

Université MUSTAPHA Stambouli

Mascara



جامعة مصطفى اسطمبولي

معسكر

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques

Laboratoire de Laboratoire de Géo Environnement et Développement des Espaces

THESE de DOCTORAT

Spécialité : Biotechnologies et Communications Microbiennes

Intitulée

Bioremédiation des sols pollués par l'usage des PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

Présentée par : MAZARI Hibat Errahmen

Le: 08 /07/ 2024

Devant le jury :

Président	DJADOUNI Fatima	Prof.	Université de Mascara
Examineur	KHELIL-RADJI Fatima Zohra	Prof.	Université Oran 1
Examineur	MEHDEB Djamilia	MCA	Ecole supérieur d'agronomiede Mostagamen
Examineur	MOUMENE Ouhiba	MCA	Université de Mascara
Examineur	NAIR Samira	MCA	Université de Mascara
Encadrant	MELIANI AMINA	Prof.	Université de Mascara
Co-Encadrant	DJIBAOUI Rachid	Prof.	Université de Mostaganem

Année Universitaire : 2023 – 2024

Remerciement

Je rends grâce à Allah, le Tout-Puissant, pour m'avoir accordé la force et la patience nécessaires pour achever cette thèse. Ses bénédictions ont été ma source d'inspiration et de réconfort tout au long de ce voyage académique

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers ma directrice de thèse, Prof. MELIANI Amina, pour son encadrement attentif, ses conseils éclairés et son soutien constant tout au long de cette recherche. Son expertise, sa patience et sa disponibilité ont été d'une valeur inestimable pour la réussite de ce travail.

Je souhaite également remercier chaleureusement mon co-encadrant, Prof. DJIBAOUI Rachid, pour sa collaboration précieuse, ses conseils avisés et son soutien tout au long de ce projet. Sa contribution a été essentielle pour la progression de mes travaux et pour l'atteinte des objectifs fixés.

Un remerciement particulier est adressé au président du jury Mme DJADOUNI Fatima pour son engagement et son évaluation attentive de ce travail. Sa contribution a permis d'assurer la qualité et la rigueur de cette thèse.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers les membres du jury : Mme KHELIL-RADJI Fatima Zohra, Mme MEHDEB Djamilia, Mme MOUMENE Ouhiba et Mme NAIR Samira pour leur temps, leur expertise et leurs précieux commentaires qui ont contribué à enrichir ce travail.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à M. BOUDEROUA Kaddour pour son soutien inestimable et sa contribution précieuse en m'ouvrant les portes du Laboratoire de Biotechnologie Appliquée à l'Agriculture et à la Préservation de l'Environnement - ESAM.

Sa générosité et son engagement ont été des éléments essentiels dans la réalisation de cette thèse, et je lui suis sincèrement reconnaissant pour son aide précieuse.

Je saisis également cette occasion pour exprimer ma reconnaissance envers les enseignants et en particulier aux ingénieurs de laboratoire de l'ESAM pour leur précieux soutien tout au long de cette recherche, ainsi que mes collègues de l'ESAM et du laboratoire LGEDE pour leur soutien et leur collaboration précieuse.

Enfin, je suis reconnaissant envers toutes les personnes qui m'ont aidé de près ou de loin dans cette aventure académique, que ce soit au sein des laboratoires ou des facultés de l'Université de Mostaganem, de l'ENS de Mostaganem, de l'Université de Mascara et CYYMIT d'Eskişehir.

المخلص

يشكل تلوث التربة بالمعادن الثقيلة خطراً كبيراً للبيئة، مما يؤثر بشكل كبير على صحة الإنسان والتنوع الحيوي. في هذا السياق، يظهر استكشاف استراتيجيات حيوية لاستخلاص المعادن الثقيلة كبديل مستدام وفعال بيئياً. تظهر بعض ناقلات المعادن، ولاسيما «Pyoverdine»، خصائص فعالة في امتصاص المعادن، مما يوفر حلاً واعداً لهذه المشكلة. تضمنت هذه الدراسة فحصاً لخمس وأربعين عزلة من بكتيريا *Pseudomonas* لتقييم قدرتها على استخلاص هذه المعادن من التربة الملوثة. بالإضافة إلى ذلك، قمنا بمتابعة تكوين عدة مركبات ابيضية، بما في ذلك السيدروفور «siderophores» وحمض الإندول الخليك «AIA» والأمونيا وسيانيد الهيدروجين «HCN» وإذابة الفوسفات تم توصيف المحاليل المجزأة من siderophores المنقى باستخدام التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء (FT-IR). حيث أشارت النتائج إلى وجود مستويات ملحوظة في إنتاج siderophore لدى كل من *P. lactis* و *P. atacamensis* و *Pseudomonas sp. PS11* على وجه الخصوص، أظهر pyoverdine المستخلصة من *P. lactis* تقارباً أعلى في الارتباط للبروم والقصدير والروديوم والرصاص. تشير النتائج التي توصلنا إليها إلى أن pyoverdine المستخرج من *P. atacamensis* أظهر فعالية في إزالة أيونات النحاس (49.63%)، متجاوزاً قدرة *P. lactis* (47.65%) والمحاليل الشاهدة (EDTA) وحمض الستريك، التي تتراوح من (43.11%) إلى (27.58%).

بالإضافة إلى ذلك، تم فحص السلالات بحثاً عن قدرتها في تحفيز نمو النبات، على محصول القمح اللين (*Triticum aestivum L.*)، سلالة SERI 82-Bread في ظروف إجهاد معدني ناجم عن كبريتات النحاس بتركيزين مختلفين. درسنا تأثيرها على إنبات البذور ونمو الشتلات، مع الأخذ في الاعتبار المعايير الفسيولوجية والكيميائية الحيوية والمورفولوجية. أظهرت النتائج أن البكتيريا المحفزة لنمو النبات حسنت بشكل كبير المؤشرات مثل إنتاج اليخضور ومحتوى البرولين مقارنة بمجموعة التحكم غير الملقحة. وتفتح هذه النتائج آفاقاً واعدة لوضع استراتيجيات معالجة بيولوجية صديقة للبيئة، مما يسهم في الحفاظ على صحة النظم الإيكولوجية الأرضية والأمن الغذائي في الأجل الطويل.

الكلمات المفتاحية: المعالجة الحيوية، المعادن الثقيلة، PGPR، siderophores، التربة الملوثة

Abstract

Soil contamination by heavy metals poses a major environmental risk with extensive implications for human health and biodiversity. In this context, exploring biological methods for chelating heavy metals has emerged as a promising and environmentally sustainable approach. Specifically, certain metallophores, notably pyoverdine, demonstrate efficient metal uptake properties, offering a viable solution. This study involved screening forty-five isolates of *Pseudomonas* for their potential to extract these metals from contaminated soils. Additionally, we monitored the synthesis of various metabolites including siderophores, indole-3-acetic acid (AIA), ammonia, hydrogen cyanide (HCN), and phosphate solubilization. The purified siderophore fraction was characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). Results indicated a notably higher level of siderophore production in *P. lactis*, *P. atacamensis*, and *Pseudomonas* sp. PS11. Particularly, pyoverdine from *P. lactis* demonstrated higher binding affinity for bromine, tin, rhodium, and lead. Our findings suggest that pyoverdine extracted from *P. atacamensis* exhibited improved copper ion removal capacity (49.63%), surpassing that of *P. lactis* (47.65%) and control agents (EDTA and citric acid, ranging from 43.11% to 27.58%).

Furthermore, strains were examined for their *in vivo* PGP potential on a culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.), SERI 82-Bread wheat variety, under metal stress induced by copper sulfate at two different concentrations. We studied their impact on seed germination and seedling growth, considering physiological, biochemical, and morphological parameters. Results demonstrated that PGPR significantly enhanced indicators such as chlorophyll production and proline content compared to the uninoculated control group. These findings offer promising prospects for the development of environmentally friendly bioremediation strategies, thereby contributing to preserving the health of terrestrial ecosystems and ensuring long-term food security.

Keywords : Bioremediation, heavy metals, PGPR, siderophores, contaminated soils

Résumé

La contamination des sols par des métaux lourds représente un risque environnemental majeur, avec des implications étendues pour la santé humaine et la biodiversité. Dans ce contexte, l'exploration de méthodes biologiques pour chélater les métaux lourds a émergé comme une approche prometteuse et durable sur le plan environnemental. Notamment, certains métallobactériophores, en particulier la pyoverdine, démontrent des propriétés de captation efficaces, offrant une solution viable. Cette étude a impliqué le dépistage de quarante-cinq isolats de *Pseudomonas* pour leur potentiel à extraire ces métaux des sols contaminés. De plus, nous avons suivi la synthèse de divers métabolites, notamment les sidérophores, l'acide indole-3-acétique (AIA), l'ammoniac, le cyanure d'hydrogène (HCN) et la solubilisation du phosphate. Les fractions de sidérophores purifiées ont été caractérisées à l'aide de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR). Les résultats ont indiqué un niveau notablement plus élevé de production de sidérophores chez *P. lactis*, *P. atacamensis* et *Pseudomonas* sp. PS11. En particulier, la pyoverdine de *P. lactis* a démontré une affinité de liaison plus élevée pour le brome, l'étain, le rhodium et le plomb. Nos conclusions indiquent que la pyoverdine extraite de *P. atacamensis* a présenté une capacité améliorée de retrait des ions cuivre (49,63 %), surpassant celle de *P. lactis* (47,65 %) et des agents témoins (EDTA et acide citrique, allant de 43,11 % à 27,58 %).

De plus, les souches ont été examinées pour leur potentiel PGPR in vivo sur une culture de blé tendre (*Triticum aestivum* L.), variété SERI 82-Bread wheat, confrontée à un stress métallique induit par le sulfate de cuivre à deux concentrations différentes. Nous avons étudié leur impact sur la germination des grains et la croissance des plantules, en tenant compte des paramètres physiologiques, biochimiques et morphologiques. Les résultats ont démontré que les PGPR ont significativement amélioré des indicateurs tels que la production de chlorophylle et la teneur en proline par rapport au groupe témoin non inoculé. Ces résultats ouvrent des perspectives prometteuses pour le développement de stratégies de bioremédiation respectueuses de l'environnement, contribuant ainsi à préserver la santé des écosystèmes terrestres et à assurer la sécurité alimentaire à long terme.

Mots clés : Bioremédiation, métaux lourds, PGPR, sidérophores, sols contaminés

Liste des abréviations

Ag : Argent
Au : Or
Ca : Calcium
Cu : Cuivre
Fe : Fer
Hg : Mercure
Mg : Magnésium
Mn : Manganèse
Ni : Nickel
V : Vanadium
Zn : Zinc

AIA : Acide indole-3-acétique	HCN : Acide cyanhydrique
ADN : Acide désoxyribonucléique	HCl : Acide chlorhydrique
CAS : Chrome Azurol S	IT : Indice de tolérance
CE : Conductivité électrique	MOS : Matière organique du sol
CEC : Capacité d'échange de cations	NaF : Fluorure de Sodium
Chlo_a : Chlorophylle A	PGP : Protéine de transport de glycoprotéine
Chlo_b : Chlorophylle B	PGPE : Endophytes promoteurs de croissance des plantes
Chlo_{total} : Total de chlorophylle (A + B)	PGPR : Rhizobactéries promoteurs de croissance des plantes
CMC : Carboxyméthylcellulose	ppm : Parties par million
CMI : Concentration minimale inhibitrice	pH : Potentiel Hydrogène
CO₂ : Dioxyde de carbone	RWC : Teneur en eau relative
EDTA : Acide éthylènediaminetétraacétique	TGR : Taux de germination relative
FT-IR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	TTC : Triphenyltetrazolium chloride
	UFC : Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1 :	Présentation générale de l'homéostasie du cuivre au niveau systémique et cellulaire (Ge <i>et al.</i> , 2022)	15
Figure 2 :	Mécanismes de phytoremédiation impliqués dans la contamination par les métaux lourds chez <i>Brassica juncea L</i> (Rani <i>et al.</i> , 2023).....	22
Figure 3 :	Mécanismes impliqués dans l'absorption des métaux lourds par un système microbien (Syed <i>et al.</i> , 2023).....	32
Figure 4 :	Mode d'action des PGPR indiquant des effets directs et indirects dans l'amélioration de la croissance des plantes et la suppression des phytopathogènes (Hyder <i>et al.</i> , 2023).....	38
Figure 5 :	Pyoverdine et sa diversité structurale chez <i>Pseudomonas</i> sp. (Kümmerli, 2023).....	49
Figure 6 :	Localisation du site d'échantillonnage à Sour (Mostaganem - Algérie) disponible sur Google Maps: https://www.google.com/maps	50
Figure 7 :	Mode de prélèvement des Échantillons de sol.....	51
Figure 8 :	Dispositif expérimental de la granulométrie par tamisage.....	52
Figure 9 :	Dispositif de Pipette de Robinson (Laboratoire INSID - Relizane 'El Matmar').....	54
Figure 10 :	Les grains de blé enrobés de CMC contenant des cellules bactériennes ^a ; Séchage des grains dans un flux d'air laminaire ^b	64
Figure 11 :	Germination des grains sous des conditions de stress.....	64
Figure 12 :	Plantation de jeunes plants.....	65
Figure 13 :	Cultivation de plants de blé dans une chambre de culture : 1 semaine ^a ; 2 semaines ^b ; 3 semaines ^c ; 4 semaines ^d	66
Figure 14 :	Granulométrie par tamisage, distribution de la taille moyenne des grains.....	70
Figure 15 :	Aspect macroscopique de la culture ^a et des colonies ^b de <i>Pseudomonas</i> sur gélose King B, caractérisation microscopique ^c des <i>Pseudomonas</i> après une coloration de Gram au grossissement X1000.....	75
Figure 16 :	Résultats de la CMI par macrodilution.....	76
Figure 17 :	La CMI par microdilution suite à l'Addition de TTC sur Microplaque à 96 Puits.....	77

Figure 18 :	Activités des PGPR: production de HCN ^{a/b} (résultats positifs ^a /négatifs ^b), production de sidérophores ^c , et solubilisation de phosphate dans les milieux de Pikovskaya ^d et NBRIP ^e	78
Figure 19 :	la production d'acide indole acétique chez différents isolats.....	79
Figure 20 :	Solubilisation quantitative du phosphate par les isolats en milieu NBRIP.....	80
Figure 21 :	Taux de la production quantitative des siderophores.....	80
Figure 22 :	La purification fractionnée des siderophores : F1 : Fraction catécholate, F2 : fraction hydroxamate et RC : réactif de CAS.....	81
Figure 23 :	Spectres FTIR de la pyoverdine de (a) <i>P. atacamensis</i> PO22, (b) <i>P.lactis</i> R2P30, et (c) <i>Pseudomonas</i> sp. PS11.....	82
Figure 24 :	Extraction des métaux lourds du sol avec différentes solutions : Pyoverdine, EDTA et acide citrique après 24 heures d'agitation.....	81
Figure 25 :	Arbre phylogénétique illustrant la relation entre les souches PO22, R2P30, PS11 et PO29 les espèces de <i>Pseudomonas</i> les plus étroitement apparentées.....	85
Figure 26 :	Visualisation de la séparation des facteurs (siderophores, AIA, PO ₄) et les variables (isolats) en ACP.....	87
Figure 27 :	Dendrogramme de l'analyse de regroupement, testant le niveau de similarité dans l'élimination des métaux lourds.....	88
Figure 28 :	Effet du cuivre sur a : le taux de germination et b :le taux de germination relative.....	95
Figure 29 :	Effet du cuivre sur l'indice de tolérance.....	96
Figure 30 :	Effet du cuivre sur la longueur des plantules.....	97
Figure 31 :	Effet du cuivre sur la longueur des racines et des plantules.....	97
Figure 32 :	Impact de Cu et l'inoculation des PGPR sur la RWC.....	98
Figure 33 :	Impact de Cu et l'inoculation des PGPR sur la fuite d'électrolyte.....	99
Figure 34 :	Impact de Cu et l'inoculation des PGPR sur la teneur en chlorophylle.....	100
Figure 35 :	Impact de Cu et l'inoculation des PGPR sur la teneur en proline.....	101

Figure 36 :	Effet du cuivre et des PGPR sur la teneur en calcium ^a , en fer ^b , en potassium ^c et en magnésium ^d chez le blé. Les parties aériennes et racinaires sont présentées par A et B respectivement.....	105
Figure 37 :	Effet du cuivre et des PGPR sur la teneur en manganèse ^a , en phosphore ^b , en zinc ^c et en cuivre ^d chez le blé. Les parties aériennes et racinaires sont présentées par A et B respectivement.....	106
Figure 38 :	La biomasse aérienne des plantes.....	108
Figure 39 :	La biomasse racinaire des plantes.....	109
Figure 40 :	La longueur des parties racinaire des plantes.....	110
Figure 41 :	La longueur des parties aérienne des plantes.....	111
Figure 42 :	Effet du cuivre sur la biomasse racinaire et aérienne des plantes.....	111

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Technologies de bioremédiation.....	30
Tableau 2 :	Types de sols selon la classification USCS/LCPC (Kebir, 2012).....	52
Tableau 3 :	Calcul des pourcentages plus fins (retenus) (Kebir, 2012).....	53
Tableau 4 :	Résultats de l'analyse par tamisage du sol étudié	69
Tableau 5 :	résultats des paramètres physico-chimiques du sol.....	71
Tableau 6:	Valeurs moyennes de chlorophylle de <i>Triticum aestivum</i> L.....	100
Tableau 7 :	Valeurs moyennes de la proline de <i>Triticum aestivum</i> L	101

Table des matières

<i>Remerciement</i>	I
المخلص.....	III
Abstract.....	IV
Résumé	V
Liste des abréviation.....	VII
Liste des figures	VII
Liste des tableaux.....	X
Introduction :	1
<i>Chapitre I : Les Métaux Lourds dans l'Écosystème : Le Cu Entre Nécessité et toxicité</i>	1
I.1 Définition des métaux lourds	3
I.2. Sources de contamination	3
I.3. Les métaux lourds dans les sols agricoles	4
I.4.Facteurs influant sur la mobilité des métaux lourds dans le sol	4
I.4.1.Potentiel d'hydrogène (pH)	4
I.4.2. Le potentiel redox (Eh)	5
I.4.3. La capacité d'échange de cations CEC	5
I.4.4. La matière organique du sol (MOS)	6
I.4.5.Texture du sol	6
I.4.6. Le temps	6
I.5. Le cuivre	7
I.5.1. Le cuivre et la santé animale	7
I.5.3. Le cuivre et la santé humaine	9
I.6.Toxicité des métaux lourds	9
I.6.1. La toxicité chez la plante	10
I.6.1.1. Sur la germination	10
I.6.1.2. Le système racinaire	11
I.6.1.3. Effet sur la croissance et la morphologie des plantes	11
I.6.1.4. Physiologique	11

I.6.1.5. Pigments photosynthétiques.....	12
I.6.2.Mécanismes de régulation du cuivre dans la santé et la pathologie humaine.....	13
I.6.2.1. La maladie de Wilson.....	14
I.6.2.2. La maladie d'Alzheimer	15
I.7.Approches de remédiation pour les sols contaminés.....	16
I.7.1.Méthodes de remédiation physique	17
I.7.2. La remédiation chimique	17
I.7.3. La remédiation électrocinétique	18
I.8.Inconvénients des approches de remédiation des Sols.....	19
<i>Chapitre II : Bioremédiation : une approche biologique pour l'élimination des métaux lourds.....</i>	<i>21</i>
II. Approches de phytoremédiation pour la dépollution environnementale	21
II.1. Historique	21
II.2. Stratégies vertes de remédiation (La phytoremédiation).....	21
II.2.1. La phytoremédiation des métaux lourds.....	21
II.2.1.1 La rhizofiltration.....	22
II.2.1.2. La phytostabilisation	23
II.2.1.3. La phytovolatilisation.....	24
II.2.1.4. La phytoextraction	24
II.2.2.Limitation de la phytoremédiation	25
II.3. La Mycoremédiation : réponse écologique à la pollution	26
II.3.1.Limitation de la mycoremédiation	27
II.4.La Bioremédiation	28
II.4.1 La Bioremédiation <i>in situ</i>	29
II.4.2.La Bioremédiation <i>ex situ</i>	29
II.4.3.Les technologies de bioremédiation	30
II.4.4. Les Micro-Organismes : acteurs clés de la bioremédiation	31
II.4.4.1. Intégration des OGM dans la Bioremédiation	33
II.4.5.Bioremédiation limitations et défis.....	34
<i>Chapitre III : Les PGPR et les Siderophores de Pseudomonas : comme outils de Bioremédiation.....</i>	<i>36</i>

III.1. Bactéries promotrices de croissance des plantes (PGPR).....	36
III.2. Classification des PGPR	36
III.2.1. Le degré de proximité.....	36
III.2.2. Le mécanisme	36
III.2.2.1. Les mécanismes directs	36
III.2.2.2. Les mécanismes indirects	37
III.2.3. La fonction	38
III.3. PGPR et stress.....	38
III.4. PGPR et l'effet ISR	40
III.5. Les EPS des PGPR	41
III.6. Les sidérophores.....	42
III.6.2. Classification des siderophores.....	42
III.6.2.1. Classification selon l'organisme producteur	43
III.6.2.1.1. Origine végétale.....	43
III.6.2.1.2. Origine fongique	43
III.6.2.1.3. Origine bactérienne	44
III.6.2.2. Classification selon la structure chimique.....	45
III.6.2.2.1. Les Hydroxamates.....	45
III.6.2.2.2. Les Catécholates.....	46
III.6.2.2.3. Les Carboxylates	46
III.6.2.2.4. Les sidérophores type mixtes.....	47
III.6.3. La Pyoverdine.....	48
III.6.4. Pyoverdines et la chélation des métaux lourds	49
<i>Matériel et méthodes</i>	<i>51</i>
IV.1. Zone d'étude	50
IV.1.1. Choix de la zone d'étude	50
IV.1.2. Localisation géographique et caractéristique.....	50
IV.1.3 Echantillonnage	50
IV.1. 4. Prélèvement	51

IV.1.2. Préparations des échantillons avant l'analyse (AFNOR NF X 31-427).....	51
IV.1.2.1. Quartage	51
IV.1.3. Analyse granulométrique des sols (AFNOR NF X31-107)	51
IV.1.4. Analyse granulométrique par tamisage (AFNOR NF X31-101)	52
IV.1.3. Analyse granulométrique par sédimentation (AFNOR NF X31-107 (1983)).....	53
IV.1.4. Analyse physico-chimique du sol.....	54
IV.1.4.1. Détermination de l'humidité résiduelle (AFNOR NF X 31-102 (1992)).....	54
IV.1.4.2. Détermination du pH.....	54
IV.1.4.3. Détermination de la conductivité électrique (NF X 31-113)	54
IV.1.4.4. Détermination de la matière organique.....	55
IV.2. Analyses microbiologiques	55
IV.2.1. Prélèvement des échantillons.....	55
IV.2.2. Isolement des bactéries résistantes aux métaux lourds.....	55
IV.2.3. Identification phénotypique	55
IV.2.3.1. Examen macroscopique :	55
IV.2.3.2. Examen microscopique.....	55
IV.2.3.3. Examen Biochimique.....	56
IV.2.4. Identification génétique des isolats de <i>Pseudomonas</i>	56
IV.2.5. Conservation des isolats.....	57
IV.2.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des métaux lourds	57
IV.2.6.1. Par Macrodilution	57
IV.2.6.2. Méthode de microdilution.....	57
IV.2.7. Évaluation des Paramètres des PGP <i>in vitro</i>	57
IV.2.7.1. Solubilisation du phosphate	57
IV.2.7.1.1. Evaluation qualitative de la solubilisation des phosphates	57
IV.2.7.1.2. Evaluation quantitative de la solubilisation des phosphates.....	58
IV.2.7.2. Production d'acide indole acétique (AIA).....	58
IV.2.7.3. Production d'acide cyanhydrique (HCN)	59
IV.2.7.4. Production d'ammoniac	59

IV.2.7.5. La production qualitative des sidérophores.....	59
IV.2.7.5.1. Évaluation quantitative de la production de sidérophores	60
IV.2.7.5.2. Extraction des siderophores	60
IV.2.7.5.4. Caractérisation du sidérophore par FT-IR.....	61
IV.2.8. Prélèvement et préparation du sol contaminé par le cuivre.....	61
IV.2.9. Lavage du sol selon batch processing.....	61
IV.3. Impact de l'inoculation de PGPR sur la croissance du blé tendre en conditions de stress métallique : Etude <i>in vivo</i>	63
IV.3.1. Matériel végétal.....	63
IV.3.2. Les souches bactériennes.....	63
IV.3.3. La désinfection des grains.....	63
IV.3.4. Préparation de l'inoculum bactérien et enrobage des grains.....	63
IV.3.5. Interaction bactérie-graine (effet PGPR <i>in vivo</i>).....	64
IV.3.5.1. Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination des grains sous stress métallique	64
IV.3.5.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance des plantes de blé sous stress métallique :	65
IV.3.5.2.1. Inoculation des plants de et blé conditions de culture :.....	65
IV.3.5.3. Paramètres physiologiques.....	66
IV.3.5.3.1. Test de fuite d'électrolyte.....	66
IV.3.5.3.2. Indice de teneur en eau relative (RWC)	66
IV.3.5.4. Paramètres biochimiques.....	66
IV.3.5.4.1. Contenu en chlorophylle	66
IV.3.5.4.2. Mesure des concentrations de proline	67
IV.3.5.4.3. Détermination de la concentration en élément minéral et en Cu dans les composants aériens et racinaires par ICP-OES.....	67
IV.3.5.5. Détermination des caractéristiques morphologiques	68
IV.3.5.6. Traitement statistique.....	68
<i>Résultats et discussions</i>	50
V.1.Caractéristiques physico-chimique du sol.....	69

V.1.1. Analyse granulométrique du sol étudié :	69
V.1.2. La granulométrie par sédimentation :	70
V.1.3. Les analyses physico-chimiques :	70
Discussion :	71
V.2. Caractérisation microbiologique	74
V.2.1 Analyses Morphologique :	74
V.2.2. Détermination de la Concentration Inhibitrice Minimale (CMI)	75
V.2.2.1. Macrodilution :	75
V.2.2.2. Microdilution :	77
V.2.3. Évaluation du potentiel PGP des isolats	77
V.2.3.1. Production d'acide indolacétique (AIA)	78
V.2.3.2 HCN et production d'ammoniac.....	79
V.2.3.3 Solubilisation du phosphate	79
V.2.3.4 Production de sidérophores.....	80
V.2.3.5 Caractérisation de la pyoverdine purifiée par FT-IR	81
V.2.3.6 Lavage du sol selon batch processing:.....	83
V.2.3.7. Identification moléculaire des isolats bactériens	84
V.2.3.8. L'analyse multivariée à l'aide de l'analyse en composantes principales (ACP)	85
Discussion	90
V.3. Effet du cuivre sur la Germination du blé tendre	95
V.3.1. Le taux de germination et le taux de germination relative.....	95
V.3.2. L'Indice de tolérance :	96
V.3.3. Longueur des plantules :	96
V.3.2. Impact de l'inoculation bactérienne sur la croissance du blé tendre en conditions de stress métallique	97
V.3.2.1. Contenu en eau relative des feuilles (RWC)	97
V.3.2.2. Fuite d'électrolyte	98
V.3.2.3. Teneur en Chlorophylle.....	99
V.3.2.4. La teneur en Proline	101

V.3.2. 5. L'acquisition des éléments nutritifs	102
V.3.2.5.1. Au niveau racinaire	102
V.3.2.5.2. Au niveau aérien.....	103
V.3.2.6. Paramètres morphologiques.....	107
V.3.2.6.1.Effet du cuivre sur la biomasse fraîche aérienne et racinaire	107
V.3.2.6.2. Poids frais de la partie aérienne	107
V.3.2.6.3.Poids frais des racines.....	108
V.3.2.6.4. Longueur des racines.....	109
V.3.2.6.5.Longueur de la partie aérienne.....	110
Discussion	112
Conclusion et Perspectives	124
<i>Références bibliographique</i>	<i>127</i>
<i>Annexes</i>	<i>130</i>

Introduction

Introduction :

En raison de l'expansion économique énorme et de la croissance rapide dans divers secteurs, notamment l'agriculture et l'industrie, l'environnement est confronté à une augmentation significative de la pollution (**Alengebawy et al., 2021**). Parmi les multiples préoccupations environnementales actuelles, la pollution par les métaux lourds est particulièrement sérieuse. Cette forme de pollution présente des risques sérieux pour la qualité et la fertilité des sols, ainsi que pour la santé et le bien-être des êtres vivants, y compris les animaux et les humains, via la chaîne alimentaire (**Teng et al., 2022**). Une fois que ces métaux pénètrent dans les écosystèmes, ils ont tendance à persister pendant des périodes prolongées (**Mathew et al., 2023; Luo, 2024**), leur biodégradabilité étant limitée et leur potentiel de contamination des sources d'eau et de nourriture étant significatif, ce qui entraîne des conséquences durables sur la sécurité alimentaire (**Adnan et al., 2022**). Outre ces impacts, les niveaux élevés de résidus, leur toxicité élevée et la complexité de leur élimination rapide constituent des défis majeurs pour la production agricole et la sécurité alimentaire (**Luo, 2024**).

Dans les vignobles, l'usage de composés de cuivre (Cu) pour combattre les maladies fongiques remonte à plus d'un siècle (**Marini et al., 2024**). Bien que les pesticides à base de cuivre soient efficaces contre ces maladies, leur utilisation généralisée a été identifiée comme une source majeure de contamination des sols par le cuivre (**Marini et al., 2024; Schoffer et al., 2024**). La surutilisation de ces produits agrochimiques suscite des préoccupations urgentes, menaçant les écosystèmes. La pollution des sols, résultant de l'accumulation d'engrais chimiques, de pesticides et de métaux lourds, découle directement de l'industrialisation rapide, de l'intensification agricole et de la transformation des écosystèmes naturels pour répondre aux besoins humains croissants (**Alkhanjaf et al., 2024**).

Il existe de nombreuses méthodes conventionnelles pour la remédiation physique et chimique (**Tyagi et Kumar, 2021; Rajendran et al., 2022**), notamment l'excavation, le lavage des sols, la remédiation électrocinétique, la stabilisation (**Xu et al 2021**), ainsi que la précipitation chimique, la chélation, et l'osmose inverse (**Inobeme et al., 2023**). Bien que ces méthodes soient souvent efficaces pour éliminer ou réduire les contaminants, elles présentent également des inconvénients notables (**Peng et al., 2021**), tels que leur coût élevé et leurs effets néfastes à long terme (**Liu et al., 2020**), incluant une forte consommation d'énergie, la dégradation des sols, et la possibilité de pollution secondaire (**Inobeme et al., 2023**). En revanche, la technologie de bioremédiation émerge comme une solution efficace pour éliminer

les contaminants environnementaux tout en étant économique, pratique et respectueuse de l'environnement (**Kour et al., 2021**). Elle mobilise une diversité d'organismes biologiques tels que les bactéries, les algues, les champignons, les lichens ainsi que les plantes (**Inobeme et al., 2023**). Au cours des dernières années les rhizobactéries prometteuse de la croissance des plantes (PGPR) ont attiré une attention considérable en raison de leur rôle dans la bioremédiation. Les statistiques montrent une augmentation exponentielle du nombre annuel de publications de 1995 à 2023. Cette croissance rapide est attribuée à la préoccupation mondiale croissante concernant la pollution par les métaux lourds, ainsi qu'à l'utilisation de ces bactéries comme solution prometteuse (**Qin et al., 2024**). Les PGPR fournissent une large gamme de matériaux de recherche pour la technologie de remédiation microbienne, car ils démontrent une capacité à tolérer les métaux lourds, à dégrader ou à remédier aux contaminants du sol en les convertissant en formes moins toxiques (**Gupta et al., 2023**). Il devient essentiel de comprendre la nature et l'impact de l'interaction entre les paramètres physico-chimiques du sol et la disponibilité ainsi que la toxicité des métaux lourds, dans les sols contaminés. De même, il est crucial d'évaluer l'efficacité des populations de PGPR résistantes aux métaux lourds dans la bioremédiation des sols contaminés par ces métaux, en comparaison avec d'autres méthodes de remédiation. En outre, il est nécessaire d'examiner l'efficacité des siderophores en tant qu'alternative biologique des chélateurs chimiques et organiques pour le lavage des sols pollués par le cuivre, et d'analyser comment utilisation des PGPR affecte la croissance des plantes sous stress métallique. Ces questions de recherche sont cruciales pour développer des stratégies de bioremédiation efficaces et respectueuses de l'environnement face aux défis croissants liés à la pollution par les métaux lourds.

La présente étude vise à examiner les interactions au sein de l'écosystème sol-bactérie- plante dans le contexte de la contamination par les métaux lourds, en mettant particulièrement l'accent sur la présence et dissémination du cuivre dans les sols pollués. Nous nous proposons d'évaluer l'efficacité des populations de PGPR résistantes aux métaux lourds dans la bioremédiation de ces sols contaminés, en les comparant à d'autres méthodes de dépollution. De plus, nous souhaitons étudier l'efficacité des siderophores en tant qu'alternative biologique pour le lavage des sols pollués par le cuivre, tout en analysant l'impact PGP sur la croissance des plantes en conditions de stress métallique.

Via l'intégration de ces différentes perspectives, nous espérons contribuer à l'élaboration de stratégies novatrices et respectueuses de l'environnement pour la gestion durable des sols contaminés par les métaux lourds, tout en favorisant la santé des écosystèmes terrestres.

Pour comprendre pleinement les enjeux et les solutions potentielles liés aux métaux lourds, il est essentiel d'analyser la littérature existante sur ce sujet. La partie bibliographique se divise en trois parties. Le premier chapitre est consacré à une analyse détaillée des métaux lourds dans l'écosystème, avec un accent particulier sur le cuivre. Ce chapitre examine à la fois les rôles biologiques essentiels du cuivre et les mécanismes par lesquels il devient toxique pour les organismes vivants. Il explore les sources de contamination par le cuivre, les effets de cette contamination sur l'environnement et la santé, ainsi que les limitations des méthodes physico-chimiques traditionnelles de la remédiation. En établissant ce cadre théorique, ce chapitre fournit une base essentielle pour comprendre les défis associés à la présence de métaux lourds dans l'environnement et prépare le terrain pour les discussions ultérieures sur les stratégies de bioremédiation.

Le deuxième chapitre se penche sur la bioremédiation en tant qu'approche biologique pour l'élimination des métaux lourds. Il commence par définir et expliquer les principes de la bioremédiation, en mettant en lumière ses avantages par rapport aux méthodes physico-chimiques traditionnelles. Les mécanismes de bioremédiation, incluant la phytoremédiation et la bioremédiation microbienne, sont explorés en détail, suivis d'exemples pratiques de succès dans ce domaine. Ce chapitre aborde également les défis et les limitations auxquels la bioremédiation est confrontée, offrant une vision équilibrée des possibilités et des obstacles.

Le troisième chapitre explore les Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) et les siderophores produits par *Pseudomonas* comme outils de bioremédiation. Après une introduction aux PGPR et à l'importance des siderophores, ce chapitre détaille les mécanismes par lesquels les PGPR favorisent la croissance des plantes et interagissent avec les métaux lourds, mettant en évidence le potentiel de ces microorganismes dans la détoxification des sols contaminés.

La partie pratique de cette recherche s'articule autour de trois volets : la caractérisation physicochimique du sol, l'isolement et l'évaluation des bactéries résistantes au cuivre pour leur potentiel de promotion de croissance *in vitro*, et l'application de leurs métabolites secondaires

pour le lavage des sols contaminés. Enfin, l'étude évalue le pouvoir des PGPR *in vivo* sur la culture de *Triticum aestivum* L. sous conditions de stress métallique.

*Chapitre I : Les Métaux Lourds dans l'Écosystème : Le Cu
Entre Nécessité et toxicité*

I.1 Définition des métaux lourds

L'étude de **Duffus (2002)** offre une série de critères pour caractériser les métaux lourds, bien que le terme ne soit pas précisément défini. Ces critères comprennent la densité spécifique, définissant les métaux lourds par une plage de 3,5 à 7 g cm⁻³. De plus, la masse atomique relative, avec les métaux ayant une masse atomique supérieure à celle du sodium, variant entre 63,54 [cuivre (Cu)] et 200,59 [mercure (Hg)] selon **Gaj et al. (2007)**. Le numéro atomique, situé entre 21 (scandium) et 92 (uranium), constitue un critère distinct, tandis que les propriétés chimiques, influençant fortement la densité, varient de 14,5 g/cm⁻³ pour des mélanges comme 76 % W, 20 % Cu, 4 % Ni, à 16,6 g/cm⁻³ pour des compositions comme 90 % W, 7 % Ni, 3 % Cu (Duffus 2002).

En outre, une définition basée sur la toxicité est établie, ces métaux étant hautement toxiques même à des concentrations très faibles, avec une tendance à s'accumuler dans la chaîne alimentaire et les tissus mous et durs. La caractéristique clé réside dans leur propension à exister sous forme chargée positivement, leur permettant de se lier à des atomes chargés négativement, comme discuté par **Badr et El-Habit (2018)**. Enfin, des définitions non chimiques datant d'avant 1936, telles que celles faisant référence à des armes à feu ou à des balles de grande taille à haute capacité, sont également citées par **Duffus (2002)**.

I.2. Sources de contamination

Les métaux lourds deviennent essentiellement des contaminants de l'environnement du sol en raison de leur génération excessive par des activités naturelles et anthropiques. Parmi les exemples de sources naturelles, on trouve les activités géothermiques, les comètes, la poussière transportée par le vent et les activités volcaniques (**Nagajyoti et al., 2010; Singh et al., 2018**).

D'autre part, la contamination d'origine anthropique est principalement due aux processus d'industrialisation rapide combinés à l'utilisation intensive de substances chimiques telles que les hydrocarbures, les pesticides, les fongicides et les hydrocarbures chlorés (**Masindi et Muedi, 2018**).

Les métaux lourds sont des polluants environnementaux omniprésents et persistants introduits dans l'environnement par des activités humaines, telles que l'exploitation minière et la fusion, ainsi que par d'autres sources de déchets industriels (**Teitzel et Parsek, 2003; Priya et al., 2023**).

En plus de ces sources, des métaux lourds ont été détectés dans des jouets et des produits pour bébés. L'exposition des enfants aux métaux lourds dans les jouets en plastique contaminés reste une préoccupation majeure pour la santé, dans certains cas provoquant un empoisonnement aigu chez les jeunes enfants (Al-Qutob *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2015; Ismail *et al.*, 2017).

Barkay et Schaefer (2001) ont mentionné que les métaux lourds sont les principaux contaminants inorganiques, qui comprennent le cadmium, le chrome, le cuivre, le plomb, le mercure, le nickel et le zinc, etc. La bioremédiation des métaux lourds peut être réalisée par immobilisation, concentration et partitionnement vers un compartiment environnemental, minimisant ainsi les dangers anticipés (Lloyd, 2003).

I.3. Les métaux lourds dans les sols agricoles

Les métaux lourds dans les sols agricoles existent sous différentes formes dissoutes (cationiques libres et espèces complexes de charges positives, neutres ou négatives), particulières (adsorbées, structurales et coprécipitées) et colloïdales (particules de taille micro et nanométrique). Le devenir des différentes espèces de métaux lourds est contrôlé par les variables principales : le pH (solubilité), la force ionique (activité et écrantage de charge) et le carbone organique dissous (complexation). Dans la rhizosphère, la spéciation chimique contrôle la toxicocinétique (absorption et transport des métaux par les plantes) tandis que la toxicodynamique (interaction entre la plante et les espèces absorbées) détermine le résultat de la toxicité (Uchimiya *et al.*, 2020).

I.4. Facteurs influant sur la mobilité des métaux lourds dans le sol

I.4.1. Potentiel d'hydrogène (pH)

Le pH joue un rôle essentiel dans de nombreuses réactions du sol, contrôlant les échanges ioniques, les réactions de réduction/oxydation, l'adsorption et les réactions de complexation (Singh et Kalamdhad, 2013). Il est un paramètre qui peut être utilisé pour estimer la mobilité des éléments chimiques dans le sol. Par conséquent, l'unité de pH peut être utilisée pour mesurer la disponibilité des métaux lourds liés au niveau de toxicité et à la pollution du sol (Sintorini *et al.*, 2021).

Le pH est le facteur le plus influent sur l'élimination du cuivre (Aityoubet *et al.*, 2020). À un pH élevé, les formes prédominantes sont des hydroxydes peu solubles et à un pH bas, des ions métalliques libres qui sont hautement solubles et prédominants. Il existe deux types de

complexes dans les réactions de complexation des métaux avec les particules du sol : les complexes solubles et les complexes insolubles. À un pH de 9, la solubilité du cuivre augmente en raison de la formation de complexes solubles (Singh et Kalamdhad, 2013).

I.4.2. Le potentiel redox (Eh)

Le potentiel redox (Eh) mesure l'activité des électrons libres en solution dans le sol, régulant ainsi de nombreuses réactions d'oxydation et de réduction (Petruzzell *et al.*, 2020). Ceci a un impact direct sur la toxicité et la mobilité des métaux lourds (ML) (Mao et Ye, 2018). Les sols présentant des niveaux élevés de Eh sont généralement secs et bien aérés, tandis que ceux qui sont submergés ou riches en matières organiques ont tendance à avoir des valeurs de Eh plus faibles. Les sols riches en matières organiques favorisent la solubilisation des oxyhydroxydes de fer, ce qui peut augmenter la biodisponibilité de certains contaminants tels que les anions d'arsenic (Petruzzell *et al.*, 2020).

De plus, les variations de l'Eh peuvent induire des réactions complexes, telles que la dénitrification et la réduction des oxydes de fer et de manganèse, influençant ainsi la solubilité des ML. Dans des milieux anoxiques, les ML peuvent se trouver sous des formes plus solubles, tandis que dans des conditions oxydées, ils ont tendance à se précipiter sous forme de sulfures métalliques moins toxiques (Mao et Ye, 2018).

I.4.3. La capacité d'échange de cations CEC

La capacité d'échange de cations (CEC) exprime la densité de charge sur les surfaces des colloïdes du sol, déterminée par les substances organiques ainsi que la quantité et le type d'argiles (Petruzzell *et al.*, 2020). Ces colloïdes possèdent une surface relativement grande, leur permettant de retenir de grandes quantités de cations. Des études ont montré que la CEC était corrélée à la répartition des métaux lourds dans les sols et à la biodisponibilité du plomb pour les vers de terre. Plus la CEC est élevée, plus la capacité du sol à retenir et à échanger des cations est grande, ce qui peut influencer la toxicité des métaux lourds dans le sol (Wijayawardena *et al.*, 2016). La capacité d'échange de cations (CEC) est l'un des facteurs importants influençant l'absorption et l'accumulation des métaux lourds (Ikhajiagbe *et al.*, 2019).

I.4.4. La matière organique du sol (MOS)

La matière organique du sol (MOS) comprend les constituants organiques présents dans le sol, se distinguant en substances humiques et non humiques. Les substances humiques (SH), telles que les acides fulviques (AF) et les acides humiques (AH), se forment naturellement pendant la décomposition des résidus organiques. Elles jouent un rôle crucial dans la rétention des métaux lourds, régulant la disponibilité du vanadium (V) en modulant sa mobilité. Les SH peuvent complexer le V, réduisant ainsi sa biodisponibilité, tandis que les AF ont été identifiés comme limitant la toxicité du V en agissant comme adsorbant (**Wnuk, 2023**).

I.4.5. Texture du sol

La texture du sol influence le niveau d'humidité et la conductivité électrique (EC). Les différentes tailles de particules de sol peuvent créer différents espaces pour que le sol retienne les particules d'eau. Le sable, le limon et l'argile sont des exemples de différents types de sols. Le sable ne retient pas très bien l'humidité en raison de son faible degré de contact de surface et a une valeur de conductivité électrique (EC) plus basse, tandis que le limon est une boue humide et a une valeur moyenne de conductivité électrique (EC). En revanche, le sol riche en argile a une valeur de conductivité électrique (EC) plus élevée en raison de sa texture qui peut retenir une grande quantité d'eau et peut entraîner un niveau d'humidité élevé (**Othmane et al., 2020**).

Cette observation souligne l'importance de la texture du sol dans la répartition des éléments chimiques, notamment le vanadium (V), dont la concentration augmente proportionnellement à la teneur en argile. Les sols riches en argile présentent ainsi une plus grande capacité d'échange cationique (CEC), favorisant une rétention accrue de V. Cette caractéristique se traduit par une mobilité et une biodisponibilité supérieures du V dans ces sols (**Wnuk, 2023**). Par conséquent, l'impact de la texture du sol sur la distribution des contaminants entre les phases est un facteur déterminant de leur biodisponibilité (**Petruzzell et al., 2020**).

I.4.6. Le temps

Le temps régit les interactions entre la phase solide du sol et les contaminants. Avec le temps, un contaminant subit des transformations qui le conduisent à être plus fortement retenu par la phase solide et donc moins disponible pour les processus environnementaux. Cet aspect est particulièrement important pour les composés organiques, mais concerne également les

composés inorganiques, qui diminuent dans le sol au fil du temps, sous des formes biodisponibles (Petruzzell *et al.*, 2020).

I.5. Le cuivre

Le cuivre est un élément chimique de symbole Cu. Il appartient à la famille des métaux de transition ou un élément de bloc D. Il est un membre du groupe 1B dans le tableau périodique avec l'argent (Ag) et l'or (Au). Sa configuration électronique est $3d^{10}4s^1$ (Mustafa et AlSharif, 2018) avec numéro atomique 29, poids atomique 63,5 et densité 8,96 g cm³, point d'ébullition 2595 °C et point de fusion 1083 °C (Rehman *et al.*, 2019).

Le cuivre est un métal essentiel, offrant une excellente malléabilité, ductilité, ainsi qu'une conductivité électrique et thermique élevée. Il est largement utilisé dans le domaine de la construction électrique. Le cuivre est également reconnu comme un excellent matériau métallique écologique en raison de sa couleur noble et élégante, de ses propriétés décoratives de qualité, et de son excellente recyclabilité (Cao *et al.*, 2022). Il est largement utilisé dans divers domaines tels que le câblage, les machines industrielles, la galvanoplastie plastique, les circuits imprimés, le moulage sous pression de zinc, les pare-chocs automobiles et les rouleaux d'héliogravure (Barros *et al.*, 2022).

Le cuivre est le troisième métal le plus utilisé au monde (Wuana et Okieimen, 2011), les plus grandes réserves de cuivre se trouvent au Chili. Des réserves importantes sont également présentes aux États-Unis, au Pérou, en Zambie, en République démocratique du Congo (Ellingsen *et al.*, 2007; Møller et Aaseth, 2021), en Australie, au Mexique et en Chine. (Barros *et al.*, 2022). Parmi les minerais de cuivre exploitables dans le monde, environ 90 % sont des minerais sulfurés, 9 % sont des minerais oxydés et moins de 1 % sont des minerais de cuivre métallique (Møller et Aaseth, 2021).

I.5.1. Le cuivre et la santé animale

Le cuivre est un oligoélément essentiel de l'organisme animal, impliqué dans le métabolisme des protéines animales (Wang *et al.*, 2013 ; Parveen, 2023; Amundson *et al.*, 2024). Des rapports indiquent également que la carence ou la surconsommation de cuivre peut affecter divers aspects de la réponse immunitaire chez les animaux. Par exemple, des essais expérimentaux sur des animaux ont montré une diminution du nombre de neutrophiles et de leur activité phagocytaire en cas de carence ou d'excès de cuivre. De plus, la prolifération des

lymphocytes et la production d'anticorps spécifiques de l'antigène peuvent être réduites en présence d'un déséquilibre de cuivre (**Hefnawy et El-Khaiat, 2015**).

Le caractère essentiel du Cu pour les mammifères a été fermement établi par Hart et al. qui ont rapporté que le Cu était nécessaire à l'érythropoïèse. Ce sont les composants d'une variété d'enzymes dans le corps et il est important pour les animaux de maintenir une fonction physiologique normale. Lors du test d'infection à *Salmonella typhimurium*, nous avons constaté que la mortalité des rats carencés en cuivre est élevée et que le temps de survie est court (**Wang et al., 2013**).

Certaines observations suggèrent des bénéfices potentiels de la supplémentation en cuivre. Des études sur des veaux traités au cuivre ont montré une augmentation de l'activité neutrophile, tandis qu'une vache Holstein en lactation supplémentée en cuivre a présenté une augmentation significative de l'activité de la superoxydedismutase sérique, bien que la fonction leucocytaire ne soit pas affectée par cette supplémentation (**Hefnawy et El-Khaiat, 2015**).

I.5.2. Le cuivre et la santé végétale

Le cuivre représente un micronutriment essentiel indispensable au développement et à la croissance des plantes (**Yruela, 2009; Rahman et al., 2020; Pradeep et Aishwarya, 2023**). Pour un développement normal, les plantes nécessitent des quantités modérées de cuivre, généralement entre 5 et 20 mg kg⁻¹, tandis que des concentrations inférieures à 4 mg kg⁻¹ sont considérées comme une carence, et celles dépassant les 20 mg kg⁻¹ peuvent entraîner une toxicité (**Pivić et al., 2017**).

Le cuivre agit en tant que cofacteur pour plusieurs protéines métalliques et joue un rôle clé dans divers processus physiologiques et biochimiques. Dans plusieurs protéines régulatrices, le cuivre joue un rôle structurant essentiel, participant activement à des réactions cruciales telles que le métabolisme de la paroi cellulaire, le métabolisme des protéines, le transport photosynthétique des électrons, la signalisation hormonale, les réponses au stress oxydatif, la respiration mitochondriale et la détection de l'éthylène (**Rahman et al., 2020; Pradeep et Aishwarya, 2023**).

Au moins 30 enzymes contenant du cuivre sont répertoriées, comprenant des oxydases telles que la cytochrome oxydase, la diamine oxydase, la phénol oxydase, la DOPA oxydase, la tyrosinase, la phénolase, la polyphénol oxydase, la laccase et la plastocyanine. Notamment,

la plastocyanine, identifiée comme la protéine de cuivre la plus abondante, joue un rôle crucial dans le transport d'électrons entre le complexe du cytochrome b6f et le photosystème I dans la lumière thylakoïde des chloroplastes (**Rai et al., 2021**).

Les cultures céréalières manifestent des pointes blanches en tant que symptômes caractéristiques de carence en cuivre, un micronutriment dont le manque a été identifié comme le principal facteur limitant pour le rendement des cultures, la qualité alimentaire et la santé humaine (**Rahman et al., 2020**).

Au-delà de son rôle biologique, le cuivre contribue également à intensifier la saveur, la couleur des fleurs et des légumes, ainsi que la teneur en sucre et la durée de conservation des fruits. Les signes typiques d'une carence en cuivre comprennent le dépérissement des tiges et des rameaux, le jaunissement des feuilles, un retard de croissance et des feuilles vert pâle qui se fanent facilement (**Rai et al., 2021**).

I.5.3. Le cuivre et la santé humaine

Le cuivre est un oligo-élément essentiel, à la fois chez l'homme et chez l'animal, comme indiqué par **Bost et al. (2016)**, présent dans pratiquement toutes les cellules de l'organisme humain (**Angelova et al., 2011**).

Le corps humain renferme environ 100 mg de cuivre (**Bost et al., 2016**), les concentrations les plus élevées se situant dans le cerveau et le foie, tandis que le système nerveux central et le cœur affichent également des concentrations significatives de ce minéral. Environ 50 % du cuivre est stocké dans les os et les muscles, avec environ 25 % dans les muscles squelettiques, 15 % dans la peau, 15 % dans la moelle osseuse, 8 à 15 % dans le foie et 8 % dans le cerveau (**Angelova et al., 2011**).

En tant que cofacteur de nombreuses enzymes redox, la céruloplasmine émerge comme l'enzyme ferroxidase Cu-dépendante la plus abondante, présentant une activité d'oxydation Cu-dépendante. Outre son rôle dans le métabolisme du fer, le cuivre est également indispensable en raison de son implication dans divers processus biologiques tels que la défense antioxydante, la synthèse des neuropeptides et la fonction immunitaire, comme souligné par **Bost et al. (2016)**.

I.6. Toxicité des métaux lourds

La pollution environnementale causée par les métaux lourds et leurs effets sur la santé sont parmi les principales causes de problèmes de santé dans le monde entier (**Nyiramigisha et**

al., 2021). La grande majorité des métaux lourds induisent une pollution environnementale et atmosphérique, présentant un risque mortel pour les êtres humains. Ces métaux peuvent acquérir une toxicité significative en s'associant à divers composants de l'environnement, tels que l'eau, le sol et l'air. Tout au long de la chaîne alimentaire, les humains et d'autres organismes vivants peuvent être exposés à ces métaux lourds potentiellement dangereux. (Mitra *et al.*, 2022). Ils deviennent principalement des contaminants du sol en raison de leur génération excessive par des activités à la fois naturelles et anthropiques. Des exemples de sources naturelles comprennent les activités géothermiques, les comètes, la poussière transportée par le vent et les activités volcaniques (Nagajyotiet *al.*, 2010 ; Singh *et al.*, 2018).

D'autre part, la contamination d'origine humaine est principalement attribuable aux processus d'industrialisation rapide, associés à l'utilisation intensive de substances chimiques telles que les hydrocarbures, les pesticides, les fongicides et les hydrocarbures chlorés (Masindi *et Muedi*, 2018). De plus, l'extraction minière et la métallurgie contribuent également à cette contamination, tout comme d'autres sources de déchets industriels (Teitzel *et Parsek*, 2003).

Le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE/GPA) et le Plan d'action mondial (GPA) reconnaissent les déchets électroniques (e-déchets), comprenant des dispositifs tels que les téléphones mobiles, les tablettes, les ordinateurs et les montres intelligentes, comme une menace majeure pour l'environnement et le bien-être humain. Cela est principalement dû à la présence de métaux lourds tels que le Hg, le Cd et le Pb dans les appareils électroniques, pouvant poser des risques sérieux tant pour l'environnement que pour la santé humaine s'ils ne sont pas correctement éliminés (Das *et al.*, 2023).

I.6.1. La toxicité chez la plante

I.6.1.1. Sur la germination

De nombreuses études ont démontré l'importance de l'essai de germination pour évaluer les effets de la toxicité du Cu sur diverses espèces végétales (Adrees *et al.*, 2015 ; Amin *et al.*, 2021). Par exemple, chez le blé (*Triticum aestivum L.*), une réduction significative du pourcentage de germination a été observée, atteignant 46 % à des niveaux de 500 ppm de Cu après 24 heures d'incubation par rapport au témoin. De même, à des concentrations de Cu de 100 ppm, la germination des grains de blé a diminué d'environ 40 % par rapport au témoin après 14 jours de germination. Pour le riz (*Oryzasativa L.*), une diminution progressive de la germination des grains a été constatée avec l'augmentation des niveaux de Cu, allant de 0,2 à 1,5 mM, sur une période de 4 jours. En outre, l'exposition à un traitement de 10 µM de Cu a

entraîné une réduction significative de la germination des grains de riz et de blé à 60 % et 35 % respectivement par rapport au témoin sur une période de 4 jours (**Adrees et al., 2015**).

Le traitement au cuivre a produit des effets toxiques sur la germination et la croissance de *L. culinaris*. Les indices de tolérance les plus faibles pour les plantules de *L. culinaris* ont été enregistrés pour un traitement au cuivre de 100 ppm (**Iqbal et al., 2018**). Ces résultats mettent en évidence la capacité de l'excès de Cu à altérer la germination des grains dans différentes plantes, soulignant une variabilité significative de la tolérance au sein et entre les espèces végétales (**Adrees et al., 2015**).

I.6.1.2. Le système racinaire

La toxicité causée par des niveaux élevés de cuivre se manifeste principalement dans le système racinaire des plantes. Avec une exposition prolongée au cuivre, les racines perdent leur vigueur, prennent une couleur sombre et s'épaississent, ce qui entraîne une réduction de la croissance. Dans la partie aérienne des plantes, les symptômes morphologiques de la toxicité du cuivre se manifestent par la chlorose des feuilles et une réduction marquée de la croissance, y compris de la surface foliaire, de la hauteur et du diamètre de la tige. Dans les stades avancés, les bords des feuilles peuvent devenir nécrotiques (**Cruz et al., 2022**).

I.6.1.3. Effet sur la croissance et la morphologie des plantes

La toxicité du cuivre a un impact significatif sur la croissance des plantes. Bien que le cuivre soit un oligo nutriment essentiel à la croissance des plantes, il devient néfaste lorsqu'il dépasse la limite permise, entraînant une performance de croissance médiocre avec une perte de production. Ainsi, la réduction de la croissance des plantes induite par les métaux lourds est une conséquence finale de changements qui se produisent initialement au niveau biochimique, physiologique et minéral des plantes (**Cruz et al., 2022**).

Des concentrations plus élevées de Cu dans les plantes ont altéré leur morphologie, entraînant une sensibilité accrue à un excès de Cu. Les études ont montré que l'application de concentrations élevées de Cu dans la solution nutritive a entraîné une diminution de la longueur des racines, des pousses et des feuilles des plants de maïs par rapport au témoin. De plus, il a été observé une diminution linéaire de la hauteur des plants de maïs avec l'augmentation des doses excessives de Cu (**Adrees et al., 2015**).

I.6.1.4. Physiologique

Le cuivre fait partie des métaux lourds toxiques et, chez les plantes, sa présence en concentration élevée entraîne des effets néfastes tels que la croissance retardée, la chlorose, des perturbations de l'absorption minérale, des dommages oxydatifs aux cellules, la formation d'espèces réactives de l'oxygène et l'augmentation de la perméabilité membranaire. Cela conduit à des modifications dans le système enzymatique antioxydant des plantes, tandis que le manque de cuivre peut également affecter la croissance, le métabolisme et les processus de développement des plante (**Fatima et al.,2021**).

Ces changements physiologiques résultant de la toxicité du cuivre peuvent perturber les fonctions physiologiques des éléments nutritifs essentiels des plantes sont perturbées lorsque la concentration de ces éléments est en dessous d'une limite adéquate en raison de la présence de niveaux toxiques de cuivre dans le milieu de culture. Ainsi, la réduction de la concentration de Fe, Zn (dans les feuilles) et de Mg (dans les racines) modulée par des niveaux toxiques de cuivre coïncide avec la diminution de la surface foliaire, de la longueur des racines et de l'indice SPAD chez les plantes. Cela suggère que le cuivre à des niveaux toxiques affecte les fonctions physiologiques de ces éléments nutritifs, réduisant par conséquent la croissance des plantes (**Cruz et al., 2022**).

En conséquence, la toxicité des métaux lourds dans les tissus végétaux peut entraver divers processus physiologiques des plantes, y compris ceux du blé, et finalement affecter la santé humaine. En résumé, les concentrations excessivement élevées de métaux endommagent les plantes en altérant la perméabilité membranaire, en inhibant les enzymes actives physiologiquement, en inactivant les photosystèmes et en perturbant le métabolisme minéral. De plus, ils induisent un stress oxydatif, perturbent la fonction des pigments et altèrent l'activité des protéines. La surproduction de ROS sous l'effet des métaux peut causer des dommages significatifs aux structures cellulaires, notamment l'oxydation des protéines et des lipides, des dommages à l'ADN, l'inhibition des enzymes, et en fin de compte la mort cellulaire (**Rizvi et al., 2020**).

I.6.1.5. Pigments photosynthétiques

Parmi les effets les plus courants d'une concentration plus élevée de Cu dans le milieu de culture, on trouve la diminution du contenu des pigments photosynthétiques, ce qui entraîne une réduction de la photosynthèse liée à une diminution du contenu en chlorophylle et à des dommages structurels de l'appareil photosynthétique. Un certain nombre d'études ont rapporté les effets inhibiteurs du Cu sur les deux photosystèmes, et il a été constaté que le PS II est le site le plus sensible à la toxicité du Cu (**Adrees et al., 2015; Ambrosini et al., 2015**).

Bien que le cuivre soit essentiel dans le transport des électrons (**Rehman et al., 2019; Cruz et al., 2022**) entre les photosystèmes II et I, des niveaux toxiques inhibent le photosystème II, entraînant une diminution de l'activité photosynthétique. Le cuivre toxique affecte la photosynthèse en réduisant l'activité de l'enzyme Rubisco et la conductance stomatique, tout en augmentant la concentration intercellulaire en CO₂. Cette perturbation peut être due à des facteurs stomatiques, comme une réduction de la conductance stomatique, ainsi qu'à des facteurs non stomatiques, tels que des dommages à la Rubisco et à la chaîne de transport d'électrons. Ces effets entraînent une limitation de la photosynthèse, à la fois stomatique et non stomatique, ce qui compromet la capacité des plantes à produire des hydrates de carbone (**Cruz et al., 2022**).

I.6.2. Mécanismes de régulation du cuivre dans la santé et la pathologie humaine

La régulation homéostatique du cuivre chez l'homme implique plusieurs cibles moléculaires clés. La céruloplasmine (CP) est la principale protéine transporteuse pour le cuivre échangeable dans le plasma sanguin (**Ramos et al., 2016 ; Ge et al., 2022**), assurant sa circulation et sa distribution vers les organes et les tissus. Au niveau cellulaire, la famille des métallo-réductases STEAP et le canal ionique au cuivre, transporteur 1 du cuivre (CTR1), permettent une absorption du cuivre à haute affinité. Cette absorption est accompagnée d'une diversité de métallochaperons cytoplasmiques et mitochondriaux, incluant la protéine antioxydante 1 (ATOX1), le chaperon du cuivre pour la superoxyde dismutase (CCS), les protéines de synthèse de la cytochrome oxydase 1 (SCO1) et SCO2, ainsi que les chaperons du cuivre pour la cytochrome c oxydase 11 (COX11) et COX17. Les ATPases 7A (ATP7A) et 7B (ATP7B) agissent également en synergie pour garantir l'insertion ciblée du cuivre dans les métalloprotéines. Les pompes ioniques au cuivre ATP-dépendantes, ATP7A et ATP7B, assurent à la fois l'exportation du cuivre et les fonctions de métallochaperon (**Ge et al., 2022**).

Les deux enzymes pompent le cuivre du cytoplasme vers des compartiments présentant une concentration de cuivre plus élevée. ATP7A déplace le cuivre hors du cytosol et à travers la membrane basolatérale dans les tissus extra-hépatiques, tandis qu'ATP7B déplace le cuivre hors du cytosol et à travers la membrane apicale dans le foie, le cerveau et le rein. ATP7A contrôle le transport à travers la muqueuse intestinale et la barrière hémato-encéphalique (BHE) (**Horn et Wittung-Stafshede, 2021**).

Les protéines riches en thiol, métallothionéine 1 (MT1) et MT2, lient plusieurs ions cuivre et peuvent servir de réservoir de stockage de cuivre. De plus, le peptide abondant et antioxydant

glutathion (GSH) peut également participer directement ou indirectement à la régulation des réserves cellulaires de cuivre. Dans les mitochondries, le facteur d'assemblage de la cytochrome c oxydase 6 (COA6) et SCO2 aident à maintenir l'équilibre rédox de SCO1 et, par conséquent, sa liaison au cuivre et sa distribution à la cytochrome c oxydase (COX). Ensemble, ces protéines maintiennent une bio-disponibilité intracellulaire appropriée du cuivre et assurent la métallation des enzymes dépendantes du cuivre, notamment la COX, la superoxydedismutase 1 (SOD1) et les enzymes oxygénase/oxydase, telles que la tyrosinase, la lysyl oxydase (LOX), la dopamine β-hydroxylase (DBH) et les oxydases aminées au cuivre (Ge *et al.*, 2022).

Le Cuivre est un élément toxique présent en concentrations élevées dans le cerveau, le foie et les reins, et sa toxicité entraîne principalement des problèmes gastro-intestinaux et des symptômes neurologiques. Les formes aiguës de toxicité peuvent conduire à des complications graves telles que rhabdomyolyse, insuffisance cardiaque et rénale, et peuvent même être mortelles (Alengebawy *et al.*, 2021). De plus, des élévations aberrantes des niveaux de cuivre ont été signalées dans les tumeurs ou le sérum de modèles animaux et de patients atteints de divers cancers, notamment du sein, du poumon, du tractus gastro-intestinal, de la cavité buccale, de la thyroïde, de la vésicule biliaire, gynécologiques et de la prostate (Ge *et al.*, 2022).

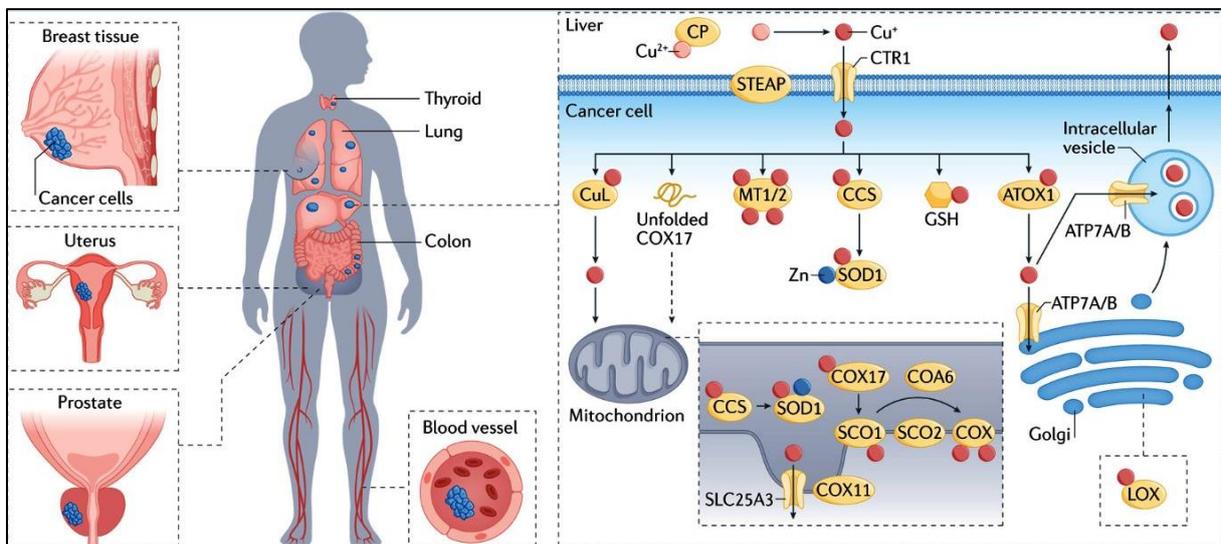


Figure 1 : Présentation générale de l'homéostasie du cuivre au niveau systémique et cellulaire (Ge *et al.*, 2022).

I.6.2.1. La maladie de Wilson

La maladie de Wilson (WD: dégénérescence hépatolenticulaire) a été décrite pour la première fois de manière exhaustive en 1912 par Kinnier Wilson comme une "dégénérescence lenticulaire progressive" (Wentworth et Stotts, 2020 ; Schilsky *et al.*, 2022). C'est un trouble

génétique rare dans lequel une erreur innée du métabolisme du cuivre entraîne une accumulation excessive de cuivre dans les tissus corporels et un dysfonctionnement significatif des organes (**Wentworth et Stotts, 2020**).

Le cuivre s'accumule de manière non spécifique dans le cerveau des patients atteints de la maladie de Wilson à des concentrations jusqu'à 10 fois supérieures à la normale. Les astrocytes sont les principaux régulateurs du chargement du cuivre dans le cerveau. Dans la maladie de Wilson, ils augmentent en nombre et en taille alors qu'ils stockent de grandes quantités de cuivre localement, ainsi que produisent des cellules astrocytaires anormales connues sous le nom de gliose de type I d'Alzheimer et de cellules d'Opalski (**Barber et al., 2021**).

Le cuivre est bien connu pour s'accumuler dans le foie en raison de la maladie de Wilson. Des niveaux accrus de cuivre peuvent causer un stress oxydatif ; par conséquent, la déposition de cuivre hépatique n'est pas seulement pathognomonique, mais aussi pathogène. Des niveaux élevés de cuivre hépatique sont également observés dans les maladies hépatiques cholestatiques. Cependant, ils résultent d'une excrétion biliaire diminuée du cuivre et ne sont pas une cause d'infection hépatique (**Mitra et al., 2022**)

I.6.2.2. La maladie d'Alzheimer

Ces dernières années, l'intérêt pour le rôle des métaux de transition tels que le fer (Fe), le zinc (Zn) et le cuivre (Cu) dans la maladie d'Alzheimer (AD) a été significatif. Ces métaux se lient au peptide amyloïde- β ($A\beta$), accélérant ainsi son agrégation et favorisant la formation de plaques neurotoxiques. Le fer et le cuivre peuvent également contribuer au stress oxydatif et aux changements neuroinflammatoires dans le cerveau atteint de la maladie d'Alzheimer. De plus, le déclin cognitif associé à la maladie d'Alzheimer est lié à des perturbations dans le traitement et la fonction de la protéine précurseur du peptide amyloïde- β (APP), ainsi qu'à la phosphorylation et à l'agrégation de la protéine associée aux microtubules (MAP), la tau, toutes deux étant associées à des déséquilibres dans l'homéostasie des métaux (**Mathys et White, 2017**).

La maladie d'Alzheimer est un trouble neurodégénératif caractérisé par la formation de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements cellulaires de protéines tau (**Kumar et al., 2022**) Initialement, l'aluminium a été suspecté comme agent causal, mais des recherches ont remis en question ce lien, le considérant désormais comme une conséquence plutôt qu'une cause. D'autres métaux comme le mercure, le zinc, le cadmium et le plomb sont également impliqués

dans la pathologie. Le cuivre, notamment présent dans les plaques amyloïdes, est également étudié en lien avec la maladie d'Alzheimer (**Pohanka, 2019**).

Le cuivre possède une forte affinité pour le peptide amyloïde β de 42 acides aminés (**Haneet al., 2013 ; Pohanka, 2019; Abelein et al., 2022**), un précurseur des plaques amyloïdes, et peut initier son agrégation. En présence de peroxyde d'hydrogène et de nitrite, le cuivre (II) peut provoquer la nitrification du peptide. Comparativement au fer et à l'aluminium, les ions cuivre catalysent la formation de plaques insolubles plus importantes. De plus, le cuivre peut bloquer la dégradation du peptide amyloïde β en inhibant une enzyme métalloprotéase appelée enzyme dégradant l'insuline, ce qui peut être irréversible, surtout avec le cuivre dans les états d'oxydation I et II (**Pohanka, 2019**).

I.7.Approches de remédiation pour les sols contaminés

Les approches de remédiation des sols contaminés par les métaux lourds sont essentielles pour atténuer rapidement la pollution et éviter la propagation des métaux lourds dans la chaîne alimentaire, réduisant ainsi les risques pour la santé associés (**Liu et al., 2020**). Elles visent principalement à créer une solution finale qui protège la santé humaine et l'environnement (**Wuana et Okieimen, 2011**). Diverses méthodes sont utilisées à l'échelle du site pour traiter la pollution des sols et atténuer ses impacts environnementaux (**Ciampi et al., 2024**).

Ces approches de remédiation sont généralement soumises à une gamme de réglementations et peuvent également être basées sur des évaluations des risques pour la santé humaine et écologique lorsque des normes législatives n'existent pas ou sont consultatives. Les autorités réglementaires accepteront normalement des stratégies de remédiation axées sur la réduction de la biodisponibilité des métaux uniquement si une réduction de la biodisponibilité est associée à une réduction du risque, et si les réductions de biodisponibilité sont démontrées être à long terme. Pour les sols contaminés par des métaux lourds, la forme physique et chimique du contaminant métallique dans le sol influe fortement sur le choix de l'approche de traitement de remédiation appropriée (**Wuana et Okieimen, 2011**).

Les méthodes de remédiation physique comprennent le remplacement du sol et la vitrification, tandis que les approches chimiques reposent sur le changement des propriétés physico-chimiques du sol, telles que le pH et le potentiel redox, grâce à l'ajout d'agents de durcissement, de matière organique ou de réactifs chimiques (**Liu et al., 2020**).

Pour permettre une évaluation précise de la contamination du site et des alternatives de remédiation, des informations sur les caractéristiques physiques du site et le type ainsi que le niveau de contamination sur le site doivent être obtenues. La contamination dans le sol doit être caractérisée pour établir le type, la quantité et la distribution des métaux lourds dans le sol. Une fois que le site a été caractérisé, le niveau souhaité de chaque métal dans le sol doit être déterminé (Wuana et Okieimen, 2011).

La remédiation des sols contaminés par le cuivre implique le contact entre le milieu de remédiation et les ions de cuivre. Les processus de remédiation visent à traiter les milieux contaminés de manière à les contenir, les éliminer ou les dégrader. Cette tâche peut être complexe en raison de la distribution hétérogène des métaux lourds dans le sol, à la fois verticalement et horizontalement (Apori *et al.*, 2018).

I.7.1.Méthodes de remédiation physique

Il existe plusieurs méthodes de remédiation physique des sols disponibles, parmi lesquelles le remplacement du sol est couramment utilisé dans les zones fortement polluées (Liu *et al.*, 2023). Cette méthode implique de remplacer ou partiellement remplacer le sol contaminé par un sol non contaminé, ce qui dilue la concentration de métaux lourds dans le sol et augmente ainsi sa fonctionnalité (Derakhshan *et al.*, 2017 ; Khalid *et al.*, 2017).

Le labourage du sol, également connu sous le nom de retournement ou de labour, est une autre méthode utilisée pour réduire les concentrations de contaminants dans de grandes zones de sol contaminé, où il est impraticable de retirer et de remplacer toute la couche de sol contaminé. Cette méthode favorise l'activité microbienne et accélère la décomposition naturelle des contaminants dans le sol (Priya *et al.*, 2023).

D'autre part, la désorption thermique est utilisée pour volatiliser les métaux lourds et les métalloïdes du sol contaminé, et implique de chauffer le sol pour libérer les contaminants, suivie par l'élimination des métaux lourds volatils du sol contaminé (Yao *et al.*, 2012; Derakhshan *et al.*, 2017; Priya *et al.*, 2023).

De plus, une étude menée par Sah et Lin (2000) a examiné l'utilisation de la technologie électrocinétique pour la remédiation des sols contaminés par le cuivre, montrant que ce processus a le potentiel d'éliminer le cuivre des sols contaminés, avec une efficacité de 70 à 85 % (Apori *et al.*, 2018).

I.7.2. La remédiation chimique

La remédiation chimique, qui implique l'utilisation de produits chimiques pour extraire ou stabiliser les polluants présents dans les milieux contaminés, comprend plusieurs méthodes (**Derakhshan et al., 2017**).

Parmi ces méthodes, le processus de lavage chimique des sols est un processus ex-situ qui élimine les contaminants métalliques du sol en le lavant avec une solution d'extracteur appropriée (**Kumar et al., 2023b**). Ces méthodes visent à réduire la quantité de métaux lourds disponibles pour les plantes en modifiant le pH du sol pour provoquer la précipitation des métaux ou la formation de complexes insolubles (**Dhaliwal et al., 2020**).

Les approches chimiques, utilisées pour limiter l'absorption des métaux par les plantes et leur toxicité, visent principalement à réduire l'activité des ions métalliques dans la solution du sol (**Sow et Balo, 2022**). **Zhai et al. (2018)** ont étudié l'effet combiné du lavage du sol et de l'immobilisation in situ avec différents matériaux, réduisant considérablement la biodisponibilité des métaux Cd, Cu, Pb et Zn dans le sol. **Feng et al. (2020)** ont utilisé des agents chimiques pour éliminer les contaminants du sol, réduisant ainsi les risques environnementaux. **Wang et al. (2020)** ont exploré l'utilisation d'acides moins toxiques pour extraire les métaux du sol pollué, bien que leur efficacité soit inférieure à celle de l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) dans le processus de lavage (**kumar et al., 2023**).

Ces techniques permettent soit de réduire les risques en dégradant chimiquement les substances dangereuses, soit de stabiliser les contaminants au sein de la matrice en rompant les liaisons polluantes (**Derakhshan et al., 2017**).

I.7.3. La remédiation électrocinétique

La remédiation électrocinétique (EK) a été reconnue comme l'une des approches les plus prometteuses pour éliminer divers contaminants des sols à grains fins avec une faible perméabilité depuis la fin des années 1980 (**Adnan et al., 2022**).

Cette méthode, qui implique l'application d'une très haute tension pour créer un gradient de champ électrique aux deux extrémités du sol, permet le déplacement des polluants chargés vers les pôles par électromigration, flux électro-osmotique et électrophorèse, bénéficiant ainsi aux sols à faible perméabilité (**Dhaliwal et al., 2020**).

En utilisant une électrode incorporée sous la surface du sol pour générer un gradient de courant continu à basse pression et induire des réactions électrolytiques, cette technique offre

également la possibilité de nettoyer les sols contaminés en déplaçant les métaux lourds et autres contaminants du sol vers les électrodes (Priya *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2020).

Pendant une telle remédiation, de grandes quantités de H_3O^+ et d' O_2 générées à l'anode créent des environnements acides, tandis que de grandes quantités d'ions hydroxydes produits à la cathode rendent son environnement basique (Liu *et al.*, 2020). L'électrocinétique présente certains avantages par rapport à d'autres méthodes de remédiation des sols. Elle est particulièrement efficace pour les métaux lourds et d'autres contaminants ionisables et peut être utilisée pour différents types de sols. Elle est particulièrement efficace pour les métaux lourds et d'autres contaminants ionisables et peut être utilisée pour différents types de sols. De plus, elle ne nécessite pas le retrait du sol contaminé, ce qui peut être bénéfique pour préserver l'intégrité du site (Priya *et al.*, 2023).

I.8. Inconvénients des approches de remédiation des Sols

La remédiation physique et chimique est une méthode bien établie pour traiter les sols contaminés. Bien qu'elle soit souvent efficace pour éliminer ou réduire les contaminants, cette approche comporte également certains inconvénients (Peng *et al.*, 2021), notamment d'être coûteuse et d'avoir des effets négatifs à long terme (Liu *et al.*, 2020).

D'autres techniques telles que la technologie de séparation impliquent le lavage et le rinçage du sol pour éliminer les contaminants, mais elles peuvent nécessiter une technique supplémentaire pour éliminer complètement les contaminants, ce qui est plus coûteux et peut présenter des risques pour l'environnement en raison de l'utilisation de tensioactifs synthétiques (Shit *et al.*, 2023). De même, la méthode de vitrification, bien qu'efficace pour éliminer les métaux lourds, est complexe et énergivore, limitant ainsi son application (Dhaliwal *et al.*, 2020).

Concernant la méthode de remplacement du sol, bien qu'elle soit capable de réduire les effets climatiques nocifs des émissions toxiques, elle est coûteuse, nécessite une grande zone de travail et n'est appropriée que pour traiter les sols localement fortement contaminés (Liu *et al.*, 2020; Priya *et al.*, 2023). De plus, la réalisation de travaux de terrassement pendant cette opération peut perturber l'environnement local (Priya *et al.*, 2023).

En outre, d'autres approches telles que l'électrocinétique et l'incinération thermique présentent également des avantages et des inconvénients spécifiques en termes de coûts,

d'efficacité et d'impact environnemental, Dans ce processus, un courant basse tension est appliqué pour induire le déplacement des métaux lourds et des polluants organiques-inorganiques vers les électrodes. En revanche, l'incinération thermique, bien qu'efficace pour la conversion des polluants en CO₂ et en eau, génère des substances cancérigènes et des composés inorganiques néfastes pour la santé respiratoire. De plus, elle contribue à l'acidification, à l'eutrophisation et au réchauffement climatique. À noter également que ce procédé est réalisé hors du site contaminé, ce qui accroît sa complexité et ses coûts (Shit *et al.*, 2023).

Étant donné les défis et les limites des méthodes physico-chimiques de remédiation des sols contaminés par les métaux lourds, il est impératif d'explorer des alternatives plus durables et économiques. La bioremédiation émerge comme une solution prometteuse, offrant une approche naturelle et respectueuse de l'environnement pour traiter les contaminants dans les sols.

*Chapitre II : Bioremédiation : une approche biologique pour
l'élimination des métaux lourds*

II. Approches de phytoremédiation pour la dépollution environnementale

II.1. Historique

La phytoremédiation trouve ses origines en 1948, lorsque des chercheurs italiens ont observé que la plante *Alyssum bertolonii* accumulait du nickel. En 1962, des études en Russie ont montré que certaines plantes aquatiques pouvaient purifier les eaux contaminées par des substances radioactives. Ces découvertes ont été confirmées en 1977 par Robert Brooks en Nouvelle-Zélande. Vers les années 1980, le terme "phytoremédiation" a été utilisé pour décrire ces plantes capables d'accumuler des métaux sans toxicité (**Shamoogardiani et Navidjouy, 2022**).

II.2. Stratégies vertes de remédiation (La phytoremédiation)

La remédiation verte, la botanoremédiation, l'agroremédiation ou la remédiation végétative peuvent être décrites comme des stratégies de remédiation in situ qui utilisent la végétation et des techniques agronomiques pour éliminer, contenir ou rendre les contaminants environnementaux inoffensifs (**Zaghloul, 2020**).

La phytoremédiation est largement utilisée pour restaurer les terrains miniers en raison de son efficacité, de son caractère écologique et de sa rentabilité (**Sandell, 2020**). Cette approche exploite la capacité des plantes à tolérer, accumuler et transloquer les éléments traces potentiellement toxiques (ETPT) à travers leurs tissus aériens, permettant ainsi d'éliminer, transférer ou stabiliser les ETPT afin de nettoyer l'environnement et de rendre les polluants inoffensifs (**Alsafran et al., 2022**). Elle est considérée comme une méthode spécifique à l'espèce, efficace, économique, respectueuse de l'environnement et scientifiquement acceptée. De plus, la phytoremédiation est reconnue comme une approche rentable pour remédier aux sols contaminés, grâce à divers processus tels que l'accumulation, la transformation, la translocation, la stabilisation et la dégradation (**Zhang et al., 2023; Verma et al., 2021**).

II.2.1. La phytoremédiation des métaux lourds

Pour être efficace, la phytoremédiation nécessite des plantes idéales capables de transloquer et accumuler les métaux lourds dans leurs parties aériennes, ainsi que de survivre dans des conditions difficiles et de croître rapidement (**Sandell, 2020**). Les metalophytes, des plantes adaptées à des sols naturellement riches en métaux lourds, sont préférables pour la phytoremédiation car elles ont évolué pour croître dans des conditions environnementales difficiles et possèdent des mécanismes de résistance aux métaux lourds (**Sandell, 2020**).

Ces stratégies de résistance incluent l'exclusion, qui restreint le transport des métaux dans la biomasse aérienne, et l'accumulation, qui transloque les métaux dans la biomasse aérienne (Verma *et al.*, 2021). Le succès de la phytoremédiation dépend des traits des plantes utilisées, notamment leur tolérance au stress, leur système racinaire étendu, leur symbiose mycorhizienne, leur tolérance à la sécheresse et leur capacité à concurrencer d'autres plantes (Sandell, 2020). En outre, les espèces indigènes sont préférables car les espèces non indigènes ont le potentiel de devenir invasives et de nuire à la biodiversité (Verma *et al.*, 2021). Ainsi, les plantes qui colonisent spontanément les sites pollués par les métaux lourds avant la restauration sont particulièrement intéressantes car elles ont une meilleure chance de survie et de croissance dans ces environnements (Sandell, 2020).

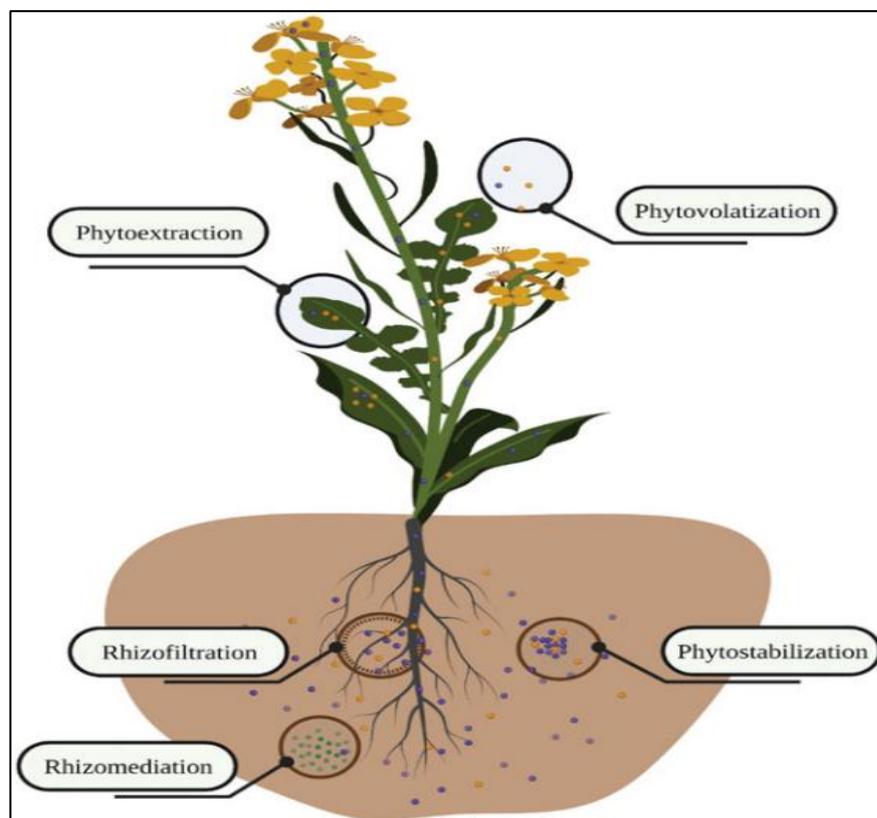


Figure 2 : Mécanismes de phytoremédiation impliqués dans la contamination par les métaux lourds chez *Brassica juncea L* (Rani *et al.*, 2023).

II.2.1.1 La rhizofiltration

La rhizofiltration ou phytofiltration, repose sur l'utilisation des racines des plantes pour absorber ou adsorber les polluants présents dans les effluents contaminés, limitant ainsi la mobilité de ces contaminants dans les eaux souterraines. Cette méthode, utilisée tant en *ex situ*

qu'en *in situ* pour la bioremédiation, met en lumière l'importance des racines des plantes dans ce processus en absorbant ou adsorbant les polluants. Elle implique des plantes pourvues d'un système racinaire développé, capable de retenir les polluants toxiques, tout en étant facilement récoltables pour une élimination sécurisée et nécessitant un entretien minimal (**Guerra et al., 2011; Rani et al., 2023 ; Rai et Nongtri 2024**). Elle est utilisée pour les métaux tels que le plomb, le cadmium, le cuivre, le nickel, le zinc et le chrome, qui sont retenus à l'intérieur des racines (**Zaghloul, 2020 ; Raïet Nongtri, 2024**). Parmi les différentes plantes terrestres, la moutarde indienne (*Brassica juncea L.*) et le tournesol (*Helianthus annuus L.*) sont reconnus pour leur capacité à éliminer les métaux lourds de l'environnement contaminé.

La moutarde indienne a démontré son efficacité dans l'élimination du cadmium (Cd), du chrome (Cr), du cuivre (Cu), du nickel (Ni), du plomb (Pb) et du zinc (Zn) grâce à ses racines. De son côté, le tournesol est capable d'éliminer le plomb (Pb), l'uranium (U), le césium-137 (¹³⁷Cs) et le strontium-90 (⁹⁰Sr) des solutions hydroponiques. En effet, la moutarde affiche une valeur de bioaccumulation en plomb (Pb) de 563 et peut éliminer ce dernier de l'eau dans une plage de concentration allant de 4 mg/L à 500 mg/L (Agence de protection de l'environnement des États-Unis, 2000) (**Rani et al., 2023**).

Par ailleurs, le facteur de bioconcentration pour de nombreux métaux par les plantes aquatiques appropriées pour les applications de rhizofiltration peut atteindre jusqu'à 0.001948 du poids sec de la plante. Les micro-organismes du sol, en libérant des ligands organiques, en digérant des matériaux organiques et en émettant des métabolites et des sidérophores, peuvent améliorer la solubilité des métaux et leur oxydation (**Barathi et al., 2023**).

De plus, certaines bactéries endophytes résidant à la surface des racines contribuent également à la rhizofiltration. À l'intérieur de la surface des racines de la plante, certaines bactéries telles qu'*Ochrobacterium* et *Pseudomonas* convertissent le chrome hexavalent (Cr-VI) en chrome trivalent (Cr-III). Ce dernier est alors facilement précipité à l'intérieur de la racine de la plante, contribuant ainsi efficacement au nettoyage de l'eau (**Barathi et al., 2023**).

II.2.1.2. La phytostabilisation

La phytostabilisation, une méthode visant à limiter la mobilité et la biodisponibilité des contaminants dans le sol, repose sur plusieurs mécanismes. Les plantes phytostabilisantes peuvent croître dans des sols contaminés par des métaux, maintenant ces derniers dans leurs parties souterraines et les immobilisant dans la rhizosphère grâce à divers processus. De plus,

ces plantes fournissent de la litière et une couverture végétative, ce qui contribue à stabiliser les contaminants (**OroojSurriya et al., 2014; Sabir et al., 2014**).

L'objectif principal de la phytostabilisation est de limiter la mobilité des polluants dans les sols contaminés par les métaux lourds. Ceci est essentiel pour empêcher le transfert de ces contaminants vers les plantes comestibles et donc réduire leur entrée dans les niveaux trophiques supérieurs (**Rai et Nongtri, 2024**).

Les sols contaminés par l'As, le Cd, le Cu, le Pb et le Cr peuvent être remédiés par phytostabilisation (**OroojSurriya et al., 2014**). Cependant, malgré son efficacité dans la remédiation des sols, des boues et des sédiments contaminés, il est important de reconnaître que la phytostabilisation ne permet pas une élimination complète des polluants de l'environnement mais les immobilise plutôt pour réduire leur biodisponibilité (**Rai et Nongtri, 2024**).

II.2.1.3. La phytovolatilisation

La phytovolatilisation est une technique de remédiation environnementale qui implique la conversion des métaux en substances volatiles à travers les feuilles des plantes, lesquelles peuvent être ensuite libérées dans l'environnement environnant par leurs stomates. Cette méthode s'avère particulièrement adaptée pour le mercure (Hg) et le sélénium (Se) (**Rai et Nongtri, 2024**).

Elle englobe également l'absorption et la libération de polluants organiques et métalliques tels que le tétrachloroéthane, le trichlorométhane, le tétrachlorométhane, etc., ainsi que l'arsenic (As), le mercure (Hg) et le sélénium (Se), soit sous leur forme initiale, soit après une modification métabolique.

Parmi les plantes réputées pour leur capacité à volatiliser le sélénium figurent le riz (*Oryza sativa*), le pied de lapin (*Polypogon monspeliensis*), l'Azolla (*Azolla filiculoides*) et l'herbe à cornichon (*Sesuvium portulacastrum*) (**Özyiğit et Doğan, 2014**).

II.2.1.4. La phytoextraction

La phytoextraction (ou phytoséquestration, phytoaccumulation) est un processus qui se produit au niveau des racines des plantes. Cela leur permet d'absorber les polluants présents dans le sol ou dans l'eau à travers leurs racines, puis de transporter ces contaminants vers la partie aérienne de la plante, notamment les tiges et les feuilles (**Özyiğit et Doğan, 2014; Hasanuzzaman et al., 2015; Rani et al., 2023; Sanjana et al., 2024**). Elle se décline en deux

types, la phytoextraction assistée par des chélateurs ou la phytoextraction induite et la phytoextraction continue.

Les plantes utilisées pour la phytoextraction doivent croître rapidement, produire une biomasse considérable, avoir un système racinaire long et un transfert racine-tige élevé, et être résistantes à des concentrations élevées de métaux lourds et de métalloïdes dans les tissus végétaux (**Rani et al., 2023**).

Les plantes suivantes sont bien connues pour être utilisées dans les processus de phytoextraction : la moutarde indienne (*Brassica juncea*) pour l'arsenic, le bore, le cadmium, le chrome (VI), le cuivre, le nickel, le plomb, le sélénium, le strontium et le zinc ; la thlaspi blanc (*Thlaspi caerulescens*) pour le cadmium et le zinc ; l'alysson (*Alyssum wulfenianum*) pour le nickel ; le colza (*Brassica napus*), le kenaf (*Hibiscus cannabinus L. cv. Indian*) et le fétuque élevée (*Festuca arundinacea Schreb cv. Alta*) pour le sélénium ; le peuplier (*Populus sp.*) pour l'arsenic et le cadmium ; le tournesol (*Helianthus annuus*) pour le césium et le strontium ; le sorgho (*Sorghum vulgare L.*), la luzerne (*Medicago sativa*) et le maïs (*Zea mays*) pour le plomb, le zinc, le mercure et le nickel (**Özyiğit et Doğan, 2014**).

II.2.2.Limitation de la phytoremédiation

La phytoremédiation présente à la fois des avantages économiques en réduisant les coûts, mais elle est également confrontée à des inconvénients qu'il est important de considérer lors de son utilisation. Le suivi des résultats peut s'avérer chronophage, et choisir une technique capable de cibler plusieurs polluants à la fois est un défi en soi. De plus, il est essentiel de maintenir la concentration des contaminants dans les limites de tolérance des plantes et de sélectionner des espèces capables d'éliminer efficacement diverses impuretés (**Asante-Badu, 2020**).

Par ailleurs, d'autres obstacles se dressent également devant la phytoremédiation, notamment le temps nécessaire pour traiter les sols, qui peut être prolongé et doit être répété sur plusieurs années. De plus, la biodisponibilité du cuivre pour les plantes et l'efficacité de la méthode dépendent fortement de l'emplacement géographique. En outre, la quantité de sol traité est limitée par les profondeurs d'enracinement des plantes, et les sols doivent être modérément contaminés par le cuivre pour permettre la survie des plantes. De vastes zones sont également nécessaires pour que la méthode soit appliquée efficacement (**Widmer et Norgrove, 2023**).

Un autre défi majeur auquel la phytoremédiation est confrontée concerne la présence de plomb dans les cellules des organismes vivants, entraînant souvent la mort cellulaire, également connue sous le nom d'apoptose. Cette situation réduit la productivité des plantes et altère leur

santé globale. De plus, la capacité de la phytoremédiation à absorber efficacement de grandes quantités de plomb est limitée, nécessitant souvent l'intégration d'autres mécanismes pour une élimination efficace des polluants (**Batch, 2022**).

II.3. La Mycoremédiation : réponse écologique à la pollution

La mycoremédiation se présente comme une solution prometteuse, alliant efficacité économique et respect de l'environnement, pour traiter efficacement la pollution croissante des sols et de l'eau. Cette technique de bioremédiation éprouvée exploite le potentiel des champignons pour purifier les environnements contaminés (**Kapahi, et Sachdeva, 2017; Akgul et Akgul 2018 ; Akhtar et Mannan, 2020**).

Cette technologie joue un rôle vital dans le traitement de divers polluants environnementaux tels que les pesticides, le pétrole et les effluents de papeterie contenant de nombreuses substances toxiques telles que les hydrocarbures aromatiques halogénés et polyphénoliques, les métaux lourds et les concentrations élevées de lignine et de matériaux cellulose. C'est une technologie en développement rapide et progressive qui remédie aux polluants environnementaux (**Kumar et al., 2023a**).

Le mycélium fongique démontre une capacité à sécréter des enzymes extracellulaires permettant la décomposition des contaminants organiques en dioxyde de carbone et en eau. Les champignons responsables de la pourriture du bois jouent un rôle essentiel dans la conversion des composants toxiques en formes moins nocives. Leurs activités enzymatiques contribuent à la dégradation des composés complexes, favorisant ainsi l'élimination des substances toxiques de l'environnement (**Akgul et Akgul, 2018**).

Les champignons, ou les macrochampignons, figurent parmi les acteurs essentiels de la mycorémédiation dans la nature. Les espèces de *Pleurotus* (également appelées pleurotes), reconnues pour leur popularité mondiale en raison de leur faible coût de production et de leurs rendements élevés, jouent un rôle essentiel dans la mycorémédiation en raison de leur biomasse mycélienne étendue, démontrant ainsi un fort potentiel de biosorption (**Kapahi, et Sachdeva, 2017; Akgul et Akgul, 2018**).

L'étude d'**Archana et Jaitly** (2015) met en lumière le potentiel de remédiation des métaux lourds par les champignons de Zygomycotina, présents principalement dans le sol et le fumier. Ces champignons, tels que *Circinella sp.*, *Cunninghamella echinulata* et *Mucor rouxii*,

se sont révélés efficaces pour l'élimination du nickel, du plomb, du cuivre, du zinc, du cadmium et du nickel des solutions aqueuses, montrant une augmentation de la capacité de biosorption avec la température et la concentration initiale du métal.

Parallèlement, l'étude de *Rhizopus sp.* a révélé des capacités variables de biosorption du chrome, du cadmium et du plomb, soulignant leur potentiel en tant qu'agents de dépollution dans les environnements contaminés par les métaux lourds. De même, les champignons de l'*Ascomycotina*, comme *Aspergillus sp.* et *A. niger*, ont démontré une capacité significative de bioaccumulation du chrome, du nickel et du cadmium, avec des conditions optimales de pH et de température favorisant leur croissance et leur efficacité dans l'élimination des métaux lourds des solutions industrielles et des eaux usées contaminées.

L'étude d'**Akhtar et Mannan (2020)** met en évidence la capacité des champignons à dépolluer les sites contaminés par les métaux lourds. Ces champignons indigènes sont résistants à la toxicité des métaux et adaptés aux conditions environnementales locales. Par exemple, des espèces telles qu'*Aspergillus*, *Rhizomucor*, *Fusarium* et *Emericella*, isolées d'une terre agricole contaminée par l'arsenic, ont montré une tolérance élevée à cet élément et ont amélioré la croissance des plantes exposées à l'eau contaminée. De même, *Funneliformis geosporum*, un champignon mycorhizien, a réduit l'accumulation de zinc dans les plantes de blé, améliorant ainsi la qualité du sol et le rendement des cultures dans des conditions de contamination par le zinc. Par ailleurs, *Pleurotus ostreatus* s'est révélé efficace pour éliminer le manganèse de l'eau contaminée, ainsi que d'autres métaux lourds présents dans les effluents de laverie de charbon.

Ces études suggèrent que ces champignons indigènes non seulement éliminent les métaux lourds du sol, mais améliorent également la croissance des plantes et le rendement des cultures dans les terres agricoles fortement contaminées par les métaux lourds.

II.3.1.Limitation de la mycoremédiation

La mycoremédiation présente des limites liées au pH, au temps et à la température. Les champignons sont particulièrement sensibles au pH, avec une diminution de la productivité biologique et de leur capacité à accepter les ions de plomb dans des conditions de pH inférieur à 3,0 ou supérieur à 5,0. De plus, l'élimination du plomb par les champignons peut prendre du temps, et les taux d'absorption influencent la vitesse de ce processus, allant de quelques heures à plusieurs jours. La tolérance à la température varie selon les espèces, mais des températures

plus élevées peuvent compromettre les processus d'adsorption en raison de l'incapacité du corps fongique à maintenir la viabilité de ses structures cellulaires. Ces limitations ne sont pas exhaustives, car les concentrations de plomb et d'autres produits chimiques liés au plomb peuvent agir comme des interférences pour la mycoremédiation (**Batch, 2022**).

D'autre part, l'application de la mycoremédiation avec des espèces spécifiques comme *P. ostreatus* présente des inconvénients supplémentaires. Ce champignon nécessite un environnement aérobie, est sensible aux perturbations une fois établi, et nécessite un amendement de lignocellulose pour prospérer (**Anderson et Juday, 2016**). De plus, des limitations environnementales et des défis liés à la faisabilité et à la biodégradation restreignent les applications de la mycoremédiation, malgré son attrait comme alternative verte et économique aux techniques chimiques conventionnelles de dépollution (**Rehman et al., 2018**).

Pour améliorer les possibilités d'application de la bioremédiation, il est nécessaire de développer des stratégies synergiques reposant sur un cadre politique favorable, impliquant des tests à différentes échelles, du laboratoire au terrain, avec des espèces fongiques adaptées (**Akpasi et al., 2023**).

II.4. La Bioremédiation

La bioremédiation est définie comme un processus utilisant des micro-organismes ou leurs enzymes pour traiter les sites pollués afin de retrouver leur état d'origine (**Cheng 2014; Ojuederie et Babalola 2017; Ying 2018**). Les micro-organismes décomposent ou transforment avec succès le contaminant complexe et toxique en une forme plus simple ou moins toxique (**Ojuederie et Babalola, 2017**).

L'objectif principal de la bioremédiation est de stimuler la microflore indigène dans le site contaminé en fournissant plus de nourriture et des conditions de croissance appropriées afin qu'ils puissent croître à leur plein potentiel et produire plus d'enzymes pour décomposer le contaminant complexe en substances plus simples (**Chen et Wang, 2017**).

Pendant le processus de bioremédiation du contaminant, des liaisons chimiques sont rompues et de l'énergie est libérée, qui est ensuite utilisée par les micro-organismes pour leur croissance. Les espèces microbiennes transformant les métaux lourds peuvent être isolées à la fois dans des environnements aérobies et anaérobies. Les micro-organismes aérobies sont plus fréquemment utilisés pour les processus de bioremédiation par rapport aux micro-organismes anaérobies (**Azubuiké et al., 2016**).

Les approches de bioremédiation sont généralement classées comme *in situ* ou *ex situ*. (a) *In situ* : où la technologie de remédiation est appliquée sur le site de contamination et (b) *Ex situ* : le contaminant est retiré du site de contamination pour l'application de la technologie de remédiation (Zouboulis *et al.*, 2011; Nejad *et al.*, 2017; Ying, 2018; Sharma *et al.*, 2019).

II.4.1 La Bioremédiation *in situ*

La bioremédiation *in situ*, qui consiste à traiter les substances polluées sur le site de contamination sans nécessiter d'excavation du sol, présente l'avantage d'être peu coûteuse et de minimiser la perturbation du sol (Riseh *et al.*, 2023 ; Sayqal et Ahmed, 2021). Cette approche a été efficacement utilisée pour traiter divers types de polluants tels que les métaux lourds, les solvants chlorés, les colorants et les hydrocarbures (Riseh *et al.*, 2023).

Le choix entre les différentes méthodes de bioremédiation dépend de plusieurs facteurs, notamment la nature et l'étendue de la contamination, la concentration des contaminants et la durée prévue pour achever le processus de remédiation (Sayqal et Ahmed, 2021).

La bioremédiation intrinsèque, qui exploite les populations microbiennes indigènes pour dégrader les contaminants, est une méthode moins coûteuse qui ne nécessite pas d'intervention extérieure (Riseh *et al.*, 2023).

En revanche, la bioremédiation génie implique l'utilisation de micro-organismes génétiquement modifiés et de conditions physico-chimiques optimisées pour accélérer la dégradation des polluants (Riseh *et al.*, 2023). Ces techniques *in situ* génies comprennent diverses approches telles que le bioventil, le biosparging, la biostimulation, la bioaugmentation et la phytoremédiation (Sayqal et Ahmed, 2021).

La biodégradation *in situ* est une autre méthode qui consiste à fournir des nutriments et de l'oxygène aux micro-organismes présents dans le sol pour dégrader les contaminants organiques. Cette approche peut être utilisée pour traiter à la fois les eaux souterraines et les sols contaminés. En revanche, la bioremédiation *ex situ* implique l'excavation du sol contaminé pour le traitement en dehors du site, utilisant des stratégies telles que le labourage et le compostage (Vaid *et al.*, 2022).

II.4.2. La Bioremédiation *ex situ*

La bioremédiation *ex situ* implique d'excaver les polluants et de les déplacer des sites contaminés vers un autre site pour traitement (Vaid *et al.*, 2022 ; Riseh *et al.*, 2023). Les techniques de bioremédiation sont choisies en fonction de divers facteurs tels que la profondeur de la pollution, le type de polluant, le degré de pollution, le coût du traitement et l'emplacement

géographique du site contaminé. Cette méthode implique l'excavation des polluants puis leur transport vers un autre site pour traitement (Riseh *et al.*, 2023). La bioremédiation *ex situ* est catégorisée en systèmes en phase solide et en phase liquide (Sayqal et Ahmed, 2021 ; Riseh *et al.*, 2023).

Dans la bioremédiation en phase solide, après l'excavation du sol, un inoculum bactérien est libéré dans des tas de sol à l'aide de tuyaux afin de remédier aux métaux lourds. Dans la bioremédiation en phase liquide, les sols pollués sont combinés avec de l'eau, des nutriments et de l'oxygène dans un bioréacteur pour fournir une situation optimisée aux micro-organismes afin de dégrader efficacement les contaminants du sol (Riseh *et al.*, 2023). Les techniques les plus importantes comprennent le labourage, le compostage, les tas de compost et les bioréacteurs (Sayqal et Ahmed, 2021).

II.4.3. Les technologies de bioremédiation

Les technologies de bioremédiation sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Technologies de bioremédiation.

Bioaugmentation	La bioaugmentation consiste à ajouter des micro-organismes dégradant les polluants (naturels/exotiques/génétiquement modifiés) pour augmenter la capacité de biodégradation des populations microbiennes indigènes dans la zone contaminée (Abatenh <i>et al.</i> , 2017).
Les biofiltres	sont une méthode visant à dégrader les polluants présents dans les émissions industrielles en immobilisant les communautés microbiennes pour qu'elles se développent à la surface solide. Lorsque l'air contenant des polluants toxiques est filtré à travers les biofiltres, il est adsorbé par les biofilms microbiens et dégradé (Kumar <i>et al.</i> , 2018).
La biotransformation	Les microbes peuvent transformer les métaux et les métalloïdes par des réactions d'oxydoréduction et de méthylation. Ces réactions peuvent modifier la mobilité des métaux et réduire leur toxicité, offrant ainsi des applications en bioremédiation (Jobby <i>et al.</i> , 2017).
La biostimulation	consiste à stimuler les populations microbiennes indigènes présentes dans les sols ou les eaux souterraines, et peut être réalisée soit <i>in situ</i> soit <i>ex situ</i> (Zouboulis et Moussas, 2011).
La bioventilation	est une technique qui implique la stimulation contrôlée du flux d'air en apportant de l'oxygène à la zone non saturée (zone vadose) afin d'augmenter la bioremédiation en favorisant les activités des micro-organismes indigènes (Azubuiké <i>et al.</i> , 2016).

Le compostage	est un processus de traitement aérobique et thermophile ; il peut être réalisé en utilisant des tas statiques, des tas aérés ou des réacteurs à alimentation continue ; il est économique mais nécessite un temps de traitement prolongé (Zouboulis et Moussas, 2011).
La culture sur sol	est un système de traitement en phase solide pour les sols contaminés ; elle peut être réalisée in situ ou dans une installation construite (Zouboulis et Moussas, 2011).
Le biopilage	consiste à excaver les sols contaminés, à les mélanger avec des amendements du sol, puis à les placer sur une zone de traitement où la bioremédiation est réalisée en utilisant une aération forcée. Le dioxyde de carbone et l'eau sont produits après que les contaminants ont été réduits (Choudhary et al., 2017).
Le biosparging	est une méthode similaire au bioventilation qui utilise l'oxygène et les nutriments pour stimuler l'activité métabolique des micro-organismes indigènes localisés dans la zone saturée de contaminants (Kumar et al., 2018).
Les bioréacteurs	impliquent le traitement de matériaux solides contaminés (sol, sédiment, boue) ou d'eau à travers un système de confinement conçu (Choudhary et al., 2017).

II.4.4. Les Micro-Organismes : acteurs clés de la bioremédiation

De nos jours, les micro-organismes ont retrouvé leur importance en raison de leurs applications diverses dans le sol, car ils comprennent des méthodes de rémédiation réalisables pour résoudre et restaurer l'état ordinaire du sol (**Mohan et al., 2022**).

Les micro-organismes utilisés dans la bioremédiation peuvent être indigènes ou non indigènes et peuvent être introduits sur les sites contaminés de différentes manières. L'utilisation de micro-organismes indigènes dans les environnements contaminés est l'approche la plus importante pour résoudre les problèmes liés à la biodégradation et à la bioremédiation des polluants (**Riseh et al., 2023**).

La plupart des processus de bioremédiation sont réalisés dans des conditions aérobies, mais l'exécution d'un système dans des conditions anaérobies peut permettre aux organismes microbiens de dégrader des molécules autrement récalcitrantes. Les organismes aérobies dépendent de l'oxygène pendant leur activité de croissance. Ce sont des processus continus connus sous le nom de respiration cellulaire, qui utilisent de l'oxygène pour oxyder des substrats comme les acides gras issus du pétrole afin d'obtenir de l'énergie. Des exemples de bactéries aérobies dégradatrices sont *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes* et *Mycobacterium* (**Sayqal et Ahmed, 2021**).

Les micro-organismes modifient l'état ionique des métaux lourds, ce qui influence la solubilité, la biodisponibilité et le déplacement dans le sol ainsi que dans l'environnement aquatique. La mobilisation ou l'immobilisation des métaux lourds aide à la remédiation microbienne, qui est ensuite suivie par l'oxydation-réduction, la chélation, la modification du complexe métallique et la biométhylation. La catalyse enzymatique par les microbes solubilise les métaux avec un état d'oxydation plus élevé à un état d'oxydation plus faible, par exemple, *Thiobacillus ferrooxidans* et *T. thiooxidans* sont responsables de l'oxydation enzymatique de l'uranium. L'isolement des micro-organismes responsables de la dégradation des métaux lourds pourrait également aider à transporter les métaux lourds en utilisant des mécanismes de transport liés à la membrane et les transformer en formes non dangereuses.

Les micro-organismes utilisent des processus comme la biosorption, la bioaccumulation, la biotransformation et la biolixiviation pour rester en vie dans un environnement pollué par les métaux (**Pande et al., 2022**).

Selon l'étude menée par **Blaylock et al., (1997)**, la bioremédiation, comparée à d'autres méthodes conventionnelles (excavation et mise en décharge) dans le traitement d'une acre de sol contaminé par le plomb (Pb), s'est révélée rentable car elle permet d'économiser environ 50 à 60 % des coûts.

Cependant, dans le processus de bioremédiation, la croissance et le métabolisme des micro-organismes dépendent largement de certaines adaptations environnementales telles que la température appropriée, le pH et l'humidité (**Mohan et al., 2022**).

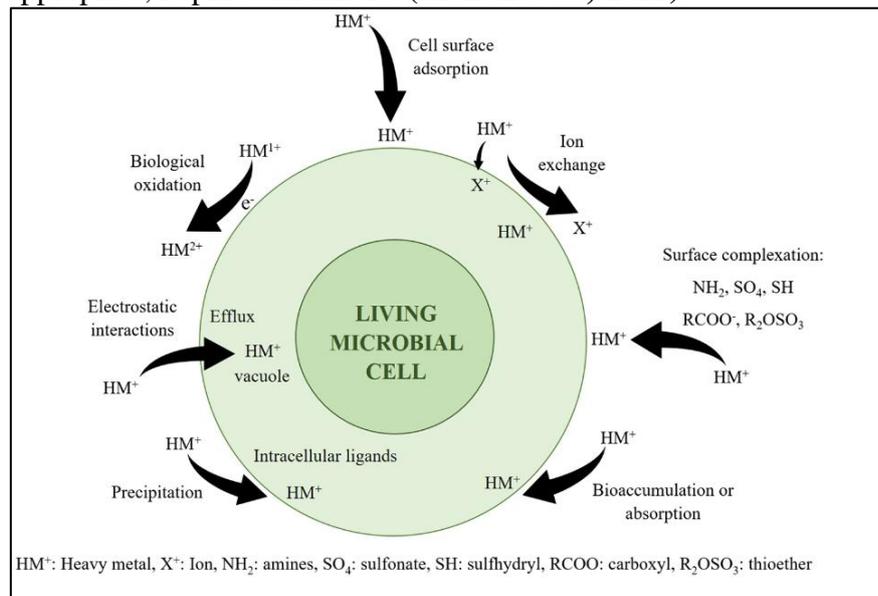


Figure 3 : Mécanismes impliqués dans l'absorption des métaux lourds par un système microbien (**Syed et al., 2023**)

II.4.4.1. Intégration des OGM dans la Bioremédiation

Avec les évolutions récentes dans le domaine de la biotechnologie, l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés (OGM) pour la bioremédiation est en plein développement. Ces organismes, capables pour persister au divers stress liés à l'accumulation de polluants, sont le fruit de la technologie de l'ADN recombinant développée dans de nombreux laboratoires à travers le monde (**Perera et Hemamali, 2022**).

Cependant, leur introduction dans les terres agricoles peut perturber la structure normale du microbiome du sol et catalyser le processus de dégradation en raison de modifications dans leurs voies métaboliques, entraînant une sécrétion accrue de biomolécules favorisant la bioremédiation (**Rebello et al., 2021**).

Le génie génétique, en éditant des gènes individuels, en construisant des voies métaboliques et en modifiant les séquences génétiques, est primordial dans développement des OGM pour la bioremédiation, avec un intérêt particulier sur la modification des étapes limitantes des processus métaboliques (**Pande et al., 2022**). Parallèlement, la compréhension approfondie des extrémophiles et de leurs caractéristiques génétiques, physiologiques et métaboliques est cruciale pour élaborer des stratégies efficaces de bioremédiation (**Perera et Hemamali, 2022**).

Les OGM offrent la possibilité de décontaminer les sols des métaux lourds tels que le Cd, l'As, le Cu, le Hg et le Ni. Les chercheurs ont réussi à modifier génétiquement les transporteurs membranaires microbiens pour améliorer la bioremédiation de ces métaux, en exploitant des mécanismes de liaison et de transport.

Les transporteurs et les mécanismes de liaison jouent un rôle crucial dans ce contexte de bioremédiation des métaux lourds, dès que les métaux lourds entrent dans la cellule, de nombreuses phytochélatines, métallothionéines et polyphosphates travaillent ensemble pour la séquestration des métaux lourds et le changement des systèmes d'importation-stockage des métaux lourds des micro-organismes pourrait renforcer leur capacité à extraire les métaux lourds de l'eau et du sol (**Pande et al., 2022**).

Dans une étude récente, l'utilisation de *Pseudomonas fluorescens* génétiquement modifiées pour la dégradation des biphényles polychlorés n'a eu aucun impact significatif sur

la structure et la fonction de la communauté bactérienne par rapport aux changements provoqués par d'autres facteurs biotiques et abiotiques, soulignant la sécurité de cette approche **(Rebello et al., 2021)**.

Par ailleurs, L'application d'*E.coli* a été reconnue en tant que bactérie recombinante possédant une capacité accrue d'absorption des métaux, car la bactérie a une surface accrue par unité de masse cellulaire, ce qui facilite l'absorption de plus de métal à partir de solutions. De plus, il a été observé que le système présente ses propres avantages par rapport aux bactéries à Gram négatif. Le processus de translocation ne se produit qu'à travers une membrane. Pendant le processus de translocation, les bactéries à Gram positif sont plus rigides avec une sensibilité minimale au stress en raison de la présence d'une paroi cellulaire épaisse qui peut entourer les cellules microbiennes, ce qui rend le processus de bio-adsorption plus faisable **(Adetunji et Anani, 2021)**.

II.4.5. Bioremédiation limitations et défis

Bien que la bioremédiation soit souvent considérée comme la méthode la plus simple, la moins coûteuse et respectueuse de l'environnement, elle présente néanmoins certaines limitations. L'une des principales limites de la bioremédiation est sa durée prolongée pour atteindre les concentrations cibles de polluants. Ce processus est connu pour sa lenteur, nécessitant généralement un temps de traitement plus long que d'autres méthodes de remédiation **(Azubuiké et al., 2016 ; Kumar et al., 2018)**.

Pour mettre en œuvre la bioremédiation *in situ* avec succès, il est impératif que le site dispose d'un sol à haute perméabilité. En cas d'utilisation d'un processus *ex situ*, le contrôle des composés organiques volatils peut s'avérer difficile **(Kumar et al., 2018)**. De plus, la bioremédiation bactérienne peut être limitée par les conditions environnementales, la disponibilité des nutriments pour la croissance bactérienne et la présence d'autres polluants **(Azubuiké et al., 2016 ; Batch, 2022)**.

Tout d'abord, les bactéries sont sensibles à la température et au pH dans l'environnement. Les températures extrêmes peuvent altérer la membrane cellulaire, diminuant l'efficacité de la capacité des bactéries à effectuer la biosorption. Pendant ce temps, le pH affecte les charges à la surface cellulaire des bactéries, ce qui peut influencer les mécanismes de retrait du plomb de l'environnement. Par exemple, le plomb avec des niveaux de pH plus élevés a plus de chances d'adsorber à la surface de la cellule tandis qu'avec un faible pH, le plomb devient soluble, pénétrant dans la cellule et altérant les fonctions bactériennes telles que les réactions métaboliques **(Batch, 2022)**.

Deuxièmement, la disponibilité des nutriments est importante car pour que les bactéries éliminent efficacement le plomb des sols, elles doivent avoir une croissance et une reproduction adéquates. Ces nutriments essentiels à leur survie comprennent le glucose, l'azote et d'autres qui aident à augmenter la capacité des bactéries à ne pas être affectées toxiquement par le plomb. Enfin, la présence d'autres produits chimiques toxiques auxquels la bactérie n'est pas adaptée pourrait affecter l'efficacité de l'absorption du plomb par la bactérie. Par conséquent, le site de sol contaminé doit d'abord être examiné pour d'autres produits chimiques potentiellement toxiques, puis une espèce bactérienne doit être choisie avant sa mise en œuvre (Batch, 2022).

*Chapitre III : Les PGPR et les Siderophores de Pseudomonas :
comme outils de Bioremédiation*

III.1. Bactéries promotrices de croissance des plantes (PGPR)

Les bactéries promotrices de croissance des plantes (PGPR) sont des micro-organismes présents dans la zone du sol près des racines, appelée la rhizosphère. Résidant autour ou sur la surface des racines des plantes et aident à favoriser leur croissance et leur développement. Les PGPR sécrètent des substances qui stimulent la croissance des plantes, les rendant plus résistantes aux stress et améliorant leur capacité à absorber les nutriments du sol (*Kumar et al., 2021 ;Vocciante et al., 2022 ; Agarwal et al., 2023 ; Hnini et al 2024*).

III.2. Classification des PGPR

La classification des PGPR repose sur divers critères, notamment le degré de proximité, le mécanisme d'action et la fonction.

III.2.1. Le degré de proximité

Selon le degré de proximité bactérienne par rapport aux racines et l'intimité de l'association, les PGPR sont divisés en PGPR extracellulaires, présents dans le sol de la rhizosphère ou entre les cellules des racines, et les PGPR intracellulaires, qui sont présents à l'intérieur des cellules racinaires dans des structures nodulaires spécialisées (*Agarwal et al., 2023*). On appelle ceux qui sont trouvés associés aux racines les PGPR. Ils sont également présents dans la rhizosphère, sur les feuilles (phyllosphère) ou à l'intérieur de la plante (endosphère).

Les endophytes (PGPE) sont généralement les plus efficaces pour soutenir la croissance ; étant à l'intérieur des tissus de la plante, ils peuvent communiquer avec la plante hôte et exercer leur effet bénéfique de manière beaucoup plus efficace. De plus, les PGPE, protégés de l'environnement externe, sont beaucoup moins soumis aux variations biotiques et abiotiques chimico-physiques fréquentes du sol. Les bactéries endophytes proviennent de l'écosystème de la rhizosphère entourant les racines et pénètrent dans les tissus végétaux principalement en utilisant des fissures naturelles créées dans les racines lors de la croissance (*Vocciante et al., 2022*).

III.2.2. Le mécanisme

III.2.2.1. Les mécanismes directs

Les mécanismes directs impliquent l'utilisation par les bactéries de traits qui favorisent directement la croissance des plantes, notamment la production et la sécrétion de diverses substances chimiques régulatrices, d'hormones et de sidérophores dans la zone de la rhizosphère. Les PGPR facilitent ainsi la croissance des plantes en favorisant l'acquisition de

ressources ou en modifiant les niveaux d'hormones végétales (**Vocciante *et al.*, 2022 ; Agarwal *et al.*, 2023**).

Les mécanismes directs les plus importants et les plus étudiés comprennent la fourniture de nutriments minéraux tels que l'azote, le phosphore et le fer, ainsi que de phytohormones telles que les auxines, les cytokinines et les gibbérellines. Les PGPR sont capables de fixer l'azote atmosphérique et de le rendre disponible pour les plantes, de solubiliser le phosphate pour en augmenter la biodisponibilité, et de convertir le fer pour le rendre accessible aux plantes. De plus, ils produisent des phytohormones qui stimulent la germination des grains, la croissance des racines, des tiges et des feuilles, tout en régulant les niveaux d'éthylène pour éviter les effets néfastes du stress (**Alves *et al.*, 2022**).

III.2.2.2. Les mécanismes indirects

La promotion de la croissance des plantes par divers PGPR est bien documentée, à la fois par des processus indirects (**Jadhav *et al.*, 2024**). Les mécanismes indirects sont définis comme des activités inhibitrices lorsque les PGPR entravent l'effet négatif des organismes pathogènes (stress biotique) en produisant des composés antibiotiques, tels que des sidérophores, des enzymes lytiques et du cyanure d'hydrogène, qui agissent comme des allélochimiques pour défendre contre les pathogènes. Ces composés peuvent également contribuer à la décomposition de la matière organique et à l'augmentation de la disponibilité des nutriments (**Alves *et al.*, 2022; Vocciante *et al.*, 2022**). De plus, les bactéries induisent une résistance systémique qui permet aux plantes de réagir de manière plus efficace contre les pathogènes. En outre, certaines bactéries peuvent simplement évincer les pathogènes en compétition pour les ressources et la colonisation de la rhizosphère (**Agarwal *et al.*, 2022**).

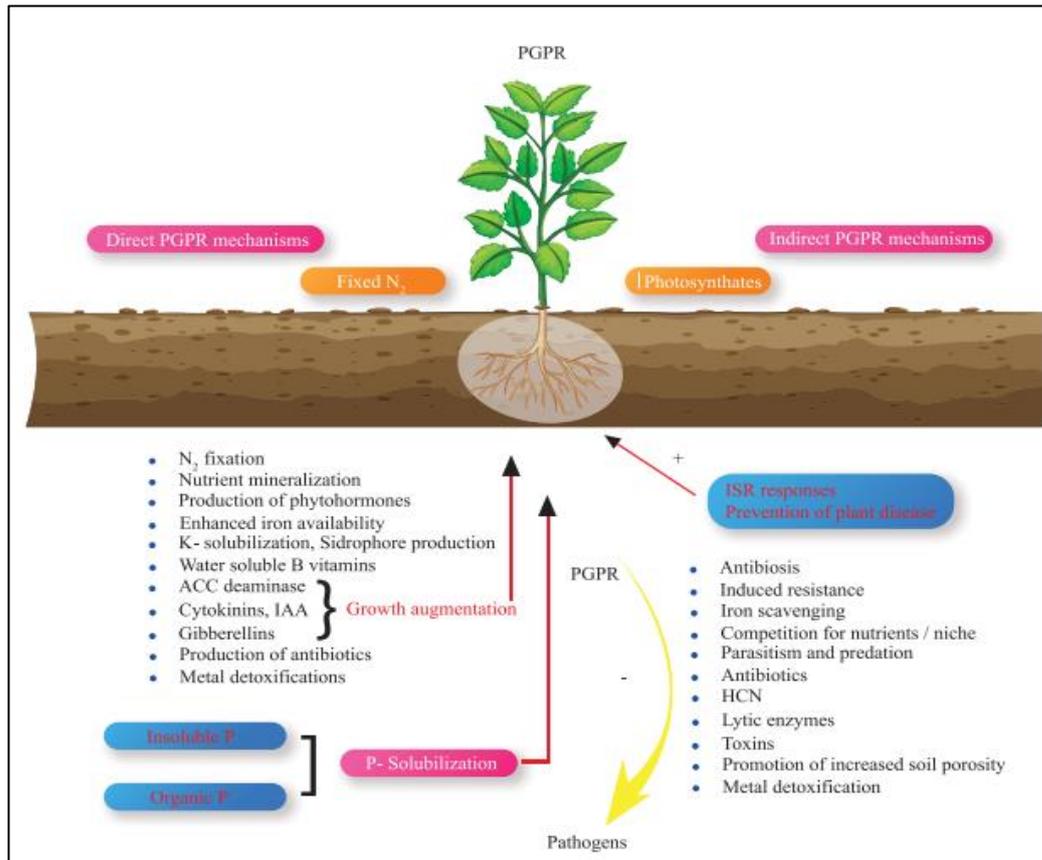


Figure 4 : Mode d'action des PGPR indiquant des effets directs et indirects dans l'amélioration de la croissance des plantes et la suppression des phytopathogènes (**Hyder et al., 2023**).

III.2.3. La fonction

Les PGPR peuvent être divisés en fonction de leur fonctionnalité en tant que biofertilisants, qui augmentent la disponibilité des nutriments, des phytostimulateurs, qui favorisent la croissance par sécrétion de phytohormones, des rhizorémédiateurs, qui dégradent les polluants organiques, et des biopesticides, qui tuent les micro-organismes nuisibles en sécrétant des métabolites antimicrobiens antifongiques (**Agarwal et al., 2022**).

III.3. PGPR et stress

Différents types de stress abiotiques, tels que la salinité, la sécheresse, les métaux lourds, l'engorgement en eau, la température, la contamination de l'eau, les polluants atmosphériques, etc., ainsi que les stress biotiques comme la pathogénicité, les mauvaises herbes, les parasites, etc., sont présents dans l'environnement. En interagissant avec les plantes, les PGPR les aident à atténuer à la fois les stress abiotiques et biotiques (**Kabiraj et al., 2020**).

Les plantes sont généralement très sensibles aux métaux toxiques, et même une légère exposition à ces métaux peut entraîner divers symptômes physiologiques néfastes. Un excès de métaux lourds peut ainsi inhiber la germination des grains, entraver la croissance des semis, endommager les systèmes membranaires et les enzymes antioxydantes, et même provoquer des aberrations chromosomiques, voire la mort des plantes dans les cas les plus graves (**Feng et al., 2021**).

Les PGPR sont des microorganismes bénéfiques qui non seulement améliorent la croissance des plantes mais leur confèrent également une résistance au stress métallique. Leur application dans le sol agricole est largement soutenue, avec de multiples études soulignant leurs effets positifs sur les plantes (**Jalmi et Sinha, 2022 ; Hnini et al., 2024**).

L'accumulation de niveaux élevés de ROS (espèces réactives de l'oxygène) dans les cellules végétales est responsable de dommages oxydatifs qui perturbent l'équilibre cellulaire et peuvent compromettre la santé des plantes (**Bhattacharyya et al., 2020**).

Le stress abiotique entraîne la production de ROS dans les plantes, nécessitant un équilibre entre leur formation et leur élimination pour assurer une croissance appropriée. Les enzymes antioxydantes telles que la SOD, la POD et la catalase, ainsi que des composés comme la proline, jouent un rôle crucial dans la réduction de l'accumulation de ROS, préservant ainsi l'intégrité cellulaire et protégeant la plante contre l'oxydation (**Nivethaet al., 2021; Zainab et al., 2021**).

Pour contrer ces effets néfastes, les souches de PGPR interviennent en réduisant la production de ROS grâce à la synthèse d'une variété d'antioxydants, tant enzymatiques que non enzymatiques. Elles contribuent ainsi à maintenir un équilibre optimal de ROS dans les cellules végétales. Ces PGPR jouent également un rôle essentiel dans la réduction de la toxicité des métaux lourds en les rendant moins nuisibles, en modulant leur biodisponibilité dans le sol et en contrôlant les populations de phytopathogènes. De plus, ils renforcent le système antioxydant des plantes, augmentant ainsi leur capacité à tolérer le stress métallique (**Feng et al., 2021**).

Plusieurs souches de PGPR, telles que *Rhizobium* sp. RP5 et *Pseudomonas* sp. CPSB21, stimulent la production d'enzymes antioxydantes chez les plantes en conditions stressantes, ce qui aide à atténuer les effets du stress. De plus, certains PGPR sont capables de convertir les métaux lourds en formes moins toxiques et de les séquestrer à l'intérieur des cellules bactériennes par des processus d'oxydation-réduction. Certains PGPR facilitent également la phyto-volatilisation des métaux lourds, favorisant ainsi leur conversion en formes moins toxiques à l'intérieur des plantes (**Hnini et al., 2022**).

Une autre étude a montré que l'inoculation de souches de PGPR tolérantes aux métaux lourds chez *S. sesban*, telles que *B. xiamenensis* et *B. gibsonii*, a augmenté l'activité antioxydante, incluant la SOD, la POD et la teneur en proline, par rapport aux plantes non immunisées. Cette inoculation améliore le système antioxydant, permettant à la plante de surmonter les effets nocifs des métaux lourds (**Zainab et al., 2021**).

III.4. PGPR et l'effet ISR

Chez les plantes, la préparation de la défense peut également être due à des mécanismes de signalisation de résistance induite, qui impliquent la SAR (résistance systémique acquise) et la ISR (résistance systémique induite) par une signalisation à longue distance dans les parties distales pour renforcer la capacité défensive contre les pathogènes (**Bukhat et al., 2020**).

Les deux types de résistance induite rendent les parties non infectées de la plante plus résistantes à l'attaque des pathogènes dans plusieurs espèces végétales. La résistance est induite par les rhizobactéries *via* la voie du SAR (**Rehman et al., 2020**), ce qui induit l'accumulation des protéines liées à la pathogénèse (PR) et de l'acide salicylique, tandis que l'ISR dépend des voies régulées par l'acide jasmonique et l'éthylène (**Khoshru et al., 2020**). L'ISR régule les niveaux d'éthylène et de jasmonate qui restaurent le mécanisme de résistance latent chez la plante hôte. Un réseau de signalisation en cascade contrôle la réponse ISR chez les plantes et ces signaux sont régulés par des phytohormones (**Rawat et al., 2020**).

L'ISR initie de multiples mécanismes de défense potentiels, notamment en augmentant l'activité de la chitinase, de la β -1,3 glucanase et de la peroxydase; en accumulant des substances antimicrobiennes à faible poids moléculaire telles que les phytoalexines; et en formant des biopolymères protecteurs, tels que la lignine, la callose et les glycoprotéines riches en hydroxyproline (**Manoj et al., 2020**). L'ISR active les réponses de défense des plantes par l'action de différents éliciteurs PGPR, tels que les acides organiques, les sidérophores, les liposaccharides et les hormones (**Hyder et al., 2023**).

La reconnaissance de ces éliciteurs par la plante déclenche des cascades de signalisation de défense, conduisant à l'expression de gènes liés à la défense. Une fois que les voies de signalisation de défense sont activées, les plantes commencent à produire des composés liés à la défense, tels que les protéines PR, les phytoalexines et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (**Zaib et al., 2023**).

Il a été constaté que les PGPR peuvent achever le processus d'ISR en augmentant l'activité des enzymes antioxydantes. Sous l'effet du stress des métaux lourds, les cellules végétales libèrent un excès de ROS, entraînant des dommages oxydatifs. Cependant, les PGPR favorisent la synthèse de diverses enzymes antioxydantes par les cellules végétales pour résister à ces dommages oxydatifs, telles que la superoxyde dismutase (SOD), la peroxydase (POD), la catalase (CAT), l'ascorbate peroxydase (APX), etc., ce qui peut éliminer efficacement les ROS des cellules végétales et favoriser la croissance des plantes (**Manoj et al., 2020**).

III.5. Les EPS des PGPR

L'élimination des métaux lourds par la biomasse microbienne, en particulier les souches de *Pseudomonas*, est un sujet d'étude important. L'utilisation de substances extracellulaires polymériques (EPS) bactériennes, y compris les EPS purifiées, est prometteuse pour la remédiation des eaux contaminées en raison de leur capacité à adsorber et à flocculer efficacement les ions métalliques (**Balíková et al., 2022**).

Ces EPS constituent un mélange complexe de polymères de poids moléculaire élevé qui sont des agrégats microbiens, largement responsables de la liaison des cellules avec d'autres matériaux particuliers (**Siddharth et al., 2021**). Elles sont produites de manière microbienne par sécrétion bactérienne active, élimination de matériau en surface des cellules et lyse cellulaire, et s'accumulent dans la boue (**Wei et al., 2017**). Les protéines, les glucides, les hétéropolymères et les acides nucléiques sont les principaux constituants des EPS, représentant 50 à 90 % du carbone organique total dans une biomasse de boue (**Wei et al., 2017; Manoj et al., 2020**).

La matrice des EPS contient plusieurs groupes fonctionnels tels que les groupes carboxyle, phosphorique, amine et hydroxyle qui peuvent interagir avec des espèces cationiques en solution et représentent donc des sites potentiels de liaison des métaux (**Pagliaccia et al., 2021**). Les propriétés des EPS sont la mobilisation ou l'immobilisation des métaux toxiques en se liant avec des métaux lourds tels que le plomb, le cadmium et l'uranium. Les interactions avec les ions de métaux lourds sont le résultat direct de la liaison avec les groupes fonctionnels chargés négativement des substances polymériques supplémentaires. Ces groupes comprennent des acides phosphate, hydroxy, succinyle et uronique. Les EPS, produites par certains microbes, induisent la formation de biofilms en réponse à l'exposition à des métaux lourds toxiques (**Singh et al., 2019**).

Le phénomène de formation de complexes est dû à la formation d'une interaction hydrophile entre le métal lourd et les groupes acide carboxylique/phosphore des EPS, tandis que l'interaction hydrophobe aide à intégrer le métal lourd sur la surface des EPS. De plus, la valeur de pH du milieu joue un rôle décisif dans la formation de complexes organométalliques, car elle détermine la distribution des charges à la surface des EPS (Manoj *et al.*, 2020).

Les EPS produits par *Pseudomonas aeruginosa* démontrent une capacité efficace à lier le cuivre(II), empêchant ainsi son accès au cytoplasme. L'optimisation de la production d'EPS par cette souche représente une stratégie prometteuse pour la rétention du cuivre. Des études ont rapporté que jusqu'à 26 mg d'EPS peuvent être obtenus (Balíková *et al.*, 2022).

III.6. Les sidérophores

Les sidérophores sont un groupe de métabolites secondaires produits par diverses bactéries, champignons, levures et certaines plantes (monocotylédones) pour chélater le fer du milieu environnant en réponse à la rareté du fer (Özdemir *et al.*, 2023; Deb et Tatung, 2024).

Les sidérophores sont des chélateurs d'ions fer de haute affinité et spécificité, avec un poids moléculaire de moins de 10 kDa (Passari *et al.*, 2023; Deb, et Tatung, 2024). Ces molécules de faible poids moléculaire, généralement comprises entre 200 et 2000 Da, présentent une forte affinité de liaison pour le fer (III), avec une constante de liaison ($k_f > 10^{30}$) (Schalk *et al.*, 2020). Le terme «sidérophore» dérive du mot grec «Siderophore» signifiant «transporteur de fer» et a été isolé pour la première fois pendant les années 1949-1952 par Neilands (Deb et Tatung, 2024).

Initialement découverts comme des facteurs de croissance, les sidérophores tels que la myobactine, la ferrichrome et la coprogène ont suscité l'intérêt de chercheurs comme Garibaldi et Neilands. Ils ont étudié leur mode d'action, améliorant la production de ferrichrome A en inoculant des organismes producteurs dans des milieux déficients en fer. Dans les années 1960, des scientifiques ont identifié les ferrioxamines et la ferrimycine, et ont élucidé la structure de la DFO B. Plus tard, Emery et Neilands ont détaillé les structures de la ferrichrome et de la ferrichrome A. À ce jour, plus de 500 sidérophores ont été répertoriés, dont 270 ont été structurellement caractérisés (Sarvepalli *et al.*, 2024).

III.6.2. Classification des siderophores

La classification des siderophores est basée à la fois sur l'organisme producteur et sur leur structure chimique. En ce qui concerne l'organisme producteur, les siderophores peuvent être produits par divers types d'organismes tels que les bactéries, les champignons, les plantes, les

cyanobactéries et les organismes marins (**Vineeth *et al.*, 2023**). En ce qui concerne la structure chimique, les sidérophores peuvent être classés en différentes catégories en fonction de leurs caractéristiques structurales, de leurs groupes fonctionnels et des types de ligands (**Debet Tatung; Sarvepalli *et al.*, 2024**).

Par ailleurs, les sidérophores sont classés d'après la nature de l'organisme producteur et la nature chimique.

III.6.2.1. Classification selon l'organisme producteur

III.6.2.1.1. Origine végétale

Les phytosidérophores (PS) sont des exsudats racinaires libérés par les espèces de graminées (Poaceae) qui jouent un rôle central dans la nutrition des plantes en fer (Fe) (**Spiridon *et al.*, 2023**). Ces composés, connus sous le nom de famille des acides muginéiques (MAs), sont sécrétés depuis la surface des racines jusqu'à la rhizosphère pour solubiliser le fer insoluble dans les sols. Les MAs solubilisent également les oxydes ferriques localisés dans l'apoplaste des racines (**Yoneyama, 2021**).

Ces complexes sont constitués de deux amine-N, deux carboxylate-O et un site d' α -hydroxy-carboxylate, créant une structure octaédrique compacte où l'atome de fer (III) central reste lié (**Vineeth *et al.*, 2023**). Ainsi, les plantes graminées ont développé un système spécifique de captation du fer exclusivement en formant des complexes Fe-MAs. Cependant, en raison de la sécrétion limitée de MAs, certaines cultures de graminées telles que le riz et le maïs sont sensibles à la pénurie de fer et à la chlorose sévère qui en résulte, tandis que les espèces tolérantes à la carence en fer telles que l'orge sécrètent de grandes quantités de MAs (**Yoneyama, 2021**).

III.6.2.1.2. Origine fongique

Les siderophores fongiques jouent un rôle primordial dans l'absorption, le transport et le stockage du fer, ce qui est crucial dans diverses conditions telles que la carence en fer, la défense antioxydante, la compétition microbienne et la virulence chez l'homme. Des études récentes ont mis en lumière l'importance des siderophores et de leurs voies de biosynthèse dans le traitement et le diagnostic de diverses infections fongiques, ce qui fait des cibles géniques et protéiques associées à ces voies des composants clés dans le traitement des maladies fongiques (**Prabahar *et al.*, 2021**).

Aspergillus fumigatus et *A. nidulans* produisent 55 sidérophores qui présentent une certaine similitude. *A. fumigatus* utilise les sidérophores hydroxamates fusarinine C et triacetyl fusarinine C pour capturer le fer extracellulaire, ferricrocine pour la distribution et le stockage intracellulaires du fer, et hydroxyferricrocine pour le stockage du fer conidial, la germination et la résistance au stress oxydatif (Vineeth *et al.*, 2023).

La plupart des espèces d'*Ascomycota* et de *Basidiomycota* produisent des sidérophores de type hydroxamate, présentant une variété structurelle remarquable spécifique à l'espèce. En revanche, les *Mucoromycota* ne produisent pas de sidérophores de type hydroxamate, mais produisent un sidérophore de type carboxylate, appelé rhizoferrine, isolé à l'origine de *Rhizopus microsporus*. La rhizoferrine présente une affinité significativement plus faible pour le fer que les hydroxamates. La biosynthèse de la rhizoferrine dépend d'une synthétase indépendante des peptides non ribosomiques (NRPS) (NIS) chez *Rhizopus delemar* (Happacher *et al.*, 2023).

III.6.2.1.3. Origine bactérienne

Le fer est un nutriment vital pour les cellules, agissant comme un transporteur d'oxygène dans le corps humain. Cependant, un excès de fer peut augmenter le risque de cancer en produisant des espèces réactives de l'oxygène (Khasheii *et al.*, 2021). Dans le contexte du cancer, les cellules malignes ont des besoins significativement plus élevés en fer en raison de leur taux de réplication élevé. Ainsi, la diminution des concentrations de fer dans l'environnement cellulaire avec l'utilisation de sidérophores a montré une réduction de la prolifération et de la croissance tumorale (Passari *et al.*, 2023).

Des études ont évalué l'impact des sidérophores bactériens, tels que l'exochéline-MS et le mycobactim de *Mycobacterium smegmatis*, ainsi que la desféroxamine B (MPO) extraite de *S. pileux*, sur la prolifération cellulaire. Les résultats ont révélé une diminution significative de la réplication des cellules cancéreuses du sein, du foie et de la leucémie, à des concentrations qui n'ont pas affecté la croissance des cellules normales. Ces observations suggèrent un potentiel thérapeutique des sidérophores dans le traitement de certains cancers (Passari *et al.*, 2023).

De plus, les sidérophores bactériens peuvent également être bénéfiques pour l'environnement. des résultats indiquent que *Pseudomonas mونسensis* RMC4 présente une forte production de sidérophores et de pyoverdine, ainsi qu'une capacité de complexation du fer plus élevée, ce qui en fait un excellent candidat pour être utilisé comme biofertilisant en fer et pour mobiliser le fer dans le sol. De plus, la découverte que le génome code de nombreux autres

traits favorisant la croissance des plantes souligne son utilisation potentielle comme inoculant agricole polyvalent (**Lozano-González et al., 2023**).

Cependant Les sidérophores peuvent également être un facteur de pathogénicité, comme cela a été observé chez certaines espèces. Ces chélateurs jouent un rôle critique dans l'acquisition du fer tout au long du cycle de vie de *P. aeruginosa*. Étant donné la signification clinique de *P. aeruginosa* et les défis posés par sa multirésistance aux médicaments, comprendre son métabolisme du fer, en particulier le rôle des sidérophores, devient crucial (**Song et al., 2024**).

III.6.2.2. Classification selon la structure chimique

III.6.2.2.1. Les Hydroxamates

Les hydroxamates sont couramment trouvées dans un groupe de sidérophores dans un environnement qui se compose d'alkylamines hydroxylées et acylées, notamment la N6-acyl-N6-Hydroxyl lysine ou la N5-acyl-N5-Hydroxyl ornithine chez les bactéries (**Sarvepalli et al., 2024**). Ils possèdent des groupes fonctionnels $C(=O)N(OH)R$, où R est un acide aminé ou son dérivé, responsable de la chélation du fer (**Khasheii et al., 2021; Timofeeva et al., 2022; Sarvepalli et al., 2024**).

Chaque sidérophore est capable de former des ligands hexadentés et des complexes octaédriques avec les ions Fe(III). Lorsque l'hydroxamate se combine avec Fe(III), son groupe fonctionnel perd un proton du groupe hydroxylamine (-NOH) pour former un ligand bidenté. La bactérie *Bacillus megaterium* ATCC 19213 est connue pour produire deux sidérophores hydroxamates (schizokinène et N-désoxyshizokinène) dans des conditions limitées en Fe (**Timofeeva et al., 2022**).

Chaque groupe hydroxamate fournit deux atomes d'oxygène formant un ligand bidenté avec le fer, ce qui donne un complexe octaédrique hexadenté avec l'ion ferrique. La constante de liaison pour ces complexes se situe généralement entre 10^{22} et 10^{32} M^{-1} (**Vineeth et al., 2023**). Le premier groupe de ces sidérophores est le ferrichrome produit par le champignon *Ustilago sphaerogena*. D'autres sidérophores hydroxamates sont l'hydroxamate, la desferrioxamine B, E et G, l'aérobactine (portant en fait des groupes citrate et hydroxymate), et la ferribactine libérée par *Pseudomonas fluorescens* (**Khasheii et al., 2021**).

Il a été rapporté que des bactéries marines produisent des ensembles de sidérophores amphiphiles issus de différents genres de bactéries mais avec un groupe peptidique unique pour la coordination avec Fe(III), tels que les amphibactines et les marinobactines. *Vibrio* sp. R-10 produit des amphibactines ayant de longues appendices d'acides gras (C14 à C18) qui sont insaturés, saturés, hydroxylés, et un groupe peptidique court (Sarvepalli *et al.*, 2024).

III.6.2.2.2. Les Catécholates

Les sidérophores de type catécholate se lient à l'ion Fe(III) par des groupes hydroxyle ou catécholate. Lors de la chélation avec Fe(III), un complexe hexadenté-octaédrique est formé, avec deux atomes d'oxygène de chaque groupe catécholate impliqués. Tous les sidérophores de type catécholate sont des dérivés de l'acide salicylique ou de l'acide 2,3-dihydroxybenzoïque (2,3-DHBA) (Timofeeva *et al.*, 2022). Les catécholates se trouvent uniquement chez les bactéries (Khasheii *et al.*, 2021).

Le groupe hydroxyle du sidérophore coordonne avec Fe⁺³ pour former un complexe octaédrique hexadenté. La stabilité du complexe, la résistance au pH naturel et la lipophilicité sont des propriétés uniques des catécholates (Sarvepalli *et al.*, 2024).

Les principaux sidérophores catécholates incluent l'entérobactine, la bacillibactine et la vibriobactine. Le groupe catécholate des sidérophores forme également un complexe octaédrique hexadenté en prenant deux atomes d'oxygène pour chélater le fer (Khasheii *et al.*, 2021). D'autres incluent la bacillibactine, produite par différentes espèces de *Bacillus*, la aminochéline, l'azotochéline et la protochéline, produites par *Azotobacter vinelandii*. La bacillibactine et la protochéline sont des sidérophores tri-catécholate, tandis que l'azotochéline est un di-catécholate ; et la aminochéline est un sidérophore mono-catécholate (Soares, 2022).

III.6.2.2.3. Les Carboxylates

Les sidérophores de type carboxylate constituent une nouvelle classe qui n'est ni de type hydroxamate ni de type catécholate ; ils ont plutôt une structure carboxylique et sont produits à la fois par des bactéries et des champignons (Khasheii *et al.*, 2021). Ils se lient au Fe *via* des groupes carboxyle et hydroxyle. Ces sidérophores de type carboxylate n'ont pas été décrits dans la littérature pour les PGPR (Timofeeva *et al.*, 2022).

Quelques bactéries, comme le rhizobactin de *Rhizobium meliloti*, et certains champignons, tels que organismes appartenant à la famille des Mucorales de Zygomycota, possèdent des groupes carboxylate (Vineeth, *et al.*, 2023).

Le meilleur exemple de ce type de sidérophores est la structure de la rhizobactine, produite par les rhizobiums. Elle possède une structure d'acide éthylènediamine d-carboxylique et hydroxycarboxyl comme chélateur du fer. La staphyloferrine A est libérée par *Staphylococcus hyicus* et est un membre de cette famille ayant de la d-ornithine et deux acides citriques reliés par deux liaisons amides. À pH acide, les sidérophores carboxylate sont plus efficaces pour chélater le fer ferrique par rapport aux types catécholate et hydroxylate ; par conséquent, ils sont utiles pour les microorganismes vivant dans des environnements acides. Cependant, on prédit que les sidérophores carboxylate sont inhibés en compétition avec les sidérophores catécholate dans l'exploration du fer dans le sang et le sérum humains (Khasheii *et al.*, 2021)

III.6.2.2.4. Les sidérophores type mixtes

Les sidérophores mixtes sont caractérisés par la présence d'une combinaison de groupes hydroxy, carboxy et catécholates dans leur structure (Khasheii *et al.*, 2021; Soares, 2022; Vineeth *et al.*, 2023). Un exemple notable est le pétrobactine, un sidérophore d'acide α -hydroxy bis-catéchol produit par la bactérie marine dégradant le pétrole *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Il s'agit du premier rapport démontrant la caractérisation structurale et la photo-décarboxylation lors de la liaison des sidérophores au Fe^{+3} . La fraction citryle du pétrobactine se lie au fer et subit une décarboxylation rapide sous l'action de la lumière solaire et de l'eau de mer en surface, entraînant ainsi la décarboxylation des acides α -hydroxy et l'oxydation du ligand pétrobactine-fer (Sarvepalli *et al.*, 2024).

D'autres exemples incluent l'aérobactine, signalée chez des souches pathogènes d'*E. coli*, *Shigella flexneri* et *Klebsiella pneumoniae*, ainsi que l'yersiniabactine, qui présente une affinité modérée pour le fer et comprend des groupes phénolate, thiazole, oxazoline et carboxylate pour la liaison au fer (Khasheii *et al.*, 2021). Certaines espèces, comme *Rhosococcus erythropolis*, produisent l'hétérobactine (Vineeth *et al.*, 2023).

Les PVD appartiennent à la catégorie des types mixtes et constituent une famille de sidérophores, avec plus de cent identifiés. Ils se composent généralement d'un chromophore de type dihydroxyquinoléine, d'une séquence peptidique et d'une chaîne latérale acyle. Un exemple notable est PvdI, produit par *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15,692, qui présente un groupe catéchol et deux groupes hydroxamate (Soares, 2022).

III.6.3. La Pyoverdine

Les pyoverdines (PVD) sont des molécules fluorescentes produites par les bactéries du genre *Pseudomonas*. Connue également au cours des dernières décennies sous les noms de fluorescéines et de pseudobactines, elles ont été découvertes pour la première fois en 1892 (Dell'Anno *et al.*, 2022; Ghssein et Ezzeddine, 2022). Cependant, la compréhension de leurs fonctions biologiques dans le métabolisme microbien est restée inconnue jusqu'en 1978, année où Meyer et Abdallah ainsi que Meyer et Hornsperger ont dévoilé leur rôle dans l'acquisition du fer. Par conséquent, d'un point de vue fonctionnel, les PVD appartiennent à la classe des sidérophores (Dell'Anno *et al.*, 2022).

Actuellement, plus de 100 pyoverdines sécrétées par différentes souches et espèces de *Pseudomonas* ont été identifiées (David et Geoffroy, 2020 ; Ghssein et Ezzeddine, 2022), ce qui représente environ 20 % des sidérophores microbiens caractérisés (Ghssein et Ezzeddine, 2022). Les pseudomonades fluorescentes produisent les pyoverdines fluorescentes comme leurs principaux sidérophores. Ces chélateurs sont produits par les bactéries pour accéder au fer (Schalk *et al.*, 2020).

Plus de 60 PVD ont été décrits parmi les espèces de *Pseudomonas*, y compris *Pseudomonas fluorescens* SBW25, qui favorise la croissance des plantes, le pathogène végétal *Pseudomonas syringae*, et le pathogène humain *Pseudomonas aeruginosa* (Liu *et al.*, 2021). La pyoverdine est synthétisée *via* la synthèse peptidique non ribosomique, impliquant une série d'enzymes plutôt qu'un code génétique spécifique. Elle se compose de trois parties : un chromophore conservé, un squelette peptidique variable de 6 à 12 acides aminés, et une chaîne latérale variable. Bien qu'une seule souche produise généralement des pyoverdines avec le même squelette peptidique, la variabilité apparaît au niveau de la communauté, avec des souches produisant différents types de pyoverdine (Kümmerli, 2023).

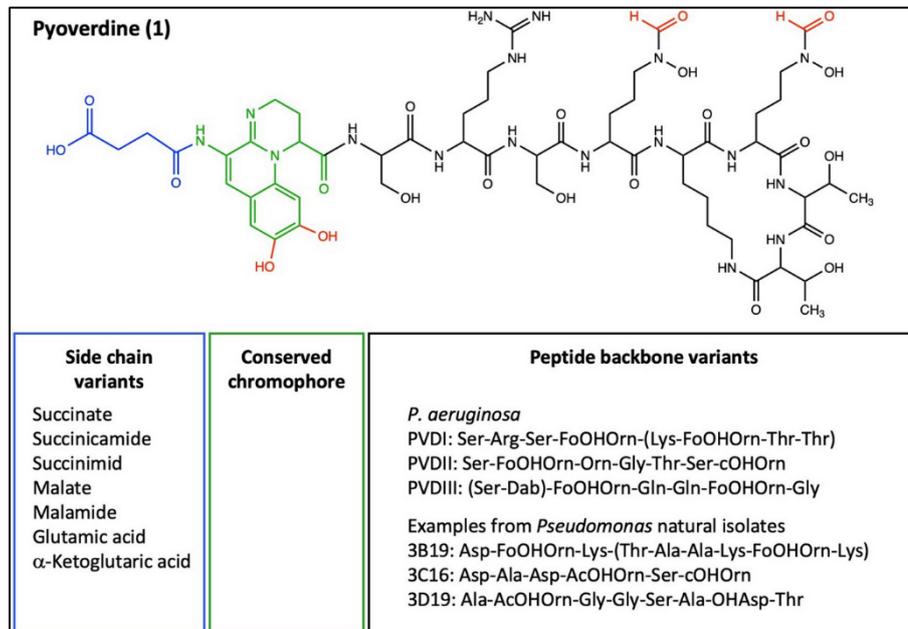


Figure 5 : Pyoverdine et sa diversité structurale chez *Pseudomonas* sp. (Kümmerli, 2023).

III.6.4. Pyoverdines et la chélation des métaux lourds

Les sidérophores ont la capacité de modifier le degré d'oxydation de divers métaux lourds, tels que le Cd, le Cu, le Ni, le Pb, le Zn, ainsi que le Th, l'U et le Pu, les rendant ainsi moins toxiques (Galyamova et Sedykh, 2022). Ils se lient également à d'autres métaux toxiques comme le Cr, le V et l'Al, ainsi qu'au Cd, au Ni, à l'As (III, V), au Mg, au Zn, au Cu, au Co et au Sr (Gupta et al., 2023).

En raison de leur capacité de liaison supérieure au fer par rapport aux autres métaux lourds, les sidérophores présentent un intérêt particulier dans la promotion de la croissance des plantes soumises à un stress métallique (Galyamova et Sedykh, 2022). Par exemple, la pyoverdine, un type de sidérophore, produit par la souche bactérienne *P. fluorescence*, augmente la mobilité et réduit la toxicité des métaux lourds dans les mines d'uranium (Timofeeva et al., 2022).

De plus, la production de sidérophores par des bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* contribue à réduire la toxicité de l'aluminium (Inobeme et al., 2023). La souche de laboratoire *P. aeruginosa* PAO1 et l'isolat naturel *Pseudomonas* sp. 1502IPR-01 ont amélioré la nutrition en fer et la biomasse des arachides en monoculture dans un sol normal. En revanche, une souche mutante déficiente en sidérophore n'a eu aucun effet bénéfique sur les plantes, soulignant le rôle crucial de la pyoverdine dans l'amélioration de la nutrition en fer des

arachides. Des résultats similaires ont été observés chez le maïs, montrant une régulation à la baisse du phytosidérophore en présence de *Pseudomonas* sp. 1502IPR-01 ou de sa pyoverdine, ce qui suggère un lien direct entre la pyoverdine et le métabolisme du fer des plantes (**Wang et al., 2024**).

Chez les Streptomycètes, la production de sidérophores stimule non seulement l'absorption du fer, mais diminue également l'absorption du cadmium, ce qui contribue à la résistance des plantes à la toxicité des métaux (**Inobeme et al., 2023**). En outre, la sécrétion de PVD par des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* augmente la résistance de la souche au Cd(II) (**Soares, 2022 ; Mei et al., 2024**). Ces résultats montrent que les sidérophores jouent un rôle crucial dans la régulation de la biodisponibilité des métaux lourds dans le sol, contribuant ainsi à la croissance et à la santé des plantes (**Timofeeva et al., 2022**).

Matériel et méthodes

IV.1. Zone d'étude

IV.1.1. Choix de la zone d'étude

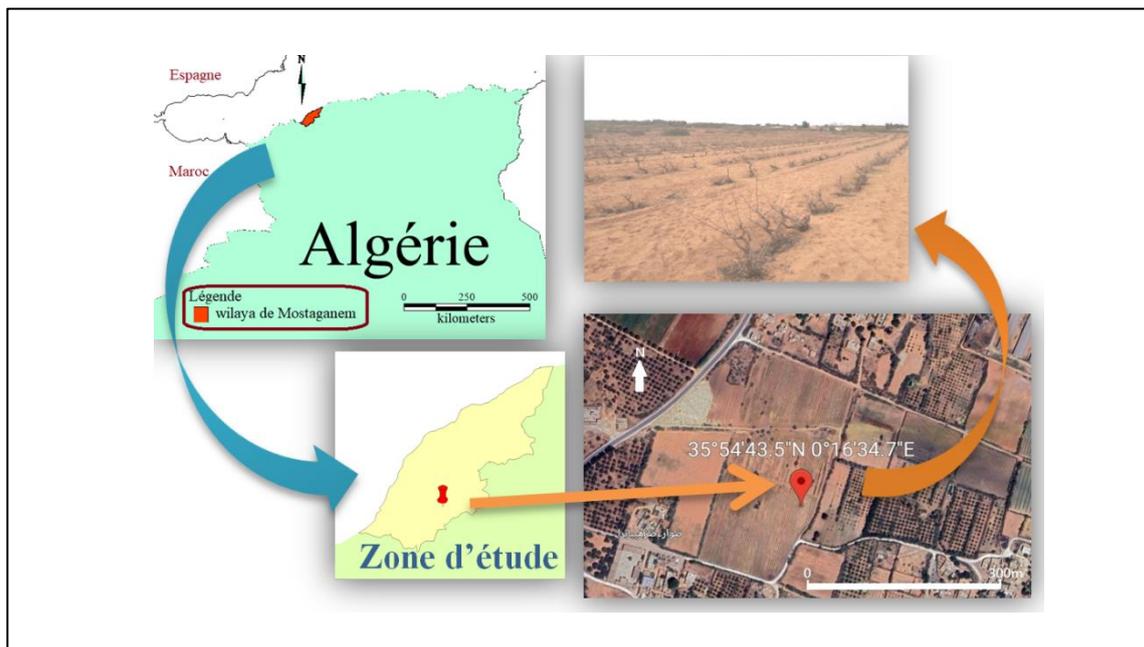
Dans le cadre de notre enquête sur les zones polluées par les métaux lourds, nous nous sommes dirigés vers la région de Sour, dans la wilaya de Mostaganem. Cette zone est reconnue pour sa culture de la vigne, pratiquée depuis des décennies, où l'utilisation de pesticides à base de cuivre est fréquente.

IV.1.2. Localisation géographique et caractéristique

La zone d'étude se trouve à Mostaganem, dans la région nord-ouest de l'Algérie. Les coordonnées géographiques du site d'échantillonnage (Figure 6) sont situées à une latitude de $35^{\circ}54'42.53''$ N et à une longitude de $0^{\circ}16'34.94''$ E. La Figure 6 fournit une représentation visuelle de l'emplacement précis du site d'échantillonnage.

IV.1.3 Echantillonnage

L'échantillonnage des sols a été réalisé avec une méthode rigoureuse pour assurer la représentativité des échantillons prélevés.



Images ©2024 Airbus, Images ©2024 Airbus, CNES / Airbus, Maxar Technologies, Données cartographiques ©2024

Figure 6 : Localisation du site d'échantillonnage à Sour (Mostaganem - Algérie) disponible sur Google Maps: <https://www.google.com/maps>

IV.1. 4. Prélèvement

Les échantillons de sol ont été collectés à des profondeurs de 20 et 40 cm dans des sacs de prélèvement stériles, avec cinq prélèvements respectifs (Figure 7) effectués lors des collectes de prélèvement en novembre 2020 et mars 2021, et ce processus a été répété trois fois. Cette approche méthodique visait à réduire l'hétérogénéité horizontale de l'échantillon.

Une fois arrivés au laboratoire, les échantillons de sol destinés aux analyses physico-chimiques et microbiologique sont été traités dans les plus brefs délais après leur prélèvement, après avoir été débarrassés de la végétation, des pierres et des impuretés. Par la suite, les échantillons de sol ont été étalés afin de faciliter l'opération de tamisage.

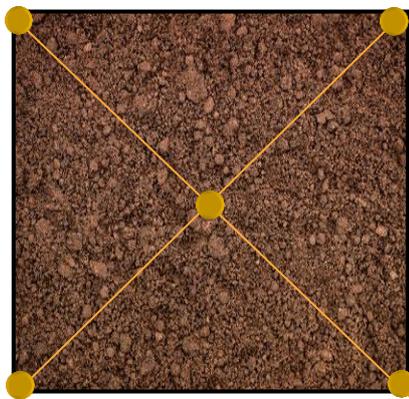


Figure 7 : Mode de prélèvement des Échantillons de Sol

IV.1.2. Préparations des échantillons avant l'analyse (AFNOR NF X 31-427)

IV.1.2.1. Quartage

Les échantillons sont soumis à un quartage pour réduire leur volume tout en préservant leur représentativité. Chaque échantillon de sol est divisé en quatre parties égales, dont seule la moitié est conservée en réunissant deux quarts opposés. Cette sélection est ensuite homogénéisée, et un nouveau quartage est effectué, ce processus étant répété trois fois. Ainsi, un échantillon représentatif du matériau initial est obtenu, conformément à la méthode de **Pauwels et al. (1992)**.

IV.1.3. Analyse granulométrique des sols (AFNOR NF X31-107)

L'analyse granulométrique vise à évaluer la répartition des tailles de particules. Le protocole combine deux méthodes : un fractionnement sec jusqu'à 80 μm , suivi d'une séparation gravimétrique jusqu'à 2 μm par sédimentation selon la loi de Stoke. Cette approche permet de

classifier les particules en fonction de leur diamètre de la manière suivante et en prenons en considération la classification des sols (tableau 2) (Kébir, 2012).

Tableau 2 : Types de sols selon la classification USCS/LCPC(Kebir, 2012)

Classe	Définition	Caractéristique
A	Sols fins	$D_{max} \leq 50\text{mm}$ et passant à $80 \mu\text{m} > 35\%$
B	Sols sablonneux et graveleux avec sols fins	$D_{max} \leq 50 \text{ mm}$ et passant à $80 \mu\text{m} \leq 35\%$
C	Sols à éléments fins et gros	$D_{max} > 50 \text{ mm}$ et passant à $80 \mu\text{m} \leq 35\%$
D	Sols insensibles à l'eau avec sols fins	Voir la norme NF P 11-300
R	Matériaux rocheux	Voir la norme NF P 11-300

D_{max} : Diamètre pour lequel 95% des grains du sol sont plus petits

IV.1.4. Analyse granulométrique par tamisage (AFNOR NF X31-101)

Cette méthode implique le passage de l'échantillon à travers des tamis de différentes tailles, permettant ainsi de mesurer le poids du sol retenu sur chaque tamis. Ces résultats sont ensuite utilisés pour calculer le pourcentage de particules de sol dans différentes plages de tailles, offrant des informations essentielles sur la texture du sol et son impact sur la fertilité et la croissance des plantes.

Le principe de cette manipulation consiste à prélever un échantillon de sol séché à 105°C pendant 24h et à le verser dans une colonne de tamis disposés par ordre croissant d'ouvertures de bas en haut (figure 8). Selon Kebir (2012) le calcul des pourcentages plus fins (retenus) se fait selon la formule indiquée dans le tableau 3.



Figure 8 : Dispositif expérimental de la granulométrie par tamisage

Tableau 3 : Calcul des pourcentages plus fins (retenus) (**Kebir, 2012**).

Taille du tamis	Ouverture du tamis (mm)	Mass e de tamis (g)M1	Retaine d soil + Pan (g)M2	Masse de sol (g) $R_i = M_2 - M_1$	% retenu(%) $R_n = (R_i / M) \times 100$	%cumulére tenu (%)C	% plus fin (%) $100 - C$
#13	1,5	s ₁	s ₁ '	m ₁	$(m_1/M) \times 100$	R _{n1}	F1
#15	1,3	s ₂	s ₂ '	m ₂	$(m_2/M) \times 100$	R _{n1} +R _{n2}	F2
#18	1	s ₃	s ₃ '	m ₃	$(m_3/M) \times 100$	R _{n1} +R _{n2} +R _{n3}	F3
#28	0,65	s ₄	s ₄ '	m ₄	$(m_4/M) \times 100$	F4
#35	0,5	s ₅	s ₅ '	m ₅	$(m_5/M) \times 100$	F5
#80	0,18	s ₆	s ₆ '	m ₆	$(m_6/M) \times 100$	F6
#100	0,15	s ₇	s ₇ '	m ₇	$(m_7/M) \times 100$	F7
#150	0,1	s ₈	s ₈ '	m ₈	$(m_8/M) \times 100$	F8
#250	0,058	s ₉	s ₉ '	m ₉	$(m_9/M) \times 100$	F9
#270	0,053	s ₁₀	s ₁₀ '	m ₁₀	$(m_{10}/M) \times 100$	F10
Bac de réception <0.053		s ₁₁	s ₁₁ '	m ₁₁	$(m_{11}/M) \times 100$	F11
M=1000mg							

IV.1.3. Analyse granulométrique par sédimentation (AFNOR NF X31-107 (1983))

La sédimentation permet d'obtenir la portion d'échantillon avec une granulométrie inférieure à 80 µm après la mesure finale de la méthode du tamis (**Kebir, 2012**) utilisant un dispositif à la pipette Robinson (figure 9). Cette analyse a été réalisée au laboratoire INSID situé à Relizane (El Matmar).



Figure 9 : Dispositif de Pipette de Robinson (Laboratoire INSID - Relizane ‘El Matmar’)

IV.1.4. Analyse physico-chimique du sol

IV.1.4.1. Détermination de l'humidité résiduelle (AFNOR NF X 31-102 (1992))

L'humidité résiduelle est définie comme la masse perdue après séchage à 105°C d'un échantillon pendant 24 heures. Sa mesure sert à déterminer la masse sèche d'un échantillon de sol. L'humidité résiduelle H est exprimée en pourcentage massique et est calculée par la formule suivante :

$$H = \left[\frac{(m_0 - m_1)}{m_0} \times 100 \right]$$

m_0 : étant le poids initial de l'échantillon.

m_1 : est le poids sec de l'échantillon

IV.1.4.2. Détermination du pH

Les valeurs de pH ont été obtenues à partir de la norme NF X 31-103(1992), dont le principe est la mise en équilibre ionique d'une certaine masse de solide avec un volume donné d'eau déminéralisée. Le ratio de la masse de l'échantillon sur la masse d'eau, 10 g de sol sont mis en suspension dans 50 mL d'eau distillée (méthode du 1/5), après avoir agité les échantillons sur une plaque d'agitation pendant 1 heure et laissé reposer pendant 2 heures, les valeurs ont été mesurées à l'aide d'un pH-mètre.

IV.1.4.3. Détermination de la conductivité électrique (NF X 31-113)

La conductivité électrique (CE) du sol est essentiellement liée à la quantité des ions présents dans l'eau interstitielle, de leur charge et de leur mobilité électrique. La mesure CE réalisée en homogénéisant 10g de sol dans 50 ml d'eau distillée dans un agitateur pendant 30 min. L'extrait obtenu après 1 heure de repos est mesuré par un conductimètre. Les résultats sont exprimés en dS/cm.

IV.1.4.4. Détermination de la matière organique

La méthode choisie pour déterminer le carbone organique total est la méthode d'Anne décrite par **Aubert, (1978)**. Cette méthode consiste à utiliser un oxydant robuste : le bichromate de potassium en milieu sulfurique jusqu'au dégagement de CO₂. L'excès de bichromate est titré par une solution de sulfate de fer ammoniacal (sel de Mohr) en présence d'un indicateur coloré (diphénylamine) et de Fluorure de Sodium NaF. La teneur en carbone organique est exprimée en pourcentage de la matière organique totale du sol.

La teneur en carbone organique est exprimée en % (g en % de terre fine séchée à l'air) en trois répétitions ; pour passer du pourcentage de carbone organique au pourcentage de matière organique totale, on multiplie par le coefficient 1,72 (**Belabed, 2018**).

IV.2. Analyses microbiologiques

IV.2.1. Prélèvement des échantillons

Des échantillons de racines de vignes (*Vitis vinifera L.*) et de la moutarde des champs (*Sinapisarvensis L.*) (rhizoplane et rhizosphère) ont été collectés dans des sacs de prélèvement stérile et transportés au laboratoire. L'échantillonnage a été effectué en mois de Novembre 2020 et Mars 2021 respectivement. Les conditions microbiologiques d'asepsie ont été strictement respectées.

IV.2.2. Isolement des bactéries résistantes aux métaux lourds

Dix g de sol ont été dilués dans 90 mL d'eau physiologique stérile après une agitation continue pendant 15 min, une série de dilutions décimales a été réalisée 0,1 mL des dilutions décimales sont étalées sur la surface des boîtes de Petri contenant une gélose **KingB** additionnée 100µM de sulfate de cuivre, de nitrate et de plomb (**Naik et Dubey, 2011**). Incubées à une température de 30 °C pendant un intervalle de temps de 24 à 48heures (**Nautiyal et Das Gupta, 2007**). Le milieu King B a été sélectionné et utilisé dans le cadre du criblage des bactéries productrices de chélateurs.

IV.2.3. Identification phénotypique

IV.2.3.1. Examen macroscopique

La morphologie des colonies ainsi que la production de pigments ont été examinées sur milieu King B après incubation à 30°C pendant 24 heures. Ce milieu est spécifiquement utilisé pour favoriser la production de pigments fluorescents par *Pseudomonas* (**Sawada et al., 2022**).

IV.2.3.2. Examen microscopique

La coloration de Gram a été réalisée pour déterminer le type de Gram, la taille des cellules et leur arrangement. De plus, la mobilité les agrégats de cellules bactériennes ont été examinés à l'état frais (**Tripathi et Sapra, 2021**).

IV.2.3.3. Examen Biochimique

Pour obtenir une orientation vers le genre *Pseudomonas* en cours de screening, une identification biochimique par la galerie API 20NE (système standardisé d'identification des bacilles à Gram négatifs) a été réalisée. Vingt microtubes contenant des substrats déshydratés ont été inoculés avec une suspension bactérienne ajustée à une densité de 0,5 Mc Farland pour reconstituer le milieu ou l'inoculum. Les réactions produites pendant la période d'incubation donnent lieu à des changements de couleur spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimal et les bactéries ne se développent que si elles peuvent utiliser le substrat correspondant (**Delarras, 2014**). Le test d'oxydase est le 21^{ème} test d'identification à réaliser en dehors de la galerie et selon les recommandations Biomerieux S.A (France). La lecture et l'identification du profil numérique est obtenue en utilisant le Catalogue Analytique API 20NE.

IV.2.4. Identification génétique des isolats de *Pseudomonas*

L'identification génétique des quelques isolats de *Pseudomonas*, ayant montré une production de sidérophores plus élevée, a été réalisée en extrayant l'ADN total selon le protocole fourni par Macherey-Nagel. Le gène entier de l'ARNr 16S de ces isolats a été amplifié en utilisant des amorces universelles : l'amorce de départ (amorce avant) 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' et l'amorce de fin (amorce inverse) 5' TACGGYACCTTGTTACGACTT 3'. Après amplification, les gènes de l'ARNr 16S ont été purifiés et séquencés en utilisant la technique de terminaison de chaîne enzymatique avec le kit BigDye v3.1 d'Applied Biosystems. Les séquences nucléotidiques obtenues ont ensuite été alignées avec les séquences du gène de l'ARNr 16S de Pseudomonad dans la base de données GenBank ([//www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Ces séquences ont été soumises à une comparaison avec celles de la base de données GenBank en utilisant le programme NCBI BLAST et EZbiocloud. Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant le logiciel MEGA version 11 et en appliquant la méthode Neighbor-Joining.

IV.2.5. Conservation des isolats

Les isolats purifiés ont été conservés sur gélose nutritive inclinée à 4 °C et dans des tubes Eppendorf contenant du BN additionné de glycérol stérile à -20 °C pour une conservation à long terme.

IV.2.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des métaux lourds

IV.2.6.1. Par Macrodilution

Pour déterminer la capacité de résistance des bactéries isolées, les isolats bactériens ont été cultivés dans un milieu de bouillon de Mueller Hinton stérile supplémenté avec différentes concentrations de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) (2,5- 5- 7.5 -10mM) et incubés pendant 24 heures à 30°C à 120 rpm (Adhami *et al.*, 2017). La croissance microbienne a été enregistrée avec un spectrophotomètre UV-Visible à 620 nm. La dilution la plus élevée sans croissance est considérée comme la CMI.

IV.2.6.2. Méthode de microdilution

Des microplaques stériles à 96 puits ont été utilisées. A l'aide d'une micropipette, 100 µl de bouillon de Mueller Hinton stérile ont été ajoutés à tous les puits de la microplaque. 100 µl de solution de métaux lourds avec des concentrations différentes (6, 8, 10, 12,14 et 16 mM) ont été ajoutés aux puits de la microplaque. 10 µl de suspension bactérienne DO_{620} (0.08-0.1) de chaque isolat ont été ajoutés. La microplaque a été incubée à 30°C et la croissance des isolats a été contrôlée toutes les 24 heures (Adhami *et al.*, 2017). La viabilité des cellules a été déterminée à l'aide du TTC (chlorure de triphényltétrazolium), préparé à 0,4 mg/ml dans de l'eau distillée stérile et filtré par un filtre millipores 0.22µm. 40 ul de cette solution ont été ajoutés à chaque puits. Les plaques ont été réincubées à 30°C pendant environ 10 à 30 minutes, le TTC montre la viabilité cellulaire par l'apparition d'une couleur rouge (Varma *et al.*, 2021).

IV.2.7. Évaluation des Paramètres des PGP *in vitro*

IV.2.7.1. Solubilisation du phosphate

IV.2.7.1.1. Evaluation qualitative de la solubilisation des phosphates

La solubilisation bactérienne du phosphate a été évaluée sur la gélose de Pikovskaya contenant du phosphate tricalcique(Ca_3PO_4)₂) en tant que source de phosphate. Toutes les bactéries ont été inoculées individuellement dans des boîtes, et incubées à 30°C pendant 4 à 7

jours. L'activité de la solubilisation a été évaluée qualitativement par la formation de halos claires autour des colonies (Mehta et Nautiyal, 2001). La formation de telles zones indique une capacité de solubilisation des phosphates par les bactéries, ce qui serait un indicateur significatif de leur potentiel pour la libération de phosphore dans le sol.

IV.2.7.1.2. Evaluation quantitative de la solubilisation des phosphates

Le milieu liquide NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate growth medium) a été utilisé pour l'évaluation quantitative de la solubilisation des phosphates. 50 mL de milieu NBRIP ont été inoculés avec 1 ml de suspension bactérienne de chaque isolat ($OD_{620} = 0,08-0,1$). Après une période de 7 jours à 30°C dans un incubateur agité à 180 tr/min, 5 ml de chaque culture ont été centrifugés à 4000 tr/min pendant 30 minutes pour déterminer la teneur en phosphate soluble dans le surnageant en utilisant la méthode spectrophotométrique au vanadate-molybdate (Hamoum *et al.*, 2015).

Un millilitre du surnageant a été mélangé avec 2,5 ml du réactif de Barton dans un flacon de 50 ml, et le volume a ensuite été complété à 50 ml avec de l'eau distillée. Après 10 minutes, la densité optique a été mesurée à 430 nm (spectrophotomètre SPECORD 210 Plus analytique). Le phosphore soluble a été calculé en utilisant l'équation de régression basée sur la courbe d'étalonnage.

IV.2.7.2. Production d'acide indole acétique (AIA)

La capacité des différentes bactéries étudiées à produire de l'acide indole-3-acétique (AIA) a été évaluée dans un bouillon nutritif. Plus précisément, 50 ml de milieu de bouillon nutritif (NB) contenant 0,01 % de D-tryptophane ont été inoculés avec 1 ml de suspension bactérienne ($OD_{620} = 0,08$), conformément au protocole décrit par Kesaulya *et al.* en 2015. Cette inoculation a été réalisée à la fois en l'absence et en présence de 5 mM de $CuSO_4$. Ensuite, les cultures ont été incubées pendant une période de 4 jours à 30°C, à l'abri de la lumière, et agitées à 180 tr/min.

Après la période d'incubation, les cultures bactériennes ont été centrifugées à 4000 tr/min pendant 30 minutes afin de séparer les cellules bactériennes du liquide. Ensuite, 1 ml du surnageant obtenu a été mélangé avec 4 ml du réactif de Salkowski. La formation de Tris-libérés par les bactéries ont été quantifiés à l'aide de l'équation de régression de la courbe d'étalonnage (Bouquet *et al.*, 2020).

IV.2.7.3. Production d'acide cyanhydrique (HCN)

Les isolats bactériens ont été ensemencés sur des boîtes de gélose nutritive contenant 4,4 g/L de glycine, un acide aminé essentiel dans la synthèse de l'HCN. Pour mesurer la production d'HCN, une approche indirecte a été utilisée. Dans chaque boîte de Petri, un filtre Whatman No. 1 a été imprégné avec une solution de 0,5 % d'acide picrique dissous dans une solution de carbonate de sodium à 2 %. Ce filtre a été soigneusement placé à l'intérieur du couvercle de la boîte de Petri. Les boîtes de culture ont ensuite été hermétiquement scellées avec du parafilm pour éviter la fuite d'HCN gazeux. Les boîtes, y compris les boîtes témoins, ont été incubées à une température de 28 ± 2 °C pendant une période de 4 jours. Au cours de cette période, les bactéries inoculées ont eu l'opportunité de produire de l'HCN. La présence d'HCN dans l'atmosphère de la boîte entraînait un changement de couleur du filtre imbibé, passant du jaune à l'orange (Ponmurugan *et al.*, 2011).

IV.2.7.4. Production d'ammoniac

Dans le contexte de l'étude du rôle des isolats bactériens dans la transformation de l'azote environnemental, nous avons évalué leur capacité à produire de l'ammoniac en suivant le protocole de Cappuccino et Sherman (1992). Les cultures bactériennes cultivées ont été inoculées dans 10 mL de bouillon de peptone et incubées à 30°C pendant 48 heures sur un incubateur agité à 120 tr/min. 0,5 mL du réactif de Nessler ont été ajoutées aux échantillons.

La formation d'une couleur allant du jaune pâle au brun foncé indiquait la production d'ammoniac (Dey *et al.*, 2004). Cette méthode joue un rôle essentiel dans la caractérisation des capacités des isolats bactériens à convertir des composés d'azote organique en ammoniac. La production d'ammoniac par les bactéries est un processus biologique clé qui contribue au cycle de l'azote dans les sols.

IV.2.7.5. La production qualitative des sidérophores

La production des sidérophores par les isolats bactériens a été détectée selon la méthode de Schwyn et Neilands (1987). Les bactéries ont été étalées sur un milieu gélosé CAS (Chrome Azurol S). Les boîtes de culture ont ensuite été incubées dans l'obscurité à une température de 30 °C pendant 5 jours. La formation d'un halo jaune-orange autour de la colonie bactérienne a été interprétée comme une réaction positive indiquant la production de sidérophores (Kamaruzzaman *et al.*, 2020).

IV.2.7.5.1. Évaluation quantitative de la production de sidérophores

La production de sidérophores par les isolats de *Pseudomonas* a été évaluée de manière quantitative dans un milieu liquide selon le protocole décrit par **Schwyn et Neilands (1987)**. La croissance bactérienne et la production de sidérophores ont été réalisées dans un flacon de 500 mL contenant 100 mL de milieu au succinate. Les isolats ont été cultivés de manière indépendante dans le milieu au succinate à une température de 30 °C sous agitation à 120 tr/min pendant 48 heures. Après la période d'incubation, la densité cellulaire a été mesurée à une longueur d'onde de 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. La détection et l'estimation des sidérophores ont été effectuées après centrifugation (pendant 20 minutes à 4 000 g × cm) et analyse d'un surnageant exempt de cellules pour y détecter la présence de sidérophores en utilisant le test au Chrome Azurol S (CAS).

La teneur en sidérophores a été exprimée en pourcentage d'unités de sidérophores à l'aide de la formule suivante :

Pourcentage d'unité de sidérophore = $Ar - As / Ar \times 100$:

Ar = absorbance de référence à 630 nm (réactif CAS)

As = absorbance de l'échantillon à 630 nm (**Kejelaet al., 2017**).

IV.2.7.5.2. Extraction des siderophores

Au bout de 48 heures, 1 000 mL de milieu succinate inoculé ont été centrifugés (4 000 g cm pendant 20 minutes) et le pH du surnageant acellulaire a été ajusté à 2,0 avec du HCl 6 M et maintenu pendant une nuit à 4 ° C. Celui-ci a été extrait avec de l'acétate d'éthyle (v/v) (Schwyn et Neilands 1987). nous l'avons soigneusement agité pour permettre l'extraction des sidérophores dans la phase organique. L'extrait acétate a ensuite été évaporé à l'aide d'un rotavapeur.

IV.2.7.5.3. La purification du sidérophore

Les sidérophores extraits ont été purifiés en utilisant de la résine XAD-4 dans une colonne d'adsorption. La colonne a été préparée en suspendant environ 30 g de XAD-4 dans de l'eau déionisée (dH₂O) et en laissant le mélange reposer à température ambiante toute la nuit pour permettre au matériau d'absorber toute l'eau. Après avoir rempli la colonne avec le XAD-4 préparé, elle a été équilibrée avec des volumes de lit de dH₂O jusqu'à ce qu'une conductivité de 2 µS cm⁻¹ soit obtenue. Ensuite, la colonne a été chargée avec l'extrait brut des sidérophores. La colonne est ensuite éluée avec environ 250 mL de méthanol, et il est recommandé de

recueillir cinq fractions de 50 mL à chaque fois. La purification du sidérophore a été confirmée à chaque étape en utilisant le test liquide CAS (Nithyapriya *et al.*, 2021).

IV.2.7.5.4. Caractérisation du sidérophore par FT-IR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) est une technique puissante pour caractériser les siderophores en révélant leur composition chimique à travers l'identification des groupes fonctionnels spécifiques. La fraction purifiée du sidérophore a été collectée et préparée pour la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR) dans la plage de 4000 à 400 cm^{-1} . Les longueurs d'onde du spectre infrarouge ont été déterminées en fonction de leurs groupes fonctionnel ses spectres obtenus ont été traités par le logiciel JASCO SPECTRA Manager II software.

IV.2.8. Prélèvement et préparation du sol contaminé par le cuivre

Nous avons prélevé des échantillons de sol en surface dans la zone côtière de Cap Ivi Abdelmalek Ramdane, située à Mostaganem. Ces échantillons ont été collectés dans la plage, à une profondeur de 0 à 30 cm, et tamisés à travers un tamis de 2 mm pour éliminer tout débris ou pierres indésirables. Le sol a été enrichi artificiellement avec une concentration élevée de CuSO_4 , atteignant 50 00 mg/kg. Pour assurer une répartition uniforme du cuivre, le sol a été agité en continu sur un agitateur orbital rotatif pendant 3 jours. Ensuite, il a été étalé sur des plateaux pour être séché à l'air après un vieillissement de 45 jours.

IV.2.9. Lavage du sol selon batch processing

Chaque échantillon de sol préalablement contaminé par le cuivre (10 g) a été soumis à un processus de lavage individuel. Trois agents de lavage distincts ont été utilisés : le sidérophore, l'EDTA (un chélateur chimique à une concentration de 0,01 M) et l'acide citrique (CA, un chélateur organique, à une concentration de 0,01 M).

De plus, un échantillon de contrôle a été traité avec de l'eau distillée pour servir de référence. Le pH de toutes les solutions de lavage a été ajusté à 7. Les expériences de lavage ont été réalisées en utilisant des flacons en verre de 250 ml, fermés hermétiquement, placés sur un agitateur mécanique et ont été agitées à une vitesse de 180 rpm. Après 24 heures, le surnageant a été séparé des particules de sol par centrifugation à 4 000 rpm pendant 15 minutes, puis analysé pour déterminer leur teneur en métaux lourds à l'aide du spectromètre de fluorescence-X XEPOS P. L'équation suivante a été utilisée pour calculer le pourcentage d'élimination des métaux lourds de la solution :

$$\% \text{ Adsorption} = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100$$

C₀ est la concentration initiale de métal lourd,

C_e est la concentration finale de métal lourd (Mahmoud et al., 2015; Zhao et al., 2019).

IV.3. Impact de l'inoculation de PGPR sur la croissance du blé tendre en conditions de stress métallique : Etude *in vivo*

IV.3.1. Matériel végétal

Les grains de blé tendre *Triticum aestivum* L. de la variété SERI 82-Bread wheat utilisées dans cette expérience ont été fournies par le Centre international de recherche sur le blé et le maïs (CIMMYT), situé à Eskisehir en Turquie.

IV.3.2. Les souches bactériennes

Les souches utilisées dans cette étude ont été préalablement sélectionnés parmi ceux recueillis lors de la première étape de notre recherche. Leur choix s'est fondé sur leur capacité avérée à produire des sidérophores ainsi que sur leurs activités favorisant la croissance des plantes. Nous avons retenu quatre souches (PO22, R2P30, PS11, PO29) considérées dans cette recherche comme les meilleurs PGPR.

IV.3.3. La désinfection des grains

La désinfection des grains de blé a été réalisée en les immergeant dans une solution d'éthanol à 70% pendant 2 minutes, suivie d'un trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 10 minutes. Les grains ont ensuite été soigneusement rincés à plusieurs reprises avec de l'eau distillée stérile (Hamoum *et al.*, 2015).

IV.3.4. Préparation de l'inoculum bactérien et enrobage des grains

Les souches bactériennes ont été récupérées du stock de glycérol et ensemencées sur de l'agar King B à 30 °C pendant 24 heures. Chaque souche été transférée dans un bouillon nutritif et incubée sous agitation constante à 150 tr/min pendant 48 heures à 30 °C. Les cultures ont été ensuite centrifugées à 6 000 tr/min pendant 5 minutes et le culot résultant de chaque souche a été mis en suspension dans une solution stérile de carboxyméthylcellulose (CMC) à 1 %, atteignant une concentration de 10^8 UFC/mL. Cette méthode, qui consiste à appliquer un ingrédient actif tel qu'un inoculum bactérien à la surface de la graine à l'aide d'une substance liante, a été adoptée. Les grains désinfectés ont ensuite été soigneusement enrobés de cellules bactériennes homogénéisées contenant de la CMC, agitées pendant 1 heure à 30 °C, puis séchées à l'air pendant une nuit dans des conditions aseptiques sous un flux laminaire. Les grains non inoculées, recouvertes d'une solution stérile de CMC, ont été utilisées comme contrôle négatif (Tsegaye *et al.*, 2022; Saadaoui *et al.*, 2022).



Figure 10 : Les grains de blé enrobés de CMC contenant des cellules bactériennes ^a; Séchage des grains dans un flux d'air laminaire^b.

IV.3.5. Interaction bactérie-graine (effet PGPR *in vivo*)

IV.3.5.1. Effet de l'inoculation bactérienne sur la germination des grains sous stress métallique

Dix grains inoculés, ainsi qu'un témoin non inoculé, ont été placés dans des boîtes de Pétri contenant du papier filtre stérile imprégné d'eau distillée stérile et de solutions de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) à des concentrations de 50 et 100 ppm. Les boîtes de Petri ont ensuite été incubées à une température de 28°C pendant 12 jours. Pour évaluer l'impact du stress métallique sur la germination du blé, cette expérience a été réalisée avec quatre souches PGPR différentes (PO22, R2P30, PS11, PO29), ainsi qu'avec le consortium (la combinaison de ces quatre souches bactériennes) afin d'étudier leur effet synergique sur la tolérance au stress métallique chez les grains de blé. Divers paramètres tels que le taux de germination, le taux de germination relatif, l'indice de tolérance, et la longueur des coléorhizes ont été étudiés.



Figure 11 : Germination des grains sous des conditions de stress.

IV.3.5.2. Effet de l'inoculation bactérienne sur la croissance des plantes de blé sous stress métallique :

Une seule graine pré-germée a été plantée à une profondeur de 1 cm sous la surface du sol dans chaque tube en plastique (16 cm de hauteur x 2,5 cm de diamètre) rempli d'un mélange de sable stérilisé (4 cycle de 3h à 121°C), de terre de champ et de fumier organique (50:40:10, v/v/v). Les tubes ont été répartis en trois séries distinctes, désignées C0= 0 ppm, C1= 200 ppm et C2= 500 ppm. Chaque série a été inoculée avec cinq souches bactériennes différentes, avec un groupe témoin non inoculé. Chaque configuration a été reproduite six fois pour assurer la fiabilité des résultats.



Figure 12 : Plantation de jeunes plants

IV.3.5.2.1. Inoculation des plants de et blé conditions de culture :

Les plantules ont été inoculées avec 10 ml de suspension bactérienne, tandis que les pots témoins ont été irrigués avec de l'eau distillée stérile. Une ré-inoculation a été effectuée après 15 jours. Les plantes ont été arrosées toutes les deux semaines avec 10 ml de solution Hoagland dilué à 1/10. Les plantes ont été cultivées dans une chambre de croissance avec une photopériode artificielle de 16 heures, maintenue à une température de 25 °C et une humidité relative de 70 %. Après 6 semaines, les plants ont été récoltés.

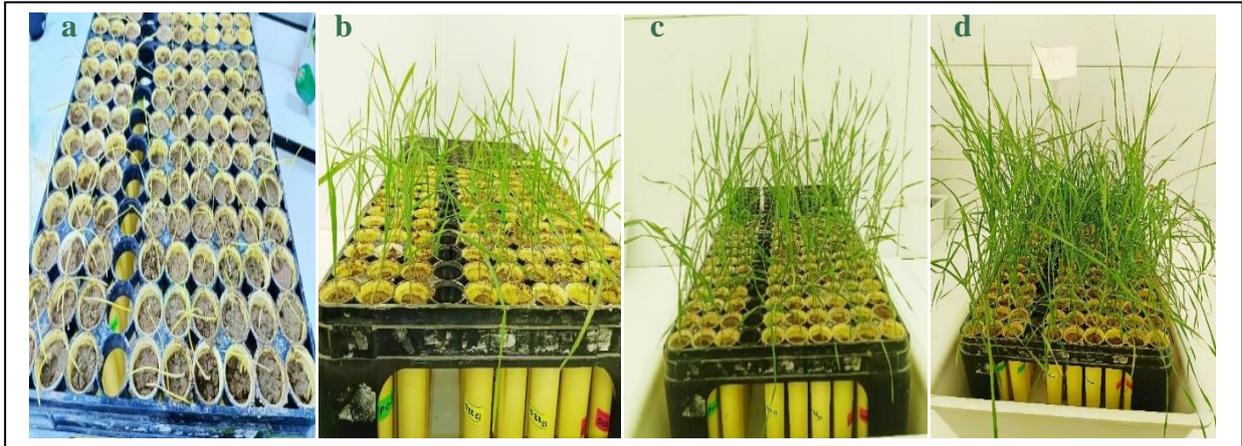


Figure 13 : Cultivation de plants de blé dans une chambre de culture : 1 semaine ^a ; 2 semaines ^b ; 3 semaines ^c ; 4 semaines ^d.

IV.3.5.3. Paramètres physiologiques

IV.3.5.3.1. Test de fuite d'électrolyte

Le test de fuite d'électrolyte a permis de mesurer les ions inorganiques totaux relâchés par les tissus foliaires, suivant le protocole décrit par **Dionisio-Sese et al. (1998)**. Les fuites d'électrolyte ont ensuite été quantifiées en utilisant la formule suivante :

$$\text{Électrolyte leakage (\%)} = (\text{EC1} - \text{EC0}) / (\text{EC2} - \text{EC0}) \times 100$$

IV.3.5.3.2. Indice de teneur en eau relative (RWC)

L'évaluation de l'hydratation des plantes s'est basée sur l'indice de teneur en eau relative (RWC), déterminé conformément à la méthode décrite par **Ladiges (1975)**, adaptée par **Clarke et al. (1982)** et **Rascio et al. (1988)**. La formule utilisée pour calculer la teneur relative en eau est exprimée par :

$$\text{RWC(\%)} = \frac{\text{Pf} - \text{Ps}}{\text{Ppt} - \text{Ps}} \times 100$$

IV.3.5.4. Paramètres biochimiques

IV.3.5.4.1. Contenu en chlorophylle

La chlorophylle a (Chlo_a), la chlorophylle b (Chlo_b) et la chlorophylle totale (Chlo_{totale}) des feuilles fraîches entièrement développées ont été déterminées selon la méthode décrite par **Arnon (1949)** et modifiée par **Ferus et Arkosiova (2001)**. Des échantillons de feuilles fraîches

(0,1 g) ont été homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur et extraits avec 5 mL de solution d'acétone à 80 %. Après une nuit de congélation, l'échantillon a été filtré et la densité optique a été mesurée à 663 et 645 nm. Les concentrations en chlorophylles a et b ont ensuite été calculées selon les formules suivantes :

$$Chlo_a(mg/l) = 12,7 DO_{663} - 2,69 DO_{645}$$

$$Chlo_b(mg/l) = 22,9 DO_{645} - 4,68 DO_{663}$$

$$Chlo_{total} = Chlo_a + Chlo_b$$

IV.3.5.4.2. Mesure des concentrations de proline

La concentration en proline a été évaluée en utilisant la méthode développée par **Troll et al. (1955)**. Pour ce faire, des tissus de feuilles fraîches (100 mg) ont été homogénéisés dans 2 mL de méthanol à 40 %. Ensuite, à cet homogénat, 2 mL de ninhydrine acide (préparée en dissolvant 1,25 g de ninhydrine dans 30 mL d'acide acétique glacial et 20 mL d'acide phosphorique 6 mol L⁻¹) et 2 mL d'acide acétique glacial ont été ajoutés. Le mélange a été chauffé à ébullition au bain-marie à 100°C pendant 60 minutes. Après refroidissement, le mélange bouilli a été toluénisé avec 5 mL de toluène. Les densités optiques des échantillons ont ensuite été mesurées à une longueur d'onde de 528 nm, après calibration de l'instrument à l'aide d'un mélange d'acide acétique, d'eau distillée, d'acide orthophosphorique et de ninhydrine (**Kouadria et al., 2023**). La concentration de proline a été déterminée en se référant à une courbe d'étalonnage et exprimée en mg/g de poids frais (FW).

IV.3.5.4.3. Détermination de la concentration en élément minéral et en Cu dans les composants aériens et racinaires par ICP-OES

Les échantillons du blé tendre (partie aérienne et racinaire) ont été lavés avec de l'eau distillée et séchés à 65 °C pendant 48 heures. Les échantillons séchés ont été broyés et pesés à 0,2 g dans des tubes de digestion par micro-ondes. Après l'ajout de 10 ml d'acide nitrique aux échantillons, ces derniers ont été digérés à 200 °C pendant 20 minutes dans un système de digestion par micro-ondes (CEM, MARS6). Dans la dernière étape, les échantillons ont été complétés à 50 ml avec de l'eau distillée et la concentration des éléments (P, Ca, Mg, K, Fe, Mn et Cu) a été déterminée par ICP-OES (Perkin Elmer, Optima 8000).

IV.3.5.5. Détermination des caractéristiques morphologiques

Les paramètres morphologiques ont été évalués en mesurant la hauteur de la plante, la longueur des racines, le nombre de tiges, le nombre de nœuds et le nombre de feuilles par plante, qui ont été évaluées à l'aide d'une échelle en centimètres et exprimées en unité de mesure standard. En ce qui concerne la biomasse, les poids frais des parties aériennes et racinaires ont été mesurés à l'aide d'une balance analytique, chaque poids étant exprimé en grammes. Pour les poids frais, ces derniers ont été obtenus après la récolte des plantules de blé.

IV.3.5.6. Traitement statistique

Le traitement statistique des données obtenues a été mis en œuvre au moyen d'une analyse de dispersion avec le logiciel STATISTICA 7. Les données sont exprimées en moyenne \pm écart type (SD). L'analyse statistique a été réalisée avec une analyse de variance (ANOVA), une corrélation et une analyse en composantes principales (ACP) (analyse multifactoriels). Une différence était considérée comme statistiquement significative lorsque $p \leq 0,05$. Le logiciel SPSS Statistics 26 a été employé pour déterminer les valeurs de p , à travers le test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi de l'analyse post-hoc de Dunn pour établir la signification statistique, fixée à $P < 0,05$.

Résultats et discussions

V.1. Caractéristiques physico-chimique du sol

V.1.1. Analyse granulométrique du sol étudié :

L'analyse granulométrique du sol étudié, présentée à travers une courbe granulométrique, offre une représentation visuelle de la distribution des tailles moyennes des grains dans le matériau analysé, exprimée en pourcentage du poids total. Cette analyse, effectuée par tamisage des diverses fractions du sol à une profondeur de 0 à 20 cm, est détaillée dans le tableau (4).

Tableau 4 : Résultats de l'analyse par tamisage du sol étudié

Taille du tamis	Ouverture du tamis (mm)	Masse de tamis (g)M1	Sol retenu + Bac (g)M2	Masse de sol (g) Ri=M2 – M1	% retenu(%)Rn= (Ri/M) × 100	% cumuléreten u (%)C	% plus fin (%) 100-C
#13	1,5	274,83	278,67	3.84	0.384	0.384	99.616
#15	1,3	276	278.2	2.2	0.22	0.604	99.396
#18	1	266.33	267.01	0.68	0.068	0.672	99.328
#28	0,65	243.61	244.75	1.14	0.114	0.786	99.214
#35	0,5	258.24	281.85	23.61	2.361	3.147	96.853
#80	0,18	260.66	1034.38	773.72	77.372	80.519	19.481
#100	0,15	236.74	390.11	153.37	15.337	95.856	4.144
#150	0,1	237.62	239.17	1.55	0.155	96.011	3.989
#250	0,058	235.89	270.28	34.39	3.439	99.45	0.55
#270	0,053	231.24	233.02	1.78	0.178	99.628	0.372
Bac de réception <0.053		4.94	8.66	3.72	0.372	100	0
M=1000							

À la lumière de ces résultats, on peut dire que le sol est composé de la fraction granulaire de 0,18 mm et 0,1 mm (figure 14). Selon les données de la littérature (classification USCS / LCPC), le sol appartient à la classe "B" (sol de sableux limoneux).

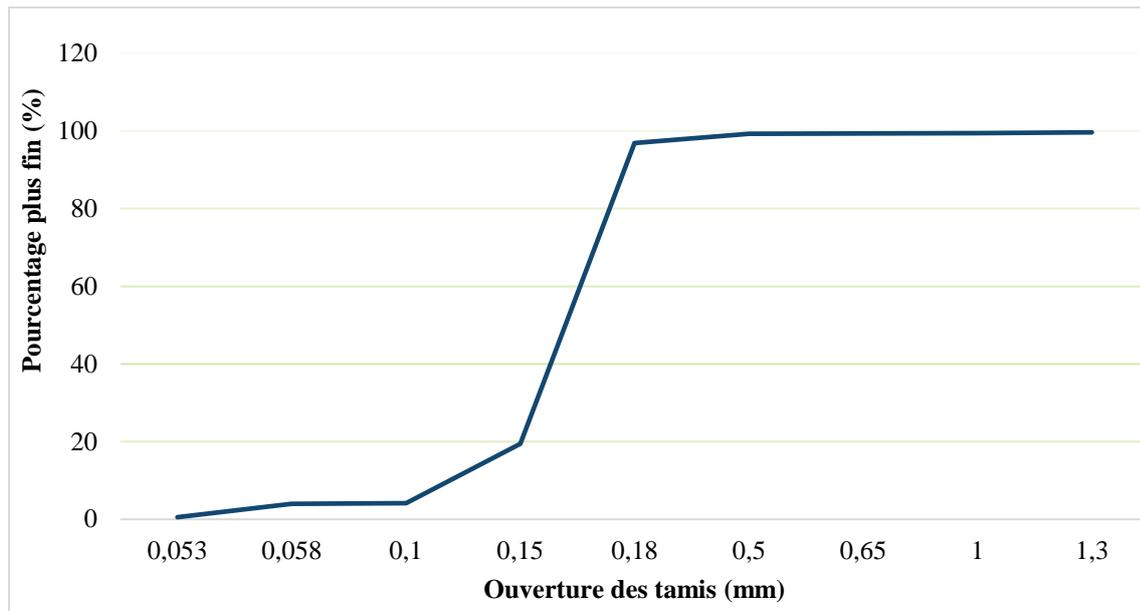


Figure 14 : Granulométrie par tamisage, distribution de la taille moyenne des grains.

V.1.2. La granulométrie par sédimentation :

La sédimentation est une opération qui permet de déterminer les fractions ayant un diamètre (D) inférieur à 80 micromètres ($< 0,08$ mm). Cette méthode complète la méthode des tamis. Ainsi, le sol a réussi la deuxième étape de la granulométrie, réalisée par la méthode de la pipette de Robinson utilisant la loi de Stokes. Les résultats ont révélé que le pourcentage d'argile dans ce sol est d'environ 12 %, avec 68 % de sable et 20% de limon.

V.1.3. Les analyses physico-chimiques :

Les résultats de l'analyse physico-chimique du sol, présentés dans le tableau numéro 5, mettent en lumière plusieurs caractéristiques importantes. Tout d'abord, le pH du sol est légèrement alcalin, avec une valeur mesurée à 7,4, ce qui est généralement favorable à la croissance des plantes. De plus, la conductivité électrique du sol est faible, avec une mesure de $0,07$ dS m^{-1} , indiquant une salinité minimale. L'humidité résiduelle du sol est relativement élevée, s'élevant à 75,08 %, suggérant une capacité de rétention d'eau importante après le drainage. En ce qui concerne la composition du sol, on observe des niveaux faibles de matière organique, avec un pourcentage de 1,14 %, et de carbone, mesuré à 0,22 %. De plus, les concentrations en azote (0,049 mg/l), phosphore (0,22 mg/L), potassium (6,16 mg/L), calcium

(62 mg/L), magnésium (3,66 mg/L) et sodium (10,35 mg/L) sont toutes dans des plages appropriées pour la croissance des plantes.

Tableau 5 : résultats des paramètres physico-chimiques du sol

Paramètre	Unité	Valeur
pH	-	7.4
Conductivité électrique	dS/ m	0.07
Humidité résiduelle	%	75.08
Matière Organique	%	1.14
Carbone	%	0.22
N ₂	-	0.049
P	mg/L	0.22
K	mg/L	6.16
Ca	mg/L	62
Mg	mg/L	3.66
Na	mg/L	10.35

Discussion :

▪ Texture du sol

Les résultats de la distribution des particules dans le sol révèlent une composition dominée par le sable, représentant 68% du mélange, suivie de près par le limon avec une proportion de 20%. L'argile est présente en moindre quantité, ne représentant que 12% de la composition totale. Cette répartition indique que le sol présente une texture sableux-limoneuse.

Le facteur de texture du sol joue un rôle essentiel dans la mobilité des métaux au sein du profil du sol. Composé de minéraux et de fines particules telles que des oxydes et des argiles, le sol présente une diversité de particules qui influent sur l'adsorption et la fixation des métaux lourds. Les particules d'oxydes et d'argiles, constituant majeur de la texture du sol, agissent comme des sites d'adsorption et de fixation pour les métaux lourds présents dans le sol (**Pikula et Stępień, 2021**).

De plus, la taille des particules d'argile exerce une influence significative sur la mobilité des métaux lourds, démontrant ainsi l'importance de la composition du sol dans le processus d'adsorption (**Łyszczarz et al., 2021**). Les traitements des boues peuvent également altérer la

biodisponibilité des métaux et modifier les fractions de métaux dans le sol au fil du temps, influençant ainsi leur mobilité et leur rétention (**Achkir et al., 2023**).

En termes de perméabilité, les sols présentant une porosité et une perméabilité plus élevées sont plus susceptibles de favoriser le transport des contaminants, impactant ainsi la propagation de la pollution dans l'environnement (**Zeng et al., 2023**).

Par exemple, le cadmium montre une tendance au lessivage plus prononcée, notamment dans les sols sableux, par rapport au cuivre, qui est moins sujet au lessivage. Cette observation souligne l'importance de prendre en compte la texture du sol dans l'évaluation et la gestion de la pollution par les métaux lourds (**Pikula et Stępień, 2021**).

- **Le potentiel d'hydrogène pH :**

Le pH du sol joue un rôle crucial dans la santé et la productivité des écosystèmes terrestres, Dans notre étude, le pH du sol étudié est de 7,4, ce qui le classe comme légèrement basique selon le diagramme de pH (**Hartemink et Barrow, 2023**). Cette valeur est considérée comme favorable à la croissance des plantes, car une plage de pH d'environ 7 est la plus adaptée, permettant une disponibilité optimale de tous les nutriments essentiels pour les plantes, comme l'ont souligné **Gondal et al (2021)**.

En outre, le pH du sol est étroitement lié à de nombreuses autres propriétés du sol et contrôle ses caractéristiques physiques, chimiques et biologiques. Par exemple, il régule la mobilité des métaux lourds dans le sol, comme le démontre l'étude d'**Alsabhan et al. (2022)**, qui a observé une concentration plus élevée de métaux lourds dans les sols acides. Les micro-organismes du sol peuvent également influencer le pH, contribuant ainsi à maintenir l'équilibre vers la neutralité.

Le pH du sol affecte également la solubilité des éléments nutritifs, notamment du phosphore, du molybdène, du calcium et du magnésium, dont la disponibilité varie en fonction du pH du sol. Par exemple, à un pH de 5,5 (**Gondal et al., 2021**). Il est important de noter que l'acidité du sol résulte souvent de concentrations élevées de protons et d'interactions avec différents ions minéraux, ce qui peut conduire à une concentration accrue de métaux lourds et d'autres cations dans le sol (**Husnain et al., 2021**), la solubilité de ces éléments est faible, tandis qu'elle est plus élevée à des pH plus élevés.

De plus, un pH optimal, compris entre 6,6 et 7,3, favorise les activités microbiennes qui contribuent à la disponibilité des nutriments pour les plantes, comme l'ont indiqué **Gondal et al. (2021)**.

▪ La conductivité électrique

La conductivité électrique est utilisée comme indicateur de la concentration des sels solubles présents dans le sol. Avec une valeur de conductivité électrique de $0,07 \text{ dS m}^{-1}$, le sol examiné présente une faible salinité. Selon les normes de la FAO, la salinité des sols est classée en fonction de la conductivité électrique (CE), allant de non salée ($0 - 4,5 \text{ dS m}^{-1}$) à très salée ($>18 \text{ dS m}^{-1}$).

Ainsi, la faible CE observée dans notre sol suggère qu'il appartient à la catégorie des sols non salés, favorables généralement à la croissance des cultures. Cependant, des niveaux de CE supérieurs à 8 dS m^{-1} peuvent avoir des répercussions négatives sur la croissance des cultures et modifier la mobilité des éléments traces dans le sol (**Bartkowiak et al., 2020**). Cette faible conductivité électrique peut être attribuée à une teneur en sel réduite, résultant du lessivage des sels lors des processus d'irrigation. Ce lessivage est favorisé par la texture sableuse du sol. Par ailleurs, la précipitation complexe des sels et leur transport vers les plantes peuvent également contribuer à la diminution de la conductivité électrique (**Salem et al., 2020**).

L'étude menée par **Bartkowiak et al. (2020)** explore la relation entre la salinité du sol et la biodisponibilité des métaux lourds, notamment le Zn, Cu, Pb, Mn et Fe. Les résultats révèlent une variation des niveaux de ces métaux mobiles et biodisponibles en fonction de la salinité du sol. Notamment, la biodisponibilité du zinc augmente de manière significative avec l'augmentation de la salinité, tandis que les autres métaux traces présentent des tendances variables. Cette relation complexe entre la salinité et la mobilité des métaux est influencée par divers facteurs, notamment la teneur en chlorure dans le sol, qui peut influencer sur la mobilisation des métaux et leur absorption par les plantes.

▪ La matière organique

Les résultats indiquent que la teneur en matière organique du sol est de 1,14%, tandis que la teneur en carbone est de 0,22%. Selon le programme d'interprétation LANO/CA, cette teneur en matière organique est classée comme pauvre, avec des niveaux égaux ou inférieurs à 14‰ (**Dincher, 2020**). Cette faible quantité de matière organique dans le sol pourrait avoir des implications sur sa fertilité et sa capacité à soutenir la croissance des plantes.

En outre, la matière organique du sol et les minéraux argileux sont les principaux composants du sol qui possèdent une capacité d'adsorption significative par rapport aux métaux, grâce à la sorption par échange, la complexation ou la chélation (**Łyszczarz et al., 2021**).

L'étude de Zwoliński (1994) a mis en évidence que dans les peuplements de pin écossais (*Pinus silvestris*), le taux de décomposition de la matière organique diminuait à mesure que le niveau de contamination par les métaux lourds augmentait. Cela a entraîné une réduction des émissions de CO₂ et une accumulation de matière organique dans le sol.

Ces résultats ont des implications significatives pour l'estimation du budget carbone mondial, en particulier compte tenu de l'augmentation de la superficie des sols contaminés par les métaux lourds (**Enya et al., 2020**).

V.2. Caractérisation microbiologique

Dans la présente étude, nous avons identifié et caractérisé des bactéries résistantes aux métaux lourds isolées de la rhizosphère de vignes et de moutarde des champs du sol agricole. L'objectif était d'isoler des bactéries rhizosphériques à effet PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) résistantes aux métaux lourds, en vue de tester ultérieurement leurs effets sur la bioremédiation des sols contaminés et sur la croissance des plants de blé tendre sous stress métallique.

Cinquante Quatre colonies fluorescentes ont été examinées à partir du niveau initial de milieu gélosé King B supplémenté en sulfate de cuivre. Parmi celles-ci, 45 isolats ont été sélectionnées en raison de leur haute résistance aux métaux lourds, tandis que 4 souches ont été choisies pour leur production importante de sidérophores, en vue d'études ultérieures.

V.2.1. Analyses Morphologique :

L'examen macroscopique (Figure 15. a) révèle que les colonies sur gélose King B (Figure 15. b) se caractérisent par leur petite taille, leur aspect crémeux, lisse, circulaire et convexe, ainsi que par une production de pigment jaune verdâtre qui se diffuse dans le milieu. Lors de l'examen microscopique (Figure 15. c), les cellules apparaissent sous forme de bâtonnets isolés, sont négatives à la coloration de Gram, mobiles et non sporulées.

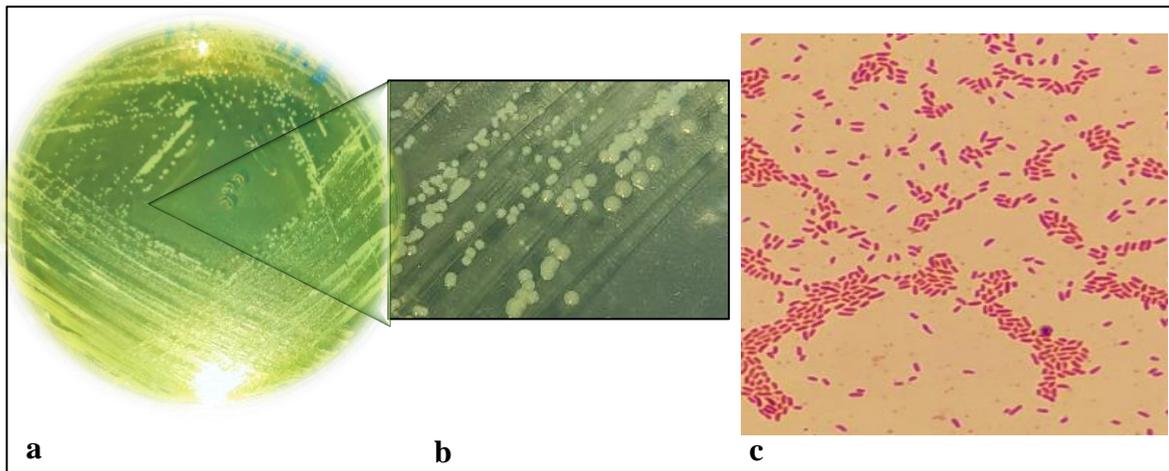


Figure 15 : Aspect macroscopique de la culture ^a et des colonies^b de *Pseudomonas* sur gélose King B, caractérisation microscopique ^c des *Pseudomonas* après une coloration de Gram au grossissement X1000

V.2.2.Détermination de la Concentration Inhibitrice Minimale (CMI)

V.2.2.1.Macrodilution :

L'observation d'un ralentissement ou d'une diminution de la croissance bactérienne à des concentrations croissantes de sulfate de cuivre (figure 16) peut indiquer un effet dose-dépendant, où l'effet sur la croissance est proportionnel à la concentration du CuSO_4 dans le milieu de culture. Cela peut être dû à plusieurs facteurs. Tout d'abord, les ions métalliques peuvent interagir avec les composants du milieu de culture ou avec les cellules bactériennes, ce qui entraîne des interférences dans les lectures de spectrophotométrie et peut fausser les résultats.

De plus, certains métaux lourds peuvent former des précipités dans le milieu de culture liquide à un pH neutre, ce qui peut perturber la mesure de la turbidité. Pour cette raison, il est nécessaire d'utiliser des tests de vitalité cellulaire pour évaluer plus précisément l'impact des métaux lourds sur la viabilité des cellules bactériennes.

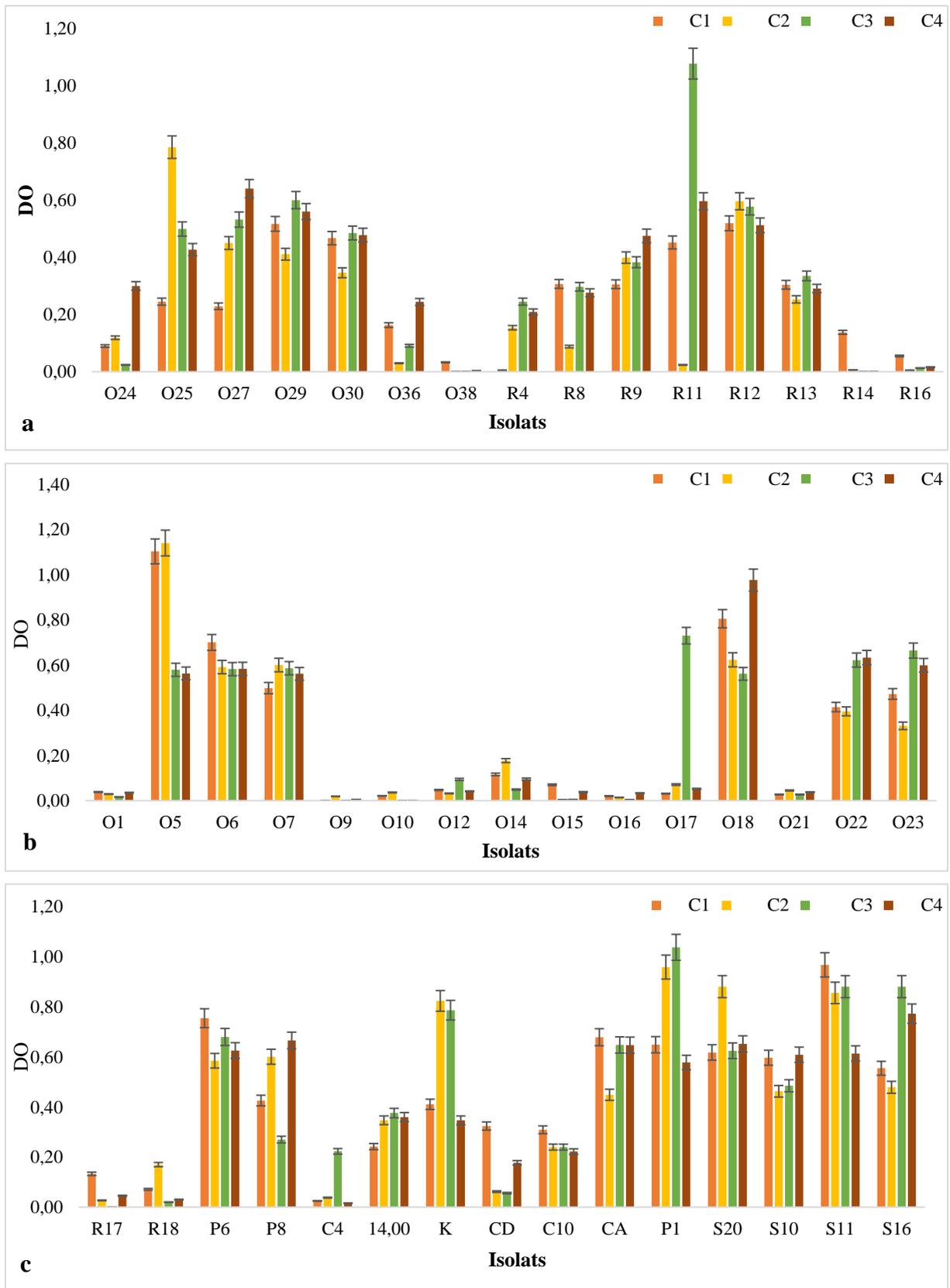


Figure 16 : Résultats de la CMI par macrodilution ^{a,b et c}

V.2.2.2. Microdilution :

Après avoir évalué la tolérance au cuivre de 45 isolats distincts de *Pseudomonas*, la concentration inhibitrice minimale (CMI) pour le sulfate de cuivre été établie à 12 mM suite à l'addition de TTC. Ces isolats ont montré une tolérance élevée au cuivre, variant de 6 mM à 12 mM. En présence de bactéries métaboliquement actives, le TTC est transformé en formazan de couleur rouge (figure 17). La quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules viables. La croissance bactérienne peut ensuite être évaluée de manière visuelle.

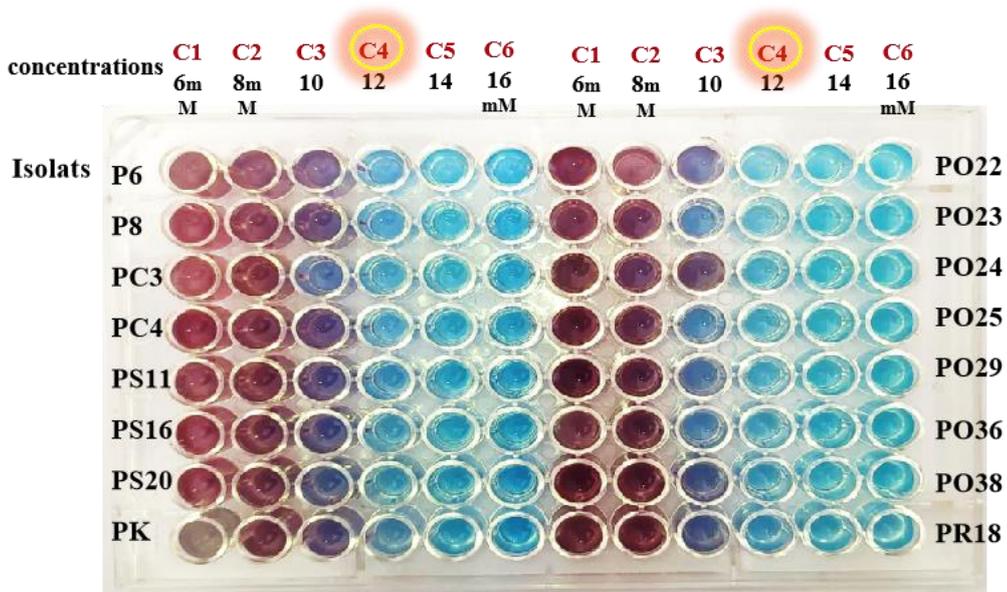


Figure 17 : La CMI par microdilution suite à l'Addition de TTC sur Microplaque à 96 Puits

V.2.3. Évaluation du potentiel PGP des isolats

L'objectif de cette partie est de mettre en lumière la capacité des différents isolats à produire des substances reconnues pour leur rôle dans la promotion de la croissance des plantes. Divers tests PGP ont été réalisés, notamment la production de phytohormones telles que l'acide indole acétique, la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores, de l'ammoniac, ainsi que la production de composés volatils tels que l'acide cyanhydrique (Figure 18).

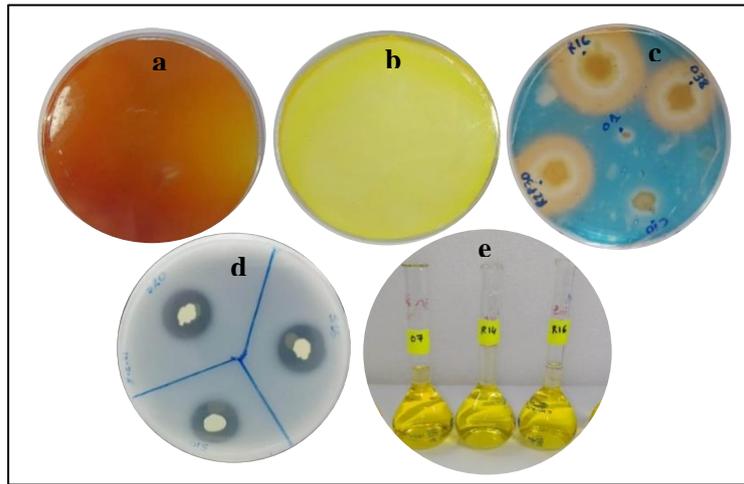


Figure 18: Activités des PGPR: production de HCN^{a/b} (résultats positifs^a /négatifs^b), production de sidérophores^c, et solubilisation de phosphate dans les milieux de Pikovskaya^d et NBRIP^e.

V.2.3.1. Production d'acide indolacétique (AIA)

Les tests réalisés sur 45 isolats rhizosphériques de *Pseudomonas* pour la production d'AIA ont révélé que 60 % étaient capables de produire de l'AIA en présence et en absence du stress métallique, avec des quantités variant de $126,33 \pm 0,05$ (l'isolat PS16) à $577,14 \pm 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ (l'isolat R2P10).

La production la plus élevée a été observée chez les isolats identifiés de *P. lactis* (R2P30) avec $428,19 \pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$, suivie de *P. atacamensis* (PO22) avec $342,28 \pm 0,04$ $\mu\text{g/ml}$, *P. atacamensis* (PO29) avec $211,30 \pm 0,06$ $\mu\text{g/ml}$ et *Pseudomonas* sp. (PS11) avec $165,47$ $\mu\text{g/ml}$. La présence de 5Mm de cuivre dans le milieu a significativement affecté la production d'AIA ($p \leq 0,05$), entraînant une diminution allant de 7,3 % à 48,9 % dans la plupart des isolats.

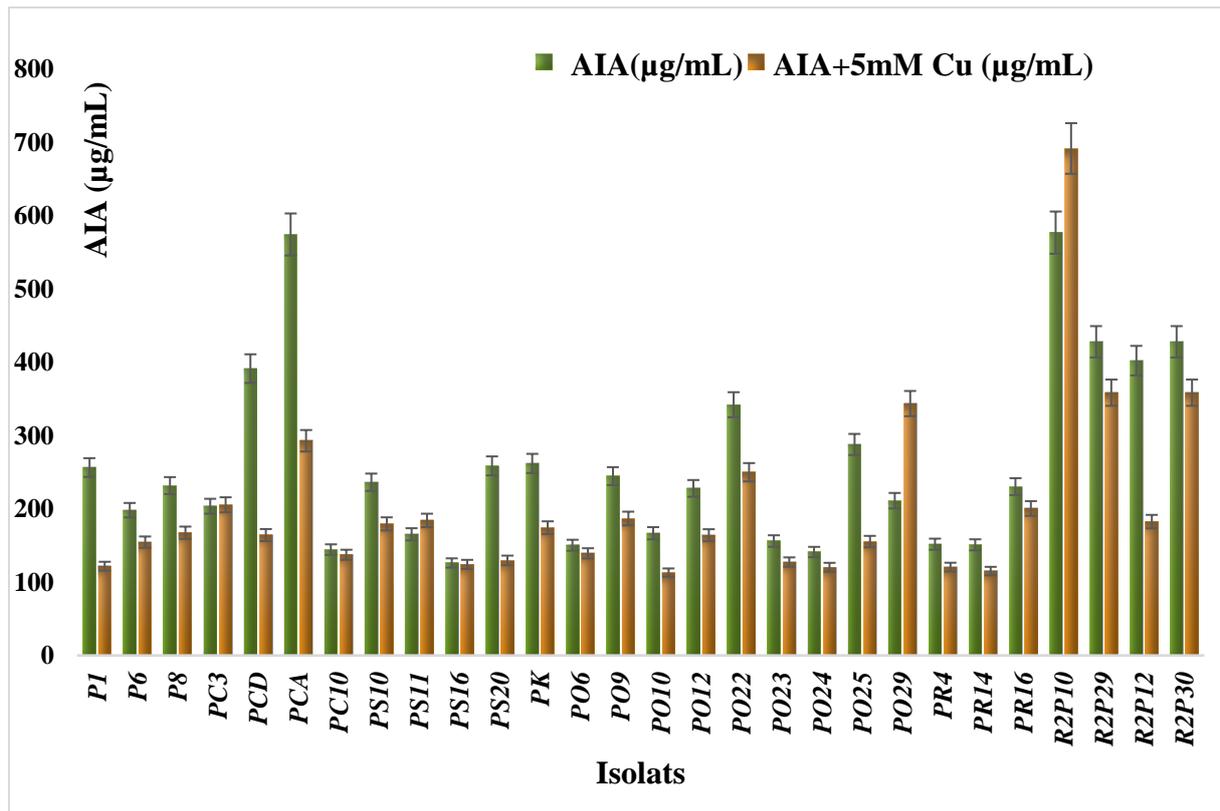


Figure 19 : La production d'acide indole acétique chez différents isolats.

V.2.3.2 HCN et production d'ammoniac

Parmi les 45 isolats testés, 20 (44,4 %) ont démontré une production de HCN après 4 jours d'incubation (Figure 18). De plus, une majorité significative, soit 41 isolats (91 %), ont présenté la capacité de produire de l'ammoniac. Parmi ceux-ci, les 4 isolats de *Pseudomonas* identifiés ont donné un résultat positif, avec une production remarquable d'HCN pour *P. atacamensis*. (PO29).

V.2.3.3 Solubilisation du phosphate

Les capacités qualitatives de solubilisation du phosphate ont été observées chez 84 % des isolats, comme en témoigne la formation de zones transparentes sur milieu Pikovskaya (Figure 19). Les quantités d'acides organiques produites lors de la solubilisation dans le milieu liquide NBRIP ont varié, allant de $35 \pm 0,04$ µg/ml (l'isolat P1) à $840 \pm 0,06$ µg/ml (l'isolat PO38).

La production la plus élevée a été observée chez les isolats identifiés de *P. atacamensis* (PO29) avec $690 \pm 0,07$ µg/ml, suivie de *P. atacamensis* (PO22) avec $200 \pm 0,05$ µg/ml, *P. lactis* (R2P30) avec $170 \pm 0,06$ µg/ml, et *Pseudomonas* sp. (PS11) avec $140 \pm 0,05$ µg/ml.

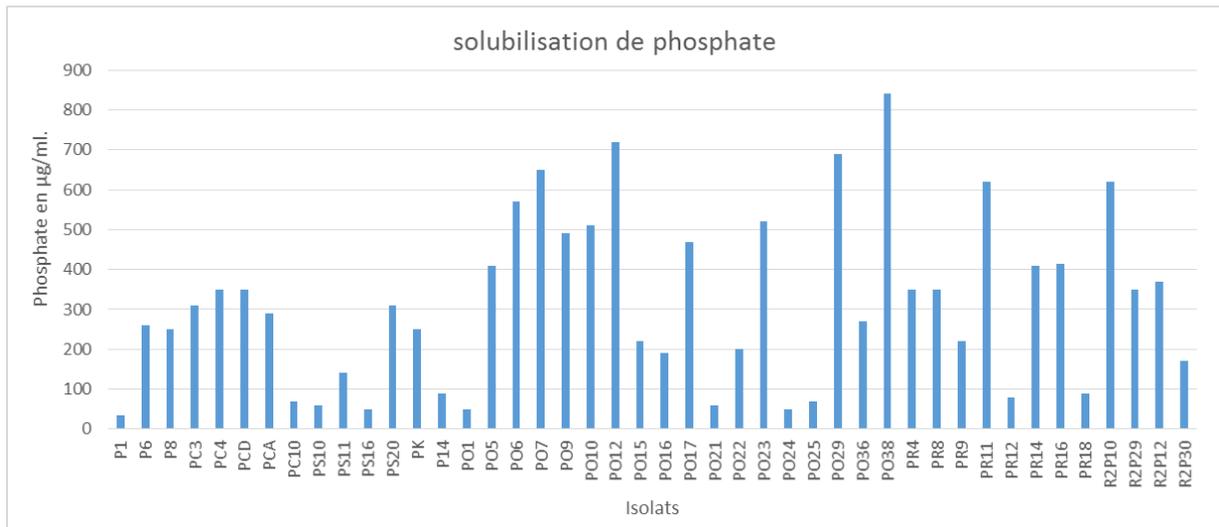


Figure 20 : Solubilisation quantitative du phosphate en milieu NBRIP.

V.2.3.4 Production de sidérophores

Tous les isolats bactériens ont été évalués pour déterminer leurs capacités de production de sidérophores, en utilisant à la fois des méthodes qualitatives et quantitatives. Dans l'évaluation qualitative sur des milieux agar CAS, les isolats producteurs de sidérophores ont présenté la formation d'une zone jaune à orange entourant leurs colonies, indicative de la chélation du fer. Pour valider ces résultats, des mesures quantitatives de la production de sidérophores ont été effectuées en cultures liquides (Figure 21). Parmi les isolats, *P. lactis* (R2P30), *P. atacamensis* (PO22), *Pseudomonas sp.* (PS11) et *P. atacamensis* (PO29) ont démontré les niveaux les plus élevés de production de sidérophores, avec des pourcentages de 67,69 %, 66,53 %, 56,86 % et 53,71%, respectivement, dans un milieu succinique.

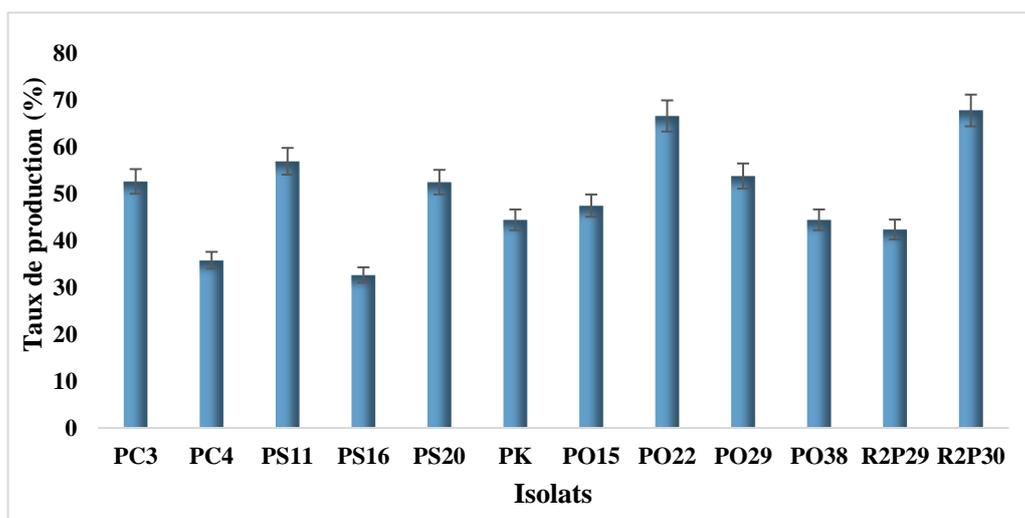


Figure 21 : Taux des siderophores produits par les isolats

V.2.3.5 Caractérisation de la pyoverdine purifiée par FT-IR

Le résultat de la purification fractionnée des siderophores a donné deux fractions différentes après l'ajout du réactif CAS. Une fraction est devenue violette et l'autre orange (figure 22), ce qui indique la présence de catécholate et d'hydroxamate.

Les résultats de la spectroscopie FT-IR des sidérophores purifiés sont détaillés dans la Figure 3, mettant en évidence divers pics détectés à différents nombres d'ondes (cm^{-1}).

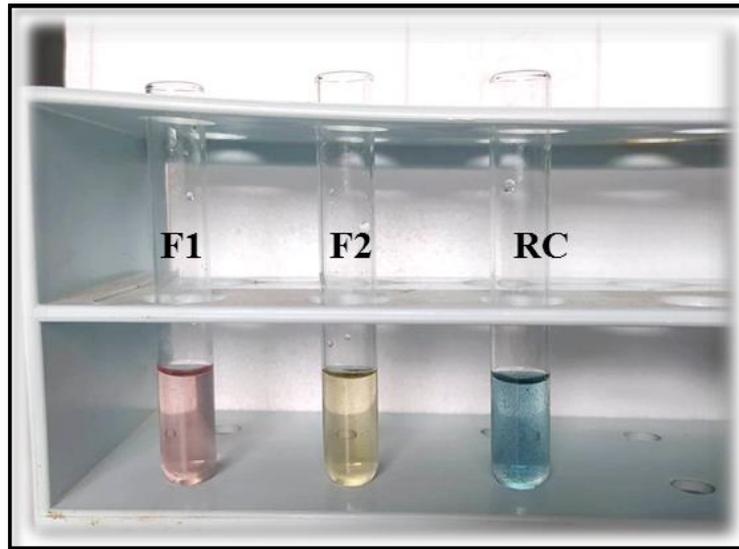


Figure 22 : La purification fractionnée des siderophores : F1 : Fraction catécholate, F2 : fraction hydroxamate et RC : réactif de CAS.

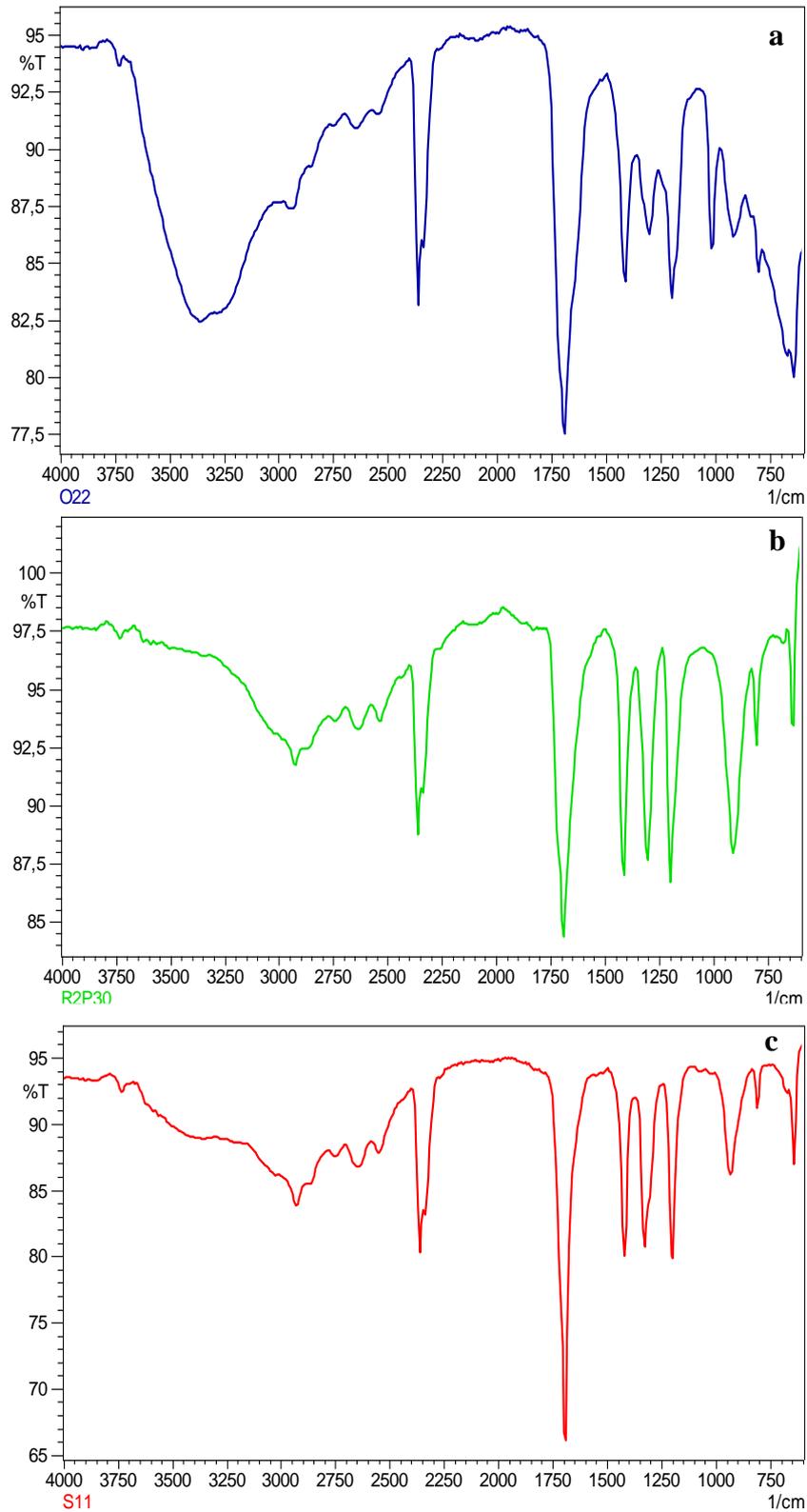


Figure 23 : Spectres FTIR de la pyoverdine de (a) *P. atacamensis* PO22, (b) *P.lactis* R2P30, et (c) *Pseudomonas* sp. PS11.

V.2.3.6 Lavage du sol selon batch processing:

Les sidérophores, l'EDTA ou les solutions d'acide citrique ont la capacité d'extraire les métaux lourds du sol contaminé par rapport à l'eau distillée (figure 24). La valeur du test de Kruskal-Wallis est statistiquement significative ($p < 0,05$), ce qui indique qu'il existe des différences significatives entre au moins certains des groupes.

Les résultats de la comparaison entre les groupes révèlent qu'il n'y a pas de différence significative entre les solutions d'EDTA et la pyoverdine de *P. lactis* (R2P30) dans leur capacité à éliminer les métaux lourds du sol contaminé, contrairement à l'acide citrique, à *P. atacamensis* (PO22) et à la pyoverdine de *Pseudomonas sp.* (PS11) ($p > 0,05$). Les pyoverdines extraites de *P. atacamensis* (PO22) ont une capacité supérieure à éliminer les ions cuivre (49,63 %), suivies de près par *P. lactis* (47,65 %), par rapport à l'EDTA (43,11 %) et à l'acide citrique (27,58 %). La pyoverdine de *P. lactis* (R2P30) a une affinité de liaison plus élevée pour le brome, l'étain, le rhodium et le plomb que l'EDTA, cependant, elle est similaire au nickel avec 89 %.

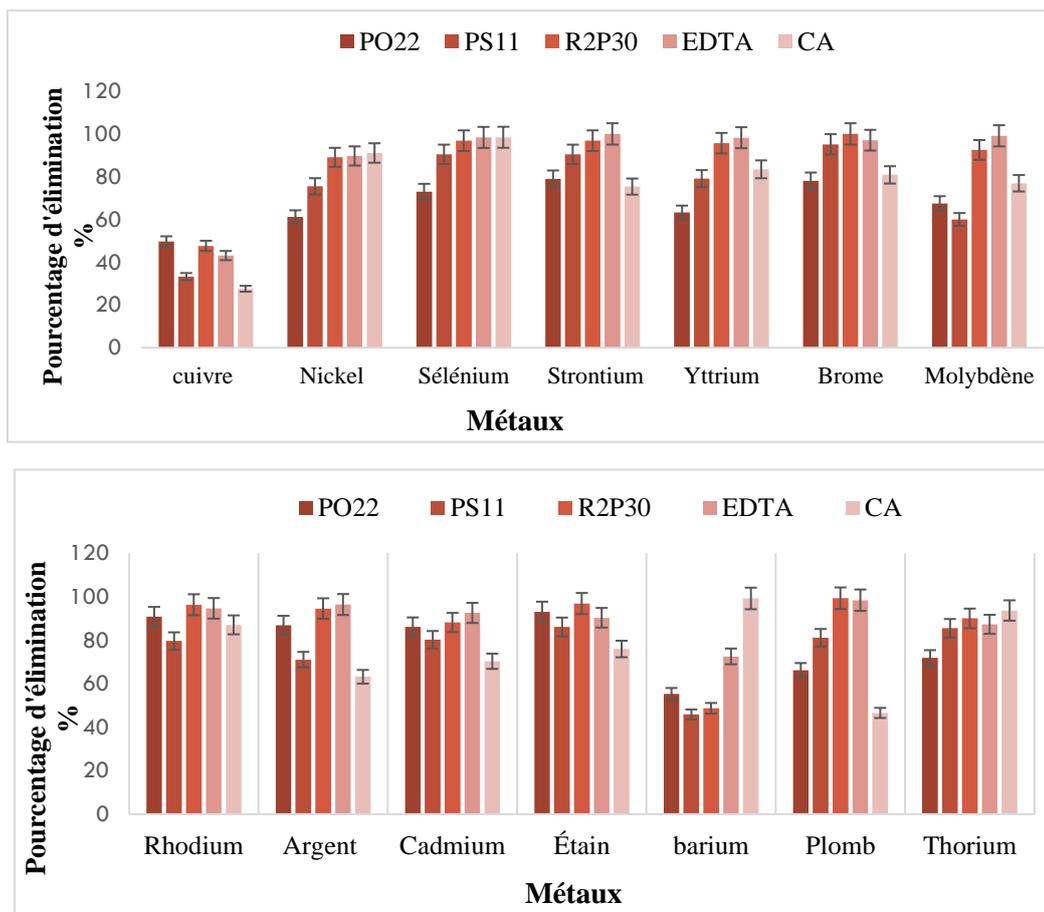


Figure 24 : Extraction des métaux lourds du sol avec différentes solutions : Pyoverdine, EDTA et acide citrique après 24 heures d'agitation.

V.2.3.7. Identification moléculaire des isolats bactériens

Les isolats de *Pseudomonas* PO22, R2P30, PS11 et PO29, remarquables pour leur production de sidérophores supérieure dans cette étude, ont été identifiés génétiquement par séquençage de leurs gènes 16S ARNr. Ce processus d'identification a inclus une recherche BLAST sur le site web du Centre national de biotechnologie de l'information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Une analyse supplémentaire à l'aide de l'outil en ligne EzBioCloud, qui a pris en compte à la fois les résultats de 16S ARNr et de BLAST, a indiqué que l'isolat PO22 ressemblait étroitement à diverses souches de *P. atacamensis*, présentant une homologie de 100 %. De même, l'isolat de *Pseudomonas* R2P30 a été identifié comme *P. lactis*, montrant une homologie de 99,28 %, tandis que l'isolat PS11 a été classé comme *Pseudomonas* *sp.*, avec un pourcentage d'homologie de 99,14 %. Et pour l'isolat PO29 a été identifié comme *P. atacamensis*, avec un pourcentage d'homologie de 98.27%. Ces résultats sont référencés sous les numéros d'accès OQ726322, OQ726323, OQ726353 et PP704712

Un arbre phylogénétique (Figure 25) a été construit pour représenter les relations entre les isolats fluorescents de *Pseudomonas* ainsi que d'autres membres bien établis du genre *Pseudomonas*. Cet arbre a été généré en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) dans la version 11 de MEGA. Il fournit une représentation visuelle des connexions génétiques entre ces isolats, offrant des informations sur leurs relations évolutives.

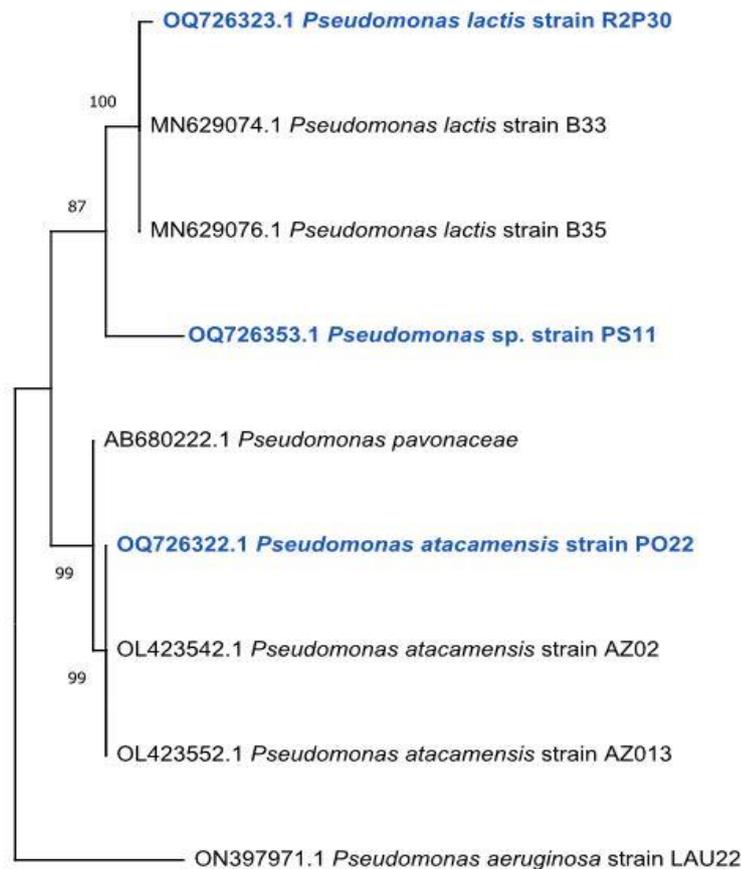


Figure 25 : Arbre phylogénétique illustrant la relation entre les souches PO22, R2P30, PS11 et PO29, les espèces de *Pseudomonas* les plus étroitement apparentées.

V.2.3.8. L'analyse multivariée à l'aide de l'analyse en composantes principales (ACP)

Les deux premiers axes de l'ACP expliquent une grande partie de l'information (Figure 26.a.b), soit environ 80,31 %. Le premier axe, à lui seul, explique 49,86 % de l'information totale. Cet axe est fortement positivement corrélé au CU+AIA ($R = 0,93$) et à l'AIA ($R = 0,88$), et dans une moindre mesure au PO₄ ($R = 0,59$), caractérisant positivement les observations R2P10, PCA et R2P29, et négativement les observations PO15 et PO38. Le deuxième axe, avec 30,55 % de l'information expliquée, est positivement corrélé au SIDEROPHE ($R = 0,89$), caractérisant les observations R2P30, PO22 et PS11, et négativement corrélé au PO₄ ($R = -0,59$), caractérisant principalement les observations PO6, PO12, PO23 et PO10.

Les deux premiers axes de l'ACP expliquent une grande partie de l'information, de l'ordre de 86,07 %. Le premier axe, à lui seul, explique 49,86 % de l'information totale. Cet axe est fortement positivement corrélé au plomb ($R=0,95$), au strontium ($R=0,91$), à l'argent ($R=0,91$),

au cadmium ($R=0,88$), au brome ($R=0,79$), à l'étain ($R=0,78$), au molybdène ($R=0,77$), au rhodium ($R=0,72$), à l'yttrium ($R=0,68$) et au cuivre ($R=0,67$), caractérisant principalement le R2P30 et l'EDTA. Il est également négativement corrélé au baryum ($R=-0,44$), qui est fortement élevé en termes de PCA. Le deuxième axe, avec 36,22 % de l'information expliquée, est fortement positivement corrélé au thorium ($R=0,97$), au sélénium ($R=0,95$), au nickel ($R=0,94$), à l'yttrium ($R=0,73$) et au baryum ($R=0,63$), qui caractérisent fortement le CA et sont peu présents dans le PO22.

Pour catégoriser davantage les groupes de retrait des métaux lourds, une analyse de regroupement hiérarchique (ACH) a été utilisée. Le dendrogramme présenté dans la Figure 27 est divisé en deux sous-clusters. Le premier groupe se compose principalement d'échantillons contenant du molybdène et de l'étain, tandis que le deuxième groupe est caractérisé par du baryum et du sélénium. Ce regroupement illustre efficacement les similitudes et les différences dans l'élimination des métaux lourds par divers traitements, suggérant que R2P30, EDTA et PS11 partagent des similitudes significatives dans leur capacité à éliminer les métaux lourds.

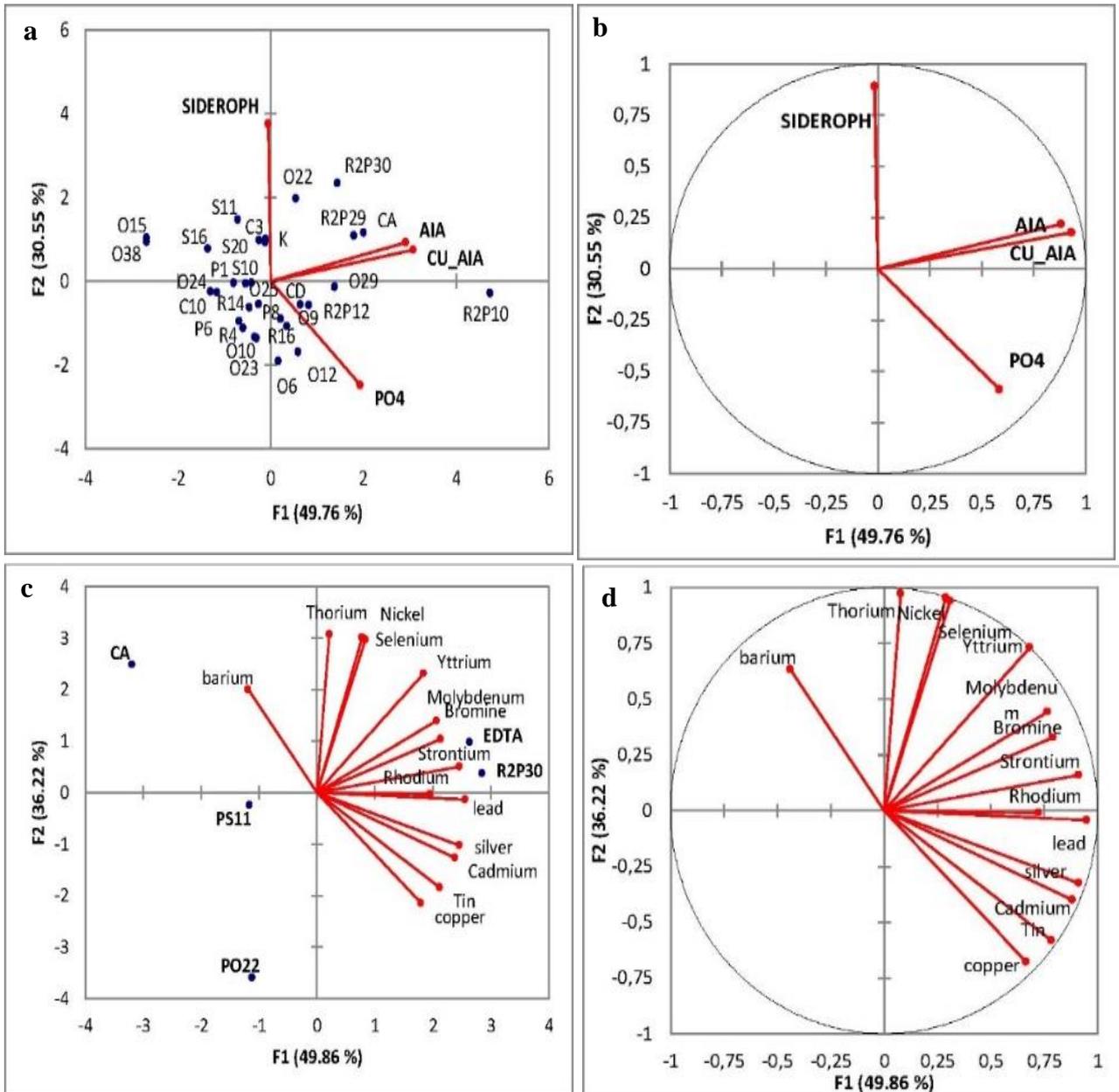


Figure 26 : Visulisation de la séparation des facteurs (sidérophores, AIA, PO₄) et les variables (isolats) en ACP.

L'AIA, l'AIA-Cu et le PO₄ sont regroupés d'un côté, tandis que les sidérophores sont positionnés de l'autre côté à travers les deux composantes principales (PCA a et b). De manière significative, un regroupement distinct des métaux est observé dans le deuxième ensemble de composantes principales (c et d), avec le baryum montrant une séparation marquée par rapport aux autres métaux.

Le dendrogramme (Figure 27.a) fourni illustre les similarités entre différents métaux sur l'axe des X, tandis que l'axe des Y représente la mesure de similarité. Les éléments sont regroupés en clusters, indiquant leur proximité en termes de similarité. Par exemple, le Molybdène et le Rhodium montrent une forte similarité, se rejoignant à un niveau bas de l'axe des Y. Un autre groupe distinct inclut le Brome, Strontium, Plomb, Argent, et Cadmium, qui présentent une similarité modérée.

Les éléments comme l'Étain, le Baryum, l'Yttrium, le Thorium, le Nickel, et le Sélénium forment un autre groupe, indiquant des similarités variables. La longueur des branches indique le degré de dissimilarité, avec des branches plus courtes signifiant une plus grande similarité. Ce dendrogramme permet de visualiser les relations hiérarchiques entre les éléments, facilitant l'interprétation de leur regroupement basé sur des critères de similarité spécifiques à l'étude en question.

Le dendrogramme (Figure 27.b) présenté illustre les similarités entre différentes solutions de lavage pour les sols pollués par les métaux lourds, en particulier les solutions de la pyoverdine (PO22, R2P30, PS11), le chélateur organique (acide citrique - CA) et chimique (EDTA). L'axe des Y représente la similarité, où des valeurs plus basses indiquent une plus grande similarité. Le dendrogramme montre que l'acide citrique (CA) est isolé, indiquant qu'il est le plus dissemblable des autres solutions.

De même, PO22 se distingue et n'est pas étroitement lié aux autres. En revanche, PS11, R2P30 et EDTA forment un cluster distinct, indiquant une forte similarité entre eux. Parmi ce groupe, R2P30 et EDTA sont particulièrement similaires, se rejoignant à un niveau très bas sur l'axe des Y. Cette analyse permet de comprendre quelles solutions de lavage, y compris les solutions bactériennes utilisant la pyoverdine, le chélateur organique et le chélateur chimique, ont des effets similaires sur l'élimination des métaux lourds des sols, facilitant ainsi le choix des méthodes les plus appropriées pour la décontamination.

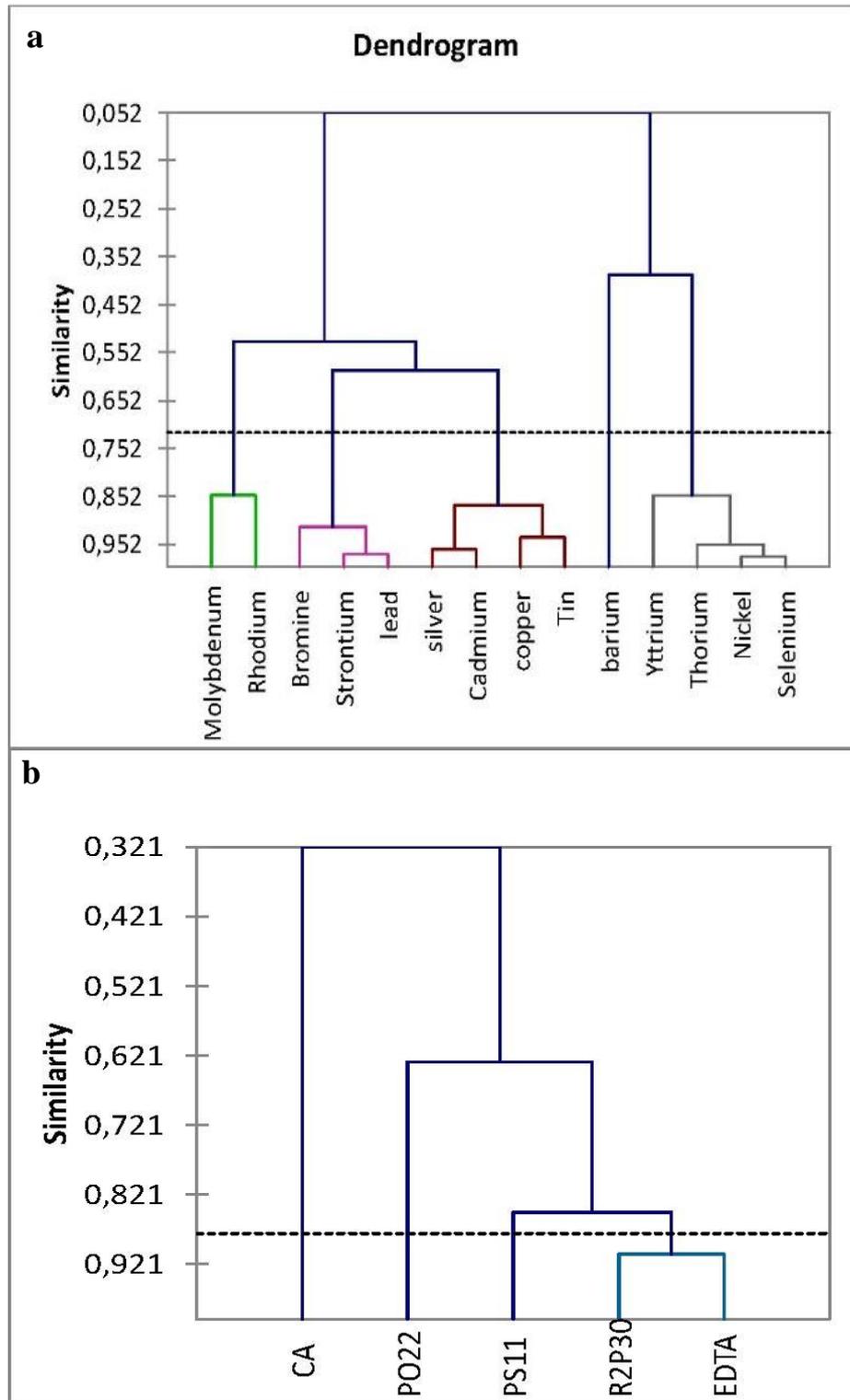


Figure 27: Dendrogramme de l'analyse de regroupement, testant le niveau de similarité dans l'élimination des métaux lourds. Il met en évidence la proximité de R2P30, EDTA et PS11 dans leur efficacité à éliminer les métaux lourds.

Discussion :

▪ La Concentration minimale inhibitrice :

Benhalima et al. (2019) ont constaté que 400 µg/ml de cuivre inhibaient 25 % de leurs isolats de *Pseudomonas*. De plus, **Singh et al. (2010)** ont indiqué que la CIM du cuivre dans les souches de *Pseudomonas* testées variait entre 180 et 300 µg/ml.

Al-Sajad et al. (2024) ont examiné les isolats PGPR de *Pseudomonas aeruginosa*, provenant des rhizosphères des plantes dans un champ agricole en Iraq. Leurs recherches ont révélé une résistance accrue au sulfate de cuivre et au chlorure de zinc par rapport aux autres isolats bactériens, avec une résistance supérieure au CuSO₄ (CMI = 3200 µg/ml).

L'étude de **Monych et al. (2020)** a révélé que *Pseudomonas aeruginosa* PAO1(PaS) non seulement améliore sa propre tolérance au cuivre et à l'argent, mais qu'il peut également améliorer la tolérance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Les résultats ont montré que l'ajout de PaS a entraîné une augmentation significative, jusqu'à quatre fois, de la CMI du cuivre et de l'argent pour *S. aureus*, comme indiqué par un point d'inflexion se produisant à des concentrations plus élevées d'AgNO₃ et de CuSO₄ en présence de PaS.

Des souches résistantes au cuivre ont été détectées chez de nombreuses bactéries phytopathogènes, notamment chez les pseudomonades. Les auteurs ont rapporté que *Pseudomonas caryophylli*, *P. cepacia*, *P. gladioli*, *P. glumae*, *P. solanacearum*, *P. tolaasii* et certains pathovars de *P. syringae* tels que *pv. actinidiae* et *pv. tomato*, ont montré des niveaux de résistance significativement élevés au CuSO₄. Ils ont suggéré que la pression de sélection périodique imposée par les applications de pulvérisation de cuivre semblait favoriser l'établissement généralisé de populations bactériennes tolérantes au cuivre (**Abdellatif et al., 2020**).

▪ Acide Indol Acétique :

Les PGPR améliorent la croissance des plantes grâce à des mécanismes tels que la solubilisation du phosphate, la production de sidérophores, la fixation biologique de l'azote, l'interférence avec les signaux de détection du quorum, l'inhibition de la formation de biofilms et la production de phytohormones (**Mushtaq et al., 2022**).

Les microorganismes produisant de l'acide indole acétique (AIA) jouent un rôle crucial dans la régulation des niveaux hormonaux des plantes, facilitant ainsi leur adaptation aux conditions

de stress, ces microorganismes producteurs de phytohormones possèdent la capacité remarquable de réduire et de transporter les métaux lourds à travers les racines des plantes, contribuant ainsi à leur adaptation dans des environnements stressants. Des recherches antérieures ont signalé une réduction de l'accumulation de nickel (Ni) et d'arsenic (As) dans les racines de la plante *Vigna radiata* et, par conséquent, une moindre translocation vers les parties aériennes suite à l'inoculation avec *Bacillus megaterium* et *Exiguobacterium* (Nazli *et al.*, 2020).

Dans l'étude de Bouquet *et al.* (2020), le plomb induit une forte diminution de la production d'AIA pour *C. metallidurans*, passant de 45,9 mM pour le témoin sans Pb à 23,5 mM à 100 µM de Pb, soit une diminution de 48,8 %. Ces résultats révèlent que *C. metallidurans*, qui semblait initialement être un candidat potentiel efficace pour la phytoremédiation en raison de sa production élevée d'AIA, présente une réponse différente dans des conditions réalistes et n'est probablement pas adaptée à la bioaugmentation dans les sols pollués par le plomb. Par conséquent, les méthodes actuelles de sélection qui ne prennent pas en compte les métaux peuvent sélectionner des souches inadaptées. Ce résultat souligne l'importance de réaliser des tests préliminaires avec le métal étudié à des concentrations réalistes.

L'étude de Majhi *et al.* (2024) explore le rôle de l'acide indol-3-acétique (AIA) dans la réponse des bactéries au stress induit par le Cu^{2+} . Les chercheurs ont constaté que l'AIA augmente l'efficacité des enzymes antioxydantes telles que la POX et la CAT, renforçant ainsi le système de défense de la bactérie. La bactérie *Micrococcus yunnanensis*, tolérante au Cu^{2+} , a produit jusqu'à 47 mg L⁻¹ d'AIA dans un milieu sans Cu^{2+} . Sous stress au Cu^{2+} , la production d'AIA a été maintenue jusqu'à une concentration de Cu^{2+} de 200 mg L⁻¹, avant de diminuer avec une augmentation de la concentration en Cu^{2+} . Cette étude souligne le potentiel de l'AIA comme mécanisme de défense chez les bactéries confrontées au stress métallique.

▪ Production de l'HCN et de l'ammoniac

De nombreuses bactéries PGPR produisent de l'ammoniac via le catabolisme des protéines, ce qui représente un processus important dans la fertilité du sol en conduisant à la minéralisation des résidus organiques en molécules d'ammonium, devenant ainsi une source d'azote disponible pour les plantes. La production de ce métabolite par les micro-organismes peut influencer directement la croissance des plantes en fournissant de l'azote. Ainsi, les bactéries productrices

d'ammoniac peuvent agir comme des biofertilisants dans les sols appauvris tels que ceux contaminés par des métaux lourds (**Abdelwahed et al., 2022**).

Divers taxons bactériens, notamment *Bacillus* sp. et *Pseudomonas* sp., sont connus pour leur production de HCN dans des environnements stressants. Notamment, la production d'ammoniac par ces souches microbiennes n'a pas été affectée par différentes doses de Cd (**Syed et al., 2023**).

▪ La solubilisation du phosphate

Les microorganismes rhizosphériques, en particulier les bactéries solubilisant le phosphate (PSB), jouent un rôle central dans la solubilisation du phosphore à partir d'une forme indisponible dans des environnements limités en nutriments (**Dey et al., 2024**).

Les PSB peuvent tout d'abord dissoudre les sources de phosphore insolubles en libérant des acides organiques et des enzymes, les convertissant ainsi en PO_4^{3-} qui se lie aux métaux lourds pour former des précipités de phosphate, ce qui peut réduire considérablement la quantité d'ions de métaux lourds libres dans le sol (**Feng et al., 2024**).

Les zones contaminées par les métaux lourds constituent une source importante de souches microbiennes solubilisatrices de phosphate résistantes aux métaux lourds, et les BSP résistants aux métaux lourds provenant des zones minières ont un grand potentiel d'application dans la remédiation des sols contaminés par les métaux lourds (**Hu et Chen, 2023**).

De nombreuses études ont démontré l'efficacité des bactéries solubilisatrices de phosphate (PSB) dans l'immobilisation des métaux lourds. Par exemple, des souches de PSB telles que *Pantoea* sp. CS2-B1 et *Enterobacter cloacae* SM1-B1 ont montré une capacité à immobiliser le plomb (Pb), tandis que *Serratia marcescens* OPDB3-6-1 a démontré une efficacité dans l'immobilisation du Pb, du Cd et du Cu. De plus, les souches *Pseudomonas* sp. PG-12, *Leclercia adecarboxylata* B3 et *Pseudomonas putida* F2-1 ont également été identifiées comme ayant la capacité de convertir le Pb(II) soluble en une forme insoluble. Ce mécanisme de promotion de l'immobilisation des métaux lourds par les PSB est attribué à leur capacité à produire du phosphore soluble et des métabolites, qui peuvent se lier aux ions de métaux lourds et les transformer en une forme insoluble (**Wan et al., 2020**).

L'étude menée par **Mahdi et al. (2021)** met en lumière la capacité des PSB, en particulier les entérobactéries, à tolérer des concentrations plus élevées de métaux lourds, offrant ainsi des

perspectives prometteuses quant à leur utilisation potentielle en tant qu'agents de bioremédiation. Les bactéries s'adaptent également au stress des métaux lourds en développant divers mécanismes de résistance via des protéines de liaison métallique intracellulaires (**Mahdi et al., 2021**).

▪ **Caractérisation de la Pyoverdine Purifiée par FT-IR**

Les résultats de la spectroscopie FT-IR des sidérophores purifiés sont détaillés dans la Figure 26, mettant en évidence divers pics détectés à différentes longueurs d'onde (cm^{-1}). Le spectre montre une large bande à 3375 cm^{-1} , indicative de la présence d'un groupe OH d'alcool (R-OH) et de l'allongement du groupe N-H, caractéristique des amides secondaires. Une autre bande significative, observée à 2958 cm^{-1} , correspond à la fonction OH libre, généralement associée à l'acide carboxylique (R-COOH), avec la liaison C=O indiquant la présence du groupe carbonyle.

De plus, la bande d'absorption observée à 2300 cm^{-1} peut être associée à la présence de l'anneau benzoïque, tandis que la bande détectée à 1750 cm^{-1} est indicative du groupe C=O. Le spectre révèle également des bandes entre 1208 et 1450 cm^{-1} , caractéristiques de l'allongement du groupe aromatique C=C. Notamment, une bande située à 1333 cm^{-1} est attribuée à l'allongement du groupe C=O. Une deuxième bande, plus fine, à 1041 cm^{-1} correspond aux liaisons C-O et C=N. De plus, une bande au-delà de 980 cm^{-1} est associée à la liaison N-H.

Ces résultats sont cohérents avec la présence de la pyoverdine, comme l'ont également rapporté **Tank et al. (2012)** et **Shainy et al. (2016)**. La détection de bandes entre 1208 et 1450 cm^{-1} , attribuée à l'allongement du groupe aromatique C=C, confirme davantage cette identification. La caractérisation de l'extrait de sidérophore purifié par spectroscopie FT-IR révèle ainsi une composition similaire à celle de la pyoverdine, en accord avec les études antérieures dans le domaine.

▪ **Rôle des sidérophores dans la chélation des métaux lourds :**

Les sidérophores sont des molécules à faible poids moléculaire principalement spécifiques aux ions ferriques, mais ils ont également la capacité de se lier et de chélater d'autres métaux lourds en raison de leurs constantes de stabilité métallo-sidérophore élevées (**Patel, 2016**; **Ghsein et Ezzeddine, 2022**). Lorsque les métaux lourds se lient aux sidérophores libres, ils

entravent la chélation des ions fer, réduisant ainsi la quantité de fer accessible. Cela stimule à son tour la synthèse de plus de sidérophores, aidant à la survie bactérienne ou végétale et offrant une protection partielle contre la toxicité des métaux lourds (**Zhang et al., 2023**).

L'affinité de liaison des sidérophores à divers ions métalliques est influencée par les caractéristiques structurelles de leurs groupes fonctionnels, ainsi que par la taille et la charge des cations. Bien que les motifs de liaison aux métaux à base de soufre et d'azote dans les sidérophores présentent de fortes affinités pour les ions divalents tels que Cu^{2+} , Zn^{2+} et Ni^{2+} , les groupes fonctionnels principaux, qui sont des résidus hydroxamate, catécholate et carboxylate contenant de l'oxygène, ont tendance à préférer les ions trivalents aux ions divalents (**Hofmann et al., 2021**).

Les pyoverdines (PVD), un type de sidérophore, sont particulièrement douées pour chélater une gamme de métaux autres que le fer (**Schalk et al., 2020**). Bien qu'il ait été suggéré que l'interaction métal-sidérophore puisse également contribuer à la liaison du cuivre(II) ou d'autres métaux lourds via la souche *P. veronii* 2E, le cuivre(II) n'a pas favorisé la genèse des sidérophores. Cependant, les sidérophores produits, qui appartiennent à la famille des pyoverdines, peuvent être utilisés comme agents d'extraction efficaces pour les bactéries car ils sont efficaces pour solubiliser et mobiliser de nombreux métaux avec des affinités variables (**Balíková et al., 2022**).

La découverte de l'augmentation de la production de pyoverdine induite par le cuivre est cohérente avec un rôle de la pyoverdine dans la détoxification du cuivre dans les populations de *P. aeruginosa*. Un besoin prolongé de détoxification du cuivre conduit à une évolution continue d'une production accrue de sidérophores (**Lear et al., 2022**).

La voie microbiologique émerge comme la meilleure option pour la production de PVD, par la culture de micro-organismes biologiquement sûrs (agents biologiques du groupe 1), tels que *P. fluorescens*. Dans ce contexte, il est de plus en plus important de connaître plus en profondeur comment les conditions de culture peuvent influencer les niveaux de PVD sécrétés. Bien que *P. fluorescens* ait été largement utilisé comme outil pour la production de PVD, dans le contexte de plusieurs applications, il existe un manque de recherche concernant les facteurs spécifiques régissant la régulation de la libération de PVD, contribuant à une meilleure explication des niveaux de production, et pour comprendre quel est le rôle de la propre molécule dans le processus, comme cela a été fait pour d'autres souches (**Vindeirinho et al., 2020**).

V.3. Effet du cuivre sur la Germination du blé tendre

V.3.1. Le taux de germination et le taux de germination relative

Les résultats de la germination des grains de blé ont été obtenus afin d'évaluer l'impact des différentes concentrations de CuSO_4 (50 et 100 ppm) et de l'inoculation des 4 souches avec le consortium (B5) à effet PGPR sur ce processus.

Le taux de germination relative (TGR) est un indicateur essentiel pour évaluer la capacité des plantes à tolérer le stress induit par le cuivre. Il compare le pourcentage de germination des grains sous stress (exposés au cuivre) par rapport à celui des grains non stressés (témoin, à la concentration 0 de cuivre).

Aucun des deux n'a démontré un effet significatif sur la germination, Bien qu'un taux de germination plus faible observé avec les souches de PGPR par rapport au témoin, cela pourrait indiquer que les bactéries PGPR ont un effet négligeable ou négatif sur la germination des grains de blé dans ces conditions particulières. Cette observation peut être attribuée à divers facteurs, tels que des interactions complexes entre les bactéries et les plantes. L'augmentation du taux de germination en présence de cuivre dans cette expérience peut être le résultat de divers facteurs, notamment les effets stimulants du cuivre à des concentrations appropriées.

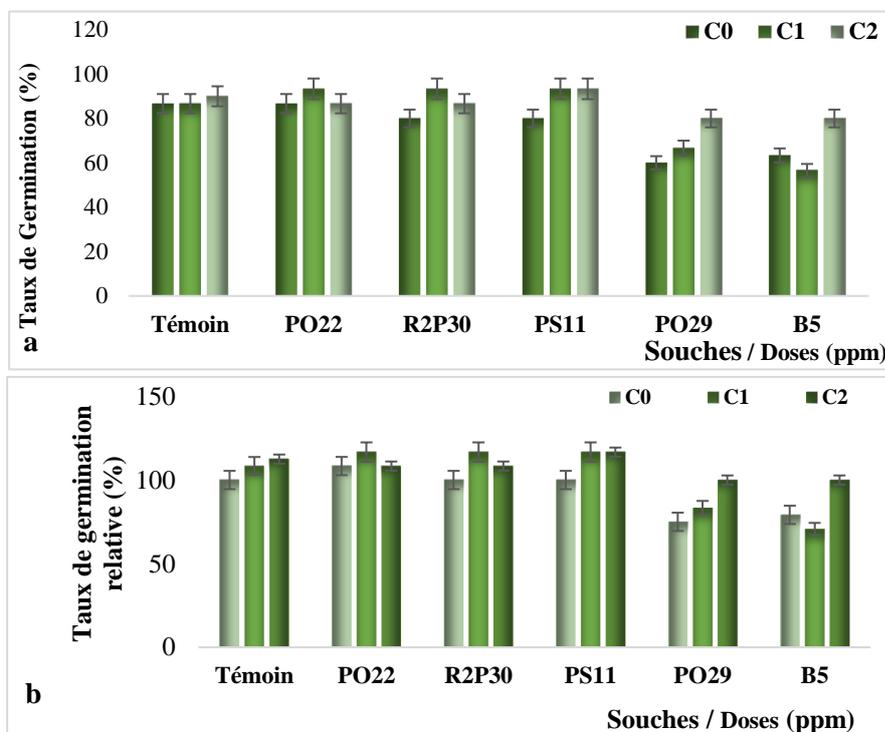


Figure 28 : Effet du cuivre sur le taux de germination ^a et le taux de germination relative ^b.

V.3.2. L'Indice de tolérance :

L'indice de tolérance (I.T.) est une mesure de la capacité des plantes à tolérer un stress, dans ce cas précis, la présence de cuivre à différentes concentrations et l'inoculation de PGPR. Un I.T. plus élevé indique une meilleure tolérance au stress. Nous remarquons que pour le groupe témoin, l'I.T. diminue avec l'augmentation de la concentration de cuivre, indiquant une diminution de la tolérance au stress. Cependant, pour les autres souches, ainsi que pour le consortium des conditions expérimentales, l'I.T. peut varier de manière différente en fonction de la souche de PGPR et de la concentration de cuivre.

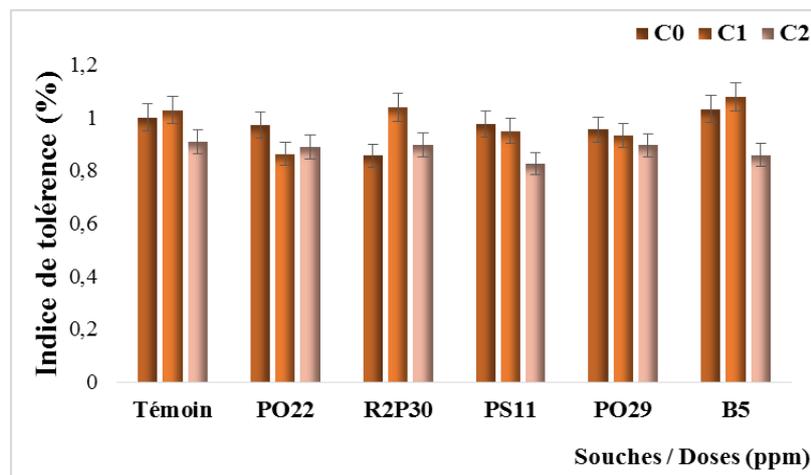


Figure 29 : Effet du cuivre sur l'indice de tolérance

V.3.3. Longueur des plantules :

L'analyse de la longueur des plantules révèle des variations notables en fonction des conditions expérimentales. Dans la majorité des cas, une corrélation entre l'augmentation de la concentration de cuivre et la diminution de la longueur des plantules est observée. Néanmoins, des exceptions se présentent, où la longueur des plantules peut au contraire augmenter à certaines concentrations de cuivre ou avec certaines souches de PGPR.

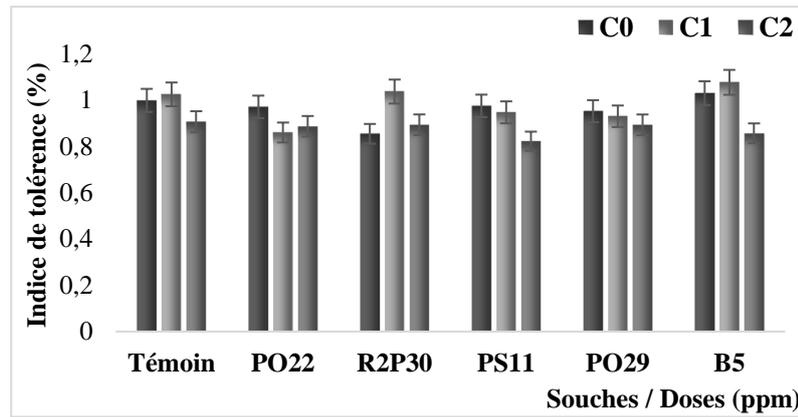


Figure 30 : Effet du cuivre sur la longueur des plantules.

Bien que les résultats ne révèlent aucun effet significatif du cuivre et de l'inoculation bactérienne par les PGPR sur la longueur des plantules, une observation attentive des racines révèle un impact notable. En effet, l'expérimentation démontre une réduction de la longueur des racines ainsi qu'une augmentation de la ramification des poils absorbants, ce qui peut affecter leur capacité à explorer le sol pour l'absorption de l'eau et des nutriments.

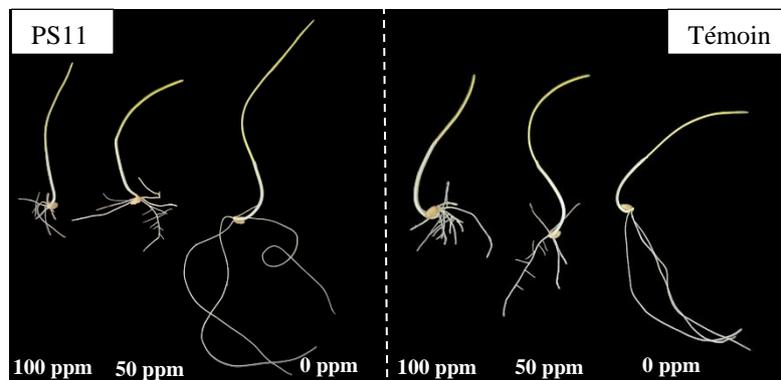


Figure 31 : Effet du cuivre sur la longueur des racines et des plantules.

V.3.2. Impact de l'inoculation bactérienne sur la croissance du blé tendre en conditions de stress métallique

V.3.2.1. Contenu en eau relative des feuilles (RWC) :

Les moyennes des indices de contenu en eau relative (RWC) ont été évaluées à différentes concentrations de cuivre. À l'absence de cuivre, les valeurs moyennes d'indice RWC varient de

79,75% pour *Pseudomonas sp.* (PS11) à 96,36% pour *P.lactis* (R2P30), révélant une certaine diversité dans la réponse des plantes aux différentes concentrations de cuivre.

À la concentration 200 ppm, les moyennes d'indice RWC varient de 65,87% (le groupe témoin) et 78,79% pour *Pseudomonas sp.* (PS11). Globalement, une diminution de l'indice RWC par rapport à la concentration 0 est observée, suggérant un impact potentiel du cuivre sur l'hydratation des tissus.

À la concentration 500 ppm, les moyennes d'indice RWC varient de 53,55% pour *P. atacamensis* (PO22) à 81,50% pour le consortium (B5). Une baisse de l'indice RWC par rapport à la concentration 0 est constatée, indiquant un effet négatif accru du cuivre sur l'hydratation des tissus à des concentrations plus élevées.

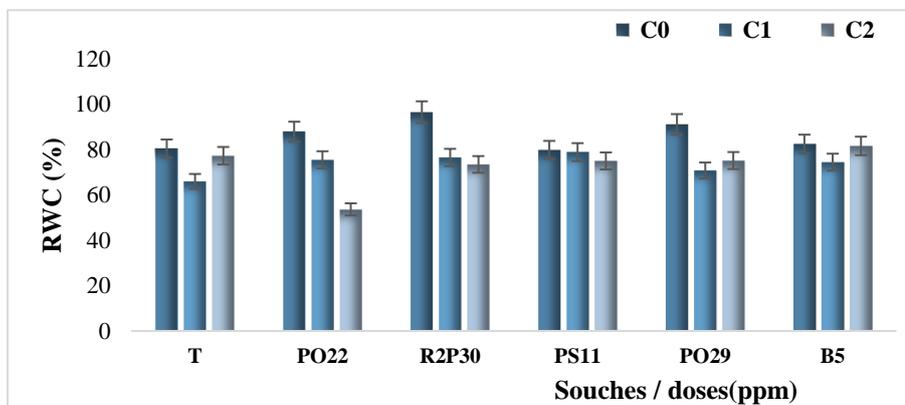


Figure 32 : Impact de Cu et l'inoculation des PGPR sur la RWC.

V.3.2.2. Fuite d'électrolyte

Les pourcentages de fuite d'électrolyte ont été évalués à différentes concentrations de cuivre. À l'absence de cuivre, ces pourcentages varient de 24,72% *P. atacamensis* (PO29) à 78,71% *P. atacamensis* (PO22), soulignant une variation significative dans la réponse des plantes à différentes concentrations de cuivre. À la concentration 200 ppm, les pourcentages de fuite d'électrolyte fluctuent entre 53,84% pour *Pseudomonas sp.*(PS11) et 73,73% (le groupe témoin). Globalement, une augmentation de la fuite d'électrolyte par rapport à la concentration 0 est observée, indiquant un effet négatif du cuivre sur l'intégrité membranaire.

À la concentration 500 ppm, de cuivre, les pourcentages de fuite d'électrolyte varient entre 45,63% pour *P.lactis* (R2P30) et 66,31% (le groupe témoin). Encore une fois, une augmentation

de la fuite d'électrolyte par rapport à la concentration 0 est constatée, suggérant un effet négatif accru du cuivre sur l'intégrité membranaire à des concentrations plus élevées.

Ces observations mettent en évidence une relation dose-réponse entre le cuivre et la fuite d'électrolyte, révélant l'impact néfaste du cuivre sur la stabilité membranaire des plantes.

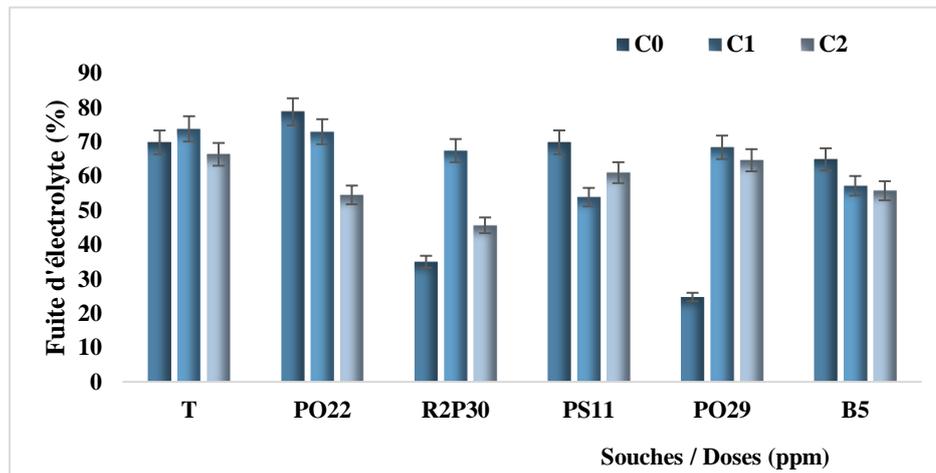


Figure 33 : Impact de Cu et l'inoculation des PGPR sur la fuite d'électrolyte

V.3.2.3. Teneur en Chlorophylle

L'analyse de la variance des résultats du dosage des pigments chlorophylliens contenue dans les différents échantillons de feuilles de blé traité révèle que la teneur en chlorophylle est affectée significativement par l'accroissement du CuSO_4 et l'inoculation bactérienne.

La teneur en chlorophylle (Chl_a , Chl_b et $\text{Chl}_{\text{totale}}$) a été évaluée dans différentes conditions expérimentales impliquant l'absence de cuivre (C0) ainsi que des concentrations croissantes de cuivre (200 ppm et 500 ppm).

A l'absence de cuivre, les valeurs de chlorophylle totale varient de manière significative, allant d'environ $20,81 \pm 3$ mg/g (dans le groupe témoin) à $32,65 \pm 4$ mg/g pour *P. atacamensis* (PO22),

A la concentration 200 ppm, on observe des diminutions de 3 à 25% des concentrations de chlorophylle totale, avec des valeurs fluctuant entre environ $17,46 \pm 5$ mg/g (dans le groupe témoin) et $24,59 \pm 5$ mg/g pour *P. atacamensis* (PO22). Tandis qu'à la concentration 500 ppm, les baisses sont plus prononcées, variant de 29 à 70%, avec des valeurs de chlorophylle totale se situant entre environ $6,9 \pm 2$ mg/g *P. atacamensis* (PO29). et $23,04 \pm 5$ mg/g *P. atacamensis* (PO22), démontrant une diminution générale par rapport à la condition sans cuivre dans la plupart des groupes.

Les mêmes observations peuvent être faites pour les chlorophylles a et b, avec des variations entre les groupes et des diminutions générales observées par rapport à la concentration 0 à des concentrations plus élevées de cuivre.

Les résultats révèlent des variations dans les taux d'augmentation de la production totale de chlorophylle pour chaque souche de PGPR par rapport au témoin, à l'absence du stress métallique. La souche *P.atacamensis* (PO22) s'est distinguée avec le taux le plus élevé, atteignant jusqu'à 56,92 %, tandis que la souche *P.atacamensis* (PO29) a enregistré le taux le plus modeste, avec seulement 13,12 %.

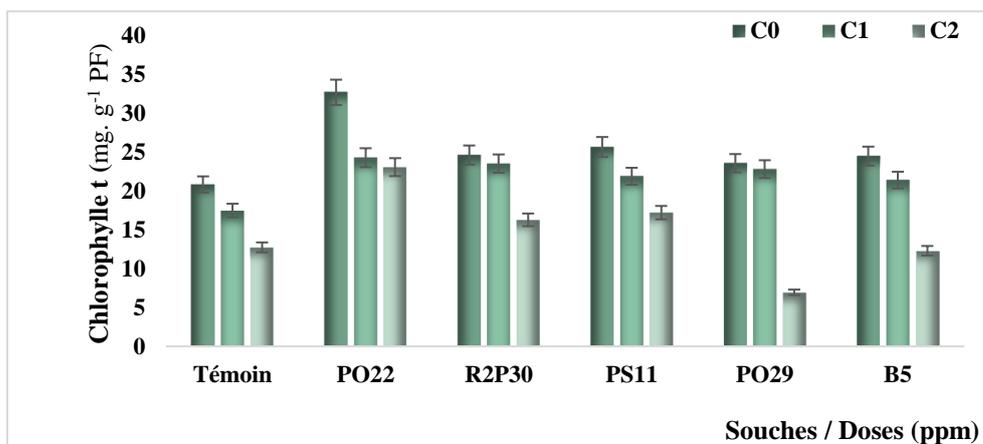


Figure 34 : Impact de Cu et l'inoculation des PGPR sur la teneur en chlorophylle.

Le tableau 06 présente les valeurs moyennes de chlorophylle totale (mg.g¹ PF) de *Triticum aestivum* L. traitées à différentes concentrations de cuivre et inoculées avec diverses souches de PGPR. Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type. Les lettres (a, b et c) indiquent les groupes homogènes tels que déterminés par l'analyse ANOVA, permettant ainsi de distinguer les effets significatifs des différents traitements sur la teneur en chlorophylle.

Tableau 6 : Valeurs moyennes de chlorophylle de *Triticum aestivum* L.

Souches	Témoin	PO22	R2P30	PS11	PO29	B5
Chlorophylle Total (mg.g ¹ PF)	17 a±1,4	26,1c ±1,6	22 bc ±1,3	21,6 a ±1,4	17,8 ab ±2,1	19,4 ab±1,7

V.3.2.4. La teneur en Proline

L'analyse de la variance des résultats de dosage de la proline des feuilles de plantules de blé indique une influence significative ($p < 0.05$) de l'augmentation de la concentration de CuSO_4 dans le milieu, ainsi que de l'inoculation des PGPR, sur la teneur en proline.

En l'absence de cuivre, une concentration minimale de proline équivalente à $26,71 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ de la matière fraîche a été observée pour le groupe témoin, tandis qu'une concentration maximale de $75,3 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ a été mesurée pour la souche *Pseudomonas sp.* (PS11).

À la concentration de 200 ppm, les valeurs de proline varient entre $22,93 \pm 3 \mu\text{g/ml}$ pour la souche B5 (consortium) et $39,93 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ pour la souche *P. atacamensis* (PO22). En comparaison, le témoin présente une valeur de $29,18 \pm 2 \mu\text{g/ml}$ à cette concentration. Pour ce qui est de la concentration de 500 ppm, les valeurs de proline vont de $43,34 \pm 5 \mu\text{g/ml}$ pour la souche *P. atacamensis* (PO29) à $107,84 \pm 12 \mu\text{g/ml}$ pour la souche *P. atacamensis* (PO22). En comparaison, le témoin présente une valeur de $53,59 \pm 5 \mu\text{g/ml}$.

Ces résultats soulignent des différences significatives dans les niveaux de proline entre les souches PGPR et le témoin à chaque concentration de cuivre. Ils mettent en évidence la capacité des souches PGPR à influencer la production de proline en réponse au stress métallique, avec des variations remarquables entre les souches.

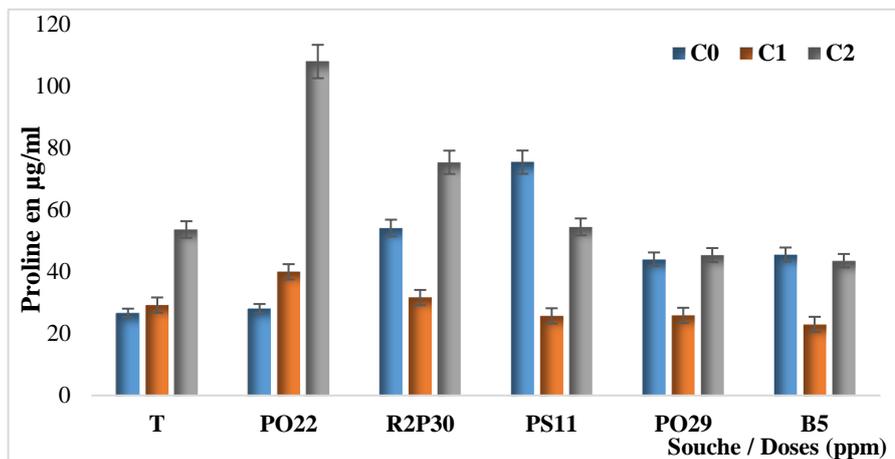


Figure 35 : Impact de Cu et l'inoculation des PGPR sur la teneur en proline.

Les concentrations de proline dans les différentes souches de *Triticum aestivum* L. ont été mesurées après traitement avec diverses concentrations de cuivre. Les valeurs moyennes de la proline ainsi obtenues, ainsi que leurs écarts types, sont présentées dans le Tableau 7. Les lettres

(a et b) indiquent les groupes homogènes déterminés par l'analyse de variance (ANOVA), mettant en évidence les différences significatives entre les souches

Tableau 7 : Valeurs moyennes de la proline de *Triticum aestivum* L.

Souches	Témoin	PO22	R2P30	PS11	PO29	B5
Chlorophylle	37,1 ab ± 3.1	58,6 b ± 8.7	53,6 ab ± 4	50,4 ab ± 5	37,9 a ± 2	36,9 a ± 2
Total (mg.g ⁻¹ PF)						

V.3.2. 5. L'acquisition des éléments nutritifs

V.3.2.5.1. Au niveau racinaire

L'application des PGPR a eu un impact significatif ($p < 0.05$) sur l'absorption des éléments nutritifs par les plantes de blé (Figure 36 et 37). Les résultats ont montré une augmentation significative de l'absorption des éléments nutritifs par les pousses, notamment du calcium, du fer, du phosphore et du cuivre, après l'inoculation avec différentes souches de PGPR. Le consortium B5, composée des souches PO22, PS11, R2P30 et PO29, s'est révélée particulièrement efficace, induisant des augmentations substantielles dans plusieurs éléments nutritifs.

Pour le calcium, le consortium bactérien (B5) a induit la plus grande augmentation de l'absorption, avec un accroissement de 260,74 % par rapport au contrôle non inoculé, suivi de PO22, PS11 et R2P30 avec des augmentations de 18,63 %, 1,22 % et 5,8 % respectivement.

En ce qui concerne le fer, l'inoculant B5 a entraîné une augmentation de 41,25 %, tandis que d'autres souches comme PO22 et PS11 ont montré des augmentations de 13,02 % et 7,18 % respectivement.

Pour le phosphore, l'inoculant B5 a provoqué une augmentation de 21,16 %, tandis que R2P30 a affiché une augmentation de 8,41 %.

Quant au cuivre, le traitement par la souche R2P30 a présenté la plus forte augmentation, avec 40,82 %, suivi de près par l'inoculant B5 avec 23,53 %, puis PS11 avec 18,81 %, PO22 avec 7,29 %, et enfin PO29 avec 4,88 %.

V.3.2.5.2. Au niveau aérien

Les effets des inoculants B5, PO22, R2P30 et PO29 sur le dosage des éléments nutritifs dans la partie aérienne des plantes de blé ont été évalués (Figure 36 et 37). Pour le calcium, les plantes traitées avec l'inoculant PO29 ont montré la plus forte augmentation, avec une augmentation de 99,81 %, suivies par le consortium B5 avec une augmentation de 89,32 %. Les inoculants PO22, PS11 et R2P30 ont également entraîné des augmentations, bien que moins importantes, avec des pourcentages respectifs de 78,32 %, 35,30 % et 19,46 %.

En ce qui concerne le fer, les plantes traitées avec le consortium B5 ont présenté la plus forte augmentation, avec une augmentation de 86,5 %. Les souches PO22, R2P30 et PO29 ont également montré des augmentations, avec des pourcentages respectifs de 69,27 %, 25,23 % et 14,81 %.

Pour le potassium, les pourcentages de concentration dans les plantes de blé sont de 44,5 % pour l'inoculant B5, suivi de PS11 et PO29 avec 34,64 % et 31,77 % respectivement.

Pour le magnésium, les valeurs de concentration dans les plantes de blé sont de 115,06 % pour l'inoculant PO29, suivi de B5, PS11, PO29 et R2P30 avec 102,94 %, 80,72 %, 59,03 % et 18,87 % respectivement.

En ce qui concerne le manganèse, les valeurs de concentration dans les plantes de blé sont de 25,73 % pour l'inoculant PO29, suivi de B5, PO22 et PS11 avec 16,34 %, 7,33 % et 1,629 % respectivement.

Pour le phosphore, les valeurs de concentration dans les plantes de blé sont de 85,76 % pour l'inoculant PO29, suivi de PS11 et B5 avec 65,26 % et 55,90 % respectivement.

Pour le zinc, les valeurs de concentration dans les plantes de blé sont de 83,56 % pour l'inoculant R2P30, 25,73 % pour l'inoculant PS11, 19,41 % pour l'inoculant PO22 et 14,10 % pour l'inoculant PO29.

En ce qui concerne le cuivre, les plantes traitées avec l'inoculant PO29 ont montré la plus forte augmentation, avec des valeurs respectives de 118,91 %, suivies de 118,16 % pour l'inoculant PO22, 110,44 % pour l'inoculant R2P30, 99 % pour l'inoculant B5 et 90,36 % pour l'inoculant PS11. Les résultats sont illustrés dans l'histogramme ci-dessous.

La souche PO22 se distingue par sa capacité exceptionnelle à produire des sidérophores, ce qui se traduit par une abondance de fer dans ses parties racinaires et aériennes. Cette richesse en fer favorise une augmentation significative de la production de chlorophylle. En conséquence, la souche PO22 émerge comme la meilleure productrice de chlorophylle parmi les souches étudiées. Cette capacité à synthétiser des sidérophores et à favoriser l'accumulation de fer dans la plante démontre le potentiel de la souche PO22 en tant que promoteur de la croissance végétale. En contraste, le groupe témoin, dépourvu de la bactérie productrice de sidérophores, a montré une absence de cette capacité et une faible teneur en fer dans ses parties racinaires et aériennes. Cette situation a entraîné une production réduite de chlorophylle.

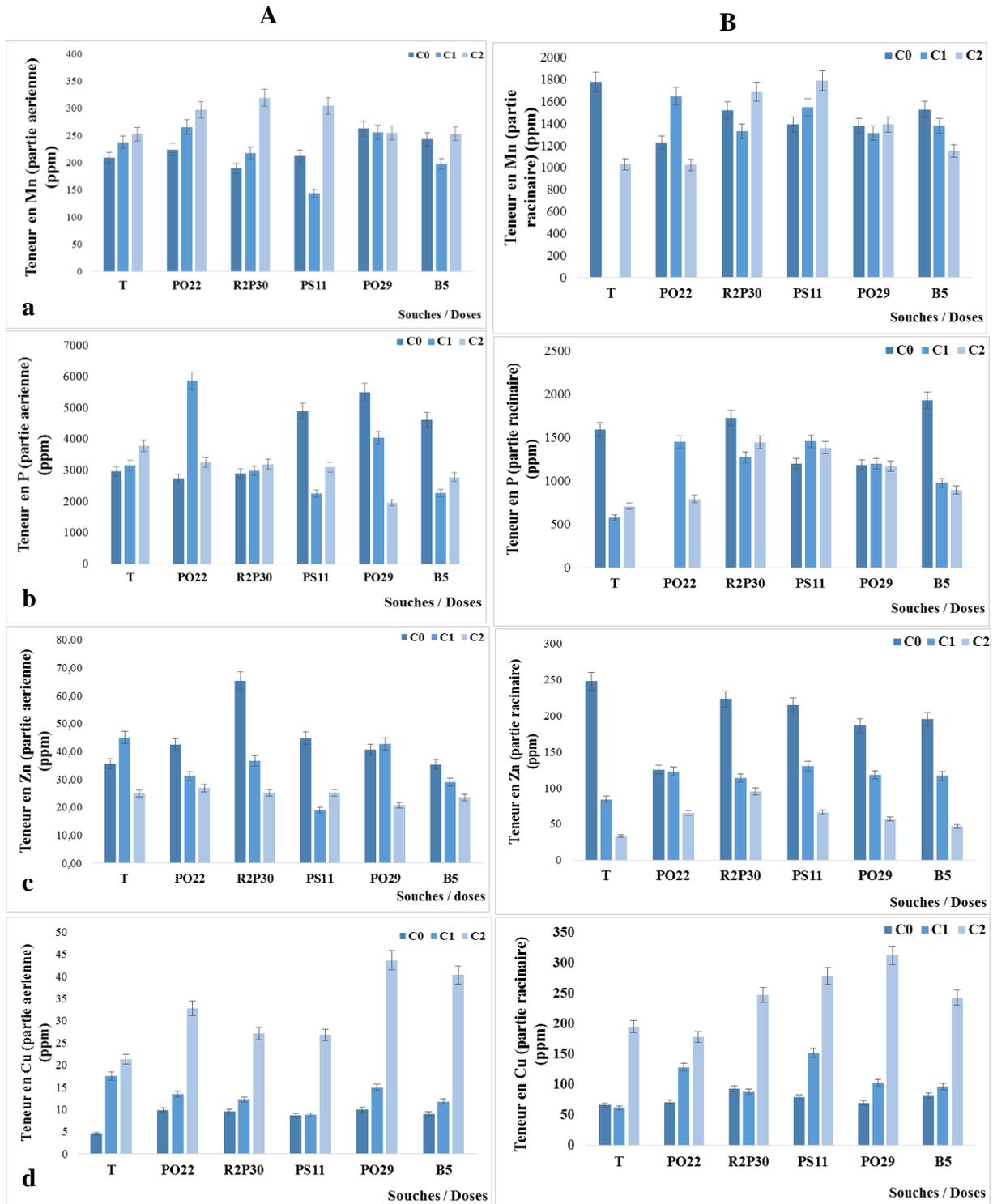


Figure 37 : Effet du cuivre et des PGPR sur la teneur en manganèse^a, en phosphore^b, en zinc^c et en cuivre^d chez le blé. Les parties aériennes et racinaires sont présentées par A et B respectivement.

V.3.2.6. Paramètres morphologiques

L'analyse statistique des résultats concernant l'influence de l'inoculation des PGPR et du stress métallique sur différents paramètres morphologiques, effectuée à l'aide du test ANOVA, a démontré un effet significatif sur la croissance des plantes

V.3.2.6.1. Effet du cuivre sur la biomasse fraîche aérienne et racinaire

La biomasse fraîche aérienne et racinaire de *Triticum aestivum* L. a diminué progressivement avec l'augmentation des doses de cuivre dans le sol. Elle a diminué de 39% à la concentration de 200 ppm et de 51,8% à la concentration de 500 ppm pour la partie racinaire, et de 5,8% à la concentration de 200 ppm et de 10,4% à la concentration de 500 ppm pour la partie aérienne.

V.3.2.6.2. Poids frais de la partie aérienne

À l'absence du cuivre (0 ppm), une variation significative est observée dans l'augmentation du poids frais de la partie aérienne parmi les différentes souches de PGPR. La souche B5 affiche la plus forte augmentation, avec une valeur maximale de 31,94%, témoignant de son potentiel à favoriser la croissance de la partie aérienne des plantules. En revanche, la souche R2P30 présente la plus faible augmentation, avec une valeur minimale de 15,43%.

Pour la concentration de cuivre de 200 ppm, une tendance similaire est observée, bien que les valeurs d'augmentation varient selon les souches. La souche PO29 affiche la plus forte augmentation avec 80,79%, indiquant une réponse positive du poids frais de la partie aérienne des plantules à cette concentration de cuivre. D'autre part, la souche PS11 enregistre une augmentation notable de 39,22%, soulignant également son potentiel bénéfique.

Enfin, pour la concentration de cuivre de 500 ppm, les effets sur l'augmentation du poids frais de la partie aérienne sont moins favorables. Cependant, certaines souches présentent toujours une augmentation, bien que moins importante. La souche B5 affiche la plus forte augmentation avec 61,38%, soulignant la tolérance différenciée des souches à des concentrations élevées de cuivre.

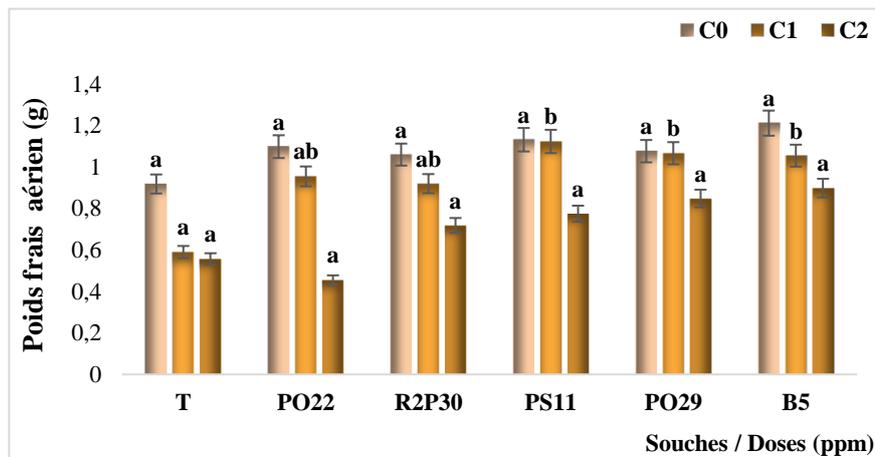


Figure 38 : La biomasse aérienne des plantes.

V.3.2.6.3. Poids frais des racines

A l'absence du cuivre (0 ppm), une variation significative ($p < 0.05$) est observée dans l'augmentation du poids frais des racines parmi les différentes souches de PGPR. La souche PO29 affiche la plus forte augmentation, avec une valeur maximale de 39,95%, témoignant de son potentiel à favoriser la croissance des racines. En revanche, les souches PO22 et B5 présentent les plus fortes diminutions, avec des valeurs minimales de 38,73% et 37,25% respectivement.

Pour la concentration de cuivre de 200 ppm, une tendance similaire est observée, bien que les valeurs d'augmentation varient selon les souches. La souche PO29 affiche la plus forte augmentation avec 200,69%, indiquant une réponse positive du poids frais des racines à cette concentration de cuivre. D'autre part, la souche R2P30 enregistre une augmentation notable de 75,86%, soulignant également son potentiel bénéfique.

Enfin, pour la concentration de cuivre de 500 ppm, les effets sur l'augmentation du poids frais des racines sont moins favorables. Cependant, certaines souches présentent toujours une augmentation, bien que moins importante. La souche B5 affiche la plus forte augmentation avec 73,6%, soulignant la tolérance différenciée des souches à des concentrations élevées de cuivre.

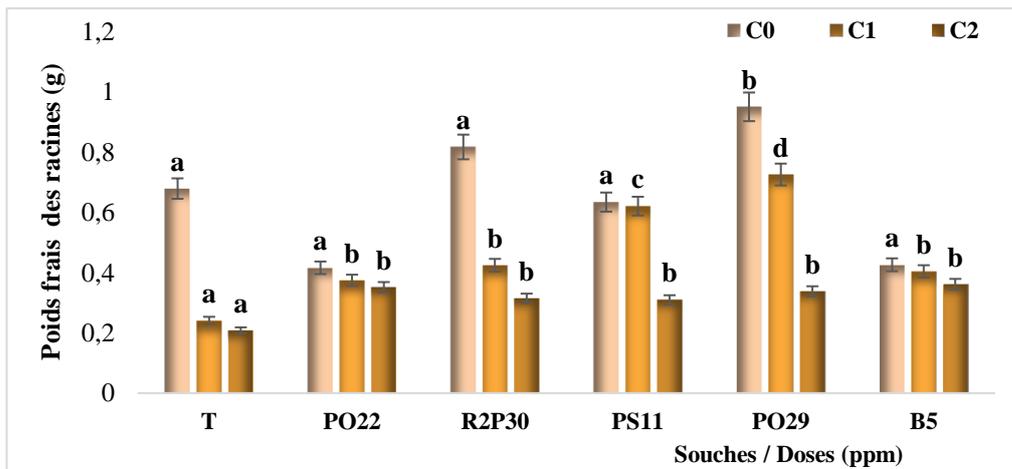


Figure 39 : La biomasse racinaire des plantes.

V.3.2.6.4. Longueur des racines

La longueur des parties aériennes et racinaires de *Triticum aestivum* L. a diminué avec l'augmentation des doses de cuivre ($p < 0.05$) dans le sol. En revanche, l'inoculation des PGPR n'a pas montré de différence significative ($p > 0.05$).

A l'absence du cuivre (0 ppm), une variation est observée dans l'augmentation de la longueur des racines parmi les différentes souches de PGPR. La souche PS11 affiche la plus forte augmentation, avec une valeur maximale de 25,13%, témoignant de son potentiel à favoriser la croissance racinaire. En revanche, la souche PO22 présente la diminution la moins importante, avec une valeur minimale de 8,72%.

Pour la concentration de cuivre de 200 ppm, une tendance similaire est observée, bien que les valeurs d'augmentation varient selon les souches. La souche PS11 maintient sa position en tête avec une augmentation maximale de 36,65%, indiquant une réponse positive de la croissance racinaire à cette concentration de cuivre. D'autre part, la souche B5 enregistre une augmentation notable de 29,32%, soulignant également son potentiel bénéfique.

Enfin, pour la concentration de cuivre de 500 ppm, les effets sur l'augmentation de la longueur des racines sont moins favorables. Cependant, certaines souches présentent toujours une augmentation, bien que moins importante. La souche R2P30 affiche la plus forte augmentation avec 8,90%, tandis que la souche PS11 maintient un effet positif avec une augmentation de 4,19%. En revanche, les souches PO22 et B5 enregistrent des diminutions

significatives, soulignant la sensibilité différenciée des souches à des concentrations élevées de cuivre.

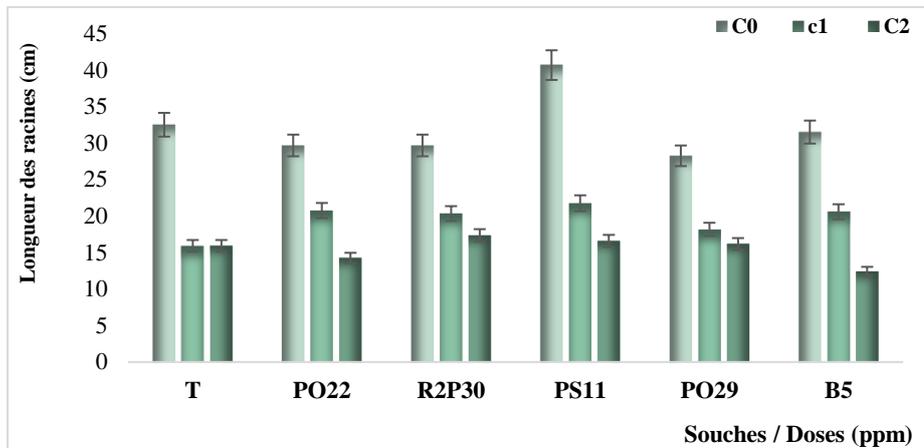


Figure 40 : La longueur des parties racinaire des plantes

V.3.2.6.5. Longueur de la partie aérienne

A l'absence du cuivre (0 ppm), une variation significative ($p < 0.05$) est observée dans l'augmentation de la longueur de la partie aérienne parmi les différentes souches de PGPR. La souche PS11 affiche la plus forte augmentation, avec une valeur maximale de 4,49%, témoignant de son potentiel à favoriser la croissance de la partie aérienne des plantules. En revanche, la souche PO22 présente la diminution la moins importante, avec une valeur minimale de 6,12%.

Pour la concentration de cuivre de 200 ppm, une tendance similaire est observée, bien que les valeurs d'augmentation varient selon les souches. La souche PO29 affiche la plus forte augmentation avec 5,80%, indiquant une réponse positive de la partie aérienne des plantules à cette concentration de cuivre. D'autre part, la souche PS11 enregistre une augmentation notable de 1,79%, soulignant également son potentiel bénéfique.

Enfin, pour la concentration de cuivre de 500 ppm, les effets sur l'augmentation de la longueur de la partie aérienne sont moins favorables. Cependant, certaines souches présentent toujours une augmentation, bien que moins importante. La souche B5 affiche la plus forte augmentation avec 5,13%, tandis que la souche PS11 maintient un effet positif avec une augmentation de 4,24%. En revanche, les souches PO22 et PO29 enregistrent des diminutions significatives, soulignant la sensibilité différenciée des souches à des concentrations élevées de cuivre.

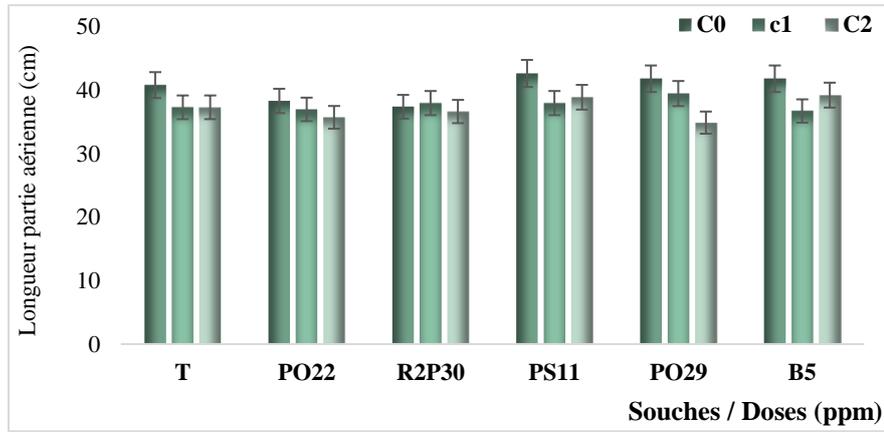


Figure 41: La longueur des parties aérienne des plantes



Figure 42 : Effet du cuivre sur la biomasse racinaire et aérienne des plantes

Discussion :

Le cuivre est un micronutriment essentiel nécessaire en très faible concentration par les plantes pour leur croissance et leur développement appropriés (**Rather et al., 2020 ; Shabbir et al., 2020 ; Pradeep et Aishwarya, 2023**), et il est un composant vital de plusieurs biomolécules. En excès par rapport à sa concentration admissible, il a une influence néfaste élevée sur la germination des grains et la croissance des plantes (**Rather et al., 2020**)

Comme de nombreuses plantes, le blé est également sensible aux métaux lourds. Une fois que les métaux lourds pénètrent dans les plantes, le stress déclenche différentes réponses chez les plantes, allant de la germination à la croissance, aux réponses biochimiques et aux pertes de rendement chez le blé (**Rizvi et al., 2020**).

La diversité des microorganismes est importante pour les substrats de culture des plantes, et elle varie considérablement. Seules quelques espèces ont un impact positif sur la croissance des plantes ou la teneur en nutriments, tandis que la majorité sont soit neutres, soit inoffensives. Parmi ces organismes, ceux qui sont bénéfiques pour les plantes ont été étudiés depuis de nombreuses années (**Çiğ et al., 2021**). Dans le cas des bactéries du sol, cela inclut les rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (PGPR), qui peuvent stimuler la croissance des racines, améliorer l'absorption des nutriments, soulager le stress des plantes ou protéger les plantes contre les pathogènes (**Valente et al., 2020**).

Les PGPR tolérants aux métaux peuvent avoir un impact positif sur la production de blé, même lorsqu'ils sont appliqués dans des sols contaminés par des métaux, en fournissant des macro et micro-nutriments, et en sécrétant des biomolécules actives telles que les EPS, les mélanines et la métallothionéine (MTs) (**Rizvi et al., 2020**).

- **La germination des grains :**

Dans l'étude de **Iqbel et al. (2020)** sur l'Avoine, les grains traités avec 100 ppm de CuSO_4 ont montré une vitesse de germination plus élevée (602,57) par rapport à celles traitées avec 200 ppm (635,73), indiquant que le CuSO_4 retardait la germination des grains d'*Avena sativa* L. Les valeurs de $P(T \leq t)$ étaient de 0,02 pour 100 ppm et de 0,04 pour 200 ppm, suggérant que les deux traitements au CuSO_4 avaient des effets significatifs sur la germination.

Dans une autre étude menée par **Khan et al. (2020)**, le traitement nutritionnel a également été évalué pour son effet sur la germination du blé *Triticum aestivum* L. Les résultats ont montré une amélioration du pourcentage de germination avec les deux concentrations de 100 ppm et 200 ppm de ZnSO₄ et CuSO₄. Cependant, le ZnSO₄ a montré une amélioration significativement plus importante ($P < 0,05$) par rapport au CuSO₄. Le ZnSO₄ a atteint un pourcentage de germination maximum significatif de $95,23 \pm 4,26$ sous 0 mM de stress.

Concernant l'inoculation de deux variétés de blé avec les souches *Pantoea agglomerans* (Pa) et *Bacillus thuringiensis* (B25), ou leur combinaison, les résultats ont montré une augmentation significative de l'indice de vigueur en longueur et en poids des grains, mais pas de changements significatifs dans le pourcentage final et l'indice de germination des grains. Cette amélioration a été observée principalement dans la variété Boutaleb (**Saadaoui et al., 2022**).

Cependant, une étude ultérieure menée par **Kerbab et al. (2021)** a examiné l'effet de différentes souches bactériennes, notamment *Bacillus atropheus*, sur la germination du blé dur *Triticum durum*, avec ou sans ajout de sel. Les résultats ont montré une amélioration significative de la germination, en particulier avec les combinaisons des souches *Bacillus atropheus*.

Enfin, dans les investigations **Bayat et al. (2022)** sur la germination des grains de lin, le trempage des grains dans une solution de 100 ppm de NP C-ZnO a favorisé un taux de germination maximal de 90 %. Cependant, d'autres traitements ont montré des effets variables, certains se révélant même toxiques pour la germination, comme le traitement avec 150 ppm d'AgNO₃.

- **La pression de turgescence des feuilles :**

Le RWC représente essentiellement la mesure du contenu en eau actuel des tissus foliaires par rapport à leur capacité maximale de rétention d'eau lorsqu'ils sont totalement turgescents (**Nithinkumar et al., 2024**). Il constitue un indicateur du pourcentage de la teneur en eau dans une feuille en tant que fraction de l'eau volumétrique totale qu'une feuille peut contenir et maintenir une turgescence (**Rahman et al., 2021**), avec des valeurs typiques de RWC allant de 98 % dans les feuilles bien hydratées et activement transpirantes à environ 40 % dans les feuilles sévèrement desséchées et mourantes (**Nithinkumar et al., 2024**).

Dans nos résultats, nous avons observé une diminution significative des teneurs en eau relatives (RWC) dans les feuilles de *T. aestivum* exposées à la toxicité du cuivre, ce qui reflète la perte de pression de turgescence des feuilles, entraînant le flétrissement des plantes et la flaccidité des cellules (Rahman *et al.*, 2021)

Parallèlement, Selon l'étude de Heile *et al.* (2021), les teneurs relatives en eau ont été réduites en raison du stress au Cd dans les cultures de blé. Comparativement aux pots témoins sans stress où seule de l'eau distillée a été appliquée, le RWC a diminué de 24,90 % en réponse au stress au Cd.

Cependant, selon l'étude de Neshat *et al.* (2022), le traitement bactérien a significativement réduit d'environ 16 % les dommages causés par l'effet destructeur du sodium sur le RWC, en particulier sous une concentration de sel de 100 mM. Cette observation est cohérente pour les deux souches bactériennes testées.

- **Fuite d'électrolyte :**

Les plantes cultivées dans un sol contenant du cuivre ont montré une augmentation de la fuite d'électrolyte par rapport à celles cultivées dans un sol sans cuivre (Javed *et al.*, 2021). Les plantes traitées avec du cuivre à une concentration de 100 mg kg⁻¹ ont présenté une augmentation significative de la fuite d'électrolyte (EL) de 28,70 % par rapport aux plantes témoins. Dans les plants de tomate soumis à un stress au Cuivre par rapport à leurs plants témoins, on observe une augmentation de la production de radicaux libres, probablement induite par le Cuivre, ce qui entraîne une déstabilisation de la membrane et donc une augmentation de sa perméabilité (Nazir *et al.*, 2021).

L'étude réalisée par Ali *et al.* (2022) sur la culture de *Zea mays* L., inoculée avec *Enterobacter cloacae* PM23, a révélé une diminution significative de la fuite d'électrolyte (14 à 19 %) sous un stress salin. Cette souche, reconnue pour ses effets promoteurs de croissance des plantes (PGP), a démontré son efficacité dans la réduction des dommages causés par le stress salin.

Parallèlement, L'étude menée par Xia *et al.* (2020) a révélé une augmentation de la fuite d'électrolytes chez les plantes de canne à sucre infectées par le pathogène par rapport aux plantes non infectées et au témoin non inoculé. En revanche, les plantes de canne à sucre inoculées par *B. xiamenensis* et infectées par *C. falcatum* ont montré une diminution significative de la fuite d'électrolytes allant jusqu'à 30 % par rapport aux plantes non traitées.

Ces résultats mettent en évidence le potentiel bénéfique de l'inoculation de *B. xiamenensis* dans la réduction des dommages causés par l'infection par *C. falcatum*, soulignant ainsi le rôle des bactéries bénéfiques dans la protection des plantes contre les pathogènes.

Cependant **Nazim et Bano (2024)** ont observé que la fuite d'électrolytes était maximale dans le groupe témoin (T0), tandis qu'elle était minimale dans tous les génotypes du groupe T6 (*Pseudomonas* + Acide salicylique), suivi par T5 (*Bacillus* + Acide salicylique) et T4 (Acide salicylique).

▪ **La Chlorophylle :**

La chlorophylle, un pigment essentiel à la photosynthèse des plantes, exerce une forte influence sur le statut nutritionnel en azote, la capacité photosynthétique et le rendement des cultures, et constitue un paramètre clé reflétant la croissance des cultures. Une estimation précise et rapide des niveaux de chlorophylle permet d'évaluer efficacement l'environnement de croissance, la gestion de l'eau et des engrais des cultures, informant ainsi les décisions de gestion ultérieures des champs et la prédiction des rendements (**Wu et al., 2023**).

Il est bien connu que les métaux lourds dans l'environnement du sol ont tendance à migrer vers la rhizosphère et sont soumis à l'absorption par les racines des plantes là-bas. Par la suite, ils sont transportés via le xylème et le phloème vers les parties supérieures de la plante (**Adamczyk-Szabela et Wolf, 2024**).

Ce processus de transport des métaux lourds à travers la plante est particulièrement crucial pour les micronutriments essentiels comme le cuivre (Cu). Le Cu est un micronutriment végétal naturellement présent et d'une grande importance, agissant en tant qu'enzyme et coenzyme dans divers processus métaboliques des plantes. Il joue un rôle crucial dans la lignification des parois cellulaires via le métabolisme des polyphénols, influençant ainsi l'équilibre hydrique des plantes. De plus, il contribue aux processus essentiels tels que la photosynthèse, la respiration, la synthèse des glucides et le métabolisme des protéines (**Ahmed et al., 2021**).

Cependant, une accumulation excessive de Cu chez les organismes peut entraîner un déséquilibre nutritionnel et provoquer des dommages oxydatifs, retardant ainsi la croissance des plantes et menaçant leur survie. L'appareil photosynthétique, en particulier, est une cible bien connue des métaux lourds, et la toxicité du Cu altère l'ultrastructure des chloroplastes, nuisant à l'efficacité de la photosynthèse (**Li et al., 2023**).

Des concentrations élevées de cuivre sont associées à la suppression de la photosynthèse, à des perturbations dans l'architecture des membranes thylakoïdes, ainsi qu'à l'inhibition de l'accumulation de chlorophylle et du transport électronique des deux photosystèmes, I et II (**Chowdhury, 2021**).

Des niveaux élevés de cuivre dans la plante diminuent la teneur en fer. Le rapport cuivre-fer optimal varie selon les espèces végétales. En particulier, l'absorption et le transport du fer sont fortement influencés par les concentrations et les proportions d'autres métaux lourds. Le fer est considéré comme un élément jouant un rôle clé dans les mécanismes de la photosynthèse. Il est très courant que les métaux lourds induisent un stress chez les plantes et provoquent des troubles métaboliques multidirectionnels qui limitent davantage la photosynthèse et la productivité en biomasse (**Adamczyk-Szabela et Wolf, 2024**).

D'autre part, le rôle stimulant des PGPR dans la concentration de chlorophylle foliaire a été rapporté par plusieurs chercheurs (**Komal et al., 2022**). La production de sidérophores par les deux souches de PGPR améliore la biodisponibilité de micronutriments tels que le Fe et le Zn en complexant ces éléments (**Abbaszadeh-Dahaji et al., 2021**).

Iqbal et al. (2022) ont souligné l'importance cruciale des niveaux totaux de chlorophylle dans la photosynthèse, tout en notant leur extrême sensibilité aux stress environnementaux. Leur étude a montré que l'inoculation de bactéries tolérantes au cuivre a entraîné une amélioration significative du contenu en chlorophylle par rapport au sol stressé par le cuivre non inoculé. Des résultats similaires ont été rapportés par Islam et al. (2015), qui ont observé une augmentation du contenu en chlorophylle, du nombre de gousses, de la nodulation racinaire et du poids de 1000 grains chez les plantes inoculés par rapport aux non inoculés. Une autre étude a également trouvé que l'inoculation de *P. polymyxa* et *B. circulans* augmentait les pigments photosynthétiques des plantes de maïs, à la fois dans des conditions idéales et sous stress au cuivre dans chaque groupe de traitement (**Iqbal et al., 2022**).

Les niveaux de chlorophylle ont augmenté en raison de l'inoculation de *Klebsiella pneumoniae* chez *Vigna mungo* sous stress au Cd. De même, les contenus en chlorophylle des plants de *Zea mays* ont également augmenté avec l'application d'*Azotobacter chroococcum* en présence de Cu et de Pb (**Chowdhury, 2021**).

La diminution de la teneur en chlorophylle pourrait être le résultat du remplacement du magnésium nécessaire à la biosynthèse de la chlorophylle ou de l'altération ultra-structurale des chloroplastes sous l'effet de la toxicité des métaux. Cette réduction de la teneur en chlorophylle

pourrait être due aux activités inhibées de diverses enzymes associées à la biosynthèse de la chlorophylle (**Alshegaihi et al., 2023**).

Ces résultats sont cohérents avec des études antérieures examinant l'effet des métaux lourds sur la teneur en chlorophylle des plantules de blé (**Li et al., 2023 ; Raza et al., 2024**).

De plus, nos résultats ont montré que le ratio de chlorophylle a/b était significativement réduit par les traitements au CuSO₄. Cette observation est conforme à des études antérieures indiquant que le traitement avec des concentrations de 0,1 M et 0,3 M de composés de Cu a entraîné des niveaux significativement plus bas de chlorophylle a et de chlorophylle totale dans les échantillons traités par rapport au témoin non traité, selon l'étude d'**Atrooz et Bara'ah (2024)** sur l'herbe de blé (*Triticum aestivum*). De plus, le rapport chlorophylle a/b était également plus faible dans les échantillons traités.

- **La Proline :**

Lorsque les plantes sont exposées à des niveaux toxiques de métaux, plusieurs ajustements biochimiques ont lieu au sein des cellules végétales (**Spormann et al., 2023**) parmi ces ajustements on distingue la proline. Un des osmoprotecteurs les plus étudiés dans les plantes cultivées impliquée dans la régulation de l'homéostasie ionique et de l'équilibre redox. La proline et les sucres réducteurs ou non réducteurs sont abondants dans les cellules (**Dikilitas et al., 2020**) cet acide aminé dont l'accumulation dans les plantes a été observée dans diverses conditions de stress (**Hanif et al., 2023**). Les espèces végétales qui accumulent plus de proline sous le stress présentent de meilleures performances physiologiques et une meilleure survie (**Spormann et al., 2023**).

Outre son rôle dans la constitution des protéines, la proline participe également à l'ajustement osmotique cytoplasmique, à la stabilisation des protéines et des membranes, à la préservation de la turgescence cellulaire, à la régulation du potentiel redox cellulaire, à la neutralisation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et au maintien de l'équilibre redox dans les plantes. La supplémentation exogène en proline chez les plantes a entraîné une réponse favorable contre le stress salin ou la sécheresse (**Hanif et al., 2023**).

Des approches récentes ont été utilisées pour réguler et augmenter l'accumulation de la teneur en proline sous l'effet des métaux lourds, afin d'améliorer la tolérance des plantes. Par

exemple, l'inoculation avec des rhizobactéries favorisant la croissance des plantes (**Osmane et al., 2020**)

Les PGPR, en agissant directement et indirectement, favorisent la tolérance des plantes au stress abiotique. Ils induisent l'accumulation d'osmolytes et la signalisation des phytohormones, aidant ainsi les plantes à surmonter le choc initial du stress. De plus, les métabolites secondaires et les composés organiques volatils produits par les PGPR renforcent la croissance des plantes et leur résistance au stress. Par exemple, les polyamines sont cruciales pour les activités physiologiques et défensives des plantes, tandis que pendant le stress hydrique, les plantes inoculées montrent une tolérance accrue, accompagnée d'une augmentation de l'acide abscissique (**Khan et Mehmood, 2023**).

Nos résultats sont cohérents avec d'autres cultures suggèrent que l'inoculation de PGPR peut être une stratégie efficace pour atténuer le stress métallique, Dans l'étude d'**Abdel Latif et al. (2020)**, l'inoculation de PGPR combinée à des doses de Cu a augmenté la teneur en osmolytes chez les plants de maïs, aidant ainsi à maintenir un équilibre hydrique optimal sous stress de Cu. Cette augmentation des osmolytes a favorisé une homéostasie rédox soutenue, bénéfique au métabolisme des plantes.

Les conclusions de l'étude récente de **Bashir et al. (2022)**, impliquant l'inoculation du blé avec des PGPR tels que *Bacillus subtilis* et *Aspergillus niger*, ainsi que l'application de L-proline, mettent en évidence une amélioration significative de la croissance des plantes exposées aux métaux. Ces résultats combinés démontrent que les PGPR et la L-proline exercent un effet bénéfique sur la croissance et le développement des plantes, même en présence de stress dû au cadmium.

Dans une étude récente menée par **Zainab et al. (2021)**, l'inoculation de *B. xiamenensis* et de *B. gibsonii* a entraîné une augmentation significative de la teneur en proline, atteignant respectivement jusqu'à 190 % et 179 %. Malgré une production initialement plus faible de proline chez les plantes de *S. sesban* en conditions de stress métallique, une augmentation de cette production a été observée suite au traitement avec des souches de PGPR tolérantes aux métaux lourds, indiquant ainsi un effet protecteur. Plus précisément, *B. xiamenensis* a augmenté la teneur en proline jusqu'à 117 % et *B. gibsonii* jusqu'à 112 %.

Dans une autre étude menée par **Tirry et al. (2021)**, nos résultats ont également révélé que le stress induit par le Cr (VI) a amplifié l'accumulation de proline dans les plantes de *M. sativa*. L'augmentation de la teneur en proline est couramment observée comme une réponse adaptative

aux stress environnementaux. La proline aide les plantes à faire face à la toxicité liée au stress en régulant l'équilibre osmotique, en détoxifiant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), en stabilisant les enzymes antioxydantes, en modulant l'expression génique et en activant de multiples voies de détoxification. Les memes auteurs ont indiqué que l'inoculation avec des PGPR a entraîné une diminution substantielle de la teneur en proline dans les plantes de *M. sativa*, suggérant que les plantes inoculées étaient moins affectées par le stress au Cr (VI) que les plantes non inoculées.

▪ L'acquisition des éléments nutritifs

Les micronutriments sont des éléments essentiels dans le métabolisme végétal, impactant la croissance, la production, la résistance au stress et aux maladies des plantes. Des éléments tels que le cuivre (Cu), le manganèse (Mn), le fer (Fe) et le zinc (Zn) sont cruciaux à des concentrations optimales (**Rai et al., 2021**).

Le fer, en particulier, joue un rôle central dans divers processus cellulaires, incluant la photosynthèse et la respiration cellulaire (**Feng et al., 2022**). Les recherches de **Sayed et al. (2023)** démontrent la capacité des souches microbiennes tolérantes aux métaux à produire des sidérophores, même en présence de concentrations élevées de Cd, soulignant ainsi leur résilience. D'autres études mettent en lumière le rôle bénéfique de bactéries du sol et de champignons, comme *Bacillus aerophilus* et *Trichoderma virens*, dans la croissance des cultures contaminées par des métaux lourds grâce à la production de sidérophores.

Les recherches de **Ghazy et El-Nahrawy (2021)** ont montré que les pyoverdines de sidérophores de type trihyobroxamate peuvent former des ligands hexadentés avec les ions Fe^{3+} , favorisant ainsi le rendement de diverses cultures. Enfin, les PGPR, en produisant des sidérophores, facilitent la solubilisation et le transport du fer vers des complexes solubles absorbables par les plantes, constituant ainsi un mécanisme crucial pour leur approvisionnement en fer (**Subramaniam et Sundaram, 2020**).

Dans l'étude de **Nawaz et al. (2020)**, l'effet des PGPR sur l'acquisition des éléments nutritifs varie selon les variétés de blé. Chez la variété tolérante au sel (Aas-11), l'absorption de sodium par les racines reste inchangée avec tous les traitements PGPR, mais augmente légèrement dans la variété sensible au sel (Galaxy-13), en particulier avec T2 (*P. fluorescens*) et T4 (*Exiguobacterium aurantiacum*). L'absorption de sodium par les pousses augmente

significativement avec tous les traitements PGPR dans les deux variétés. Concernant le potassium, une augmentation significative est observée dans les racines et les pousses de la variété tolérante au sel avec T4, tandis que T5 (consortium de PGPR) montre une augmentation significative dans la variété sensible au sel. Les traitements PGPR n'ont pas d'effet significatif sur la teneur en calcium des racines, mais augmentent significativement la teneur en calcium des pousses, en particulier avec T5 et T4 dans Aas-11. En résumé, l'application de PGPR affecte différemment l'acquisition des éléments nutritifs selon les variétés de blé, avec des variations dans l'absorption du sodium et du potassium ainsi que dans la teneur en calcium des racines et des pousses.

Selon les recherches de **Çiğ et al (2021)**, L'application de PGPR a entraîné une augmentation des contenus en potassium, calcium et magnésium du blé einkorn, mais une diminution des contenus en phosphore et en sodium. Les plantes traitées avec PGPR ont montré des niveaux de potassium, calcium, phosphore, magnésium et sodium respectivement de 2,496 %, 2,368 %, 0,4452 %, 0,4687 % et 0,2183 %, tandis que les plantes sans PGPR étaient à 2,090 %, 1,97 %, 0,4930 %, 0,4204 % et 0,2304 %. Les contenus les plus élevés en K et Na ont été observés avec l'application de PGPR, tandis que les valeurs les plus élevées de P et Mg ont été obtenues sans PGPR. Les teneurs en Fe, Cu, Mn et Zn ont augmenté avec l'application de biochar, mais ont montré des variations avec l'application de PGPR. La teneur en Fe et Mn a augmenté avec l'application de PGPR, tandis que celle en Zn et Cu a diminué. La teneur en nickel a également augmenté avec l'application de biochar et de PGPR. En résumé, l'application de PGPR a modifié les contenus en éléments nutritifs du blé einkorn, avec des implications potentielles sur sa valeur nutritionnelle.

▪ **Le poids et la longueur des racines et des pousses**

Les diverses bactéries rhizobiennes bénéfiques associées aux céréales ont des effets bénéfiques positifs sur la croissance et le rendement du blé dans différents environnements. L'application de granules de PGPR augmente la longueur des pousses, la longueur des racines, le poids sec des pousses et des racines, le poids des grains par épi, la teneur en azote des pousses et des racines et la teneur en azote des semis (**Devkota, et al., 2020**).

Le cuivre a eu un impact significatif sur le développement des semis, réduisant à la fois la longueur et la biomasse des racines et des pousses. L'inhibition de la croissance des racines a été plus marquée, avec une diminution de 58 % de la longueur des racines et de 13 % du poids

des racines, tandis que la longueur des pousses diminuait de seulement 8 % et le poids de la biomasse des pousses n'était pas significativement affecté. L'effet de l'inoculation sur le développement des semis pendant les 14 jours en l'absence de cuivre dépendait de la souche utilisée. *A. brasilense* Sp7 n'a eu un effet significatif que sur la biomasse des pousses, avec une augmentation de 16 % par rapport au témoin non inoculé. *A. baldaniorum* Sp245 a significativement réduit la longueur des racines de 20 % mais a augmenté la biomasse des racines de 22 %. *A. brasilense* Cd a eu l'impact le plus notable sur les semis, augmentant de manière significative la biomasse des racines et des pousses de 52 % et 53 % respectivement.

(Muratova *et al.*, 2022).

Dans l'étude de Bashir *et al.* (2022), les effets du stress cadmié (à des concentrations de 40 et 80 mg/kg de sol) sur la biomasse végétale ont été examinés, montrant notamment une diminution significative du poids frais des pousses végétales. Pour les deux variétés de blé (V1 et V2), des réductions importantes du poids frais ont été observées chez les plantes non traitées (V1 : 27,54 %, V2 : 31,23 %). En revanche, les plantes de blé traitées avec *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* et L-proline ont montré une augmentation de la biomasse fraîche par rapport aux plantes non traitées. Les pourcentages d'augmentation varient selon les traitements : *Bacillus subtilis* (V1 : 43,86 %, V2 : 46,43 %), *Aspergillus niger* (V1 : 32,50 %, V2 : 28,57 %).

De plus, l'application de PGPR a entraîné une augmentation du poids frais et sec des racines passant de 1,324 g à 1,688 g pour le poids frais, tout comme le poids sec des racines, passant de 0,177 g à 0,289 g (Çiğ *et al.*, 2021).

L'inoculation avec des PGPR a eu un effet significatif sur la longueur des pousses dans la variété Aas-11, avec le consortium de PGPR (T5) montrant l'impact le plus élevé (14,36 %), suivi de T3 (13,94 %), T2 (11,96 %) et T4 (10,44 %). Cependant, dans la variété Galaxy-13, les effets ont été variables, avec une augmentation maximale observée pour T4 (5,72 %) et T2 (2,90 %), mais une réduction pour T5 (consortium de PGPR) et T3 (*B. pumilus*) par rapport au témoin.

Pour les poids frais et secs des racines, des augmentations significatives ont été observées dans la variété tolérante au sel, avec T3 montrant la plus forte augmentation, suivie de T5, T4 et T2 par rapport au témoin. Cependant, dans Galaxy-13, seule l'application combinée de PGPR a entraîné une augmentation significative du poids frais (30,72 %) et sec (66,66 %) des racines par rapport au témoin (Nawaz *et al.*, 2020).

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

En conclusion, cette étude met en lumière l'importance de rechercher des solutions durables pour remédier à la contamination des sols par les métaux lourds, qui constitue un défi environnemental majeur avec des répercussions significatives sur la santé humaine et la biodiversité. L'utilisation de méthodes biologiques pour chélater ces métaux lourds, notamment en exploitant des métallobactéries tels que la pyoverdine, offre une perspective prometteuse.

À la lumière des paramètres étudiés, il est clair que la toxicité des métaux dans le sol est étroitement liée à plusieurs paramètres étudiés, notamment la texture du sol par granulométrie et sédimentation, ainsi que les analyses physicochimiques telles que le pH, la conductivité électrique, l'humidité résiduelle, la matière organique et la teneur en éléments minéraux.

Dans le cadre de notre étude sur un sol sableux limoneux, caractérisé par un pH légèrement basique, une conductivité électrique non saline et une faible teneur en matière organique, nous avons observé que ces conditions favorisent une certaine mobilité du cuivre au sein du profil du sol.

Il est évident que la texture du sol joue un rôle essentiel dans la biodisponibilité et la mobilité des métaux au sein du profil du sol. Ces résultats soulignent l'importance de comprendre en profondeur les interactions entre les propriétés du sol et la disponibilité des métaux, ce qui est essentiel pour une gestion efficace des sols et des ressources naturelles.

Nos résultats, basés sur le dépistage de quarante-cinq isolats de *Pseudomonas* résistants au cuivre et possédant des capacités de promotion de la croissance des plantes (PGP), ont révélé des caractéristiques prometteuses. Nous avons observé que ces isolats sont capables de produire de l'auxine (AIA) en présence et en absence de cuivre, tout en solubilisant le phosphore inorganique et en produisant de l'acide cyanhydrique (HCN).

Parmi ces isolats, *P. lactis*, *P. atacamensis* et *Pseudomonas sp.* PS11 se sont distingués par leur capacité à produire des niveaux élevés de sidérophores, identifiés principalement comme de la pyoverdine après purification par FTIR.

Nous avons ensuite évalué l'efficacité de chélation accrue de la pyoverdine pour certains métaux lourds, démontrant sa capacité à chélater plusieurs métaux avec des affinités différentes. Parmi les métaux lourds testés, la souche *P. atacamensis* (PO22) a présenté le pourcentage le plus élevé de chélation par rapport au cuivre. Ces résultats mettent en lumière le potentiel des isolats de *Pseudomonas* résistants au cuivre en tant qu'agents de PGP, et mettent en évidence

l'importance des sidérophores, notamment la pyoverdine, dans la chélation des métaux lourds. Ils ouvrent ainsi la voie à de futures recherches sur l'utilisation de ces isolats dans des applications agronomiques et environnementales.

Nos travaux ont également mis en évidence le potentiel des PGPR pour améliorer la croissance et la tolérance des plantes, notamment du blé tendre, face à un stress métallique induit par le sulfate de cuivre. Ce stress a exercé une influence significative sur divers paramètres physiologiques des plantes, tels que la réduction de la biomasse racinaire et aérienne, la diminution de la chlorophylle des tissus, ainsi que la perturbation de l'homéostasie ionique et hydrique.

En revanche, les PGPR étudiés ont notablement augmenté des indicateurs de vitalité tels que la production de régulateurs de stress, comme la proline, et ont favorisé une amélioration significative du taux de pigments chlorophylliens ainsi que de l'assimilation des éléments minéraux, même en conditions de stress. Ces observations mettent en évidence le rôle des PGPR dans la promotion d'une agriculture durable et résiliente aux défis environnementaux.

Les résultats de cette étude ouvrent ainsi des perspectives prometteuses pour le développement de stratégies de bioremédiation respectueuses de l'environnement, contribuant ainsi à préserver la santé des écosystèmes terrestres et à garantir la sécurité alimentaire à long terme.

Dans le cadre des perspectives de recherche, la pyoverdine, identifiée comme un chélateur biologique prometteur dans notre étude, pourrait bénéficier de recherches supplémentaires en vue de sa commercialisation, notamment des travaux sur la production à grande échelle, la purification et la formulation pour faciliter son utilisation dans des applications agricoles et environnementales.

Pour évaluer pleinement l'efficacité des PGPR, des essais sur le terrain à grande échelle sont nécessaires, permettant d'évaluer leur impact sur la croissance des plantes, la productivité des cultures et la qualité du sol, fournissant ainsi des données cruciales sur leur faisabilité et leur efficacité dans des systèmes de culture réels.

Parallèlement, une exploration plus approfondie des mécanismes moléculaires sous-tendant l'interaction des PGPR avec les plantes et leur rôle dans la tolérance au stress métallique pourrait

être entreprise, notamment en étudiant les voies de signalisation et en identifiant les gènes impliqués.

Des recherches complémentaires visant à optimiser les formulations microbiennes contenant des PGPR sont également nécessaires, avec un accent sur la compatibilité entre les souches et sur les techniques de formulation pour améliorer la stabilité et la viabilité des inoculants microbiens dans des conditions environnementales variées.

Références bibliographique

Références bibliographique :

- Abbaszadeh-Dahaji, P., Atajan, F. A., Omidvari, M., Tahan, V., & Kariman, K. (2021).** Mitigation of copper stress in maize (*Zea mays*) and sunflower (*Helianthus annuus*) plants by copper-resistant *Pseudomonas* strains. *Current microbiology*, 78, 1335-1343.
- Abdel Latef, A. A. H., Zaid, A., Abo-Baker, A. B. A. E., Salem, W., & Abu Alhmad, M. F. (2020).** Mitigation of copper stress in maize by inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus circulans*. *Plants*, 9(11), 1513.
- Abdellatif, E., Kaluzna, M., Ferrante, P., Scortichini, M., Bahri, B., Janse, J. D., ... & Rhouma, A. (2020).** Phylogenetic, genetic, and phenotypic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolated from citrus blast and black pit in Tunisia. *Plant Pathology*, 69(8), 1414-1425.
- Abdelwahed, S., Saadouli, I., Kouidhi, S., Masmoudi, A. S., Cherif, A., Mnif, W., & Mosbah, A. (2022).** A new pioneer colorimetric micro-plate method for the estimation of ammonia production by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Main Group Chemistry*, 21(1), 55-68.
- Abelein, A., Ciofi-Baffoni, S., Mörman, C., Kumar, R., Giachetti, A., Piccioli, M., & Biverstål, H. (2022).** Molecular structure of Cu (II)-bound amyloid- β monomer implicated in inhibition of peptide self-assembly in Alzheimer's disease. *JACS Au*, 2(11), 2571-2584.
- Achkir, A., Aouragh, A., El Mahi, M., Labjar, N., Bouch, M. E., Ouahidi, M. L., ... & Moussaoui, T. E. (2023).** Implication of sewage sludge increased application rates on soil fertility and heavy metals contamination risk. *Emerging Contaminants*, 9(1), 100200.
- Adamczyk-Szabela, D., & Wolf, W. M. (2024).** The Influence of Copper and Zinc on Photosynthesis and Phenolic Levels in Basil (*Ocimum basilicum* L.), Borage (*Borago officinalis* L.), Common Nettle (*Urtica dioica* L.) and Peppermint (*Mentha piperita* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 3612.
- Adetunji, C. O., & Anani, O. A. (2021).** Recent advances in the application of genetically engineered microorganisms for microbial rejuvenation of contaminated environment. *Microbial Rejuvenation of Polluted Environment: Volume 3*, 303-324.
- Adhami, E., Aghaei, S., & Zolfaghari, M. R. (2017).** Evaluation of heavy metals resistance in biofilm cells of native *Rhodococcus* spp. isolated from soil. *Archives of Hygiene Sciences*,

- 6(3), 235-243.
- Adnan, M., Xiao, B., Xiao, P., Zhao, P., Li, R., & Bibi, S. (2022).** Research progress on heavy metals pollution in the soil of smelting sites in China. *Toxics*, 10(5), 231.
- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., ... & Bharwana, S. A. (2015).** The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 8148-8162.
- Agarwal, P., Vibhandik, R., Agrahari, R., Daverey, A., & Rani, R. (2023).** Role of root exudates on the soil microbial diversity and biogeochemistry of heavy metals. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-21.
- Ahmed, F., Javed, B., Razzaq, A., & Mashwani, Z. U. R. (2021).** Applications of copper and silver nanoparticles on wheat plants to induce drought tolerance and increase yield. *IET nanobiotechnology*, 15(1), 68-78.
- Aityoub, A., Abouelfida, A., Benyaich, A., Elmeray, M., Idouhli, R., Koumya, Y., and Khadiri, M. (2020).** Hierarchization of physicochemical factors during simultaneous removal of lead and copper from the Marrakech Municipal Discharge Soils.
- Akgul, A., & Akgul, A. (2018).** Mycoremediation of copper: exploring the metal tolerance of brown rot fungi. *BioResources*, 13(3), 7155-7171.
- Akhtar, N., & Mannan, M. A. U. (2020).** Mycoremediation: expunging environmental pollutants. *Biotechnology reports*, 26, e00452.
- Akpasi, S. O., Anekwe, I. M. S., Tetteh, E. K., Amune, U. O., Shoyiga, H. O., Mahlangu, T. P., & Kiambi, S. L. (2023).** Mycoremediation as a Potentially Promising Technology: Current Status and Prospects—A Review. *Applied Sciences*, 13(8), 4978.
- Al-Qutob M., A.Asafra, T. Nashashibi, and A.A. Qutob, 2014.** Determination of Different Trace Heavy Metals in Children's Plastic Toys Imported to the West Bank/Palestine by ICP/MS-Environmental and Health Aspects. *Journal of Environmental Protection*, 5, 1104-1110.
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021).** Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9(3), 42.
- Alengebawy, A., Abdelkhalek, S. T., Qureshi, S. R., & Wang, M. Q. (2021).** Heavy metals and pesticides toxicity in agricultural soil and plants: Ecological risks and human health implications. *Toxics*, 9(3), 42.
- Ali, B., Wang, X., Saleem, M. H., Sumaira, Hafeez, A., Afridi, M. S., ... & Ali, S. (2022).** PGPR-mediated salt tolerance in maize by modulating plant physiology, antioxidant

- defense, compatible solutes accumulation and bio-surfactant producing genes. *Plants*, 11(3), 345.
- Alkhanjaf, A. A. M., Sharma, S., Sharma, M., Kumar, R., Arora, N. K., Kumar, B., ... & Mukherjee, T. (2024).** Microbial strategies for copper pollution remediation: Mechanistic insights and recent advances. *Environmental Pollution*, 123588.
- Alsabhan, A. H., Perveen, K., & Alwadi, A. S. (2022).** Heavy metal content and microbial population in the soil of Riyadh Region, Saudi Arabia. *Journal of King Saud University-Science*, 34(1), 101671.
- Alsafran, M., Usman, K., Ahmed, B., Rizwan, M., Saleem, M. H., & Al Jabri, H. (2022).** Understanding the phytoremediation mechanisms of potentially toxic elements: A proteomic overview of recent advances. *Frontiers in plant science*, 13, 881242.
- Archana A, Jaitly AK (2015).** Role of myco-communities in the field of heavy metal remediation. *Biolife* 3(1):77–108
- Al-Sajad, M. S., & Alsalim, H. A. A. (2024).** DETECTION OF GENES RESPONSIBLE FOR HEAVY METALS RESISTANCE IN LOCALLY ISOLATED *PSEUDOMONAS* SPP. *IRAQI JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES*, 55(1), 361-370.
- Alshegaihi, R. M., Saleem, M. H., Saleem, A., Ali, B., Aziz, H., Fahad, S., ... & Elansary, H. O. (2023).** Silicon and titanium dioxide mitigate copper stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) through regulating antioxidant defense mechanisms. *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-17.
- Alves, A. R., Yin, Q., Oliveira, R. S., Silva, E. F., & Novo, L. A. (2022).** Plant growth-promoting bacteria in phytoremediation of metal-polluted soils: current knowledge and future directions. *Science of the Total Environment*, 838, 156435.
- Ambrosini, V. G., Rosa, D. J., Prado, J. P. C., Borghezan, M., de Melo, G. W. B., de Sousa Soares, C. R. F., ... & Brunetto, G. (2015).** Reduction of copper phytotoxicity by liming: a study of the root anatomy of young vines (*Vitis labrusca* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 270-280.
- Amin, H., Arain, B. A., Jahangir, T. M., Abbasi, A. R., Mangi, J., Abbasi, M. S., & Amin, F. (2021).** Copper (Cu) tolerance and accumulation potential in four native plant species: A comparative study for effective phytoextraction technique. *Geology, Ecology, and Landscapes*, 5(1), 53-64.
- Amundson, L. A., Kirn, B. N., Swensson, E. J., Millican, A. A., & Fahey, G. C. (2024).** Copper metabolism and its implications for canine nutrition. *Translational Animal Science*, txad147.

- Anderson, C., & Juday, G. (2016).** Mycoremediation of petroleum: A literature review. *J. Environ. Sci. Eng. A*, 5, 397-405.
- Angelova, M., Asenova, S., Nedkova, V., & Koleva-Kolarova, R. (2011).** Copper in the human organism. *Trakia journal of sciences*, 9(1), 88-98.
- Apori, O. S., Hanyabui, E., & Asiamah, Y. J. (2018).** Remediation technology for copper contaminated soil: A review. *Asian Soil Research Journal*, 1(3), 1-7.
- Asante-Badu, B., Kgorutla, L. E., Li, S. S., Danso, P. O., Xue, Z., & Qiang, G. (2020).** PHYTOREMEDIATION OF ORGANIC AND INORGANIC COMPOUNDS IN A NATURAL AND AN AGRICULTURAL ENVIRONMENT: A REVIEW. *Applied Ecology & Environmental Research*, 18(5).
- ATROOZ, O. M., & BARA'AH, B. (2024).** EVALUATION OF THE EFFECTS OF Cu, Zn, AND Hg METALS ON WHEAT. *Pak. J. Bot*, 56(3), 925-932.
- Azubuiké, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016).** Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 1-18.
- Badr F. M. and O.El-Habit, 2018.** Heavy Metal Toxicity Affecting Fertility and Reproduction of Males. In book: Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health.
- Balíková, K., Vojtková, H., Duborská, E., Kim, H., Matúš, P., & Urík, M. (2022).** Role of exopolysaccharides of *Pseudomonas* in heavy metal removal and other remediation strategies. *Polymers*, 14(20), 4253.
- Barathi, S., Lee, J., Venkatesan, R., & Vetcher, A. A. (2023).** Current Status of Biotechnological Approaches to Enhance the Phytoremediation of Heavy Metals in India—A Review. *Plants*, 12(22), 3816.
- Barber, R. G., Grenier, Z. A., & Burkhead, J. L. (2021).** Copper toxicity is not just oxidative damage: Zinc systems and insight from Wilson disease. *Biomedicine*, 9(3), 316
- Barkay, T., & Schaefer, J. (2001).** Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current opinion in microbiology*, 4(3), 318-323
- Barros, K. S., Vielmo, V. S., Moreno, B. G., Riveros, G., Cifuentes, G., & Bernardes, A. M. (2022).** Chemical composition data of the main stages of copper production from sulfide minerals in Chile: a review to assist circular economy studies. *Minerals*, 12(2), 250.

- Bartkowiak, A., Dabkowska-Naskret, H., Jaworska, H., & Rydlewska, M. (2020).** Effect of salinity on the mobility of trace metals in soils near a soda chemical factory. *Journal of Elementology*, 25(2).
- Bashir, S., Javed, S., Al-Anazi, K. M., Farah, M. A., & Ali, S. (2022).** Bioremediation of cadmium toxicity in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants primed with L-Proline, *Bacillus subtilis* and *Aspergillus niger*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(19), 12683.
- Batch, C. R. (2022).** Mycoremediation Recommendation Among Bioremediation Strategies in Lead (Pb) Contamination in United States Soils (Doctoral dissertation, California State University, Sacramento).
- Bayat, M., Zargar, M., Murtazova, K. M. S., Nakhaev, M. R., & Shkurkin, S. I. (2022).** Ameliorating seed germination and seedling growth of nano-primed wheat and flax seeds using seven biogenic metal-based nanoparticles. *Agronomy*, 12(4), 811.
- Bhattacharyya, C., Banerjee, S., Acharya, U., Mitra, A., Mallick, I., Haldar, A., ...& Ghosh, A. (2020).** Evaluation of plant growth promotion properties and induction of antioxidative defense mechanism by tea rhizobacteria of Darjeeling, India. *Scientific reports*, 10(1), 1-19.
- Bost, M., Houdart, S., Oberli, M., Kalonji, E., Huneau, J. F., & Margaritis, I. (2016).** Dietary copper and human health: Current evidence and unresolved issues. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 35, 107-115.
- Bouquet, D., Lépinay, A., Gaudin, P., Jean-Soro, L., Le Guern, C., Lichtfouse, E., & Lebeau, T. (2020).** A new assay of bacterial selection with Pb reveals an unexpected effect of Pb on bacterial behavior: implications for remediation. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 983-992.
- Bukhat, S., Imran, A., Javaid, S., Shahid, M., Majeed, A., & Naqqash, T. (2020).** Communication of plants with microbial world: Exploring the regulatory networks for PGPR mediated defense signaling. *Microbiological research*, 238, 126486.
- Cao, J., Lv, Z., Liao, B., Chen, D., Tong, W., Zong, Z., ... & Xiang, T. (2022).** In-situ fabrication of superhydrophobic surface on copper with excellent anti-icing and anti-corrosion properties. *Materials Today Communications*, 33, 104633.
- Chowdhury, S. K. (2021).** Application of heavy metal tolerance plant growth promoting bacteria for remediation of metalliferous soils and their growth efficiency on maize (*Zeamays* L.). *Plant Isol Sci J Biol*, 4(1), 039-050.

- Ciampi, P., Zeppilli, M., Lorini, L., Villano, M., Esposito, C., Nielsen, C., ... & Petrangeli Papini, M. (2024).** Coupling Physical and Chemical-Biological Techniques for the
- Çiğ, F., Sönmez, F., Nadeem, M. A., & Sabagh, A. E. (2021).** Effect of biochar and PGPR on the growth and nutrients content of einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.) and post-harvest soil properties. *Agronomy*, *11*(12), 2418
- Clarke J.M. and Mc Caig T.N. (1982).** Excised-leaf water retention capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, *62*(3), 571-578.
- Cruz, F. J. R., da Cruz Ferreira, R. L., Conceição, S. S., Lima, E. U., de Oliveira Neto, C. F., Galvão, J. R., ... & Viegas, I. D. J. M. (2022).** Copper toxicity in plants: nutritional, physiological, and biochemical aspects. In *Advances in Plant Defense Mechanisms*. IntechOpen.
- Cui XY., S.W Li , S.J. Zhang , YY. Fan , LQ. Ma, 2015.** Toxic metals in children's toys and jewelry: Coupling bioaccessibility with risk assessment. *Environmental Pollution* *200*:77-84.
- Das, S., Sultana, K. W., Ndhala, A. R., Mondal, M., & Chandra, I. (2023).** Heavy metal pollution in the environment and its impact on health: Exploring green technology for remediation. *Environmental Health Insights*, *17*, 11786302231201259.
- David, S. R., & Geoffroy, V. A. (2020).** A review of asbestos bioweathering by siderophore-producing *Pseudomonas*: A potential strategy of bioremediation. *Microorganisms*, *8*(12), 1870.
- Deb, C. R., & Tatung, M. (2024).** Siderophore producing bacteria as biocontrol agent against phytopathogens for a better environment: A review. *South African Journal of Botany*, *165*, 153-162
- Dell'Anno, F., Vitale, G. A., Buonocore, C., Vitale, L., Palma Esposito, F., Coppola, D., ... & de Pascale, D. (2022).** Novel insights on pyoverdine: from biosynthesis to biotechnological application. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(19), 11507.
- Derakhshan Nejad, Z., Jung, M. C., & Kim, K. H. (2017).** Remediation of soils contaminated with heavy metals with an emphasis on immobilization technology. *Environmental geochemistry and health*, *40*, 927-953.
- Derakhshan Nejad, Z., Jung, M. C., & Kim, K. H. (2017).** Remediation of soils contaminated with heavy metals with an emphasis on immobilization technology. *Environmental geochemistry and health*, *40*, 927-953

- Devkota, S., Rayamajhi, K., Yadav, D. R., & Shrestha, J. (2020).** Effects of different doses of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) granules on wheat yield.
- Dey, G., Maity, J. P., Banerjee, P., Sharma, R. K., Etesami, H., Bastia, T. K., ... & Chen, C. Y. (2024).** Characterization of halotolerant phosphate-solubilizing rhizospheric bacteria from mangrove (*Avicennia* sp.) with biotechnological potential in agriculture and pollution mitigation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 55, 102960.
- Dhaliwal, S. S., Singh, J., Taneja, P. K., & Mandal, A. (2020).** Remediation techniques for removal of heavy metals from the soil contaminated through different sources: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(2), 1319-1333.
- Dikilitas, M., Simsek, E., & Roychoudhury, A. (2020).** Role of proline and glycine betaine in overcoming abiotic stresses. *Protective chemical agents in the amelioration of plant abiotic stress: biochemical and molecular perspectives*, 1-23.
- Dionisio-Sese, M. L., & Tobita, S. (1998).** Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant science*, 135(1), 1-9.
- Duffus JH., 2002.** “Heavy metal” – a meaningless term?. *Pure and Applied Chemistry* 74(5):793-807.
- Ellingsen, D. G., Horn, N., & Aaseth, J. (2007).** Handbook on the Toxicology of Metals.
- Enya, O., Heaney, N., Iniyama, G., & Lin, C. (2020).** Effects of heavy metals on organic matter decomposition in inundated soils: Microcosm experiment and field examination. *Science of the total environment*, 724, 138223.
- Fatima, S., Aslam, N., & Khalid, S. (2021).** Effects of copper toxicity on different growth attributes of *Phlox drummondii*. *Environment & Ecosystem Science*, 5(1), 58-63.
- Feng, Y., He, J., Zhang, H., Jia, X., Hu, Y., Ye, J., ... & Chen, H. (2024).** Phosphate solubilizing microorganisms: a sustainability strategy to improve urban ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1320853.
- Feng, Y., Kreslavski, V. D., Shmarev, A. N., Ivanov, A. A., Zharmukhamedov, S. K., Kosobryukhov, A., ... & Shabala, S. (2022).** Effects of iron oxide nanoparticles (Fe^3O_4) on growth, photosynthesis, antioxidant activity and distribution of mineral elements in wheat (*Triticum aestivum*) Plants. *Plants*, 11(14), 1894.
- Feng, Z., Ji, S., Ping, J., & Cui, D. (2021).** Recent advances in metabolomics for studying heavy metal stress in plants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116402.

- Focarelli, F., Giachino, A., & Waldron, K. J. (2022).** Copper microenvironments in the human body define patterns of copper adaptation in pathogenic bacteria. *PLoS pathogens*, 18(7), e1010617.
- Gaj, R., Izosimova, A., & Shnug, E. (2007).** Organic fertilization effects on heavy metal uptake. *Encyclopedia of soil science*, 2, 1169-1171.
- Ge, E. J., Bush, A. I., Casini, A., Cobine, P. A., Cross, J. R., DeNicola, G. M., ... & Chang, C. J. (2022).** Connecting copper and cancer: from transition metal signalling to metalloplasia. *Nature Reviews Cancer*, 22(2), 102-113.
- Ghazy, N., & El-Nahrawy, S.(2021).** Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. *Archives of microbiology*, 203(3), 1195-1209.
- Ghssein, G., & Ezzeddine, Z. (2022).** A review of *Pseudomonas aeruginosa* metallophores: Pyoverdine, pyochelin and pseudopaline. *Biology*, 11(12), 1711.
- Gondal, A. H., Hussain, I., Ijaz, A. B., Zafar, A., Ch, B. I., Zafar, H., ... & Usama, M. (2021).** Influence of soil pH and microbes on mineral solubility and plant nutrition: A review. *International Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 5(1), 71-81.
- Guerra, F., Gainza, F., Pérez, R., & Zamudio, F. (2011).** Phytoremediation of heavy metals using poplars (*Populus* spp.): a glimpse of the plant responses to copper, cadmium and zinc stress. *Handbook of phytoremediation*. Nova Science, New York, 387-413.
- Gupta, R., Khan, F., Alqahtani, F. M., Hashem, M., & Ahmad, F. (2023).** Plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) assisted bioremediation of Heavy Metal Toxicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-29.
- Gupta, R., Khan, F., Alqahtani, F. M., Hashem, M., & Ahmad, F. (2023).** Plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR) assisted bioremediation of Heavy Metal Toxicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-29.
- Hamoum, H., Bouznad, A., Mekhaldi, A., & Djibaoui, R. (2015).** Screening for PGP Activities of Diazotrophic Bacteria Isolated from Saline Soil and their Effect on Maize Growth under Saline Stress. *Journal of Pure and Applied Microbiology*.
- Hane, F., Tran, G., Attwood, S. J., & Leonenko, Z. (2013).** Cu²⁺ affects amyloid- β (1–42) aggregation by increasing peptide-peptide binding forces. *PloS one*, 8(3), e59005.
- Hanif, S., Sajjad, A., Javed, R., Mannan, A., & Zia, M. (2023).** Proline doped ZnO nanocomposite alleviates NaCl induced adverse effects on morpho-biochemical response in *Coriandrum sativum*. *Plant Stress*, 9, 100173.

- Happacher, I., Aguiar, M., Yap, A., Decristoforo, C., & Haas, H. (2023).** Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*: Impact on biotic interactions and potential translational applications. *Essays in Biochemistry*, 67(5), 829-842.
- Hartemink, A. E., & Barrow, N. J. (2023).** Soil pH-nutrient relationships: the diagram. *Plant and Soil*, 486(1), 209-215.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., & Fujita, M. (2015).** Arsenic toxicity in plants and possible remediation. *Soil remediation and plants: Prospects and challenges*, 433-501
- Hefnawy, A. E., & El-Khaiat, H. M. (2015).** The importance of copper and the effects of its deficiency and toxicity in animal health. *International Journal of Livestock Research*, 5(12), 1-20.
- Heile, A. O., Zaman, Q. U., Aslam, Z., Hussain, A., Aslam, M., Saleem, M. H., ... & Ali, S. (2021).** Alleviation of cadmium phytotoxicity using silicon fertilization in wheat by altering antioxidant metabolism and osmotic adjustment. *Sustainability*, 13(20), 11317.
- Hnini, M., Rabeh, K., & Oubohssaine, M. (2024).** Interactions between beneficial soil microorganisms (PGPR and AMF) and host plants for environmental restoration: A systematic review. *Plant Stress*, 100391.
- Horn, N., & Wittung-Stafshede, P. (2021).** ATP7A-regulated enzyme metalation and trafficking in the menkes disease puzzle. *Biomedicines*, 9(4), 391.
- Hu, X., & Chen, H. (2023).** Phosphate solubilizing microorganism: a green measure to effectively control and regulate heavy metal pollution in agricultural soils. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1193670.
- Husnain, A., Farooq, Q., Sohail, S., Shasang, S., Toor, D., Zafar, A., & Rehman, B. (2021).** Adaptability of soil pH through innovative microbial approach. *Current Research in Agricultural Sciences*, 8(2), 71-79.
- Hyder, S., Rizvi, Z. F., los Santos-Villalobos, S. D., Santoyo, G., Gondal, A., Khalid, N., ... & Rani, A. (2023).** Applications of plant growth-promoting rhizobacteria for increasing crop production and resilience. *Journal of Plant Nutrition*, 46(10), 2551-2580.
- Ikhajiagbe, B., Musa, S. I., & Okeme, J. O. (2019).** Effect of changes in soil cation exchange capacity on the reclamation of lead by *Eleusine indica* (L.) Gaertn. *FUDMA Journal of Sciences*, 3(4), 176-183.
- Inobeme, A., Ajai, A. I., Adetunji, C. O., Inobeme, J., Adekoya, M. A., Maliki, M., ... & Okonkwo, S. (2023).** Emerging pollutants from the industries and their treatment. In *Modern approaches in waste bioremediation: environmental microbiology* (pp. 1-11). Cham: Springer International Publishing.

- Iqbal, M. Z., Nayab, S., & Shafiq, M. (2018).** Effects of copper on seed germination and seedling growth performance of *Lens culinaris* Medik. *Journal of Plant Development*, 25, 85
- Iqbal, S., Khan, A. M., Dilshad, I., Moatter, K., Ahmed, T., & Gilani, S. A.(2020).** 84. Influence of seed priming with CuSO₄ and ZnSO₄ on germination and seedling growth of oat under NaCl stress. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 9(1), 897-912.
- Iqbal, S., Shurjeel, H. K., Jehan, S., Naseem, M., Sattar, H., Abbas, N., ... & Khan, N. (2022).** Copper Effect on Cu Uptake, Earthworm AChE Activity, Chlorophyll Content, Gas Exchange Parameters of Mung bean Mitigated by Copper Tolerant Bacteria under Cu Contaminated Soil. *Journal of Xi'an Shiyou University, Natural Science Edition*.18, 173-194.
- Ismail SNS. NS. Mohamad, K. Karuppiah, EZ. Abidin, I. Rasdi, SM. Praveena, 2017.** Heavy metals content in low-priced toys. *ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences*, 5, 1499–1509.
- Jalmi, S. K., & Sinha, A. K. (2022).** Ambiguities of PGPR-induced plant signaling and stress management. *Frontiers in Microbiology*, 13, 899563.
- Javed, T., Ali, M. M., Shabbir, R., Anwar, R., Afzal, I., & Mauro, R. P. (2021).** Alleviation of Copper-Induced Stress in Pea (*Pisum sativum* L.) through Foliar Application of Gibberellic Acid. *Biology* 2021, 10, 120.
- Kabiraj, A., Majhi, K., Halder, U., Let, M., & Bandopadhyay, R. (2020).** Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for crop stress management. *Sustainable agriculture in the era of climate change*, 367-389.
- Kamaruzzaman, M. A., Abdullah, S. R. S., Hasan, H. A., Hassan, M., Othman, A. R., & Idris, M.(2020).**Characterisation of Pb-resistant plant growth- promoting rhizobacteria (PGPR) from *Scirpus grossus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101456.
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2017).** Mycoremediation potential of *Pleurotus* species for heavy metals: a review. *Bioresources and bioprocessing*, 4(1), 32.
- KEBIR, T. (2012).** *Etude de Contamination, d'Accumulation et de Mobilité de Quelques Métaux Lourds dans des Légumes, des Fruits et des sols Agricoles Situés près d'une Décharge Industrielle de l'usine Alzinc de la ville de Ghazaouet* (Doctoral dissertation).
- Kejela, T., Thakkar, V. R., & Patel, R. R.(2017).** A novel strain of *Pseudomonas* inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* infections and promotes germination of coffee. *Rhizosphere*, 4, 9-15.

- Kesaulya, H., Zakaria, B., & Syaiful, S. A. (2015).** *Isolation and physiological characterization of PGPR from potato plant rhizosphere in medium land of Buru Island.* *Procedia Food Science*, 3, 190-199.
- Khalid, S., Shahid, M., Niazi, N. K., Murtaza, B., Bibi, I., & Dumat, C. (2017).** A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. *Journal of geochemical exploration*, 182, 247-268.
- Khan, N., & Mehmood, A. (2023).** Revisiting climate change impacts on plant growth and its mitigation with plant growth promoting rhizobacteria. *South African Journal of Botany*, 160, 586-601.
- Khan, R. A., Khan, A., Qadri, T. A., & Iftikhar, M. (2020).** 43. Response of Wheat (*Triticum aestivum* L.) to Zinc Sulphate and Copper Sulphate under salt stress. *Pure and Applied Biology (PAB)*, 9(4), 2648-2658.
- Khasheii, B., Mahmoodi, P., & Mohammadzadeh, A. (2021).** Siderophores: Importance in bacterial pathogenesis and applications in medicine and industry. *Microbiological Research*, 250, 126790.
- Khoshru, B., Mitra, D., Khoshmanzar, E., Myo, E. M., Uniyal, N., Mahakur, B., ... & Rani, A. (2020).** Current scenario and future prospects of plant growth-promoting rhizobacteria: an economic valuable resource for the agriculture revival under stressful conditions. *Journal of Plant Nutrition*, 43(20), 3062-3092.
- Komal, K., Kumar, A., Khan, M. A., Dev, A., Kumar, A., Prasad, S., & Ahamad, N. (2022).** Effect of plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) on chlorophyll content of chickpea plant (*Cicer arietinum* L.). *Pharma Innovation J*, 11, 1021-1025.
- Kouadria, R., Bouzouina, M., Lotmani, B., & Soualem, S. (2023).** Unraveling the role of endophytic fungi in barley salt-stress tolerance. *Hellenic Plant Protection Journal*, 16(1), 12-22.
- Kour, D., Kaur, T., Devi, R., Yadav, A., Singh, M., Joshi, D., ... & Saxena, A. K. (2021).** Beneficial microbiomes for bioremediation of diverse contaminated environments for environmental sustainability: present status and future challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 24917-24939.
- Kumar A., Sidhu J., Goyal A., Tsao J.W. StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC. Treasure Island (FL). (2020).** Alzheimer Disease. Rehman, M., Liu, L., Wang, Q., Saleem, M. H., Bashir, S., Ullah, S., & Peng, D. (2019). Copper environmental toxicology,

- recent advances, and future outlook: a review. *Environmental science and pollution research*, 26, 18003-18016
- Kumar, A., Maleva, M., Bruno, L. B., & Rajkumar, M. (2021).** Synergistic effect of ACC deaminase producing *Pseudomonas* sp. TR15a and siderophore producing *Bacillus aerophilus* TR15c for enhanced growth and copper accumulation in *Helianthus annuus* L. *Chemosphere*, 276, 130038.
- Kumar, P., Kirti, S., Kiran, R. K., & Suman, S. K. (2023 a).** Mycoremediation a potential tool to control environmental pollution and their Application. *Plant Stress Biology*, 107.
- Kumar, V., Rout, C., Singh, J., Saharan, Y., Goyat, R., Umar, A., ... & Baskoutas, S. (2023 b).** A review on the clean-up technologies for heavy metal ions contaminated soil samples. *Heliyon*.
- Kumar, V., Shahi, S. K., & Singh, S. (2018).** Bioremediation: an eco-sustainable approach for restoration of contaminated sites. *Microbial bioprospecting for sustainable development*, 115-136.
- Kümmerli, R. (2023).** Iron acquisition strategies in pseudomonads: mechanisms, ecology, and evolution. *Biometals*, 36(4), 777-797.
- Ladiges PY., 1975-** Some aspects of tissue water relation in three populations of tissue water relations in three populations of *Eucalyptus viminalis* Labill. *New Phytologist*, 75(1), 53-62.
- Lear, L., Hesse, E., Buckling, A., & Vos, M. (2022).** Copper selects for siderophore-mediated virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC microbiology*, 22(1), 303.
- Li, S., Liu, Y., Wang, Z., Liu, T., Li, X., & Zhang, P. (2023).** Integrating Chlorophyll a Fluorescence and Enzymatic Profiling to Reveal the Wheat Responses to Nano-ZnO Stress. *Plants*, 12(22), 3808.
- Li, Y., Shi, S., Zhang, Y., Zhang, A., Wang, Z., & Yang, Y. (2023).** Copper stress-induced phytotoxicity associated with photosynthetic characteristics and lignin metabolism in wheat seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 254, 114739.
- Liu, S., Yang, B., Liang, Y., Xiao, Y., & Fang, J. (2020).** Prospect of phytoremediation combined with other approaches for remediation of heavy metal-polluted soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 16069-16085.
- Liu, X., Qi, W., Cui, S., Lv, L., Jiang, J., Jiang, J., & Zhu, Z. (2023).** A Comparison of Different Remediation Technologies of Contaminated Agricultural Soils. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 406, p. 03018). EDP Sciences.

- Liu, Y., Dai, C., Zhou, Y., Qiao, J., Tang, B., Yu, W., ... & Lu, S. E. (2021).** Pyoverdines are essential for the antibacterial activity of *Pseudomonas chlororaphis* YL-1 under low-iron conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(7), e02840-20.
- Lloyd JR (2003)** Microbial reduction of metals and radionuclides. *FEMS Microbiol Rev* 27: 411-425. *Literature Journal of Environmental Management* 1;217:56-70
- Lozano-González, J. M., Valverde, S., Montoya, M., Martín, M., Rivilla, R., Lucena, J. J., & López-Rayó, S. (2023).** Evaluation of Siderophores Generated.
- Luo, N. (2024).** Methods for controlling heavy metals in environmental soils based on artificial neural networks. *Scientific Reports*, 14(1), 2563
- Łyszczarz, S., Lasota, J., Szuszkiewicz, M. M., & Błońska, E. (2021).** Soil texture as a key driver of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) distribution in forest topsoils. *Scientific Reports*, 11(1), 14708.
- M., Bannon, D., Nakanishi, H., McBride, M. B., Williams, M. A., and Yoshihara, T. (2020).** Chemical speciation, plant uptake, and toxicity of heavy metals in agricultural soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Mahdi, I., Fahsi, N., Hafidi, M., Benjelloun, S., Allaoui, A., & Biskri, L. (2021).** Rhizospheric phosphate solubilizing *Bacillus atrophaeus* GQJK17 S8 increases quinoa seedling, withstands heavy metals, and mitigates salt stress. *Sustainability*, 13(6), 3307.
- Majhi, K., Let, M., & Bandopadhyay, R. (2024).** Efficacious use of *Micrococcus yunnanensis* GKSM13 for the growth of rice seedlings under copper stress with elucidation into genomic traits. *Current Plant Biology*, 37, 100318.
- Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., & Rajkumar, M. (2020).** Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of environmental management*, 254, 109779.
- Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., & Rajkumar, M. (2020).** Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of environmental management*, 254, 109779.
- Mao, L., & Ye, H. (2018).** Influence of redox potential on heavy metal behavior in soils: a review. *Research of Environmental Sciences*, 31(10), 1669-1676
- Marini, E., De Bernardi, A., Tagliabue, F., Casucci, C., Tiano, L., Marcheggiani, F., ... & Vischetti, C. (2024).** Copper toxicity on *Eisenia fetida* in a vineyard soil: a combined study

- with standard tests, genotoxicity assessment and gut metagenomic analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-14.
- Mathys, Z. K., & White, A. R. (2017).** Copper and Alzheimer's disease. *Neurotoxicity of Metals*, 199-216.
- Mehta, S., & Nautiyal, C. S. (2001).** An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current microbiology*, 43, 51-56.
- Mei, S., Bian, W., Yang, A., Xu, P., Qian, X., Yang, L., ... & Niu, A. (2024).** The highly effective cadmium-resistant mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* and the function of pyoverdine induced by cadmium. *Journal of Hazardous Materials*, 133876.
- Mitra, S., Chakraborty, A. J., Tareq, A. M., Emran, T. B., Nainu, F., Khusro, A., ... & Simal-Gandara, J. (2022).** Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University-Science*, 34(3), 101865.
- Mitra, S., Chakraborty, A. J., Tareq, A. M., Emran, T. B., Nainu, F., Khusro, A., ... & Simal-Gandara, J. (2022).** Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University-Science*, 34(3), 101865.
- Mohan, S., Varshney, A., & Dahiya, P. (2022).** In situ bioremediation of heavy metal contaminated soil. In *Relationship Between Microbes and the Environment for Sustainable Ecosystem Services, Volume 2* (pp. 235-254). Elsevier.
- Møller, L. B., & Aaseth, J. (Eds.). (2021).** *Handbook on the Toxicology of Metals: Volume II: Specific Metals*. Academic Press.
- Monych, N. K., & Turner, R. J. (2020).** Multiple compounds secreted by *Pseudomonas aeruginosa* increase the tolerance of *Staphylococcus aureus* to the antimicrobial metals copper and silver. *Msystems*, 5(5), 10-1128.
- Muratova, A. Y., Lyubun, E. V., Golubev, S. N., & Turkovskaya, O. V. (2022).** Effect of copper ions on the associations of Azospirillum bacteria with wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*, 26(5), 477.
- Mustafa, S. K., & AlSharif, M. A. (2018).** Copper (Cu) an essential redox-active transition metal in living system—a review article. *American Journal of Analytical Chemistry*, 9(01), 15.
- Nagajyoti P. C., K. D. Lee and T. Sreekanth, 2010.** Heavy metals, *occurrence and toxicity for plants*. *Environ Chem Lett* 8:199–216

- N., Wang, T., Chen, Y., Wang, M., Lu, Q., Wang, K., ... & Zuo, Y. (2024).** Microbiome convergence enables siderophore-secreting-rhizobacteria to improve iron nutrition and yield of peanut intercropped with maize. *Nature Communications*, 15(1), 839
- Nawaz, A., Shahbaz, M., Asadullah, Imran, A., Marghoob, M. U., Imtiaz, M., & Mubeen, F. (2020).** Potential of salt tolerant PGPR in growth and yield augmentation of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2019.
- NAZIM, K., & BANO, A. (2024).** Role of salicylic acid and plant growth promoting rhizobacteria (pgpr) to enhance cold tolerance in tomato (*lycopersicon esculentum* mill.). *Pak. J. Bot*, 56, 3.
- Nazir, F., Fariduddin, Q., Hussain, A., & Khan, T. A. (2021).** Brassinosteroid and hydrogen peroxide improve photosynthetic machinery, stomatal movement, root morphology and cell viability and reduce Cu-triggered oxidative burst in tomato. *Ecotoxicology and environmental safety*, 207, 111081.
- Neshat, M., Abbasi, A., Hosseinzadeh, A., Sarikhani, M. R., Dadashi Chavan, D., & Rasoulnia, A. (2022).** Plant growth promoting bacteria (PGPR) induce antioxidant tolerance against salinity stress through biochemical and physiological mechanisms. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(2), 347-361.
- Neshat, M., Abbasi, A., Hosseinzadeh, A., Sarikhani, M. R., Dadashi Chavan, D., & Rasoulnia, A. (2022).** Plant growth promoting bacteria (PGPR) induce antioxidant tolerance against salinity stress through biochemical and physiological mechanisms. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(2), 347-361.
- Nithinkumar, K., Saikia, N., Gairola, A., Kumar, V., Jena, T., Kumari, M., ... & Govindasamy, P. (2024).** Relative Water Content: Concept and Practical Implications,6 (2), 280-284
- Nithyapriya, S., Lalitha, S., Sayyed, R. Z., Reddy, M. S., Dailin, D. J., El Enshasy, H. A., & Herlambang, S., 2021.** *Production, purification, and characterization of bacillibactin siderophore of Bacillus subtilis and its application for improvement in plant growth and oil content in sesame.* *Sustainability*, 13(10), 5394.
- Nivetha, N., Lavanya, A. K., Vikram, K. V., Asha, A. D., Sruthi, K. S., Bandeppa, S., ... & Paul, S. (2021).** PGPR-mediated regulation of antioxidants: Prospects for abiotic stress management in plants. *Antioxidants in plant-microbe interaction*, 471-497.
- Nyiramigisha, P. (2021).** Harmful impacts of heavy metal contamination in the soil and crops grown around dumpsites. *Reviews in Agricultural Science*, 9, 271-282.

- OroojSurriya, S. S. S., Waqar, K., & Kazi, A. G. (2014).** Phytoremediation of soils: prospects and challenges. *Soil remediation and plants: Prospects and challenges*, 1.
- OSMANE, B., Yssaad, H. A. R., & Topcuoglu, B. (2020).** Effect of heavy metals (copper and zinc) on proline, polyphenols and flavonoids content of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Archives (09725210)*, 20(2).
- Othaman, N. N., Isa, M. N., Ismail, R. C., Ahmad, M. I., & Hui, C. K. (2020).** Factors that affect soil electrical conductivity (EC) based system for smart farming application. In *AIP conference proceedings* (Vol. 2203, No. 1). AIP Publishing.
- Özdemir, F. İ., AYDIN, B., & Tülek, A. (2023).** Investigation of the Siderophore Production and Associated Heavy Metal Accumulation Potential of *Brevibacillus laterosporus* 301/İK3-2. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 51(3), 317-325.
- Pagliaccia, B., Carretti, E., Severi, M., Berti, D., Lubello, C., & Lotti, T. (2021).** Heavy metal biosorption by Extracellular Polymeric Substances (EPS) recovered from anammox granular sludge. *Journal of Hazardous Materials*, 126661.
- Pande, V., Pandey, S. C., Sati, D., Bhatt, P., & Samant, M. (2022).** Microbial interventions in bioremediation of heavy metal contaminants in agroecosystem. *Frontiers in microbiology*, 13, 824084.
- Parveen, S. (2023).** Nucleic acid interactions of copper complexes. In *Nucleic Acids* (pp. 95-144). Academic Press.
- Passari, A. K., Ruiz-Villafán, B., Cruz-Bautista, R., Díaz-Domínguez, V., Rodríguez-Sanoja, R., & Sanchez, S. (2023).** Opportunities and challenges of microbial siderophores in the medical field. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(22), 6751-6759
- Passari, A. K., Ruiz-Villafán, B., Cruz-Bautista, R., Díaz-Domínguez, V., Rodríguez-Sanoja, R., & Sanchez, S. (2023).** Opportunities and challenges of microbial siderophores in the medical field. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(22), 6751-6759.
- Peng, X., Cui, Y., Cao, W., Wu, Z., Xia, M., & Xu, L. (2021).** Remediation technologies and risk assessment of soil contaminated with heavy metals. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 781, No. 3, p. 032057). IOP Publishing.
- Perera, I. C., & Hemamali, E. H. (2022).** Genetically modified organisms for bioremediation: Current research and advancements. *Bioremediation of Environmental Pollutants: Emerging Trends and Strategies*, 163-186.
- Petruzzelli, G., Pedron, F., & Rosellini, I. (2020).** Bioavailability and bioaccessibility in soil: a short review and a case study. *AIMS Environmental Science*, 7(2).

- Pikuła, D., & Stępień, W. (2021).** Effect of the degree of soil contamination with heavy metals on their mobility in the soil profile in a microplot experiment. *Agronomy*, *11*(5), 878.
- Pivić, R., Dinić, Z., Stanojković, A., Maksimović, J., Jošić, D., & Stanojković-Sebić, A. (2017).** Accumulation of heavy metals and trace elements in *Medicago sativa* L. grown along the E75 route section Belgrade-Leskovac. *Biotechnology in animal husbandry*, *33*(3), 361-374.
- Pohanka, M. (2019).** Copper and copper nanoparticles toxicity and their impact on basic functions in the body. *Bratisl. Lek. Listy*, *120*(6), 397-409.
- Prabahar, A., Shanmugam, L., Jose, M. A., Radhakrishnan, K. M., & Raja, K. (2021).** A Summary on Up-To-Date Research on Fungal Siderophores on Disease, Treatment and Pathogenicity Based on Text Mining, Bioinformatics and Experts' Opinion. *Fungal Siderophores: From Mineral—Microbe Interactions to Anti-Pathogenicity*, 187-210.
- Pradeep, S. D., & Aishwarya, K. R. (2023).** The Role of Copper in Plants and Its Uptake and Assimilation by Plants. In *Just Agriculture e-Magazine Vol. 3 Issue-5*
- Priya, A. K., Muruganandam, M., Ali, S. S., & Kornaros, M. (2023).** Clean-up of heavy metals from contaminated soil by phytoremediation: A multidisciplinary and eco-friendly approach. *Toxics*, *11*(5), 422.
- Qin, H., Wang, Z., Sha, W., Song, S., Qin, F., & Zhang, W. (2024).** Role of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria in Plant Machinery for Soil Heavy Metal Detoxification. *Microorganisms*, *12*(4), 700.
- Rahman, R., Sofi, J. A., Javeed, I., Malik, T. H., & Nisar, S. (2020).** Role of micronutrients in crop production. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *8*, 2265-2287.
- Rahman, S. U., Xuebin, Q., Kamran, M., Yasin, G., Cheng, H., Rehim, A., ... & Alyemini, M. N. (2021).** Silicon elevated cadmium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.) by endorsing nutrients uptake and antioxidative defense mechanisms in the leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, *166*, 148-159.
- Rai, P. K., & Nongtri, E. S. (2024).** Heavy metals/-metalloids (As) phytoremediation with *Landoltia punctata* and *Lemna* sp.(duckweeds): coupling with biorefinery prospects for sustainable phytotechnologies. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-25.
- Rai, S., Singh, P. K., Mankotia, S., Swain, J., & Satbhai, S. B. (2021).** Iron homeostasis in plants and its crosstalk with copper, zinc, and manganese. *Plant Stress*, *1*, 100008.

- Rajendran, S., Priya, T. A. K., Khoo, K. S., Hoang, T. K., Ng, H. S., Munawaroh, H. S. H., ... & Show, P. L. (2022).** A critical review on various remediation approaches for heavy metal contaminants removal from contaminated soils. *Chemosphere*, 287, 132369.
- Ramos, D., Mar, D., Ishida, M., Vargas, R., Gaité, M., Montgomery, A., & Linder, M. C. (2016).** Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells. *PLoS One*, 11(3), e0149516
- Rani, P., Rose, P. K., Kidwai, M. K., & Meenakshi. (2023).** *Brassica Juncea* L.: A Potential Crop for Phytoremediation of Various Heavy Metals. In *Heavy Metal Toxicity: Environmental Concerns, Remediation and Opportunities*. Singapore: Springer Nature Singapore(pp. 285-311).
- Rascio a., Cedola m., Sorrentino Gpastore d. And Wittmer g.,** 1988- pressure volume curves and drought resistance in two wheat genotypes. *Edit. Physiol. Plant*, 73, pp. 122-127.
- Rather, B. A., Mir, I. R., Masood, A., Anjum, N. A., & Khan, N. A. (2020).** Nitric oxide pre-treatment advances seed germination and alleviates copper-induced photosynthetic inhibition in Indian mustard. *Plants*, 9(6), 776.
- Rawat, P., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2020).** Plant growth-promoting rhizobacteria: A booster for ameliorating soil health and agriculture production. *Soil health*, 47-68.
- Raza, M. A. S., Aslam, M. U., Valipour, M., Iqbal, R., Haider, I., Mustafa, A. E. Z. M., ... & Elshamly, A. M. (2024).** Seed priming with selenium improves growth and yield of quinoa plants suffering drought. *Scientific Reports*, 14(1), 886.
- Rebello, S., Nathan, V. K., Sindhu, R., Binod, P., Awasthi, M. K., & Pandey, A. (2021).** Bioengineered microbes for soil health restoration: present status and future. *Bioengineered*, 12(2), 12839-12853.
- Rehman F, Kalsoom M, Adnan M, Toor MD, Zulfiqar A (2020).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria and their Mechanisms Involved in Agricultural Crop Production: A Review. *SunText Rev Biotechnol* 1(2): 110.
- Rehman, M., Liu, L., Wang, Q., Saleem, M. H., Bashir, S., Ullah, S., & Peng, D. (2019).** Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. *Environmental science and pollution research*, 26, 18003-18016.

- Rehman, S., Mahboob, L., Atta, A., Ahmad, W., Saqib, K. A., & Naqvi, S. Z. H. (2018).** Mycoremediation: A Green Technology Approach. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED BIOTECHNOLOGY AND RESEARCH*, 9(2), 672-686.
- Riseh, R. S., Vazvani, M. G., Hajabdollahi, N., & Thakur, V. K. (2023).** Bioremediation of heavy metals by Rhizobacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(8), 4689-4711.
- Rizvi, A., Zaidi, A., Ameen, F., Ahmed, B., AlKahtani, M. D., & Khan, M. S. (2020).** Heavy metal induced stress on wheat: phytotoxicity and microbiological management. *RSC advances*, 10(63), 38379-38403.
- Saadaoui, N., Silini, A., Cherif-Silini, H., Bouket, A. C., Alenezi, F. N., Luptakova, L., ... & Belbahri, L. (2022).** Semi-arid-habitat-adapted plant-growth-promoting rhizobacteria allows efficient wheat growth promotion. *Agronomy*, 12(9), 2221.
- Sabir, M., Waraich, E. A., Hakeem, K. R., Öztürk, M., Ahmad, H. R., & Shahid, M. (2014).** Phytoremediation: mechanisms and adaptations. *Soil remediation and plants: prospects and challenges*, 85, 85-105.
- Salem, M. A., Bedade, D. K., Al-Ethawi, L., & Al-Waleed, S. M. (2020).** Assessment of physiochemical properties and concentration of heavy metals in agricultural soils fertilized with chemical fertilizers. *Heliyon*, 6(10).
- Sandell, E. (2020).** Post-Mining Restoration in Zambia: Screening native tree species for phytoremediation potential.
- Sanjana, S., Jazeel, K., Janeeshma, E., Nair, S. G., & Shackira, A. M. (2024).** Synergistic interactions of assorted ameliorating agents to enhance the potential of heavy metal phytoremediation. *Stress Biology*, 4(1), 13.
- Sarvepalli, M., Velidandi, A., Ramachandravarapu, A. K., & Korrapati, N. (2024).** Marine Actinomycetes Siderophores: Types, High Throughput Characterization Techniques, Applications, and Their Association with Nanotechnology: A Comprehensive Review. *NanoWorld J*, 10(1), 1-21.
- Sawada, H., Fujikawa, T., & Satou, M. (2022).** *Pseudomonas aegrilactucaae* sp. nov. and *Pseudomonas morbosilactucaae* sp. nov., pathogens causing bacterial rot of lettuce in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(11), 005599.
- Sayqal, A., & Ahmed, O. B. (2021).** Advances in heavy metal bioremediation: an overview. *Applied Bionics and Biomechanics*, 2021.

- Schalk, I. J., Rigouin, C., & Godet, J. (2020).** An overview of siderophore biosynthesis among fluorescent *Pseudomonads* and new insights into their complex cellular organization. *Environmental Microbiology*, 22(4), 1447-1466.
- Schilsky, M. L., Roberts, E. A., Bronstein, J. M., Dhawan, A., Hamilton, J. P., Rivard, A. M., ... & Zimbren, P. C. (2022).** A multidisciplinary approach to the diagnosis and management of Wilson disease: executive summary of the 2022 practice guidance on Wilson disease from the American association for the study of liver diseases. *Hepatology*, 77(4), 1428-1455.
- Schoffer, J. T., Solari, F., Petit-Dit-Grézériat, L., Pelosi, C., Ginocchio, R., Yáñez, C., ... & Neaman, A. (2024).** The downside of copper pesticides: An earthworm's perspective. *Environmental Science and*
- Schwyn, B., & Neilands, J. B., 1987.** *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.* *Analytical biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Shabbir, Z., Sardar, A., Shabbir, A., Abbas, G., Shamshad, S., Khalid, S., ... & Shahid, M. (2020).** Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. *Chemosphere*, 259, 127436.
- Shamoogardiani, E., & Navidjouy, N. (2022).** Phytoremediation of heavy metals polluted environments. *Health Science Monitor*, 1(1), 10-23.
- Siddharth, T., Sridhar, P., Vinila, V., & Tyagi, R. D. (2021).** **Environmental** applications of microbial extracellular polymeric substance (EPS): A review. *Journal of Environmental Management*, 287, 112307
- Singh, J., & Kalamdhad, A. S. (2013).** Bioavailability and leachability of heavy metals during composting—a review. *International Research Journal of Environment Sciences*, 2(4), 59-64.
- Singh R., N.K. Ahirwar, J.Tiwari and J. Pathak, 2018.** Review on sources and effect of heavy metal in soil: its bioremediation. *Impact Journals* 1-22
- Singh,S.K , P. P. Singh, A.Gupta1, A. K. Singh and J. Keshri, 2019.** Tolerance of Heavy Metal Toxicity Using PGPR Strains of Pseudomonas Species In: *PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture*, 239-252.
- Sintorini, M. M., Widyatmoko, H., Sinaga, E., & Aliyah, N. (2021).** Effect of pH on metal mobility in the soil. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 737, No. 1, p. 012071). IOP Publishing.

- Soares, E. V. (2022).** Perspective on the biotechnological production of bacterial siderophores and their use. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(11), 3985-4004.
- Song, Y., Wu, X., Li, Z., Ma, Q. Q., & Bao, R. (2024).** Molecular mechanism of siderophore regulation by the *Pseudomonas aeruginosa* BfmRS two-component system in response to osmotic stress. *Communications Biology*, 7(1), 295.
- Sow, P., & Balo, S. (2022).** Hazards of Heavy Metal Pollution in Indian Soils, Its Distribution Pattern and Remediation Methods. *Research and Review*, 21, 3.
- Spiridon, A., Oburger, E., Valadbeigi, Y., Kloimböck, T., Stanetty, C., Kratena, N., ... & Hann, S. (2023).** Surveying the mugineic acid family: Ion mobility–quadrupole time-of-flight mass spectrometry (IM-QTOFMS) characterization and tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) quantification of all eight naturally occurring phytosiderophores. *Analytica Chimica Acta*, 1278, 341718.
- Spormann, S., Nadais, P., Sousa, F., Pinto, M., Martins, M., Sousa, B., ... & Soares, C. (2023).** Accumulation of proline in plants under contaminated soils—. *Antioxidants*, 12(3), 666.
- Subramaniam, N., & Sundaram, L. (2020).** Siderophore producing *Pseudomonas* spp. isolated from rhizospheric soil and enhancing iron content in *Arachis hypogaea* L. plant.
- Syed, Z., Sogani, M., Rajvanshi, J., & Sonu, K. (2023).** Microbial biofilms for environmental bioremediation of heavy metals: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(9), 5693-5711.
- Teitzel GM, Parsek MR (2003).** Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 69: 2313-2320.
- Teng, Y., Liu, L., Zheng, N., Liu, H., Wu, L., & Yue, W. (2022).** Application of different indices for soil heavy metal pollution risk assessment comparison and uncertainty: A case study of a copper mine tailing site. *Minerals*, 12(9), 1074.
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022).** Bacterial siderophores: Classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. *Plants*, 11(22), 3065
- Timofeeva, A. M., Galyamova, M. R., & Sedykh, S. E. (2022).** Bacterial siderophores: Classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. *Plants*, 11(22), 3065.
- Tirry, N., Kouchou, A., El Omari, B., Ferioun, M., & El Ghachtouli, N. (2021).** Improved chromium tolerance of *Medicago sativa* by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 1-14.
- Tripathi, N.; Sapra, A. 2021.** *Gram Staining*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA.

- Troll, W., and Lindsley, J. (1955).** A photometric method for determination of proline. *Journal of Biological Chemistry*, 215: 655-660.
- Tsegaye, Z., Alemu, T., Desta, F. A., & Assefa, F. (2022).** Plant growth-promoting rhizobacterial inoculation to improve growth, yield, and grain nutrient uptake of teff varieties. *Frontiers in Microbiology*, 13, 896770.
- Tyagi, B., & Kumar, N. (2021).** Bioremediation: Principles and applications in environmental management. In *Bioremediation for environmental sustainability* (pp. 3-28). Elsevier.
- Uchimiya, M., Bannon, D., Nakanishi, H., McBride, M. B., Williams, M. A., & Yoshihara, T. (2020).** Chemical speciation, plant uptake, and toxicity of heavy metals in agricultural soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(46), 12856-12869.
- Vaid, N., Sudan, J., Dave, S., Mangla, H., & Pathak, H. (2022).** Insight into microbes and plants ability for bioremediation of heavy metals. *Current Microbiology*, 79(5), 141.
- Valente, J., Gerin, F., Le Gouis, J., Moëgne-Loccoz, Y., & Prigent-Combaret, C. (2020).** Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant, Cell & Environment*, 43(1), 246-260.
- Varma, A., Gameda, H. B., McNulty, M. J., McDonald, K. A., Nandi, S., & Knipe, J. M., 2021.** *Bioprinting transgenic plant cells for production of a recombinant biodefense agent.* bioRxiv
- Veiga, A., Maria da Graça, T. T., Rossa, L. S., Mengarda, M., Stofella, N. C., Oliveira, L. J., ... & Murakami, F. S. (2019).** Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds. *Journal of microbiological methods*, 162, 50-61.
- Verma, R. K., Sankhla, M. S., Jadhav, E. B., Parihar, K., & Awasthi, K. K. (2021).** Phytoremediation of heavy metals extracted from soil and aquatic environments: Current advances as well as emerging trends. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 12, 5486-5509.
- Masindi, V., & Muedi, K. L. (2018).** Environmental contamination by heavy metals. *Heavy metals*, 10(4), 115-133.
- Vindeirinho, J. M., Soares, H. M., & Soares, E. V. (2020).** Modulation of siderophore production by *Pseudomonas fluorescens* through the manipulation of the culture medium composition. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193, 607-618.
- Vineeth, M., Thabrez, M. D., Ayub, A., & Manoj, M. (2023).** New Insights into the Role of Siderophores as Triggers of Plant Immunity. *Multidisciplinary Research in Agriculture and Allied Sciences*, 101.

- Voccianti, M., Grifoni, M., Fusini, D., Petruzzelli, G., & Franchi, E. (2022).** The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plant's environmental stresses. *Applied sciences*, *12*(3), 1231.
- Wan, W., Qin, Y., Wu, H., Zuo, W., He, H., Tan, J., ... & He, D. (2020).** Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria with multiple phosphorus sources utilizing capability and their potential for lead immobilization in soil. *Frontiers in microbiology*, *11*, 510229.
- Wang, Z. Y., He, N., Wang, Y. J., & Zhang, J. (2013).** Effects of copper on organisms: a review. *Advanced Materials Research*, *726*, 340-343.
- Wei, L., Li, Y., Noguera, D. R., Zhao, N., Song, Y., Ding, J., ... & Cui, F. (2017).** Adsorption of Cu²⁺ and Zn²⁺ by extracellular polymeric substances (EPS) in different sludges: effect of EPS fractional polarity on binding mechanism. *Journal of hazardous materials*, *321*, 473-483.
- Wentworth B. J. and M. Stotts, . (2020).** Wilson's Disease: The Copper Connection. *Practical Gastroenterology*, *44*, 10–20
- Widmer, J., & Norgrove, L. (2023).** Identifying candidates for the phytoremediation of copper in viticultural soils: A systematic review. *Environmental Research*, *216*, 114518.
- Wijayawardena, M. A. A., Megharaj, M., & Naidu, R. (2016).** Exposure, toxicity, health impacts, and bioavailability of heavy metal mixtures. *Advances in agronomy*, *138*, 175-234.
- Wnuk, E. (2023).** Mobility, bioavailability, and toxicity of vanadium regulated by physicochemical and biological properties of the soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *23*(1), 1386-1396.
- Wu, Q., Zhang, Y., Zhao, Z., Xie, M., & Hou, D. (2023).** Estimation of relative chlorophyll content in spring wheat based on multi-temporal UAV remote sensing. *Agronomy*, *13*(1), 211.
- Wuana, R. A., & Okieimen, F. E. (2011).** Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Notices*, *2011*.
- Xia, Y., Farooq, M. A., Javed, M. T., Kamran, M. A., Mukhtar, T., Ali, J., ... & Chaudhary, H. J. (2020).** Multi-stress tolerant PGPR *Bacillus xiamenensis* PM14 activating sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) red rot disease resistance. *Plant physiology and biochemistry*, *151*, 640-649.

- Xu, D. M., Fu, R. B., Wang, J. X., Shi, Y. X., & Guo, X. P. (2021).** Chemical stabilization remediation for heavy metals in contaminated soils on the latest decade: Available stabilizing materials and associated evaluation methods-A critical review. *Journal of Cleaner Production*, 321, 128730.
- Yao, Z., Li, J., Xie, H., & Yu, C. (2012).** Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals. *Procedia Environmental Sciences*, 16, 722-729.
- Yoneyama, T. (2021).** Iron delivery to the growing leaves associated with leaf chlorosis in mugineic acid family phytosiderophores-generating graminaceous crops. *Soil Science and Plant Nutrition*, 67(4), 415-426.
- Yruela, I. (2009).** Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Functional Plant Biology*, 36(5), 409-430.
- Zaghloul, M. (2020).** Phytoremediation of heavy metals principles, mechanisms, enhancements with several efficiency enhancer methods and perspectives: A Review. *Middle East J*, 9(1), 186-214.
- Zaib, M., Sandhu, M., Zar, M., Ghani, U., Rehman, A., Musharraf, M. H., ... & Raza, I. (2023).** A Brief Review on Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Key Role in Plant Growth. *International Research Journal of Education and Technology (IRJEdT)*, 5(07), 104.
- Zainab, N., Amna, Khan, A. A., Azeem, M. A., Ali, B., Wang, T., ... & Chaudhary, H. J. (2021).** PGPR-mediated plant growth attributes and metal extraction ability of *Sesbania sesban* L. in industrially contaminated soils. *Agronomy*, 11(9), 1820.
- Zeng, J., Ke, W., Deng, M., Tan, J., Li, C., Cheng, Y., & Xue, S. (2023).** A practical method for identifying key factors in the distribution and formation of heavy metal pollution at a smelting site. *Journal of Environmental Sciences*, 127, 552-563.
- Zhang, Y., Li, M., Su, A., Lv, X., Qiu, Y., & Xu, Y. (2023).** Co-planting improves the phytoremediation efficiency of combined phenanthrene and copper co-contaminated soils. *Journal of Cleaner Productio*

Annexes

Annexe I :

1. Milieux de culture

Tableau 8. Composition des milieux de culture

Milieu	Ingrédients	g/L
Milieu succinate	K ₂ HPO ₄	6g
	KH ₂ PO ₄	3g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1g
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2g
	acide succinique	4g
	pH=7 (le pH est ajusté à 7 par NaOH 6M)	
Milieu Pikovskaya	Glucose	10
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
	NaCl	0,2
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,1
	KCl	0,2
	Extrait de levure	0,5
	MnSO ₄ .7H ₂ O	0,002
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,002
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
	Agar agar	15
	pH 7,0	
Milieu NBRIP (National Botanical Research Institut's phosphate medium)	Glucose	10
	Ca ₃ (PO ₄) ₂	5
	MgCl ₂ .6H ₂ O	5
	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,25
	KCl	0,2
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1
	pH 7,0	

1. Solution nutritive Hoagland

Tableau 9. Macro et microéléments utilisés en solution Hoagland

Macroéléments :		
Produits	Solution mère	Composant Par litre (mL)
	(g/L)	
1M KNO ₃	101	5
1M Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236	5
1M MgSO ₄ .7H ₂ O	246	2
1M NH ₄ NH ₃	80	1
1M KH ₂ PO ₄	136	1
Fe-EDTA	7.8 g /0.5 L	1,5
Microéléments		1

Microéléments :	
Produits	Solution mère (g)
H ₃ BO ₃	2,86
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,05
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.12

1. Gélose CAS

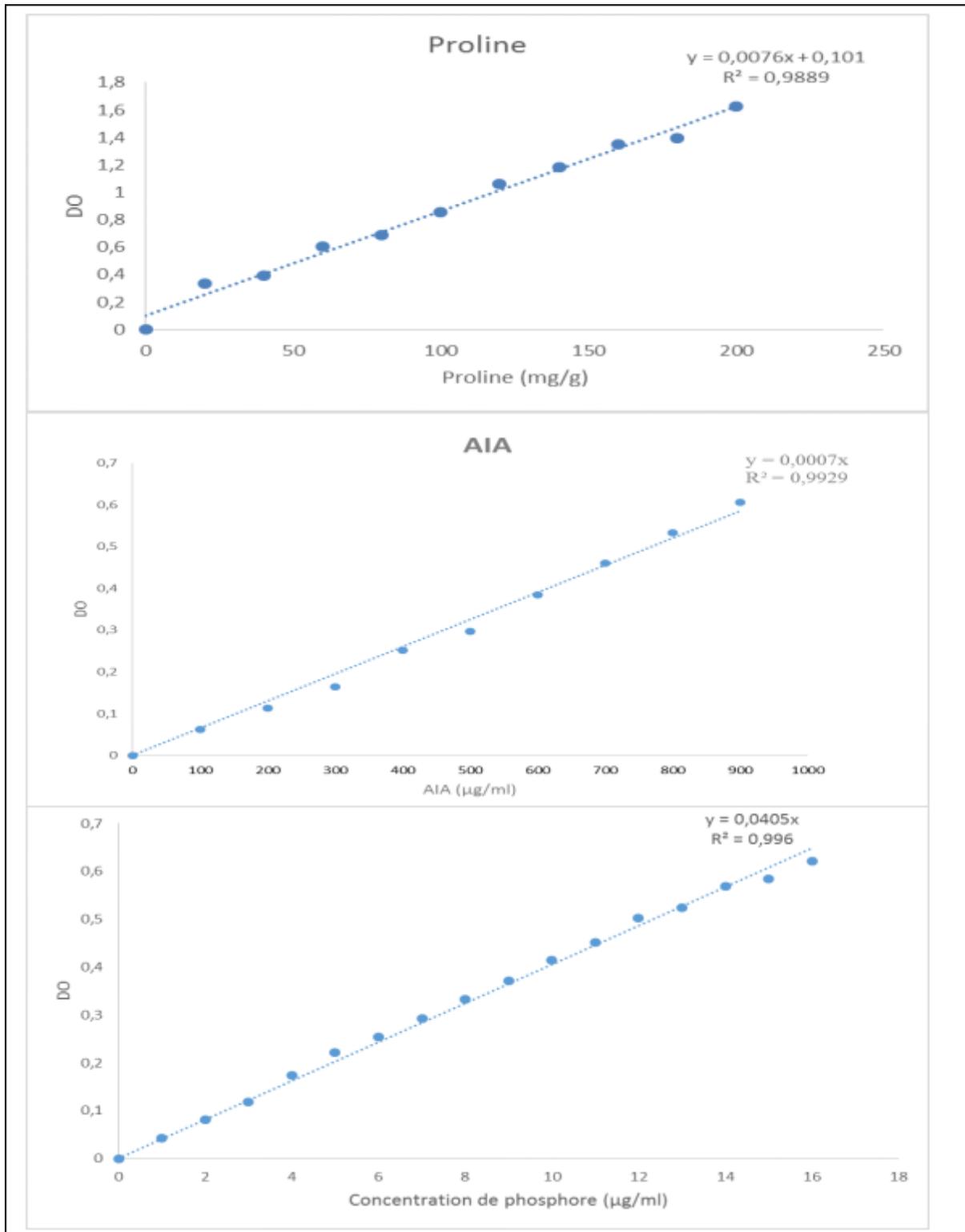
Tableau 10. Composition de la gélose CAS

Solution	Composition	Quantité (mL)	Volume (mL)
Solution 1 (Solution indicatrice Fe-CAS)	FeCl ₃ .6H ₂ O (1mM)	10	100
	CAS (1,21 mg/ml-)	50	
	HDTMA (1,82mg/ml)	40	
Solution		Quantité (g)	
Solution 2 (Solution tampon) pH= 6,8 avec du KOH 50%	PIPES	30,24	800
	KH ₂ PO ₄	0,3	
	NaCl	0,5	
	NH ₄ Cl	1	
	Agar	15	
Solution 3	Glucose	2 g	70
	Mannitol	2 g	
		Quantité (mg)	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	493	
	CaCl ₂	11	
	MnSO ₄ .H ₂ O	1,17	
	H ₃ BO ₃	1,4	
	CuSO ₄ 9 5H ₂ O	0,04	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,2	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1	
Solution 4	Casamino acids	10% (p:v)	30

Annexe II : Réactifs**Tableau 11. Réactifs et compositions**

1. Réactif de Salkowski	Composition
Acide perchlorique	50 mL à 35 %
FeCl ₃	1 mL de à 0.5 M.
2. Réactifs de Barton	Composition
Solution A:	12,5 g
Ammonium molybdate	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O, dans
Dissoudre d'ammonium molybdate	200 mL d'eau distillée.
Solution B:	
Ammonium Vanadate	
Dissoudre 0,625g d'ammonium Vanadate (NH ₄)	
VO ₃ , dans 150 mL d'eau distillée bouilli et	
laisse au froid puis ajouter 125 mL d'acide nitrique	
à 60%.	
3. La réaction de Vanado-molybdate (Barton)	Composition
La solution B est mise dans une fiole de 500 ml, puis la solution A est ajoutée et le volume est complété par l'eau distillée.	

Annexe III : Les courbes



a

Figure 50. Courbes d'étalonnages pour le dosage de la proline, de l'AIA, et du phosphore

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de cette thèse. Leur soutien et leur engagement ont été d'une valeur inestimable tout au long de ce parcours académique.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude envers ma famille pour leur soutien indéfectible tout au long de cette aventure académique. Leur amour, leur encouragement et leur compréhension ont été les piliers sur lesquels j'ai pu m'appuyer durant les moments de doute et de difficulté.

À mes amis, je souhaite également adresser mes plus sincères remerciements. Leur présence, leur soutien moral et leurs encouragements constants ont été une source de motivation inestimable.

- **École Supérieure d'Agronomie de Mostaganem**

Je suis reconnaissante envers les ingénieurs de laboratoire, les enseignants, et les doctorants de l'École Supérieure d'Agronomie pour leur précieuse contribution :

Ingénieurs de Laboratoire : N. KHOUANI, F. CHAOUI, F. LADJAL, A. BELARBI, L. ABDERAHMENE

Enseignant (s) : A. BAKHTI, A. CHADLI, D. MEHDEB

Doctorant (s) : C. BELHOCINE, AR. CHAIB EDDOUR, A. LARBAOUI, S. BAKHTI, H. BOUKHATEM, A. CHADLI, R. THELAIDJIA

Ingénieurs Agronomes : O. SACI, R. LOUIDI, ET B. MESBAHI.

Stagiaire : K. KHALEF.

- **École Normale Supérieure des Enseignants de Mostaganem**

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers Y. KHITER de l'École Normale Supérieure des Enseignants pour sa contribution.

- **Université de Mostaganem** : M. ZERHOUNI, H. HAMOUM, A. ARABI, S. ZAOUI
A. TAHLAYTI, N. BARRAHAL.

- **Université de Mascara** : N. GUEDIDER, S. ALIANE, S. BERKAT, S. KREIRI, M.
KOUADRI, S. MOKRANI. Leur appui a été précieux tout au long de ce projet.

- **Lafrage Ciment Oggaz**

Enfin, un grand merci à Zineb Sfiat de Lafarge Ciment Oggaz pour sa contribution.

Chaque personne mentionnée ci-dessus a joué un rôle crucial dans la réalisation de cette thèse, et je leur suis profondément reconnaissant pour leur contribution.