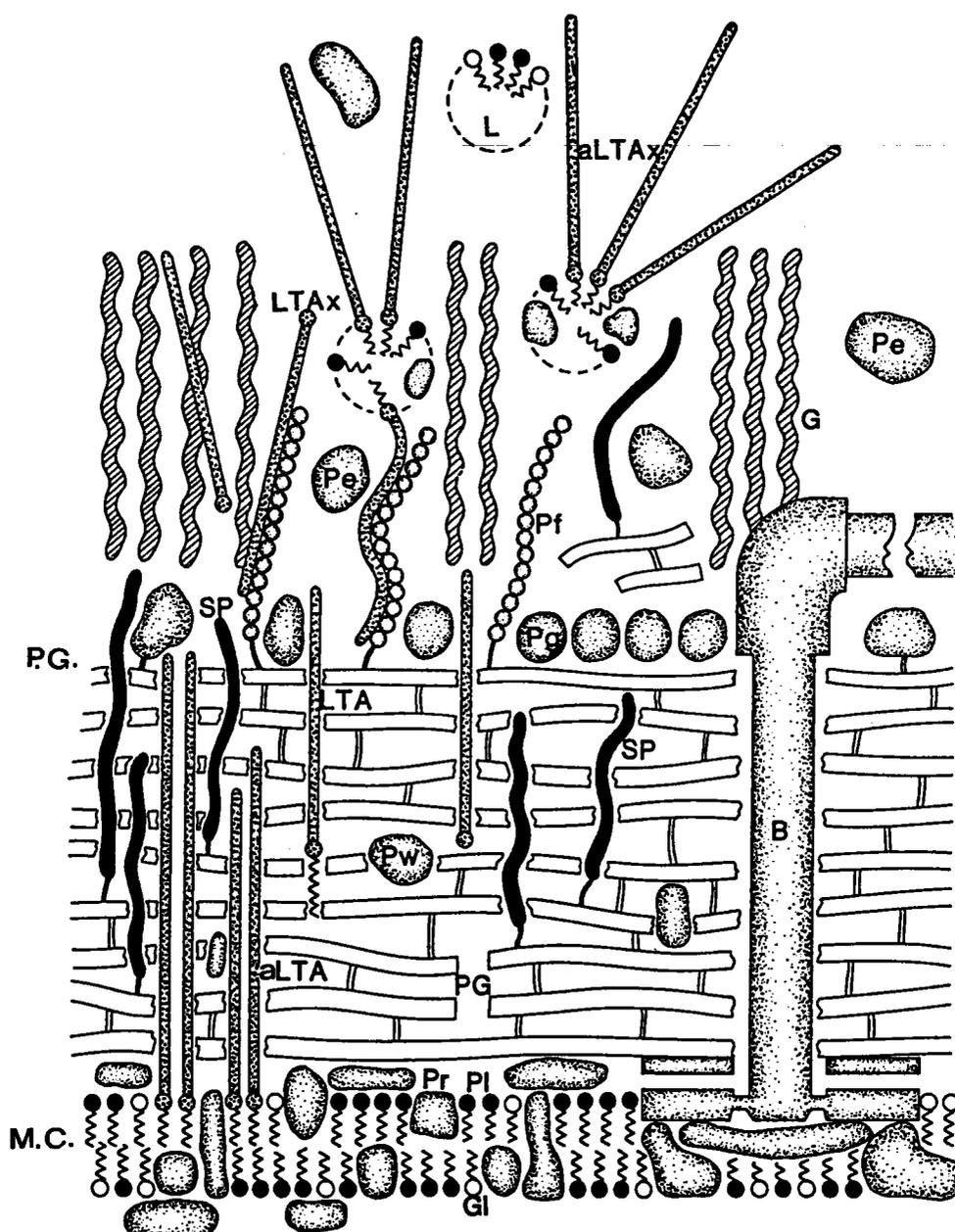
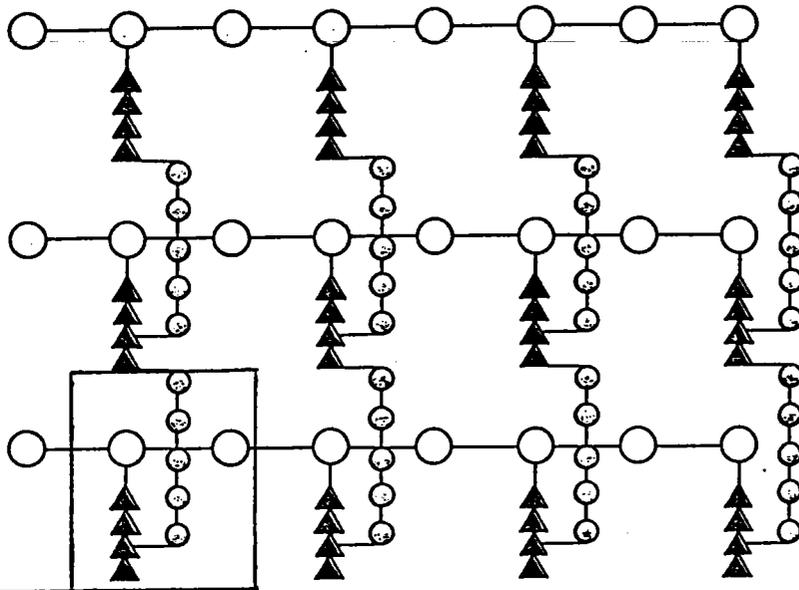


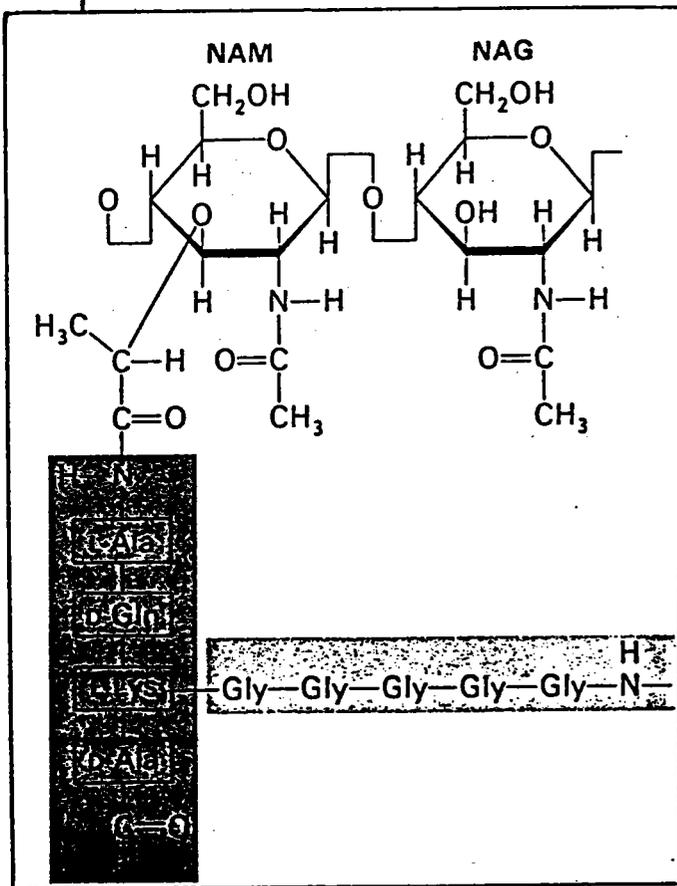
Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation de la paroi cellulaire chez les bactéries gram positives (SAVAGE et FLETCHER, 1985).

- PG = peptidoglycane
- L = lipides ; aLTAx : acides lipotéichoïques excrétés
- Pe = protéines ; Pf : protéines fibrillaires ; Pg : protéines globulaires
- SP = polymères secondaires comme l'acide téichoïque ; téichuronique et polysaccharides
- B = base du flagelle composée de protéines
- MC = membrane cytoplasmique
- Pr = protéines de la membrane
- Pl = phospholipides
- Gl = glycolipides



SUCRES
TETRAPEPTIDES

PONTS
PENTAGLYCINES



NAM = acide N-acétyl muramique
NAG = N-acétyl glucosamine

Figure 5 : Unité de base du peptidoglycane chez *Staphylococcus aureus* (d'après STRYER, 1981).

2.2.2. Bactéries gram négatives

Au moins 4 structures ou couches peuvent être différenciées au niveau des enveloppes des bactéries gram négatives (Figure 6), soit en se déplaçant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

a) Les exopolymères

Les exopolymères jouent un rôle considérable, plus particulièrement dans le processus d'agrégation cellulaire sur un support (ROBINSON *et al.*, 1985 ; PRINGLE *et al.*, 1983) et, pour ce qui nous intéresse, dans le phénomène d'accumulation des métaux (BROWN et LESTER, 1982).

En général, ces polymères sont des hexoses neutres, des polyols, des sucres aminés, méthylés, des acides uroniques organisés en homopolysaccharides et hétéropolysaccharides, le plus souvent situés et identifiés à la périphérie cellulaire (SUTHERLAND, 1985 ; UHLINGER et WHITE, 1983).

Les exopolymères les plus souvent identifiés sont des exopolysaccharides dont la production par certaines populations bactériennes a été rapportée par plusieurs auteurs (DUGUID, 1948, 1951, DUGUID et WILKINSON, 1953 ; FUNAHARA *et al.*, 1980 ; BOYLE et READE, 1983). Les exopolysaccharides constituent la structure bactérienne la plus périphérique. Toutefois leur présence n'est pas systématique, ils peuvent être attachés aux cellules, libres autour des cellules ou relargués simplement lors d'une mise en suspension (WILKINSON, 1958). Leur présence dépend de plusieurs facteurs, comme la nature de la souche bactérienne, l'état physiologique des bactéries, la composition du milieu et plus particulièrement le rapport C/N (WILKINSON, 1958).

Leur présence protège les bactéries contre la phagocytose, l'attaque par les bactériophages, la dessiccation. Ils peuvent agir comme des exotoxines, ils aident à la rétention et dispersion d'ions, ils confèrent aux bactéries une certaine résistance vis-à-vis des toxiques (SEYFRIED et FRASER, 1980 ; RIDGWAY et OLSON, 1982).

Une forte production d'exopolysaccharides par une bactérie entraîne la formation d'un glycocalyx, anciennement appelé capsule (MOORHOUSE *et al.*, 1977), délimitant une zone périphérique fortement hydratée, ayant une épaisseur qui, quelquefois, atteint plus d'une dizaine de μm . Ils peuvent être excrétés et diffusés dans le milieu par perte du site protéique de fixation des polysaccharides à la paroi (SUTHERLAND, 1977) ou par rupture de la chaîne polysaccharide due à l'action des oxydants puissants comme l'ozone (DORE, 1984).

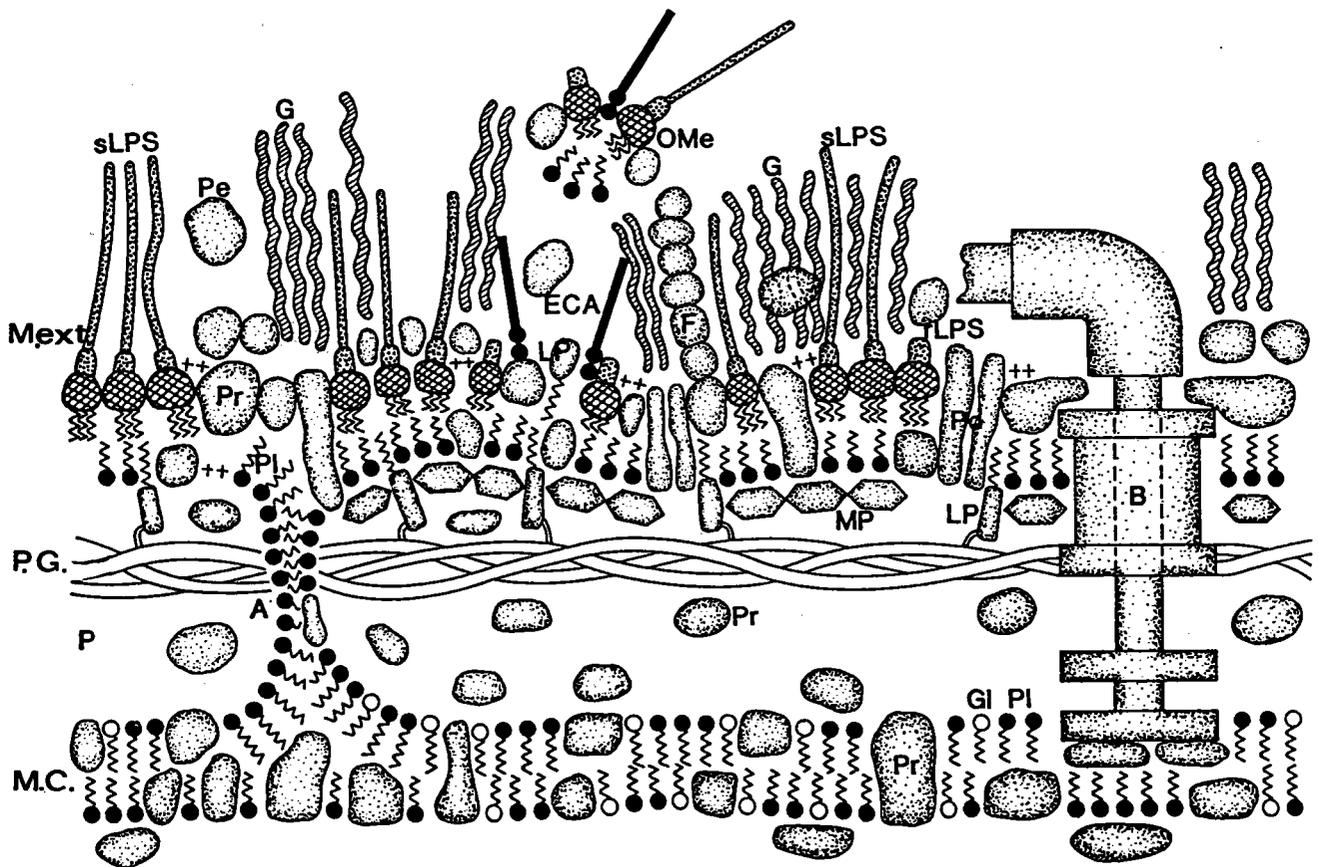


Figure 6 : Représentation schématique de l'organisation de la paroi cellulaire chez les bactéries gram négatives (SAVAGE et FLETCHER, 1985).

Mext = membrane externe ; PG = peptidoglycane ; MC = membrane cytoplasmique

Une couche plus ou moins épaisse d'exopolymères, jouant le rôle d'une résine échangeuse d'ions souvent appelée glycocalix composée de :
 G = polysaccharides extracellulaires ; LPS = lipopolysaccharides ; Pe = protéines extracellulaires

Mext = une membrane externe asymétrique composée de :

PL = phospholipides ; LPS = lipopolysaccharides ; Pr = protéines ; Po = porines

B = flagelle

PG = peptidoglycane, structure rigide fortement associée à la face interne de la membrane externe, composée d'une couche linéaire de glycane ; de LP = lipoprotéines ; MP = protéines : type M,F et peptides

P = l'espace périplasmique ou périplasma contenant des protéines (enzymes et chimiorécepteurs)

MC = une membrane interne ou membrane plasmique, bicouche asymétrique composée de PL = phospholipides ; Gl = glycolipides ; Pr = protéines

b) La membrane externe

Comme le montre la figure 6, la membrane externe est la couche de la paroi la plus externe, et possède une structure membranaire double. Elle est composée de 20 à 25% de phospholipides (la plupart de ces phospholipides sont des phosphatidyl éthanolamine associés à des petites quantités de phosphatidyl glycérol), de 30% de lipopolysaccharides et de 45 à 50% de protéines (BEVERIDGE, 1981).

* Les lipopolysaccharides sont composés des trois régions liées entre elles par covalence. Sur la figure 7, chaque région permet de déterminer respectivement le sérotype, l'espèce et le genre. La première est un lipide hydrophobe (Lipide A), un centre polysaccharidique (sucres centraux), et une chaîne polysaccharidique spécifique (antigène type O).

* Les lipides type A sont constitués de résidus de glucosamines phosphorylées qui forment un di-oligosaccharide auquel est attaché un O-N acyl ester ; les autres composés du lipide A sont l'éthanolamine ou le 4-aminoarabinose.

* Le centre polysaccharidique ou core est composé en particulier d'aldohéptose et de 2-céto-3- déoxyoctanate (K.D.O.) qui confèrent une charge négative à cette partie.

L'antigène polysaccharidique -O est constitué de polymères de séquences répétitives de 2 à 4 unités monosaccharidiques avec généralement des hexoses, pentoses, déoxy-, didéoxyl-, amino-, diamino sucres. Les bactéries qui ne possèdent pas cet antigène sont nommées R et celles qui le possèdent S, pouvant ainsi être classées ou différenciées par des réactions sérologiques.

Les protéines de la membrane externe contiennent plus de 20 peptides différents. Les espèces se différenciant seulement sur 4 à 6 d'entre eux (BEVERIDGE, 1981). Ces protéines peuvent être des protéines structurales liées ou non à des lipides, ou des porines et/ou des fibrines, (de masse moléculaire entre 33 000 et 38 000) lesquelles forment des canaux transmembranaires hydrophiles permettant la diffusion passive.

Ainsi comme le montre la figure 8, les lipoprotéines font entre autres le travail de liaison entre la membrane externe et le peptidoglycane sous-jacent.

La conformation des protéines dans la membrane externe (Figure 8), bien étudiée chez *Escherichia coli*, est différente de celle de la membrane cytoplasmique.

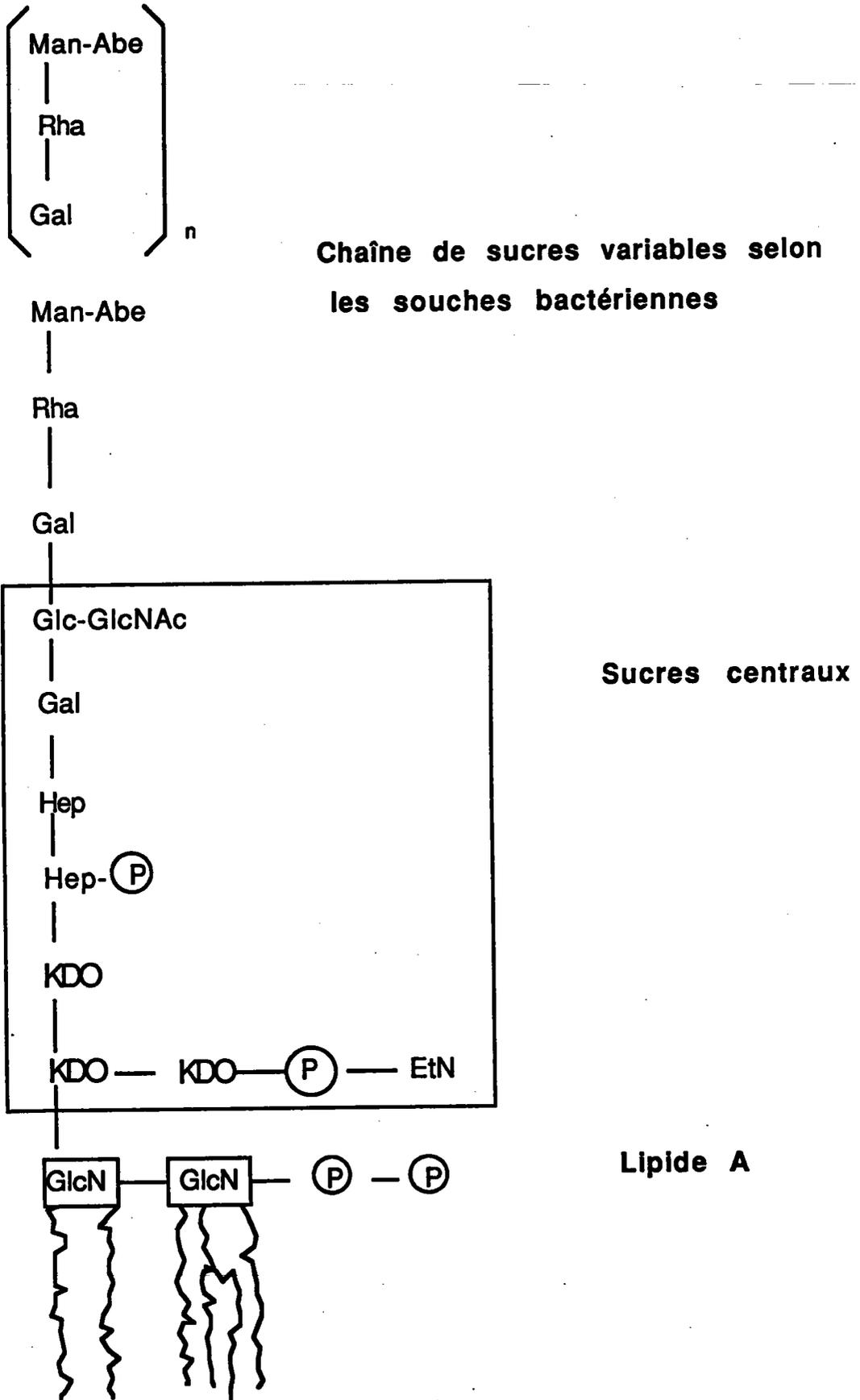


Figure 7 : Représentation d'une molécule de lipopolysaccharide. La séquence de sucres est celle de *Salmonella typhimurium*. Abréviations utilisées : Abe, abéquose ; EtN, éthanoline ; Gal, galactose ; Gpc, glucose ; GpcN, glucosamine ; Gpc NAc, N-acétyl-glucosamine ; Hep, heptulose ; KDO, 2-céto, 3-déoxyoctonate ; Man, mannose ; Rha, L-rhamnose (d'après STRYER, 1981).

Les porines qui confèrent à la membrane externe les propriétés d'une barrière de perméabilité, limitant le passage de certains sucres neutres et des oligopeptides dont la masse moléculaire est supérieur à 700, permettent le passage des petites molécules de masse moléculaire inférieur à 600 comme le glucose, le saccharose et les acides aminés. Le passage de petites molécules hydrophiles est assuré grâce à la présence de ces porines (NAKAE *et al.*, 1979). D'autres protéines comme la OmpA mise en évidence chez *E. coli*, est une protéine transmembranaire qui, sans présenter toutes les propriétés d'une porine, facilite toutefois la perméabilité aux acides aminés et à certains peptides. Les mutants défectifs en protéines OmpA présentent une membrane externe instable n'autorisant pas la conjugaison. Cependant, ces quelques observations ne permettent pas encore clairement d'établir le rôle de cette protéine dans la membrane externe (NIKAIDO et VAARA, 1985). Quelques rares enzymes ont été localisés au niveau de la membrane externe d'*Escherichia coli* ; parmi celles-ci une phospholipase qui interviendrait dans la libération de protéines bactériennes sécrétées comme les bactéricines, la colicine (CHAPON *et al.*, 1984), et des protéases.

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

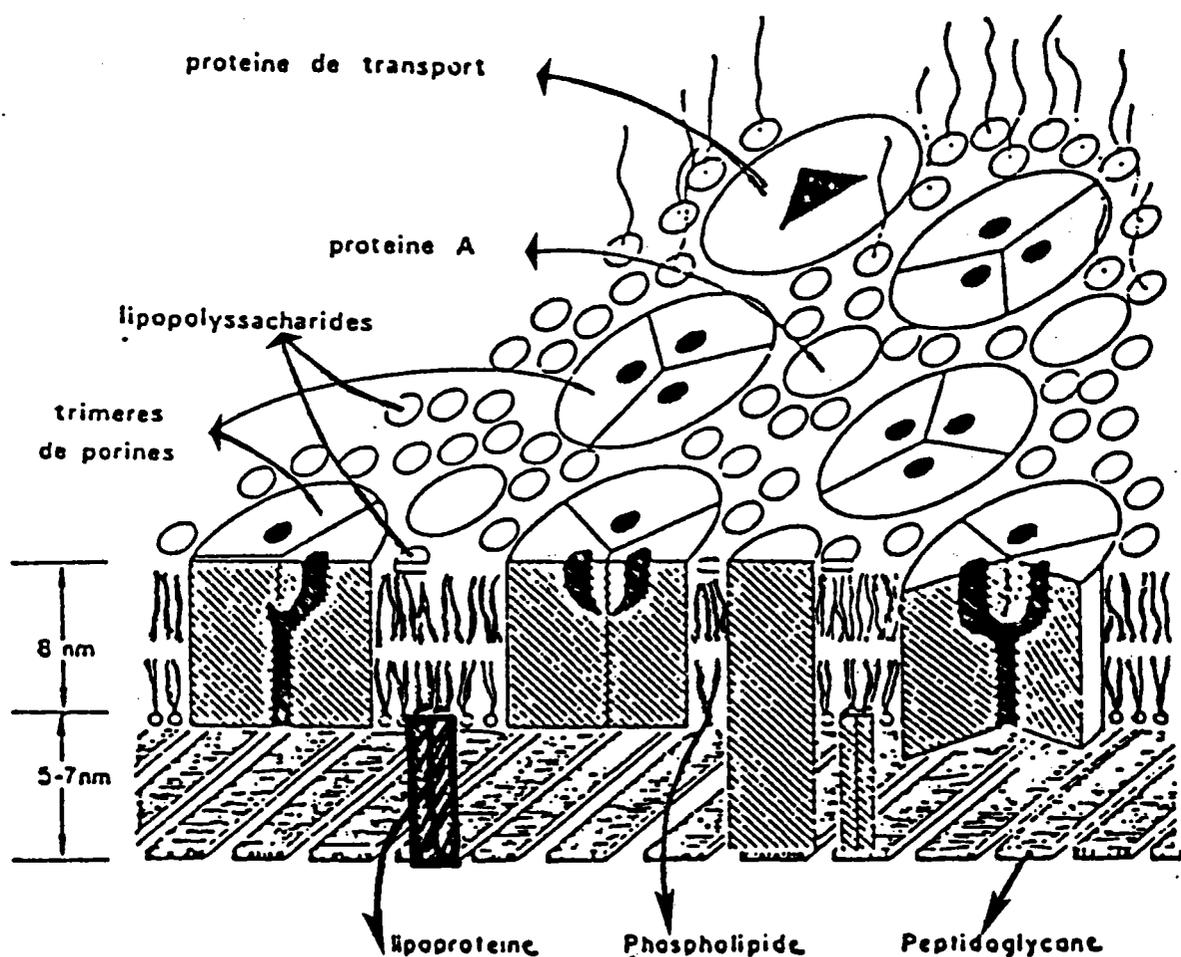


Figure 8 : Modèle schématique de la structure de la membrane externe d'*Escherichia coli* et de *Salmonella typhimurium* (d'après VAARA et NIKAIDO, 1984, dans NIKAIDO et VAARA, 1985).

c) Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est une structure rigide maintenant la forme de la cellule. Il représente de 2-10% en poids sec de la paroi avec une épaisseur de 3 à 10 nm. Cette structure, similaire à celle des bactéries gram positives, est composée de sucres et de peptides comme l'indique son nom. Cette macromolécule est constituée d'un réseau de polysaccharides en chaînes linéaires reliés entre eux par de courtes unités peptidiques. Cette structure formant un filet extrêmement ramifié, dense et rigide, tout autour de la cellule, est capable à elle seule de maintenir la forme de la cellule.

Associées au peptidoglycane et servant de lien entre le peptidoglycane et la membrane externe, on trouve au moins deux macromolécules. Une de ces deux macromolécules est une protéine structurale de 36 500 daltons en forme hexagonale située sur la partie supérieure du peptidoglycane, l'autre est une lipoprotéine d'environ 7 000 daltons attachée par ses terminaisons carboxyliques (COOH) au résidu d'acide diaminopimelique du peptidoglycane.

d) L'espace périplasmique

Contrairement aux bactéries gram positives où la membrane cytoplasmique est directement liée à la paroi, chez les bactéries gram négatives il existe un espace entre les deux membranes.

L'espace périplasmique constitue un compartiment aqueux qui contient des protéines de la face externe de la membrane cytoplasmique et de la membrane externe. Par définition, le peptidoglycane se situe dans le périplasme. Dans des conditions normales l'espace périplasmique représente de 20 à 40% du volume cellulaire total et autorise une série de fonctions extrêmement importantes (SAVAGE et FLETCHER, 1985) :

- . il est en équilibre avec des molécules qui viennent de l'extérieur et qui ont traversé la membrane externe ;
- . il est isoosmotique avec le cytoplasme cellulaire, ce qui entraîne une pression dans l'ensemble peptidoglycane - membrane externe, constituant un rôle de protection de la paroi ;

il contient un nombre d'enzymes hydrolytiques qui permettent le "traitement" de certaines molécules nutritives provenant de l'extérieur et de substances d'excrétion (BEVERIDGE, 1981 ; AARONSON, 1981) ;

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

e) La membrane cytoplasmique

La membrane cytoplasmique est principalement constituée d'un mélange de protéines-phospholipides ; les protéines représentent 50 à 70% du poids sec de la membrane. Quatre types d'acides gras peuvent être différenciés chez les bactéries : les chaînes monoinsaturées non ramifiées ; les chaînes ramifiées ; les chaînes saturées non ramifiées ; les chaînes comportant des cyclopropanes possèdent de 15 à 19 atomes de carbone (ROGERS et al., 1980).

Les protéines dans la membrane sont de type protéines-intrinsèques ou intégrales, profondément enchassées dans la bicouche lipidique et les protéines extrinsèques ou périphériques localisées à la surface de la membrane, fixées par des liaisons faibles, principalement ioniques, faisant intervenir des cations divalents comme le magnésium (BADDILEY et al., 1973).

D'autres protéines trouvées dans la membrane cellulaire sont les protéines enzymatiques, par exemple celles de la chaîne respiratoire (HADDOCK et JONES, 1977), des enzymes de biosynthèse, des constituants de la paroi (SALTON, 1971), des enzymes de transport (KABACK, 1972 ; HAMILTON, 1975), des A.T.P. ases (HAROLD et BAARDA, 1969 ; SIMONI et POSTMA, 1975), des protéines structurales formant quelquefois des canaux ou des pores au travers de la membrane (WILLIAMS, 1981).

Parmi les caractéristiques qui différencient la membrane externe de la membrane plasmique, il faut souligner trois points majeurs :

i. Les protéines sont présentes en plus grande quantité dans la membrane externe que dans la membrane cytoplasmique.

ii. Les phospholipides sont pratiquement exclusivement distribués à la surface interne de la membrane alors que les lipopolysaccharides sont surtout présents à la surface externe. Seule l'extrémité lipidique du lipopolysaccharide ou lipide A constitue la partie interne de la bicouche lipidique ; la partie polysaccharide est orientée vers l'extérieur de la bactérie.

iii. Le lipopolysaccharide est un constituant spécifique de la membrane externe et, en tant que tel, il possède des molécules qui servent de marqueurs spécifiques de cette membrane comme le K.D.O. (CHOPRA *et al.*, 1977).

A l'heure actuelle, le modèle en mosaïque fluide de SINGER et NICHOLSON (1972) est le plus communément admis pour décrire la structure membranaire. Dans ce modèle, essentiellement basé sur des considérations thermodynamiques, l'arrangement des phospholipides et des protéines est tel que le système possède une énergie minimale, les macromolécules n'étant liées que par des liaisons faibles (type hydrophobes, Van der Waals, électrostatiques et liaisons hydrogènes).

2.2.3. Lyse cellulaire et séparation des enveloppes bactériennes

Plusieurs chercheurs ont essayé tout d'abord de lyser les bactéries puis d'isoler les enveloppes afin d'une part de connaître leur composition, leur taille et leur fonctionnement, d'autre part de les utiliser comme matériel biologique dans des études d'accumulation et de transfert des molécules présentes dans l'environnement. Pour cela plusieurs méthodes et techniques ont été proposées, tout d'abord pour produire : (a) la lyse cellulaire au moyen d'une méthode adéquate sans altérer l'intégrité des enveloppes, et ensuite pour obtenir (b) l'isolement de ces structures.

a) Lyse bactérienne

La lyse cellulaire peut être obtenue en utilisant le lysozyme, les muramidases ou un mélange lysozyme-versène sur des bactéries gram négatives (REPASKE, 1958). D'autres auteurs ont utilisé plus tard l'EDTA plus le lysozyme d'une part pour la formation de sphéropastes, et d'autre part pour l'obtention finale de la lyse bactérienne (OSBORN et MUNSON, 1974 ; KABACK, 1968).

La lyse bactérienne a été souvent obtenue en utilisant des méthodes peu respectueuses des structures, comme par exemple en agitant les suspensions bactériennes en présence de bil-

les de verre, ou en les congelant et en les décongelant en présence de DNase (WEIDEL *et al.*, 1960) ou en les traitant par différentes concentrations de NaCl et en présence d'éthanol ou glycérol (Mac LEOD et MATULA, 1962). Une lyse osmotique peut être obtenue après utilisation d'enzymes et d'EDTA, par une mise en suspension des bactéries ainsi traitées dans de l'eau distillée stérile à 4°C (NEU et HEPPER, 1964, 1965). Cette méthode a été reprise plus tard par BIRDSELL et COSTA-ROBLES (1976) et FOX *et al.* (1970).

WEIDEL *et al.* (1963) et NANNINGA (1969) ont pu extraire des mucopolymères composant la paroi après utilisation de sodium dodécyl sulfate. BUCKMIRE et Mac LEOD (1965) ont pu constater, après une lyse osmotique, la présence d'hexosamines attachées à la membrane externe par une structure mal définie. La lyse osmotique a été incluse plus tard dans des schémas de fractionnement subcellulaires par MARTIN et Mac LEOD (1971) et OSBORN *et al.* (1972).

L'étude des enzymes et des composants intracellulaires a été le premier pas dans la recherche de sous-structures bactériennes. Les outils qui ont permis cette recherche étaient tout d'abord la lyse cellulaire obtenue par des méthodes très performantes comme : la sonication MARQUIS (1968), la pression avec la presse de FRENCH, ou le broyage cellulaire avec des billes en verre, SALTON (1974) ; HUGHES *et al.* (1971).

Le choix de la méthode à utiliser pour rompre les cellules, avant de procéder au fractionnement et à la séparation des enveloppes, est une étape décisive. En effet, la méthode de rupture doit être spécifique au type d'organisme, elle ne doit pas endommager les autres structures qui seront récupérées par la suite, elle doit être facile à utiliser (pas encombrante), et enfin rapide pour éviter dans certains cas la contamination et l'action enzymatique intracellulaire.

b) Différentes techniques de séparation des enveloppes bactériennes

Les enveloppes cellulaires d'une bactérie gram négative sont composées : d'une membrane externe, d'une couche de peptidoglycane et d'une membrane cytoplasmique qu'il est parfois utile de séparer.

SALTON et HORNE (1951) ont pu seulement observer des fractions de membrane cytoplasmique et de paroi non contaminées avec le matériel cytoplasmique, cependant les premiers vrais essais de fractionnement des enveloppes bactériennes ont été faits aux environs des années 1960 (ROGERS *et al.*, 1980). Le fractionnement des structures subcellulaires est très important pour l'étude de leurs caractéristiques générales, pour la connaissance

de l'arrangement interne de ces structures et leur interrelation. Aussi, dans l'étude des mécanismes de transport cellulaire le fractionnement des cellules a posé et pose encore des problèmes particuliers, surtout dans le cas des enveloppes des bactéries gram négatives. En effet, il est souvent très difficile d'empêcher la destruction d'une des enveloppes pour l'obtention d'une autre, mais surtout d'obtenir les trois enveloppes en fractions complètement isolées et pures à partir du même matériel biologique initial. De toute façon, même avec les méthodes actuelles, il est impossible d'obtenir des fractions complètement pures.

Historiquement, les premières fractions ont été récupérées par centrifugation après lyse cellulaire pour être ensuite analysées chimiquement et observées au microscope. SALTON et FREE (1965) isolent les parois des bactéries gram positives tandis que THOMPSON *et al.* (1970) ont pu obtenir des muréinoplastes (cellules sans membrane externe) en lavant les cellules avec 0,5 M NaCl et 0,5 M de solution de sucrose. Après cette date, des protoplastes ont été préparés en utilisant du lysozyme plus EDTA entraînant la disparition d'hexosamines (établissant ainsi la preuve de la présence du peptidoglycane) (COSTERTON *et al.*, 1967). Leur production a été observée et contrôlée au microscope à contraste de phase (par l'arrondissement des cellules en forme de bâtonnets). Dans cette technique, les ions divalents comme le Mg^{+2} empêchent la lyse cellulaire (RAYMAN et Mac LEOD, 1975) en stabilisant ces membranes (BADDILEY *et al.*, 1973).

D'autres marqueurs membranaires ont par la suite été utilisés pour identifier ces structures et leur degré de pureté. Ainsi pour la membrane cytoplasmique, OSBORN *et al.* (1972) ont dosé quelques enzymes type : oxydases, hydrolases et synthétases ; le K.D.O. faisant partie des lipopolysaccharides sert de marqueur pour la membrane externe. KASAHARA et ANRAKU (1974a,b) ont utilisé la succinate déshydrogénase S.D.H. comme marqueur spécifique de la membrane cytoplasmique. D'une manière générale, FORSBERG *et al.* (1970a,b) ont dosé les protéines et les hexosamines pour analyser la paroi et ses composants.

Les techniques les plus complètes de séparation des éléments cellulaires font appel à des méthodes de centrifugation :

- i. Centrifugation zonale différentielle.
- ii. Centrifugation en gradient de concentration de sucrose (SYKES, 1971).

Des exemples de ces techniques et les résultats des dosages des marqueurs sont présentés dans le tableau 14, de FOX *et al.* (1970) à HOYLE et BEVERIDGE (1983). Bien que d'une manière générale les auteurs suivent les mêmes protocoles de base, les techniques sont

plus complexes d'année en année et les dosages des marqueurs sont par conséquent plus détaillés. Il est très difficile de faire la comparaison entre ces différents résultats, compte tenu de l'évolution de ces techniques et de l'hétérogénéité des unités dans l'expression des résultats. Le K.D.O. est par exemple exprimé par certains auteurs en unités arbitraires difficiles à convertir. D'un autre côté la plupart des techniques jusqu'alors réalisées ont été pensées pour extraire spécifiquement une ou au maximum deux des trois enveloppes. Enfin la perte de matériel membranaire lors de chaque séparation d'une part, et la contamination entre fractions pendant les manipulations (phénomène inévitable) d'autre part, sont rarement présentées. Des contrôles sévères appréciant l'ampleur de la contamination devraient donc être systématiquement intégrés au plan de travail.

Tableau 14 : Résultats des poids secs et des marqueurs des enveloppes bactériennes de différentes méthodes proposées.

Pr = Protéines ; P = Phosphore ; H = Hexosamines ; SDH = Succinate-déshydrogénase ; KDO = 2-céto-3-déoxyoctanate ; P.s. = poids sec.

nd = non détecté

Auteurs	Méthode de fractionnement utilisée	Espèce	Fraction obtenue			
			Paroi	Membrane externe M. ext mg/g de cellule (Ps) Pr = 17,8 RNA = 0,58 SDH = < 0,02 µmol/mg Pr Pr = 10% du total	Peptidoglycane P.G.	Membrane cytoplasmique M.C. mg/g de cellule (Ps) Pr = 18,3 RNA = 0,82 SDH = 0,38 µmol/mg Pr Pr = 25% du total
MIURA et MIZUSHIMA, 1968	Lysozyme + lyse osmotique centrifugation en gradient de concentration de sucrose	<i>Escherichia coli</i> K12				
FOX et al., 1970	0,5M sucrose + centrifugation + EDTA et lysozyme centrifugation différentielle + DNase + rupture par pression	<i>Escherichia coli</i> K12		SDH = 2,17 mmol/mg prot		SDH = 0,70 mmol/mg prot
FORSBERG et al., 1970 a, b	0,5M sucrose 0,5M NaCl + centrifugation Lysozyme DNase + RNase + centrifugations	<i>Alteromonas haloplankis</i>		Ps = 7,9% du total H = 31,3% en poids sec Pr = 53,5 %	Ps = 1,2-2% du total	
MARTIN et MAC LEOD, 1971	0,5M sucrose Lysozyme DNase + RNase Presse de French + centrifugations	<i>Alteromonas haloplankis</i>				Ps = 10-20% du total RNA = 0,6 ± 0,1% DNA = 0,1 ± 0,01% H = 0,7 ± 0,2%
THORNE et al., 1973	Lysozyme + papaïne Presse de French Centrifugations	<i>Acinetobacter</i> sp.	Ps = 39 mg Pr = 28,8 mg H = 3 mg KDO = 0,12 mg	Ps = 25 mg Pr = 21,6 mg H = 1,0 mg KDO = 0,09 mg		
YAMATO et al., 1975	Lysozyme + EDTA Presse de French SDS et sonication Centrifugations	<i>Escherichia coli</i>		pour 30 g de poids sec Pr = 185 mg DNA = 0,34 mg RNA = 5,6 mg P = 1,4 mg KDO = 29,9 mg		pour 30 g de poids sec Pr = 70 mg DNA = 0,21 mg RNA = 3,4 mg P = 1,84 mg KDO = 0,13 mg
BOOTH et CURTIS, 1977	0,25M sucrose Lysozyme + EDTA Lyse osmotique Centrifugations	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO.1.		% du poids sec de l'enveloppe Pr = 41% KDO = 2,5% RNA = 1,6% DNA = nd% SDH = < 0,01% µmol/mg Pr Pr = 48,7%		% du poids sec de l'enveloppe Pr = 49% KDO = 0,3% RNA = 1,7% DNA = 0,6% SDH = 0,08 µmol/mg Pr Pr = 34,5
HANCOCK et NIKAIKO, 1978	Lysozyme DNase + RNase Presse de French Centrifugations	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		SDH = 75 nmol/mg Pr		SDH = 458 nmol/mg Pr
ANWAR et al., 1983	Sucrose 20% Lysozyme Presse de French Centrifugations	<i>Pseudomonas cepacia</i>		SDH = 19,2 nmol/mg Pr Pr = 50,7 mg		SDH = 315 nmol/mg Pr Pr = 14,9
HOYLE et BEVERIDGE, 1983	SDS Sonications - Centrifugations	<i>Escherichia coli</i> K12			Pr = 0,18 ± 0,02 mg/mg de PG SDH = 0 µg/mg de Pr KDO = 0 µmol/mg PG	

2.3. BIOSORPTION DES METAUX PAR LES BACTERIES

2.3.1. Considérations générales sur la biosorption des métaux

Les phénomènes de biosorption des métaux par les bactéries ont souvent été étudiés et rapportés au cours de ces dernières années. Plusieurs termes généraux ont été utilisés pour décrire ces phénomènes lorsqu'ils n'impliquent aucun mécanisme particulier reconnu ou identifié. Les termes les plus couramment utilisés sont biosorption, bioaccumulation ou simplement accumulation et/ou fixation ; (ou en anglais biosorption et uptake).

Les résultats obtenus au cours de ces études de biosorption sont très hétérogènes, montrant ainsi la diversité de paramètres et leur variabilité intervenant dans la biosorption des métaux, ainsi que la difficulté de les contrôler.

Ainsi, dans la bioaccumulation des métaux par les bactéries peuvent intervenir des paramètres dépendant du microorganisme lui-même, mais aussi ceux du métal et du milieu.

a) Paramètre microorganisme

Dans ce paragraphe, il est possible de distinguer plusieurs variables qui peuvent contrôler la bioaccumulation des métaux par les microorganismes. Ce sont :

- la taille du microorganisme
- la charge électrique périphérique
- la composition chimique
- l'activité métabolique de la bactérie

La relation entre la taille du microorganisme et la quantité de métal accumulé n'a pas pu être mise en évidence dans les essais conduits par DRAPEAU et al. (1983) suggérant l'importance mineure de ce paramètre comparativement aux autres variables. Par contre, l'importance de la composition chimique des enveloppes cellulaires a été parfaitement montrée dans l'étude conduite par BEVERIDGE et MURRAY (1976) et BEVERIDGE et KOVAL (1981) dans laquelle 15 métaux ont été fixés par des parois extraites à partir d'*Escherichia coli* et de *Bacillus subtilis*. Dans ces essais, la fixation est approximativement dix fois supérieure pour les parois de *Bacillus subtilis*. Enfin, les modifications de l'activité métabolique entraînent des modifications de la charge électrique superficielle (RANDLE et al., 1969) et de la composition des enveloppes, modifiant ainsi les interactions cellule-métal. Par exemple, une

modification dans la concentration de la phosphatase alcaline chez *Escherichia coli* provoquerait une augmentation de l'accumulation de Zn^{+2} , permettant ainsi l'activation de cette enzyme (MITRA et al., 1975). Dans d'autres cas, la précipitation de métaux dépend de l'activité de sulfates-réductases associés à la membrane cellulaire (WOOD et WANG, 1983).

b) Paramètre métal

Chaque métal présente des caractéristiques spécifiques que traduisent sa valence, sa charge électrique, son rayon ionique, son hydratation et son affinité pour certains ligands (classification de NIEBOER et RICHARDSON, 1980). De plus, la concentration de l'ion métallique (CHOPRA, 1975 ; DOYLE et al., 1975 et HOUBA et REMACLE, 1982), le sel auquel il est associé, et leur affinité, influencent considérablement l'accumulation du métal.

c) Paramètre milieu

MOUVET et BOURG (1983) et BOURG (1984) montrent que la spéciation d'un métal donné pour une concentration définie dépend des facteurs du milieu : pH, température, force ionique, potentiel d'oxydo-réduction, présence de complexants. Ces facteurs peuvent influencer la croissance bactérienne mais également la composition chimique des structures cellulaires et la charge électrique périphérique, ainsi que l'accumulation du métal par la cellule.

En ce qui concerne le pH, il agit sur l'accumulation des métaux par les bactéries en modifiant la charge électrique périphérique de la cellule d'une part, et la spéciation du métal d'autre part. Ces phénomènes sont relatifs au type de bactérie. En effet, OU et MARQUIS (1970) ont montré que pour un pH neutre la paroi de *Staphylococcus aureus* a une charge nette positive, tandis que la paroi de *Micrococcus lysodeikticus* est chargée négativement. Plus tard, MARQUIS et al. (1976) ont montré que les parois des bactéries présentent à pH alcalin, des sites de fixation anioniques périphériques, facilitant ainsi la fixation des protons et des cations.

D'autres observations ont été faites au sujet du pH et de la fixation du métal. C'est ainsi que LION et al. (1982) ont montré une relation entre l'augmentation de la fixation des métaux par les sédiments et l'augmentation du pH. De plus, plusieurs auteurs ont mis en évidence la libération des métaux accumulés par des boues activées lors d'une diminution du pH (HAYES et al., 1979 ; JENKINS et al., 1981 ; LAKE et al., 1984 ; GOULD et GENETELLI,

1984 ; ADAMS et SANDERS, 1984). Ces observations sont dépendantes du type d'organisme et de la spéciation du métal. Ainsi, NORBERG et PEARSON (1984) ont observé une augmentation de 45% de fixation de cadmium par *Zooglea ramigera* entre pH = 5,5 et 8,0 tandis que TITUS et PFISTER (1982) ont observé une diminution de la fixation de cadmium entre pH = 6,5 et 8,5 par *Pseudomonas* sp.

Par contre, les résultats concernant l'influence de la température sur la fixation des métaux sont plus homogènes : la quantité de cadmium fixé par *Pseudomonas* sp. augmente quand la température augmente jusqu'à 35°C (TITUS et PFISTER, 1982). Par contre, pour des températures dépassant les 50°C, l'effet est contraire (AJMAL et al., 1982).

Les métaux peuvent être complexés par des molécules présentes dans le milieu, et ainsi influencer sur leur biodisponibilité et évidemment leur bioaccumulation. La nature de ces molécules est extrêmement diverse. Ainsi les métaux forment des complexes avec les acides humiques et fulviques (POMMERY et al., 1985 ; CAMPELL et EVANS, 1987 ; TITUS et PFISTER, 1982), avec des chlorures (BABICH et STOTZKY, 1978, 1982 ; KUREK et al., 1982), avec des molécules contenues dans les milieux nutritifs habituellement employés en microbiologie (RAMA MOORTHY et KUSHNER, 1975), avec des polyacides synthétiques comme l'acide polygalacturonique et polymétacrylique (JELLINECK et SANGAL, 1972), avec la cystéine, le glutamate et l'aspartate (TYNECKA et al., 1975 ; STRANDBERG et al., 1981), des complexants type E.D.T.A. (PICKET et DEAN, 1979), etc...

2.3.2. Mécanismes de biosorption

Deux cas d'espèces sont généralement évoqués dans la littérature : l'adsorption et l'absorption, traduisant respectivement, soit une accumulation en surface, soit une pénétration intracellulaire.

Cette distinction reflète souvent plus un souci de confort intellectuel que l'expression d'une réalité (ainsi, à tort, beaucoup de phénomènes étiquetés d'adsorption représentent un mélange adsorption-absorption). Toutefois, par souci de simplification, nous conserverons cette distinction.

2.3.2.1. L'adsorption

L'adsorption est un phénomène lié tout d'abord aux charges et aux groupements fonctionnels de la surface cellulaire, aux interactions ions-solvant et aux interactions décrites par

des forces de Van der Waals (BOURG, 1984). Dans l'étude de l'adsorption, les enveloppes cellulaires prennent une place importante, et les sites d'adsorption responsables de ce phénomène, font plus particulièrement l'objet de notre étude (ainsi l'adsorption dépendra alors des caractéristiques de ces sites et de la relation entre eux).

Les résultats obtenus sur la fixation des métaux sur des structures isolées sont très hétérogènes car l'accumulation dépend du métal, de la souche bactérienne, de la structure elle-même, mais aussi de son mode d'extraction ou de préparation et de sa contamination par des polymères organiques. Toutefois, la nature anionique des enveloppes et leur comportement de résine échangeuse d'ions expliquent leur capacité à fixer les métaux (MARQUIS *et al.*, 1976 ; BEVERIDGE, 1984 ; BUKLIN et REUSCH, 1986).

Il est possible de différencier parmi les enveloppes cellulaires responsables de l'adsorption des métaux par les bactéries :

- a) la couche d'exopolysaccharides
- b) la membrane externe
- c) le peptidoglycane
- d) la membrane cytoplasmique

a) Les exopolysaccharides

Plusieurs auteurs ont constaté que les quantités de métal fixées par les exopolysaccharides bactériens étaient considérables (CORPE, 1975 ; BROWN et LESTER, 1979 ; STERRITT et LESTER, 1980). Toutefois, les résultats obtenus sont en partie critiquables, car le matériel extrait des bactéries peut être contaminé par des molécules arrachées de la périphérie cellulaire type protéines et même des acides nucléiques, résultant d'une lyse cellulaire (BROWN et LESTER, 1979).

Pour contourner ce problème d'extraction, quelques auteurs ont utilisé des souches de *Klebsiella aerogenes* K54A₃ et K54A₃(0) respectivement forte et faible productrice d'exopolysaccharides (FRIEDMAN et DUGAN, 1968 ; BITTON et FREIHOFER, 1978 ; BAUDA et BLOCK, 1985) pour démontrer l'action des exopolymères vis-à-vis des métaux.

L'accumulation des métaux par les exopolymères extraits de boues activées a pu être décrit sous forme d'isotherme (BROWN et LESTER, 1982a). La figure 9 montre des courbes biphasiques. Pour les valeurs supérieures à 0,01 mg/l et 1 mg/l de Cd⁺² et Ni⁺² respectivement, les valeurs de métal adsorbé n'augmentent plus, indiquant la saturation des sites de fixation des polymères à ces concentrations.

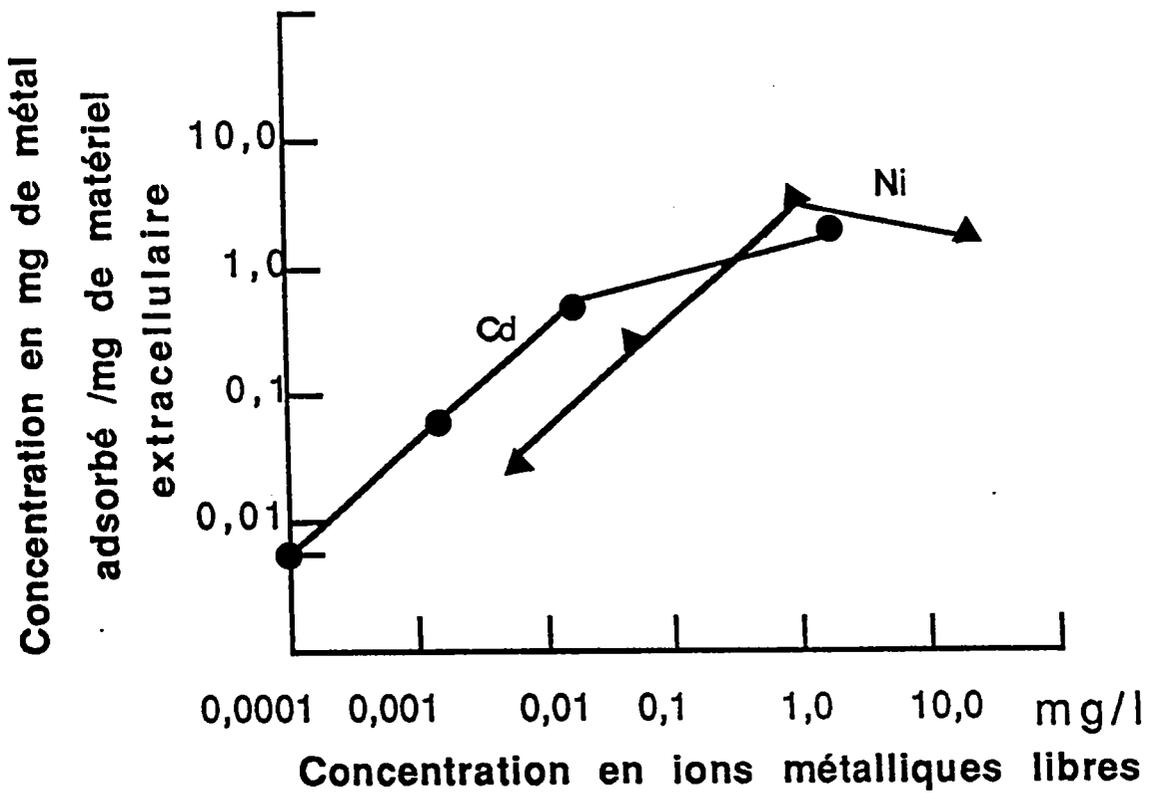


Figure 9 : Isothermes de Freundlich montrant la relation entre (●) cadmium (▲) nickel, adsorbés par les polymères extracellulaires (BROWN et LESTER ,1982).

b) La membrane externe

Comme cela a déjà été décrit par SAVAGE et FLETCHER (1985), la membrane externe représente un système complexe. Les porines existant dans cette membrane et formant des pores ou des canaux aqueux (traversant la structure membranaire hydrophobe) (NICAS et HANCOCK, 1983 et BENZ, 1985) permettent le passage d'ions type Na^+ , K^+ ou des sucres (NAKAE et NIKAIDO, 1975 ; NAKAE, 1976 ; SCHINDLER et ROSENBUSCH, 1978), mais ne semblent pas jouer un rôle dans le passage des ions métalliques.

Par contre, il a été observé par quelques chercheurs que la membrane externe était capable d'accumuler les métaux. Ce phénomène a été tout d'abord observé par BEVERIDGE et KOVAL (1981) sur des parois plus ou moins purifiées de bactéries gram négatives. Ensuite, NAKAE et NAKAE (1982) et HOYLE et BEVERIDGE (1983) ont montré le rôle dans la fixation des métaux par la fraction membrane externe.

La membrane externe est composée principalement de : phospholipides, protéines et lipopolysaccharides (voir chapitre 2.2.), dont les groupements présents dans ces molécules intervenant dans la fixation des métaux sont essentiellement : les groupements phosphates, des phospholipides et lipopolysaccharides (FERRIS et BEVERIDGE, 1984), et les groupements carboxyliques et thiols des protéines (DOYLE et al., 1980 ; JACOBSON et TURNER, 1980). Ces protéines possèdent aussi un grand nombre de groupements chargés positivement, comme les fonctions amines, lesquelles peuvent former des liaisons avec des anions métalliques (BLUNDELL et JENKINS, 1977).

L'étude concernant les groupements phosphates comme sites d'adsorption des métaux a été plus détaillée et dans certains cas elle a aussi servi pour la caractérisation de lipopolysaccharides ou de phospholipides des différentes souches de la même espèce bactérienne (Figure 10).

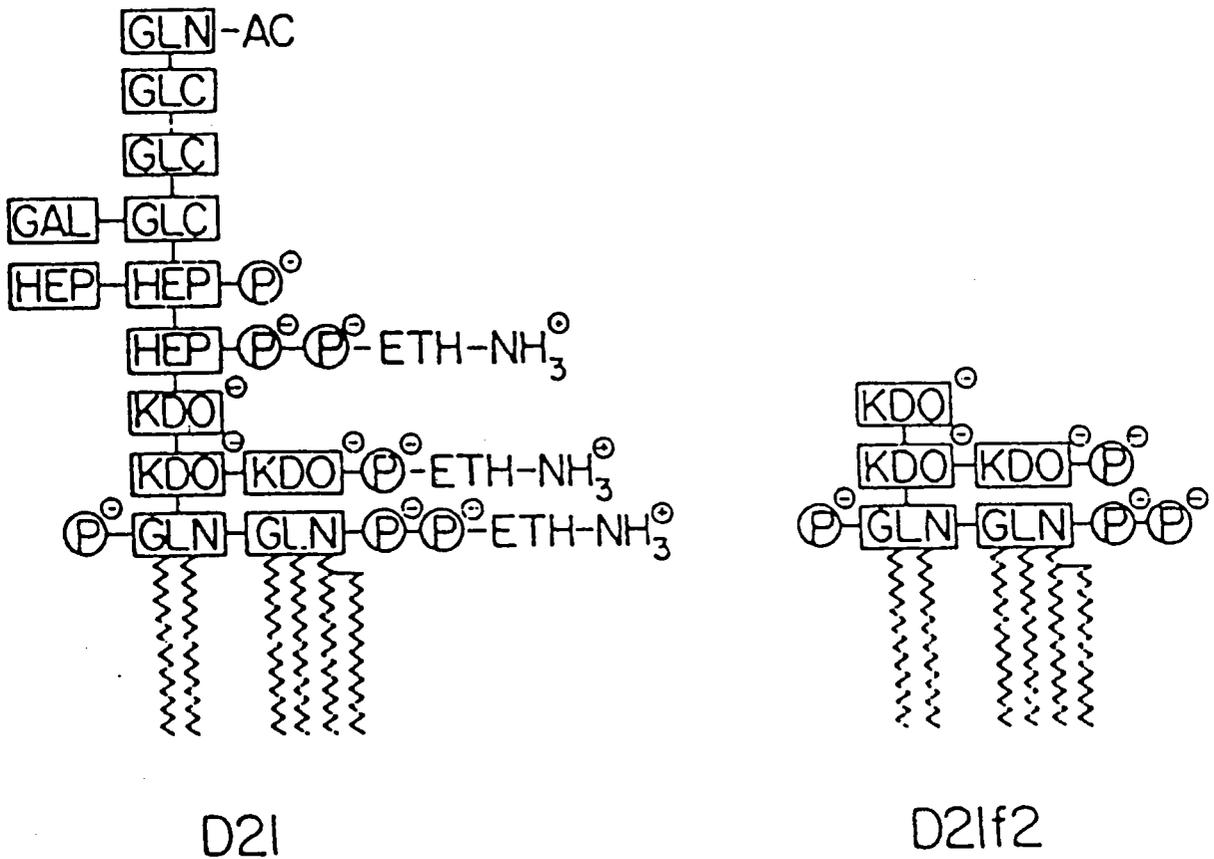


Figure 10: Structure des lipopolysaccharides d'*Escherichia coli* K12 souche D21 et D21f2 et ses groupes chargés négativement, plus particulièrement les groupes phosphate (COUGHLIN *et al.*, 1983).

GLC = glucose ; GAL = galactose ; HEP = L-glycéro-D-mano-heptose ; GLN-AC = N-acétylglucosamine ; ETH-NH₃⁺ = éthanolamine ; P = phosphate

L'interaction entre le phosphore et les métaux a été étudiée plus récemment par POKORNY (1983) en utilisant la résonance magnétique nucléaire (RMN) du phosphore 31. Dans ce cas, le cadmium pénétrerait dans une sphère hydratée de groupement phosphate et se placerait au niveau de la molécule d'eau dans une liaison hydrogène avec l'atome d'oxygène libre du groupement phosphate (Figures 11a,b).

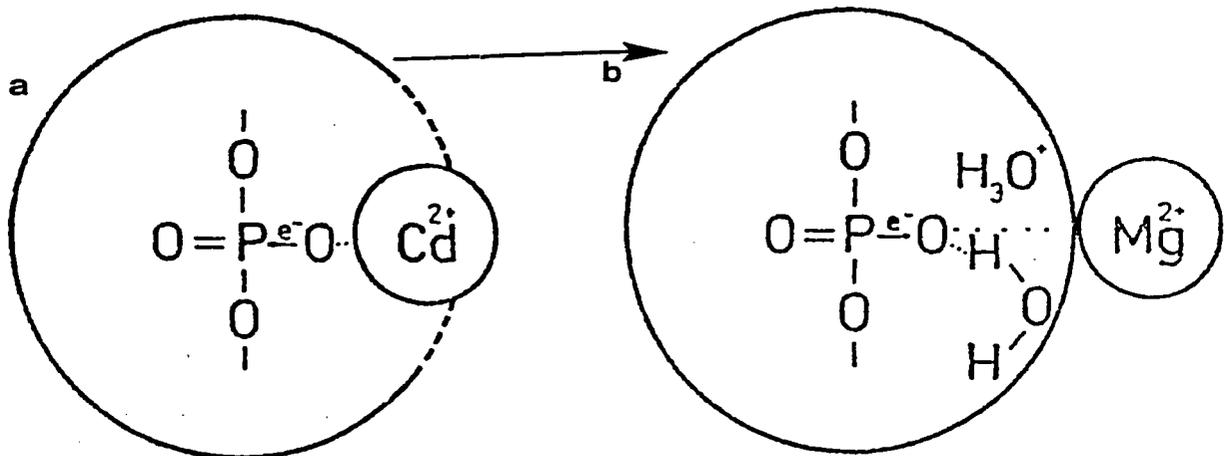


Figure 11 : Modèle d'interaction des phosphates avec les métaux (POKORNY, 1983).

Dans ce modèle, le magnésium pas plus que le Ca²⁺, Sr²⁺ et Zn²⁺ ne sont capables de pénétrer le rayon hydraté pour substituer la molécule d'eau et établir la liaison hydrogène avec l'oxygène. Enfin, l'utilisation de la RMN du ³¹P sur des structures biologiques a montré l'interaction des phosphates de la membrane externe d'*Escherichia coli* K12 avec l'euporium (FERRIS et BEVERIDGE, 1984) et le manganèse (FERRIS et BEVERIDGE, 1985, non publié).

c) Le peptidoglycane

Le peptidoglycane est une structure à mailles larges composée basiquement de sucres et de peptides et, comme cela a déjà été décrit, chez les bactéries gram positives, elle est associée à l'acide téichoïque.

Le peptidoglycane est aussi capable d'accumuler des métaux. Cette observation a été faite tout d'abord par MARQUIS *et al.* (1976) ; MATHEWS *et al.* (1979) et BEVERIDGE *et al.* (1982) en utilisant des parois de bactéries gram positives. Plus tard, HOYLE et BEVERIDGE (1984) ont travaillé sur le peptidoglycane d'*Escherichia coli* K12. BEVERIDGE (1984) met en évidence le même phénomène avec des parois extraites à partir de *E. coli* dont le peptidoglycane fixe deux ou trois fois plus de métal (Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2}) que la membrane externe.

Les groupements les plus efficaces dans la fixation des métaux par le peptidoglycane sont : les groupements phosphates de l'acide téichoïque (chez les bactéries gram positives) et amino et carboxyles des chaînes peptidiques (Figure 12). La mise en évidence du rôle de ces derniers dans la complexation des cations métalliques divalents a été faite par MARQUIS *et al.* (1976), DOYLE *et al.* (1980) et par BEVERIDGE et MURRAY (1980). Par exemple, ces auteurs ont bloqué les sites carboxyliques chimiquement pour démontrer leur intervention dans la fixation des métaux.

Ainsi HOYLE et BEVERIDGE (1983) ont trouvé que pour 1 mg de peptidoglycane extrait à partir de la paroi cellulaire d'*Escherichia coli* K12, il y avait 0,02 μmole de groupements carboxyliques susceptibles de fixer des cations divalents type Mg^{+2} et Ca^{+2} . De plus, selon BEVERIDGE et MURRAY (1980), pour un cation il intervient deux résidus carboxyliques.

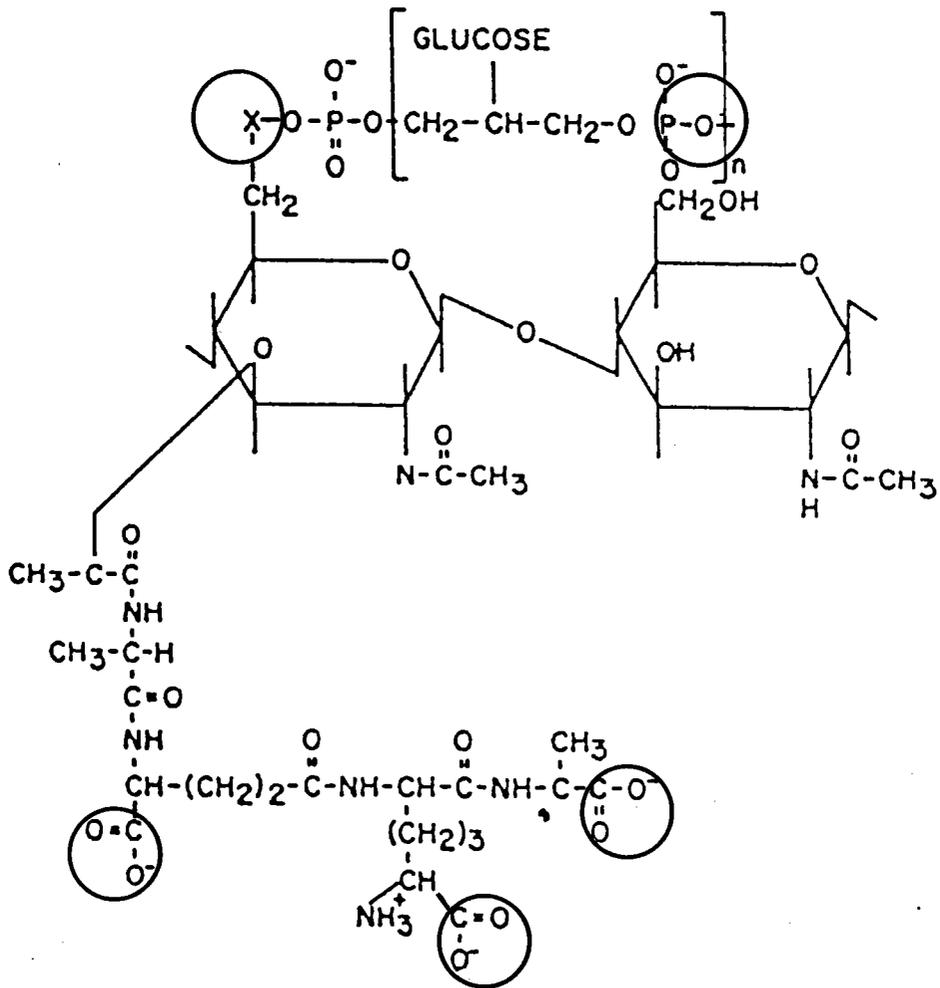


Figure 12 : Structure de la paroi de *Bacillus subtilis*, montrant les sites capables de fixer les métaux (carboxyliques et phosphate).
Le site de fixation entre le peptidoglycane et l'acide téichoïque polyglycérophosphate est inconnu mais représenté par (X). (DOYLE et al., 1980).

2.3.2.2. Absorption/Accumulation intracellulaire

La membrane cytoplasmique bactérienne, comme toutes les membranes biologiques, constitue une forte barrière de perméabilité sélective, directement concernée dans le transport d'ions et de molécules vers l'intérieur de la cellule. Cette barrière sert principalement à réguler le volume cellulaire, maintenir le pH intracellulaire et la composition ionique favorable aux activités enzymatiques.

Les mécanismes susceptibles de transporter les molécules et les ions à travers la membrane sont :

a) transport actif : dans le transport actif, la variation d'énergie libre de la molécule transportée est positive (nécessitant un apport d'énergie)

b) transport passif : dans le transport passif, la variation d'énergie libre de la molécule transportée est négative (cette réaction étant spontanée).

L'apport d'énergie nécessaire dans le transport actif peut provenir de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP ou, en d'autres termes, se révéler ATP dépendant, par exemple pour le transport de cadmium par *Staphylococcus aureus* (TYNECKA et al., 1981a). Le cadmium emprunterait le système de transport actif spécifique du manganèse pour pénétrer dans le compartiment intracellulaire et son transport serait contrôlé par le gradient transmembranaire de protons issu de la phosphorylation oxydative ou chaîne respiratoire en aérobie et par l'hydrolyse de l'ATP en anaérobie.

L'énergie peut provenir aussi d'un gradient transmembranaire des protons. Par exemple, le transport du lactose par la lactose perméase chez les bactéries est couplé à un transfert de protons du milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule.

En ce qui concerne les transports passifs, deux systèmes sont bien connus. D'une part le système de porines décrit précédemment, d'autre part le système que certains antibiotiques utilisent pour transporter des molécules d'une face à l'autre de la membrane en se déplaçant eux-mêmes au sein de la bicouche phospholipidique de la membrane cytoplasmique. Il est important de noter que ces deux types de transport, dits médiatés, ne semblent jamais avoir été décrits pour les métaux.

Finalement, la diffusion simple est un phénomène qui ne nécessite ni énergie ni molécule transporteuse ; dans ce cas, les ions ou molécules s'introduisent au travers de la membrane par des mouvements de ces molécules en équilibrant les concentrations de part et d'autre de la membrane.

L'accumulation des métaux à l'intérieur de la cellule est un phénomène qui a été étudié par plusieurs auteurs à partir de l'observation faite sur les bactéries sensibles aux métaux et leur capacité d'accumuler des grandes quantités de métaux dans le cytoplasme. Par exemple REMACLE *et al.* (1982) ont observé que cette accumulation intracellulaire est dans certains cas 3 fois plus importante chez les bactéries sensibles aux métaux comparativement à des bactéries résistantes.

Plusieurs mécanismes d'accumulation des métaux à l'intérieur de la cellule ont été décrits dans la littérature : l'accumulation des métaux par les protéines capables de fixer les métaux, dont la synthèse est induite en présence de métaux ; l'accumulation par formation de complexes insolubles, et les phénomènes de relargage, c'est-à-dire les mécanismes utilisés par la bactérie pour réduire l'accumulation de métaux.

a) Séquestration des métaux par des protéines spécifiques

Il existe des protéines capables de fixer les métaux comme le zinc, le cuivre et le cadmium (KHAZAELI et MITRA, 1981). Cette capacité est due à leur richesse en acides aminés soufrés. En effet, elles contiennent en moyenne 8% de soufre ; mais par contre, elles ne comportent pas d'acides aminés aromatiques (KAGI et VALLEE, 1961).

Récemment, trois de ces protéines ont été isolées chez *Pseudomonas putida* cultivé en présence de cadmium (HIGHAM *et al.*, 1984). Une autre protéine membranaire de poids moléculaire 34500 d a été isolée chez une souche *Alcaligenes* par Mc ENTEE *et al.* (1986) dont la synthèse est induite par la présence du cadmium à des concentrations supérieures à 0,1 mM.

TYNECKA *et al.* (1981a,b) ont montré l'existence chez certaines bactéries d'un plasmide dans lequel deux gènes sont observés : Cad A et Cad B. Le gène Cad A est responsable de la diminution d'au moins 100 fois de l'accumulation de cadmium chez les bactéries résistantes. Par contre, selon PERRY et SILVER (1982), le gène Cad B induirait la production d'une protéine capable de complexer le métal type métallothionéine.

b) Accumulation par formation des complexes insolubles

Les métaux sont parfois accumulés sous forme de complexes insolubles vraisemblablement non toxiques pour les bactéries. La nature des complexes formés dépend étroitement de la composition du milieu. Ainsi, dans un milieu non carencé, AIKING *et al.* (1982) ont rapporté la précipitation de sulfures de cadmium chez *Klebsiella aerogenes* sous forme de granules intracellulaires.

Enfin, le relargage est un mécanisme utilisé par les bactéries pour réduire l'accumulation. Ainsi la méthylation de certains métaux comme le mercure et le cadmium pour les rendre volatiles est une méthode utilisée par la bactérie pour réduire l'accumulation intracellulaire des métaux. Dans le cas du mercure (Hg^{2+}), il est transformé sous forme volatile (Hg^0) à l'aide d'une enzyme NADPH dépendante, la mercurique réductase, pour les composés organomercuriques, c'est l'organomercuriale lyase qui intervient (SUMMERS et SILVER, 1978 ; et ROBINSON et TUOVINEN, 1984).

2.3.3. Evaluation de l'accumulation des métaux sur les enveloppes bactériennes

L'accumulation des métaux par les enveloppes bactériennes doit être traduite, afin d'être compréhensible et comparable, en termes objectifs c'est-à-dire quantitatifs et, si possible, cinétiques.

Plusieurs expressions et méthodes tout à fait différentes sont généralement utilisées pour traduire cette accumulation. Ce sont :

- a. coefficient d'accumulation (CA)
- b. facteur de concentration (FC)
- c. expression cinétique
- d. expression sous forme d'isothermes d'adsorption : Freundlich
Langmuir
- e. modèle de Ruzic
- f. modèle de Scatchard.

a) Coefficient d'accumulation (CA)

Le coefficient d'accumulation (CA) exprime la quantité de métal biosorbé par les microorganismes c'est-à-dire la quantité de métal retrouvée dans ou sur la biomasse, rapportée à la masse ou au nombre de cellules, ou même la quantité de protéines de la biomasse. Le plus souvent, le CA est exprimé en [métal fixé] (M) . [matière sèche]⁻¹ (M⁻¹), ou selon les auteurs en (M) de métal fixé. (M_x⁻¹) de matière sèche. Cette expression n'intègre ni le facteur temps ni la variable concentration initiale. Le CA est donc totalement dépendant du moment de l'analyse et de la manière de réaliser l'expérience.

b) Facteur de concentration (FC)

Le facteur de concentration est une expression qui tient compte de la concentration de métal introduite en faisant le rapport : concentration de métal dans la phase microorganisme/concentration de métal dans la phase aqueuse.

$$FC = \frac{\text{métal fixé (M)} \cdot \text{matière sèche}^{-1} (M_x^{-1})}{\text{métal solution (M)}_s \cdot \text{volume liquide (L)}^{-3}}$$

ou encore :

$$FC = \frac{\text{C.A.}}{\text{métal solution (M)} \cdot \text{volume liquide (L)}^{-3}}$$

Si cette expression de FC représente un progrès comparativement à celle de C.A., elle n'intègre toujours pas le facteur temps et, de ce point de vue, reste totalement dépendante du moment de l'analyse.

c) La cinétique d'accumulation

Comme son nom l'indique, une mesure de cinétique représente par définition une mesure réalisée au cours du temps, qui va donc généralement s'exprimer sous la forme métal accumulé (M) . matière sèche⁻¹ (M_x⁻¹) . temps⁻¹ (T⁻¹). Les mesures sont le plus souvent réalisées en considérant l'hypothèse suivante : la quantité et la qualité du matériel biologique ne varient pas durant l'intervalle de temps considéré. Pour être respectée, une telle hypothèse exige que l'espace temps soit court pour éviter toutes modifications des caractéristiques des cellules (pas

de croissance, pas de mortalité, pas de variation d'activité). Cette hypothèse est sans doute rarement respectée, mais malheureusement presque jamais contrôlée par les expérimentateurs.

Dans le même ordre d'idée, il est important de souligner comme l'ont fait STRANDBERG *et al.* (1981), que la simple évaluation des matières sèches peut être totalement faussée par l'accumulation même des métaux étudiés, qui peut représenter jusqu'à 15% du poids sec total.

L'accumulation cinétique d'un métal peut en ordre général se traduire par une courbe d'allure tri ou quadriphasique (Figure 13).

L'accumulation des métaux par les microorganismes est un phénomène assez rapide. Dans la plupart des études concernant ce sujet, plus de 70% du total du métal sont accumulés dans la première heure (BRODA, 1972 ; MACKA *et al.*, 1979 ; BAUDA et BLOCK, 1985 ; BORDONS et JOFRE, 1987 ; FLATAU *et al.*, 1984). Dans les deux premières phases de la cinétique, un processus d'adsorption (à la périphérie cellulaire - sur les enveloppes) et d'absorption à l'intérieur de la cellule sont observés. Une certaine quantité du métal reste piégé par les sites de fixation des enveloppes tandis qu'une autre quantité traverse la barrière membrane cytoplasmique pour s'accumuler dans le cytoplasme. Après les deux premières phases au cours desquelles l'accumulation est rapide de type "exponentiel", une phase de ralentissement est observée avec saturation des sites de fixation périphériques et accumulation intracellulaire (absorption), et relargage dû à deux phénomènes : soit que la bactérie possède le mécanisme pour transformer le métal et le faire sortir (et flux du métal), soit parce qu'il y a lyse cellulaire et par conséquent libération du métal.

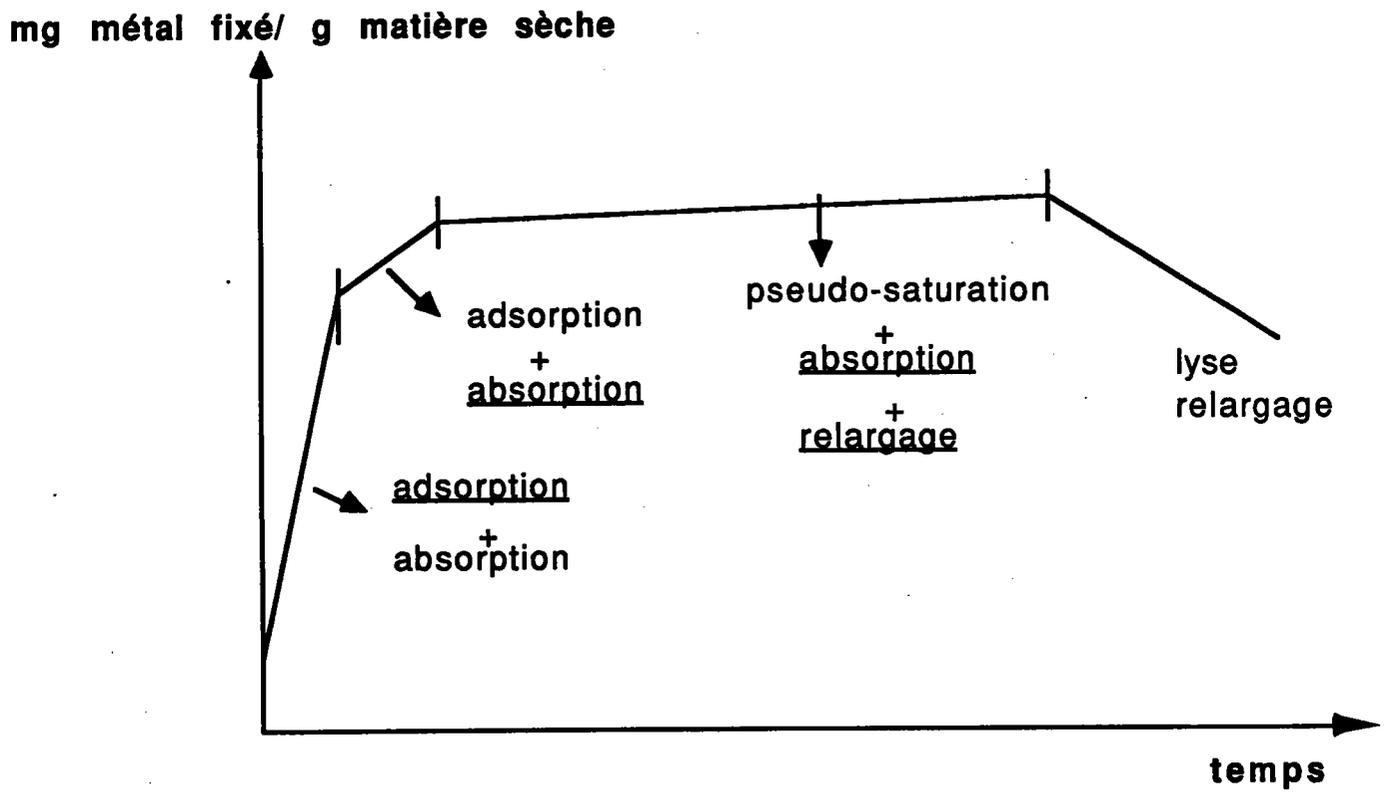


Figure 13 : Représentation théorique d'une cinétique d'accumulation d'un métal par les bactéries

d) Isothermes d'adsorption

D'une manière plus générale, les processus d'adsorption sont représentés par les isothermes d'adsorption dont la littérature est très abondante. De fait, ces isothermes initialement utilisés pour décrire l'adsorption des gaz sur des solides, traduisent dans notre cas l'adsorption d'ions en solution aqueuse (les métaux) sur des solides (les bactéries).

Deux types d'isotherme sont généralement utilisés : l'isotherme de Freundlich et l'isotherme de Langmuir. L'isotherme de Freundlich (ELLIS et KNEZEK, 1972) a souvent été employée pour décrire l'équilibre entre le métal adsorbé par les bactéries et le métal restant en solution. L'isotherme de Freundlich obéit à une loi empirique qui suppose que tous les sites de fixation ne sont pas équivalents, c'est-à-dire que les surfaces d'adsorption sont hétérogènes. L'équation obtenue est du type :

$$[\text{Met ad}] = K [\text{Met sol}]^{1/n}$$

Met ad = quantité de métal adsorbé par unité de poids d'adsorbant

Met sol = concentration de métal en solution à l'équilibre après adsorption

K, n = constantes

1/n représente la pente et K représente la constante du complexe :

$$\frac{[\text{Met.ad}]}{[\text{Met.sol}]^{1/n}}$$

Cette équation peut se linéariser en coordonnées Log-Log (Figure 14) et s'applique généralement pour des faibles concentrations de métal en solution et à l'équilibre, elle s'écrit :

$$\text{Log} [\text{Met ad}] = 1/n \text{ Log} [\text{Met sol}] + \text{Log} K$$

Ainsi, des isothermes de Freundlich ont été tracées pour traduire l'adsorption du cadmium par *Pseudomonas fluorescens* (BAUDA et BLOCK, 1985) ; et *Klebsiella aerogenes* (BROWN et LESTER, 1982a), du nickel par *Pseudomonas* sp. (BORDONS et JOFFRE, 1987) ; du cuivre et cadmium par les polymères de *K. aerogenes* (RUDD et al., 1984) et aussi par des populations bactériennes mixtes (GAID, 1981 ; FRISTOE et NELSON, 1983) (Figure 15).

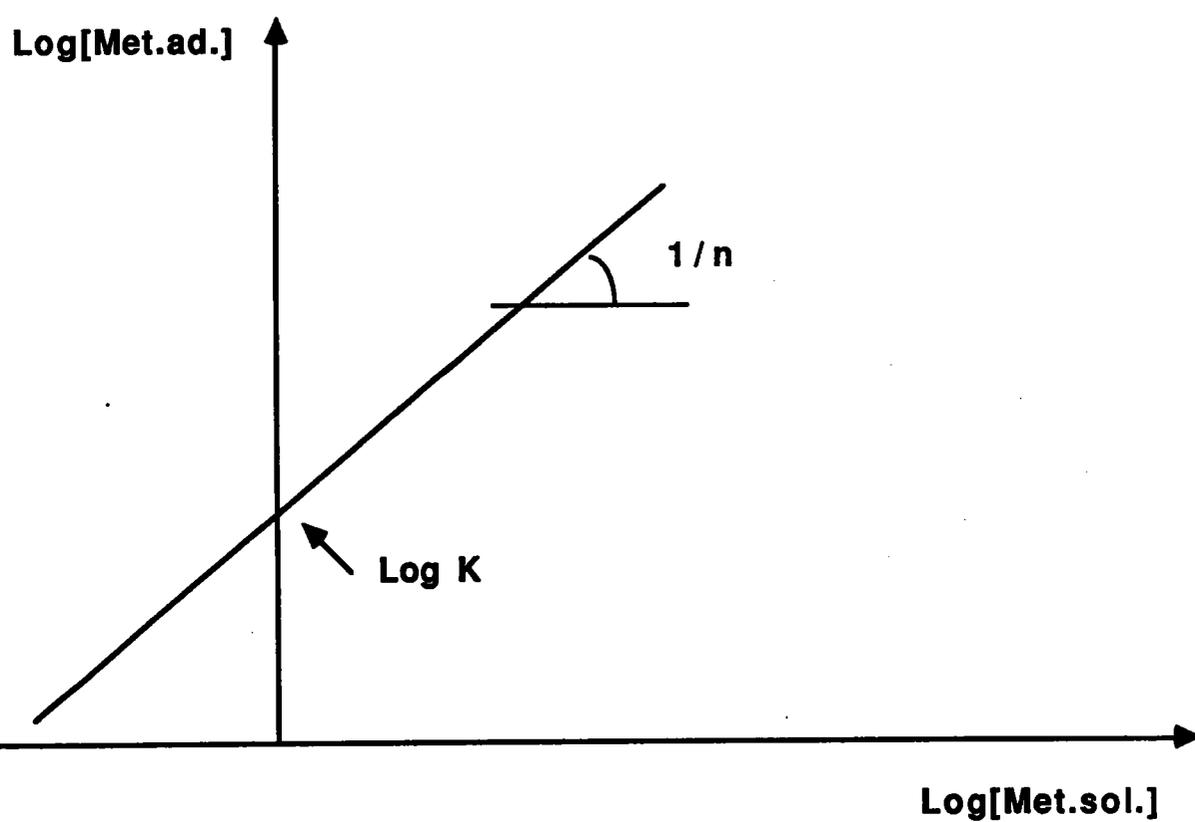


Figure 14 : Représentation théorique de la linéarisation d'une isotherme de Freundlich

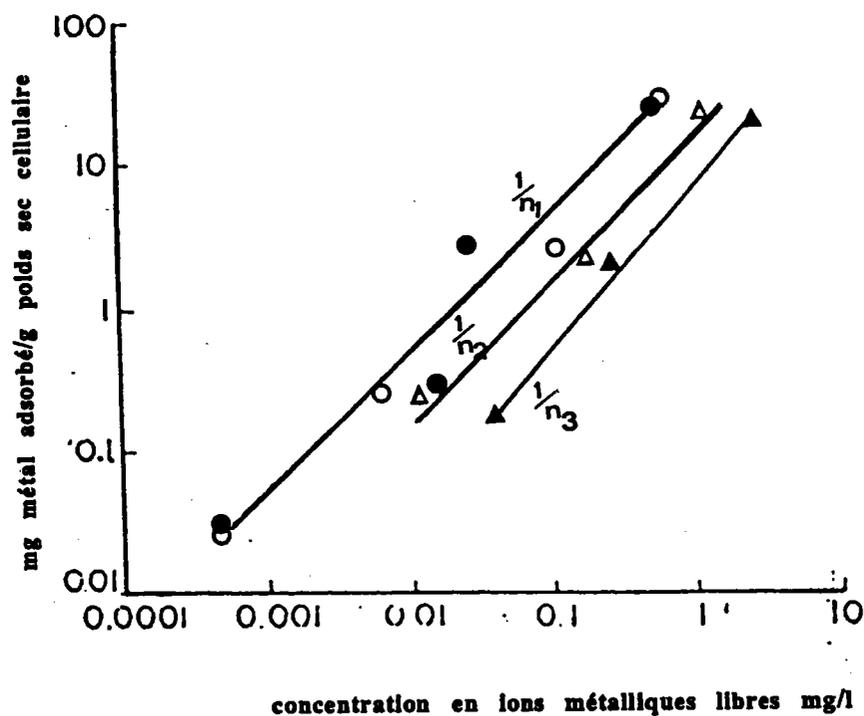


Figure 15 : Isothermes de Freundlich montrant la relation existant entre les métaux : ● cadmium, ○ manganèse, ▲ nickel, Δ cobalt adsorbés par *K. aerogenes* et le métal en solution. (BROWN et LESTER, 1982a).

Cette représentation (Figure 15) montre que pour les trois métaux utilisés, l'adsorption par *K. aerogenes* est similaire étant donné la valeur presque identique des trois pentes.

$$1/n_1 = 1,03 \quad 1/n_2 = 1,1 \quad 1/n_3 = 1,0$$

Pour des concentrations élevées, lorsque l'adsorbant approche de la saturation, l'isotherme de Langmuir est préféré (LA FRANCE *et al.*, 1986) (Figure 16). L'équation exprimant cette isotherme s'écrit :

$$\text{Met ad} = \frac{K \cdot [\text{Met sol}] \cdot b}{1 + K [\text{Met sol}]}$$

$$\frac{[\text{Met sol}]}{[\text{Met ad}]} = \frac{1}{K \cdot b} + \frac{[\text{Met sol}]}{b}$$

$$\frac{1}{[\text{Met ad}]} = \frac{1}{K \cdot b [\text{Met sol}]} + \frac{1}{b}$$

K : représente la constante d'équilibre d'adsorption

b : représente la capacité ultime d'adsorption

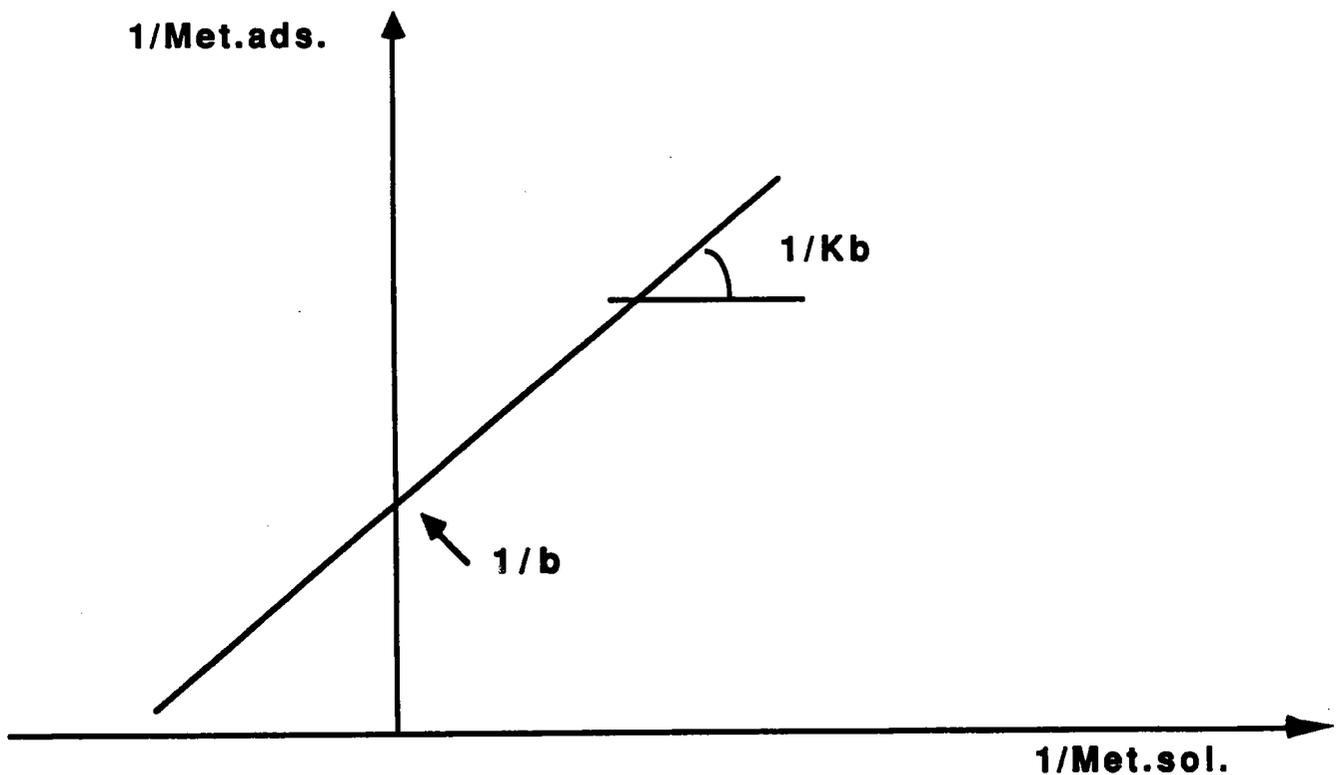


Figure 16 : Représentation théorique de la linéarisation d'une isotherme de Langmuir

WELLS et BROWN (1987) montrent l'adsorption du cadmium par *Rhytidiadelphus squarrosus* en utilisant une isotherme de Langmuir (Figure 17a,b)

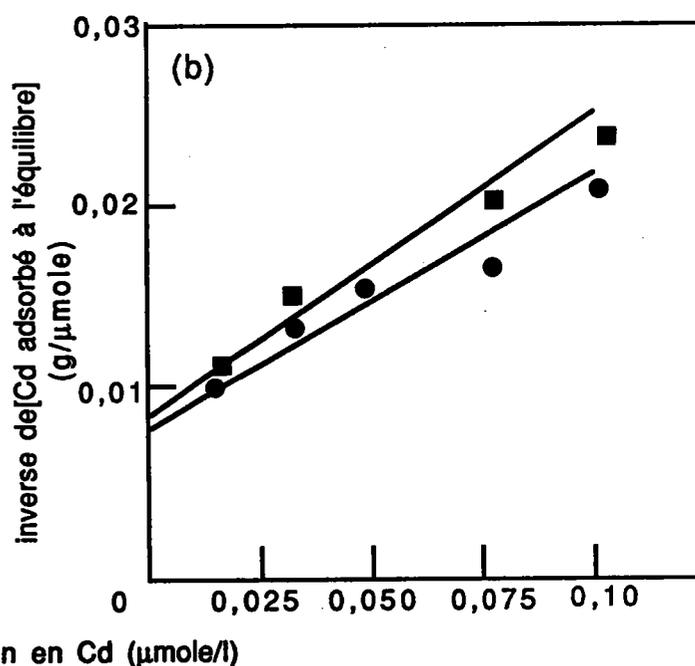
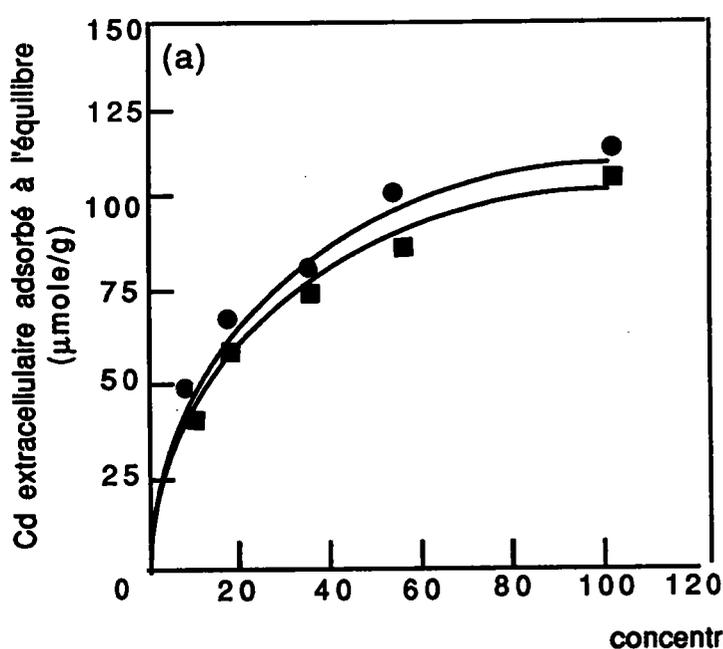


Figure 17a : Isotherme d'adsorption de Langmuir du cadmium par *Rhytidiadelphus squarrosus* de deux populations différentes.

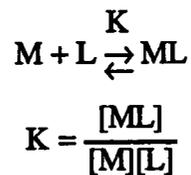
Figure 17b : Linéarisation de l'isotherme (WELLS et BROWN, 1987).

Ces deux modèles (isothermes de Freundlich et de Langmuir), bien que très utilisés et souvent représentés dans la littérature, ne répondent pas à toutes les questions que les chercheurs se posent au sujet de l'adsorption des métaux sur les biomasses. La notion quantitative des sites d'absorption et la coopération entre eux ou simplement les phénomènes de déplacement des métaux sont absents et incapables d'être expliqués par l'utilisation de ces modèles.

e) Modèle de Ruzic

Le modèle de Ruzic a été proposé par RUZIC (1982) pour essayer de mieux comprendre la notion de ligand avec plusieurs sites (métal libre et complexe Ligand + métal). Ce modèle permet d'apprécier la constante de stabilité (K) des complexes métal-ligand (ML) et les types de sites de fixation ; les équations suivantes montrent la manière d'établir l'équation générale de Ruzic.

A l'équilibre, il est possible d'écrire :



$$L_T = [L] + [ML] \text{ ou } M_T = [M] + [ML]$$

$$M_T - [M] = L_T - [L] = L_T - \frac{M_T [M]}{[M]K}$$

d'où

$$\frac{M_T - [M]}{[M]K} + M_T - [M] = L_T$$

$$(M_T - [M]) \frac{K [M] + 1}{[M]} = KL_T$$

$$\frac{[M]}{M_T - [M]} = \frac{K [M] + 1}{KL_T} = \frac{[M]}{L_T} = \frac{1}{K [L_T]}$$

$$\frac{[M]}{M_T - [M]} = \frac{[M]}{L_T} = \frac{1}{KL_T} \quad (1)$$

D'après l'équation (1) le tracé de $\frac{[M]}{M_T - [M]}$ en fonction de $[M]$ doit conduire à une droite de

de pente $\frac{1}{L_T}$ et d'ordonnée à l'origine $\frac{1}{KL_T}$

$[M]$ = concentration de métal libre

$[L]$ = concentration en ligand

$[ML]$ = concentration en métal complexé

K = constante d'instabilité

M_T = métal total ; L_T = ligand total

Quelques exemples ont été donnés par RUDD *et al.* (1984) et BARON (1987). Les figures 18a, b, montrent deux représentations du modèle de Ruzic, de l'adsorption du cuivre par les flocs de boues activées et par les polymères extracellulaires. Dans ce cas, la discontinuité dans les couches montre qu'il y a au moins deux types de sites d'adsorption. Toutefois, ce modèle ne permet pas de savoir si ces sites travaillent en coopération positive ou négative.

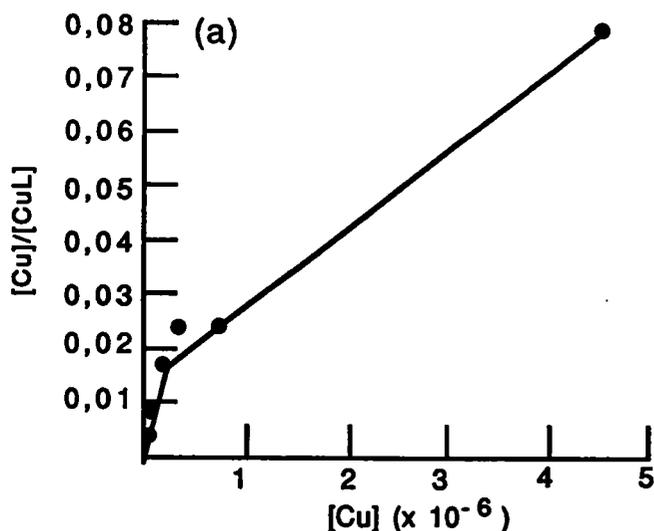


Figure 18a : Modèle de Ruzic, de l'adsorption de cuivre par les flocs de boue activée.

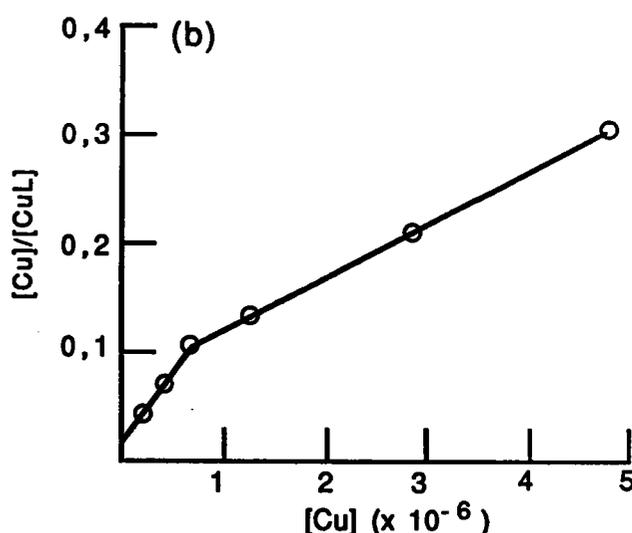
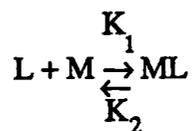


Figure 18b : Adsorption du cuivre par les polymères extracellulaires. Met sol/Met adsor contre Met sol.

f) Modèle de Scatchard

Le modèle de Scatchard (SCATCHARD, 1949) permet d'apprécier les constantes cinétiques ($K_A, K'_A \dots K_A^n$), les quantités de métal fixé par unité de ligand, les différents types de site de fixation de métaux, et de connaître la relation existant entre les sites (coopération positive ou négative). DAHLQUIST (1978) montre que si les courbes obtenues sont concaves, la coopération entre les sites récepteurs est négative. Si les courbes sont convexes, la coopération entre les sites récepteurs est positive. L'équation suivante montre la façon de représenter ce modèle :



avec

L : ligand

M = Métal

K_1 et K_2 = constantes cinétiques

ML = complexe

A l'équilibre, on peut écrire :

$$K_1 [M] [L] = K_2 [ML] \quad (1)$$

d'où l'on tire :

$$\frac{[L] [M]}{[ML]} = \frac{K_2}{K_1} = K_d = \frac{1}{K_a} \quad (2)$$

Le nombre total de sites récepteurs (N_R) est égal à la quantité de fraction ou ligand piégeant le métal nL et il vient

$$N_R = n[L] = [L] + [ML] \quad (3)$$

$$[L] = n[L] - [ML] \quad (4)$$

et en combinant les équations (4) et (2), on obtient :

$$K_d = \frac{n[L] - [ML][M]}{[ML]}$$

Ce qui est équivalent à :

$$[ML] = \frac{[M]n[L]}{K_d + [M]}$$

Enfin, en linéarisant, on obtient :

$$\frac{1}{ML} = \frac{K_d}{nL M} + \frac{1}{nL}$$

ou encore :

$$\frac{[ML]}{[M]} = -K_a [ML] + K_a n[L]$$

L'expression graphique de cette équation (Figures 19a et b) montre que si la fraction ou le ligand étudié contiennent un seul type de récepteur, on obtient une droite de pente K_a . Au contraire, si la fraction étudiée contient plusieurs types de site on obtient une courbe pour laquelle il est possible de définir au moins deux types de récepteur (à forte et à faible affinité).

Dans le cas de la figure 19b, cette représentation montre une courbe concave avec au moins deux types de site avec deux affinités différentes en coopération négative, ce type de coopération impliquerait que la priorité est plus importante pour un ou plusieurs sites que pour d'autres.

Quelques exemples ont été donnés par DAHLQUIST (1978) pour des courbes convexes dont les sites sont en coopération positive. Ce type de coopération impliquerait la même priorité pour tous les sites.

Le modèle de Scatchard a été utilisé par plusieurs chercheurs à cause de la grande quantité d'informations qu'il fournit. Dans la plupart des travaux concernant la fixation des métaux sur des ligands, les techniques utilisées sont principalement : la dialyse, la filtration de gel ou le passage par colonne de sephadex. La dialyse est l'une des techniques les plus utilisées car

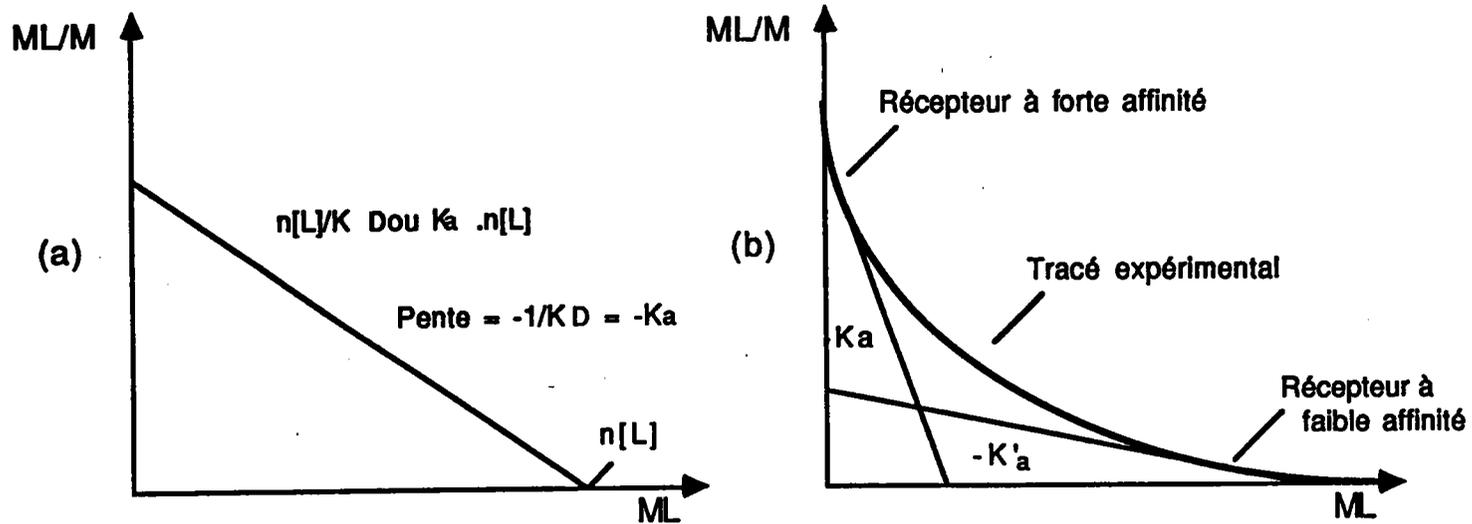


Figure 19. a et b : Expression graphique de l'équation de Scatchard (Louisot, 1983)

elle comporte un nombre peu élevé de manipulations ; elle est la manière de procéder la plus simple et la plus pratique, surtout quand il s'agit des bactéries ou des structures subcellulaires.

Les bactéries ou structures subcellulaires vont directement dans le sachet de dialyse et sont maintenues à 4°C sous agitation, limitant les risques de contamination et peut-être de lyse ; les sachets sont suffisamment grands pour loger des quantités assez importantes de biomasse cellulaire (de l'ordre de quelques grammes) plus les solutions des métaux, mais leur porosité est telle qu'elle permet uniquement la sortie du métal libre, facile à doser dans ces conditions dans la phase aqueuse. Avec cette méthode, il est possible de travailler avec des éléments radioactifs en réduisant l'exposition du manipulateur aux mélanges radioactifs.

De nombreux travaux ont été réalisés pour expliquer la fixation des métaux sur les ligands "simples" (une molécule avec un groupement bien spécifique) ou sur des ligands plus complexes comme les enveloppes cellulaires ou des cellules entières (PRICE, 1972 ; LAMBERT et al., 1975 ; KADOKURA et al., 1982 ; GIEBSY et al., 1983 ; RUDD et al., 1984 ; MURTHY et FRIESEN, 1985). A titre d'exemple, un modèle de Scatchard est utilisé pour expliquer l'adsorption du cuivre sur une protéine (Figure 20) par KADOKURA et al. (1982

Dans la figure 20 au moins deux types de site de fixation sont observés ; le premier avec une pente K_1 plus importante, traduit les sites à plus forte affinité, le deuxième avec une pente K_2 , traduit les sites de moins forte affinité. Ces sites travaillent en coopération négative car la courbe est concave. Les deux techniques (dialyse et filtration de gel) utilisées ne présentent aucune différence dans l'interprétation de ce modèle en ce qui concerne ce cas précis (cuivre plus une protéine-kératine).

DOYLE et al. (1980) et MATHEWS et al. (1979) ont travaillé sur l'adsorption des métaux type Ca^{+2} , Na^+ , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , sur la paroi cellulaire modifiée au niveau des sites carboxyliques et sur le peptidoglycane de *Bacillus subtilis* respectivement.

Les auteurs ont utilisé la technique de dialyse pour la fixation des métaux sur les structures et l'interprétation a été faite par le modèle de Scatchard (Figure 21). Dans ce cas, les auteurs ont linéarisé l'ensemble des points obtenus, empêchant par conséquent l'appréciation des différents sites existant dans ces structures complexes et leur coopération.

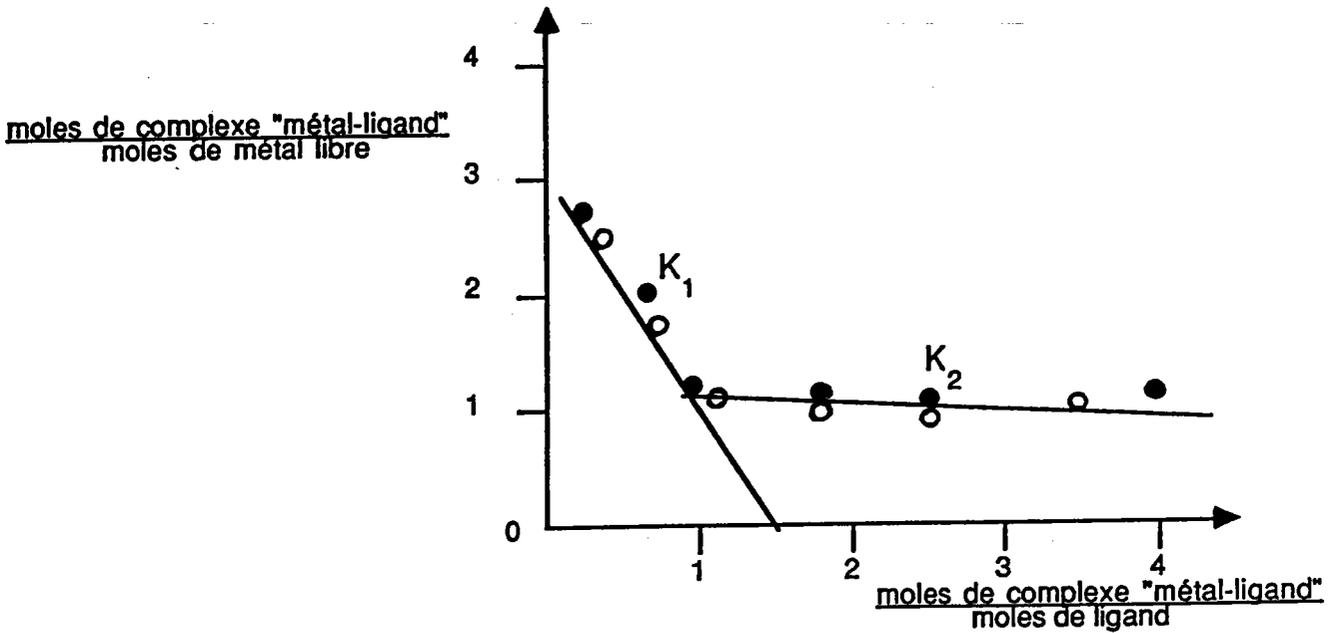


Figure 20 : Représentation de Scatchard de l'adsorption du cuivre sur un protéine (Kératine), comparaison de deux méthodes : ○ Dialyse ; ● Filtration sur gel (KADOKURA et al., 1982).

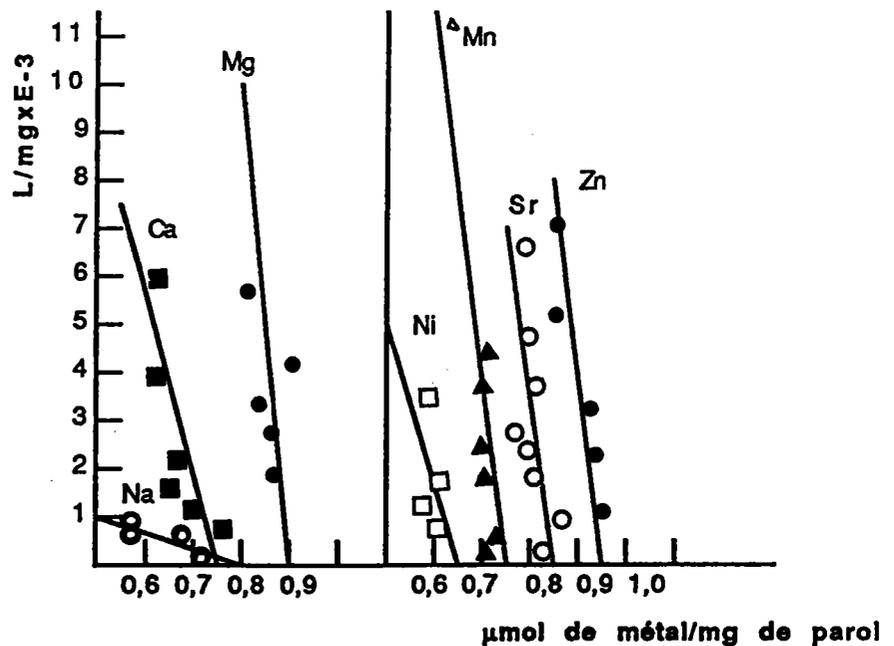


Figure 21 : Présentation du modèle de Scatchard de l'adsorption des métaux sur les parois de *Bacillus subtilis* après l'équilibre de dialyse (DOYLE et al., 1980).

2.3.4. Extraction des métaux

L'extraction des métaux a été entreprise par plusieurs chercheurs pour essayer de comprendre de manière fondamentale la localisation de ces métaux au niveau du matériel biologique, la quantité de métaux qui serait adsorbée sur les surfaces cellulaires et celle qui serait absorbée à l'intérieur de la cellule. Finalement, à un niveau plus pratique, les techniques d'extraction ont été appliquées au "nettoyage" des biomasses contaminées avec des métaux.

Les enveloppes cellulaires jouent certes un rôle important dans l'accumulation des métaux, mais elles peuvent en effet s'accumuler plus profondément dans la cellule, faisant du même coup que les stratégies utilisées pour atteindre ces métaux deviennent extrêmement complexes. Les métaux liés à des exopolysaccharides seront a priori plus facilement extractibles que ceux liés à des protéines intracellulaires ou à de l'ADN à cause principalement de la barrière constituée par les enveloppes.

A un niveau plus pratique, il est très important de connaître la manière d'extraire les métaux contaminant les boues de station d'épuration. MEGUELLATI (1982) et FORSTNER (1984), au moyen d'une extraction sélective, ont pu montrer la répartition des métaux entre plusieurs fractions : fraction échangeable et facilement soluble, fraction carbonatée, fraction facilement réductible, fraction modérément réductible, fraction résiduelle. En connaissant ces diverses relations boue-métal plusieurs chercheurs ont voulu extraire les métaux des boues à l'aide d'un ensemble de techniques.

Parmi les solutions proposées et appliquées pour extraire les métaux aussi bien à partir des populations pures de laboratoire qu'à partir des populations mixtes, complexes et inconnes d'un système de boues activées, il y a : l'élutriation, l'acidification, le remplacement par d'autres ions l'utilisation des complexants. La plupart des auteurs utilisent un mélange de plusieurs de ces techniques (SCOTT et HORLINGS, 1975 ; HAYES et al., 1979 ; JENKINS et al., 1981 ; LAKE et al., 1984 ; GOULD et GENTELLI, 1984 ; ALIBHAI et al., 1985 ; LEGRET et al., 1983, 1987 ; KEMPTON et al., 1987).

L'élutriation consiste en un ou plusieurs lavages de la boue par de l'eau non contaminée avec des métaux de façon à obtenir les premières quantités de métaux présents dans la boue sous "forme soluble" (ADAMS, 1965) quoique, dans la plupart des cas, les quantités extraites ne sont pas très élevées. Par exemple, JENKINS et COOPER (1964) ont montré que par cette méthode les pourcentages extractibles en Cu^{+2} , Ni^{+2} et Zn^{+2} étaient respectivement de 0,3 ; 14,3 et 1,7%. Lorsque LANGERWERFF et al. (1976) sèchent les boues avant de les laver

avec de l'eau de robinet contenant 0,6 M CaCl_2 , les pourcentages d'extraction augmentent à 2, 11 et 36% pour le Cu^{+2} , Cd^{+2} et Zn^{+2} respectivement.

Les formes extractibles ou facilement échangeables du métal peuvent être extraites en utilisant de 0,1 à 0,5 M d'acétate d'ammonium, mais le rendement est inférieur à 1% (ANDERSSON, 1975).

Enfin les métaux peuvent être complexés (adsorbés-absorbés) à la matière organique ou à des composants cellulaires (surtout à des groupements fonctionnels). Ce phénomène a été observé par CALLANDER et BARFORD, 1983. L'extraction de ces métaux est encore plus difficile et nécessite des réactifs plus "forts". JUSTE *et al.* (1977) et LUND *et al.* (1985) réalisent des extractions en utilisant des acides type : HCl , H_2SO_4 ou des mélanges comme KCl 0,1 N ; DTPA ; EDTA ; NTA ; ces derniers sont des cations ayant une plus grande affinité que les ligands pour les métaux.

La figure 22 résume les différents types de réactifs utilisés pour l'extraction des métaux des boues activées : l'eau (élutriation) est très utilisée pour les formes solubles, le KNO_3 pour les formes échangeables, mais pour les formes fixées à la matière organique ce sont les complexants type DTPA, EDTA. Enfin pour les formes résiduelles c'est le HNO_3 le plus utilisé.

SOURCE	MCLAREN & CRAWFORD (1973)	SILVEIRA & SOMMERS (1977)	ALLOWAY et al. (1979)	PETRUZZELLI et al. (1981)	EMMERICH et al. (1982b)	SCHALSCHA et al. (1980;1982)	SOON & BATES (1982)	SPOSITO et al. (1982a)
METALS UTILIZED	Cu	Cd,Cu,Pb,Zn	Cd	Cd,Cu,Ni,Pb,Zn	Cd,Cu,Ni,Zn	Cr,Cu,Mn,Ni,Zn	Cd,Ni,Zn	Cd,Cu,Ni,Pb,Zn
<u>CHEMICAL FORM EXTRACTED</u>								
SOLUBLE	↑ CaCl ₂	↑ H ₂ O	↑ Deionized H ₂ O	↑ H ₂ O	↑ 1	↑ KNO ₃	↑ CH ₃ CO ₂ NH ₄	↑ KNO ₃
EXCHANGEABLE	↓ CaCl ₂	↓ KNO ₃	↓ CaCl ₂	↓ KNO ₃	↓ KNO ₃	↓ NaF	↓ CH ₃ CO ₂ NH ₄	↓ KNO ₃
ADSORBED	↑ CH ₃ CO ₂ H				↑ Ion Exchange H ₂ O			↑ Deionized H ₂ O
ORGANICALLY BOUND	↓ K ₄ P ₂ O ₇		↓ K ₄ P ₂ O ₇		↓ NaOH	↓ Na ₄ P ₂ O ₇	↓ (CH ₃ CO ₂) ₂ Ca	↓ NaOH
AVAILABLE		↑ DTPA		↑ DTPA				
CARBONATE PRECIPITATED					↑ Na ₂ -EDTA	↑ EDTA		↑ Na ₂ -EDTA
SULFIDE PRECIPITATED		↓ KNO ₃				↓ HNO ₃	↓ HNO ₃	
OCCLUDED	↑ Cu-Ox [†]		↑ HONH ₂ HCL [†]		↓ HNO ₃	↑ T-E ₃ C. HNO ₃		↓ HNO ₃
RESIDUAL	↓ HF		↓ T-E ₃ C. HNO ₃					

Figure 22 : Différents réactifs utilisés pour l'extraction des métaux des boues activées (LAKE et al., 1984).

Un très bon exemple (Tableau 15) a été donné par STOVER et al. (1976) sur l'extraction des métaux présents dans une boue par différents réactifs chimiques les plus utilisés.

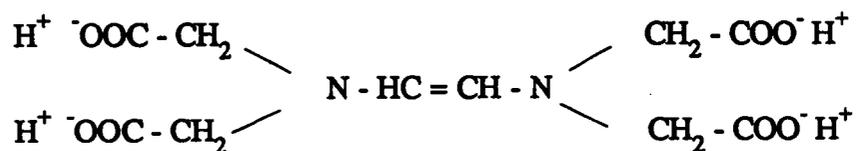
Tableau 15 : Pourcentages d'extraction des métaux d'une boue digérée anaérobie par les différents réactifs.

Elément	KNO ₃	KF	Na ₂ P ₂ O ₇	EDTA	HNO ₃
Cd (II)	0	0	14,8	48,8	17,5
Cu (II)	6,4	10,4	10,4	22,5	35,1
Ni (II)	13,9	8,3	14,2	32,4	6,8
Zn (II)	0,3	0,4	50,3	18,2	9,3

D'après le tableau 15, ce sont les complexants type EDTA les plus efficaces dans l'extraction des métaux d'une boue digérée en sachant que les concentrations utilisées sont très faibles par rapport aux autres réactifs. Les techniques d'extraction des métaux par les complexants reposent sur la possibilité de dissociation du complexe métal-biomasse. Les complexants présentent une affinité pour le métal plus forte que celle des sites de fixation dans la cellule ; d'autre part, les complexants organiques et de synthèse possèdent des groupements fonctionnels en plus grande quantité, prêts à intervenir dans le piégeage des métaux. Les complexants les plus utilisés dans les techniques d'extraction sont : EDTA, DTPA, NTA (LAKE et al., 1984).

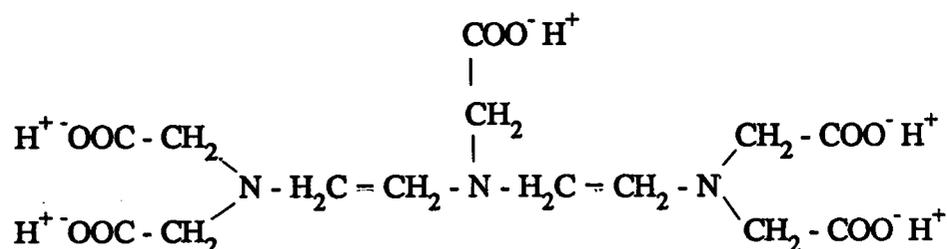
. EDTA : Acide éthylène diamine tétracétique : C₁₀H₁₆O₈N₂

PM = 292,25 g/mol.



. DTPA : Acide diéthylène triamine pentaacétique : $C_{14}H_{23}O_{10}N_3$

PM = 393,35 g/mol.



. NTA : Acide nitrilo triacétique : $C_6H_9O_6N$

PM = 191,14 g/mol.

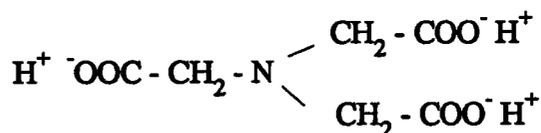


Figure 23 : Formules semi-développées des complexants EDTA, DTPA, NTA (Merck index 1983).

L'action des complexants dépend du pH et de leur concentration. Ainsi NORWELL et LINDSAY (1972) observent l'influence du pH sur "l'affinité métal-ligand" : le cuivre et le zinc additionnés à des sols de pH différents sont faiblement complexés à un pH de 5,8 alors qu'à partir d'un pH de 6,8 le taux de métal complexé atteint les 50%, indiquant qu'à pH alcalin (faible concentration en protons) les complexants du sol sont moins compétitifs que le DTPA pour ces deux métaux. Ces mêmes auteurs ont travaillé avec l'EDTA et observent que les complexes EDTA-Cu et EDTA-Zn ont une stabilité maximale à pH = 6,8. Au-delà de ce pH, le Ca^{2+} déplace ces métaux du fait de sa forte affinité pour l'EDTA.

GARDINER (1976) s'intéresse également à l'affinité de l'EDTA vis-à-vis du cuivre, du cadmium et du zinc. Intégrant des données de SILLEN et MARTELL (1964 et 1971), il observe des "affinités relatives" de l'EDTA pour différents cations, décroissantes selon $\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Le cuivre en présence d'EDTA à 10^{-6}M et d'autres complexants inorganiques (CO_3^{2-} à 10^{-3}M.OH^-) est préférentiellement sous la forme Cu-EDTA. D'autre part le cadmium est complexé à plus de 90% par l'EDTA pour des concentrations respectives de 100 mg Cd/l et

5×10^{-7} mole EDTA/l. Enfin, le remplacement de l'EDTA par le NTA conduit à une augmentation du taux de métaux complexés, avec 10 fois plus pour Cu^{2+} et 4 fois plus pour Cd^{2+} . Selon BARICA et al. (1973), l'EDTA est plus efficace dans la complexation du Zn^{2+} .

Ces complexants de synthèse à forte concentration ont une action toxique pour certaines souches bactériennes en piégeant et en arrachant les cations fixés sur les structures et qui sont indispensables à la cellule : c'est le cas de l'EDTA qui selon GRAY et WILKINSON (1965) déstructure les parois isolées de certaines bactéries sensibles comme *Pseudomonas aeruginosa*.

Ces complexants ont également été employés dans les techniques d'extraction lors d'études de métaux dans les boues activées. LAKE et al. (1984) relèvent ainsi l'utilisation du DTPA dans la mise en évidence des formes "disponibles" des métaux, c'est-à-dire liées à la biomasse mais extractibles par l'action de complexants forts. L'EDTA est aussi utilisé pour déplacer les métaux.

3. MATERIEL ET METHODES

3.1. PSEUDOMONAS FLUORESCENS

Pseudomonas fluorescens (Institut Pasteur 6326), largement distribué dans l'environnement, a été choisi comme représentant des bactéries gram négatives, permettant d'obtenir les trois enveloppes cellulaires : membrane externe (M. ext), peptidoglycane (PG), membrane cytoplasmique (M.C.), qui serviront de support à notre recherche au niveau de fractions isolées.

Cette souche a été cultivée à 30°C sous agitation dans un bouillon nutritif peptoné, pH = 6,9 (bio Mérieux 51101) et conservée à 4°C sur gélose inclinée (bio Mérieux 51381).

Les cellules de *Pseudomonas* ont un diamètre d'environ 0,7-0,8 µm et une longueur de 2,3 à 2,8 µm. Elles présentent plus d'un flagelle qui leur permet la mobilité. Dans le cas de *Pseudomonas fluorescens*, il y a production d'un pigment fluorescent (type pyoverdine). *P. fluorescens* est oxydase, citrate et nitrate positifs, hydrolyse les protéines mais pas l'amidon. Il utilise comme source de carbone dans un milieu de laboratoire, glucose, tréhalose, 2-cétogluconate, etc... (KRIEG et HOLT, 1984). La température optimale de croissance est 25-30°C en aérobie. Sur une gélose nutritive, les colonies de *P. fluorescens* sont petites, rondes, plates et incolores. Sur un milieu où elles peuvent produire des pigments, les colonies sont colorées ; par exemple, sur une gélose au désoxycholate citrate lactose (D.C.L.), les colonies sont verdâtres ou brunâtres et lactose négatives (cette description est loin d'être complète, elle se limite à donner quelques détails et à présenter le matériel biologique employé dans cette étude).

3.1.1. *Pseudomonas fluorescens* pour le fractionnement des enveloppes

La suspension de *P. fluorescens* utilisée pour le fractionnement des enveloppes cellulaires a été obtenue par culture en laboratoire en plusieurs étapes : Un tube contenant 10 ml de milieu nutritif (NB) (bio Mérieux 51101, pH 6,9) a été inoculé avec le contenu d'une culture pure de *P. fluorescens* cultivé en aérobie dans une gélose inclinée d'agar nutritif pendant 17-24 heures à 30°C. Un erlen (250 ml) contenant 100 millilitres de bouillon nutritif a étéensemencé avec les 10 ml de l'inoculum déjà préparé puis laissé pendant 24 heures à 30°C sous agitation.

Des échantillons de 20 ml de cette culture ont ensuite été introduits stérilement dans 5 erlens contenant chacun 700 ml de milieu (BN) placés pendant 24 heures sous agitation à 30°C afin d'obtenir une forte production de cellules en phase stationnaire.

Les cellules bactériennes ont été récupérées du milieu par centrifugation à 25 000 g pendant 30 min à température ambiante pour être ensuite lavées avec un même volume de solution saline stérile (NaCl : 0,85%). Les culots obtenus ont été remis en suspension dans un volume final de 250 ml de solution saline stérile pour obtenir une concentration bactérienne de l'ordre de $4,5 \times 10^{11}$ bactéries par millilitre (soit 589 mg de poids sec), nécessaire à l'obtention d'une quantité suffisante et mesurable des structures bactériennes.

3.1.2. Préparation d'une suspension de *Pseudomonas fluorescens* pour les essais d'accumulation des métaux après croissance

En ce qui concerne les essais de contamination par des métaux après culture, une suspension de *Pseudomonas fluorescens* (d'environ 10^8 bactéries/ml) a été préparée dans de l'eau distillée stérile à partir de colonies bactériennes obtenues sur gélose nutritive (Bio Mérieux 51381 à 23 g/l) après 24 heures d'incubation à 30°C. Cette suspension a été filtrée au travers d'une toile à bluter (5 µm) pour séparer les agrégats bactériens.

3.1.3. Préparation d'une suspension de *Pseudomonas fluorescens* pour les essais d'accumulation des métaux au cours de la croissance

Pour les essais de contamination par des métaux au cours de la croissance bactérienne, la souche de *P. fluorescens* a été cultivée dans un bioréacteur alimenté en continu : les paramètres étaient une température de 30°C, un pH de 7,5, un débit d'alimentation $Q = 110$ ml/heure et un taux de dilution $D = 0,22$ h⁻¹ pour un milieu peptoné bio Mérieux 5111 dilué au 1/2 (12,5 g/l) puis au 3/4 (18,75 g/l). Les concentrations bactériennes ont été déterminées par la méthode de numération en gélose et exprimée en unité formant colonie (cf 3.2.1).

3.1.4. Boues de station d'épuration

Les échantillons de boues testés proviennent de stations d'épuration traitant des eaux usées à charge urbaine et industrielle. Un premier lot était prélevé à la station de Metz, au niveau du bassin d'aération et du filtre-pressé, le second était fourni par la station de Bordeaux, prélevé à trois niveaux : le décanteur secondaire, le digesteur et le filtre-pressé. L'état physique des boues variait selon l'origine :

- les boues de bassin d'aération (appelées boues activées), très fluides, sont une suspension de biomasse dans un effluent ;

- les boues de décanteur secondaire et de digesteur sont épaissies (humidité résiduelle 80%) ;

- les boues provenant de filtre-presse sont solides (humidité résiduelle de 30 à 50%).

Les échantillons prélevés étaient conservés dans des récipients en polyéthylène, en chambre froide à 4°C avant utilisation.

3.2. NUMERATION DES BACTERIES

Les numérations bactériennes ont été effectuées par deux méthodes : (a) la méthode des unités formant colonies (U.F.C.) et (b) le comptage microscopique par épifluorescence (LEITZ, Ref : 513523 avec une lampe 50W HBO).

a. La méthode des unités formant colonies (U.F.C.) vise à évaluer le nombre de bactéries capables de se multiplier sur une gélose nutritive (bio Mérieux 51381) après incubation de 24 heures à 30°C de l'échantillon ou de ses dilutions au 1/10 dans l'eau physiologique (NaCl 0,85%).

b. Le comptage microscopique par épifluorescence permet le dénombrement de toutes les bactéries mortes et vivantes, colorées par l'acridine orange et rendues fluorescentes par la lumière ultra-violette (MAGNAN, 1985 ; DELATTRE, 1986). La numération a été effectuée après filtration des suspensions bactériennes sur des filtres en acétate de cellulose de 0,45 µm de porosité, 47 mm de diamètre, stériles (Sartorius R Ref SM. 13006. 047. ACN). Cette filtration a été réalisée avec une trompe à eau, sous faible dépression.

La coloration des bactéries a été obtenue avec une solution de Triton X 100 et une solution d'acridine orange conservée à +4°C. La solution de Triton X 100, fraîchement préparée contenait : Triton X 100 = 0,1% V/V, Saccharose = 0,2 M, EDTA = 0,001 M, acide citrique monohydraté = 0,02 M, phosphate monopotassique = 0,02 M, eau distillée filtrée, stérile q.s.p. 1 litre.

La solution d'acridine orange, fraîchement préparée, contenait : acridine orange 0,1% P/V, chlorure de sodium = 0,1 M, acide citrique monohydraté = 0,01 M, phosphate monopotassique = 0,01 M, eau distillée filtrée, stérile q.s.p. 1 litre.

La coloration a été réalisée en six étapes successives :

1. Séchage des filtres
2. Trempage dans la solution de Triton X 100 pendant 1 minute 30 secondes
3. Rinçage pendant 30 secondes dans l'eau distillée, filtrée
4. Trempage dans la solution d'acridine orange pendant 12 minutes
5. Rinçage pendant 30 secondes dans l'eau distillée, filtrée
6. Séchage.

Le comptage des bactéries colorées à l'acridine orange a été effectué à l'aide d'un microscope optique (Leitz) équipé pour permettre une observation par épifluorescence (Lampe de 50W HBO). Le nombre n de champs à compter a été déterminé par la formule suivante :

$$V(\bar{x}) = \frac{1-f}{n} \times S1^2$$

où $f = n/203500 =$ nombre total de champs

$n =$ nombre de champs comptés

$S1 =$ écart-type des $Ln\bar{x}$ calculé sur un échantillon très grand et le plus représentatif possible de la population

$V(\bar{x}) =$ écart-type sur la moyenne (\bar{x}) (où $x = Ln\bar{x}$) (COCHRAN, 1977).

* La mesure de densité optique a été choisie pour déterminer la concentration bactérienne de suspensions de *Pseudomonas fluorescens* dans l'eau physiologique (NaCl 0,85%), ou distillée, suprapure ou dans un bouillon peptoné. Son principe est, à partir d'une droite étalon établie entre la densité optique à 620 nm (DO_{620}) et la concentration X d'une suspension bactérienne dans un milieu déterminé, de connaître la concentration en bactéries par ml d'une suspension bactérienne par mesure de sa densité optique à 620 nm. L'équation établie est du type :

$$DO_{620} = a + b \cdot X \text{ (bactéries/ml)}$$

$$\text{soit } X = (DO_{620} \text{ lue} - a)/b$$

$$Y = 0,0176 X + 0,0031 \text{ (} r = 0,9996 \text{ pour 7 dilutions)}$$

Y = unités en D.O. à 620 nm

X = nombre de bactéries/ml/dilution.

3.3. TECHNIQUE DE SEPARATION DES ENVELOPPES CELLULAIRES

a) Isolement des membranes externes

Les membranes externes ont été préparées selon la méthode légèrement modifiée de FORSBERG *et al.* (1970b). Les bactéries ont été centrifugées à 16 000 g pendant 30 min à 4°C, les surnageants étaient alors éliminés. Les cellules ont été lavées trois fois dans un même volume de solution saline stérile afin d'éliminer un maximum de matériel organique ou de molécules du milieu par centrifugation à 16 000 g pendant 30 min à 4°C.

Les cellules entières ainsi lavées étaient mises en suspension dans une solution de sacrose 0,5M dans la moitié du volume initial, pour l'extraction des membranes externes. Cette suspension a été incubée à 25°C pendant 30 min sous agitation et centrifugée à 35 000 g pendant 20 min. La procédure était répétée 4 fois. Les culots contenant les muréinoplastes (cellules sans membrane externe) ont été remis en suspension dans 70 ml de solution saline stérile et stockés par congélation à -25°C. Les 5 surnageants obtenus préalablement sont centrifugés à 73 000 g pendant 2 heures à 4°C, les microculots de cette centrifugation contiennent les membranes externes. Ils sont alors dilués pour avoir un volume final de 10 ml dans une solution saline stérile (NaCl 0,85% pH = 7,2). Cette fraction est conservée à -25°C.

b) Préparation du peptidoglycane

Le peptidoglycane a été isolé en utilisant la méthode modifiée de YAMATO *et al.* (1975). 30 ml de la suspension de muréinoplastes ont été dilués pour obtenir un volume final de 100 ml dans un tampon tris-HCl, pH = 8,0. Une quantité de S.D.S. (Sodium dodecyl sulfate ; Serva 20760) a été ajoutée à la suspension contenant les muréinoplastes pour avoir une con-

centration finale de 20 mg/ml. Ce mélange a été incubé pendant une heure à 25°C avec agitation de façon à solubiliser la membrane cytoplasmique. Après incubation, la suspension a été centrifugée à 24 000 g pendant 30 min à 4°C. Les culots ont été remis en suspension dans 100 ml de solution saline stérile, placés dans la glace, et soniqués (avec un sonicateur PONS type 20-200S) pendant 5 min avec des interruptions toutes les 20 secondes. Puis 25 mg de déoxyribonucléase et de ribonucléase ont été ajoutés à la suspension, laquelle est ensuite incubée à 25°C pendant 15 min, après quoi elle est centrifugée à 78 000 g pendant 40 min à 18°C afin d'obtenir dans les culots la fraction qui contient le peptidoglycane. Cette fraction est diluée dans 10 ml de solution saline stérile et congelée à -25°C.

c) Préparation des membranes cytoplasmiques

Les membranes cytoplasmiques ont été préparées à partir d'un aliquote de la suspension de muréinoplastes selon la méthode proposée par MARTIN et Mac LEOD (1971). 30 ml de la suspension de muréinoplastes dans 0,5M sucrose ont été dilués 10 fois dans un tampon tris-HCl pH = 8,0 plus 0,05M Mg SO₄ de façon à obtenir 300 ml de suspension à une concentration 0,05M de sucrose. La suspension de muréinoplastes est alors incubée à 25°C pendant 30 min permettant ainsi la stabilisation de la membrane cytoplasmique avec Mg²⁺ (BADDILEY *et al.*, 1973 ; COSTERTON *et al.*, 1967 ; MARTIN et Mc LEOD, 1971).

La suspension ainsi stabilisée est ensuite laissée à 30°C pendant 1 heure (de plus) avec agitation après avoir ajouté 1 mg/l de lysozyme (SIGMA L-7001). La formation des protoplastes par digestion du peptidoglycane était contrôlée au microscope à contraste de phase comme l'avaient suggéré THOMPSON *et al.* (1970). (Les cellules perdant leur forme bacillaire pour devenir rondes).

La suspension de protoplastes a été centrifugée à 11 000 g pendant 20 min à 4°C. Les culots ont été mis en suspension dans 150 ml de tampon tris-HCl pH = 8,0 et de nouveau centrifugés à 11 000 g pendant 20 min à 4°C. Les culots contenant les protoplastes lavés ont été remis en suspension dans 300 ml d'eau distillée à 4°C et placés dans un bain de glace avec agitation pendant 30 min pour briser les protoplastes. Alors 25 mg de déoxyribose (SIGMA chemical Co., pancreas de boeuf, 525 Kunitz units/mg protéine) et 25 mg de déoxyribonucléase (SIGMA chemical Co., pancreas de boeuf, 525 Kunitz units/mg protéine) ont été ajoutés afin d'éliminer les acides nucléiques. L'ensemble a été incubé avec agitation pendant 15 min à 25°C. Finalement, la suspension a été centrifugée à 73 000 g pendant 1 heure à 4°C afin d'obtenir des microculots contenant les membranes cytoplasmiques, lesquelles ont été diluées dans 10 ml de solution physiologique 0,85% stérile, et stockées à -25°C.

3.4. MESURE DES POIDS SECS

La détermination du poids sec a été réalisée sur des suspensions bactériennes, des structures cellulaires comme les enveloppes et aussi sur des boues activées. Deux méthodes ont été employées (a) gravimétrie après lyophilisation et (b) gravimétrie après filtration et séchage.

a) Après lyophilisation : le poids sec des cellules entières, muréinoplastes et des enveloppes (membrane externe, peptidoglycane et membrane cytoplasmique) de *Pseudomonas fluorescens* a été mesuré après lyophilisation dans des ampoules en verre bien lavées et séchées. Un millilitre de chaque fraction est introduit dans chaque ampoule, laquelle avait été préalablement pesée. Après lyophilisation (à l'aide d'un lyophilisateur CD 52 Herosicc), les ampoules sont à nouveau pesées. Les résultats sont obtenus par différence entre les poids secs (toutes les mesures sont faites en triplicat) et ramenés à l'échantillon initial de chaque structure. Un témoin NaCl est fait en pesant l'ampoule plus 1 ml d'eau physiologique 0,85% NaCl.

b) Après filtration et séchage : cette technique est utilisée dans le cas de suspensions bactériennes et des boues activées, d'après la norme AFNOR T90.105. Un filtre Millipore 0,45 µm, préalablement séché 1 heure à 105°C et pesé, est déposé sur un support en verre fixé sur une fiole à vide. La pompe à vide étant mise en fonctionnement, 2 ml de suspension bactérienne homogénéisée sont placés sur le filtre. Après 2 à 3 minutes, le filtre est mis à sécher à l'étuve à 105°C pendant 3 heures puis pesé. La différence de poids du filtre correspondant au poids sec des 2 ml de suspension bactérienne a été finalement exprimée en mg/l.

Dans le cas des boues de décanteur secondaire, de digesteur et de filtre-presse, le prélèvement par pipette et la filtration sont ici inadaptés. La technique consiste alors à placer, sur un filtre Millipore 0,45 µm préséché à 105°C pendant 1 heure et pesé, une quantité d'environ 2 g d'échantillon puis à placer le filtre à l'étuve à 105°C jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La différence de poids indique le poids sec de la biomasse rapportée au poids frais.

3.5. DOSAGE DES MARQUEURS DES ENVELOPPES

Le choix des marqueurs a été fait de manière à évaluer la pureté et le degré de contamination d'une fraction par une autre, mais aussi par leur caractère de spécificité vis-à-vis de chaque fraction.

Le 2-céto-3-déoxyoctanate (K.D.O.) a été choisi comme marqueur spécifique de la membrane externe (OSBORN *et al.*, 1972 ; THORNE *et al.*, 1973) ; la succinate déshydrogénase (S.D.H.) pour la membrane cytoplasmique (KASAHARA et ANRAKU, 1974) ; les hexosamines ont été dosées pour identifier la fraction peptidoglycane (COSTERTON *et al.*, 1967). Les dosages des protéines et du phosphore ont été aussi effectués.

a) Dosage du 2-céto-3-déoxyoctanate

La quantité du 2-céto-3-déoxyoctanate (K.D.O.) présente chez *Pseudomonas fluorescens* (cellules entières, muréinoplastes et les enveloppes cellulaires) a été estimée à partir de la méthode proposée par AMINOFF (1961) après minéralisation des échantillons. Le principe du dosage repose sur la réaction entre le K.D.O. et l'acide thiobarbiturique en milieu acide (périodique plus sulfurique) qui conduit à la formation d'un complexe coloré rose susceptible après une extraction au butanol d'un dosage colorimétrique à 549 nm.

Les échantillons à analyser (1 ml) sont traités avec 5 ml d'acide trichloroacétique à 10% (OSBORN *et al.*, 1972) à la température de la glace fondante. Le précipité formé est récupéré par centrifugation à 14 000 g à 4°C pendant 10 min. Le culot est repris avec 0,7 ml H₂SO₄ 0,018 N et la solution obtenue est minéralisée par chauffage des tubes fermés à 100°C pendant 20 min à l'étuve.

Le dosage du K.D.O. est conduit sur 500 µl de minéralisat auxquels sont ajoutés 250 µl d'acide périodique 25 mM à pH : 1,2 (préparé dans une solution d'acide sulfurique 0,125 N). Après mélange et incubation à 37°C pendant 30 min, 200 µl d'arsénite de sodium 2% dans l'acide chlorhydrique 0,5 N sont ajoutés puis incubés à 37°C. Après cette période sont additionnés 2 ml d'acide thiobarbiturique 0,1 M à pH : 9,0. La coloration rose attendue se développe pendant 7,5 min dans l'eau bouillante. Au terme de ce temps de réaction, les tubes sont refroidis à température ambiante puis 5 ml d'un mélange acide-butanol (95 ml de butanol + 5 ml HCl 12 N) sont alors ajoutés. Après agitation sur vortex et repos de quelques minutes, la phase organique supérieure est prélevée et lue à 549 nm contre un blanc butanol-acide.

La D.O. lue est traduite en µmoles de K.D.O. en utilisant une courbe étalon préalablement réalisée dans les mêmes conditions, avec une solution standard de K.D.O. (de 0 à 50 µmoles par ml). L'équation de cette droite étalon est :

$$Y = 0,00734 X - 0,0048$$

$$(r = 0,9936 \text{ pour } 5 \text{ concentrations})$$

où

$Y = \text{unités D.O. à } 549 \text{ nm}$

$X = \mu\text{moles de K.D.O. / ml d'échantillon.}$

Des essais spécifiques pour tester la conservation de la solution standard au cours du stockage (non rapportés ici) ont été réalisés, montrant une variation de l'ordre de 11% par rapport à la droite précédente. Aussi pour cette raison, il était impératif de répéter la gamme étalon à chaque dosage.

b) Dosage de la succinate déshydrogénase

L'activité de la succinate déshydrogénase a été mesurée sur les cellules et les extraits d'enveloppes de *P. fluorescens* selon une méthode proposée par NACHALS et al. (1960), et adaptée par KASAHARA et ANRAKU (1974).

Le dosage de cette enzyme présente dans la membrane cytoplasmique des bactéries est effectué par la mesure de la dégradation de la couleur du 2,6-dichlorophénolindophénol (MERCK 3028) et de la phénazine méthosulfate (SIGMA P9625) (DC PIP et PMS respectivement) réduits par l'enzyme activée et susceptibles d'être détectés par la décroissance de la D.O. à 600 nm à 25°C pendant une minute de réaction.

Dans une cuve pour spectrophotométrie, 500 μl de tris-HCl 300 mM à pH = 8,0, 500 μl de KCN 24 mM et 500 μl de succinate de sodium à 240 mM sont ajoutés, mélangés et laissés pendant 5 min à 25°C. Après cette période de préincubation, 500 μl de la fraction contenant l'enzyme sont ajoutés, l'ensemble est alors laissé pendant 1 min à 25°C. 500 μl de la solution DCPIP 0,24 mM et P.M.S. 1,2 mM sont ensuite ajoutés dans l'ordre et laissés au repos 4 min supplémentaires. Le programme du spectrophotomètre (KONTRON-UVIKON 812) est alors déclenché, de façon à réaliser 5 lectures à 12 secondes d'intervalle pendant 1 min à 25°C et à une longueur d'onde de 600 nm.

La Δ D.O. entre la première et la dernière lecture est établie et les résultats sont rapportés à la quantité de protéines contenues dans chaque fraction, préalablement dosées.

Δ D.O. = $\epsilon L \Delta$ concentration en S.D.H.

Δ concentration en S.D.H. = Δ D.O./ ϵL x mg protéines⁻¹

ϵ = coefficient d'extinction ($2,2 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$)

L = longueur du trajet optique dans la cuve (cm^2).

Des essais supplémentaires ont été effectués sur des fractions et cellules bactériennes après 15 jours de congélation et traitées au sonicateur, pour évaluer un possible effet de ces traitements. Aucune modification importante de l'activité de l'enzyme n'a été remarquée (au maximum, de l'ordre de 3%) par rapport aux dosages effectués avec des fractions non congelées ni soumises aux ultrasons.

c) Dosage des hexosamines

Les hexosamines présentes dans les fractions à analyser ont été dosées par la méthode d'ELSON-MORGAN, modifiée par MONTREUIL et SPIK (1963), après minéralisation des échantillons.

La détermination quantitative des hexosamines est basée sur le dosage à 520 nm d'une molécule colorée produite par réaction entre le p-diméthylaminobenzaldéhyde et un dérivé pyrrolique obtenu par contact de la fraction à analyser avec l'acétone en milieu alcalin.

Les échantillons ont été minéralisés en ajoutant 1 ml d'acide chlorhydrique HCl (12 N) à 1 ml d'échantillon à 100°C pendant 3 heures. La réaction est stoppée, après refroidissement et centrifugation des échantillons à 2 500 g pendant 15 min par neutralisation d'un millilitre de surnageant avec 2 ml de NaOH 6 N. La gamme étalon a été préparée à partir de D-glucosamine (MERCK 4113).

Dans des tubes de 50 ml, préalablement traités à l'acide chlorhydrique 1% et lavés à l'eau déminéralisée et distillée, ont été successivement ajoutés 2 ml d'échantillon à doser et à minéraliser, 1 ml d'une solution d'acétyl-acétone (acétylacétone 14% (MERCK 9600) vol/vol, carbonate de sodium anhydre (MERCK 6392) 1,25 N) et 1 ml d'eau distillée. Les tubes ont été bouchés et agités au vortex pendant 15 sec, et placés pendant 10 min dans un bain-marie bouillant. Après refroidissement dans la glace, 5 ml d'alcool 96% ont été ajoutés. Les tubes sont agités pendant 15 sec et placés dans un bain-marie à 75°C pendant 5 min. Un millilitre de réactif d'Ehrlich (p. diméthylaminobenzaldéhyde, MERCK 3058, 5,32%) pds/vol dans l'acide chlorhydrique pur concentré) est ajouté dans chaque tube très lentement. Les tubes sont maintenus pendant 15 min à 75°C (pour les tubes qui vont servir de blanc, le réactif d'Ehrlich a été substitué par 1 ml d'acide HCL 12 N). Après refroidissement, 5 ml d'alcool à 96% sont ajoutés. Les tubes ont été agités pendant 30 sec et placés pendant 30 min à l'obscurité. La coloration rose qui se développe est lue à 520 nm.

Bien que la méthode soit assez reproductible, la précision varie de 2% à 9%. Il est souhaitable de faire une nouvelle gamme étalon avec des réactifs neufs pour chaque dosage. Les

hexosamines ainsi dosées sont exprimées en $\mu\text{g/ml}$; la droite de la gamme étalon est faite à partir de l'équation :

$$Y = 0,0249 X + 0,1751$$

($r = 0,9962$ pour 5 concentrations)

où

$$Y = \text{unités en D.O. à } 520 \text{ nm}$$

$$X = \mu\text{g d'hexosamines / ml d'échantillon.}$$

d) Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été conduit sur les cellules entières, muréinoplastes et les trois fractions contenant respectivement la membrane externe, le peptidoglycane, et la membrane cytoplasmique de *P. fluorescens*. La méthode colorimétrique utilisée est celle de BRADFORD (1976) qui fait intervenir un colorant (le bleu de coomassie) capable de se lier aux protéines et de former un complexe coloré bleu par interaction des groupements anioniques du colorant avec les groupes aminés des protéines. Cette coloration est stable pendant une heure et susceptible d'être lue à 595 nm.

Les échantillons subissent une extraction dans un solvant organique (dichlorométhane 1/5), pour permettre le dosage de toutes les protéines et éviter les réactions hydrophobes des fractions placées dans un milieu aqueux.

Dans des tubes bien nettoyés dans l'acide HCl 1% et dans l'eau déminéralisée distillée, 100 μl de chaque échantillon sont introduits et 900 μl de réactif de BRADFORD (bleu de coomassie 6-250 dans l'éthanol à 96% et dans l'acide orthophosphorique ; l'ensemble est dilué dans l'eau distillée à 4°C et filtré avant la manipulation). Les tubes sont ensuite agités au vortex pendant 30 sec, et lus à 595 nm.

La gamme étalon a été faite avec des protéines (Bovine Sérum albumine dans une solution de NaCl 0,15 M). Tous les dosages ont été effectués en triplicat pour les échantillons à analyser comme pour la gamme. Dans l'ensemble, la variation d'une gamme à l'autre est inférieure à 7%, l'équation de la droite de la gamme étalon est la suivante :

$$Y = 0,00443 X - 0,0143$$

$$r = 0,9984 \text{ pour } 10 \text{ concentrations}$$

où

Y = D.O. à 595 nm

X = [] de protéines en µg/ml.

e) Dosage du phosphore

Le phosphore a été dosé sur les échantillons par la méthode colorimétrique de DUCK-CHONG (1979). Tout d'abord le phosphore est transformé en phosphore inorganique par chauffage et extraction des lipides en présence de nitrate de magnésium. Le phosphore forme alors un complexe coloré bleu avec le phosphomolybdate susceptible d'être lu à une D.O. de 820 nm.

Dans des tubes nettoyés à l'acide chlorhydrique 1%, 100 µl d'échantillon sont introduits et 30 µl de Mg(NO₃)₂ · 6 H₂O (à 10% dans l'éthanol 96%). L'ensemble est chauffé directement à la flamme d'un bec Bunsen jusqu'à évaporation. 300 µl d'H₂SO₄ (6 N) sont alors ajoutés et les tubes sont placés dans un bain-marie bouillant pendant 15 min (en cas de précipitation une extraction organique est nécessaire avec du dichlorométhane). Après refroidissement, 700 µl du mélange colorant (heptamolybdate d'ammonium 2,5% 1 volume, de l'eau distillée 2 volumes, 1 volume d'acide sulfurique 6 N et 1 volume d'acide ascorbique 10%) sont ajoutés ; les tubes sont à nouveau placés dans un bain-marie à 45°C pendant 20 min ; l'apparition d'une coloration bleue est observée, susceptible d'être lue à 820 nm contre un blanc eau distillée plus mélange colorant.

La gamme étalon est réalisée avec Na₂HPO₄ · 2H₂O à différentes concentrations jusqu'à 2 µg/ml plus mélange colorant. La méthode est assez reproductible (C.V. entre 2% - 5%). Il est souhaitable de préparer les réactifs à chaque manipulation et les maintenir à 4°C ; l'équation de la droite de la gamme étalon est :

$$Y = 0,4626 X - 0,0031$$

$$r = 0,9997 \text{ pour 6 concentrations}$$

où

Y = D.O. à 820 nm

X = µg de phosphore / ml.

f) Dosage du DNA et RNA

Le dosage du DNA et RNA a été effectué sur les fractions contenant les enveloppes cellulaires pour évaluer les probables contaminations, selon la méthode proposée par SCHNEIDER (1975).

La détermination des acides nucléiques se fait par une réaction entre les pentoses des acides nucléiques et la diphenylamine en milieu acide (acide acétique plus sulfurique) donnant une molécule colorée bleue lue à 600 nm. Les gammes étalon sont faites en utilisant le DNA et RNA (SIGMA) purs à différentes concentrations.

Un millilitre d'échantillon est mis en présence de 2 ml de réactif diphenylamine (1 gr de diphenylamine plus 100 ml d'acide acétique et 2,75 ml d' H_2SO_4) et placé pendant 10 min dans un bain-marie bouillant et lus à 600 nm.

3.6. BLOCAGE DES GROUPEMENTS CARBOXYLIQUES

Les groupements carboxyliques étant souvent reconnus comme capables de fixer des métaux (BEVERIDGE et MURRAY, 1980), il est apparu important de vérifier cette observation pour les enveloppes bactériennes.

a) Réalisation de la réaction de blocage

Les groupements carboxyliques des enveloppes bactériennes de *P. fluorescens* ont été bloqués par un ensemble de réactions chimiques ayant pour but de masquer ces groupements libres. La technique retenue est celle de DOYLE *et al.* (1980) et met en jeu deux réactifs de blocage. La réaction théorique de blocage des carboxyles est résumée sur la figure 24.

Les fractions préalablement obtenues par la méthode de fractionnement et stockées par congélation à $-25^{\circ}C$, contenant les enveloppes de *P. fluorescens* (M. ext, Pep, M. cyt) ont été rapidement décongelées dans un bain-marie à $37^{\circ}C$ et diluées dans l'eau suprapure afin d'obtenir une concentration finale de 2 mg poids sec/ml. De l'éthylènediamine 0,5 M et du 1 éthyl-3,3'- (3' diméthylaminopropyl)-carbodiimide 0,2 M sont alors ajoutés à la suspension, le mélange est agité et le pH ajusté à 4,8 (le pH est contrôlé et ajusté à l'aide de l'acide chlorhydrique). L'erlen contenant la suspension et les réactifs de blocage est continuellement maintenu sous agitation pendant 6 heures à $22^{\circ}C$.

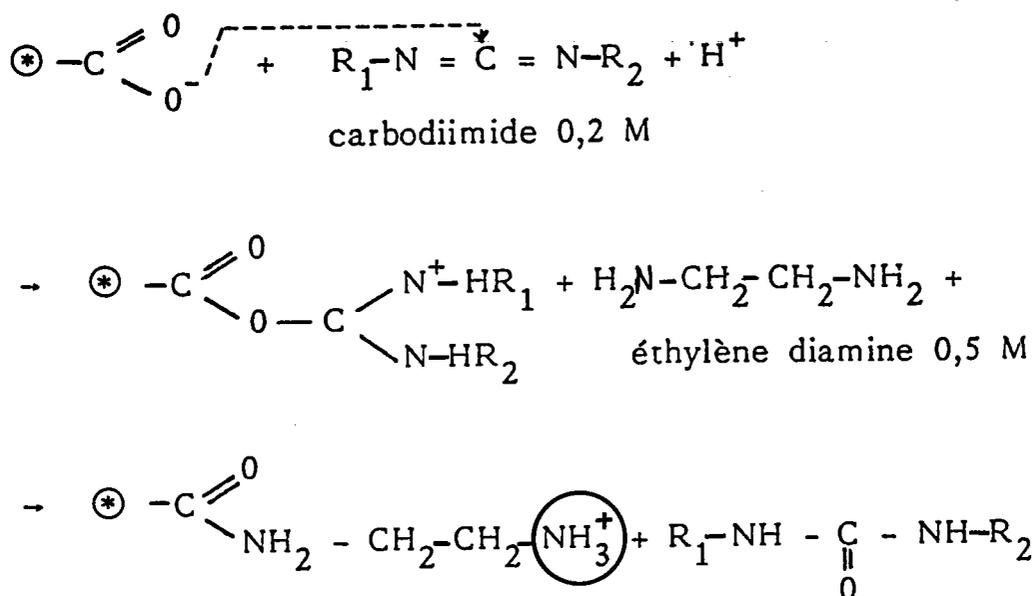


Figure 24: Schéma général de la réaction de blocage des groupements carboxyliques (d'après DOYLE et al., 1980).

Une heure après stabilisation du pH, les fractions sont lavées deux fois dans l'eau suprapure et récupérées par centrifugation à 73 000 g pendant une heure à 4°C. Les culots sont remis en suspension dans le volume initial d'eau suprapure, les suspensions sont alors introduites dans des tubes à dialyse (P.M. 6000) et dialysées contre 10 litres d'eau doublement distillée et déminéralisée pendant 24 heures à 4°C (cette opération est répétée deux fois) pour éliminer l'excédent des réactifs de blocage encore présents.

b) Contrôle de la réaction de blocage

Pour estimer la modification des groupements carboxyliques (COO⁻) en NH₃⁺ par la réaction de masquage décrite précédemment, aucune méthode capable de doser la présence ou la disparition de ces groupements (COO⁻) n'a été mise au point. Quelques méthodes sont pratiquées à l'heure actuelle pour doser des aminoacides spécifiques, mais aucune n'indique la présence de l'ensemble des groupements (COO⁻) dans une enveloppe bactérienne. Pour résoudre ce problème, nous avons dosé les groupements NH₃⁺ par la méthode colorimétrique à la ninhydrine proposée par MOORE et STEIN (1948) et ainsi estimé indirectement le succès de la réaction de blocage des COO⁻. Cette méthode est basée sur la capacité de la ninhydrine à

former un complexe coloré violacé avec les molécules contenant les groupements NH_3^+ dans un milieu acide (acide périodique), susceptible d'être dosé en spectrophotométrie à 570 nm. La gamme est faite par dilution de la glycine dans l'eau ; l'équation de la droite est :

$$Y = 115,2 X + 0,00098$$

($r = 0,991$ pour 5 concentrations)

Y = unités de D.O. 570 nm
X = mg de N aminé / ml.

1 ml de chaque échantillon est mis en contact avec 500 μl du réactif à la ninhydrine (préparée à partir de l'indontrione en présence du fructose et tamponnée avec $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4$ dans l'eau). L'ensemble est laissé pendant 16 minutes dans un bain-marie bouillant, après quoi les tubes sont laissés à refroidir à température ambiante pendant 20 min. Alors 2,5 ml de solution de dilution sont ajoutés à tous les tubes (acide périodique plus éthanol) ; après mélange au vortex, les tubes sont lus à 570 nm contre un blanc qui contient 1 ml d'eau distillée plus 500 μl de réactif à la ninhydrine plus 2,5 ml de solution de dilution.

3.7. TECHNIQUE DE DIALYSE

La technique de dialyse a été utilisée pour mesurer la quantité de métal accumulé par les enveloppes de *P. fluorescens*. Les essais sont conduits en réalisant le montage schématisé sur la figure 25.

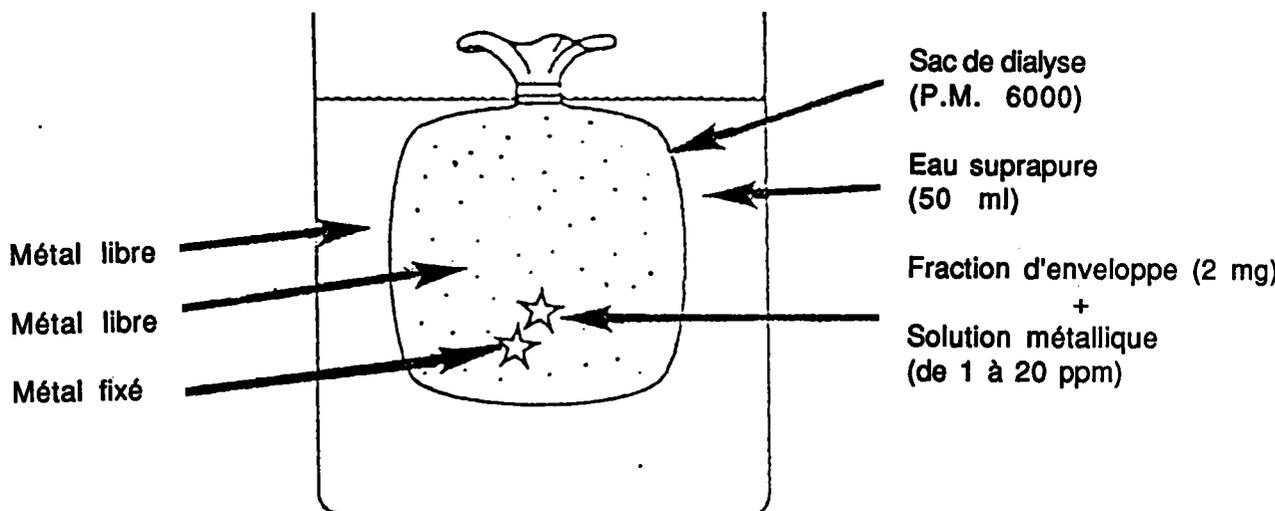


Figure 25 : Schéma du montage pour l'étude de l'accumulation des métaux sur les enveloppes cellulaires.

Dans 18 flacons en verre préalablement lavés et traités dans une solution chlorhydrique à 10% et munis d'un bouchon, 50 ml d'eau suprapure sont introduits. Les 18 flacons sont divisés en 6 lots de 3. Les trois flacons de chaque lot reçoivent un sac à dialyse SPECTRA POR (PM 6000) contenant 1 ml de fraction d'environ 2 mg/ml plus un millilitre d'une solution de métal contenant soit :

$^{109-112}\text{Cd}^{2+}$. Le cadmium marqué $^{109}\text{Cd}^{2+}$ NEZ 0,58 est fourni par NEN et sa radioactivité spécifique est de 5 ci/g dans HCl 0,5 M (solution initiale de 100 $\mu\text{ci/mL}$). Le ^{112}Cd froid utilisé est $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ fourni par MERCK. Les concentrations finales sont atteintes après l'addition d'une quantité fixe de $^{109}\text{Cd}^{2+}$ et des quantités croissantes de $^{112}\text{Cd}^{2+}$.

$^{58-63}\text{Ni}^{2+}$. Le nickel radioactif $^{63}\text{Ni}^{2+}$ NEZ 0,57 est fourni par NEN et sa radioactivité spécifique est de 12 ci/g dans HCl 0,5 M. Le $^{58}\text{Ni}^{2+}$ froid utilisé est $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ fourni par MERCK. Les concentrations finales sont atteintes après l'addition d'une quantité fixe de $^{63}\text{Ni}^{2+}$ et des quantités croissantes de $^{58}\text{Ni}^{2+}$.

$^{63}\text{Cu}^{2+}$. Pour les essais avec le cuivre, seulement du métal froid a été utilisé. $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ fourni par MERCK.

$^{65}\text{Zn}^{2+}$. Dans ce cas aussi, seul le zinc froid a été utilisé (ZnCl_2 , MERCK).

Les concentrations finales de chaque métal à l'intérieur des sachets sont : 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ppm pour respectivement les lots 1, 2, 3, 4, 5. Les trois flacons du lot numéro 6 servant de témoins, reçoivent respectivement un sac à dialyse contenant 1 ml d'une solution de métal à 1 ppm et 1 ml d'eau suprapure, pour évaluer l'éventuelle fixation de métal sur les sacs à dialyse.

Les flacons sont alors placés pendant 48 heures à 4°C sous agitation, à la suite de quoi des prélèvements de 1 ml sont effectués à l'extérieur du sac à dialyse. Les aliquotes sont placées dans des fioles de comptage, dans le cas du Cd^{2+} et du Ni^{2+} pour mesurer la radioactivité. Dans le cas du Cu^{2+} et du Zn^{2+} la quantité de métal libre à l'extérieur du sachet est mesurée en spectrophotométrie d'absorption atomique.

Le métal libre mesuré à l'extérieur du sac à dialyse après l'équilibre sert à calculer la quantité de métal accumulé par différence entre la quantité de métal introduit initialement dans les sachets et celui dosé à l'extérieur dans la phase liquide. Les résultats sont exprimés sous forme de représentations de Scatchard. Les essais ont été conduits sur des fractions de *P. fluorescens* contenant la membrane externe, le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique, modifiées ou non.

3.8. SOLUTIONS METALLIQUES TESTEES

Une solution mère de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ et une autre de ZnCl_2 ont été préparées dans l'eau suprapure (MERCK) $\text{pH} = 6,0$ et diluées dans cette eau de façon à obtenir des concentrations finales de 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ppm de chaque métal, pour être ensuite utilisées dans le protocole d'étude de la fixation des métaux sur les enveloppes bactériennes.

Dans le cas d'accumulation des métaux par une suspension bactérienne de *P. fluorescens* dans l'eau distillée stérile, les concentrations des métaux (Cu^{2+} , Cd^{2+} et Zn^{2+}) ont été préparées à partir d'une solution mère équimolaire 1,007 millimoles/l par dilution de 171,67 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 202,73 mg de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et 137,23 mg de ZnCl_2 (MERCK, pour analyse) dans un litre d'eau distillée, $\text{pH} = 6,5 \pm 0,1$.

Par dilution dans l'eau distillée stérile de cette solution mère, 6 solutions ont été préparées et utilisées pour contaminer les suspensions bactériennes afin de suivre l'accumulation de ces métaux ajoutés en concentrations croissantes.

Pour le cas de bouillon nutritif contaminé à 100,7 $\mu\text{moles/l}$, les sels étaient directement pesés et dissous dans le milieu nutritif avant stérilisation (137,34 mg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 162,18 mg de $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ et 109,78 mg de ZnCl_2 pour 8 litres), $\text{pH} = 7,4 \pm 0,1$.

3.9. DOSAGE DES METAUX

Les métaux ont été dosés par deux méthodes selon les expérimentations

- a. en radioactivité
- b. par spectrophotométrie d'adsorption atomique en flamme.

a) Le cadmium (^{109}Cd) et le nickel (^{63}Ni) non accumulés par les enveloppes de *P. fluorescens* ont été dosés dans la phase aqueuse après l'équilibre de dialyse (enveloppe plus métal). Un millilitre de chaque prélèvement est placé dans une fiole de comptage avec 15 ml de solution organique (BECKMAN HP/b ready solv). La radioactivité a été comptée dans un compteur à scintillation liquide (LKB 1211 MINIBETA). Chaque fiole a été comptée trois fois successivement pendant 10 min, en utilisant la fenêtre du tritium réduite (entre 18-30). La correspondance entre ci et cpm a été établie de façon à exprimer les résultats en μmoles de métal, en connaissant la concentration du métal radioactif initiale et la mesure du total de cpm de cette concentration en métal.

b) Le cuivre et le zinc non accumulés par les enveloppes cellulaires ont été aussi dosés dans la phase aqueuse après équilibre, en spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme (PERKIN ELMER 2380). Le cuivre (Cu^{2+}) est dosé à 324,7 nm et le zinc (Zn^{2+}) à 213,9 nm. Le Cd^{2+} est aussi dosé par cette méthode, dans le cas d'accumulation des métaux par les suspensions bactériennes de *P. fluorescens* avec une longueur d'onde de 228,8 nm.

3.10. MINERALISATION DE LA BIOMASSE ET SOLUBILISATION DES METAUX

Lorsque des mesures de taux d'accumulation ou de taux résiduels en métaux sur des biomasses ou des boues ont été nécessaires, une solubilisation des métaux était indispensable avant dosage. Elle a été réalisée par minéralisation de ces biomasses. Cette technique consiste à placer au plus 2 g de biomasse sèche dans une solution acide (H_2O , 25 ml ; HNO_3 62% (MERCK suprapur), 20 ml ; $HClO_4$ 70% (MERCK suprapur) 10 ml) à l'intérieur de longs tubes à minéraliser (PYREX \approx 30 cm x 4-5 cm diam) fermés par une cloche à condensation et placés sur une plaque chauffante à 180°C pendant 4 heures puis 300°C pendant 5 heures. Chaque minéralisat refroidi est placé en fiole jaugée, le volume est ajusté à 100 ml par l'eau distillée utilisée en partie pour le rinçage du tube, puis filtré pour éliminer les particules en suspension dont la silice. Les métaux sont alors dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique.

3.11. SOLUTIONS DU COMPLEXANT (N.T.A.)

Le choix de la concentration en complexant s'est porté sur une valeur permettant a priori une très bonne extraction avec un excès de complexant soit 10^{-3} moles par litre. Cette quantité correspond à 191,14 mg de N.T.A. par litre, le complexant utilisé est sous forme de cristaux solides et acides (LH_3 pour NTA) (produit MERCK pour analyse).

Les solutions aqueuses dont le pH naturel est acide $pH = 2,49$ pour le N.T.A. 10^{-3} M ont été ajustées à une même valeur de $6,5 \pm 0,2$ par ajout de soude normale. Les solutions de N.T.A. 0,5 et $0,25 \times 10^{-3}$ M ont été réalisées par dilution de la solution mère 10^{-3} M.

3.12. PREPARATION DU MATERIEL

Dans toutes les expérimentations, tout le matériel ayant contenu des métaux a été lavé dans un bain d'acide chlorhydrique technique à 5% et rincé plusieurs fois à l'eau déminéralisée et après à l'eau distillée de manière à désorber les métaux éventuellement fixés.

La vaisselle utilisée avec des métaux radioactifs est préalablement plongée dans un liquide décontaminant puis soumise au traitement par acide chlorhydrique.

4. ETUDE EXPERIMENTALE

4.1. FRACTIONNEMENT DES ENVELOPPES CELLULAIRES DE *P. FLUORESCENS*

4.1.1. Objectif

Les structures des enveloppes des bactéries gram négatives et gram positives sont certes bien connues à l'heure actuelle. Les techniques d'isolement des structures des enveloppes cellulaires ont été utilisées pour analyser leurs caractéristiques générales et leur arrangement, les relations existant entre elles, et aussi pour étudier les mécanismes d'accumulation et de transport cellulaire. Toutefois, aucune des méthodes déjà publiées ne permet le fractionnement simultané des trois enveloppes à partir du même matériel biologique.

Dans cette étude nous avons mis au point un protocole général permettant d'obtenir à partir du même matériel biologique les trois enveloppes de *P. fluorescens* (M. ext, PG, M. C.). Ce travail a déjà fait l'objet d'une publication (Falla *et al.*, 1988). Par cette méthode les bactéries ne sont pas brisées dans les phases initiales du processus afin de limiter les contaminations par d'autres structures. L'identité et la pureté des fractions ainsi obtenues sont évaluées par l'utilisation de marqueurs type K.D.O., hexosamines, S.D.H., phosphore et protéines, permettant également d'apprécier la perte du matériel pendant les manipulations et d'évaluer le degré de contamination de chaque fraction.

4.1.2. Protocole

La technique de séparation résumée sur la figure 26 a été décrite précisément au paragraphe 3.3. Brièvement, la membrane externe et les muréinoplastes (bactéries sans la membrane externe) ont été obtenus en induisant un choc osmotique avec une solution de sucrose 0,5 M et par centrifugation. A partir des muréinoplastes, sont séparés d'une part le peptidoglycane après l'addition du S.D.S. (sodium dodecyl sulfate) et sonication, d'autre part la membrane cytoplasmique après action du lysozyme et choc osmotique avec de l'eau distillée stérile à 4°C. Les deux dernières enveloppes ont été traitées avec des enzymes DNase et RNase pour éliminer la plupart des molécules de poids moléculaire élevé.

4.1.3. Résultats et discussion

Les adaptations et les combinaisons des techniques antérieurement publiées ont permis d'élaborer un seul et unique protocole de fractionnement avec lequel il est possible d'obtenir

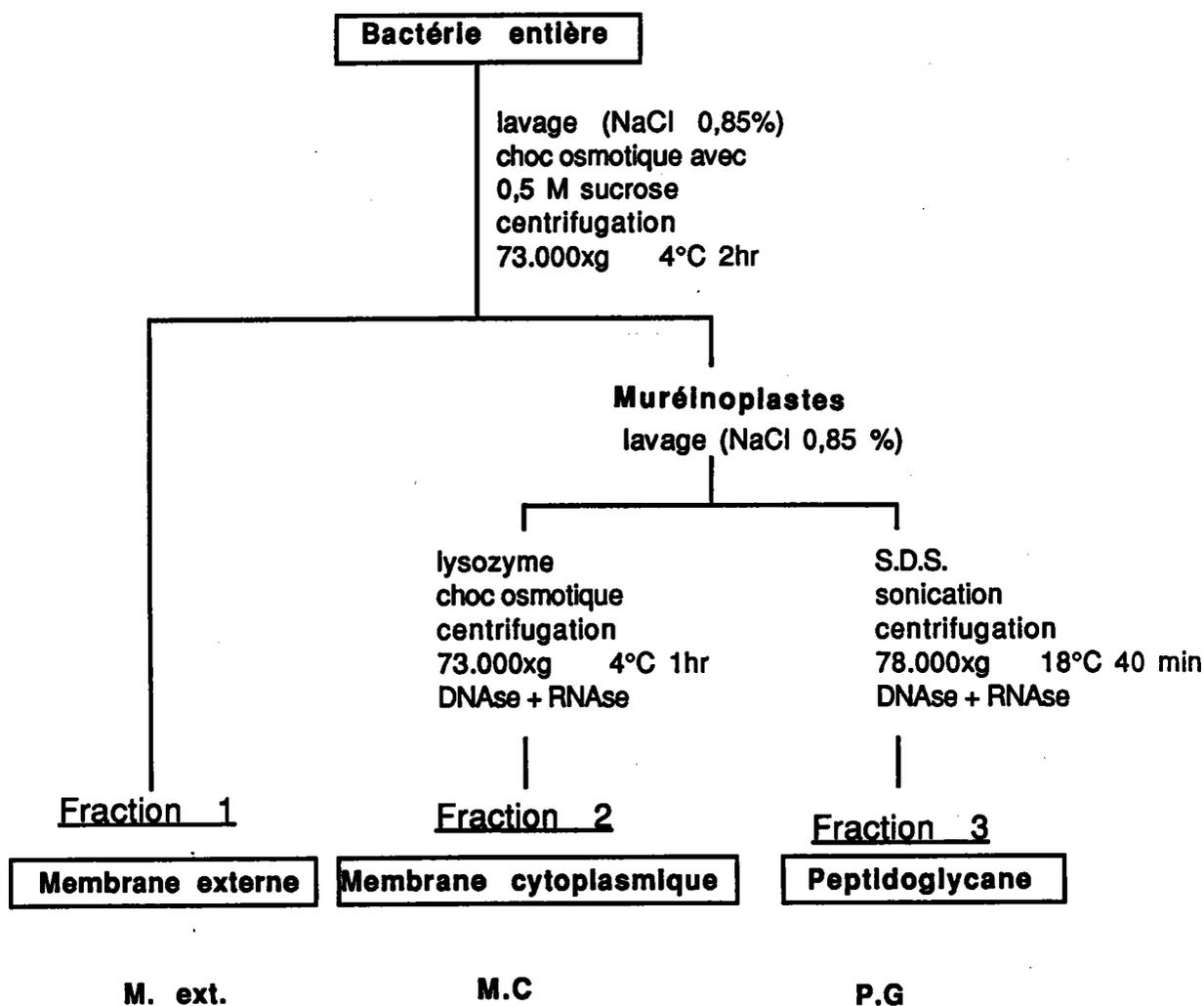


Figure 26 : Protocole de séparation des enveloppes de *Pseudomonas fluorescens* (d'après FALLA et al., 1988).

les trois enveloppes cellulaires (M. ext, PG, M.C.) à partir de la même suspension bactérienne. Par exemple la production du peptidoglycane a été conduite sans l'utilisation d'EDTA et en présence de DNase et RNase, permettant ainsi une future expérimentation avec des fractions libres de tout complexant capable d'interférer sur les essais d'accumulation et de polymères de poids moléculaire élevé. L'effet mécanique de la presse de FRENCH utilisée par MARTIN et Mac LEOD (1971) a été remplacé par un choc osmotique limitant ainsi les contaminations et permettant de garder la membrane cytoplasmique entière en respectant sa structure.

Au terme de ce protocole, il nous a été alors possible d'évaluer : la masse de chaque enveloppe, la contamination d'une structure par une autre et la perte du matériel pendant les manipulations. Le faible nombre de publications relatives à ce sujet nous a amené à confondre ici les chapitres Résultats et Discussion.

a) Masse des différentes structures

La masse des bactéries entières et lavées de *P. fluorescens*, des muréinoplastes et des enveloppes a été mesurée par gravimétrie après lyophilisation, la mesure a été effectuée en triplicat.

La membrane externe constitue 6,96% du total du poids sec des bactéries entières (Tableau 16). Ce résultat est comparable à ce qui a été obtenu par d'autres auteurs et, par exemple, la membrane externe d'*Alteromonas haloplanktis* constituait 7,9% du poids total de la bactérie (FORSBERG *et al.*, 1970a,b). Ainsi, à partir des calculs du tableau 16, la membrane externe représente un composant important de la paroi (56% du poids sec de la paroi). Ce résultat est tout à fait en accord avec l'observation de THORNE *et al.* (1973) sur *Acinetobacter sp.* (en effet la membrane externe dans ce cas représente 65% du poids sec de la paroi).

Dans nos essais, le peptidoglycane constitue 5,3% du total du poids sec de la bactérie lavée. Par contre FORSBERG *et al.* (1970a) trouvent que le peptidoglycane représente de 1,2 à 2% du poids total de la bactérie chez *A. haloplanktis*.

Enfin, en ce qui concerne la membrane cytoplasmique, elle correspond à 6,12% du poids total de *P. fluorescens*. Chez *A. haloplanktis*, MARTIN et Mac LEOD (1971) ont trouvé que la membrane cytoplasmique représentait de 10 à 20% du poids total de cette bactérie.

Il est évident que les comparaisons ne sont pas parfaitement justifiées car les mesures ont été faites sur des bactéries différentes et les fractions ont été obtenues par des protocoles sensiblement différents du nôtre. Toutefois, les similitudes dans les résultats laissent supposer que les mesures ont été obtenues dans des conditions expérimentales relativement proches.

Tableau 16 : Masse en (mg/ml fraction) et pourcentage des structures, calculés par gravimétrie après lyophilisation des fractions de Pseudomonas fluorescens (les valeurs sont données en moyenne des trois essais avec les écarts-types après soustraction de la masse des sels des échantillons).

Structure	Poids sec mg/ml de fraction	%
Bactéries entières	589 ± 5,2	100
Muréinoplastes	456 ± 12	77 ± 1
Membrane externe	41 ± 3,8	6,96 ± 0,02
Peptidoglycane	31 ± 5,6	5,3 ± 0,3
Membrane cytoplasmique	36 ± 1,6	6,12 ± 0,025

b) Estimation de la contamination

Les marqueurs ont été choisis pour évaluer la pureté et l'étendue de la contamination de chaque fraction cellulaire. Les marqueurs ont aussi été choisis d'après la littérature, d'une part pour pouvoir faire la comparaison entre les résultats obtenus dans notre étude et ceux donnés par d'autres auteurs, d'autre part pour leur spécificité, bien que quelquefois discutable, vis-à-vis des fractions qu'ils représentent. Le phosphore et les protéines ont aussi été mesurés comme marqueurs non spécifiques des fractions afin de donner une vision globale de la composition des fractions.

Ainsi, le K.D.O. a été utilisé comme marqueur spécifique de la membrane externe (OS-BORN et al., 1972 et THORNE et al., 1973), la S.D.H. de la membrane cytoplasmique (KA-SAHARA et ANRAKU, 1974), les hexosamines ont été dosées pour l'identification de la fraction contenant le peptidoglycane (COSTERTON et al., 1967). Les résultats bruts des dosages des marqueurs ont été regroupés en annexe (Tableaux A1-A5).

La concentration de ces marqueurs dans les cellules (bactéries entières et muréinoplastes) est présentée dans le tableau 17. Les concentrations d'hexosamines et la S.D.H. sont similaires dans ces types de cellules (cellules entières et muréinoplastes).

A partir de ces résultats, il est possible de calculer la diminution en protéines, phosphore et K.D.O. due à l'arrachage de la membrane externe. Elles sont respectivement de : 14, 48 et 66 %. La diminution dans le contenu des protéines peut être due à deux phénomènes, d'une part la disparition de la membrane externe, et d'autre part à la perte du matériel périplasmique. Malgré le traitement drastique effectué sur les cellules, une certaine quantité de K.D.O. est encore présente dans les muréinoplastes et représente alors un contaminant, présent dans les autres fractions.

Tableau 17 : Concentrations des marqueurs en mg de marqueur par mg de poids sec des bactéries entières et des muréinoplastes de P. fluorescens.

Cellule	Protéines	Phosphore	Hexosamines	K.D.O.	S.D.H. unités/mg de cellule
	(mg/mg de cellule)				
Bactéries entières	0,0542 ± 0,0004	0,27 E-3 ± 0,04E-3	2,8E-4 ± 1E-4	6,3E-4 ± 1,4E-4	6E-4 ± 3,5E-4
Muréinoplastes	0,0467 ± 0,0008	0,14E-3 ± 0,016E-3	2,3E-4 ± 0,68E-4	1,5E-4 ± 1E-4	7,1E-4 ± 6E-4

Les résultats du tableau 18 rassemblent les concentrations des différents marqueurs mesurés pour évaluer l'importance de la contamination des enveloppes et la pureté de chaque fraction.

Les hexosamines utilisées comme marqueur non spécifique du peptidoglycane ont été dosées dans toutes les fractions. Toutefois, dans le peptidoglycane la concentration trouvée est au moins 10 fois plus importante que dans les membranes (Tableau 19). Comme cela avait été montré dans le tableau 16, la membrane externe correspond à 50% du poids sec de la paroi ; par conséquent, il est possible de calculer que les hexosamines du peptidoglycane correspondent à 0,12% du poids sec de la paroi. Ce faible pourcentage comme celui de 7% trouvé par THORNE *et al.* (1973) peuvent être expliqués par le fort effet de la minéralisation qui peut détruire jusqu'à 10% des glucosamines et 13% d'acide muramique (FORSBERG *et al.*, 1972).

Le tableau 19 montre les résultats résumés des pourcentages de distribution de la contamination des structures, tenant compte uniquement des valeurs d'hexosamines et du K.D.O. Toutes les contaminations sont comprises entre 1 et 4% de la masse de chaque marqueur. Le contenu cytoplasmique peut aussi contaminer les fractions, qui ont été contrôlées au niveau de la présence de DNA et RNA. De ce point de vue, ces deux molécules n'ont pas été détectées dans les différentes fractions.

c) Perte de matériel cellulaire

Les quantités d'hexosamines et de K.D.O. dans les fractions obtenues par notre méthode, comparées aux valeurs trouvées chez les bactéries entières et dans les muréinoplastes, permettent d'évaluer la perte de matériel organique des fractions pendant le processus de fractionnement. Cette perte est très importante et semble pour l'heure techniquement inévitable. Ceci est lié aux pertes lors des centrifugations, aux lavages successifs, à la digestion enzymatique, au choc osmotique, etc... La membrane externe est sans doute la structure la plus sensible au traitement, qui se traduit par une perte de 84,7% de K.D.O. (Tableau 19). Cette observation est tout à fait en accord avec celle faite par DIEDRICH et COSTA-ROBLES (1974) qui calculent une perte de K.D.O. de 85,5% (dont 25,5% dès le premier lavage dans la solution de NaCl). Ces auteurs sont à notre connaissance les seuls à prendre en compte cet aspect "perte de molécules".

Une partie du peptidoglycane, qui est pourtant reconnu comme solide, est sans doute perdue pendant la préparation des muréinoplastes, la perte de 47,2% en hexosamines (Tableau 19) peut difficilement être imputée aux seules hexosamines de la membrane externe. Une observation similaire a été faite par RAYMAN et Mac LEOD (1975) qui montrent que les hexosamines présentes dans les muréinoplastes de *A. haloplanktis* correspondent seulement à 18,8% du total trouvé dans les cellules entières. En conclusion, à l'heure actuelle et avec les méthodes utilisées, il paraît impossible d'obtenir des fractions absolument pures (i.e. exemptes de toute contamination). Notre problème, dans le cadre de notre travail, est relatif au fait que les contaminations trouvées, bien que petites du point de vue quantitatif, peuvent se

Tableau 19 : Pourcentage de distribution des quatre marqueurs dans les trois fractions et de la perte totale lors du processus de fractionnement.

Structure	K.D.O. (%)	Hexosamines (%)	Protéines (%)	Phosphore (%)
Membrane externe	12,15	3,5	20,73	2,88
Peptidoglycane	1,18	45	1,34	0,55
Membrane cytoplasmique	1,94	4,3	11,39	28,46
Perte totale pendant les manipulations	84,7	47,2	67	68,09

révéler importantes du point de vue qualitatif lors de l'utilisation de ces structures dans l'étude d'accumulation et de transport des métaux. Enfin les pertes, comme cela a déjà été dit, sont importantes et matériellement inévitables par les techniques de fractionnement actuellement proposées.

4.2. ACCUMULATION DES METAUX PAR LES ENVELOPPES DE P. FLUORESCENS MODIFIEES OU NON

4.2.1. Objectif

Des travaux antérieurs faits par plusieurs auteurs (voir chapitre 2.3.) ont permis de montrer que les enveloppes cellulaires (la membrane externe, le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique) agissent à la fois comme une barrière (rôle conféré par le caractère hydrophobe des deux membranes) et une zone d'accumulation sensible à l'effet toxique du produit accumulé. Ces auteurs ont aussi attribué le pouvoir d'accumulation à des sites spécifiques trouvés dans ces enveloppes. Parmi les groupements fonctionnels capables de complexer les ions métalliques figurent les groupements thiols, phosphate et carboxyles, ces derniers étant les plus étudiés, en particulier à l'aide des méthodes de modification de ces groupements décrites par DOYLE *et al.* (1980) et BEVERIDGE et MURRAY (1980).

L'importance des groupements carboxyliques dans l'accumulation des métaux a été estimée par ces auteurs en modifiant ces groupements carboxyliques des parois extraites d'*Escherichia coli*, montrant ainsi que ces sites sont des cibles de premier rang dans l'accumulation des métaux.

Les buts des travaux rapportés ci-après sont : (a) de tester la capacité d'accumulation des métaux (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) par les fractions isolées des enveloppes bactériennes de *P. fluorescens* ; (b) de comparer cette accumulation avec des enveloppes modifiées chimiquement par masquage des sites carboxyliques ; (c) de mesurer l'accumulation et calculer au moyen du modèle de Scatchard l'affinité de ces fractions dont les groupements carboxyliques ont été bloqués ou non.

4.2.2. Protocole

Les essais d'accumulation des métaux (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) ont été réalisés en parallèle sur des fractions de chaque structure (M. ext, PG, M.C.) modifiée et non modifiée.

Les fractions préalablement obtenues ont été décongelées rapidement dans un bain-marie à 37°C. Après avoir contrôlé le poids sec des enveloppes par gravimétrie après lyophilisation d'un millilitre de chaque fraction, les fractions subissent deux lavages dans de l'eau suprapure avec centrifugation à 73 000 xg, puis sont diluées dans l'eau suprapure pH = 6 afin d'obtenir une concentration finale d'environ 2 mg/l. Chaque solution est ensuite homogénéisée pendant 2 heures à 4°C avant son utilisation par passage sur vortex toutes les 10 minutes. Les essais sont alors conduits selon la technique de dialyse décrite dans le chapitre 3.7., où 1 ml de solution contenant les métaux est mis en contact avec 1 ml de la suspension contenant les fractions bactériennes préparées selon la technique décrite auparavant.

4.2.3. Résultats

A notre connaissance, aucun auteur n'a comparé l'interaction métal-enveloppe en utilisant les trois enveloppes isolées à partir d'un même matériel biologique, en l'occurrence ici *Pseudomonas fluorescens*. La plupart des auteurs ont travaillé avec des bactéries entières ou des muréinoplastes ou avec une ou deux fractions. D'autre part, DOYLE et al. (1980) et BEVERIDGE et MURRAY (1980) pour ne citer qu'eux, ont utilisé des fractions modifiées au niveau des groupements carboxyliques dans le but d'étudier ces sites comme premiers responsables de l'accumulation des métaux au niveau des enveloppes cellulaires des bactéries gram négatives. Il faut toutefois souligner que ces auteurs n'ont pas cherché à connaître le succès des réactions de masquage des groupements carboxyliques et ont réalisé leurs expériences uniquement sur des structures modifiées, sans effectuer de comparaison avec des structures non modifiées.

Nos résultats, présentés ci-après, montrent tout d'abord d'une façon indirecte par le dosage des groupements NH_3^+ formés après transformation des groupements carboxyliques, l'efficacité de la technique de blocage des sites carboxyliques. Deuxièmement les résultats de l'accumulation des métaux sur les enveloppes cellulaires de *Pseudomonas fluorescens* sont représentés sous forme de graphiques suivant le modèle de Scatchard. Ce modèle répond à un grand nombre de questions sur l'accumulation des métaux et s'adapte bien au type de données obtenues.

4.2.3.1. Dosage des groupements NH_3^+

Le dosage des groupements NH_3^+ par la méthode à la ninhydrine a été effectué sur les enveloppes de *P. fluorescens* modifiées ou non modifiées (Tableau 20). Dans toutes les frac-

Tableau 20 : Concentrations de N aminé/mg de fraction. Les valeurs sont obtenues en faisant la moyenne des trois essais par fraction modifiée ou non + les écarts-types.

Structure	Fonctions amines mg/mg de fraction
Membrane externe non modifiée	$3,08E-3 \pm 3,4E-4$
Membrane externe modifiée	$5,6E-3 \pm 2,74E-3$
Peptidoglycane non modifié	$9,5E-4 \pm 2E-5$
Peptidoglycane modifié	$1,65E-3 \pm 6,8E-4$
Membrane cytoplasmique non modifiée	$2,3E-3 \pm 9,8E-4$
Membrane cytoplasmique modifiée	$6E-3 \pm 1,4E-3$

tions modifiées par masquage des groupements carboxyliques, les valeurs de NH_3^+ sont environ du double par rapport aux fractions non modifiées, montrant qu'il y a une réelle transformation des sites carboxyliques en sites électropositifs NH_3^+ . Ces valeurs ne permettent pas d'apprécier si la totalité des sites a été masquée, elles révèlent toutefois l'efficacité de la réaction de masquage.

4.2.3.2. Accumulation des métaux par les enveloppes isolées de *P. fluorescens*

L'ensemble des résultats bruts et des calculs intermédiaires relatifs aux essais réalisés en triplicat sur chaque fraction modifiée ou non sont rassemblés en annexe (Tableaux A6 à A13). Les métaux sont dosés après dialyse d'un milligramme de fraction contenant l'une des trois enveloppes plus un millilitre de solution contenant le métal à des concentrations différentes. Après 48 heures à 4°C le métal est dosé dans la phase liquide à l'équilibre et le rapport métal fixé/métal libre est établi.

Les informations qui sont obtenues par ajustement des résultats du dosage au modèle de Scatchard sont : l'affinité et le type de site, établis respectivement d'après la pente de chaque droite obtenue (K_a) et le nombre de droites qu'il est possible de tracer (voir paragraphe 2.3.3.).

a) Cadmium

En ce qui concerne le cadmium, comme le montrent bien les figures 27a, 28a, 29a, quelles que soient les fractions testées (M. externe, Peptidoglycane, M. cytoplasmique), au moins deux types de récepteurs ou de sites de fixation du cadmium existent (dits à forte ou à faible affinité). Les courbes ainsi obtenues sont de forme concave traduisant, selon DALQUIST (1978), le fait que la coopération entre les sites récepteurs est négative, c'est-à-dire que les sites à plus forte affinité vont piéger le métal plus rapidement que les sites à moins forte affinité. Pour les fractions non modifiées il est possible de classer les récepteurs dits à forte affinité dans l'ordre décroissant (Tableau 21) :

membrane externe > peptidoglycane > membrane cytoplasmique

et les récepteurs dits à faible affinité dans l'ordre décroissant :

peptidoglycane > membrane externe > membrane cytoplasmique.

Le blocage des sites carboxyliques par une nouvelle fonction chimique (fractions modifiées) devrait, selon l'hypothèse de BEVERIDGE et MURRAY (1980), diminuer la pente des graphes. Les essais réalisés montrent (Figures 27b, 28b, 29b et Tableau 21), au contraire et dans tous les cas, une augmentation apparente de l'affinité relative pour le cadmium après masquage, comme si apparemment les groupements carboxyliques n'intervenaient pas dans l'accumulation de cadmium ! Le classement des affinités des sites récepteurs n'est pas bouleversé après masquage des fonctions COOH.

Tableau 21 : Valeurs calculées des pentes des équations de Scatchard traduisant la fixation des Cd (II) par les enveloppes de P. fluorescens.

Structure testée	Valeurs de Ka	
	Récepteur à forte affinité	Récepteur à faible affinité
Membrane externe	-13,1	-0,96
Membrane externe modifiée	-25,3	-1,2
Peptidoglycane	-9,51	-2,09
Peptidoglycane modifié	-22,55	-2,96
Membrane cytoplasmique	-3,78	-0,36
Membrane cytoplasmique modifiée	-4,48	-1,23

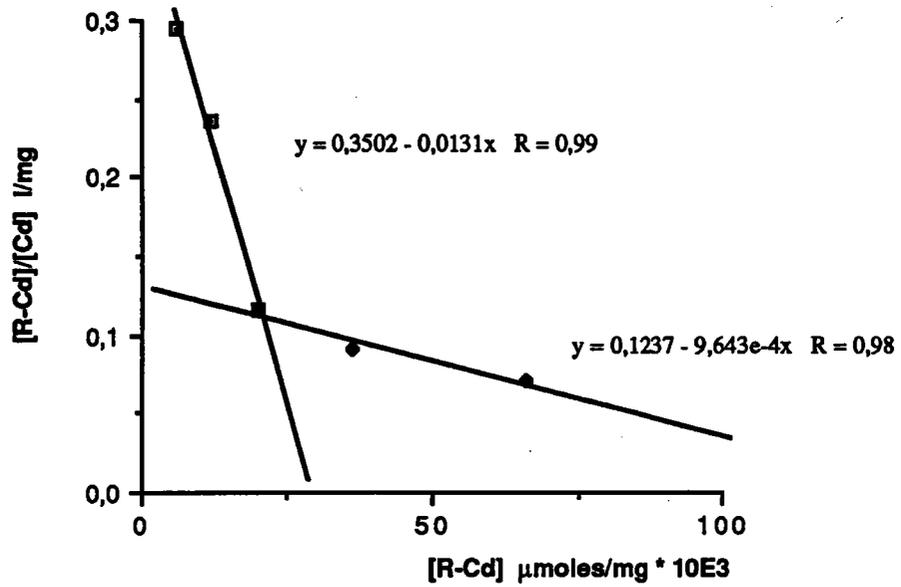


Figure 27a

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du cadmium par la membrane externe non modifiée

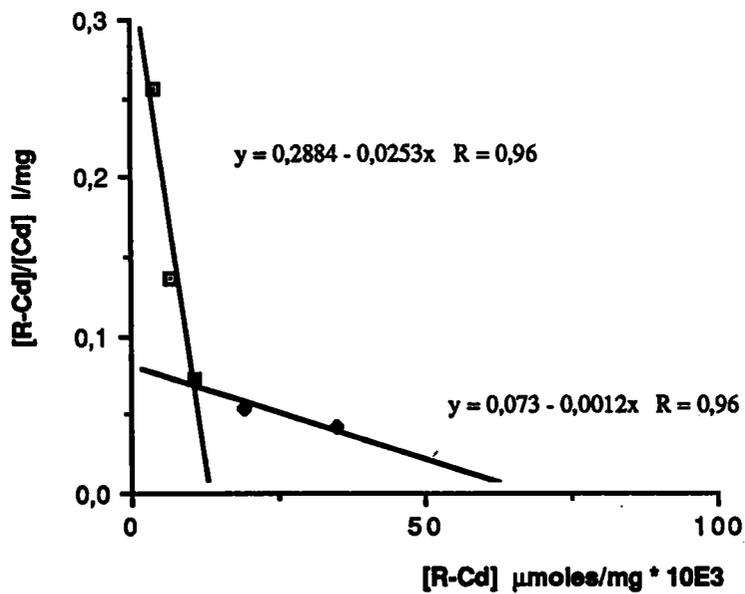


Figure 27b

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du cadmium par la membrane externe modifiée

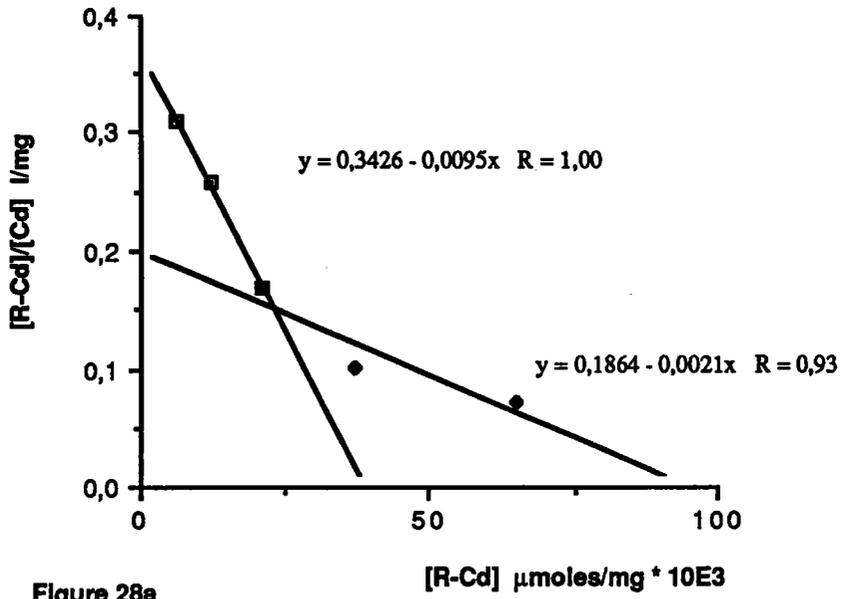


Figure 28a

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du cadmium par le peptidoglycane non modifié

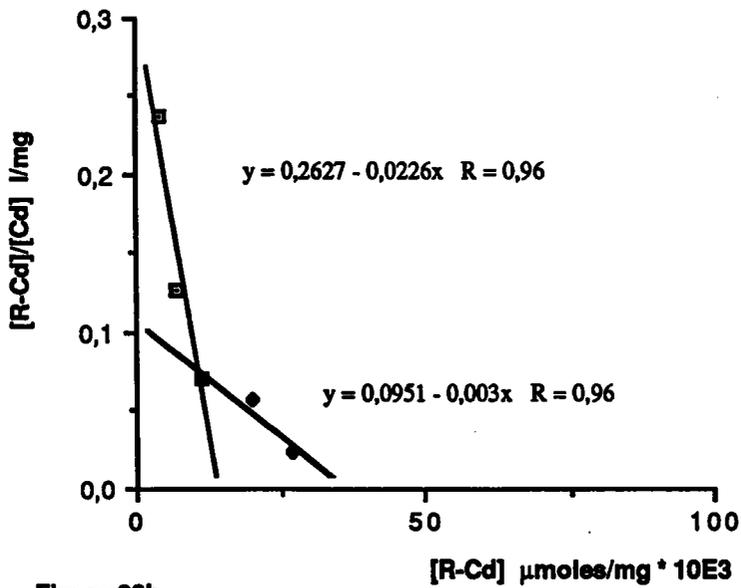


Figure 28b

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du cadmium par le peptidoglycane modifié

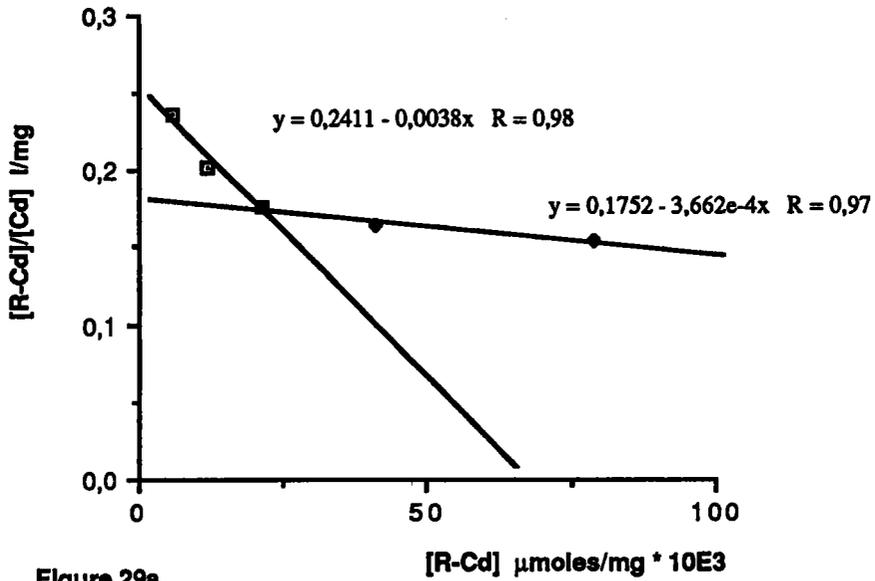


Figure 29a

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du cadmium par la membrane cytoplasmique non modifiée

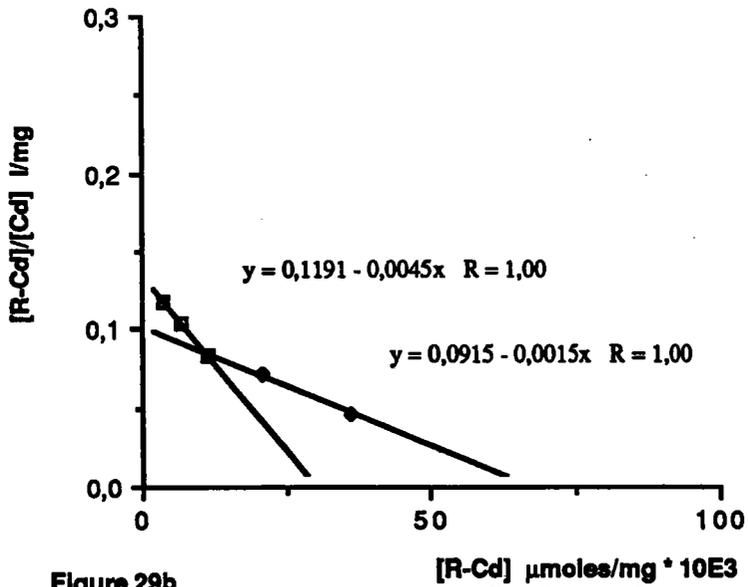


Figure 29b

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du cadmium par la membrane cytoplasmique modifiée

b) Nickel

Pour le nickel, les enveloppes non modifiées présentent aussi au moins deux types de sites récepteurs (Figures 30a, 31a et 32a). En ce qui concerne les récepteurs à forte affinité, le calcul des pentes (Tableau 22) montre que les différences sont très faibles et les trois fractions étudiées peuvent être considérées comme ayant un comportement identique. Par contre, les différences sont nettes pour les récepteurs à faible affinité comme le montrent les valeurs de pentes présentées dans le tableau 22.

Pour les fractions non modifiées il est possible de classer les récepteurs dits à faible affinité dans l'ordre décroissant :

membrane cytoplasmique > peptidoglycane > membrane externe.

Le blocage des sites carboxyliques, contrairement à ce qui se passe avec le cadmium, entraîne une modification considérable, avec en particulier une disparition des sites de forte affinité (Figures 30b, 31b et 32b). Les sites de faible affinité sont classés dans l'ordre décroissant pour les fractions modifiées comme suit :

membrane cytoplasmique > membrane externe > peptidoglycane.

En d'autres termes, la technique de masquage met en lumière le fait que le nickel s'accumule préférentiellement sur les enveloppes bactériennes au niveau des sites carboxyliques.

En général et pour les mêmes concentrations de métal, le nickel est accumulé avec une affinité moins grande que celle présentée par les récepteurs des enveloppes par le cadmium.

Tableau 22 : Valeurs calculées des pentes de l'équation de Scatchard traduisant la fixation du Ni (II) par les enveloppes de P. fluorescens (-) = sites éliminés par masquage.

Structure testée	Valeur de Ka	
	Récepteur à forte affinité	Récepteur à faible affinité
Membrane externe	-5,62	-0,025
Membrane externe modifiée	-	-0,323
Peptidoglycane	-6,43	-0,355
Peptidoglycane modifié	-	-0,266
Membrane cytoplasmique	-5,55	-1,445
Membrane cytoplasmique modifiée	-	-0,713

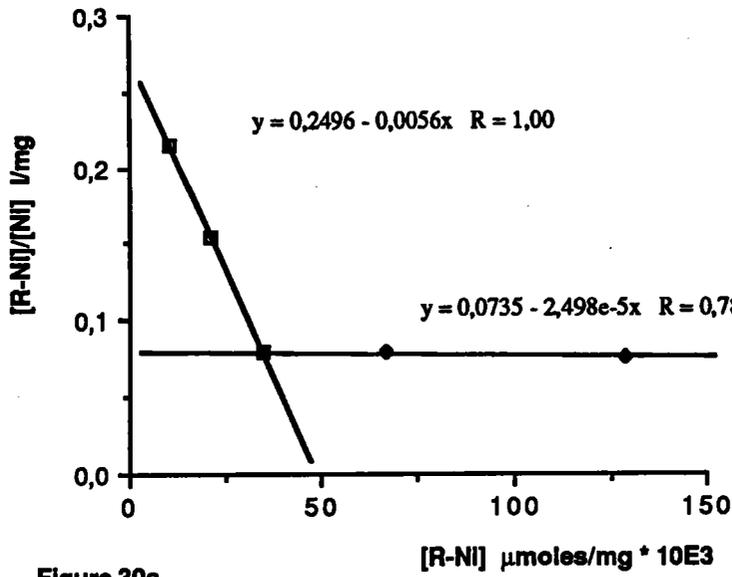


Figure 30a

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du nickel par la membrane externe non modifiée

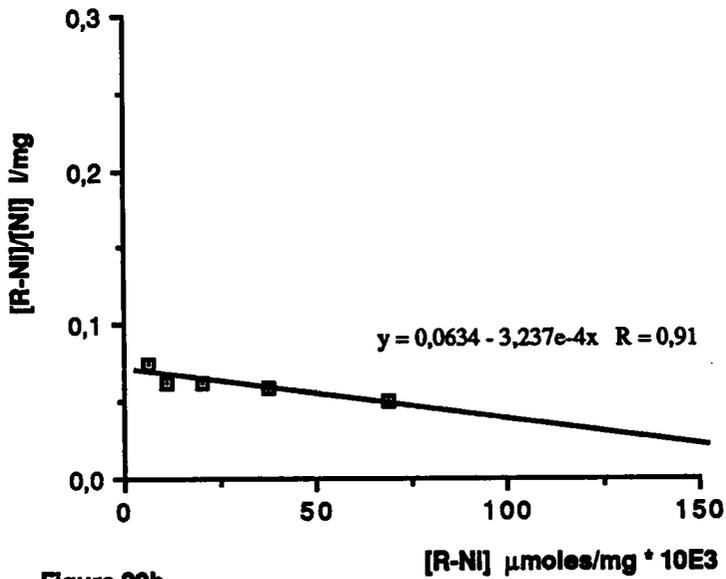


Figure 30b

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du nickel par la membrane externe modifiée

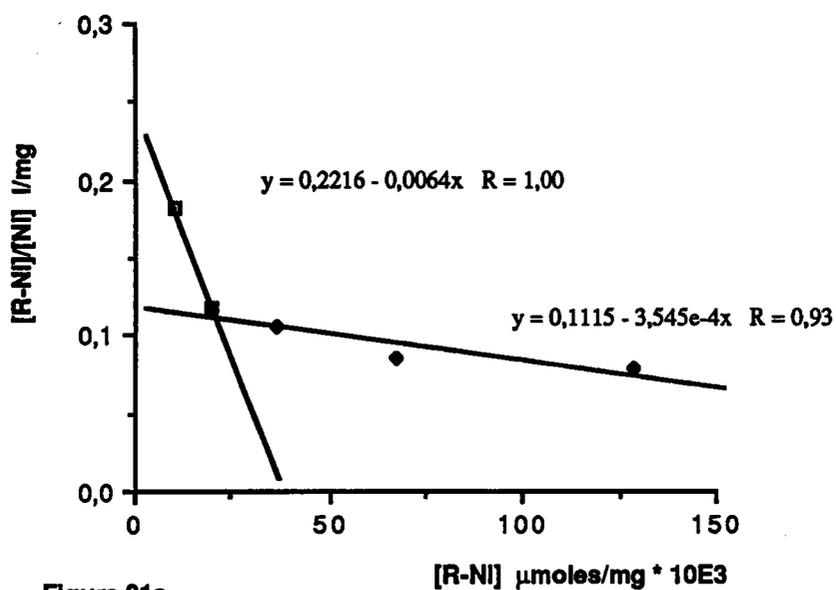


Figure 31a

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du nickel par le peptidoglycane non modifié

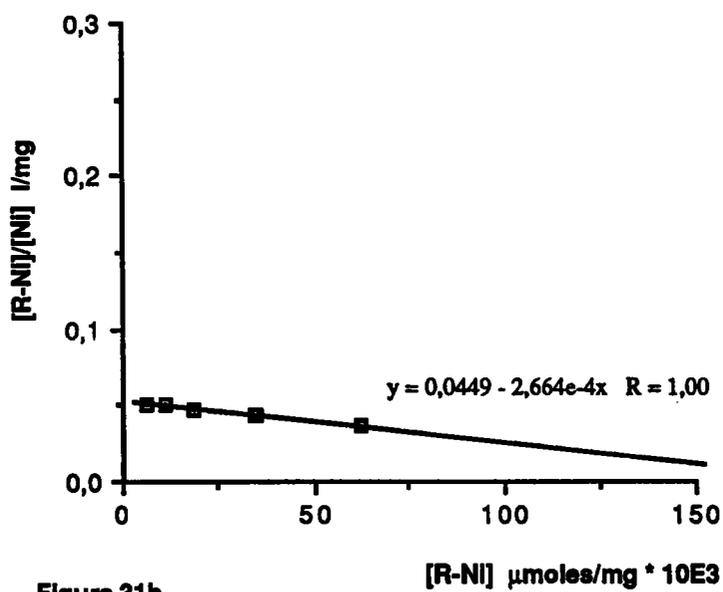


Figure 31b

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du nickel par le peptidoglycane modifié

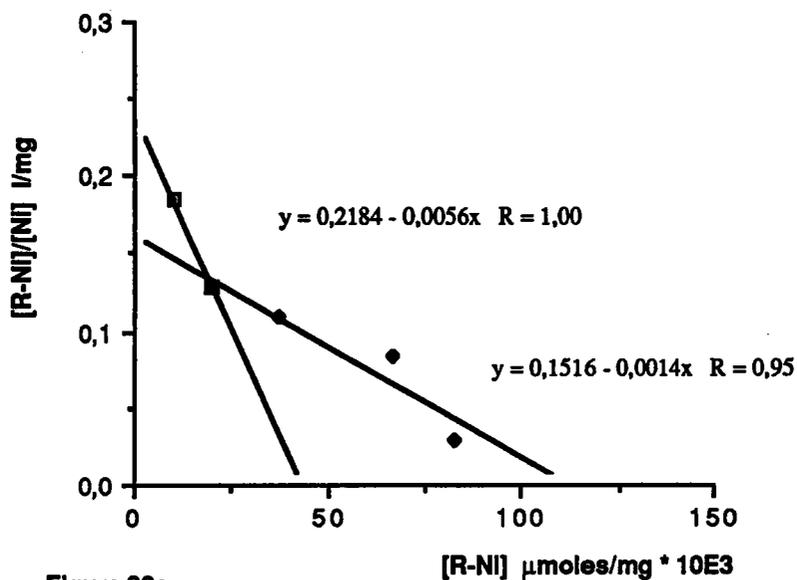


Figure 32a

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du nickel par la membrane cytoplasmique non modifiée

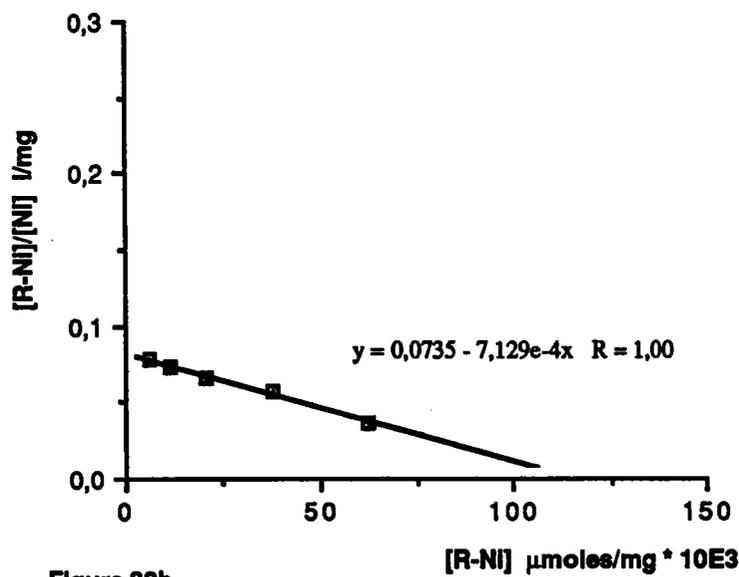


Figure 32b

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du nickel par la membrane cytoplasmique modifiée

c) Cuivre

Le cuivre a été aussi mis en contact avec les enveloppes de *P. fluorescens*, modifiées ou non.

Les enveloppes non modifiées présentent, comme cela a été déjà observé pour le Cd^{2+} et le Ni^{2+} , au moins deux types de sites (à forte et à faible affinité) pour le cuivre. Les enveloppes modifiées par blocage des sites carboxyliques ne présentent plus qu'un type de site de fixation avec la disparition de la droite qui représente les sites à forte affinité (Figures 33a,b ; 34a,b et 35a,b). Aussi dans ce cas, le cuivre s'accumule préférentiellement sur les sites carboxyliques.

D'autre part, la représentation Scatchard de ce phénomène montre, comme précédemment, des courbes en forme concave traduisant aussi la coopération négative entre les sites.

Le tableau 23 rassemble les valeurs chiffrées exprimant les pentes K_a des équations de Scatchard. Les sites à forte et à faible affinité pour le cuivre avec les enveloppes non modifiées sont classés selon l'ordre décroissant suivant :

peptidoglycane > membrane externe > membrane cytoplasmique.

Tableau 23 : Valeurs calculées des pentes des équations de Scatchard traduisant la fixation de Cu (II) par les enveloppes de P. fluorescens, (-) sites éliminés par masquage.

Structure testée	Valeur de Ka	
	Récepteur à forte affinité	Récepteur à faible affinité
Membrane externe	-0,039	-0,006
Membrane externe modifiée	-	-0,005
Peptidoglycane	-0,051	-0,009
Peptidoglycane modifié	-	-0,0047
Membrane cytoplasmique	-0,01	-0,0028
Membrane cytoplasmique modifiée	-	-0,0028

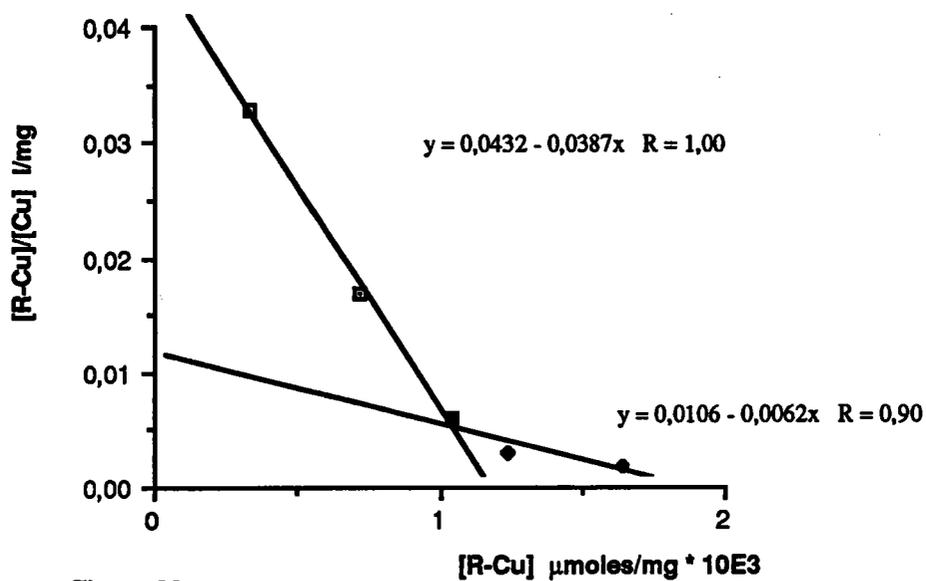


Figure 33a

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du cuivre par la membrane externe non modifiée

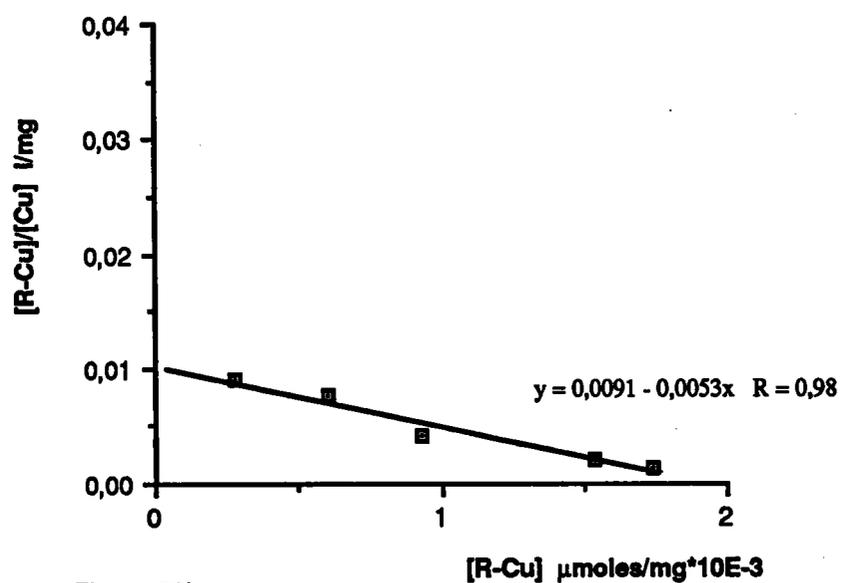


Figure 33b

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du cuivre par la membrane externe modifiée

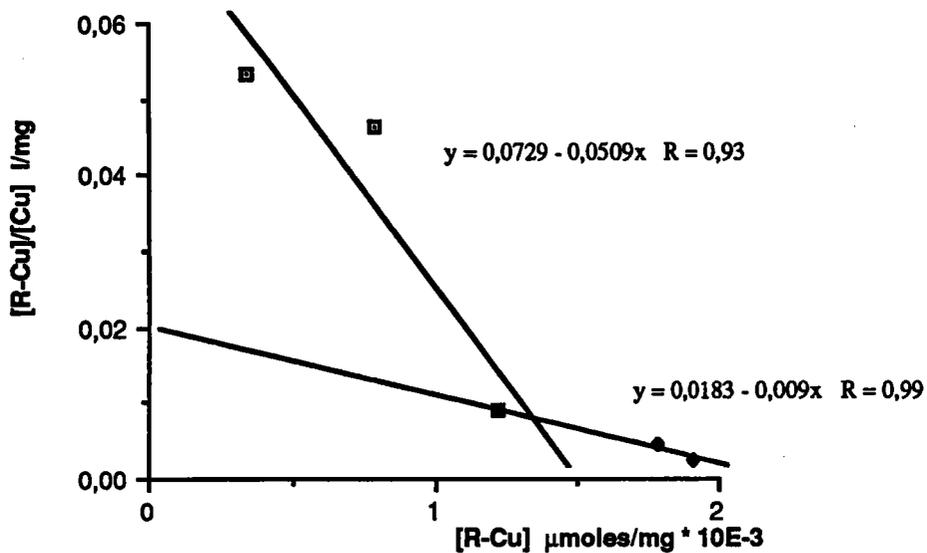


Figure 34a

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du cuivre par le peptidoglycane non modifié

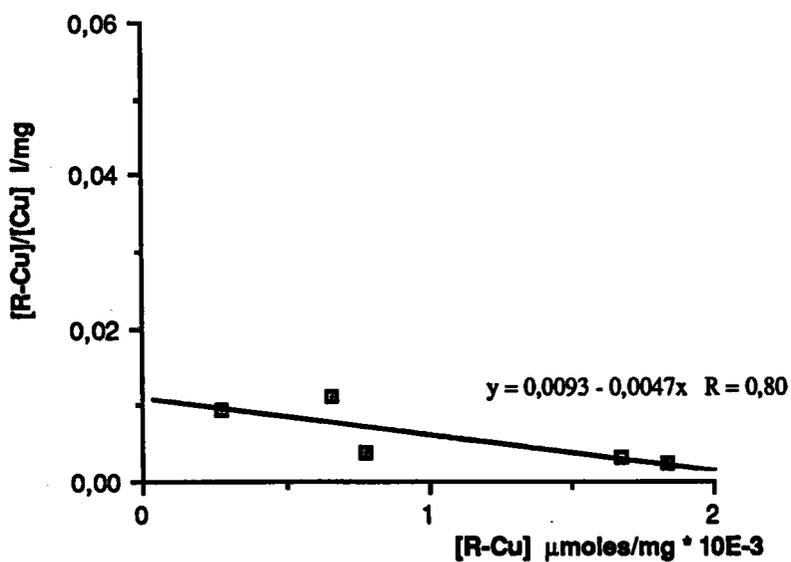


Figure 34b

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du cuivre par le peptidoglycane modifié

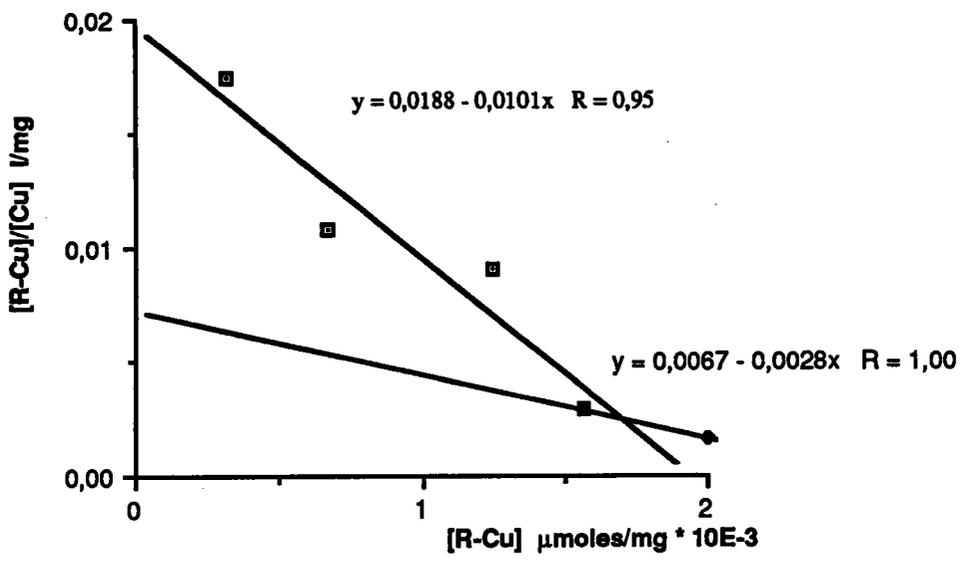


Figure 35a
 Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation
 du cuivre par la membrane cytoplasmique non modifiée

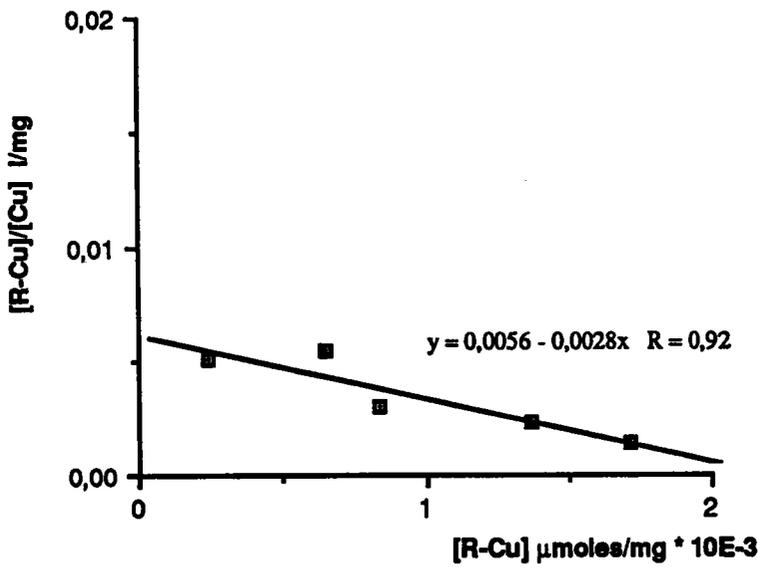


Figure 35b
 Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation
 du cuivre par la membrane cytoplasmique modifiée

d) Zinc

Pour ce métal, les enveloppes de *P. fluorescens* non modifiées ont eu le même comportement que pour les autres métaux et présentent ainsi au moins deux types de sites (à forte et à faible affinité). Les enveloppes modifiées (au niveau des groupements carboxyliques), à l'exception de la membrane cytoplasmique, présentent une disparition des sites à forte affinité, montrant ainsi que la membrane externe et le peptidoglycane accumulent préférentiellement le zinc sur les groupements carboxyliques (Figures 36a,b ; 37a,b et 38a,b).

En ce qui concerne la membrane cytoplasmique modifiée, elle présente deux types de sites même après modification des sites carboxyliques. Toutefois les sites observés après modification présentent des pentes moins importantes traduisant ainsi des affinités moins importantes par les récepteurs des enveloppes modifiées au niveau des groupements carboxyliques.

Les pentes K_a sont calculées à partir des équations des droites obtenues par la représentation de Scatchard (et rassemblées dans le tableau 24). Ainsi les enveloppes non modifiées sont classées dans l'ordre décroissant pour les sites à forte affinité :

membrane externe > peptidoglycane > membrane cytoplasmique.

Les enveloppes modifiées sont pour les récepteurs à faible affinité classées dans l'ordre décroissant :

membrane externe > membrane cytoplasmique > peptidoglycane.

Tableau 24 : Valeurs calculées des pentes des équations de Scatchard traduisant la fixation de Zn (II) par les enveloppes de P. fluorescens, (-) sites éliminés par masquage.

Structure testée	Valeurs de Ka	
	Récepteur à forte affinité	Récepteur à faible affinité
Membrane externe	-19,14	-6,62
Membrane externe modifiée	-	-2,49
Peptidoglycane	-10,53	-3,43
Peptidoglycane modifié	-	-1,48
Membrane cytoplasmique	-34,7	-3,1
Membrane cytoplasmique modifiée	-16,3	-2

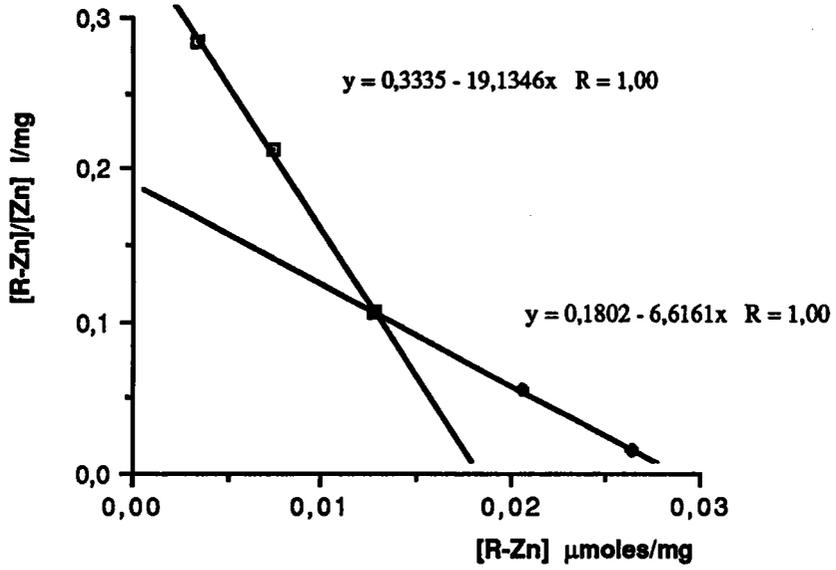


Figure 36a
 Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation
 du zinc par la membrane externe non modifiée

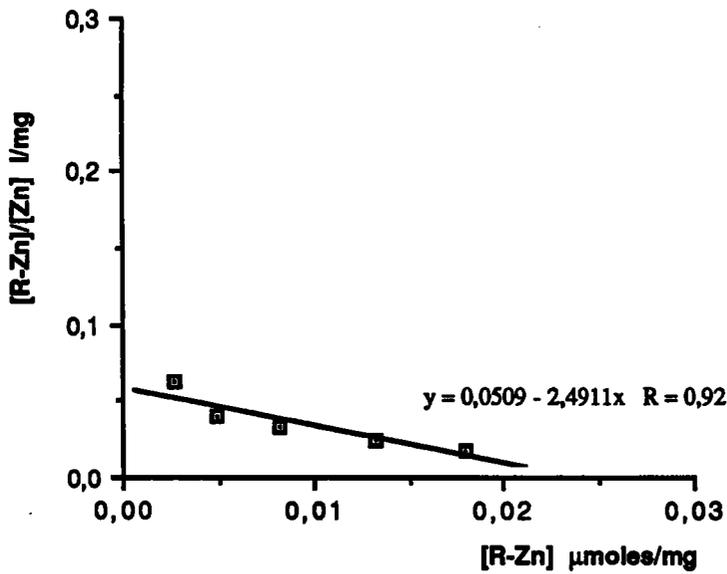


Figure 36b
 Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation
 du zinc par la membrane externe modifiée

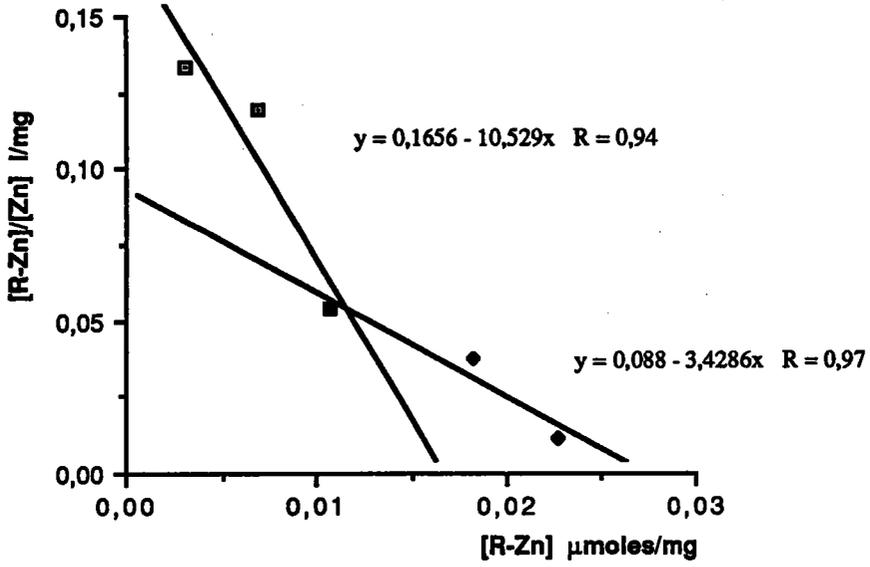


Figure 37a
 Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation
 du zinc par le peptidoglycane non modifié

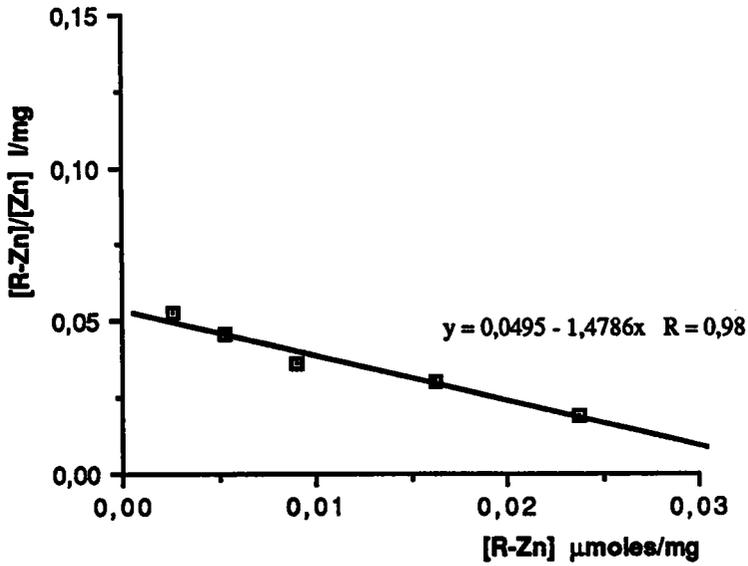


Figure 37b
 Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation
 du zinc par le peptidoglycane modifié

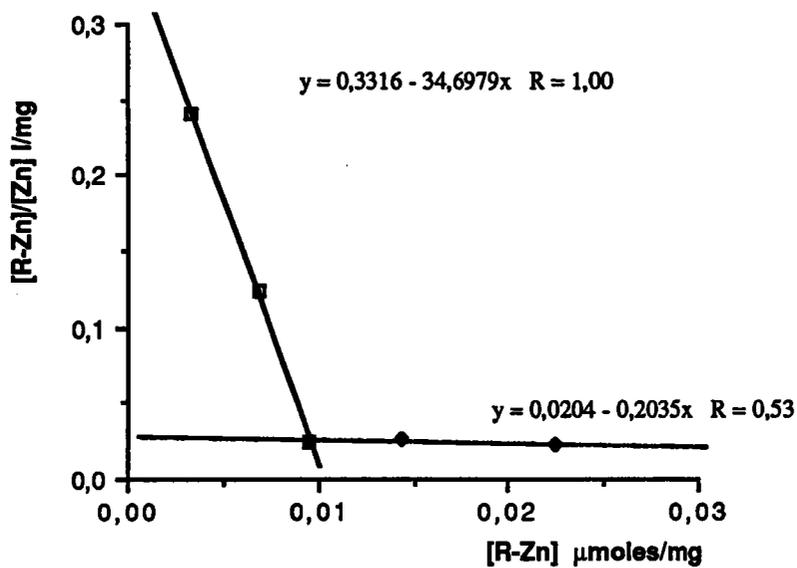


Figure 38a

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du zinc par la membrane cytoplasmique non modifiée

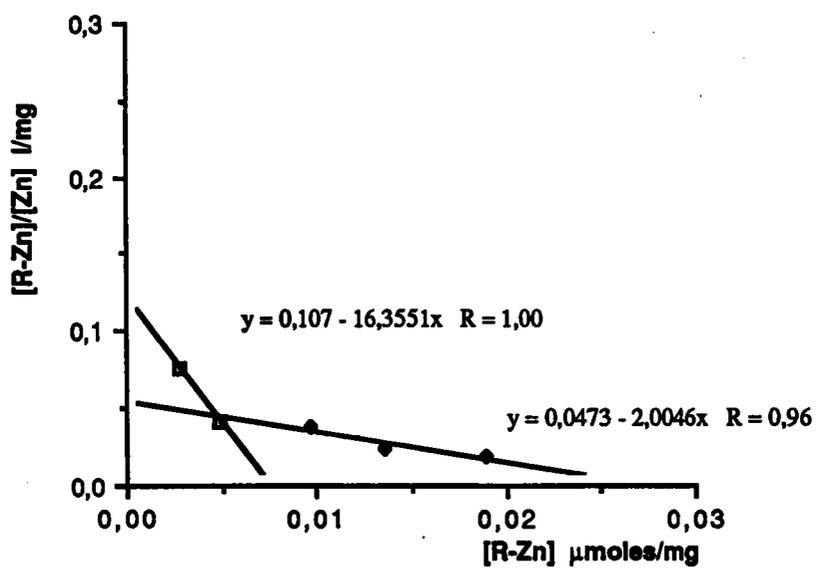


Figure 38b

Expression de l'équation de Scatchard de l'accumulation du zinc par la membrane cytoplasmique modifiée

4.2.4 **Discussion**

Comme cela a été dit dans le paragraphe 2.3.2., mais aussi rapporté par BROWN et LESTER (1982a), l'accumulation des métaux par les bactéries semble être un phénomène principalement de surface (du moins sur le plan quantitatif). Les enveloppes jouent alors un rôle considérable car elles présentent des sites privilégiés capables d'accumuler les métaux. Ces sites peuvent être par exemple des sites phosphates présents au niveau des membranes, des sites carboxyliques dans le peptidoglycane et dans les protéines membranaires.

Dans ce travail nous avons utilisé les enveloppes de *P. fluorescens* (membrane externe, peptidoglycane, membrane cytoplasmique) obtenues par fractionnement à partir du même matériel biologique, pour étudier l'accumulation de Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} . Selon la classification de NIEBOER et RICHARDSON (1980), ces métaux appartiennent tous à la classe intermédiaire, ils sont capables d'être complexés par un grand nombre de molécules biologiques y compris celles constituant les structures bactériennes.

L'importance de l'accumulation des métaux par les enveloppes n'était jusqu'à présent pas bien connue. Seuls quelques travaux ont été réalisés sur les exopolysaccharides et sur les enveloppes afin de mieux comprendre leur rôle dans les phénomènes de fixation des métaux.

Les exopolysaccharides ont été étudiés en tant que structure accumulatrice des métaux par CORPE (1975) ; BROWN et LESTER (1980). Il a été montré que la fixation des métaux, au niveau de ces polymères extraits, peut être décrite par des isothermes ou par des modèles plus complexes comme celui proposé par RUZIC (RUDD *et al.*, 1984 ; BROWN et LESTER, 1982a). Il est cependant inexact de parler du rôle des exopolysaccharides *sensu stricto* dans l'accumulation des métaux puisque l'analyse de ces exopolymères a montré qu'ils comportaient une proportion non négligeable de protéines et d'acides nucléiques (BROWN et LESTER, 1980).

Ainsi d'autres auteurs ont cherché à connaître le rôle des structures "plus internes" type membranes et peptidoglycane et leur importance dans l'accumulation des métaux, en comparant la fixation du cadmium au niveau de bactéries entières, des muréinoplastes et de protoplastes. BAUDA (1986) n'a montré aucune différence au niveau de l'accumulation du métal (Cd^{2+}) par *P. fluorescens* et *A. haloplanktis*. Par contre, les travaux de FLATAU *et al.* (1987) montrent la répartition du cadmium dans des cellules et des muréinoplastes et protoplastes issus de cellules préalablement chargées en cadmium. Dans ce cas, les teneurs diminuent dans le sens : cellules intactes > cellules rincées > muréinoplastes = protoplastes. FLATAU *et al.* (1985) ont montré d'autre part que durant les toutes premières heures de contact avec le cadmium, l'accumulation augmentait dans le sens cellules < muréinoplastes < protoplastes.

Eu égard à la complexité du problème, l'utilisation d'enveloppes bactériennes isolées est apparue comme une voie possible de recherche et de compréhension des mécanismes d'accumulation des métaux. Cette approche, même si elle interdit toute extrapolation à une situation dans laquelle des bactéries intactes auraient été exposées au métal, fournit des informations intéressantes sur les propriétés des structures isolées.

Ainsi BEVERIDGE et KOVAL (1981) ont travaillé sur des parois isolées d'*E. coli* K-12 montrant une certaine accumulation des métaux par ces structures de l'ordre de : 0,02 ; 0,09 et 0,39 μmol de Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} /mg de paroi respectivement. En 1983, HOYLE et BEVERIDGE isolent le peptidoglycane de la paroi de la même bactérie et observent pour le nickel une accumulation de 0,019 μmol /mg de structure. Cependant aucune différence significative par rapport aux résultats obtenus par BEVERIDGE et KOVAL (1981) n'a été mise en évidence. A la suite de ces travaux, BEVERIDGE (1984) compare l'accumulation des métaux (Na, K, Mg, Ca, Mn) par le peptidoglycane et la membrane externe d'*E. coli* K-12, montrant ainsi des différences de fixation des métaux par ces structures. Le peptidoglycane serait capable de fixer 2 à 3 fois plus que la membrane externe.

Afin de préciser le mode de fixation des métaux au niveau des différents types d'enveloppes bactériennes, d'autres auteurs ont étudié le rôle des principaux groupements fonctionnels (phosphates, thiols et carboxyles). En effet, ceux-ci ayant un fort pouvoir complexant vis-à-vis des ions métalliques, leur rôle dans l'accumulation des métaux par les bactéries pourrait être capital. Le plus étudié de ces groupements est le groupement carboxylique grâce aux méthodes décrites par DOYLE *et al.* (1980) et BEVERIDGE et MURRAY (1980).

Le rôle des trois enveloppes de *P. fluorescens* (M. externe, Peptidoglycane, M. cytoplasmique) modifiées ou non au niveau des groupements carboxyliques, vis-à-vis de l'accumulation de Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , a été mise en évidence dans notre étude. Les résultats obtenus ont été interprétés à l'aide du modèle de Scatchard. Ce modèle permet d'évaluer d'une part la quantité de métal accumulé sur l'ensemble des sites, et d'autre part le nombre de types de site et leur affinité à l'égard du métal étudié. Ce modèle permet également d'observer les interactions entre les différents sites récepteurs.

A partir de nos résultats, plusieurs constatations peuvent être retenues :

* Premièrement : toutes les enveloppes bactériennes (M. externe, Peptidoglycane, M. cytoplasmique), mélanges complexes d'hétéropolymères, sont capables d'accumuler les ions métalliques testés (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}), ce qui rejoint la classification de NIEBOER et RICHARDSON (1980) et les résultats des travaux de BEVERIDGE et KOVAL (1981), HOYLE et BEVERIDGE (1983) et BEVERIDGE (1984), réalisés avec la membrane externe et le peptidoglycane de *E. coli*.

* Deuxièmement : au moins deux types de récepteur à forte et à faible affinité peuvent être reconnus dans tous les cas. Cette observation rejoint celles de KADOKURA *et al.* (1979) ; PRICE (1972) ; LAMBERT *et al.* (1975), qui trouvent aussi au moins deux types de site récepteur aux métaux sur des molécules pures type protéine, et exprimés au moyen du modèle de Scatchard.

* Troisièmement : dans le cas des récepteurs à forte affinité, la figure 39 montre que le cadmium présente plus d'affinité pour la membrane externe. Le nickel et le cuivre présentent plus d'affinité pour le peptidoglycane. Le zinc présente plus d'affinité pour la membrane cytoplasmique.

* Quatrièmement : dans le cas des récepteurs à faible affinité, le zinc présente plus d'affinité pour la membrane externe. Le cadmium et le cuivre présentent plus d'affinité pour le peptidoglycane. Le nickel présente plus d'affinité pour la membrane cytoplasmique. A priori, personne à notre connaissance n'ayant réalisé ce type de démarche, les comparaisons avec la littérature scientifique restent impossibles.

* Cinquièmement : quels que soient les types de récepteurs considérés, pour la membrane externe et le peptidoglycane (les deux composants de la paroi), il est possible de classer les métaux selon l'ordre d'affinité décroissante pour ces structures : $Zn > Cd > Ni > Cu$, étonnant car la membrane externe et le peptidoglycane sont à l'évidence très différents. Les résultats de DOYLE *et al.* (1980) sont en accord avec les nôtres en ce qui concerne le K_a de $Zn > Ni$, même si les résultats de leur publication sont difficiles à interpréter sinon suspects.

* Sixièmement : quels que soient les types de récepteurs considérés, pour la membrane cytoplasmique il est possible de classer les métaux selon l'ordre décroissant au niveau de leur affinité pour cette structure : $Zn > Ni > Cd > Cu$. Cette fraction a un comportement différent des deux autres, mais aucune comparaison avec la littérature scientifique ne peut être faite car la membrane cytoplasmique ne semble pas avoir été étudiée par d'autres auteurs quant à l'accumulation des métaux.

* Septièmement : le masquage des fonctions carboxyliques entraîne une disparition des sites de fixation à forte affinité pour le Zn, Cu et Ni avec deux exceptions, d'une part le cadmium (aucune modification au niveau de l'accumulation du métal quelle que soit la structure considérée), d'autre part le Zn (dans le cas de son interaction avec la membrane cytoplasmique l'affinité n'est diminuée que d'un facteur 2). Dans le cas de DOYLE *et al.* (1980), en ce qui concerne les résultats pour le Ni et le Zn, ces métaux sont accumulés par la paroi de *E. coli* modifiée au niveau des sites carboxyliques par un seul site récepteur.

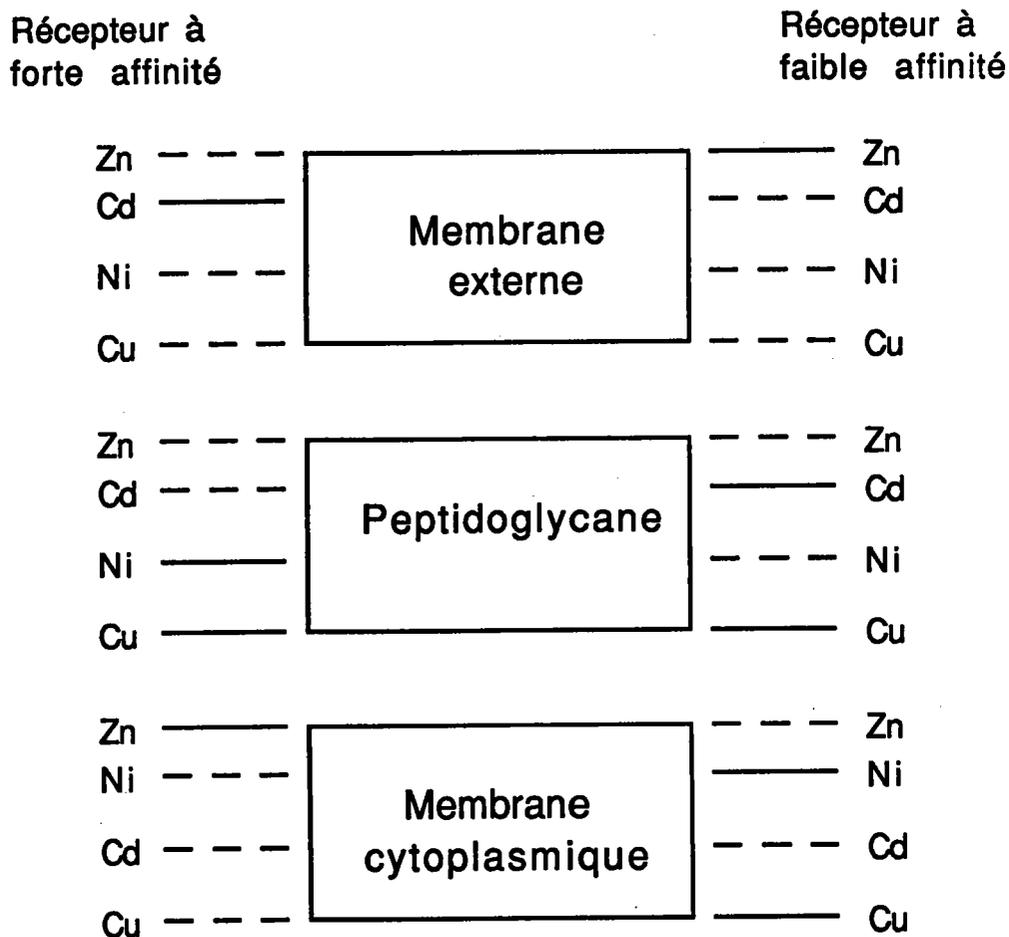


Figure 39 : Classification schématique de l'affinité des ions métalliques (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) par les enveloppes bactériennes non modifiées .

———— affinité relative maximale pour le métal considéré
 - - - - affinité relative faible pour le métal considéré

* l'ordre vertical classe les métaux selon leur valeur K_a du plus élevé au plus faible

4.3. ETUDE DE L'EXTRACTION DES METAUX (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) AVEC L'ACIDE NITRILOTRIACETIQUE (N.T.A.) A PARTIR DES BIOMASSES BACTERIENNES CONTAMINEES

L'étude du pouvoir d'extraction à l'aide d'un complexant puissant, l'acide nitrilotriacétique (N.T.A.), des biomasses contaminées par des métaux, a été réalisée dans ce travail, d'une part afin de connaître l'efficacité du N.T.A. (très utilisé en Europe dans les détergents), et d'autre part tenter d'apprécier indirectement la localisation de ces métaux au niveau des bactéries contaminées après et pendant leur croissance. En effet, par cette méthode, nous pourrions vérifier si les métaux se fixent préférentiellement au niveau des enveloppes, chez les bactéries contaminées après croissance, ce qui les rend facilement extractibles, alors que les bactéries contaminées au cours de leur croissance peuvent incorporer les métaux à un niveau "plus interne", rendant ainsi plus difficile leur extraction par les méthodes jusqu'alors utilisées.

Enfin nous avons testé cette méthode d'extraction des métaux par le N.T.A. sur des boues de station d'épuration afin d'évaluer l'efficacité d'extraction de ceux-ci et plus exactement la fraction maximale extractible, comme préalable à un "nettoyage" industriel de ces boues, simple, peu coûteux et non destructif.

4.3.1. Extraction des métaux (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) accumulés par *P. fluorescens* après croissance à l'aide du N.T.A.

Le but de cette étude est de tester la capacité d'accumulation des métaux par les bactéries cultivées en laboratoire et mises en suspension dans l'eau, afin de connaître les quantités accumulées puis extractibles par le N.T.A. L'étude est limitée à trois sels métalliques : chlorures de cuivre, de cadmium et de zinc.

a) Protocole d'accumulation

Une suspension bactérienne d'environ 10^8 bactéries par millilitre, obtenue par lavage d'une culture sur gélose de *P. fluorescens* âgée de 24 heures (18 ml) a été contaminée par simple mélange avec une solution mixte de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} (2 ml) dans l'eau distillée aux concentrations équimolaires finales et croissantes de $3,15 \times 10^{-5}$ à $100,7 \times 10^{-5}$ mole/l, la contamination de la biomasse bactérienne après croissance était réalisée comme suit :

- un premier lot de 6 tubes (tubes à centrifuger en polyuréthane, modèle KONTRON) contenant 18 ml de suspension bactérienne et 2 ml d'eau distillée stérile constituait le lot témoin "bactéries saines" (T_b)

- un lot de 6 tubes contenant 18 ml d'eau distillée stérile et 2 ml de solution mixte équimolaire de concentration croissante en cuivre, cadmium et zinc du premier au sixième tube constituait le lot témoin permettant de quantifier la fixation des métaux sur les parois du tube (T_{S1} à T_{S6})

- un lot de 6 tubes, pour lequel les 18 ml d'eau distillée étaient remplacés par 18 ml de surnageant de la suspension bactérienne (obtenus par centrifugation de cette suspension à 23 000 g pendant 30 minutes), permettait de mesurer l'influence de la matrice organique libérée par les bactéries dans le milieu, sur la fixation des métaux sur les parois du tube (T₅₁ à T₅₆)

- enfin, un lot de 6 tubes contenant 18 ml de suspension bactérienne et 2 ml de solution métallique en concentrations croissantes du premier au sixième tube était réalisé en triplicat, constituant le lot de bactéries contaminées (B₁ à B₆).

La gamme de concentration dans les tubes contaminés était alors de 3,15 à 100,7 $\mu\text{mol/l}$. Ces quatre lots étaient placés 3 heures dans un bain-marie à 30°C sous agitation. Après ce temps de contact, chaque tube était centrifugé à 23 000 x g pendant 30 minutes. Le dosage des métaux dans les surnageants, réalisé par spectrophotométrie d'absorption atomique, a permis de mesurer la fraction libre à l'équilibre pour Cu²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ et de calculer les fractions accumulées et fixées aux parois du tube.

Les culots ont été utilisés pour les essais comparatifs d'extraction.

b) Protocole d'extraction

Les culots bactériens conservés pour le test sont d'une part les culots de bactéries témoins (T_b) et les culots des bactéries contaminées (B₁ à B₆). Les culots ont chacun été mis en suspension dans 20 ml de solution de complexant, NTA à la concentration de 10⁻³ M au pH de 6,5 ± 0,1.

Le temps de contact était de 3 heures sous agitation dans un bain-marie à 30°C. Puis les tubes étaient centrifugés à 23 000 g pendant 30 minutes et les quantités de métaux extraits étaient déterminées par dosage des métaux dans le surnageant par spectrophotométrie d'absorption atomique.

c) Résultats de l'accumulation des métaux

Les résultats bruts ont été regroupés dans les tableaux (A14 et A15) en annexe et exprimés en concentration et en pourcentage de la concentration initiale. L'accumulation des métaux par les suspensions bactériennes a été exprimée sous forme de courbes et d'histogrammes.

Les trois histogrammes de la figure 40 indiquent pour chaque métal la répartition entre les trois fractions : libre dans le surnageant, fixée par les bactéries et fixée sur les parois du tube en fonction de la concentration initiale. Les valeurs ont été calculées à partir des dosages effectués dans les surnageants des bactéries contaminées (B_1 à B_6) et des bactéries témoins (T_b), rapportés aux quantités introduites.

Les témoins "eau + métaux" (T_1 à T_6) et les témoins "surnageants bactériens + métaux" (T_{S1} à T_{S6}) n'ayant pas montré d'interaction apparente sur les dosages des métaux ne sont pas discutés ici. En effet, il n'existe pas de différence significative entre ces témoins d'après le test statistique effectué sur ces données (les résultats du test statistique sont rapportés dans le tableau A16).

La figure 40 permet d'observer une forte fixation à $\text{pH } 6,5 \pm 0,1$ du cadmium ($75,6\% \pm 7,1$) et du zinc ($78,6\% \pm 12,3$) sur les bactéries, alors que le cuivre reste essentiellement dans le surnageant ($75,8\% \pm 5,9$) (moyennes et écarts-types des différentes concentrations testées). Les quantités fixées sur les parois des tubes restent voisines de 1,3 à 14,5% quels que soient le métal et les concentrations testées.

La part de cuivre fixé aux bactéries rapporté à la quantité initiale reste quasi constante, d'environ $16,3\% \pm 2,5$ même lorsque la concentration de métal ajouté augmente. Par contre, celle du zinc décroît pendant que sa fraction libre augmente de 88,7 à 56,3%. D'autre part, la fraction accumulée du cadmium augmente jusqu'à 85% puis diminue jusqu'à 63,6% lorsque la concentration en métal ajouté augmente.

La figure 41 confirme ces tendances en indiquant la part fixée de chaque métal par rapport aux parts respectives de deux autres. Ainsi la part fixée du zinc décroît de 49,3 à 41,8% ; celle du cadmium augmente de 38,8 à 47,3% tandis que celle du cuivre reste plus ou moins constante de 11,9 à 10,9% lorsque les concentrations ajoutées des trois sels passent de 3,15 à 100,7 $\mu\text{moles/l}$. En observant non plus les pourcentages mais les concentrations accumulées (Tableau A14), il apparaît que les concentrations en cuivre, en cadmium et en zinc accumulées augmentent régulièrement d'un facteur 2 environ, soit celui de la gamme de concentrations initiales.

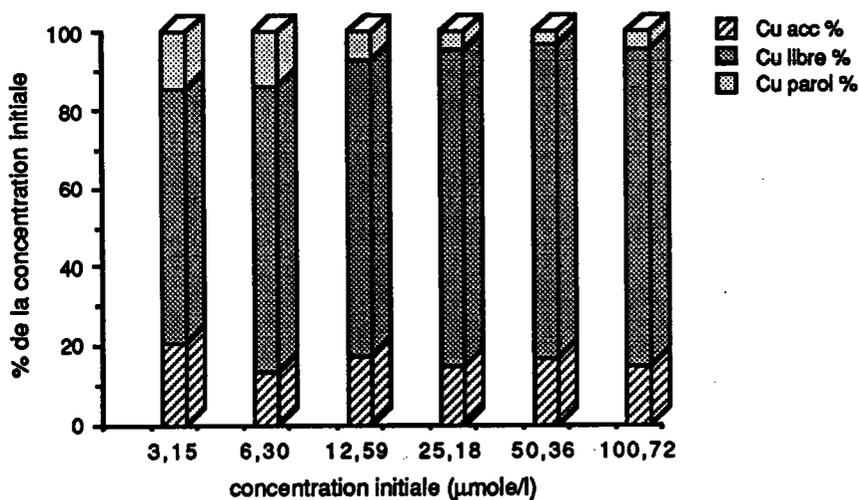
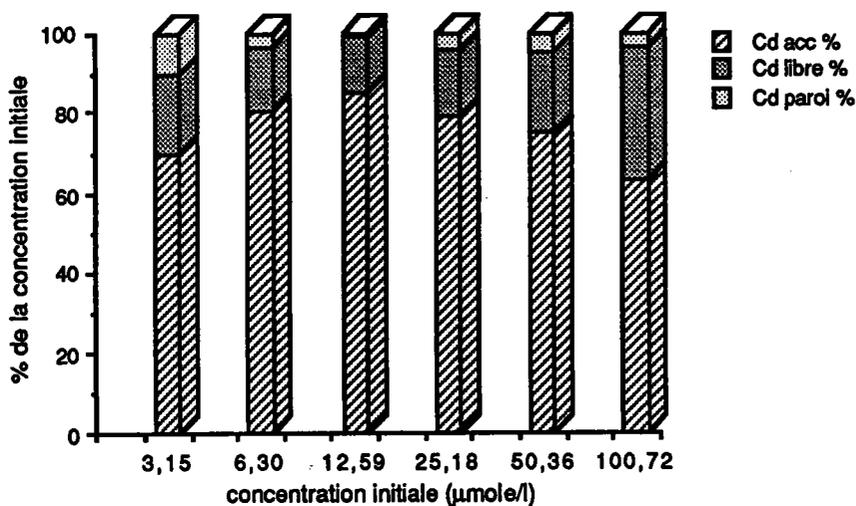
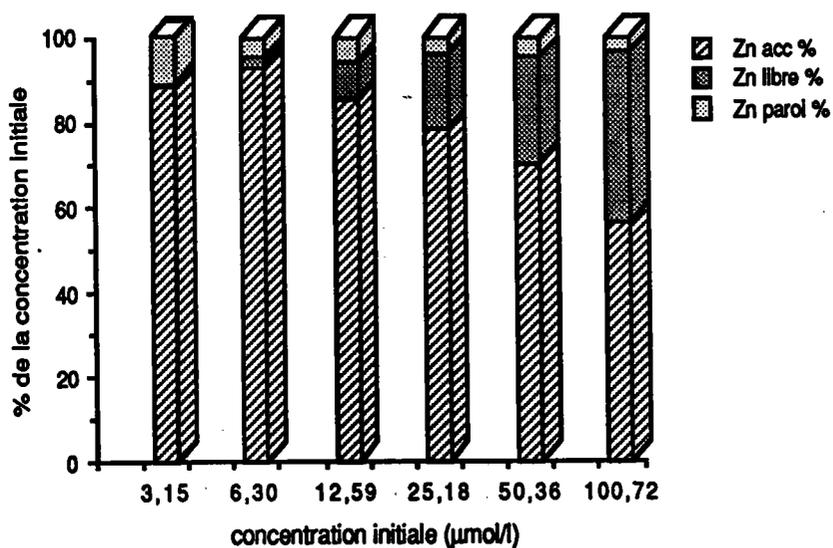
a) Cuivre**b) Cadmium****c) Zinc**

Figure 40 : Distribution entre les fractions "libre", fixée sur les parois, et liée à la biomasse (accumulée) pour chaque métal

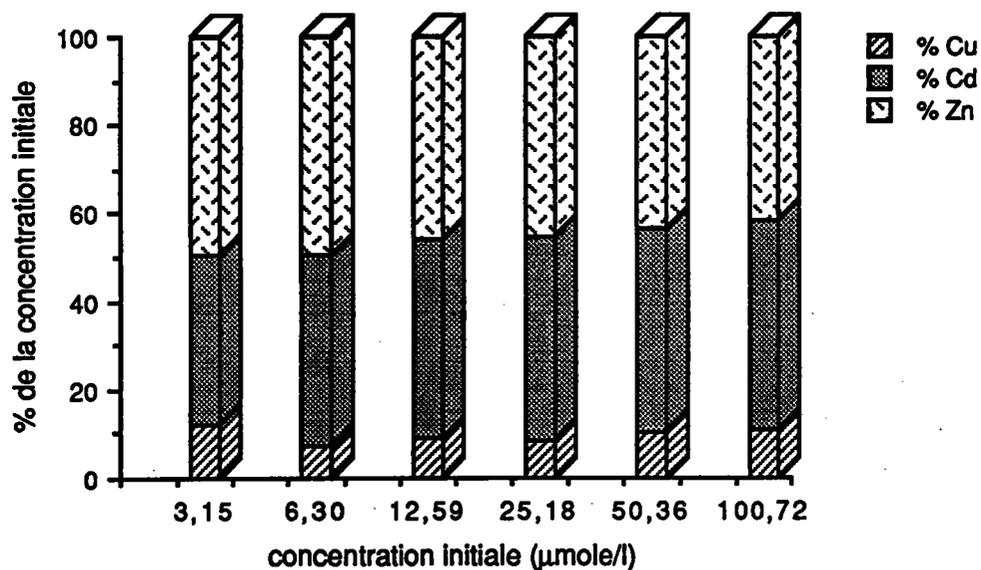


Figure 41 : Part de chaque métal Cu, Cd, Zn ($\mu\text{mole}/\text{mg}$ de poids sec), sur le total des 3 métaux accumulés ($\mu\text{mole}/\text{mg}$ de poids sec), exprimée en pourcentage

Pour chaque métal, l'isotherme d'adsorption de Freundlich a été représenté, pour pouvoir déterminer les "affinités relatives : métal-biomasse". Les isothermes sont représentés sur la figure 42 à partir des données du tableau A17, accompagnées des équations de régression respectives, déterminées graphiquement. "L'affinité relative : métal-biomasse" peut être définie par la constante K du complexe formé : K égale à [métal-biomasse] / [métal] [biomasse] dont K correspond à $e^{\log K}$. Ainsi, la figure 42 montre tout d'abord le cas du cuivre, lequel semble particulier : la courbe obtenue est biphasique, avec deux pentes différentes $1/n_1 = 0,625$ et $1/n_2 = 0,9902$. La première partie du graphe (pente $1/n_1$) peut être expliquée dans ce cas par une possible saturation de la matrice externe aux bactéries (paroi des tubes et/ou matrice organique). La deuxième partie du graphe (pente $1/n_2$) expliquerait alors l'accumulation du cuivre par les bactéries. Cette accumulation n'atteint pas la saturation pour les concentrations utilisées.

Pour le cadmium, la courbe est aussi biphasique avec deux pentes différentes $1/n_1 = 1,477$ et $1/n_2 = 0,615$. La première partie du graphe avec la pente la plus forte ($1/n_1$) correspond à l'accumulation du cadmium par les bactéries et la deuxième partie du graphe avec une pente moins forte ($1/n_2$) correspondrait à la phase de saturation.

Le zinc, quant à lui, montre une seule droite avec une seule pente $1/n = 0,4086$ qui traduit l'accumulation de ce métal par les bactéries sans atteindre la saturation pour les concentrations en métal utilisées.

Si "l'affinité relative : métal-biomasse" est donnée par K, les valeurs pour les métaux (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}) sont les suivantes :

pour le cuivre	$K = e^{-7,6849} = 4,60 \times 10^{-4} \text{ l/mg}$
pour le cadmium	$K = e^{-4,4551} = 1,16 \times 10^{-2} \text{ l/mg}$
pour le zinc	$K = e^{-3,5873} = 2,77 \times 10^{-2} \text{ l/mg}$

Ainsi, ces valeurs permettent de classer les métaux par leur "affinité" relative" dans l'ordre décroissant : $\text{Zn} > \text{Cd} > \text{Cu}$.

d) Résultats d'extraction des métaux

Les résultats de l'extraction des métaux par le N.T.A. sont regroupés dans le tableau A18 et exprimés en μmoles de métal/mg de poids sec, aussi en pourcentage de la quantité accumulée. Comme le montre la figure 43, les rendements d'extraction sont : 148% pour le cuivre, 95% pour le cadmium et 94% pour le zinc de la quantité fixée à la biomasse. Le résultat

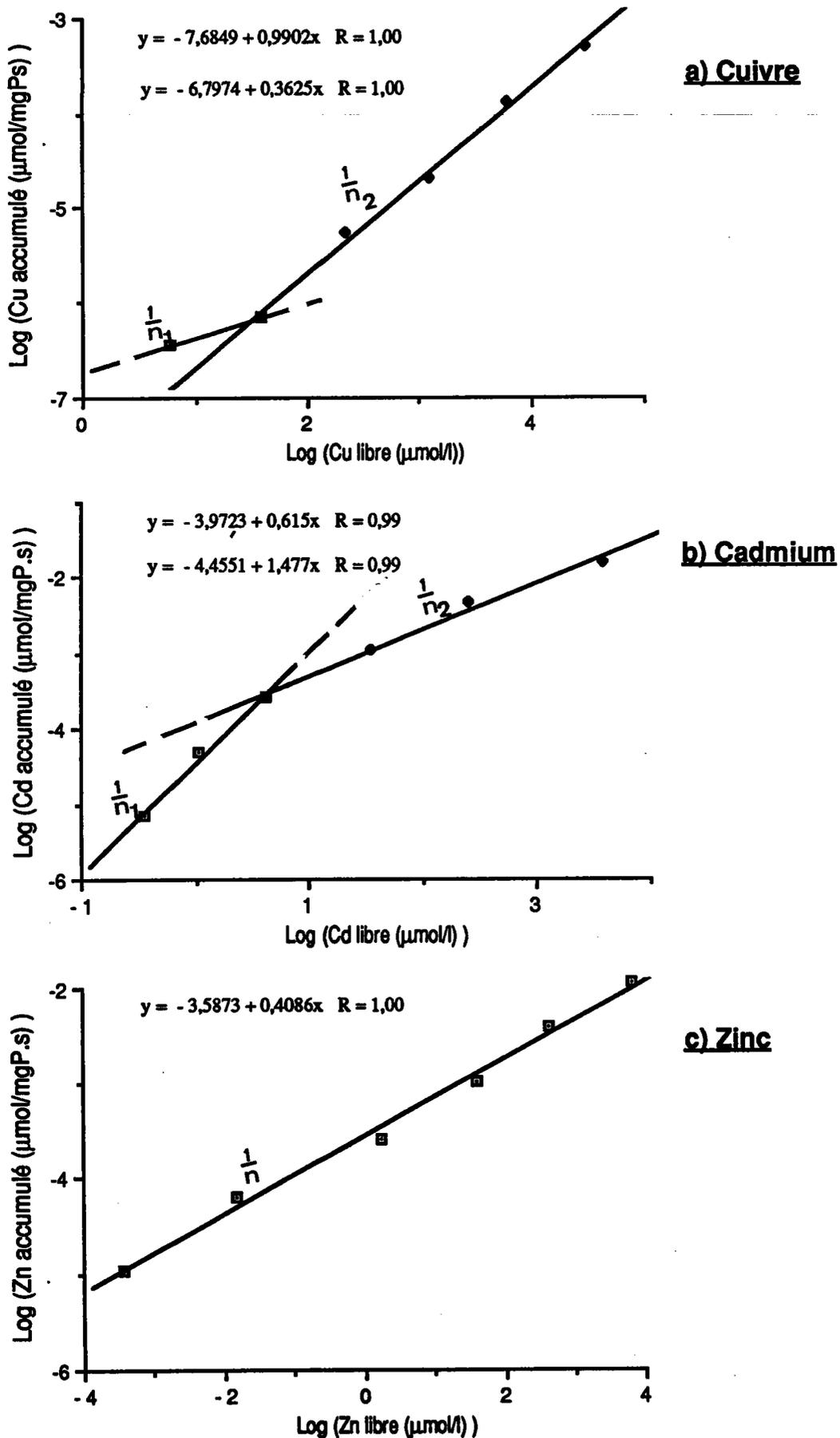


Figure 42 : Isothermes d'accumulation (modèle de Freundlich) pour Cu, Cd, Zn, chez *Pseudomonas fluorescens* contaminé après croissance

obtenu pour le cuivre peut être expliqué par les quantités désorbées des parois des tubes, ce qui confirmerait les résultats d'accumulation exprimés par les isothermes de Freundlich. Ainsi les métaux sont extraits dans un ordre décroissant : $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn}$.

Dans ce cas le N.T.A. extrait les métaux (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}) avec des rendements supérieurs à 90%. Pour cette raison, dans les essais suivants nous utiliserons non seulement le N.T.A. à une concentration de 10^{-3} mais aussi à $0,5 \times 10^{-3}$ et $0,25 \times 10^{-3}$ pour envisager la réduction de la concentration de N.T.A. jusqu'alors utilisée.

4.3.2. Extraction des métaux (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) de *P. fluorescens* contaminé en phase de croissance

Dans tous les essais précédents ayant été réalisés avec des bactéries précultivées et artificiellement contaminées par ajout de solutions métalliques, il est facile d'imaginer que l'accumulation des métaux par les bactéries est avant tout périphérique et l'extraction, du même coup, facile à réaliser. Aussi nous avons cherché à connaître dans quelle mesure les bactéries qui se multiplient en présence des métaux accumulent d'une "manière plus interne" (au niveau de la membrane cytoplasmique, cytoplasme ... ?). C'est pour se rapprocher des conditions rencontrées dans les bassins d'aération à boues activées, alimentés en continu par un effluent chargé en métaux, que dans cet essai la bactérie *Pseudomonas fluorescens* a été cultivée en bioréacteur alimenté en continu par une solution nutritive contaminée en sels de cuivre, cadmium, zinc à concentrations équimolaires de $100,7 \mu\text{moles/l}$.

a) Protocole d'accumulation

A partir d'un inoculum de *Pseudomonas fluorescens* âgé de 24 heures (10 ml), à la concentration ajustée de 10^8 bactéries/ml par mesure de la densité optique à 620 nm, un fermenteur Biolafitte contenant 500 ml de milieu nutritif (12,5 g de bouillon peptoné Bio Mérieux 5111/l d'eau distillée) stérile estensemencé dans des conditions aseptiques. Un ballon de bouillon alimente le bioréacteur à un débit constant, le surplus de suspension bactérienne du bioréacteur (le volume reste constant à 500 ml) est évacué au même débit dans un ballon de sortie où sont effectués les prélèvements pour le test d'extraction.

Le temps de contact, défini par l'inverse du taux de dilution (voir matériel et méthodes), était de 4 h 33 pour le milieu nutritif dans le bioréacteur. Le fermenteur était dans un premier temps alimenté avec un milieu peptoné stérile (12,5 g de bouillon peptoné Bio Mérieux 5111/l)

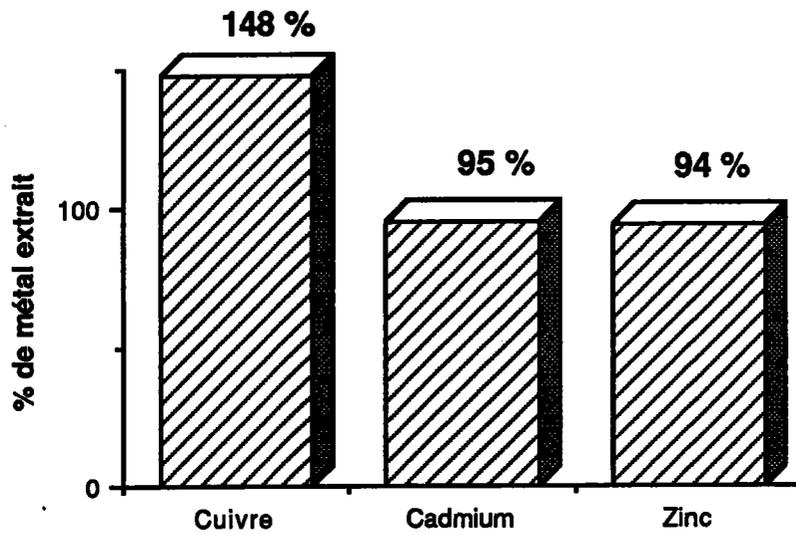


Figure 43 : Extraction par le complexant NTA à la concentration 10^{-3} mole/l de Cu, Cd, Zn, accumulés par *Pseudomonas fluorescens*.

jusqu'à ce que la croissance bactérienne atteigne la phase stationnaire, ce qui se traduit par une concentration bactérienne constante au cours du temps, mesurée par la densité optique à 620 nm. Ensuite le milieu nutritif était remplacé par une solution nutritive de même concentration contenant en plus les métaux (Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}) en quantités équimolaires initiales de 100,7 $\mu\text{moles/l}$: cette valeur a été choisie pour obtenir des quantités accumulées égales ou supérieures aux normes européennes relatives aux boues de station d'épuration (0,020 g de Cd, 1,00 g de Cu, 3,00 g de Zn par Kg de boues sèches). L'évolution de la concentration bactérienne était de nouveau suivie jusqu'à obtenir une nouvelle stabilisation de la densité optique de l'effluent en sortie du réacteur. Dans le cas où cette densité bactérienne devenait trop faible, la concentration en milieu nutritif a été augmentée de : 12,5 g/l diluée à 1/2 à 18,75 g/l diluée à 3/4, mais celle des métaux maintenue constante.

b) Protocole d'extraction

Des prélèvements à la sortie du bioréacteur ont été effectués pour les diverses mesures et les tests d'extraction. Ainsi, 60 ml d'échantillon étaient répartis dans 3 tubes à centrifuger. Ils étaient ensuite centrifugés à 23 000 g pendant 30 minutes puis traités de la façon suivante :

- les surnageants des 3 tubes permettaient un dosage en spectrophotométrie d'absorption atomique pour mesurer et quantifier la fraction libre de chaque métal

- les culots étaient mis en suspension dans 20 ml de N.T.A. à 1×10^{-3} M mais aussi à $0,5 \times 10^{-3}$ et $0,25 \times 10^{-3}$ à $\text{pH } 6,5 \pm 0,1$; ces deux dernières concentrations ont été choisies pour tester l'efficacité du complexant à des concentrations moins importantes que celle utilisée jusqu'à présent.

Le temps de contact était de 3 heures à 30°C sous agitation. Ensuite, ces tubes étaient centrifugés à 23 000 g pendant 30 minutes. Les quantités de cuivre, cadmium et zinc extraites étaient dosées directement dans le surnageant alors que les fractions résiduelles c'est-à-dire encore fixées aux bactéries étaient déterminées par spectrophotométrie d'absorption atomique à partir des culots minéralisés. Ces essais étaient menés en triplicat pour permettre de juger de la représentativité des mesures et de la reproductibilité du test.

Un dosage des métaux présents dans le milieu nutritif alimentant le bioréacteur a été effectué pour déterminer la part de métal fixée sur les parois du ballon contenant le bouillon nutritif, ainsi que les pertes éventuelles dues à l'autoclavage des milieux nutritifs, effectué avant leur utilisation.

La figure 44 traduit l'évolution de la densité bactérienne en fonction du temps. La stabilisation de cette concentration avant la contamination a nécessité environ 4 jours. Au temps $t_1 = 103$ heures (soit 4 jours 1/4) le milieu nutritif a été remplacé par un milieu nutritif de même concentration mais contenant les trois métaux ($100,7 \mu\text{moles/l}$). Dès les premières heures, une chute de la densité optique à 620 nm était enregistrée. Après une période de 24 heures celle-ci augmentait de nouveau jusqu'à une valeur constante, cependant inférieure à celle enregistrée avant contamination.

Pour obtenir une concentration bactérienne suffisante pour les expérimentations ultérieures, c'est-à-dire proche de celle observée avant intoxication, un changement de concentration en milieu nutritif était réalisé (de $12,5 \text{ mg/l}$ à $18,75 \text{ mg/l}$). Dans ces conditions (Figure 44), une augmentation de biomasse après le temps t_2 est observée avec une stabilisation de la concentration bactérienne aux environs de 3×10^6 bactéries/ml. Il faut ajouter que le pH du milieu était de 7,5 et à la sortie de 7,8 contre 6,5 lors des premiers essais.

c) Résultats de l'accumulation des métaux

Les résultats de l'accumulation des métaux dans les bactéries ont été calculés indirectement en additionnant les valeurs résiduelles dans les culots et les valeurs extraites dans le surnageant après extraction avec le N.T.A. ; la moyenne a été calculée à partir des valeurs obtenues pour chaque concentration de N.T.A. testée. Sur le tableau A19, elles sont exprimées en $\mu\text{moles/mg}$ de biomasse (poids sec) mais également en pourcentage de la concentration initiale.

Les taux de cadmium et de zinc accumulés (Figure 45) sont faibles par rapport aux résultats précédemment obtenus (cf paragraphe 4.3.1.c). En effet, ces valeurs qui étaient de 75,6% pour le Cd^{2+} et de 78,6% pour le Zn^{2+} sont ici respectivement de 14,3% et 5,1%. Le taux d'accumulation du cuivre, quant à lui, reste identique à celui observé lors des essais précédents, soit 12,3%. La fraction libre reste donc élevée pour les trois métaux.

Le calcul de la part respective de chaque métal dans le total accumulé (Figure 46) donne pour le cuivre 39% du total des trois métaux accumulés contre 10,9% aux essais précédents. Le total des trois métaux accumulés est ici égal à $0,1098 \mu\text{mole/mg}$ de biomasse sèche soit environ 3 fois moins que la valeur mesurée au cours des premiers essais ($0,3174 \mu\text{mole/mg}$ de biomasse sèche). Les quantités accumulées, pour chaque métal, exprimées en $\mu\text{moles/mg}$ de biomasse sèche sont 0,0428 pour Cu^{2+} , 0,050 pour Cd^{2+} et 0,017 pour Zn. Elles ont été également calculées en mg/g de biomasse sèche et sont respectivement 2,72 ; 5,62 et 1,16.

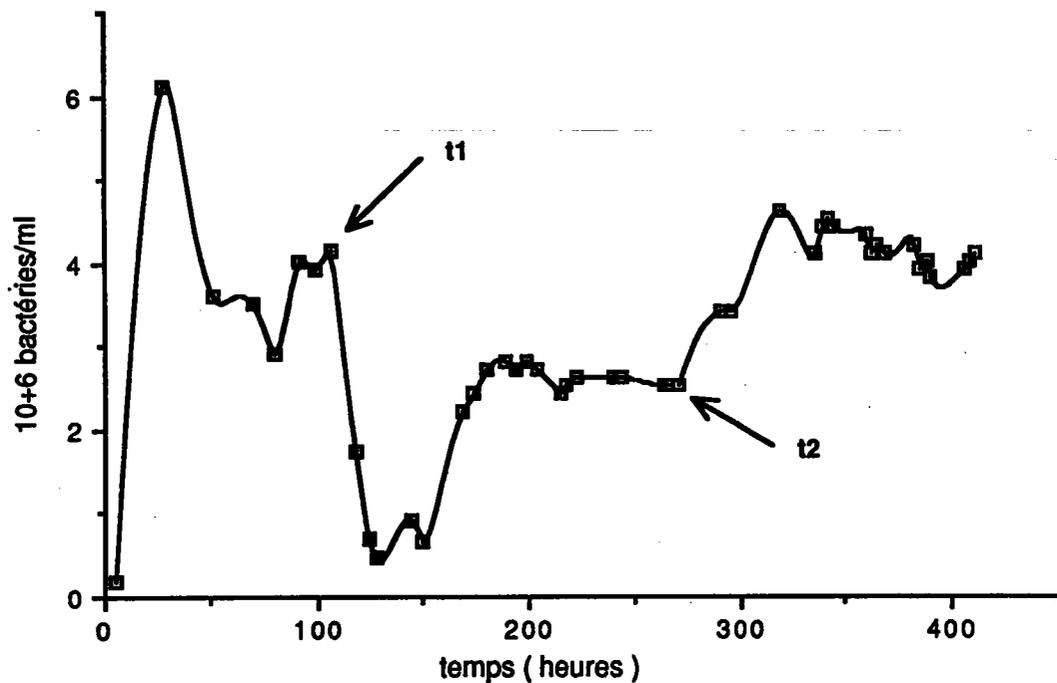


Figure 44 : Evolution de la concentration bactérienne au sein du bioréacteur au cours du temps,

t1; alimentation du bioréacteur par un milieu contaminé par Cu,Cd,Zn

t2; augmentation de la concentration du bouillon nutritif,sans modification de concentration en métaux

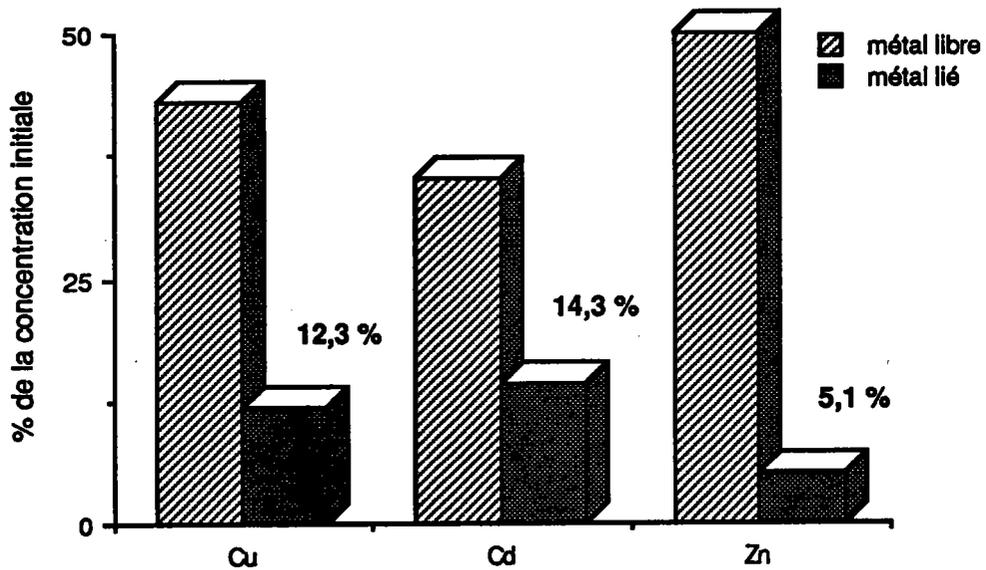


Figure 45 : Accumulation de Cu, Cd, Zn, chez *Pseudomonas fluorescens* contaminé en phase de croissance en culture continue (chemostat)

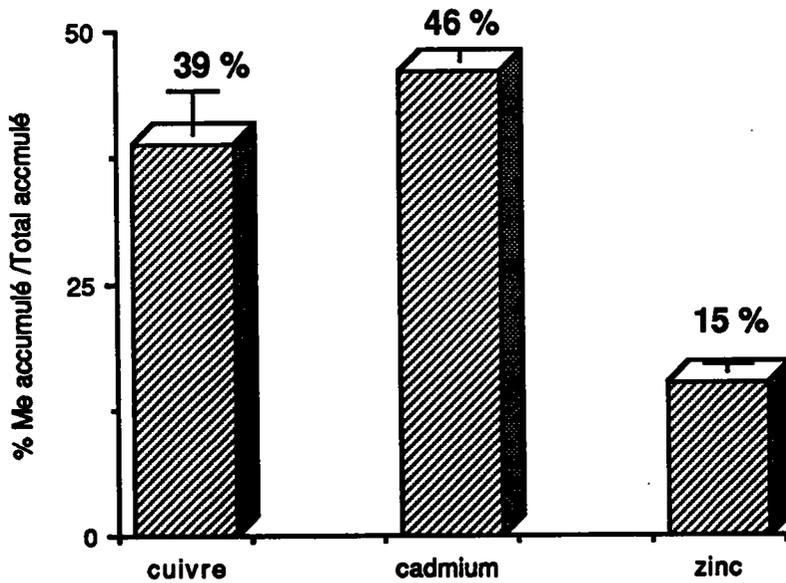


Figure 46 : Part de chaque métal Cu, Cd, Zn ($\mu\text{mole}/\text{mg}$ de poids sec), sur le total des 3 métaux accumulés ($\mu\text{mole}/\text{mg}$ de poids sec), exprimée en pourcentage

d) Résultats de l'extraction des métaux

Les résultats de l'extraction des métaux (Tableau A20) ont été mis sous forme d'histogrammes (Figure 47). Il apparaît clairement que le cadmium présente le plus fort taux d'extraction suivi du zinc puis du cuivre. Les taux d'extraction, quelle que soit la concentration en N.T.A., sont supérieurs à 78% pour le cadmium, en moyenne 57% pour le zinc, mais augmente de 33% à 52,2% dans le cas du cuivre en fonction de la concentration en N.T.A. : l'ordre d'extraction décroissant est $Cd^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+}$ quelle que soit la concentration en N.T.A. De même, la quantité totale des trois métaux extraits augmente en fonction de la concentration de 57% à 63%.

Pour ces raisons, le test d'extraction en vue de son application sur des échantillons de boues de station d'épuration a été conduit avec les concentrations en N.T.A. les plus élevées.

4.3.3. Application sur les boues de station d'épuration

L'objet de cette dernière partie est de mesurer la fraction maximale extractible des métaux (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) accumulés dans les boues de station d'épuration pour pouvoir décider de l'opportunité d'une extraction de ces métaux sur le plan industriel et rendre possible l'utilisation de ces boues en agriculture. Ce test a concerné deux lots d'échantillons de boues, le premier prélevé à la station d'épuration de Metz et le second à la station d'épuration de Bordeaux, réputée pour subir une forte contamination métallique (Metz : bassin d'aération, filtre-pressé ; Bordeaux : décanteur secondaire, digesteur et filtre-pressé).

a) Protocole

Pour chaque échantillon de boues, une quantité équivalente à 10 mg de matière sèche était mise en suspension dans 20 ml d'une solution de N.T.A. 10^{-3} M au pH de $6,5 \pm 0,1$ dans un tube à centrifuger. Les tubes (3 par échantillon) étaient placés en agitation dans un bain-marie thermostaté à $30^{\circ}C$ pendant 3 heures puis centrifugés à 23 000 g pendant 30 minutes.

Les surnageants ont permis de mesurer par un dosage direct en spectrophotométrie d'absorption atomique les quantités de métaux extraites par le N.T.A.

Les culots étaient minéralisés pour permettre la mesure des quantités résiduelles de chaque métal. Un bilan "quantité extraite + quantité résiduelle" donnait une valeur de la quantité accumulée avant extraction pour chaque métal dans chaque échantillon.

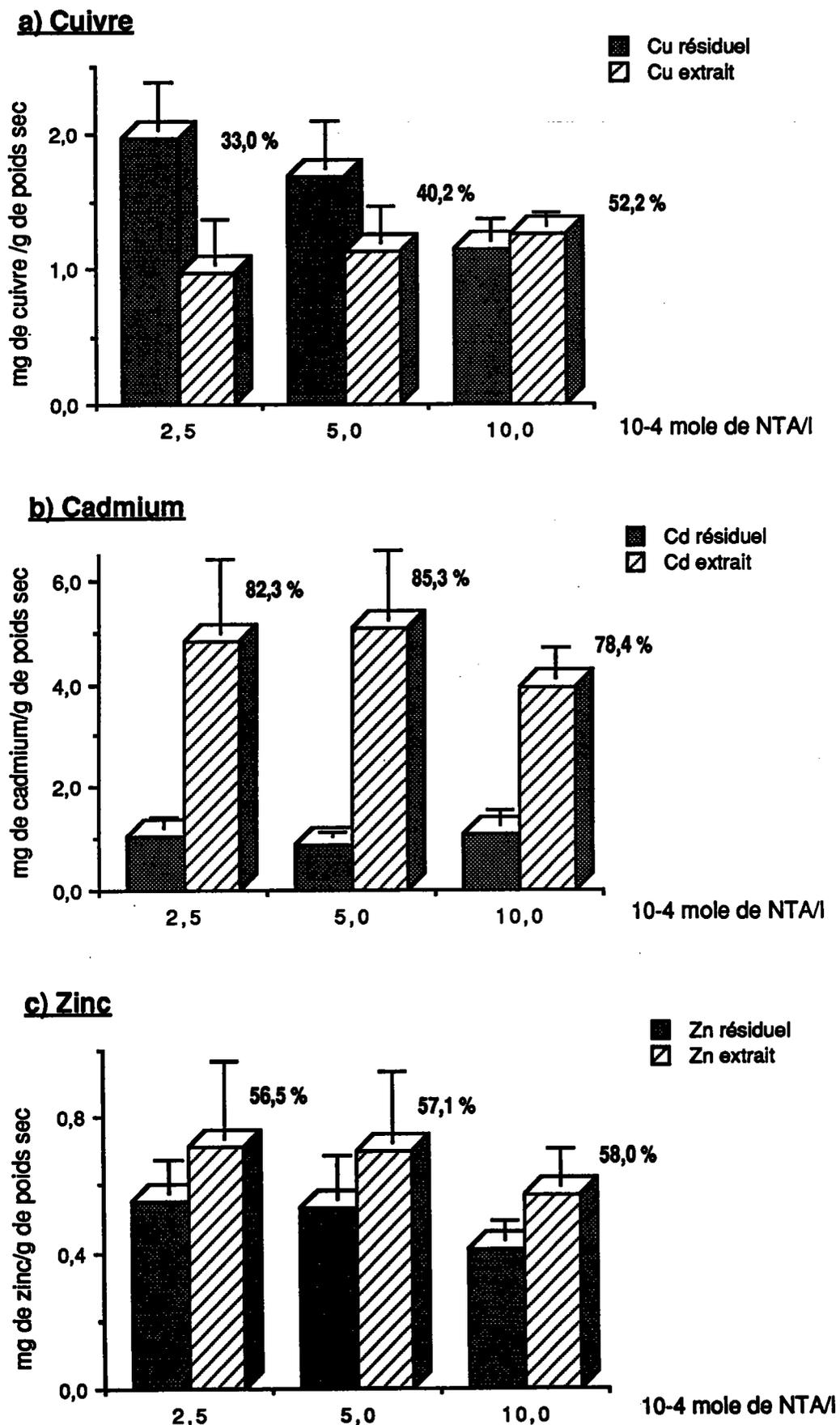


Figure 47 : Extraction par NTA aux concentrations de 2,5; 5,0 et 10,0 10^{-4} M de Cu, Cd, Zn accumulés par *Pseudomonas fluorescens* contaminé en phase de croissance, en bioréacteur

b) Résultats

Les résultats sont rassemblés dans le tableau A21 et résumés dans le tableau 25. Les concentrations de Cu^{2+} , Cd^{2+} et Zn^{2+} selon les échantillons se situent entre 0,078 et 0,94 ; 0,027 et 0,454 ; 0,745 et 2,357 mg/g poids sec respectivement.

Ainsi les boues de Bordeaux sont plus chargées en métaux que celles de Metz : le cadmium est 3 à 20 fois plus concentré, le cuivre 2 à 12 fois plus concentré et le zinc 2 à 3 fois plus important dans les échantillons de Bordeaux.

Dans le cas de boues de Bordeaux, il apparaît une différence entre les teneurs de trois types de boues pour chaque métal. La concentration augmente pratiquement toujours d'un facteur 1,5 des boues de décanteur secondaire aux boues digérées et celles-ci aux boues déshydratées. Dans le cas de Metz, les valeurs observées pour les boues de filtre-presse sont inférieures sauf dans le cas du cadmium, à celles des boues activées.

Enfin, l'ordre d'importance des trois métaux selon leur niveau de concentration, quelle que soit l'origine des échantillons, est $\text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$. Les teneurs dans ces boues comparées aux valeurs seuils fixées par la norme française (U44-041) relative aux boues de station d'épuration indiquent (Tableau 25) que :

- dans le cas de Metz, les valeurs restent en dessous des normes, avec cependant des teneurs proches de la limite pour le cadmium
- dans les échantillons de Bordeaux, les valeurs seuils sont largement dépassées dans le cas du cadmium, limite pour le cuivre, mais pas dans le cas du zinc.

Les tests d'extraction appliqués à ces boues doivent autant que possible extraire les trois métaux pour réduire leurs concentrations en dessous des seuils. Les résultats des essais rassemblés dans le tableau A21 sont résumés dans le tableau 25.

Toutefois pour le cuivre, le pourcentage d'extraction se situe en moyenne à 2,5-3% du total accumulé. Le taux d'extraction du cadmium est faible mais supérieur à celui du cuivre (7,6 à 11,2%). Le zinc semble légèrement plus facile à extraire avec des taux de 10% en moyenne et jusqu'à 16,6%. L'ordre d'extraction décroissant est : $\text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$.

Aussi les concentrations résiduelles sont très élevées, proches des concentrations initiales, supérieures aux normes lorsque les concentrations initiales l'étaient, indiquant une très grande difficulté à "nettoyer" les biomasses ainsi contaminées.

Tableau 25 : Quantités accumulées dans les échantillons des boues de station d'épuration et taux d'extraction observés après application du test d'extraction au NTA. $10^{-3}M$.

Origine des boues	Cuivre		Cadmium		Zinc	
	concentration totale (mg/g de poids sec)	% extrait	concentration totale (mg/g de poids sec)	% extrait	concentration totale (mg/g de poids sec)	% extrait
METZ bassin d'aération	0,32 (0,015)	2,8 (0,6)	0,027 (0,002)	7,6 (2,9)	1,853 (0,81)	6,2 (0,1)
METZ filtre-presse	0,078 (0,009)	26,2 (4,1)	0,0237 (0,001)	11,2 (1,9)	0,745 (0,12)	1,2 (0,3)
BORDEAUX Décanteur secondaire	0,396 (0,013)	3,7 (0,3)	0,0705 (0,005)	10,7 (0,6)	1,085 (0,022)	13,7 (0,5)
BORDEAUX digesteur	0,635 (0,024)	3,4 (0,6)	0,339 (0,076)	10,3 (0,5)	1,6 (0,036)	14,6 (0,1)
BORDEAUX filtre-presse	0,94 (0,036)	1,3 (0,1)	0,454 (0,015)	8,9 (0,9)	2,357 (0,129)	9,7 (1,5)
Norme U 44 041	1,000.		0,020.		3,000.	

4.4. DISCUSSION

Les résultats, obtenus au cours des trois étapes réalisées pour la mise au point et application du test prédictif d'extraction par un complexant organique de synthèse des métaux cadmium, cuivre et zinc accumulés dans une biomasse de type boue activée, apportent des informations importantes concernant l'affinité de ces trois métaux pour la biomasse bactérienne, et leur accumulation au sein de cette biomasse selon le mode de contamination de la bactérie testée, *Pseudomonas fluorescens*. Les valeurs d'extraction par un complexant de type N.T.A. confirment les affinités "métal-bactérie" observées, mais permettent aussi de bien mettre en évidence le rôle du complexant (sa nature et sa concentration), le rôle du métal, et l'effet de la voie de contamination de la biomasse sur le rendement d'extraction des trois métaux. Enfin, elles permettent d'évaluer la validité du test appliqué sur des échantillons de boues de station d'épuration.

L'accumulation des trois métaux (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) dépend des conditions expérimentales. En effet, les quantités accumulées changent en fonction de la voie de contamination de la biomasse. Ainsi, l'ordre décroissant des accumulations des métaux peut s'écrire :

$\text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ (biomasse contaminée après croissance)

$\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ (biomasse contaminée en phase de croissance).

Dans la plupart des cas, le zinc et le cadmium sont accumulés en plus grande quantité que le cuivre, en accord avec les résultats d'accumulation des métaux (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) sur les enveloppes bactériennes (voir chapitre 4.2.4.). Le cuivre est accumulé en moins grande quantité surtout par les biomasses contaminées après croissance. En contradiction avec les résultats de BROWN *et al.* (1982) et RUDD *et al.* (1984), indiquant de plus fortes quantités de cuivre accumulé par rapport aux autres métaux. Les faibles quantités de cuivre mais aussi celles de zinc (dans le cas des biomasses contaminées en phase de croissance) seraient en partie expliquées par la complexation du métal avec les molécules organiques du milieu. Seule la classification selon l'affinité décroissante $\text{Cd} > \text{Cu} > \text{Zn}$ correspond à celle observée par GOULD et GENTELLI (1984) et AHLIBAI *et al.* (1985) dans les boues activées.

De toutes façons, les trois métaux utilisés ici sont accumulés dans nos expériences en concentration / unité de poids de la biomasse, en quantités moins importantes par rapport aux résultats d'autres auteurs : RUDD *et al.* (1983) pour le cuivre, SHAHWANI (1984) pour le zinc et FLATAU *et al.* (1987) pour le cadmium, qui trouvent une accumulation très élevée de ces métaux respectivement sur des structures bactériennes type exopolymères ou par des bactéries après croissance ou en phase de croissance.

En ce qui concerne les boues de station d'épuration de Metz et de Bordeaux, les quantités accumulées des métaux dans un ordre décroissant sont : $Zn > Cu > Cd$ en accord avec les résultats cités par COLIN (1982). Cet ordre est en partie confirmé par les concentrations de ces métaux ($Zn > Cu > Cd$) trouvées communément dans d'autres boues de station d'épuration citées par d'autres auteurs (WONIAK et al., 1982). L'augmentation de la concentration en Cu, Cd et Zn au cours du traitement d'une boue de station d'épuration a été aussi observée par LEGRET et al. (1987).

L'efficacité de l'extraction par le N.T.A. dépend aussi de la nature du métal et surtout du mode de contamination et de la nature de la biomasse. Ainsi, le rendement global d'extraction diminue, passant d'environ 100% à 60% puis 10% respectivement pour *Pseudomonas fluorescens* contaminé après croissance, en phase de croissance, et pour les boues de station d'épuration. L'extraction des métaux par le N.T.A., dans les cas de boues de station d'épuration va dans le sens des observations de nombreux auteurs : LEGRET et al. (1985, 1987) qui classent l'extraction des métaux par acidification : $Zn > Cu > Cd$; LINDSAY et NORWELL (1978) par extraction avec le TPA : $Zn > Cu$. D'une manière générale, quelle que soit la méthode utilisée pour extraire les métaux des boues, les auteurs cités par BROWN et LESTER (1979) classent ces métaux dans l'ordre décroissant $Zn > Cu > Cd$.

Il faut signaler que les boues de station d'épuration représentent un mélange très complexe, où se retrouvent la biomasse bactérienne et d'autres matrices organiques et minérales au sein desquelles les métaux peuvent se fixer, expliquant les faibles pourcentages d'extraction des métaux dans les boues par rapport aux résultats obtenus avec des biomasses moins contaminées (par d'autres matrices minérales et organiques).

5. CONCLUSIONS

Le principal objectif du travail de recherche présenté dans ce mémoire visait à évaluer le rôle des enveloppes bactériennes dans l'accumulation de métaux.

A cet égard, *Pseudomonas fluorescens*, microorganisme très répandu dans l'environnement, a été utilisé comme modèle et un protocole de séparation de différentes enveloppes (membrane externe, peptidoglycane et membrane cytoplasmique) a été mis au point.

Sur chacune de ces fractions isolées, l'accumulation et l'affinité de métaux (Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+}) ont été testées afin de classer à la fois le métal et la structure étudiée, et d'évaluer l'importance des groupements carboxyliques dans ces phénomènes. Ces résultats ont été confortés par des essais d'extraction des métaux en laboratoire sur des cellules de *Pseudomonas fluorescens* contaminées après et pendant croissance, ainsi que sur boues de station d'épuration.

Les principaux résultats obtenus sont les suivants :

(1) Le protocole mis au point à partir d'une étude critique de la littérature a permis d'isoler les trois enveloppes : la membrane externe, le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique de *P. fluorescens* en tentant de limiter les contaminations. Ainsi 1,18% et 1,94% du 2-céto-3-déoxyoctanate (K.D.O.) de la bactérie entière (marqueur spécifique de la membrane externe) ont été dosés respectivement dans le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique. De même 3,5% et 4,3% des hexosamines de la bactérie (marqueur choisi pour caractériser le peptidoglycane) ont été dosés respectivement dans la membrane externe et la membrane cytoplasmique. Le marqueur de la membrane cytoplasmique n'a pas été détecté dans les deux autres fractions. Les pertes de matériel cellulaire restent toutefois assez importantes : 84,7% de K.D.O., 47,2% d'hexosamines, 67% de protéines et 68,09% du phosphore sont perdus lors du protocole d'extraction.

(2) La masse respective de chacune de ces enveloppes est égale à 6,96% pour la membrane externe, 5,3% pour le peptidoglycane et 6,12% pour la membrane cytoplasmique de la bactérie entière (poids sec).

(3) L'accumulation de Cd^{2+} exprimée selon l'équation de Scatchard montre l'existence d'au moins deux types de sites de fixation dits à forte et à faible affinité caractérisés par leurs constantes K_a et K_a' respectivement. Ainsi ces constantes calculées pour chaque enveloppe étaient respectivement de : ($K_a = -13,1$ et $K_a' = -0,96$) pour la membrane externe ;

($K_a = - 9,51$ et $K_a' = - 2,09$) pour le peptidoglycane et ($K_a = - 3,78$ et $K_a' = - 0,36$) pour la membrane cytoplasmique.

Pour les fractions non modifiées il est possible de classer les récepteurs dits à forte affinité dans l'ordre décroissant :

M. ext > P.G. > M. C.

et les récepteurs dits à faible affinité :

P.G. > M. ext > M.C.

Malgré le blocage des fonctions carboxyliques par un ensemble de réactions chimiques ayant pour but de masquer ces groupements en les transformant en groupements électropositifs, pour le Cd^{2+} ces deux types de sites de fixation sont toujours mis en évidence avec ($K_a = - 25,3$; $- 22,55$; $- 4,48$ et $K_a' = - 1,20$; $- 2,96$; $- 1,23$) respectivement pour la membrane externe, le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique.

(4) L'accumulation de Ni^{2+} exprimée selon l'équation de Scatchard montre là encore l'existence d'au moins deux types de sites de fixation à forte et à faible affinité avec deux constantes K_a et K_a' respectivement : ($K_a = - 5,62$ et $K_a' = - 0,025$) pour la membrane externe, ($K_a = - 6,43$ et $K_a' = - 0,355$) pour le peptidoglycane et ($K_a = - 5,55$ et $K_a' = - 1,445$) pour la membrane cytoplasmique.

Pour les fractions non modifiées il est possible de classer les récepteurs dits à faible affinité dans l'ordre décroissant :

M.C. > P.G. > M. ext

En ce qui concerne les récepteurs à forte affinité les différences entre les constantes K_a sont très faibles et les trois fractions étudiées peuvent être considérées comme ayant un comportement identique.

Le blocage des fonctions carboxyliques entraîne dans le cas du Ni^{2+} la disparition des sites à forte affinité pour ce métal avec une seule constante K_a' : ($K_a' = - 0,323$; $- 0,266$; $- 0,713$) respectivement pour les récepteurs à faible affinité de la membrane externe, peptidoglycane et la membrane cytoplasmique.

(5) L'accumulation de Cu^{2+} par les enveloppes de *P. fluorescens* montre aussi l'existence d'au moins deux types de sites de fixation avec deux constantes, K_a pour les récepteurs à forte affinité et K_a' pour les récepteurs à faible affinité : ($K_a = -0,039$ et $K_a' = -0,006$) pour la membrane externe, ($K_a = -0,051$ et $K_a' = -0,009$) pour le peptidoglycane et ($K_a = -0,010$ et $K_a' = -0,0028$) pour la membrane cytoplasmique.

Pour les fractions non modifiées les récepteurs à forte et à faible affinité sont classés dans l'ordre décroissant :

P.G. > M. ext > M.C.

Le blocage des fonctions carboxyliques entraîne aussi la disparition de sites à forte affinité, et montre l'existence d'un seul type de site de fixation avec une seule constante $K_a' = -0,005$; $-0,0047$; $-0,0028$ respectivement pour la membrane externe, le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique.

(6) L'accumulation de Zn^{2+} exprimé selon l'équation de Scatchard montre, comme pour les autres trois métaux, l'existence d'au moins deux types de sites de fixation du métal avec deux constantes K_A et K_A' respectivement pour les sites à forte et à faible affinité : ($K_a = -19,14$ et $K_a' = -6,62$) pour la membrane externe, ($K_a = -10,53$ et $K_a' = -3,43$) pour le peptidoglycane et ($K_a = -34,7$ et $K_a' = -3,1$) pour la membrane cytoplasmique.

Pour les fractions non modifiées les récepteurs à forte affinité sont classés dans l'ordre décroissant :

M.C. > M. ext > P.G.

et pour les sites à faible affinité :

M. ext > P.G. > M.C.

Le blocage des fonctions carboxyliques entraîne dans ce cas la disparition des sites à forte affinité dans la membrane externe et le peptidoglycane avec comme seule constante d'affinité $K_a' = -2,49$ pour la M. ext et pour le P.G. - 1,48 . Par contre, la membrane cytoplasmique présente toujours, après masquage des groupements carboxyliques, deux types de sites de fixation du métal $K_a = -16,3$ et $K_a' = -2,0$.

(7) L'accumulation des métaux (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) par les cellules de *P. fluorescens* dépend de la voie de contamination de ces cellules (exprimées en % de la quantité mise initialement) après ou pendant leur phase de croissance sont différentes et respectivement de : 75,6% et 16,3% pour le Cd^{2+} ; de 78,6% et 5,1% pour le Zn^{2+} ; et de 14,7% et 12,3% pour le Cu^{2+} . Ces différences s'expliquent sans doute dans notre expérimentation par la faible disponibilité des métaux ajoutés au milieu de culture permettant la croissance.

(8) L'extraction des métaux (Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) par l'acide nitrilotriacétique (N.T.A.) de *Pseudomonas fluorescens* contaminé pendant ou après la phase de croissance et des boues issues de station d'épuration fait clairement ressortir la difficulté à extraire ces métaux. Cet ensemble d'observations montre que les enveloppes cellulaires jouent sans aucun doute un double rôle : d'une part dans le piégeage des métaux et, d'autre part, comme barrière entre les milieux intra- et extracellulaire.

Ainsi, pour les bactéries contaminées après croissance, il est possible d'extraire 90% des métaux accumulés ; tandis que pour des bactéries contaminées en continu au cours de leur croissance, il n'est possible d'extraire que 60% des métaux accumulés. Enfin, pour des boues de station d'épuration (mélange complexe où les métaux se trouvent sous forme de précipités ou liés aux biopolymères intra- et extracellulaire), il n'est possible d'extraire que 10% environ des métaux présents.

6. BIBLIOGRAPHIE

AARONSON S., 1981,

Chemical communication at the microbial level.

CRC Press, Volume 1, Boca Raton. Fla.

ADAMS F., 1965,

Manganese. Methods of soil analysis, part 2.

in C.A. Black et al. (éd) : Madison, Wis. Am. Soc. Agron., 9, 1011-1018.

ADAMS T. McM. et J.R. SANDERS, 1984,

Solution of zinc, copper and nickel from metal-loaded sewage sludges,

Environ. Pollut. (série B), 8, 85-99.

AFNOR, 1985,

Matières fertilisantes - Boues des ouvrages de traitement des eaux usées.

Norme NFU44-041, 11 p..

AHRLAND S., I. CHAM et N.R. DAVIS, 1958,

The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions,

Quart. Rev., 12, 265-276.

AIKING H., K. KOK, H. VANHEERIKHUIZEN et J. VAN'T RIET, 1982,

Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide,

Appl. Environ. Microbiol., 44, 938-944.

AJMAL M., A. AHMAD ET A.A. NOMANI, 1982,

Microbial uptake of cadmium and its effects on the biochemical oxygen demand at various temperatures,

Wat. Res., 16, 1611-1614.

ALIBHAI K.R.K., I. MEHROTRA et C.F. FORSTER, 1985,

Heavy metal binding to digested sludge,

Wat. Res., 19, 1483-1488.

AMINOFF D., 1961,

Methods for the quantitative estimation of N-acetyl neuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids,

J. Biochem., 81, 384-392.

AMMANN P., C. SCHWEIZER, C. WYSS et F. KISLIG, 1979,
Bilan des métaux lourds dans le bassin versant d'une station d'épuration.
Rapport Ecole Polytechnique de l'Ecole de Lausanne, 123 p..

ANDERSSON A., 1975,
Relative efficiency of nine different soil extractans,
Swed. J. Agric. Res., **5**, 125-135.

ANWAR H., M.R.W. BROWN, R.M. COZENS et P.A. LAMBERT, 1983,
Isolation and characterization of the outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas cepacia*,
J. Gen. Microbiol., **129**, 499-507.

AUGER P., M.D. GRMEK et M. CAZIN, 1970,
Encyclopédie Internationale des Sciences et des Techniques. MORVAN R.G. (éd), vol : 2, 4,
8, 10.

BABICH H. et G. STOTZKY, 1978,
Effect of cadmium on the biota, influence of environmental factors,
Adv. Appl. Microbiol., **23**, 55-117.

BABICH H. et G. STOTZKY, 1982,
Influence of chloride ions on the toxicity of cadmium to fungi,
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., **3**, 421-426.

BADDILEY J., I.C. HANCOCK et P.M.A. SHERWOOD, 1973,
X-ray photoelectron studies of magnesium ions bound to the walls of gram positive bacteria,
Nature (LONDON), **243**, 43-45.

BALLS P.W., 1985,
Copper, lead and cadmium in coastal waters of the western north sea,
Marine Chem., **15**, 363-378.

BARICA J., M.P. STAINTON et A.L. HAMILTON, 1973,
Mobilization of some metals in water and animal tissue by NTA, EDTA and TPP,
Wat. Res., **7**, 1791-1804.

BARON J., 1987,

La fixation des métaux lourds (Cu et Cd) dans les boues de station d'épuration,

D.E.A. de Chimie et Microbiologie de l'eau, Université de Poitiers.

BAUDA P. et J.C. BLOCK, 1985,

Cadmium biosorption and toxicity to laboratory-grown bacteria,

Environ. Technol. Letters, **6**, 445-454.

BAUDA P., 1986,

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

Thèse de Doctorat, C.S.E., Université de Metz.

BEAUJEU-GARNIER J., A. GAMBLIN et A. DELOBEZ, 1988,

Images économiques du monde 1988, Sedes, 33e année, 48-53.

BENES P. et E. STEINNES, 1974,

In situ dialysis for the determination of the state of the trace elements in natural water,

Wat. Res., **8**, 947-953.

BENZ R., 1985,

Porin from bacterial and mitochondrial outer membranes,

C.R.C. Critical Rev. in Biochem., **19**, 145-190.

BENZ R., 1985,

Ion selectivity of gram negative bacterial porins,

J. Bacteriol., **162**, 722-727.

BEVERIDGE T.J. et R.G.E. MURRAY, 1976,

Uptake and retention of metals by cell walls of *Bacillus subtilis*,

J. Bacteriol., **127**, 1502-1518.

BEVERIDGE T.J. et R.G.E. MURRAY, 1980,

Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*,

J. Bacteriol., **141**, 876-887.

BEVERIDGE T.J. et J.F. KOVAL, 1981,

Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12,

Appl. Environ. Microbiol., **42**, 325-335.

- BEVERIDGE T.J., 1981,
Ultrastructure, chemistry and function of the bacterial cell wall,
Int. Rev. Cytol., 72, 229-317.
- BEVERIDGE T.J., C.W. FORSBERG et R.J. DOYLE, 1982,
Major sites of metal binding in *Bacillus licheniformis* walls,
J. Bacteriol., 150, 1438-1448.
- BEVERIDGE T.J. et J.A. DAVIES, 1983,
Cellular responses of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to the gram stain,
J. Bacteriol., 156, 846-858.
- BEVERIDGE T.J., 1984,
Mechanisms of the binding of metallic ions to bacterial walls and the possible impact on microbial ecology.
in Microbial Ecology, KLUG M.J. et C.A. REDDY (eds), American Society for Microbiology, Washington, 601-607.
- BIRDSELL D.C. et E.H. COSTA-ROBLES, 1976,
Production and ultrastructure of lysozyme and ethylenediaminetetra acetate-lysozyme spheroplasts of *Escherichia coli*,
J. Bacteriol., 93, 427-437.
- BITTON G. et V. FREIHOFFER, 1978,
Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium toward *Klebsiella aerogenes*,
Microb. Ecol., 4, 119-125.
- BLUNDELL T.L. et J.A. JENKINS, 1977,
The binding of heavy metals to proteins,
Chem. Soc. Rev., 6, 139-171.
- BOOTH B.R. et N.A.C. CURTIS, 1977,
Separation of the cytoplasmic and outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PAO.1,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 74, 1168-1176.
- BORDONS A. et J. JOFRE, 1987,
Extracellular adsorption of nickel by a strain of *Pseudomonas sp.*,
Enzyme Microb. Technol., 9, 709-713.

BOURG A.C.M., 1984,

Adsorption of trace elements by suspended particulate matter in aquatic systems.

Manuscript prepared for the special task group on "Trace elements in natural waters" of the analytical chemistry division (Commission V.6) of the International Union of Pure and Applied Chemistry.

BRADFORD M.M., 1976,

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding,

Ann. Biochem., 72, 248-254.

BRODA E., 1972,

The uptake of heavy trace elements by microorganisms,

Ann. Microb., 22, 93-108.

BROWN M.J. et LESTER J.N., 1979,

Metal removal in activated sludge : the role of bacterial extracellular polymers,

Wat. Res., 13, 817-837.

BROWN M.J. et J.N. LESTER, 1980,

Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods,

Appl. Environ. Microbiol., 40, 179-185.

BROWN M.J. et J.N. LESTER, 1982a,

Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge. I. Effects of metal concentrations,

Wat. Res., 16, 1539-1548.

BROWN M.J. et J.N. LESTER, 1982b,

Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge, II. Effects of mean cell retention time,

Wat. Res., 16, 1549-1560.

BOYLE D.C. et A.E. READE, 1983,

Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria,

Appl. Environ. Microbiol., 46, 392-399.

BUCKLIN R.C. et V.M. REUSCH, 1986,

Distribution of negative charges on the cell wall of *Streptococcus sanguis* 34,

Proceedings of the 86th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, 23-28 march.

BUCKMIRE F.L.A. et R.A. Mac LEOD, 1964,
Nutrition and metabolism of marine bacteria. XIV on the mechanism of lysis of a marine bacterium,
Can. J. Microbiol., 11, 677-691.

CALLANDER I.J. et J.P. BARDFORD, 1983,
Precipitation, chelation and the availability of metals as nutrients in anaerobic digestion. I. Methodology,
Biotechnol. and Bioenging, 25, 1947-1957.

CALLANDER I.J. et J.P. BARDFORD, 1983,
Precipitation, chelation, and the availability of metals as nutrients in anaerobic digestion. II. Applications,
Biotechnol. and Bioenging, 25, 1959-1972.

CAMPELL J.H. et R.D. EVANS, 1987,
Inorganic and organic ligand binding of lead and cadmium and resultant implications for bioavailability,
Sci. Total Environ., 62, 219-227.

CHALMIN P. et J.L. GOMBEAUD, 1988,
Cyclope : Les marchés mondiaux 1987/1988,
Economica, 241-251.

CHAPON C., S. MICHAELIS, A. PUGSLEY, D. RAIBAUD, M. SCHWARTZ et C. WANDERSMAN, 1984,
La sécrétion des protéines chez les bactéries à gram négatif,
Colloque CNRS. Recherches fondamentales en amont des biotechnologies, Paris, 19 Novembre.

CHOPRA I., 1975,
Mechanism of plasmid-mediated resistance to cadmium in *Staphylococcus aureus*,
Antimicrob. Agents Chemother., 7, 8-14.

CHOPRA I., T.G.B. HOWE et P.R. BALL, 1977,
Lysozyme-promoted association of protein, I. molecules in outer membrane of *Escherichia*

coli,

J. Bacteriol., 132, 411-418.

COCHRAN W.G., 1977,

Sampling techniques, Wiley J. and sons, éd., New York.

COLIN F., J.F. LE GUILLOU, 1980,

Recherche de l'origine et du mécanisme de concentration des métaux lourds dans les boues résiduaires urbaines en vue de la définition de méthodes préventives.

Compte-rendu de fin de Contrat, Ministre de l'Environnement, comité sol contrat MER/UP : RB N° 9004, Institut de Recherches Hydrologiques, RH 80-78, 36 p..

COLIN F., 1986,

Etat et devenir des métaux contenus dans les effluents urbains et mixtes en relation avec l'utilisation agricole des boues.

Rapport de l'IRH (Nancy), 26-46.

COLLIN P., 1976,

Bassin du Rhin - Pollution par les métaux lourds : mercure, plomb, cadmium. Campagne de surveillance 1975.

SRAE région Alsace, 61 p..

CORPE W.A., 1975,

Metal binding properties of surface materials from marine bacteria,

Dev. Ind. Microbiol., 16, 249-255.

COSTA M.M., M.C. PENEDA et R. LEITE, 1988,

Heavy metals monitoring by the pixe technique in the coastal zone of Portugal,

Environ. Technol. Letter, 9, 941-944.

COSTERTON J.W., C. FORSBERG, T.I. NATULA, F.L.A. BUCKMIRE et R.A. Mac LEOD, 1967,

Nutrition and metabolism of marine bacteria. XVI. Formation of protoplasts, spheroplasts, and related forms from a gram-negative marine bacterium,

J. Bacteriol., 94, 1764-1777.

- COUGHLIN R.T., S. TONSAGER et E.J. Mac GROARTY, 1983,
Quantitation of metal cations bound to membranes and extracted lipopolysaccharide of *Escherichia coli*,
Biochemistry, 22, 2002-2007.
- DAHLQUIST, F.W., 1978,
The meaning of Scatchard and Hill plots,
Methods Enzymol., 48, 270-299.
- DAVIES J.A., G.K. ANDERSON, T.J. BEVERIDGE et H.C. CLARK, 1983,
Chemical mechanisms of the gram stain and synthesis of a new electron-opaque marker for electron microscopy which replaces the iodine mordant of the stain,
J. Bacteriol., 156, 837-845.
- DELATTRE J.M., 1986,
Le contrôle bactérien rapide des eaux par épifluorescence,
J. Français Hydrol., 17, 59-70.
- DE PETRIS S., 1967,
Ultrastructure of the cell wall of *Escherichia coli* and chemical nature of its constituent layers,
J. Ultrastructure Res., 19, 45-83.
- DIEDRICH D.L. et E.H. COSTA-ROBLES, 1974,
Heterogeneity in lipid composition of the outer membrane and cytoplasmic membrane of *Pseudomonas BAL-31*,
J. Bacteriol., 119, 1006-1018.
- DORE M., 1984,
Action de l'ozone sur les constituants cellulaires in vitro,
Symposium, Communication Ozone et Biologie, Rennes.
- DOYLE R.J., D.C. BIRDSELL et F.E. YONG, 1973,
Isolation of the teichoic acid of *Bacillus subtilis* by affinity chromatography,
Preparative Biochemistry, 3, 13-18.
- DOYLE R.J., R.T. MARSHALL et W.H. PFANDER, 1975,
Effects of cadmium on the growth and uptake of cadmium by microorganisms,
Appl. Microbiol., 29, 562-564.

- DOYLE R.J., T.H. MATTHEWS et U.N. STREIPS, 1980,
Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall,
J. Bacteriol., 143, 471-480.
- DRAPEAU A.J., R.A. LAURENCE, P.S. HARBEC, G. SAINT-GERMAIN et N.G. LAMBERT, 1983,
Bioaccumulation de métaux lourds chez certains microorganismes,
Sciences Techniques l'Eau, 16, 359-363.
- DUCK-CHONG C.G., 1978,
A rapid sensitive method for determining phospholipid phosphorus involving digestion with magnesium nitrate,
Lipid, 14, 492-497.
- DUGUID J.P., 1948,
The influence of cultural conditions on the morphology of *Bacterium aerogenes* with reference to nuclear bodies and capsule size,
J. Path. Bact., 60, 265-274.
- DUGUID J.P., 1951,
The demonstration of bacterial capsules and slime,
J. Path. Bact., 63, 673-685.
- DUGUID J.P. et J.F. WILKINSON, 1953,
The influence of cultural conditions on polysaccharide production by *Aerogenes aerobacter*,
J. Gen. Microbiol., 2, 174-189.
- DURUM W.H., J.D. HEM, S.G. HEIDEL, 1971,
Reconnaissance of selected minor elements in surface waters of the United States, october 1970,
Geological survey Circular, 643.
- ELLIS B.G. et B.D. KNEZEK, 1972,
Adsorption reactions of micronutrients in soils, in Micronutrients in agriculture, MORTUEDT J.J., P.M. GIORDANO et W.L. LINDSAY (éd.),
Soil Sci. Soc. of America Inc, Madison, Wisconsin, USA, 59-63.

- ENGEL D.W. et B.A. FOWLER, 1979,
Factors influencing cadmium accumulation and its toxicity to marine organisms,
Environ. Health Perspect., **28**, 81-88.
- FALLA J.A., P. BAUDA et J.C. BLOCK, 1988,
Isolation of cell envelope layers of *Pseudomonas fluorescens*,
J. Microbiol. Methods, **7**, 285-294.
- FERRIS F.G. et T.J. BEVERIDGE, 1984,
Binding of a paramagnetic metal cation to *Escherichia coli* K-12 outer-membrane vesicles,
FEMS. Microbiol. Letters, **24**, 43-46.
- FERRIS F.G. et T.J. BEVERIDGE, 1985,
Function of bacterial cell surface structures,
Bio. Sci., **35**, 172-177.
- FLATAU G.N., R.L. CLEMENT et M.J. GAUTHIER, 1984,
Fixation du cadmium par une Pseudomonadacee marine vivante ou tuée par l'éthanol ou le
cyanure de potassium,
Chemosphere, **13**, 1397-1400.
- FLATAU G.N., R.L. CLEMENT, F. MAHDYOUN et M.J. GAUTHIER, 1987,
Répartition du cadmium dans les enveloppes cellulaires d'une bactérie marine,
Chemosphere, **16**, 2623-2626.
- FLORENCE T.M., 1977,
Trace metal species in fresh waters,
Wat. Res., **11**, 681-687.
- FORSBERG C.W., J.W. COSTERTON et R.A. Mac LEOD, 1970a,
Separation and localization of cell wall layers of a gram-negative bacterium,
J. Bacteriol., **104**, 1338-1353.
- FORSBERG C.W., J.W. COSTERTON et R.A. Mac LEOD, 1970b,
Quantification, chemical characteristics and ultrastructure of the three outer cell wall layers of a
gram negative bacterium,
J. Bacteriol., **104**, 1354-1368.

- FORSBERG C.W., M.K. RAYMAN, J.W. COSTERTON et R. Mac LEOD, 1972,
Isolation, characterization and ultrastructure of peptidoglycan layer of a marine *Pseudomonas*,
J. Bacteriol., 109, 895-905.
- FORSTNER U., 1984,
Chemical forms and reactivities of metals in sediments, in Chemical methods for assessing
bio-available metals in sludges and soils (éd.), LESCHBER R., R.D. DAVIS et P. L'HER-
MITE, Elsevier, 1985, 1-31.
- FOX C.F., J.H. LAW, N. TSUKAGOSHI et G. WILSON, 1970,
A density label for membranes,
Nat. Acad. of Sci., 2, 598-605.
- FRIEDMAN B.A. et P.R. DUGAN, 1968,
Concentration and accumulation of metallic ions by the bacterium *Zoogloea*,
Dev. Ind. Microbiol., 9, 381-388.
- FRISTOE B.R. et P.O. NELSON, 1983,
Equilibrium chemical modelling of heavy metals in activated sludge,
Wat. Res., 17, 771-778.
- FUNAHARA Y. et H. NIKAIDO, 1980,
A-symmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella thyphi-
murium*,
J. Bacteriol., 141, 1463-1465.
- GAID K., 1981,
Modes d'élimination de composés sur filtres : cas d'un support consommable et non adsor-
bant.
Thèse ès Sciences, Université de Rennes, 375 p., Série B, N° 344, N° Série 200.
- GARDINER J., 1976,
Complexation of trace metals by ethylenediamine tetracetic acid (EDTA) in natural waters,
Wat. Res., 10, 507-514.
- GIEBSY J.P., A. NERVEL et G.J. LEVERSEE, 1983,
Copper speciation in soft acid humic waters,
Sci. Total Environ., 28, 23-36.

GOULD M.S. et E.J. GENTELLI, 1975,
Heavy metals distribution in anaerobically digested sludges,
Proc. 30th Ind. Waste Conf., Purdue Univ., 689-699.

GOULD M.S. et E.J. GENTELLI, 1984,
Effects of competition on heavy metal binding by anaerobically digested sludges,
Wat. Res., 18, 123-126.

GRAY G.W. et S.G. WILKINSON, 1965,
The action of ethylenediaminetetra acetic acid on *Pseudomonas aeruginosa*,
J. Appl. Bact., 28, 153-164.

HADDOCK B.A. et C.W. JONES, 1977,
Bacterial respiration,
Bacterial Rev., 41, 47-99.

HÄHNE H.C.H. et W. KROONTJE, 1973,
Significance of pH and chloride concentration on behavior of heavy metal pollutants : mercury
(II), cadmium (II), zinc (II), and lead (II),
J. Environ. Qual., 2, 244-450.

HAMILTON W.A., 1975,
Energy coupling in microbial transport,
Adv. Microbiol. Physiol., 12, 1-53.

HANCOCK R.E.W. et H. NIKAIDO, 1978,
Outer membranes of gram negative bacteria XIX. Isolation from *Pseudomonas aeruginosa*
PAO 1 and use in reconstitution and definition of the permeability barrier,
J. Bacteriol., 136, 381-390.

HAROLD F.M. et J.R. BAARDA, 1969,
Inhibition of membrane-bound adenosine triphosphate and of cation transport in *Streptococcus faecalis* by N, N' dicyclohexylcarbodiimide,
J. Biol. Chem., 244, 2261-2268.

HART B.T. et S.H.R. DAVIES, 1977,
A new dialysis-ion exchange technique for determining the forms of trace metals in water,
Aust. J. Mar. Freshwater Res., 28, 105-112.

- HAYES T.D. et T.L. THEIS, 1976,
Effect and fate of selected heavy metals in anaerobic digestion,
Proc. 31st Ind. Waste conf., Purdue Univ., 1976, Ann. Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, Mich.
- HAYES T.D. et T.L. THEIS, 1978,
The distribution of heavy metals in anaerobic digestion,
J. Wat. Poll. Control Fed., 50, 61-72.
- HAYES T.D., W.J. JEWELL et R.M. KABRICK, 1979,
Heavy metal removal from sludges using combined biological chemical treatment,
Proc. 34th Ind. Waste Conf., Purdue Univ., 529-543.
- HIGHAM D.P., SADLER P.J. et SCAWEN, 1984,
Cadmium-resistance *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins,
Science, 225, 1043-1046.
- HIRAMATSU T. et I.Y.A. MASXI, 1980,
Effect of sodium chloride concentration on the protein species and phospholipid composition
of the outer membrane in a moderately halophilic bacterium *Pseudomonas halosaccharotica*,
Microbiol. Letters, 4, 289-292.
- HISCOCK S.A., 1983,
Trends in the uses of cadmium (1970-1979),
Ecotox. Environ. Safety, 7, 25-32.
- HOUBA C. et J. REMACLE, 1982,
Factors influencing toxicity of cadmium to *Tetrahymena pyriformis* : particulate or soluble
form and degree of complexation,
Environ. Pollut., 28, 35-43.
- HOYLE B.D. et T.J. BEVERIDGE, 1983,
Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli*,
Appl. Environ. Microbiol., 46, 749-752.
- HOYLE B.D. et T.J. BEVERIDGE, 1984,
Metal binding by the peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12,
Can. J. Microbiol., 30, 204-211.

HUGHES D.E., J.W.T. WIMFENNY et D. LLOYD, 1971,

The disintegration of microorganisms. In *Methods in Microbiology*, 5B, NORRIS J.R. et D.W. RIBBONS, (éd.)

Acad. Press Inc., New York, 1-54.

JACOBSON K.B. et J.E. TURNER, 1980,

The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids,

Toxicol., 16, 1-37.

JELLINEK H.H.G. et J.P. SANGAL, 1972,

Complexation of metal ions with natural polyelectrolytes removal and recovery of metal ions from polluted waters,

Wat. Res., 6, 305-314.

JENKINS S.H. et J.S. COOPER, 1964,

The solubility of heavy metal hydroxides in water, sewage, and sewage sludge. III the solubility of heavy metals present in digested sewage sludge,

Int. J. Air Water Pollut., 8, 665-703.

JENKINS R.L., B.J. SCHEFFELER, M.L. SMITH, R. BAIRD, P.L. MINGON et R.T. HANG, 1981,

Metals removal and recovery from municipal sludge,

J. Wat. Pollut. Control Fed., 53, 25-32.

JUSTE C., 1979,

Valorisation agricole des boues issues du traitement des eaux usées urbaines,

Tribune Cebedeau, 432, 461-467.

KABACK H.R., 1968,

The role of the phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system in the transport of sugar by isolated membrane preparations of *Escherichia coli*,

J. Biochem. Chemistry, 243, 3711-3724.

KABACK H.R., 1972,

Transport across isolated bacterial cytoplasmic membranes,

Biochim. Biophys. Acta, 265, 367-416.

KADOKURA S., T. MIYAMOTO, H. ITO et H. INAGAKI, 1982,

Binding of metal ions to wool keratin I. Comparison of binding data by gel filtration and equi-

librium dialysis,

Polymer J., 14, 121-126.

KAGI J.H.Z. et B.L. VALLEE, 1961,

Metallothioneine a cadmium and zinc containing protein from equine renal cortex,

J. Biol. Chem., 236, 2435-2442.

KASAHARA M. et Y. ANRAKU, 1974a,

Succinate dehydrogenase of *Escherichia coli* membrane vesicles,

J. Biochem., 76, 956-966.

KASAHARA M. et Y. ANRAKU, 1974b,

Succinate- and NADH oxidase systems of *Escherichia coli* membrane vesicles,

J. Biochem., 76, 967-976.

KEMPTON S., R.M. STERRIT et J.N. LESTER, 1987,

Heavy metal removal in primary sedimentation.

Sci. Total Environ., 63, 247-258.

KEMPTON S., R.M. STERRIT et J.N. LESTER, 1987,

Heavy metal removal in primary sedimentation I. the influence of metal solubility,

Sci. Total Environ., 63, 231-246.

KHAZAELI M.B. et R.S. MITRA, 1981,

Cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accomodation to low levels of this ion,

Appl. Environ. Microbiol., 41, 46-50.

KIRK P.W.W. et J.N. LESTER, 1984,

Significance and behavior of heavy metals in wastewater treatment processes. IV. Water quality standards and criteria,

Sci. Total Environ., 40, 1-44.

KLEIN L.A., M. LANG et N. NASH, 1974,

Sources of metal in New York city wastewater,

J. Wat. Poll. control Fed., 46, 2653-2662.

KREMLING K. et N. PETERSEN, 1981,

The distribution of zinc, cadmium, copper, manganese and iron in water of the open mediter-

ranean sea,

Meteor Forsch. Ergebnisse, **23**, 5-14.

KRIEG R.N. et J.G. HOLT, 1984,

Bergey's manual : Systematic bacteriology, Baltimore, London. (1) 9th (ed), 964 pg..

KUREK E., J. CZABAN et J.M. BOLLAG, 1982,

Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents,

Appl. Environ. Microbiol., **43**, 1011-1015.

L'A.F.E.E., 1978,

Les micropolluants minéraux dans les eaux superficielles continentales : le zinc, le cadmium,

L'A.F.E.E. éd., Paris, 1-15.

L'A.F.E.E., 1979,

Les micropolluants minéraux dans les eaux superficielles continentales : le chrome, le cuivre, le nickel,

L'A.F.E.E. éd., Paris, 1-28.

LA FRANCE P., M. MAZET, D. VILLESSOT et J.C. THOMES, 1986,

Représentation graphique d'une nouvelle forme linéarisée de l'équation de l'isotherme de LANGMUIR,

Wat. Res., **20**, 123-129.

LAKE D.L., W.W.P. KIRK et J.N. LESTER, 1984,

Fractionation, characterization, and speciation of heavy metals in sewage sludge and sludge amended soils,

J. Environ. Qual., **13**, 175-183.

LAMBERT P.A., I.C. HANCOCK et J. BADDILEY, 1975,

Influence of alanylester residues on the binding of magnesium ions to teichoic acids,

J. Biochem., **151**, 671-676.

LANGERWERFF J.V., G.T. BIERSDORF et D.L. BROWER, 1976,

Retention of metals in sewage sludge : I Constituent heavy metals,

J. Environ. Qual., **5**, 19-23.

LAUMOND F., G. COPIN-MONTEGUT, P. COURAU et E. NICOLAS, 1984,
Cadmium, copper and lead in the western mediterranean sea,
Marine Chemistry, **15**, 251-261.

LEGRET M., D. DEMARE et P. MARCHANDISE, 1983,
Speciation of heavy metals in sewage sludge,
in Proc. Int. Conf. on Heavy metals in environment, 350-353.

LEGRET M., L. DIVET et C. JUSTE, 1987a,
Mobility and bioavailability of heavy metals in sewage sludges-treated soils,
Int. Conf. on Heavy metals in Environment, **1**, 442-444.

LEGRET M., L. DIVET et P. MARCHANDISE, 1987b,
Mobilité et extraction des métaux lourds associés aux boues de station d'épuration,
Wat. Res., **21**, 541-547.

LESTER J.N., 1983,
Significance and behaviour of heavy metals in waste water treatment processes I. Sewage
treatment and effluent discharge,
Sci. Total Environ., **30**, 1-44.

LESTER J.N., R.M. STERRIT et P.W.W. KIRK, 1983,
Significance and behaviour of heavy metals in wastewater treatment processes II. Sludge
treatment and disposal,
Sci. Total Environ., **30**, 45-83.

LEVI-MINZI R., R. RIFFALDI, F. SARTORI, 1980,
Caractérisation de la fraction organique et de la fraction minérale cristalline des boues d'épura-
tion,
Proc. 2nd Int. Symposium "Characterization treatment and use of sewage sludge". Commis-
sion of the European Communities, Vienna, 291-297.

LINDSAY W.L. et W.A. NORWELL, 1978,
Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper,
Soil Sci. Soc. Am. J., **42**, 421-428.

LION L.W., R.S. ALTMAN et J.O. LECKIE, 1982,
Trace-metal adsorption characteristics of estuarine particulate matter : Evaluation of contribu-

tion of Fe/Mn oxide and organic surface coatings,
Environ. Sci. Technol., 16, 660-666.

LOUISOT P., 1983,
Biochimie générale et médicale : structurale, métabolique et sémiologique, DUPORTET B.,
M. ALOPONT et J.C. BERAND (éds.) Villeurbanne, Paris, 508-525.

LUND L.J., G. SPOSITO, A.L. PAGE, 1985,
Determination and prediction of chemical forms of trace metals in sewage sludge and sludge-
amended soils,

Mac ENTEE J.D., J.R. WOODROW et A.V. QUIRK, 1986,
Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes sp.*,
Appl. Environ. Microbiol., 51, 515-520.

MACKA W., H. WIHLIDAL, G. STEHLIK, J. WASHUTTL et E. BAUCHER, 1979,
Uptake of $^{203}\text{Hg}^{++}$ and $^{115}\text{Cd}^{++}$ by *Chlamidomonas reinhardi* under various conditions,
Chemosphere, 10, 787-796.

Mac LEOD R.A. et T.I. MATULA, 1962,
Nutrition and metabolism of marine bacteria XI. Some characteristics of the lytic phenome-
non,
Can. J. Microbiol., 8, 883-896.

MAIGNAN N., 1985,
Méthode de comptage microbiologique à réponse rapide par épifluorescence appliquée aux
produits de contraste,
S.T.P. PHARMA, 10, 993-996.

MANTOURA R.F.C., A. DICKSON et J.P. RILEY, 1978,
The complexation of metals with humic materials in natural waters,
Estuar. Coast. Mar. Sci., 6, 387-408.

MARQUIS R.E., 1968,
Salt-induced contraction of bacterial cell wall,
J. Bacteriol., 95, 775-781.

MARQUIS R.E., K. MAYZEL et E.L. CARSTENSEN, 1976,
Cation exchange in cell walls of gram-positive bacteria,
Can. J. Microbiol., 22, 975-982.

MARTELL A.E., 1970,
Stability constant of metal ion complexes,
Chem. Soc., Special Publication n° 13.

MARTIN E.L. et R.A. Mac LEOD, 1971,
Isolation and chemical composition of the cytoplasmic membrane of a gram negative bacterium,
J. Bacteriol., 105, 1160-1167.

MATIS B.J. et N.R. KEVERN, 1975,
Distribution of mercury, cadmium lead and thallium in an eutrophic lake,
Hydrobiologia, 46, 207-222.

MATTEWS T.H., R.J. DOYLE et V.N. STREIPS, 1979,
Contribution of peptidoglycan to the binding of metal ions by the cell wall of *Bacillus subtilis*,
Curr. Microbiol., 3, 51-53.

MEGUELLATI N., 1982,
Mise au point d'un schéma aux diverses phases constitutives des sédiments,
Thèse 3ème cycle, Université de Pau.

MEYER J.M. et M.A. ABDALLAH, 1978a,
The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens* : biosynthesis, purification and physico-chemical properties,
J. Gen Microbiol., 107, 319-328.

MEYER J.M. et J.M. HORNSPERGER, 1978b,
Role of pyoverdine $_{pf}$ the iron-binding fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*, in iron transport,
J. Gen. Microbiol., 107, 329-331.

MEYER J.M., M. MOCK et M.A. ABDALLAH, 1979,
Effect of iron on the protein composition of the outer membrane of fluorescent *Pseudomonads*,
FEMS Microbiol. Letters, 5, 395-398.

MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT, 1985,

Les normes de rejets,

J. Officiel de la République Française 16 novembre, 1985, 5 p., 13329-13333.

MITRA R.S., R.H. GRAY, B. CHIN et I.A. BERNSTEIN, 1975,

Molecular mechanisms of accomodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd²⁺,

J. Bacteriol., 3, 1180-1188.

MITRA R.S. et I.A. BERNSTEIN, 1977,

Nature of the repair process associated with the recovery of *Escherichia coli* after exposure to Cd²⁺,

Biochem. Biophys. Res. Com., 74, 1450-1455.

MIURA T. et S. MIZUSHIMA, 1968,

Separation by density gradient centrifugation of two types of membranes from spheroplasts membrane of *Escherichia coli* K-12,

Biochim. Biophys. Acta., 150, 159-161.

MIURA T. et S. MIZUSHIMA, 1969,

Separation and properties of outer and cytoplasmic membranes in *Escherichia coli*,

Biochim. Biophys. Acta., 193, 268-276.

MONTREUIL J. et G. SPIK, 1963,

Microdosage des glucides. Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux,

Monographies du Laboratoire de Chimie-Biologie de la Faculté des Sciences, Lille, 74-89.

MOORE S. et W. STEIN, 1948,

Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids,

J. Biol. Chem., 176, 367-388.

MOORHOUSE R., W.T. WINTER, S. ARNOTT et M.E. BAYER, 1977,

Conformation and molecular organization in fibers of capsular polysaccharide from *Escherichia coli* M41 mutant,

J. Mol. Biol., 109, 373-391.

MOUVET C. et A.C.M. BOURG, 1983,

Speciation (including adsorbed species) of copper, lead, nickel and zinc in the Meuse river,

Wat. Res., 17, 641-649.

- MURTHY G.S., H.G. FRIESEN, 1985,
Practical considerations in analyzing radio receptor assays by Scatchard analysis and capacity determination in irreversible hormone receptor interactions,
J. Biosci., 7, 135-144.
- NACHLAS M.M., S.I. MARGULIES et A.M. SELIGMAN, 1960,
A colorimetric method for the estimation of succinic dehydrogenase activity,
J. Biol. Chem., 235, 499-503.
- NAKAE T. et H. NIKAIDO, 1975,
Outer membrane as a diffusion barrier in *Salmonella typhimurium*,
J. Biol. Chem., 250, 7359-7365.
- NAKAE T., 1976,
Outer membrane of *Salmonella*, isolation of protein complex that produces transmembrane channels,
J. Biol. Chem., 251, 2176-2178.
- NAKAE T., J. ISHII et M. TOKUNAGA, 1979,
Subunit structure of functional porine oligomers that form permeability channels in the outer membrane of *E. coli*,
J. Biol. Chem., 254, 1457-1461.
- NAKAE R. et T. NAKAE, 1982,
Diffusion of aminoglycoside antibiotics across the outer membrane of *Escherichia coli*,
Antimicrob. Agents. Chemother., 22, 554-559.
- NANNINGA N., 1969,
Preparation of the ultrastructure of *Bacillus subtilis* by chemical fixation as verified by freeze-etching,
J. Cell. Biol., 42, 733-744.
- NANNINGA N., 1970,
Ultrastructure of the cell envelope of *Escherichia coli* B after freeze-etching,
J. Bacteriol., 101, 297-303.
- NEU H.C. et L.A. HEPPEL, 1964,
The release of ribonuclease into the medium when *Escherichia coli* cells are converted to

spheroplasts,

J. Biol. Chem., 239, 3893-3900.

NEU H.C. et L.A. HEPPEL, 1965,

The release of enzymes from *E. coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts,

J. Biol. Chem., 240, 3685-3692.

NICAS T.I. et R.E.W. HANCOCK, 1983,

Alteration of susceptibility to EDTA, polymyxin B and gentamicin in *Pseudomonas aeruginosa* by divalent cation regulation of outer membrane protein H₁,

J. Gen. Microbiol., 129, 509-517.

NICAS T.I. et R.E.W. HANCOCK, 1983,

Pseudomonas aeruginosa outer membrane permeability : isolation of a porin protein F-deficient mutant,

J. Bacteriol., 153, 281-285.

NIEBOER E. et D.H.S. RICHARDSON, 1980,

The replacement of the nondescript term heavy metals by a biologically and chemically significant classification of metal ions,

Environ. Pollution, 1, 3-26.

NIKAIDO H. et M; VAARA, 1985,

Molecular basis of bacterial outer membrane permeability,

Microbiol. Rev., 49, 1-32.

NORBERG A.B. et H. PEARSON, 1984,

Accumulation of heavy metal ions by *Zoogloea ramigera*,

Biotech. Bioeng., 26, 239-246.

NORWELL W.A. et W.L. LINDSAY, 1969,

Reaction of EDTA complexes of Fe, Zn, Mg and Cu with soils,

Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 33, 86-91.

NORWELL W.A. and W.L. LINDSAY, 1972,

Division S-4-soil fertility and plant nutrition : reaction of DTPA chelates of iron, zinc, copper, and manganese with soils,

Soil Sci. Soc. Amer. J., 36, 778-783.

NORWELL W.A., 1984,

Comparison of chelating agents as extractant for metals in diverse soil material,
Soil Sci. Soc. Amer. J., **48**, 1285-1292.

OLIVER B.G. et E.G. COSGROVE, 1974,

The efficiency of heavy metal removal by a conventional activated sludge treatment plant,
Wat. Res., **8**, 869-874.

OLIVER B.G. et J.H. CAREY, 1976,

Acid solubilization of sewage sludge and ash constituents for possible recovery,
Wat. Res., **10**, 1077-1081.

OP DEN KAMP J.A.F. et L.L.M. VAN DEENEN, 1969,

Bacterial phospholipids and membranes in structural and functional aspect of lipoproteins in living systems.

TRIA E. et A.M. SCANU (éd.). Acad. Press Inc., New York, 227-325.

OSBORN M.J., J.E. GAUDER, E. PARISI et J. CARSON, 1972,

Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*,
J. Biol. Chem., **247**, 3962-3972.

OSBORN M.J. et R. MUNSON, 1974,

Separation of the inner (cytoplasmic) and outer membranes of gram negative bacteria,
Methods Enzymol., **31A**, 642-653.

OU L. et R.E. MARQUIS, 1970,

Electro mechanical interactions in cell walls of gram-positive cocci,
J. Bacteriol., **101**, 92-101.

OU L., N. CHATTERJEE, F.E. YOUNG et R.E. MARQUIS, 1973,

The physiology of teichoic acid deficient *Staphylococci*,
Can. J. Microbiol., **19**, 1393-1399.

PATEL B., V.S. BANGERA, S. PATEL et M.C. BALANI, 1985,

Heavy metals in the Bombay Harbour Area,
Marine Poll. Bulletin, **16**, 22-28.

PATTERSON J.W. et P.S. KODUKULA, 1984,
Metals distributions in activated sludge systems,
J. Wat. Poll. Control Fed., **56**, 432-440..

PEARSON R.G., 1963,
Hard and soft acids and bases,
J. Am. Chem. Soc., **85**, 3533-3539.

PERRY R.D. et S. SILVER, 1982,
Cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicles,
J. Bacteriol., **150**, 973-976.

PICKETT A.W. et A.C.R. DEAN, 1979,
Cadmium and zinc sensitivity and tolerance in *Bacillus subtilis subsp. niger* and in a *Pseudo-*
monas sp.,
Microbios, **24**, 51-64.

POKORNY J., 1983,
Ein model für die wechselwirkung Zwischen metallionen und der phosphat gruppe,
Biologia, **38**, 289-292.

POMMERY J., M. IMBENOTTE et F. ERB, 1985,
Relation entre toxicité et formes libres de quelques métaux traces,
Environ. Pollut., **9**, 127-136.

PRICE P.L., 1972,
Characterization of Ca^{2+} and Mg^{2+} binding to bovine pancreatic deoxyribonuclease A*,
J. Biol. Chem., **247**, 2895-2899.

PRINGLE J.H., M. FLETCHER et D.C. ELLWOOD, 1983,
Selection of attachment mutants during the continuous culture of *Pseudomonas fluorescens*
and relationship between attachment ability and surface composition,
J. Gen. Microbiol., **129**, 2557-2569.

PUPELLA A., L. CAMPANELLA, E. CARDARELLI, T. FERRI et B.M. PETRONIO,
1987,
An experimental approach to speciation in sludges,
Sci. Total Environ., **64**, 295-301.

RAMAMOORTHY S. et D.J. KUSHNER, 1975,

Binding of mercuric and other heavy metals ions by microbial growth media,

Microb. Ecol., 2, 162-176.

RANDLE C.I., P.W. ALBRO et J.C. DITTMER, 1969,

The phosphoglyceride composition of gram negative bacteria and the changes in composition during growth,

Biochem. Biophys. Acta. 187, 214-220.

RASPOR B., P. VALENTA, H.W. NURNBERG et M. BRANICA, 1977,

Polarographic studies on the kinetics and mechanism of Cd (II) chelate formation with E.D.T.A. in sea water,

in : Rapport et procès-verbaux, Vol 24, Fasc. 8, pp 89-91, XXV Congress and Plenary Assembly of ICSEM, Split, 1976, Thalassia Yougosl. 13 (1/2), 79-91.

RAYMAN M.K. et R.A. Mac LEOD, 1975,

Interaction of Mg^{2+} with peptidoglycan and its relation to the prevention of lysis of a marine *Pseudomonad*,

J. Bacteriol., 122, 650-659.

REMACLE J., C. HOUBA et J. NINANE, 1982,

Cadmium fate in bacterial microcosms,

Wat. Air Soil Pollut., 18, 455-465.

REPASKE R., 1958,

Lysis of gram negative organisms and the role of versene,

Biochimica Biophysica Acta. 30, 225-232.

RIDGWAY H.F. et B.H. OLSON, 1982,

Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems,

Appl. Environ. Microbiol., 44, 972-987.

ROBERTS P., H.R. HEGI, A. WEBBER, H.R. KRADHENBAHL, 1977,

Metals in municipal wastewater and their elimination in sewage treatment,

Prog. Wat. Technol., 8, 301-306.

ROBINSON J.B. et O.H. TUOVINEN, 1984,

Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury com-

pounds : Physiological, biochemical and genetic analyses,
Microbiol. Rev., **48**, 95-124.

ROBINSON R.W., H.C. ALDRICH, S.F. HURST et A.S. BLEISWEIS, 1985,
Role of the cell surface of *Methanosarcina mazei* in cell aggregation,
Environ. Microbiol., **49**, 321-327.

ROGERS H.J., H.R. PERKINS et J.B. WARD, 1980,
Microbial cell wall and membranes. Chapman and Hall (éds), London, 564 pg.

RUDD T., M.R. STERRITT et J.N. LESTER, 1983,
Stability constants and complexation capacities of complexes formed between heavy metals
and extracellular polymers from activated sludge,
J. Chem. Tech. Biotechnol., **33A**, 374-380.

RUDD T., R.M. STERRITT et J.N. LESTER, 1984,
Formation and conditional stability constants of complexes formed between heavy metals
and bacterial extracellular polymers,
Wat. Res., **18**, 379-384.

RUDD T., R.M. STERRITT et J.N. LESTER, 1984,
Complexation of heavy metals by extracellular polymers in the activated sludge process,
J. Wat. Poll. Control Fed., **56**, 1260-1268.

RUZIC I., 1982,
Theoretical aspects of the direct titration of natural water and its information yield for trace
metal speciation,
Analytica Chimica Acta, **140**, 99-113.

SALTON M.R.J. et R.W. HORNE, 1951,
Studies of the bacteria cell wall, II. Method of preparation and some properties of cell wall,
Biochim. Biophys. Acta, **7**, 19-42 ; 117-91.

SALTON M.R.J. et J.H. FREER, 1965,
Composition of the membrane isolated from several gram-positive bacteria,
Biochim. Biophys. Acta, **107**, 531-538.

- SALTON M.R.J., 1971,
Bacterial membranes,
C.R.C.Crit. Rev. Microbiol., **1**, 161-197.
- SALTON M.R.J., 1974,
Isolation of cell wall from gram positive bacteria,
Methods Enzymol., **31A**, 642-653.
- SALTON M.R.J., 1987,
Bacterial membrane proteins,
Microbiol. Sci., **4**, 100-105.
- SAVAGE D.C. et M. FLETCHER (éds.), 1985,
Bacterial adhesion (mechanisms and physiological significance.
(première édition), Plenum Press, New York/London, 479 pg.
- SCATCHARD G., 1949,
The attraction of proteins for small molecules and ions,
Ann. N.Y. Acad. Sci., **51**, 600-672.
- SCHNAITMAN C.A., 1970,
Protein composition of the cell wall and cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*,
J. Bacteriol., **104**, 890-901.
- SCHNEIDER W.C., 1975,
Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis,
Methods Enzymol., **3**, 680-684.
- SCHINDLER H. et J.P. ROSENBUSCH, 1978,
Matrix protein from *Escherichia coli* outer membranes forms voltage-controlled channels in lipid bilayers,
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **75**, 3751-3755.
- SCOTT D.S. et H. HORLINGS, 1975,
Removal of phosphates and metals from sewage sludges,
Environ. Sci. technol., **9**, 849-855.

- SCOTT C.L.C., R.A. MAKULA et W.R. FINNERTY, 1976,
Isolation and characterization of membranes from a hydrocarbon-oxidizing *Acinetobacter sp.*,
J. Bacteriol., 127, 469-480.
- SEYFRIED P.L. et D.J. FRASER, 1980,
Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated swimming pools,
Can. J. Microbiol., 26, 350-355.
- SHAHWANI M.F., S.F. JAZRAWI, E.H. RAWI et N.S. AYAR, 1984,
Growth and heavy metal removal by *Klebsiella aerogenes* at different pH and temperature,
J. Environ. Sci. Health, 4, 445-457.
- SILLEN L.G. et A.E. MARTELL, 1964,
Stability constants of metal-ion complexes.
Special publ. n° 17, The chemical society, London, U.K.
- SILLEN L.G. et A.E. MARTELL, 1971,
Stability constants of metal ion complexes,
Special publ. n° 25, Supplement n° 1, The chemical society, London, U.K.
- SIMONI R.D. et P.W. POSTMA, 1975,
The energetics of bacterial active transport,
Ann. Rev. Biochem., 44, 523-554.
- SIMPSON W.R., 1981,
A critical review of cadmium in the marine environment,
Prog. Oceanog., 10, 1-70.
- SIPOS L., P. VALENTA, H.W. NURNBERG et M. BRANICA, 1979a,
Labile lead and cadmium complexes in sea water,
Mar. Chem. Sous presse.
- SIPOS L., B. RASPOR, H.W. NURNBERG et R.M. PYTKOWICZ, 1979b,
Interaction of metal complexes with coulombic ion pairs in high salinity aqueous media,
Mar. Chem. Sous presse.
- STANIER R.Y., 1970,
Some aspect of the biology of cells and their possible evolutionary significance,

STERRIT R.M. et J.N. LESTER, 1980,
Interactions of heavy metals with bacteria,
Sci. Total Environ., 14, 5-17.

STERRIT R.M. et J.N. LESTER, 1984,
Significance and behavior of heavy metals in wastewater treatment process. III. Speciation in
wastewaters and related complex matrices,
Sci. Total Environ., 34, 117-141.

STERRIT R.M. et J.N. LESTER, 1985,
Aspects of the determination of complexation parameters for metal particulate complexes in ac-
tivated sludge,
Wat. Res., 19, 315-321.

STIFF M.J., 1971,
The chemical states of copper in polluted fresh water and a scheme of analysis to differentiate
them,
Wat. Res., 5, 585-599.

STOVER R.C., L.E. SOMMERS et D.J. SILVERIA, 1976,
Evaluation of the metals in wastewater sludge,
J. Wat. Poll. Control Fed., 48, 2165-2175.

STRANDBERG G.N., J.E. SHUMATE et J.R. PARROTT, 1981,
Microbial cells as biosorbents for heavy metals : accumulation of uranium by *Saccharomyces*
cerevisiae and *Pseudomonas aeruginosa*,
Appl. Environ. Microbiol., 41, 237-245.

STRYER L., 1981,
Biochemistry (second edition). W.H. FREMAN and Co (eds) San Francisco, 949 pg.

STUMM W. et J.J. MORGAN, 1970,
Aquatic chemistry Wiley-Interscience, New York.

SUMMERS A.D. et S. SILVER, 1978,
Microbial transformation of metals,
Ann. Rev. Microbiol., 32, 637-672.

- SUNDA W.G., D.W. ENGEL et R.M. THUOTTE, 1978,
Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp *Palaemonetes pugio* :
importance of free cadmium ion,
Envir. Sci. Technol., 12, 409-413.
- SUTHERLAND I.W., 1977,
Surface carbohydrates of the prokariotic cell,
Academic Press Publishers, Londres, 472 p..
- SUTHERLAND I.W., 1985,
Biosynthesis and composition of gram negative extracellular and wall polysaccharides,
Ann. Rev. Microbiol., 39, 243-270.
- SYKES J., 1971,
Centrifugal techniques for the isolation and characterization of sub-cellular components from
bacteria,
in : Norris J.R. et D.W. Ribbons (éds), Methods in microbiology, 5A,
Acad. Press Inc. New York, 55-207.
- THOMPSON J., J.W. COSTERTON et R.A. Mac LEOD, 1970,
K⁺-dependent deplasmolysis of a marine Pseudomonad plasmolyzed in a hypotonic solution,
J. Bacteriol., 102, 843-854.
- THOMPSON J., E. CUNDLIFFE et M.J.R. STARK, 1982,
The mode of action of Berniamycin and the mechanism of resistance in the producing orga-
nism *Streptomyces bernensis*,
J. Gen. Microbiol., 128, 875-884.
- THORNE K.J.L., M.J. THORNLEY et A.M. GLAUERT, 1973,
Chemical analysis of the outer membrane and other layers of the cell envelope of *Acinetobac-*
ter sp.,
J. Bacteriol., 116, 410-417.
- TITUS J.A. et R.M. PFISTER, 1982,
Effect of pH, temperature, and Eh on the uptake of cadmium by bacteria and an artificial
sediment,
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 28, 697-704.

- TYNECKA Z., J. ZAJAC et Z. GOS, 1975,
Plasmid-dependent impermeability barrier to cadmium ions in *Staphylococcus aureus*,
Acta Microbiol. Poll., 7, 11-20.
- TYNECKA Z., Z. GOS et J. ZAJAC, 1981a,
Reduced cadmium transport determined by a resistance plasmid in *Staphylococcus aureus*,
J. Bacteriol., 147, 305-312.
- TYNECKA Z., Z. GOS et J. ZAJAC, 1981b,
Energy dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*,
J. Bacteriol., 147, 313-319.
- UHLINGER D.J. et D.C. WHITE, 1983,
Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glyco-
cocalyx in *Pseudomonas atlantica*,
Appl. Environ. Microbiol., 45, 64-70.
- VAN DER WEIJDEN C.H., 1973,
Cycling of chemical pollutants,
Medelingen Fakulteit Lanbouw-wetenschappen Gent., 4, 1738-1752.
- VERNET J.P., G. SCOLARI et F. RAPIN, 1978,
Teneurs en métaux lourds des sédiments de rivières suisses, du Rhône français et ses princi-
paux affluents,
Bulletin B.R.G.M., 3, 31-45.
- WEIDEL W., H. FRANK et H.H. MARTIN, 1960,
The rigid layer of the cell wall of *Escherichia coli* strain B,
J. Gen. Microbiol., 22, 158-166.
- WEIDEL W., H. FRANK et W. LEUTGEB, 1963,
Autolytic enzymes as a source of error in preparation and study of gram negative cell walls,
J. Gen. Microbiol., 30, 127-130.
- WELLS J.M. et D.H. BROWN, 1987,
Factors affecting the kinetics of intra and extracellular cadmium uptake by the moss *Rhytidia-
delphus squarrosus*,
New Phytol., 105, 123-137.

- WILKINSON J.F., 1958,
The extracellular polysaccharides of bacteria,
Bacteriol. Rev., 22, 46-73.
- WILLIAMS R.J.P., 1981,
Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes,
Phil. Trans. R. Soc. Lond., 294, 57-74.
- WILSON T.R.S., 1975,
Salinity and the major elements of sea water.
in Chemical Oceanography (2eme éd), 1, Acad. Press, London, 364-413.
- WOOD J.M. et H. WANG, 1983,
Microbial resistance to heavy metals,
Environ. Sci. Technol., 17, 582-590.
- WOZNIAK D.J. et J.Y.C. HUANG, 1982,
Variables affecting metal removal from sludge,
J. Wat. Poll. Control Fed., 54, 1574-1580.
- YAMATO I., Y. ANRAKU et K. HIROSAWA, 1975,
Cytoplasmic membrane vesicles of *Escherichia coli*,
J. Biochem., 77, 705-718.
- YOSHIMURA F. et H. NIKAIDO, 1982,
Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes,
J. Bacteriol., 152, 636-642.
- ZIRINO A. et S. YAMAMOTO, 1972,
A pH-dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium and lead in sea water,
Limnol. Oceanogr., 17, 661-671.

7. ANNEXES

Tableau A1 : Dosage des protéines dans les bactéries entières, les muréinoplastes et les trois enveloppes de *P. fluorescens* (M.ext, PG, M.cyt).

Structure	D.O. 595nm	Moyennes	Ecart-type	µg/ml	Facteur de correction	Résultats µg/ml
Bactéries entières	0,467 0,463 0,469	0,466	0,002	2980	x 12	35,8
Muréinoplastes	0,782 0,742 0,724	0,749	0,024	2480	x 7	17,4
Membranes externes	0,293 0,281 0,343	0,306	0,027	1730	x 1	1,7
Membranes cytoplasmiques	0,56 0,55 0,574	0,561	0,01	910	x 2,8	2,5
Peptidoglycane	0,269 0,278 0,266	0,271	0,005	75,9	x 2,8	0,21

(C.V. = 8 %)

Tableau A2 : Dosage du phosphore dans les bactéries entières, les muréinoplastes et les trois enveloppes bactériennes de *P. fluorescens* (M.ext, PG, M.cyt)

Structure	D.O. 820nm	Moyennes	Ecart-type	µg/300µl	Facteur de correction	Résultats µg/ml
Bactéries entières	0,45 0,451 0,45	0,45	0,0004	9,39	x 12	117,6
Muréinoplastes	0,371 0,348 0,379	0,366	0,013	8,3	x 7	58,1
Membranes externes	0,128 0,12 0,112	0,12	0,006	2,7	x 1	2,7
Membranes cytoplasmiques	0,56 0,566 0,572	0,566	0,005	12,29	x 2,8	34,4
Peptidoglycane	0,007 0,004 0,001	0,004	0,002	0	x 2,8	0

(C.V. = 5 %)

Tableau A3 : Dosage du S.D.H. dans les bactéries entières, les muréinoplastes et les trois enveloppes bactériennes de *P. fluorescens* (M.ext, PG, M.cyt)

Structure	D.O. 600nm	Moyennes	Ecart-type	µg/mn/l	Facteur de correction	Résultats µg/ml
Bactéries entières	0,05 0,026 0,008	0,028	0,017	0,0658	x 12	0,79
Muréinoplastes	0 0 0	0	0	0	x 7	0
Membranes externes	0 0 0	0	0	0	x 1	0
Membranes cytoplasmiques	0,075 0,088 0,092	0,087	0,007	3,2821	x 2,8	9,19
Peptidoglycane	0 0 0	0	0	0	x 2,8	0

(C.V. = 8 %)

Tableau A4 : Dosage du K.D.O. dans les bactéries entières, les muréinoplastes et les trois enveloppes bactériennes de *P. fluorescens* (M.ext, PG, M.cyt)

Structure	D.O. 549nm	Moyennes	Ecart-type	µg/500µl	Facteur de correction	Résultats µg/ml
Bactéries entières	0,41 0,429 0,447	0,429	0,002	97,6	x 12	1171,2
Muréinoplastes	0,146 0,146 0,146	0,146	0	33,29	x 7	233
Membranes externes	0,331 0,317 0,345	0,331	0,011	75,3	x 1	75,3
Membranes cytoplasmiques	0,071 0,072 0,07	0,071	0,001	16,25	x 2,8	45,5
Peptidoglycane	0 0 0	0	0	0	x 2,8	0

(C.V. = 3 %)

Tableau A5 : Dosage des hexosamines dans les bactéries entières, les muréinoplastes et les trois enveloppes bactériennes de *P. fluorescens* (M.ext, PG, M.cyt)

Structure	D.O. 520nm	Moyennes	Ecart-type	µg/ml	Facteur de correction	Résultats µg/ml
Bactéries entières	0,03 0,035 0,044	0,036	0,006	6,03	x 12	72,36
Muréinoplastes	0,040 0,053 0,048	0,049	0,002	7,83	x 7	54,81
Membranes externes	0,035 0,036 0,032	0,034	0,002	5,75	x 1	5,75
Membranes cytoplasmiques	0,047 0,05 0,05	0,049	0,001	7,83	x 2,8	21,92
Peptidoglycane	0,063 0,074 0,069	0,069	0,004	10,61	x 2,8	29,7

(C.V. = 9 %)

Tableau A6 : Accumulation du Cd 109 par les fractions bactériennes de *P. fluorescens* (M.ext, PG, M.cyt) non modifiées

MEMBRANE EXTERNE Fraction non modifiée

ppm	Moyenne cpm	Cd 109 libre $\mu\text{moles/l}$	Cd 109 libre $\mu\text{moles/52ml}$	r Cd 109 fixé $\mu\text{moles/mg}$	r/c (l/mg)
1	7,13E+03	1,45E-02	7,55E-04	4,20E-03	2,89E-01
2,5	8,60E+03	4,37E-02	2,27E-03	1,00E-02	2,30E-01
5	1,74E+04	1,77E-01	9,21E-03	1,80E-02	1,10E-01
10	1,98E+04	4,03E-01	2,10E-02	3,43E-02	8,50E-02
20	2,47E+04	1,0046	5,22E-02	6,40E-02	6,40E-02

PEPTIDOGLYCANE Fraction non modifiée

1	6,87E+03	1,40E-02	7,33E-04	4,20E-03	3,00E-01
2,5	8,07E+03	4,10E-02	2,13E-03	1,02E-02	2,50E-01
5	1,24E+04	1,26E-01	6,55E-03	1,90E-02	1,60E-01
10	1,87E+04	3,82E-01	1,99E-02	3,50E-02	9,20E-02
20	2,49E+04	1,013	5,27E-02	6,30E-02	6,20E-02

MEMBRANE CYTOPLASMIQUE

Fraction non modifiée

1	8,80E+03	1,79E-02	9,25E-04	4,10E-03	2,30E-01
2,5	9,99E+03	5,08E-02	2,64E-03	1,00E-02	1,76E-01
5	1,12E+04	1,14E-01	5,94E-03	1,95E-02	1,70E-01
10	1,19E+04	2,43E-01	1,27E-02	3,90E-02	1,58E-01
20	1,26E+04	0,513	2,67E-02	7,70E-02	1,48E-01

Tableau A7 : Accumulation du Cd 109 par les fractions bactériennes de *P. fluorescens* (M.ext, PG, M.cyt) modifiées

MEMBRANE EXTERNE Fraction modifiée

ppm	Moyenne cpm	Cd 109 libre μ moles/l	Cd 109 libre μ moles/52ml	r Cd 109 fixé μ moles/mg	r/c (l/mg)
1	4,34E+03	8,84E-03	4,60E-04	2,18E-03	2,50E-01
2,5	7,80E+03	3,96E-02	2,06E-03	5,13E-03	1,30E-01
5	1,45E+04	1,48E-01	7,72E-03	9,30E-03	6,50E-02
10	1,84E+04	3,76E-01	1,96E-02	1,75E-02	4,70E-02
20	2,31E+04	0,9444	4,91E-02	3,30E-02	3,50E-02

PEPTIDOGLYCANE Fraction modifiée

1	4,57E+03	9,29E-03	4,83E-04	2,17E-03	2,30E-01
2,5	8,18E+03	4,16E-02	2,16E-03	5,10E-03	1,20E-01
5	1,44E+04	1,46E-01	7,63E-03	9,31E-03	6,40E-02
10	1,69E+04	3,44E-01	1,79E-02	1,79E-02	5,00E-02
20	3,75E+04	1,526	7,93E-02	2,49E-02	1,70E-02

MEMBRANE CYTOPLASMIQUE

Fraction modifiée

1	9,63E+03	1,96E-02	1,00E-03	2,00E-03	1,10E-01
2,5	1,01E+04	5,13E-02	2,67E-03	4,97E-03	9,70E-02
5	1,25E+04	1,27E-01	6,59E-03	9,60E-03	7,60E-02
10	1,41E+04	2,87E-01	1,50E-02	1,90E-02	6,50E-02
20	2,07E+04	0,844	4,38E-02	3,40E-02	4,00E-02

Tableau A8 : Accumulation du Ni 63 par les fractions bactériennes de P. fluorescens (M.ext, PG, M.cyt) non modifiées

MEMBRANE EXTERNE Fraction non modifiée

ppm	Moyenne cpm	Ni 63 libre $\mu\text{moles/l}$	Ni 63 libre $\mu\text{moles/52ml}$	r Ni 63 fixé $\mu\text{moles/mg}$	r/c (l/mg)
1	1,36E+04	3,60E-02	1,86E-03	7,40E-03	2,08E-01
2,5	1,87E+04	1,22E-01	6,33E-03	1,81E-02	1,48E-01
5	3,33E+04	4,35E-01	2,26E-02	3,16E-02	7,20E-02
10	3,30E+04	8,62E-01	4,47E-02	6,36E-02	7,30E-02
20	3,43E+04	1,795	9,40E-02	1,26E-01	7,00E-02

PEPTIDOGLYCANE Fraction non modifiée

1	1,59E+04	4,15E-02	2,20E-03	7,25E-03	1,75E-01
2,5	2,39E+04	1,56E-01	8,10E-03	1,72E-02	1,11E-01
5	2,58E+04	3,38E-01	1,78E-02	3,40E-02	9,90E-02
10	3,14E+04	8,18E-01	4,26E-02	6,50E-02	7,90E-02
20	3,37E+04	1,779	9,24E-02	1,26E-01	7,10E-02

MEMBRANE CYTOPLASMIQUE

Fraction non modifiée

1	1,58E+04	4,10E-02	2,13E-03	7,27E-03	1,78E-01
2,5	2,22E+04	1,44E-01	7,53E-03	1,75E-02	1,21E-01
5	2,54E+04	3,32E-01	1,72E-02	3,42E-02	1,03E-01
10	3,19E+04	8,33E-01	4,35E-02	6,43E-02	7,70E-02
20	6,81E+04	3,547	1,84E-01	8,00E-02	2,20E-02

Tableau A9 : Accumulation du Ni 63 par les fractions bactériennes de P. fluorescens (M.ext, PG, M.cyt) modifiées

MEMBRANE EXTERNE Fraction modifiée

ppm	Moyenne cpm	Ni 63 libre $\mu\text{moles/l}$	Ni 63 libre $\mu\text{moles/52ml}$	r Ni 63 fixé $\mu\text{moles/mg}$	r/c (l/mg)
1	1,96E+04	5,13E-02	2,66E-03	3,50E-03	6,80E-02
2,5	2,36E+04	1,54E-01	8,20E-03	8,64E-03	5,60E-02
5	2,38E+04	3,09E-01	1,62E-02	1,73E-02	5,60E-02
10	2,51E+04	6,60E-01	3,43E-02	3,44E-02	5,20E-02
20	2,96E+04	1,55	8,10E-02	6,58E-02	4,30E-02

PEPTIDOGLYCANE Fraction modifiée

1	2,74E+04	7,22E-02	3,74E-03	3,20E-03	4,40E-02
2,5	2,85E+04	1,88E-01	9,69E-03	8,20E-03	4,30E-02
5	3,08E+04	4,03E-01	2,10E-02	1,62E-02	4,00E-02
10	3,26E+04	8,62E-01	4,46E-02	3,18E-02	3,70E-02
20	3,94E+04	2,074	1,08E-01	5,91E-02	2,90E-02

MEMBRANE CYTOPLASMIQUE
Fraction modifiée

1	1,91E+04	5,00E-02	2,61E-03	3,51E-03	7,10E-02
2,5	2,01E+04	1,33E-01	6,92E-03	8,91E-03	6,70E-02
5	2,24E+04	2,94E-01	1,53E-02	1,76E-02	6,00E-02
10	2,27E+04	6,92E-01	3,08E-02	3,53E-02	5,00E-02
20	3,81E+04	2,001	1,04E-01	6,00E-02	3,00E-02

Tableau A10 : Accumulation du Cu63 par les fractions bactériennes de *P. fluorescens*
(M.ext, PG, M.cyt) non modifiées

MEMBRANE EXTERNE Fraction non modifiée

ppm	D.O. absorption atomique	Cu 63 libre $\mu\text{moles/l}$	Cu 63 libre $\mu\text{moles/52ml}$	r Cu 63 fixé $\mu\text{moles/mg}$	r/c (l/mg)
1	1,00E-02	9,30E-03	2,50E-05	3,00E-04	3,20E-02
2,5	2,00E-02	4,38E-02	1,10E-04	6,80E-04	1,60E-02
5	7,00E-02	2,17E-01	5,60E-04	1,00E-03	5,00E-03
10	2,28E-01	7,62E-01	2,00E-03	1,20E-03	2,00E-03
20	5,33E-01	1,817	4,70E-03	1,60E-03	9,00E-04

PEPTIDOGLYCANE Fraction non modifié

1	9,00E-03	5,90E-03	1,50E-05	3,10E-04	5,20E-02
2,5	1,20E-02	1,64E-02	4,30E-05	7,50E-04	4,50E-02
5	5,20E-02	1,54E-01	4,00E-04	1,18E-03	7,60E-03
10	1,67E-01	5,60E-01	1,46E-03	1,74E-03	3,10E-03
20	5,00E-01	1,704	4,43E-03	1,87E-03	1,10E-03

MEMBRANE CYTOPLASMIQUE Fraction non modifié

1	1,20E-02	1,64E-02	4,30E-05	2,77E-04	1,70E-02
2,5	2,50E-02	6,10E-02	1,59E-04	6,31E-04	1,03E-02
5	4,80E-02	1,41E-01	3,70E-04	1,21E-03	8,60E-03
10	1,93E-01	6,42E+00	1,67E-03	1,53E-03	2,40E-03
20	4,90E-01	1,669	4,34E-03	1,96E-03	1,20E-03

Tableau A11 : Accumulation du Cu63 par les fractions bactériennes de P. fluorescens (M.ext, PG, M.cyt) modifiées

MEMBRANE EXTERNE Fraction modifiée

ppm	D.O. absorption atomique	Cu 63 libre μ moles/l	Cu 63 libre μ moles/52ml	r Cu 63 fixé μ moles/mg	r/c (l/mg)
1	1,60E-02	3,00E-02	7,80E-05	2,42E-04	8,00E-03
2,5	3,20E-02	8,60E-02	2,20E-04	5,70E-04	6,60E-03
5	8,40E-02	2,64E-01	6,90E-04	8,90E-04	3,30E-03
10	1,92E-01	6,39E-01	1,70E-03	1,50E-03	1,20E-03
20	5,13E-01	1,748	4,60E-03	1,70E-03	5,00E-03

PEPTIDOGLYCANE Fraction modifiée

1	1,60E-02	3,00E-02	7,80E-05	2,42E-04	8,10E-03
2,5	2,60E-02	6,46E-02	1,70E-04	6,20E-04	9,60E-03
5	1,00E-01	3,21E-01	8,40E-04	7,40E-04	2,30E-03
10	1,80E-01	6,00E-01	1,56E-03	1,64E-03	1,70E-03
20	5,09E-01	1,735	4,50E-03	1,80E-03	1,04E-03

MEMBRANE CYTOPLASMIQUE Fraction modifiée

1	2,00E-02	4,38E-02	1,14E-04	2,06E-04	4,70E-03
2,5	2,70E-02	6,80E-02	1,77E-04	6,13E-04	5,00E-03
5	9,40E-02	3,00E-01	7,80E-04	8,00E-04	2,60E-03
10	2,15E-01	7,18E-01	1,87E-03	1,33E-03	1,90E-03
20	5,21E-01	1,776	4,63E-03	1,67E-03	9,40E-04

Tableau A12 : Accumulation du Zn65 par les fractions bactériennes de P. fluorescens (M.ext, PG, M.cyt) non modifiées

MEMBRANE EXTERNE Fraction non modifiée

ppm	D.O. absorption atomique	Zn 65 libre μ moles/l	Zn 65 libre μ moles/52ml	r Zn 65 fixé μ moles/mg	r/c (l/mg)
1	2,60E-02	1,02E-02	2,60E-05	2,84E-03	2,78E-01
2,5	5,10E-02	3,33E-02	8,84E-05	6,82E-03	2,05E-01
5	2,30E-02	1,23E-01	3,12E-04	1,22E-02	9,92E-02
10	5,10E-02	4,20E-01	1,09E-03	2,01E-02	4,80E-02
20	1,76E-01	1,737	4,52E-03	2,58E-02	9,10E-03

PEPTIDOGLYCANE Fraction non modifiée

1	3,60E-02	1,99E-02	5,20E-05	2,58E-03	1,30E-01
2,5	7,40E-02	5,40E-02	1,40E-04	6,30E-03	1,16E-01
5	3,00E-02	1,98E-01	5,20E-04	1,01E-02	5,10E-02
10	6,00E-02	5,14E-01	1,34E-03	1,76E-02	3,40E-02
20	1,82E-01	1,8	4,68E-03	2,22E-02	8,00E-03

MEMBRANE CYTOPLASMIQUE Fraction non modifiée

1	2,70E-03	1,20E-02	3,10E-05	2,79E-03	2,33E-01
2,5	7,30E-03	5,40E-02	1,40E-04	6,30E-03	1,17E-01
5	4,50E-03	3,56E-01	9,30E-04	9,00E-03	1,70E-02
10	7,40E-03	6,60E-01	1,72E-03	1,38E-02	2,00E-02
20	1,54E-02	1,505	3,91E-03	2,19E-02	1,50E-02

Tableau A13 : Accumulation du Zn65 par les fractions bactériennes de P. fluorescens (M.ext, PG, M.cyt) modifiées

MEMBRANE EXTERNE Fraction modifiée

ppm	D.O. absorption atomique	Zn 65 libre μ moles/l	Zn 65 libre μ moles/52ml	r Zn 65 fixé μ moles/mg	r/c (l/mg)
1	5,60E-02	3,80E-02	9,90E-05	2,10E-03	5,53E-02
2,5	1,60E-01	1,30E-01	3,38E-04	4,30E-03	3,32E+02
5	3,90E-02	2,92E-01	7,59E-04	7,70E-03	2,64E-02
10	7,80E-02	7,04E-01	1,83E-03	1,27E-02	1,80E-02
20	1,70E-01	1,674	4,35E-03	1,75E-02	1,10E-02

PEPTIDOGLYCANE Fraction modifiée

1	6,00E-02	4,13E-02	1,07E-04	2,03E-03	4,92E-02
2,5	1,40E-01	1,13E-01	2,93E-04	4,77E-03	4,22E-02
5	3,60E-02	2,60E-01	6,76E-04	8,54E-03	3,30E-02
10	6,70E-02	5,87E-01	1,53E-03	1,57E-02	2,70E-02
20	1,49E-01	1,453	3,78E-03	2,32E-02	1,60E-02

MEMBRANE CYTOPLASMIQUE Fraction modifiée

1	5,00E-02	3,24E-02	8,40E-05	2,26E-03	7,00E-02
2,5	1,56E-01	1,27E-01	3,30E-04	4,40E-03	3,50E-02
5	3,40E-02	2,40E-01	6,24E-04	9,06E-03	3,10E-02
10	7,70E-02	6,94E-01	1,80E-03	1,30E-02	1,80E-02
20	1,67E-01	1,6422	4,27E-03	1,83E-02	1,20E-02

Tableau A14 : Quantités de Cu, Cd, Zn accumulées, libres et fixées sur les parois du tube.

Métal	Concentration initiale μmole/l	3,15	6,3	12,59	25,18	50,36	100,72
Cu	Fraction accumulée μmol/mg de poids sec	0,0016 0,0006	0,002 0,0005	0,005 0,0015	0,0088 0,0023	0,0195 0,0028	0,0346 0,0032
	Fraction libre μmole/l	2,04 0,23	4,53 0,22	9,58 0,65	20,45 1,02	40,53 1,21	80,99 1,36
	Fraction fixée sur les parois du tube μmol/l	0,45	0,9	0,85	0,98	1,48	4,97
Cd	Fraction accumulée μmol/mg de poids sec	0,0052 0,0004	0,012 0,0005	0,0251 0,0003	0,0466 0,0005	0,0886 0,0014	0,15 0,0046
	Fraction libre μmole/l	0,629 0,178	0,973 0,201	1,736 0,135	4,31 0,22	10,203 0,602	32,934 1,961
	Fraction fixée sur les parois du tube μmol/l	0,32	0,21	0,16	0,97	2,38	3,71
Zn	Fraction accumulée μmol/mg de poids sec	0,0066 0,0001	0,0137 0,0001	0,0252 0,0001	0,0462 0,0006	0,083 0,0001	0,1328 0,0056
	Fraction libre μmole/l	0,032 0,017	0,149 0,042	1,126 0,022	4,369 0,26	12,47 0,002	40,441 2,375
	Fraction fixée sur les parois du tube μmol/l	0,34	0,31	0,7	1,1	2,51	3,62

Tableau A15 : a) Fractions de Cu, Cd, Zn accumulées, libres et fixées sur les parois du tube exprimées en pourcentages.

Métal	Concentration initiale $\mu\text{mole/l}$	3,15	6,3	12,59	25,18	50,36	100,72
Cu	Fraction accumulée %	20,75	13,8	17,1	14,9	16,6	14,7
	Fraction libre %	64,75	72	76,1	81,2	80,5	80,4
	Fraction fixée sur les parois du tube %	14,5	14,2	6,8	3,9	3	4,9
Cd	Fraction accumulée %	69,8	81,1	85	79	75	63,6
	Fraction libre %	20	15,5	13,7	17,1	20,3	32,7
	Fraction fixée sur les parois du tube %	10,2	3,4	1,3	3,9	4,7	3,7
Zn	Fraction accumulée %	88,7	92,7	85,4	78,3	70,3	56,3
	Fraction libre %	1	2,4	9	17,3	24,7	40,1
	Fraction fixée sur les parois du tube %	10,7	4,9	5,6	4,4	5	3,6

b) Part représentative de chaque métal par rapport au total des trois métaux accumulés, exprimée en pourcentages.

Métal	Concentration initiale $\mu\text{mole/l}$	3,15	6,3	12,59	25,18	50,36	100,72
Cu	%(Cu/Cu+Cd+Zn)	11,9	7,2	9	8,7	10,2	10,9
Cd	%(Cd/Cu+Cd+Zn)	38,8	43,3	45,4	45,9	46,4	47,3
Zn	%(Zn/Cu+Cd+Zn)	49,3	49,5	45,6	45,4	43,4	41,8
Total	Cu + Cd + Zn $\mu\text{mol/mg P.s}$	0,0134	0,0277	0,0553	0,1016	0,1911	0,3174

Tableau A16 : Test statistique pour évaluer la significativité des différences observées entre les témoins "eau + métal" et dont les témoins "surnageants bactériens + métal".

concentration initiale ($\mu\text{mole/l}$) ->	1 3,15	2 6,3	3 12,6	4 25,2	5 50,4	6 100,7
cuiivre						
Xe =	0,163	0,32	0,657	1,53	3,06	5,366
Ve =	0,0001	0,0012	0,0018	0,001	0,0109	0,249
Xs =	0,162	0,324	0,69	1,629	3,147	5,467
Vs =	0,0009	0,0025	0,0041	0,0056	0,019	0,0256
Xe-Xs = Δ	0,001	0,004	0,033	0,099	0,097	0,101
T obs =	1,1	1,44	7,38	17,4	4,43	0,4
réponse du test seuil de 1%, T =9,92	n.S	n.S	n.S	S	n.S	n.S
cadmium						
Xe =	0,325	0,619	1,21	2,671	5,399	9,596
Ve =	0,0106	0,0138	0,027	0,0005	0,0089	0,404
Xs =	0,231	0,507	1,012	2,365	4,467	8,438
Vs =	0,0002	0,0005	0,0032	0,0021	0,107	0,077
Xe-Xs = Δ	0,094	0,112	0,198	0,306	0,932	1,158
T obs =	8,87	8,11	7,03	141,7	8,68	2,81
réponse du test seuil de 1%, T =9,92	n.S	n.S	n.S	S	n.S	n.S
zinc						
Xe =	0,176	0,34	0,681	1,503	3,069	5,396
Ve =	0,0006	0,0024	0,0092	0,0014	0,0014	0,353
Xs =	0,15	0,303	0,607	1,348	2,469	4,797
Vs =	0,0001	0,0008	0,0029	0,0002	0,0057	0,132
Xe-Xs = Δ	0,026	0,037	0,074	0,155	0,6	0,599
T obs =	42,7	14,6	7,67	109,6	102,2	1,59
réponse du test seuil de 1%, T =9,92	S	S	n.S	S	S	n.S

Xe, valeur moyenne sur 2 répétitions, mesurée dans le témoin "Eau", Ve sa variance
Xs, valeur moyenne sur 2 répétitions, mesurée dans le témoin "Surnageant bactérien", Vs sa variance
Tobs, valeur observée sur l'échantillon, et T, valeur théorique à 2 d.d.l. lue dans les tables
"S", différence Δ significative, respectivement "n.S" Δ non significative

Tableau A17 : Quantités libres et liées de chaque métal, exprimées en log pour la représentation de l'accumulation sous la forme d'isothermes de Freundlich.

Métal	Quantité initiale $\mu\text{mole/l}$		3,15	6,3	12,59	25,18	50,36	100,72
Cu	Quantité libre (Log ($\mu\text{mole/l}$))	moyenne S.D.	0,71 0,12	1,51 0,05	2,26 0,07	3,02 0,05	3,7 0,03	4,4 0,02
	Quantité accumulée (Log ($\mu\text{mole/mg Ps.}$))	moyenne S.D.	-6,54 0,37	-6,25 0,26	-5,34 0,32	-4,77 0,25	-3,95 0,15	-3,37 0,1
Cd	Quantité libre (Log ($\mu\text{mole/l}$))	moyenne S.D.	-0,51 0,31	-0,05 0,2	0,55 0,08	1,46 0,05	2,32 0,06	3,49 0,06
	Quantité accumulée (Log ($\mu\text{mole/mg Ps.}$))	moyenne S.D.	-5,27 0,08	-4,42 0,04	-3,69 0,02	-3,06 0,01	-2,43 0,02	-1,9 0,03
Zn	Quantité libre (Log ($\mu\text{mole/l}$))	moyenne S.D.	-3,56 0,54	-1,95 0,33	0,12 0,02	1,47 0,06	2,53 0,01	3,7 0,06
	Quantité accumulée (Log ($\mu\text{mole/mg Ps.}$))	moyenne S.D.	-5,03 0,01	-4,29 0,01	-3,68 0	-3,07 0,01	-2,49 0	-2,02 0,04

Tableau A18 : Récapitulatif des quantités de Cu, Cd, Zn représentées avant et après extraction au sein de la biomasse contaminée après croissance.

Concentration totale initiale : (C.T.I.)	0,6192	% de la C.T.I.	% de la C.T.A.	% de la C.T.R.
Concentration totale accumulée avant extraction (C.T.A.)	0,3174	51,3	100	-
Concentration accumulée avant extraction :				
cuivre	0,0346	5,6	10,9	-
cadmium	0,15	24,2	47,3	-
zinc	0,1328	21,5	41,8	-
Concentration totale résiduelle après extraction par NTA (C.T.R.)	0,0162	2,6	5,1	100
Concentration résiduelle après extraction				
cuivre	0	0	0	0
cadmium	0,0082	1,3	2,6	50,6
zinc	0,008	1,3	2,5	49,4

* les concentrations sont exprimées en $\mu\text{mole/mg}$ de poids sec.

Tableau A19 : Valeurs d'accumulation pour les trois métaux Cu, Cd, Zn accumulés par *Pseudomonas fluorescens* en culture continue, contaminé en phase de croissance.

Métal	Paramètre mesuré	Unité	Moyenne	Ecart-type	% de la quantité totale accumulée
Cuivre	dans le milieu nutritif (entrée)	μmole/l.	55,39	0,47	
	dans le surnageant (sortie)	μmole/l.	44,89	3,31	
	accumulé (culots bactériens)	mg/g Ps.	2,72	0,23	
		μmole/mg Ps.	0,0428	0,004	39%
	%	12,3	1,1		
Cadmium	dans le milieu nutritif (entrée)	μmole/l.	75,61	0,27	
	dans le surnageant (sortie)	μmole/l.	38,63	5,78	
	accumulé (culots bactériens)	mg/g Ps.	5,62	0,41	
		μmole/mg Ps.	0,05	0,001	46%
	%	14,3	0,3		
Zinc	dans le milieu nutritif (entrée)	μmole/l.	52	0	
	dans le surnageant (sortie)	μmole/l.	54,83	7,75	
	accumulé (culots bactériens)	mg/g Ps.	1,16	0,13	
		μmole/mg Ps.	0,017	0,001	15%
	%	5,1	0,3		
Total accumulé		μmole/mg Ps.	0,1098	0,004	100%

Tableau A20 : Valeurs d'extraction par NTA 2,5 ; 5,0 et 10,0.10⁻⁴ M pour les trois métaux Cu, Cd et Zn accumulés par *Pseudomonas fluorescens* en culture continue, contaminé en phase de croissance.

Métal	Paramètre mesuré	Unité	Moyenne	Ecart-type			
cuivre	extrait par NTA	2,5.10-4M	mg/g Ps. µmole/mg Ps. %	0,97 0,015 33	0,33 0,005 11,2		
		5,0.10-4M	mg/g Ps. µmole/mg Ps. %	1,13 0,018 40,2	0,27 0,004 9,5		
		10,0.10-4M	mg/g Ps. µmole/mg Ps. %	1,26 0,02 52,2	0,09 0,001 3,7		
		résiduel pour NTA	2,5.10-4M	mg/g Ps.	1,97	0,35	
			5,0.10-4M	mg/g Ps.	1,68	0,36	
			10,0.10-4M	mg/g Ps.	1,15	0,16	
		cadmium	extrait par NTA	2,5.10-4M	mg/g Ps. µmole/mg Ps. %	4,83 0,043 82,3	1,4 0,013 23,9
				5,0.10-4M	mg/g Ps. µmole/mg Ps. %	5,08 0,045 85,3	1,35 0,012 22,6
				10,0.10-4M	mg/g Ps. µmole/mg Ps. %	3,95 0,035 78,4	0,56 0,005 11,1
résiduel pour NTA	2,5.10-4M			mg/g Ps.	1,04	0,2	
	5,0.10-4M			mg/g Ps.	0,87	0,1	
	10,0.10-4M			mg/g Ps.	1,09	0,31	
zinc	extrait par NTA			2,5.10-4M	mg/g Ps. µmole/mg Ps. %	0,71 0,011 56,5	0,23 0,004 18,7
				5,0.10-4M	mg/g Ps. µmole/mg Ps. %	0,7 0,011 57,1	0,21 0,003 17,5
				10,0.10-4M	mg/g Ps. µmole/mg Ps. %	0,57 0,009 58	0,11 0,002 11,3
		résiduel pour NTA	2,5.10-4M	mg/g Ps.	0,55	0,1	
			5,0.10-4M	mg/g Ps.	0,53	0,13	
			10,0.10-4M	mg/g Ps.	0,41	0,06	

Tableau A21 : Quantités accumulées, extraites et résiduelles, mesurées sur des échantillons de boues de station d'épuration avant et après application du test d'extraction au NTA 10⁻³ M.

Origine des boues	METZ bassin d'aération	METZ filtre-presse	BORDEAUX Décanteur secondaire	BORDEAUX digesteur	BORDEAUX filtre-presse
Cu accumulé (extr.+ rés.) mg/g.Ps. μmol/mg.Ps.	0,32 0,005	0,078 0,0012	0,396 0,0062	0,635 0,01	0,94 0,0148
Cu résiduel mg/g.Ps. μmol/mg.Ps. rés./extr.+rés. %	0,311 (0,015) 0,0049 (0,0002) 97,2	0,058 (0,009) 0,0009 (0,0001) 73,8	0,381 (0,013) 0,0060 (0,0002) 96,3	0,614 (0,024) 0,0097 (0,0004) 96,6	0,928 (0,036) 0,0146 (0,0006) 98,7
Cu extrait mg/g.Ps. μmol/mg.Ps. extr./extr.+rés. %	0,009 (0,002) 0,00014 2,8 (0,6)	0,020 (0,003) 0,00032 26,2 (4,12)	0,0145 (0,002) 0,00023 3,7 (0,3)	0,021 (0,003) 0,00034 3,4 (0,6)	0,0119 (0,001) 0,00019 1,3 (0,1)
Cd accumulé (extr.+ rés.) mg/g.Ps. μmol/mg.Ps.	0,027 0,00024	0,0237 0,00021	0,0705 0,00062	0,339 0,00301	0,454 0,00404
Cd résiduel mg/g.Ps. μmol/mg.Ps. rés./extr.+rés. %	0,025 (0,002) 0,00022(0,0002) 92,4	0,021 (0,001) 0,00019(0,00001) 88,8	0,063 (0,005) 0,00056(0,00004) 89,3	0,304 (0,076) 0,00270 (0,00068) 89,7	0,414 (0,085) 0,0368 (0,00014) 91,1
Cd extrait mg/g.Ps. μmol/mg.Ps. extr./extr.+rés. %	0,002 (0,001) 0,000018 7,6 (2,9)	0,0027 (0,0005) 0,000024 11,2 (1,9)	0,0075 (0,0005) 0,000067 10,7 (0,6)	0,035 (0,012) 0,00031 10,3 (0,5)	0,040 (0,004) 0,00036 8,9 (0,9)
Zn accumulé (extr.+ rés.) mg/g.Ps. μmol/mg.Ps.	1,853 0,02837	0,745 0,01144	1,085 0,01657	1,6 0,02446	2,357 0,03601
Zn résiduel mg/g.Ps. μmol/mg.Ps. rés./extr.+rés. %	1,737 (0,81) 0,0266 (0,0124) 93,8	0,736 (0,12) 0,0113 (0,0018) 98,8	0,937 (0,022) 0,0143 (0,0003) 86,3	1,368 (0,036) 0,0209 (0,0006) 85,4	2,127 (0,129) 0,0325 (0,0020) 90,3
Zn extrait mg/g.Ps. μmol/mg.Ps. extr./extr.+rés. %	0,116 (0,002) 0,00177 6,2 (0,1)	0,009 (0,002) 0,00014 1,2 (0,3)	0,148 (0,005) 0,00227 13,7 (0,5)	0,233 (0,0012) 0,00356 14,6 (0,1)	0,230 (0,035) 0,00351 9,7 (1,5)

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	1
2. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	4
2.1. LES METAUX	5
2.1.1. Place dans la classification des éléments métalliques et spéciation	5
a) Le cadmium	9
b) Le nickel	11
c) Le cuivre	12
d) Le zinc	13
2.1.2. Production et consommation	14
a) Le cadmium	14
b) Le nickel	15
c) Le cuivre	16
d) Le zinc	17
2.1.3. Concentrations des métaux trouvés dans l'eau ou les écosystèmes aquatiques	17
2.1.4. Métaux dans les boues de station d'épuration	29
2.1.5. Normes européennes et françaises de concentrations maximales admissibles des métaux dans l'eau et boues	32
2.2. STRUCTURE DES ENVELOPPES BACTERIENNES	32
2.2.1. Bactéries gram positives	34
a) Le peptidoglycane	34
b) Les acides téichoïques et téichuroniques	35
c) D'autres polymères	35
2.2.2. Bactéries gram négatives	38
a) Les exopolymères	38
b) La membrane externe	40
c) Le peptidoglycane	44
d) L'espace périplasmique	44
e) La membrane cytoplasmique	45
2.2.3. Lyse cellulaire et séparation des enveloppes bactériennes	46
a) Lyse bactérienne	46
b) Différentes techniques de séparation des enveloppes bactériennes	47

2.3. BIOSORPTION DES METAUX PAR LES BACTERIES	51
2.3.1. Considération générale sur la biosorption des métaux	51
a) Paramètre microorganisme	51
b) Paramètre métal	52
c) Paramètre milieu	52
2.3.2. Mécanismes de biosorption	53
2.3.2.1. L'adsorption	53
a) Les exopolysaccharides	54
b) La membrane externe	56
c) Le peptidoglycane	58
2.3.2.2. Absorption/Accumulation intracellulaire	61
a) Séquestration des métaux par des protéines spécifiques	62
b) Accumulation par formation de complexes insolubles	63
2.3.3. Evaluation de l'accumulation des métaux sur les enveloppes bactériennes	63
a) Coefficient d'accumulation (CA)	64
b) Facteur de concentration (FC)	64
c) La cinétique d'accumulation	64
d) Isothermes d'adsorption	67
e) Modèle de Ruzic	72
f) Modèle de Scatchard	74
2.3.4. Extraction des métaux	79
3. MATERIEL ET METHODES	85
3.1. PSEUDOMONAS FLUORESCENS	86
3.1.1. <i>Pseudomonas fluorescens</i> pour le fractionnement des enveloppes	86
3.1.2. Préparation d'une suspension de <i>Pseudomonas fluo-</i> <i>rescens</i> pour les essais d'accumulation des métaux après croissance	87
3.1.3. Préparation d'une suspension de <i>P. fluorescens</i> pour les essais d'accumulation des métaux au cours de la croissance	87
3.1.4. Boues de station d'épuration	87
3.2. NUMERATION DES BACTERIES	88

3.3. TECHNIQUE DE SEPARATION DES ENVELOPPES CELLULAIRES	90
a) Isolement des membranes externes	90
b) Préparation du peptidoglycane	90
c) Préparation des membranes cytoplasmiques	91
3.4. MESURE DES POIDS SECS	92
a) Après lyophilisation	92
b) Après filtration	92
3.5. DOSAGE DES MARQUEURS DES ENVELOPPES	92
a) Dosage du 2-céto-3-déoxyoctanate	93
b) Dosage de la succinate déshydrogénase	94
c) Dosage des hexosamines	95
d) Dosage des protéines	96
e) Dosage du phosphore	97
3.6. BLOCAGE DES GROUPEMENTS CARBOXYLIQUES	98
a) Réalisation de la réaction de blocage	98
b) Contrôle de la réaction de blocage	99
3.7. TECHNIQUE DE DIALYSE	101
3.8. SOLUTIONS METALLIQUES TESTEES	102
3.9. DOSAGE DES METAUX	103
3.10. MINERALISATION DE LA BIOMASSE ET SOLUBILISATION DES METAUX	104
3.11. SOLUTIONS DU COMPLEXANT (N.T.A.)	104
3.12. PREPARATION DU MATERIEL	104
4. ETUDE EXPERIMENTALE	105
4.1. FRACTIONNEMENT DES ENVELOPPES CELLULAIRES DE <i>P. FLUORESCENS</i>	106
4.1.1. Objectif	106
4.1.2. Protocole	106
4.1.3. Résultats et discussion	106
a) Masse des différentes structures	108
b) Estimation de la contamination	109
c) Perte de matériel cellulaire	113

4.2. ACCUMULATION DES METAUX PAR LES ENVELOPPES DE <i>P. FLUORESCENS</i> MODIFIES OU NON	115
4.2.1. Objectif	115
4.2.2. Protocole	115
4.2.3. Résultats	116
4.2.3.1. Dosage des groupements NH ₃ ⁺	116
4.2.3.2. Accumulation des métaux par les enveloppes isolées de <i>P. fluorescens</i>	118
a) Cadmium	118
b) Nickel	124
c) Cuivre	129
d) Zinc	134
4.2.4. Discussion	139
4.3. ETUDE DE L'EXTRACTION DES METAUX (Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺) AVEC L'ACIDE NITRILOTRIACETIQUE (N.T.A.) A PARTIR DES BIOMASSES BACTERIENNES CONTAMINEES	143
4.3.1. Extraction des métaux (Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺) accumulés par <i>P. fluorescens</i> après croissance à l'aide du N.T.A.	143
a) Protocole d'accumulation	143
b) Protocole d'extraction	144
c) Résultats de l'accumulation des métaux	145
d) Résultats de l'extraction des métaux	148
4.3.2. Extraction des métaux (Cd ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺) de <i>P. fluorescens</i> contaminé en phase de croissance	150
a) Protocole d'accumulation	150
b) Protocole d'extraction	152
c) Résultats de l'accumulation des métaux	153
d) Résultats de l'extraction des métaux	154
4.3.3. Application sur les boues de station d'épuration	156
a) Protocole	156
b) Résultats	158
4.4. DISCUSSION	160
5. CONCLUSIONS	162
6. BIBLIOGRAPHIE	167
7. ANNEXES	200