



لجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



التعليم
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسنطينة
كلية الطبيعة الحياة

Département : Microbiologie

: ميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : écologie microbienne

Intitulé :

Isolement et caractérisation de microorganismes capables de dégrader
l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) à partir d'un sol agricole contaminé par
le même herbicide

Présenté et soutenu par : FOUGHALI Ouissem
CHIAL Hanane

Le : 22/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : M. BENHIZIA Yacine

Professeur. U.F.M. Constantine1.

Rapporteur : Mme. ZERMANE Férial

Maître Assistante « A » - UFM Constantine1.

Examineurs : Mme. GUERGOURI Ibtissem

Maître Assistante « A » - U.F.M. Constantine1.

Année universitaire
2015 – 2016

Remerciement

*Nous remercions en premier lieu **Allah** le tout puissant pour toute la volonté et
Le courage qu'il nous a donné pour l'achèvement de ce mémoire, il a été
Et sera toujours à côté de nous pour réussir à terminer n'importe quel
Travail.*

*Ce travail a été réalisé, au « Laboratoire de Microbiologie tronc commun, Faculté des
Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères Mentouri-Constantine ».*

*Nous remercions vivement **Madame zermane feriale** de nous encadrer et nous avoir suivis
régulièrement pour la réalisation de ce travail et de tout ce qu'elle a fait pour nous
permettre d'atteindre ces résultats.*

Nos remerciements s'adressent également à tous membres du jury :

***Mr BENHIZIA Yacine** professeur de l'université des frères Mentouri Constantine
Et*

***Mme GUERGOURI Ibtissem** maître assistante classe A à l'université des frères Mentouri
Constantine qui nous ont fait l'honneur de leur présence et d'avoir sacrifié leur temps pour
juger ce travail.*

*Sans oublier de remercier tous les enseignants du département microbiologie et surtout de
spécialité écologie microbienne qui nous ont transmis le goût de l'étude.*

*Merci à l'inspection phytosanitaire de Constantine pour nous avoir donné les informations
nécessaires pour notre travail.*

*Enfin nous remercions les techniciennes de laboratoire de microbiologie tronc commun
Monia, Hanane et Soumia pour son aide et ses encouragements.*

*A toutes et à tous qui, de loin ou de près, ont contribué à la réalisation de
Ce mémoire.*

Dédicaces

*Aujourd'hui et après toutes ces années j'ai l'honneur et surtout le plaisir de
Dédier ce travail de master a toutes les personnes qui m'aiment, qui croient en
Moi et me donne des raisons de devenir meilleure.*

A mes parents

*A mes cher frères Ahmed, Amine et Seif et Hichem et mes sœurs Ouassila et Karima ;
Lynda et son enfant mohamed iyade*

A toute ma famille Chial et Berrehal, à mes cousins et mes cousines.

A mes amies amina, lina, imene , sawsane ; yousra ; fayza et hadjer

*A ma chère binôme et ma sœur « ouissam » pour avoir m'accompagné et me
Supporté*

*A toute la promotion de 2ème années master écologie microbienne .pour
Ces années passées ensemble*

Chial.hanane

Dédicaces

Merci Allah pour m'avoir donné la santé, la force nécessaire et le courage pour mener à réalisé ce travail.

Je dédie ce modeste travail à :

Ma mère, Rebiha, le symbole de tendresse, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments de mon éternelle gratitude.

Mon père, Ferhat, l'école de mon enfance, qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager à me donner l'aide et me protéger.

Puisse dieu, le tout puissant, puis vous préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A mes frères, Fouad, Amine, Djamel, Bilel, ainsi qu'à tous mes amis, collègues, copines, et toute ma famille.

A mes enseignants de l'école primaire jusqu'à l'université dont les conseils précieux m'ont guidée ; qu'ils Trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

A toutes les personnes qui m'ont permis de réaliser ce travail et accompagnés tout au long de ce chemin.

*A mon binôme et ma sœur « **Hanane** », qui a partagée avec moi les bons et les mauvais moments de ce Travail.*

Foughali Ouissem

Tables des matières

Liste des abréviations

Listes des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
❖ Synthèse bibliographique	
. Le sol	
1. Définition.....	3
2. Composition du sol.....	3
2.1. La phase solide du sol.....	3
2.2. La phase liquide du sol.....	3
2.3. La phase gazeuse du sol.....	4
2.4. Les microorganismes du sol et leur rôle.....	4
2.4.1. Les procaryotes.....	4
2.4.2. Les Eucaryotes.....	5
3. Contamination et pollution des sols.....	6
3.1. Définition.....	6
3.2. Formes de pollution.....	7
3.3. Contamination des sols.....	7
3.3.1. Contamination biologique.....	7
3.3.2. Contaminations par les métaux lourds.....	7
3.3.3. Contamination par les composés organiques.....	8
3.3.3.1. Composés organiques naturels.....	8
3.3.3.2. Les xénobiotiques.....	8
II. Les pesticides	
1. Définition.....	10
2. Composition et formulation.....	10
3. Classifications des pesticides.....	11
4. Utilisation des pesticides.....	12
5. Comportement et devenir des pesticides dans l'environnement.....	15
5.1. Processus de rétention dans le sol.....	16
6. Impacts des pesticides sur l'environnement et la santé humaine.....	17
6.1. Effets sur l'environnement.....	17
6.2. Effets sur la Santé.....	17
. Les herbicides	
1. Définition.....	18
2. Classification et mode d'action des herbicides.....	18
2.1. Classification.....	18
2.2. Modes d'action des herbicides.....	20
2.2.1. Herbicides à pénétration racinaire.....	20
2.2.2. Herbicides à pénétration foliaire.....	20
2.2.3. Herbicides de contact.....	20

2.2.4. Herbicides systémiques.....	21
3. Devenir des herbicides dans les différents compartiments de l'environnement.....	21
3.1. Transport et dispersion des herbicides dans l'environnement.....	21
3.1.1. Transport et dispersion dans le sol.....	21
3.1.2. Présence des herbicides dans les eaux.....	22
V. Les herbicides sulfonylurées	
1. Définition.....	23
2. Structure chimique des herbicides sulfonylurées.....	24
3. Activité herbicide et mode d'action des sulfonylurées.....	24
3.1. Activité herbicide.....	24
3.2. Mode d'action.....	25
4. Propriétés physico-chimiques des sulfonylurées.....	26
V. Le sulfosulfuron	
1. Définition.....	26
2. Propriétés physico-chimiques.....	27
3. Toxicité du sulfosulfuron.....	27
4. Rémanence du sulfosulfuron dans le sol.....	28
V .l'herbicide APYROS	
1. Propriétés physico-chimiques.....	28
2. Composition de l'herbicide Apyros.....	29
3. Usage et dose appliqué de l'herbicide Apyros.....	29
V . Processus de dégradation des pesticides	
1. Dégradation abiotique.....	31
2. La Biodégradation.....	31
3. Persistance.....	32
4. Produits de dégradation.....	32
❖ Matériel et méthodes	
1. Enrichissement et isolement des microorganismes tolérants et dégradants l'herbicide Apyros.....	34
1.1. Prélèvement des échantillons.....	34
1.2. Mesure du pH des échantillons.....	34
1.3. Milieux et réactifs.....	34
1.4. Méthode d'isolement.....	34
1.5. Purification des souches tolérantes de fortes concentration de l'herbicide Apyros et capables de l'utiliser comme SSCE.....	35
2. Conservation des souches isolées.....	35
3. Identification présomptives des souches isolées.....	35
3.1. Identification des bactéries.....	35
3.1.1. Observation macroscopique.....	35
3.1.2. Observation microscopique.....	36
3.1.3. Caractérisation biochimique.....	36
3.1.4. Caractérisation physiologique.....	38

3. 2. Identification des moisissures.....	38
3.2.1. Observation macroscopique des moisissures.....	38
3.2.2. Observation microscopique des moisissures.....	39
4. Préparation des inoculum des souches sélectionnées.....	39
4.1. Préparation de l'inoculum général.....	40
4.2. Préparation de l'inoculum lavé.....	40
5. Etude, <i>in vitro</i>, de la cinétique de dégradation de l'herbicide Apyros par les souches sélectionnées.....	40
5.1. Mesure de la densité bactérienne.....	40
5.2. Mesure de la variation de la concentration de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) au cours du temps d'incubation	41
❖ Résultats et discussion	
❖ Résultats.....	42
1. Enrichissement et isolement des microorganismes tolérants et dégradants l'herbicide Apyros.....	42
1.1. Caractéristiques et pH de l'échantillon.....	42
1.2. Isolement et sélection des souches résistantes à l'herbicide Apyros à différentes concentrations.....	42
1.3. Purification des souches tolérantes de fortes concentrations de l'herbicide Apyros et capables de l'utiliser comme seule source de carbone et énergie.....	42
2. Identification présomptive des souches isolées	44
2.1. Identification des bactéries.....	44
2.1.1. Aspect macroscopique.....	44
2.1.2. Observation microscopique.....	44
2.1.3. Caractérisation biochimique.....	46
2.2. Identification des moisissures	49
2.2.1. Observation macroscopique des moisissures.....	49
2.2.2. Observation microscopique des moisissures.....	49
3. Etude, <i>in vitro</i>, de la cinétique de dégradation de l'herbicide Apyros par les souches sélectionnées.....	50
3.1. Mesure de la densité bactérienne.....	51
3.2. Mesure de la variation de la concentration de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) au cours du temps d'incubation	52
❖ Discussion.....	55
❖ Conclusion et perspectives.....	61
❖ Référence bibliographiques.....	62
❖ Annexes.....	71

Liste des abréviations

A.L.S : l'acétolactate synthétase.

BN : Bouillons nutritif.

CMA : la concentration maximale admissible

COV : Composés organiques volatiles.

CPP : Comité de la Prévention et de la Précaution.

DAR : date avant récolte

DDT: dichlorodiphényltrichloroéthane.

DT50 : temps de demi-vie.

EC : les concentrés émulsionnables.

FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

GN : gélose nutritive.

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Koc : Coefficient d'adsorption.

LD : Dose létale.

LC : Concentration létales.

MDRGF : droit et le respect des générations futures.

MSM : minimal salt medium.

N/A : Not Available (Non disponible).

OGA : Oxytétracycline-Glucose-Agar.

ORP: Observatoire des Résidus de Pesticides.

PGPR : bactérie rhizosphérique phytoprotectrice des racines.

PDA: Potato Dextrose Agar .

PCB : Polychloro benzènes.

SSCE : Seul source de carbone et energie.

SC : les suspensions concentrées.

SG : granulés solubles.

SL : Les concentrés solubles.

TSI: Triple Sugar Iron Bio-Rad.

UIPP: Union des Industries de la Protection des Plantes.

WG : les poudres mouillables.

Liste des figures

Numéro de figure	Titre	Page
1	Processus de dissipation des pesticides dans l'environnement	16
2	Devenir des pesticides dans l'environnement	23
3	le premier sulfonyleurée de la classe des herbicides sulfonyleurées	24
4	Structure générale des sulfonyleurées	24
5	La structure moléculaire du sulfosulfuron	27
6	Taux de transfert des produits phytosanitaires hors de la parcelle agricole	31
7	Aspect macroscopique des colonies isolées	43
8	L'aspect microscopique des isolats après coloration de Gram (Gx100)	45
9	résultats de testes biochimique	47
10	Aspect macroscopique de la souche X6 sur le milieu OGA	49
11	courbe do en fonction du tempe de souche x2 et x3	51
12	Courbe d'étalonnage de l'herbicide Apyros	52
13	Variation de la concentration de l'herbicide Apyros au cours du temps d'incubation, pour la souche X2	53
14	Variation de la concentration de l'herbicide Apyros au cours du temps d'incubation, pour la souche X3	53
15	Variation de la concentration de l'herbicide Apyros au cours du temps d'incubation, pour les deux souches X2 et X3	54
16	plan d'identification des différentes souches isolées	57

Liste des tableaux

Numéro de tableau	Titre	Page
1	Composés organiques xénobiotiques susceptibles d'être apportés aux sols	9
2	Les différentes classifications des pesticides	12
3	Les herbicides homologués sur céréales et légumineuses utilisés en Algérie	14
4	les herbicides les plus utilisent en Constantine	15
5	Principaux groupes d'herbicides	19
6	Effet de la substitution sur l'action herbicide des benzènes sulfonyles ortho substitués	25
7	Les propriétés physiques et chimiques du sulfosulfuron	27
8	Toxicité du sulfosulfuron	28
9	Propriétés physico-chimiques de l'Apyros	29
10	La composition de l'Apyros	29
11	Usage et dose appliquée de l'herbicide Apyros	30
12	Dénombrement des colonies isolées de différentes concentrations de l'herbicide Apyros	42
13	Aspect macroscopique des colonies bactériennes isolées	44
14	Aspect microscopique des bactéries isolées	44
15	Coloration de Gram des souches bactériennes isolées	46
16	Caractérisations biochimique des souches résistantes à l'herbicide Apyros et capable de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie	46
17	Production des pigmentations sur le milieu KingA et King B	47
18	Caractères cultureux de la souche X6 sur le milieu OGA	49
19	l'aspect microscopique de la souche X6	50
20	Variation de la densité bactérienne des deux souches X2 et X3, au cours des 10 jours d'incubation, sur milieu MSM plus Apyros comme SSCE	51
21	Densités optiques obtenues pour différentes concentrations d'Apyros.	52
22	Variation de la concentration de l'herbicide Apyros pour les souches X2 et X3 en fonction du temps	53
23	Les différents genres bactériens suspectés	57

Introduction

Introduction

Depuis les années 1950, le développement de l'agriculture et la volonté d'augmenter les rendements des denrées majeures, faisant partie du régime alimentaire, ainsi que l'amélioration de la santé publique ont conduit à une utilisation croissante des pesticides (95% à usage agricole) et notamment les herbicides.

L'usage des pesticides a constitué une avancée importante dans la maîtrise des ravageurs, des maladies parasitaires et des mauvaises herbes en agriculture. Ces produits ont largement facilité les conditions de travail et de production des agriculteurs et ont permis une sécurisation incontestable de la production alimentaire. En effet, depuis la mise sur le marché des molécules herbicides, la lutte contre les mauvaises herbes a pu réduire le désherbage manuel ou mécanique. Cependant, les pesticides peuvent aussi être très nocifs et l'utilisation accrue de ces produits peut endommager l'environnement.

Les pesticides posent un véritable problème de santé publique, pas seulement pour les utilisateurs qui sont les plus exposés, mais aussi pour la population générale. En effet, les effets de faible quantité de pesticides, en mélange, pendant des périodes longues posent de nombreux problèmes de santé. L'épidémiologie nous montre ainsi que les personnes exposées aux pesticides ont plus de risques de développer de nombreuses maladies que les autres : cancer, problèmes d'infertilité, problèmes neurologiques, la maladie d'Alzheimer...etc. (*MDRGF, 2004*).

Afin d'éviter la contamination par ces denrées qui sont à l'origine d'intoxications chez l'homme et les animaux, il est donc recommandé de respecter les délais d'emploi des pesticides avant la récolte (*MDRGF, 2004*), ainsi que de trouver des solutions pour les éliminer de l'environnement.

Au cours des dernières années, les chercheurs ont imaginé divers procédés d'élimination de cette pollution, parmi eux, les traitements physico-chimiques requièrent des quantités considérables d'agent oxydant et conduisent parfois à la formation de produits intermédiaires indésirables et même toxiques. De plus certains produits résistent à ce type de traitement.

Une méthode pratique pour épurer les environnements contaminés est la bioremédiation ou dépollution biologique. La bioremédiation est définie par l'utilisation d'organismes vivants pour détruire les polluants environnementaux (*Perry et al., 2004*).

Parmi les polluants environnementaux, le sulfosulfuron est un herbicide qui appartient à la famille des sulfonyles, commercialisé sous forme de plusieurs formulations tel que : l'Apyros qui est largement utilisé en Algérie (*Khelifa et al., 2003*).

De ce fait, l'objectif de notre travail est l'isolement et la caractérisation de microorganismes capables de tolérer et de dégrader l'herbicide Apyros (sulfosulfuron), à partir d'un sol agricole contaminé par ce même herbicide.

Pour atteindre cet objectif, trois étapes ont été suivies durant ce travail :

- Isolement par enrichissement, des microorganismes tolérants et dégradant l'herbicide Apyros.

- Identification présumptive des souches isolées.

- Etude, *in vitro*, de la cinétique de dégradation de l'herbicide Apyros par les souches sélectionnées, par spectrophotométrie.

Synthèse
Bibliographique

. Le sol

1. Définition :

Les sols constituent l'élément essentiel des biotopes continentaux. Leur ensemble, dénommé pédosphère, résulte de l'interaction de deux compartiments biosphériques, l'atmosphère et les deux couches superficielles de la lithosphère. C'est l'altération des roches mères, due à des forces chimiques et biologiques, qui donne naissance au régolite (manteau superficiel de débris), lui-même transformé en ce que l'on appelle sol. Les cinq principaux facteurs impliqués dans la formation du sol sont la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (*Atlas et al. , 1992*).

Le sol a de nombreuses fonctions, il est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou fertilité (quantité de carbone, d'azote, capacité d'échange ionique, etc.). Il est aussi un acteur déterminant du cycle de l'eau (stockage et régulation) et de la qualité de cette eau (source de pollution, capacité de rétention des polluants mais aussi biodégradation de ceux-ci). Mais le sol joue aussi un rôle prédominant dans tous les cycles biogéochimiques (*Quénéa, 2004*).

2. Composition du sol :

Les sols sont des milieux poreux composés de quatre compartiments qui sont les troispases, solide, liquide, gazeuse et les organismes vivants (*Calvet, 2003*).

2.1. La phase solide du sol :

Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. La fraction minérale solide représente à elle seule 93 à 95 % du poids total du sol. Elle est composée d'éléments de tailles très diverses, provenant de la fragmentation plus ou moins poussée de la roche mère originelle. La matière organique inerte provient de l'activité de tous les organismes présents à la surface ou à l'intérieur du sol. Une partie de cette matière organique est produite par des organismes vivants, le reste est constitué par les débris des végétaux morts, les cadavres d'animaux et les cellules microbiennes lysées. L'essentiel de la matière organique parvenue dans le sol est d'origine végétale (*Calvet., 2003*).

2.2. La phase liquide du sol :

La phase liquide du sol n'est pas de l'eau pure, c'est une solution dont la composition est complexe et très variable. Elle contient de très nombreuses substances dissoutes organiques et inorganiques, ionisées et non ionisées. La solution du sol est principalement une solution d'électrolytes, généralement peu concentrée, dont la molarité totale est de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} mol L⁻¹. Elle contient également des ions H⁺ et OH⁻ dont les concentrations déterminent la réaction du sol caractérisée par son pH (*Calvet, 2003*).

2.3. La phase gazeuse du sol :

La phase gazeuse occupe les pores du sol (*Davet, 1996*), elle a une composition voisine de celle de l'air mais elle peut être très variable dans l'espace et dans le temps. Elle dépend principalement de deux facteurs, la profondeur dans le sol et l'activité biologique (*Calvet, 2003*).

2.4. Les microorganismes du sol et leur rôle :

Les organismes vivants du sol sont variés et nombreux. Un sol contient typiquement 10^9 à 10^{10} microorganismes par gramme de sol (*Stéphanie et al., 2007*).

2.4.1 Les procaryotes :

Ce type d'organismes réunit les bactéries et les *archéobactéries*. La variété des innombrables espèces est si grande (*Gans et al., 2005*), considérées dans leur ensemble, les bactéries semblent pouvoir prospérer dans les milieux les plus divers. Dans le sol, on rencontre surtout des bactéries mésophiles, préférant des pH neutres ou légèrement alcalins. Des bactéries courantes du cycle du soufre, comme *Thiobacillus thiooxidans*, peuvent cependant supporter des pH très acides. Les bactéries anaérobies peuvent coexister avec des bactéries aérobies dans le même échantillon de sol. On a même montré que des bactéries strictement aérobies et des bactéries strictement anaérobies pouvaient être présentes et actives dans une même particule. La densité du peuplement décroît en générale lorsque la profondeur augmente (*Davet, 1996*).

Parmi les bactéries pouvant aussi exister dans le sol, il y a :

❖ *Les Actinomycètes* : groupe de bactéries appartenant à la flore du sol, qui jouent un rôle important dans la décomposition des matières organiques.

❖ *Azotobacter* : bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui fixe l'azote atmosphérique chez la plupart des végétaux et le transforme en ammonium (20 à 40 kilos par hectare).

❖ *Azospirillum* : bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui fixe l'azote atmosphérique chez la plupart des végétaux et le transforme en ammonium (20 à 40 kilos par hectare).

❖ *Bacillus amyloliquefaciens*: bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui génère une enzyme phytase qui permet de libérer d'avantage de phosphore organique du sol. Elle colonise les racines et ralentit les champignons nuisibles et génère également des auxines (hormone de croissance).

❖ ***Bacillus megaterium***: une des plus grosses bactéries rencontrées dans les sols. Cette bactérie est capable de produire des endospores (résiste à la sécheresse). Elle est impliquée dans le cycle du phosphore (minéralisation microbienne du phosphore organique). Elle produit également une pénicilline amidase (antibiotique).

❖ ***Bacillus radicola***: bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui s'associe au Rhizobium. Cette bactérie est productrice de phytohormones ce qui permet de développer le système racinaire du végétal.

❖ ***Bacillus subtilis***: bactérie aérobie stricte et libre dans le sol. C'est une bactérie rhizosphérique phytoprotectrice des racines (PGPR). Elle crée un bio film adhésif et protecteur (mucilage microbien).

❖ ***Lactobacillus rhamnosus***: bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui sécrète des enzymes permettant de dégrader la matière organique fraîche (lignine, cellulose,...etc.). Elle inhibe également certains germes pathogènes.

❖ ***Lactobacillus faciminis***: bactérie aérobie stricte et libre dans le sol qui sécrète des enzymes permettant de dégrader la matière organique fraîche (lignine, cellulose,...etc.). Elle inhibe également certains germes pathogènes.

❖ ***Pseudomonas spp***: bactérie aérobie stricte et libre dans le sol. C'est une bactérie rhizosphérique phytoprotectrice des racines (PGPR). Elle crée un bio film adhésif et protecteur (mucilage microbien). Elle a également la capacité de solubiliser le fer.

❖ ***Rhizobium*** : bactérie aérobie stricte qui fixe l'azote atmosphérique en association avec des plantes hôtes (légumineuses) et le transforme en ammonium (20 à 40 kilos par hectare). (Coulibaly, 2005).

2.4.2 Les Eucaryotes :

➤ Les Champignons :

Leurs exigences thermiques permettent de les considérer dans leur ensemble comme des Mésophiles : ils se développent entre 10° C et 40°C. Les Champignons supportent généralement bien les pH acides et, dans de telles conditions, sont plus compétitifs que les bactéries pour l'exploitation d'un substrat. On ne doit cependant pas, pour autant, les considérer comme des organismes acidophiles. En fait, ces organismes semblent pouvoir se développer dans des intervalles de pH environnementaux assez larges. Beaucoup possèdent, d'ailleurs, une gamme d'enzymes capables d'attaquer un même substrat à des pH différents (Davet, 1996).

Parmi les champignons vivants dans le sol on a : (Coulibaly, 2005).

❖ *Coniothyriumminitans*: champignon filamenteux qui crée une barrière physique et stimule le développement racinaire par libération d'éléments nutritifs et minéraux. Elle détruit les sclérotés du sclérotinia par production d'enzymes cellulosiques et grâce à la production de molécules à activité biocide (peptaibols).

❖ *Phanerochaetesp*: champignon filamenteux qui produit des enzymes qui dégradent la lignine et la cellulose.

❖ *Trichoderma (hazarnium et atroviride)* : champignon filamenteux qui crée une barrière physique et stimule le développement racinaire par libération d'éléments nutritifs et minéraux. Elle détruit les champignons pathogènes par production d'enzymes cellulosiques et grâce à la production de molécules à activité biocide (peptaibols).

❖ *Mycorhizes (glomus Intraradices et mosseae)* : la mycorhize est une association entre les racines des plantes et des champignons. Elle existe chez 95% de toutes les plantes à fleurs et à graines. Dans la nature, elle est essentielle à la survie des deux partenaires. Chez la plante, elle augmente sa capacité d'absorber les minéraux essentiels et sa résistance aux maladies des racines. Et elle permet au champignon de tirer les glucides directement de son partenaire, sans la compétition des autres micro-organismes.

➤ **Les algues :**

Les formes terrestres, toutes microscopiques, sont particulièrement résistantes à la dessiccation. Les algues peuvent se contenter de faibles intensités lumineuses, ce qui leur permet d'avoir un comportement autotrophe actif à plusieurs millimètres au-dessous de la surface, particulièrement dans les sols riches en particules de quartz translucides. Elles sont, dans cette situation, mieux protégées de la dessiccation(Davet, 1996).

➤ **Les protozoaires :**

Dans le sol, on rencontre des représentants de tous les groupes à forme libre. Les Flagellés et les Rhizopodes sont les plus fréquents. Ils se déplacent dans l'eau retenue dans les micropores et à la surface des microsagrégats. Plusieurs espèces de Protozoaires du sol se montrent très ubiquitaires et se retrouvent dans des conditions climatiques très différentes (Davet, 1996).

3. Contamination et pollution des sols :

3.1. Définition :

La pollution et la contamination sont deux expressions couramment employées pour désigner l'accumulation anormale et exogène, généralement due à une activité humaine, d'éléments ou de composés minéraux, organiques ou d'agents pathogènes dans un milieu donné dont la qualité se trouve affectée (Chassinat al., 1996).

Une substance toxique désigne une substance naturelle ou de synthèse, minérale ou organique, présentant une nocivité pour les organismes vivants, pouvant être absorbée par voie foliaire ou racinaire chez les plantes, par inhalation, ingestion ou contact chez les animaux, elle provoque une intoxication des organismes affectés en perturbant une fonction vitale pouvant entraîner la mort (*Ramade, 2000*).

3.2. Formes de pollution :

On distingue deux types de pollution des sols (*Jeannot et al., 2000*) :

- La pollution localisée : Elle se distingue par la présence ponctuelle dans les sols des substances dangereuses: déversements, fuites ou dépôt de déchets.

- La pollution diffuse : Elle implique des polluants à faible concentration sur de grande surfaces, ils proviennent généralement d'épandages de produits: engrais ou pesticides, retombées atmosphériques.

Pour chacun de ces types, on distingue deux origines de pollution:

- La pollution accidentelle : Déversement ponctuel et momentané de substancespolluantes.
- La pollution chronique : survenant sur de longues durées, telles que les fuites sur des Conduites enterrées, les lixiviats issus de dépôts de déchets.

3.3. Contamination des sols :

3.3.1. Contamination biologique :

La pollution biologique des sols est imputable à des organismes pathogènes ou non,étrangers au milieu et parfois à des organismes génétiquement modifiés (*Nielsen et al., 1998*).

3.3.2. Contaminations par les métaux lourds :

Les métaux lourds sont des métaux ayant une densité supérieure à 5. Certains, tels le fer(Fe), le manganèse (Mn), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le cobalt (Co), le zinc (Zn) le molybdène (Mo), sont nécessaires aux êtres vivants en petites quantités (*Bourrelier et al., 1998*), ils font partie des oligoéléments. D'autres métaux lourds, tels que le plomb (Pb), le cadmium (Cd), le mercure (Hg), et l'argent (Ag) n'entrent pas dans la composition des êtres vivants. A concentration plus élevée, en revanche, tous présentent une toxicité plus ou moins forte qui dépend des conditions ambiantes (*Davet, 1996*). Les métaux lourds peuvent se trouver dans l'air, dans l'eau et dans le sol. Le pétrole, le charbon et le bois contiennent tous les éléments chimiques et parmi eux, les métaux lourds, en quantités différentes.

Il s'ensuit que lors des procédés de combustion, ces métaux lourds et/ou leurs composés parviennent dans l'air et peuvent atteindre le sol directement, où ils sont souvent adsorbés sur les aérosols ou dans les eaux des précipitations (*Calvet, 2003*). Ils peuvent également être ramenés au sol par le traitement des cultures avec certains pesticides, les apports d'engrais, de lisiers et de boues ou de composts (*Laurent et al., 2005*).

3.3.3. Contamination par les composés organiques :

3.3.3.1. Composés organiques naturels :

En règle générale, ils sont complètement biodégradables, au moins sous certaines conditions favorables. Il faut toutefois les considérer comme des polluants si :

- leur concentration est anormalement élevée et engendre un stress important dans la biocénose du sol, ce qui peut conduire à l'inactivation de mécanismes potentiels de biodégradation, ainsi qu'à la perte des propriétés homéostatiques du sol.
- leur nature chimique ne permet pas leur dégradation dans les conditions du sol considéré.

Par exemple, la décomposition de nombreux hydrocarbures (pétrole) est impossible en conditions d'anoxie (*Calvet, 2003*).

3.3.3.2. Les xénobiotiques :

Le sol peut recevoir de nombreux composés organiques xénobiotiques, possédant des structures chimiques et des propriétés très variées (**Tableau. 1**). Ce sont des composés artificiels, inventés par l'homme et différant fortement, dans leur structure chimique des composés synthétisés par les êtres vivants (*Perry et al., 2004*).

Tableau 1. Composés organiques xénobiotiques susceptibles d’être apportés aux sols (*Calvet, 2003*).

Catégorie de Composés	Origine	Intérêt	Risques Environnementaux
Pesticides	Principalement : activités agricoles et Secondairement urbaines et transport.	Protection des plantes hygiène urbaine et entretien des voies de circulation.	Pollution des eaux, de l’air à moindre degré.
Composés organiques volatiles. (COV)	Industrie.	Solvants, produits détachants.	Pollution de l’air.
Polychlorobenzènes. (PCB)	Industrie, déchets urbains.	Isolants électriques.	Pollution des sols, de l’air et des eaux.
Hydrocarbures Aliphatiques	Industrie.	Carburants.	Pollution des sols, de l’air et des eaux.

On peut distinguer entre autres :

- des composés inertes, non dégradables, non toxiques, n’interagissant pas avec des organismes vivants. La plupart des plastiques entrent dans cette catégorie.
- des composés toxiques, plus ou moins dégradables, qui passent la barrière cellulaire lors de la nutrition de la plante. Ceux-ci peuvent se concentrer le long des chaînes alimentaires et mener à des dommages physiologiques ou à de graves intoxications, voire la mort (*Calvet, 2003*).

Les composés organiques xénobiotiques présents dans le sol sont distribués dans les phases solide, liquide et gazeuse, selon les caractéristiques des phénomènes de partition concernés. Il en résulte que les eaux superficielles et souterraines peuvent être polluées à des degrés divers en fonction de leur prédominance dans la solution du sol ou sur la phase solide.

Le risque de transfert dans les eaux des composés organiques xénobiotiques dépend de leur mobilité qui est plus ou moins limitée par leur rétention et de leur quantité présente dans le sol qui, elle, est déterminée par leur dégradation. La rétention et la dégradation sont deux phénomènes clés du processus de pollution, puisqu’ils déterminent les quantités susceptibles d’être transportées. Ces quantités sont aussi diminuées, mais dans une moindre proportion, par la volatilisation et l’absorption par les plantes. Cependant, ces deux phénomènes ne participent pas à l’effet protecteur des sols puisqu’ils génèrent des pollutions de l’air et des végétaux (*Calvet, 2003*).

➤ **Pollution du sol par les pesticides :**

La pollution du sol par différentes substances, dont les pesticides, a été reconnue comme l'une des principales menaces qui pèsent sur les sols (*Merhi, 2008*). Cette pollution peut provenir des activités agricoles ; des activités de désherbage mais aussi des sites industriels en activité ou abandonnés (*Gatignol et Etienne, 2010*), elle varie avec le type de produit utilisé, le moment de l'application et le couvert végétal du sol dont en pulvérisation sur feuillages. On estime que les pertes au sol sont de 10 à 70 % (*Alterre, 2009*). Les pesticides sont susceptibles de produire leurs effets des dizaines voire des centaines d'années après l'utilisation (*Bonnefoy, 2012*), la vitesse d'infiltration dans le sol dépend du sol (humidité, taux de matière organique, pH) et du pesticide. (*Merhi, 2008*).

. Les pesticides

1. Définition :

Le mot « pesticide » est un terme générique défini par la directive 91/414/CEE du 15 juillet 1991 comme toute substance ou mélange de substances chimiques (naturelles ou synthétiques) utilisée pour lutter contre les ravageurs qui portent atteinte aux ressources végétales ou animales, nécessaires à l'alimentation humaine. Ces produits, sont également appelés produits agro pharmaceutiques, produits phytosanitaires, ou produits de protection des plantes, (*selon l'UIPP, 2009*). Les pesticides commercialisés sont composés d'une ou plusieurs matières actives auxquelles on a ajouté d'autres substances : produits de dilution, surfactants, synergisants... afin d'améliorer leur efficacité et de faciliter leur emploi.

2. Composition et formulation :

Un pesticide est composé de 2 types de substances :

✓ **Une ou plusieurs matières actives** : Ce sont ces matières actives qui confèrent au produit l'effet poison désiré, tels que : le sulfosulfuron, le glyphosate, le métaldéhyde, l'isoproturon.

✓ **Un ou plusieurs additifs** : Ces additifs renforcent l'efficacité et la sécurité du produit, Tels que : répulsif, épaississant, anti-moussant, solvant (*Maison de consommation et de l'environnement, 2003*).

La formulation correspond à la forme physique sous laquelle le produit phytopharmaceutique est mis sur le marché ; obtenue par le mélange des matières actives et des

formulant, elle se présente sous une multitude de formes, Les plus couramment répandus sont les suivantes :

- **Pour les formulations solides** : les granulés solubles (**SG**), les poudres mouillables (**WG**).
- **Pour les formulations liquides** :

- **Les concentrés solubles (SL)**, composés de produits solubles dans l'eau.

- **Les concentrés émulsionnables(EC)**, composés de produits liquides en émulsion dans le produit.

- **Les suspensions concentrées(SC)**, appelées (parfois flow de l'anglais flowable), Composées de particules solides dispersées dans le produit (*Amatrop, 2000*).

3. Classifications des pesticides :

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché sont caractérisés par une telle variété de structure chimique, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est complexe. D'une manière générale, ils peuvent être classés en fonction de la nature de l'espèce à combattre mais aussi en fonction de la nature chimique de la principale substance active qui les compose.

Les produits phytosanitaires sont indispensables à la production agricole, il en existe une variété. Ils regroupent plus de 900 matières actives qui rentrent dans plus de 8800 spécialités commerciales (*UIPP, 2009*). De plus, les variétés et les quantités utilisées diffèrent en fonction du pays où ils sont utilisés. Néanmoins, les systèmes de classification sont universels. (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Les différentes classifications de pesticides (*Conrad et al., 1999*).

1^{er} système de classification		2^{ème} système de Classification
En fonction de la Cible	Spectre d'action	En fonction de la nature chimique de la substance chimique active des pesticides
Les herbicides	Les mauvaises herbes des cultures	*Les organochlorés * Les organophosphorés * Les carbamates * Les pyrethroides * Les triazines * Les urées- substituées
Les fongicides	Les champignons ou encore les bactéries responsables aux phyto-maladies	
Les insecticides	Les insectes. Dans ce cas, les insecticides interviennent en les éliminant ou en empêchant leur reproduction. Différents types existent : les neurotoxiques, les régulateurs de croissance et ceux agissant sur la respiration cellulaire	
Les acaricides	Les acariens	
Les nématocides	Les nématodes	
Les rodenticides	Les rongeurs	
Les taupicides	Les taupes	
Les molluscicides	Les limaces et les escargots essentiellement	
Les corvicides Les corvifuges	Les oiseaux ravageurs de culture et surtout Les corbeaux	

4. Utilisation des pesticides :

✓ **Contexte mondial :**

Les données disponibles pour appréhender l'utilisation des pesticides sont généralement basées sur les chiffres de vente des principales sociétés phytopharmaceutiques. Ces chiffres ne représentent pas les consommations réelles du fait des stockages ou déstockages effectués par les utilisateurs ainsi que des exportations ou importations vers d'autres pays. Ils traduisent par contre une diversité des utilisations, certes agricoles pour la plupart, mais également domestiques (jardins) (*Aubertot et al., 2005*).

Le marché mondial des pesticides a atteint près de 11 milliards de dollars en 2000 et globalement augmenté depuis cette date pour atteindre près de 30 milliards de dollars en 2008.

En Amérique du Nord, les pesticides sont présents dans 82 à 90% des ménages, avec en moyenne au moins 3 à 4 produits différents, dont 75% sont des insecticides utilisés dans la maison et 22% des produits de jardins (*ORP, 2008*).

Depuis les années 60, les pesticides et les engrais ont permis de multiplier la productivité agricole mondiale par trois. Malgré ces traitements, les pertes occasionnées par les ravageurs aux cultures telles que le maïs représentent encore près de 30% en Europe et 50% en Afrique.

✓ **Contexte national :**

En Algérie, la consommation des pesticides est en constante augmentation, elle est de 6000 à 10000 Tonne/an et la commercialisation de ces produits ne cesse d'augmenter d'année en année.

En termes de qualité, la consommation des pesticides, en Algérie, diffère selon les régions du pays. En effet, l'Ouest est considéré comme la région la plus consommatrice des fongicides et des insecticides, elle est par contre la moins utilisatrice des herbicides.

Dans la région Centre, les insecticides sont plus utilisés que les fongicides et les herbicides. Il en est de même dans la région Est où les données sont similaires à la région Centre (*inspection phytosanitaire Constantine., 2016*). (Tableau 3-4).

Tableau 3 : Les herbicides homologués sur céréales et légumineuses utilisés en Algérie (*inspection phytosanitaire Constantine ,2016*) :

Spécialité commerciale	Cultures	Mauvaises herbes visées	Dose	Spécialité commerciale	Cultures	Mauvaises herbes visées	Dose
2.4DIMETHYL-AMINE SALT	Céréales	Dico	0.7/1 l/ha	GESAGARDFW	Légumineuses	D.A	1.5-2.5 l/ha (sols légers)
AGRISTAR 75 WG	Céréales	Dico	7,5-30 g/ha				2.5-4 l/ha (sols lourds)
AKOPIC 240 EC	Blé dur/Blé tendre	Mono	0.25 l/ha	GLYPHOS 320 SL	Céréales pré-moisson	A.A/bisannuelle s/pérennes	1.5 l/ha
APYROS	Céréales	D.A	26,5 g/ha	GLYPHON 360	Céréales pré-moisson	A.A/bisannuelle s/pérennes	1.5 l/ha
AXIAL 045 EC	Orge	Mono	0.7-1.3 l/ha	GLYPHON 480	Céréales pré-moisson	A.A/bisannuelle s/pérennes	1.5 l/ha
BLAST	Céréales/ légumineuses/soja	Dico	325-1250ml/ha	HERBALINE	Légumes secs	Adventices	1.5-2.5 l/ha
BASAGRAN	Céréales	Dico	2-4 l/ha	HUSSAR EVOLUTION INVECTRA 2,4 D	Céréales Céréales	D.A Adventices	1 l/ha 1 l/ha
BERITYL 70 WG	Céréales	Dico	15-35 g/ha	LATON	Céréales	Dico	1 l/ha
BLENET	Céréales	Dico	70ml-1 l/ha	HUSSAR EVOLUTION	Céréales	D.A	1 l/ha
BOXER	Céréales	D. A	4-5 l/ha	OLYMPUS FLEX	Blé dur/Blé tendre	Mono	250 g/ha
BRUMBY 80 EC	Blé dur/Blé tendre	Mono	0.75 l/ha	OMEROUS SUPER 7.5 EW	Céréales	Adventices	1 l/ha
BUZZ	Céréales	Dico	0.25 kg/ha	PALLAS 45 OD	Blés	Adventices	0.5 l/ha
CALLIOFOP	Céréales	Adventices	2.5-3 l/ha	RAPID 750 DF	Blé/Orge	Dico	12.5 g/ha
COSSACKOD	Céréales	D. A	1 l/ha	RAVINOL 80 EC	Céréales	Dico	0.75-1 l/ha
DAMINE 600	Céréales	Dico	1 l/ha	SANSAC	Céréales	Adventices	1 l/ha
DESORMONE LOURD D	Céréales	Dico	0.7-1 l/ha	SEKATOROD	Blés	Adventices	150 ml/ha
DIALEN SUPER	Céréales	Dico	0.75-1 l/ha	TIFON	Céréales	Adventices	70-100 ml/hl
DILOXAN 36 EC	Céréales	Adventices	2.5-3 l/ha	TOPIK 80 EC	Céréales (BD, BT, Seigle, Triticale)	Mono	0.75-0.9 l/ha
DISCOVER	Blé/Triticale	Mono	0.25 l/ha	TRAXOS	Céréales	Mono	0.9-1.3 l/ha
	Seigle	Mono	0.3 l/ha	TREFLODATE 48 EC	Légumes secs	Dico	625-750 ml/ha
DISS STOP	Céréales	A.A/bisannuelles/pérennes	1.5 l/ha	ZELAMIN 60 SL	Céréales	Adventices	1 l/ha
DOPLER PLUS 310 EW	Céréales	Mono	1.5-2 l/ha				

Tableau 4: les herbicides les plus utiliser en Constantine (*Inspection phytosanitaire Constantine*, 2016).

Son nom commercial	Algorithme	Concentration	Formulation	Herbicide	Culture	Dose d'application (L/ha)	Mo	Mo	Nom du fabricant	Pays	Agences
24-D DIMETHYLAMINE SALT DICHLOPROPENOLY ACETIQUE	608 GL	SL	Adventices diclofoprolol	Céréales	0.2-1 L/ha				ATULLO LTD.	66-44 109	SMA DERRANE POUR L'AGRICULTURE
AMLOX 48 % WP	48%	WP	Adventices graminées annuelles	Pomme de terre Carotiflorant Pois pois Fenoil	1-2.2 L/ha 1.5-2 L/ha 2 L/ha 1.5 L/ha	7			MOBICO	66-45 074	EURL GOLDEN FIELD
AMBLEA HOCKEY	70%	WG	Graminées et Dicotylédones	Pomme de terre	0.25-0.5 L/ha	21			HOCKEY INTERNATIONAL LTD.	12-22 084	HOCKEY ALGERIE LIMITED
AGL 100 EC	100 GL	EC	Adventices annuelles	Pomme de terre	0.75-1.5 L/ha	42			AAKO B.V.	14-54 005	AGRICOM INTERNATIONAL
AGRISTAR 75 WG	75%	WG	Adventices dicotylédones	Céréales	7.5-30 g/ha				AGRICHEM	47-45 128	AGRIDALGERIE
AGRI-WEB KILL 300 SL	300 GL	SL	Adventices	Adventices foliaires	1 L/ha 1.1 L/ha	30		Applications au ras de plus de 4 ans	AGRI-MAK LTD	13-33 004	AGRI-MAKO
ARGOL	240 GL	EC	Adventices	Vigne Arbrutivac Fruiter Agrumes	4-6 L/ha	14			SOCIETE INDUSTRIELLE ALCANTAN S.A.L	08-46 116	AGRIDALGERIE
AKOFEN SUPER	30% + 2.5%	SC	Graminées annuelles	Terrains non cultivés	1-3 L/ha				AAKO B.V.	07-45 128	AGRICOM INTERNATIONAL
AKOPHC 240 EC	240 GL + 60 GL	EC	Adventices graminées	Ble tendre/Ble dur	0.25 L/ha			Applications en post-émergence de la culture et des adventices Adventices au stade 2-5 feuilles	AAKO B.V.	15-51 002	AGRICOM INTERNATIONAL
ALCALIDON 50 WP	50%	WP	Adventices graminées / dicotylédones	Pomme de terre / Carotte/Fenil / Artichaut, Fenouil / Pomme	1-2.5 L/ha	7			ALPRIT / ALCOTAN	05-45 075	ALPRIT
ALISO 70 WP	70%	WP	Adventices dicotylédones	Terrain	50-700 g/ha 6-7 L/ha	7			PHOSPHORUS S.L.	07-45 127	AGRI-MAKO LTD
APYKOS	75%	WG	Mono-cotylédones / dicotylédones / tronc / Plantes / mycètes / diatomées / galles / moules / caracanes / crustacés	Céréales	20.5 g/ha dose 200-400 L/ha			3 fois dans la vie au stade léger de la culture	MONSANTO	09-47 008	AGRI

109 Index des Produits Phytosanitaires à Usage Agricole

HERBICIDES

5. Comportement et devenir des pesticides dans l'environnement

Lors de l'application, qui s'effectue généralement sous forme de «spray», une grande partie du produit n'atteint pas l'organisme cible. Il y a alors gaspillage du produit chimique, diminution de l'effet et risque de pollution de l'air, du sol et des eaux (**Figure 1**). Plusieurs recherches consacrées à la dispersion des pesticides dans l'environnement ont prouvé la présence de ces produits dans plusieurs points de la biosphère qui n'ont subi aucun traitement (*Schomburg et al., 1991*, *Gregor et al., 1989*). Le devenir des pesticides dans l'environnement est contrôlé par de nombreux phénomènes physiques, chimique, et biologique. Les processus responsables de ces transferts sont la volatilisation,

la dérive, la rétention, le lessivage et le ruissellement. Les processus de dégradation jouent également un rôle important devenir des pesticides dans l'environnement et la dégradation peut prendre de quelques heures à plusieurs années selon les conditions environnementales et les caractéristiques physicochimiques du pesticide (*Roche, 1998*).

Le transport des produits phytosanitaire est gouverné par quatre facteurs majeurs :

- ✓ **Les propriétés chimiques du produit:** solubilité dans l'eau, ionisation, volatilité, persistance dans le milieu, présence ou l'absence de groupes réactionnels, ...etc.
- ✓ **Les propriétés du sol :** structure, type et quantité d'argiles, pourcentage de matière organique, pH, taux d'humidité, faune et flore, ...etc.
- ✓ **Les conditions et le type d'application :** taux d'application, surface traitée, nature de la cible, nature de la formulation, moment d'application,... etc.
- ✓ **Les conditions climatiques et hydrogéologiques:** intensité et fréquence de la pluie, température du sol, profondeur de la nappe, ...etc.

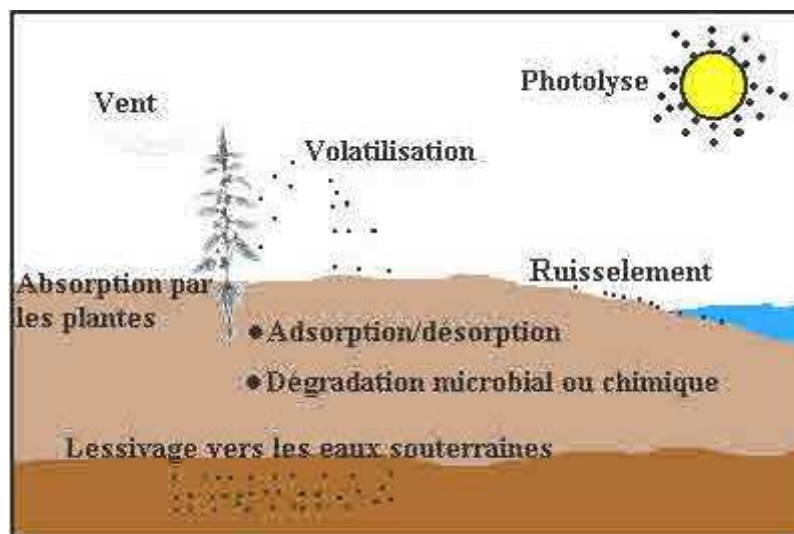


Figure 1 : Processus de dissipation des pesticides dans l'environnement (*Chafik, 2002*).

5.1. Processus de rétention dans le sol :

L'adsorption est un phénomène de surface par lequel les molécules se fixent aux particules du sol. La quantité de pesticide adsorbée varie selon le type de pesticide, la nature du sol, le pH du sol, ...etc. Les pesticides s'adsorbent facilement sur des sols riches en argile ou en matière organique. Les pesticides adsorbés sont moins susceptibles de se vaporiser ou de migrer dans le sol. Ils sont aussi plus difficilement captés par les plantes.

6. Impacts des pesticides sur l'environnement et la santé humaine :

6.1. Effets sur l'environnement :

Les pesticides sont prioritairement utilisés pour détruire ou repousser des insectes nuisibles aux cultures et récoltes et/ou pour détruire les adventices. Leur emploi superficiel sur les mauvaises herbes ou sur les cultures n'épargne pas le sol qui en reçoit une bonne part. Les organismes vivants des sols sont donc inévitablement en contact avec les pesticides. Ainsi, ces pesticides ou leurs produits de dégradation peuvent avoir une action directe ou indirecte sur les organismes vivants du sol (*Columa, 1977; Calvet et al., 2005*).

Les pesticides peuvent être toxiques pour les microorganismes des sols. Dans ce cas, l'activité microbienne est ralentie et on assiste à une sélection des microorganismes résistants aux pesticides ou pouvant l'utiliser comme source de carbone. Cela se traduit par des réajustements microbiens pouvant être associés à des modifications de caractéristiques physiologiques de la microflore des sols et peut être aussi à une diminution de la diversité des microorganismes (*Columa, 1977 ; Barriuso et al., 1996 et Savadogo et al., 2007*).

Généralement, les risques attribuables aux pesticides sont cependant difficiles à circonscrire vu le nombre élevé d'organismes vivants, leur sensibilité différente aux pesticides, la grande diversité des milieux et des pesticides employés, ainsi que la difficulté de recenser les effets engendrés.

Certains cas liés aux effets de ces produits sur les communautés benthiques (*Richardet al., 2004*), les amphibiens (*Aubertot et al., 2005, Bérubé et al., 2005*), les poissons (*Gendronet al., 1997, Dorval et al., 2005*), les oiseaux et les mammifères ont cependant été étudiés.

Des études récentes ont montré que les pesticides peuvent altérer les écosystèmes aquatiques (*Schäfer et al., 2007*), et certaines microflores qui sont essentielles à la fertilité des sols (*Downing et al., 2008*). Ainsi, la fertilité des sols peut être ébranlée à travers la diminution voire la disparition de certaines populations comme celles des lombrics (*CPP, 2002*).

6.2. Effets sur la Santé :

Les pesticides ont des effets nocifs sur les animaux et les plantes mais aussi sur la Santé humaine. Ainsi, 15 à 20% de ces produits chimiques sont cancérigènes et la plupart sont des perturbateurs endocriniens (*Meyer et al., 2003 ; Viel et al., 1998*).

L'exposition aux pesticides se caractérise par une multiplicité des voies d'exposition. En effet, ces substances peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané (absorption par la peau), par ingestion (absorption par la bouche) ou par inhalation (absorption par les poumons). (*Aubertot et al., 2005*). Bien que la connaissance des effets à court terme (toxicité aiguë) soit en progression, les risques à long terme (toxicité chronique) restent difficiles à apprécier.

L'essentiel des travaux sur le sujet concerne les populations professionnellement exposées tels que les agriculteurs. Seules des études approfondies concernant généralement des enfants ont été réalisées sur l'exposition domestique. Par ailleurs, les experts spécifient d'emblée que les résultats des études réalisées auprès des populations à exposition professionnelle ne pourraient être extrapolés à la population générale du fait de l'importance et de la périodicité de ces expositions.

. Les herbicides

1. Définition :

Les herbicides sont appelés parfois désherbants, notamment en horticulture. Ce sont des matières actives ou des produits formulés ayant la propriété de tuer les végétaux (*Coulibaly, 2005*).

Ce sont des produits aux structures chimiques complexes. Chaque herbicide possède des caractéristiques propres selon sa composition, son mode d'absorption, son effet sur la mauvaise herbe et son élimination progressive. Cependant, bien que chaque produit ait ses propriétés particulières, les herbicides d'une même famille présentent des structures chimiques semblables et de nombreuses caractéristiques communes (*Edelahid, 2004*).

Les herbicides permettent de supprimer ou de limiter le développement de plantes non désirées et des mauvaises herbes. Ils peuvent être sélectifs comme le 2,4-D ou non sélectifs comme le glyphosate (paraquate) et roundup (glyphosate). Ils agissent sur les « mauvaises herbes » soit par contact en détruisant les parties de plante sur lesquelles ils sont déposés, soit par pénétration et diffusion lorsqu'ils sont absorbés par les feuilles ou les racines et exercent leurs effets toxiques sur l'ensemble du végétal (*Fdil, 2004*).

2. Classification et mode d'action des herbicides :

2.1. Classification :

Les herbicides exploités aujourd'hui sont d'origine minérale ou d'origine organique (*Perrinet al., 1997*). Mais l'épandage moderne fait principalement appel aux composés organiques de synthèses. Chaque herbicide possède des caractéristiques propres selon sa composition, son mode d'absorption, son effet sur la mauvaise herbe et son élimination progressive (*Edelahid, 2004*).

Il n'existe pas de classification idéale, mais certaines peuvent être mieux appropriées à tel ou tel but (*Gauvrit, 1996*) (Tableau 5).

Tableau 5 : Principaux groupes d’herbicides (Document d’aide technique pour les normes directives et objectif associés à la qualité de l’eau potable en Ontario, 2003).

Selon la voie de pénétration	Selon le mode d’action	Selon les propriétés physico-chimiques
Herbicides à pénétration par les organes souterrains ** Ils sont appliqués sur le sol, ils pénètrent par les organes souterrains des végétaux (racines, graines, plantules)	Inhibition de la photosynthèse	Les triazines ** Un groupe présente une structure cyclique. ** Ce sont, en général, peu solubles dans l’eau, ils possèdent une grande stabilité chimique et sont assez fortement adsorbés sur le complexe argilo-humique
Herbicides à pénétration foliaire ** Ils sont appliqués sur le feuillage, ils pénètrent par les organes aériens des végétaux (feuilles, pétioles, tiges)	Inhibition de la synthèse des Lipides	Les acétamides L’alachlore et le métolachlore, sont très similaires chimiquement du fait d’un groupement commun N-COCH ₂ Cl et ils présentent une forte solubilité dans l’eau et une pression de vapeur plutôt élevée
Herbicides de contact ** Ils agissent après pénétration plus ou moins profonde dans les tissus, sans aucune migration d’un organe à un autre de la plante traitée	Inhibition de la synthèse des acides amines	Les aryloxyacides Ils sont constitués d’un noyau benzénique, naphténiq ou anthracénique
Herbicides systémiques ** Ces herbicides capables d’agir après pénétration et migration d’un organe à un autre de la plante traitée	Perturbation de la régulation de l’auxine	Les urées. Ils sont thermosensibles et sont facilement dégradés en isocyanates. Les urées sont assez persistantes et se retrouvent assez souvent dans les eaux. Les toluidines. ** Ils sont fortement adsorbés dans le sol. ** Sa demi-vie par évaporation à partir des surfaces de sol humide ou des eaux peu profondes varie de quelques heures à 50 heures.
	Inhibiteur de la division Cellulaire	
	Inhibiteur de synthèse des Caroténoïdes	
	Inhibiteur de synthèse des chlorophylles découplant	
	Perturbateurs de croissance	

Dans les années 1970-1980, de nouvelles familles d’herbicides à faible dose d’application sont développées, comme les sulfonylurées et les phosphonates (ayant des propriétés fongicides et herbicides) (Fdil, 2004).

Aujourd'hui on compte plus de 30 000 types de mauvaises herbes dans le monde et plus de 200 groupes d'herbicides permettant de les contrôler. Les herbicides représentent 60% des ventes totales mondiales de pesticides et 90% de ces produits sont utilisés en agriculture (*Edelahi, 2004*).

Ayant pour finalité la destruction des mauvaises herbes, les herbicides présentent également des risques pour l'environnement et la santé humaine. Il est donc important d'en contrôler son utilisation ainsi que sa commercialisation (*Gouvernement du Québec, 2002b*).

2.2. Modes d'action des herbicides :

Les herbicides se distinguent par leur voie de pénétration et leur mode d'action dans les végétaux (*Amatrop, 2000*).

2.2.1. Herbicides à pénétration racinaire :

Appliqués sur le sol, ils pénètrent par les organes souterrains des végétaux (racines, graines, plantules). Ce sont les traitements herbicides de prélevée, effectués avant la levée de la plante considérée (culture ou mauvaise herbe).

- actions sur la photosynthèse : triazines, diazines – uraciles, triazinones, urées substituées (*Fdil, 2004*).
- action sur la division cellulaire : toluidines.
- action sur l'élongation cellulaire : alachlore, métazachlore, métolachlor, etc.
- inhibition de la synthèse des caroténoïdes : isoxaflutole, clomazone.

2.2.2. Herbicides à pénétration foliaire :

Appliqués sur le feuillage, ils pénètrent par les organes aériens des végétaux (feuilles, pétioles, tiges). Ce sont les traitements herbicides de post-levée, effectués après la levée de la plante considérée (culture ou mauvaise herbe).

- actions sur la photosynthèse : bipyridyles, diazines.
- actions sur les membranes cellulaires : dinitrophénols, benzonitriles.
- action sur la division cellulaire : carbamates.
- action sur l'élongation cellulaire : aryloacides, dérivés picoliniques.
- action sur la biosynthèse : acides aminés, lipides.

2.2.3. Herbicides de contact :

Herbicides qui agissent après pénétration plus ou moins profonde dans les tissus, sans aucune migration d'un organe à un autre de la plante traitée. Exemples : gluphosinate d'ammonium.

2.2.4. Herbicides systémiques :

Herbicides capables d'agir après pénétration et migration d'un organe à un autre de la plante traitée exemples glyphosate.

3. Devenir des herbicides dans les différents compartiments de l'environnement:

3.1. Transport et dispersion des herbicides dans l'environnement :

Le transport et la dispersion des herbicides dans l'environnement (**Figure 2**) sont fonction de leurs propriétés chimiques. La volatilité, la solubilité dans l'eau, la capacité à se fixer aux matières complexantes du sol (coefficient de partage carbone organique-eau (Koc)) déterminent le compartiment dans lequel le produit va se retrouver préférentiellement (hydrophobie, ou hydrophilie) d'une molécule (*Devez, 2004*). Les herbicides migrent essentiellement verticalement. Avant d'atteindre la nappe phréatique, plusieurs processus physiques, chimiques et biologiques complexes interviennent le long du leur parcours (*Ait-Sai, 1993*). Les principaux modes de dispersion des pesticides dans l'environnement sont :

- La diffusion par infiltration entraîne une contamination du sol au-dessous du site d'entreposage. Elle peut provoquer la contamination des eaux souterraines et, si la diffusion se poursuit, la contamination des eaux de surface (par exemple des lacs et des cours d'eau).
- La dispersion sous l'effet du vent a pour effet de contaminer la surface de la zone proche du site (dispersion éolienne).
- La dispersion des pesticides par les eaux de ruissellement.
- La lixiviation dans les eaux souterraines et la dispersion dans le sous-sol. (*FAO, 2000*).

Certains pesticides sont transportés par le vent sous forme de particules, de vapeur ou de gouttelettes, ce qui risque de les entraîner le long de grandes distances depuis leur source d'origine. Par la suite, la pluie dépose ces contaminants sur le sol ou dans les cours d'eau, où certains d'entre eux s'accumulent et se transforment (*Desbordes, 2000*).

3.1.1. Transport et dispersion dans le sol :

L'eau est le principal vecteur de migration des produits phytosanitaires et à ce transport par l'eau se greffent des processus d'adsorption/désorption et des processus de dégradation, qui peuvent freiner ou parfois accélérer la migration. Si le principe de la dose juste au bon moment n'est pas respecté, et si les sols n'ont pas une capacité de rétention suffisante, il est admis que les herbicides aient une grande probabilité d'être entraînés par les eaux pluviales vers les cours d'eau et les nappes d'eau souterraine (*Desbordes, 2000 ; T. Ertli et al., 2004*).

Les herbicides liquides s'écoulent dans le sol et se dissolvent dans l'eau du sol. Les herbicides solides se dispersent tout d'abord depuis l'entrepôt à la surface du sol (par exemple sous l'effet du vent ou du ruissellement) et risquent ensuite de s'infiltrer dans le sol après dissolution dans les eaux

fluviales. Dans les deux cas, les herbicides finiront toujours par se diluer dans l'eau du sol. La concentration maximum d'herbicide dans le sol dépend de sa solubilité dans l'eau (*FAO, 2000*).

3.1.2. Présence des herbicides dans les eaux :

Un certain nombre d'actions préventives devrait être entrepris, mais a priori n'évite pas la présence des pesticides dans les milieux aquatiques pour les raisons suivantes:

- Les herbicides sont libérés dans le milieu par des utilisateurs variés, principalement l'agriculture en termes de tonnage, mais aussi le secteur non agricole où l'on relève de nombreuses situations à risques.

- Une importante cause de « fuite » d'un herbicide réside dans l'insuffisance des précautions de manipulations. De plus sur le terrain, la nécessité du traitement, les climatiques d'application, l'état et le réglage de l'appareil de traitement pèsent également beaucoup dans les quantités migrant vers les eaux.

- Les modes d'application liés aux produits, la capacité de rétention des terrains, les protections naturelles (couverture de nappes, bordures de cours d'eau ...etc.), sont autant de facteurs conditionnant le taux d'entraînement d'herbicides vers les eaux. A noter cependant que certaines molécules seulement et leurs dérivés sont en pratique analysables dans les eaux ; de plus certains herbicides ne sont pas quantifiables à des seuils suffisamment bas au regard des limites de qualité environnementale ou sanitaire, et les incertitudes sont parfois fortes (de l'ordre de 30%)(*F. Fdil, 2004*).

❖ Présence dans l'eau potable :

La problématique de la contamination de l'eau, tant en milieu naturel qu'urbain, est ressortie comme une des préoccupations majeures actuelles. Selon plusieurs groupes, l'eau potable est constamment soumise à de multiples expositions aux pesticides, que ce soit par contact avec l'air, par ruissellement ou à la suite des précipitations (*Calvet, 2003 ; Perrin et al., 1997*).

Les quantités trop élevées sont susceptibles de perturber le milieu aquatique ou de dépasser les seuils admissibles pour la production d'eau potable. Les normes françaises en vigueur concernant le taux des pesticides dans les eaux sont conformes à la directive européenne n° 98/83/CE qui limite la concentration maximale admissible (CMA) pour chaque substance à 0,1 g.L⁻¹ (sauf pour l'aldrine, le dieldrine, l'heptachlore et l'époxydédiheptachlore pour lesquelles la CMA est de 0,03 g.L⁻¹) et la concentration totale en pesticides à 0,5 g.L⁻¹ (*Flogeac, 2004 ; Fdil, 2004*).

C'est pourquoi, actuellement, de nombreux travaux de recherche portent sur l'étude du devenir des pesticides dans les eaux et les sols, ou sur les moyens de diminuer ces contaminations, ainsi que sur la biodégradation de ces composés (*Flogeac, 2004*).



Figure 2 : Devenir des pesticides dans l'environnement (Lissalde, 2010).

V. Les herbicides sulfonylurées

1. Définition :

Les sulfonylurées sont généralement caractérisés par une demi-vie relativement courte, allant de quelques jours à 8 semaines, bien que dans certaines conditions climatiques et / ou pédologiques (les climats secs, les sols alcalins), ils peuvent durer plus longtemps et causer des dommages dans la rotation des cultures (Blair et Martin, 1988).

Le premier herbicide sulfonylurée commercialisé fut le chloresulfuron en 1981 (Brown et Cotterman, 1994). Actuellement, la famille des sulfonylurées est composée d'une vingtaine d'herbicides développés principalement par Du Pont. Ces molécules sont caractérisées par une activité herbicide à des doses très réduites (10-100 fois moins que les herbicides conventionnels) (figure 3), ce qui a permis leur introduction rapide sur le marché des herbicides (Brown et Cotterman, 1994).

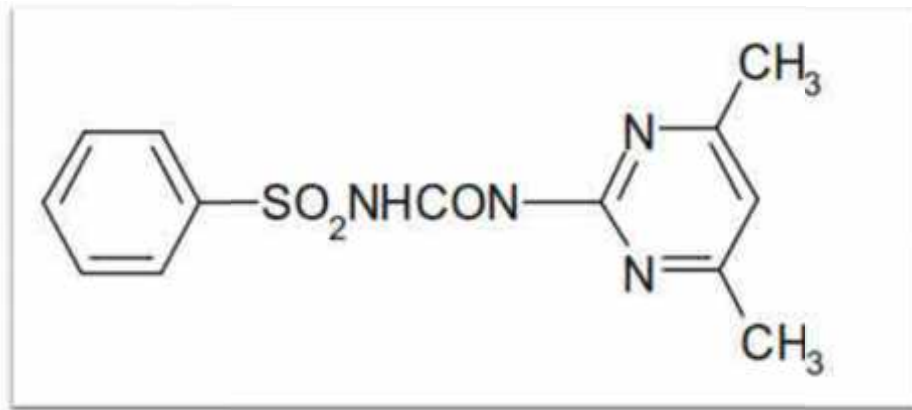


Figure3 : le premier sulfonylurée de la classe des herbicides sulfonylurées(Hay, 1990).

2. Structure chimique des herbicides sulfonylurées :

La structure générale des herbicides sulfonylurées est présentée dans la **figure 4** :

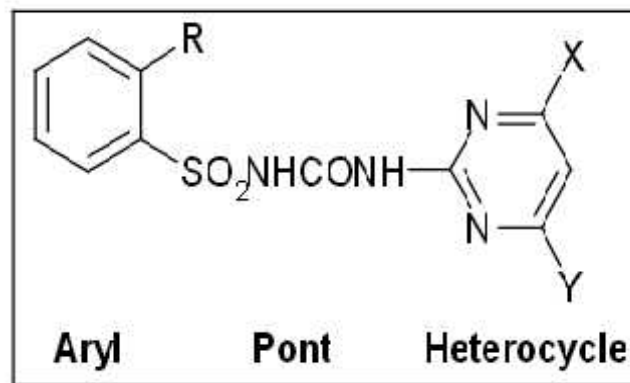


Figure 4: Structure générale des sulfonylurées (Brown 1990).

Groupement Ractivant:

CO₂CH₃; NO₂; F; Cl; Br; SO₂CH₃; SCH₃; SO₂N (CH₃)₂; CF₃; CH₃; CH₂OCH₃; OCF₃;

Groupements non activant:

COOH; OH; X=CH₃; Y=OCH₃

3. Activité herbicide et mode d'action des sulfonylurées :

3.1. Activité herbicide :

La structure chimique des sulfonylurées est composée de trois parties distinctes: groupement aryle, pont et hétérocycle (**Figure 4**).

Chaque partie joue un rôle très important quant à l'action herbicide de la molécule. Une action herbicide considérable est observée quand le cycle aromatique est *ortho* substitué (**Brown, 1990**).

Les sulfonylurées portant en position *ortho* un groupement avec un proton acide, par exemple, groupement carboxylique ou phénolique ont engénérale une faible action (**Brown, 1990**), **Letableau 6** présente le niveau d'action de quelques benzène sulfonylurées*ortho*-substitués. Les sulfonyluréesqui contiennent un groupement aryle au lieu d'un phényle sont aussi des herbicides actifs (**Brown, 1990**).

Tableau6: Effet de la substitution sur l'action herbicide des benzènes sulfonylurées*ortho*-ubstitués.

R	CO ₂ CH ₃	NO ₂	SO ₂ CH ₃	Cl	CO ₂ H	OH
Niveau d'action^a (g ha⁻¹)	1-2	4-8	8-16	8-16	>400	>2000

A :taux nécessaire appliqué pour contrôler plus de 70% des mauvaises herbes

Concernant l'hétérocycle, les niveaux d'action les plus importants sont observés quand les sulfonylurées contiennent un groupement pyrimidin-2-yl ou 1, 3,5-triazine-2-yl. Dans tous les cas, le maximum d'activité herbicide est obtenu quand le groupement hétérocyclique est substitué par des groupements alkyl ou alkoxy(**Brown., 1990**). Les niveaux d'action de quelques sulfonylurées avec différents groupements hétérocycliques.

Les sulfonylurées avec un pont non substitué sont généralement les plus actives. Pour les sulfonylurées dont le pont est substitué, l'action dépend énormément des groupements aryle et hétérocycles constituant la molécule.

3.2. Mode d'action :

Après absorption, l'herbicidesulfonylurée migre dans les plantes sensibles, où il inhibe l'acétolactate synthétase (A.L.S), enzyme responsable de la biosynthèse d'acides aminés essentiels. L'A.L.S est présente uniquement chez les végétaux, ce qui explique, la forte phytotoxicité du produit et sa faible toxicité pour le règne animal en général, et l'homme en particulier.

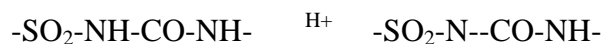
L'inhibition de l'enzyme A.L.S entraîne, très rapidement après application, un blocage de la croissance des plantes sensibles et supprime donc toute compétition vis-à-vis de la culture. Des

études ont montré que la transpiration et le métabolisme, chez les adventices, devenaient quasi nuls quelques heures après application de l'herbicide. On observe en effet, dans les jours qui suivent des symptômes de jaunissement (chlorose) ou de rougissement (anthocyanose); ces symptômes précèdent la disparition des adventices, désactivation rapide chez les plantes tolérantes. Les temps de demi-vie sont de 1 à 5 heures chez les plantes qui tolèrent les sulfonyleurées et de plus de 20 heures pour les mauvaises herbes vulnérables (*Brown, 1990*).

Les réactions de transformation qui expliquent la désactivation dans les plantes sont : l'hydroxylation aliphatique et arylique suivie de l'hydrolyse de la fonction sulfonyleurée, la rupture de la liaison sulfonamide et la O-déméthylation. (*Brown, 1990*).

4. Propriétés physico-chimiques des sulfonyleurées :

Les sulfonyleurées sont des composés non volatils avec des pressions de vapeur inférieures à 10^{-10} mmHg. Ils ont tous un proton acide adjacent au groupement sulfonyle et se comportent ainsi comme des acides faibles avec des valeurs de pKa allant de 3 à 5 (*Blair et Martin, 1988*).



Pour cette raison, leur solubilité dans l'eau à pH 7 est approximativement dix fois plus grande qu'à pH 5 (*Beyer et al., 1988*).

V. Les sulfosulfuron

1. Définition :

Le sulfosulfuron (**figure 5**) est un herbicide de la société Monsanto, commercialisé sous forme de plusieurs formulations commerciales tel que : Outrider, Attribut et Apyros qui se présente sous forme de granulés à disperser dans l'eau et contenant 76.53% de matière active (*khelifaet al., 2003*).

Essentiellement, le sulfosulfuron, à l'instar de tous les herbicides du type sulfonyleurées, agit en inhibant l'acétolactate synthase (ALS). Cette enzyme est essentielle à la synthèse des acides aminés aliphatiques (*Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 1999*).

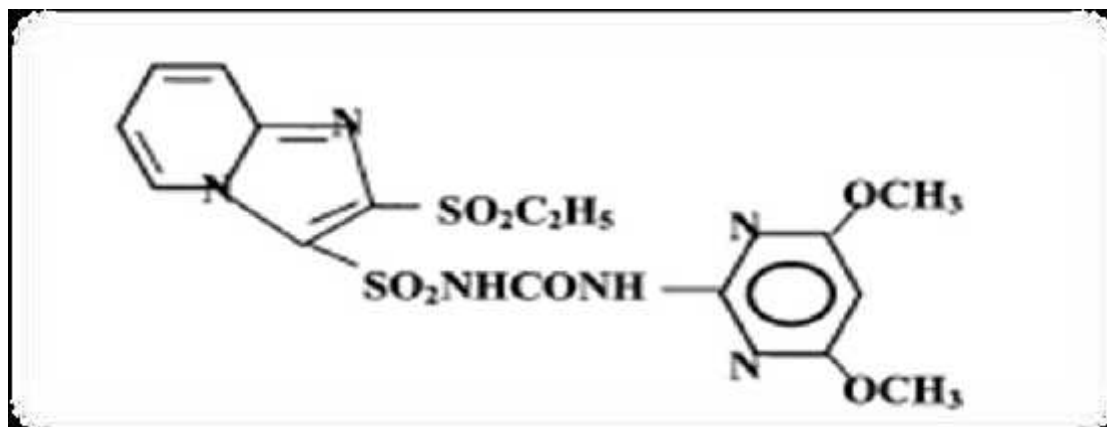


Figure 5 : La structure moléculaire du sulfosulfuron(Yaelet al., 2003).

2. Propriétés physico-chimiques :

Les propriétés physico-chimiques du sulfosulfuron sont présentées dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Les propriétés physiques et chimiques du sulfosulfuron(Californiadepartment of pesticide régulation, 2008).

Propriétés physico-chimique	Valeurs
Etat physique	Grain solide
Couleur	Blanc cassé
Densité	1.55 g/ml
Odeur	Aucune
pH (1% solution)	4.46
Point d'ébullition	334°C
Point de fusion	181-184°C
Solubilité	Soluble dans : méthylène chlorique, acétone, éthyle acétate
Coefficient de partition	Moins de 10 à pH 5,7 et 9
Pression du vapeur	$<1 \times 10^{-7}$ mm Hg à 25°C
Corrosion	Stable et non-corrosive pendant 14 jours à 54°C

3. Toxicité du sulfosulfuron :

Les types, les valeurs et les catégories de toxicité du sulfosulfuron sont présentées dans le **tableau 8**.

Tableau 8 : Toxicité du sulfosulfuron(*Californiadepartment of pesticide regulation, 2008*).

Type d'étude	Les valeurs de Toxicité	Catégories de toxicité
Toxicité orale	LD>5000mg/Kg	IV
Toxicité dermique	LD>5000mg/Kg	IV
Inhalation	LC> 3 mg/L	IV
Irritation primaire des yeux	N/A	III
Irritation dermique primaire	N/A	IV Ce n'est pas un irritantDermique
Sensibilité dermique	N/A	Ce n'est pas un sensitifDermique
Mots signal	N/A	Caution

4. Rémanence du sulfosulfuron dans le sol :

Les études sur la biotransformation effectuées au laboratoire sur des sols des Etats-Unis ont rapporté une accumulation maximale de l'herbicide correspondant à 21% de la quantité appliquée. Toutefois, les études sur les sols du Canada indiquent que le sulfosulfuron est légèrement à modérément rémanent dans le sol.

Les études sur l'adsorption et sur lessivage dans les sols ont été réalisées au laboratoire et elles révèlent l'existence d'un potentiel de mobilité. Par ailleurs, les études sur terrain sont organisées de façon à reproduire approximativement les conditions d'emploi réelles. Elles englobent notamment l'intégration de tous les processus de dissipation, notamment par transformation et par transport. Il n'est pas rare que des études sur terrain révèlent un potentiel inférieur à celui observé dans les études au laboratoire (*Agence deréglementation de la lutte antiparasitaire. 1999*).

V .L'herbicide APYROS

Depuis vingt années les herbicides appartenant au groupe sulfonilurés ont été recommandées pour contrôle des mauvaises herbes dans les céréales d'hiver (*Palm et Allison, 1980 ; Admczewskiet al., 1988*).à la fin du siècle dernier deux nouveaux herbicides de sulfonilurées à base desulfosulfuron(Apyros 75 WG) et propoxycarbazone-sodum(Attribut 70 WG) ont été introduit dans le marché polonais. Ces herbicide sont caractérisés par une grandes efficacité dans le contrôle des mauvaises herbes graminées, comprenant chiendent (Agropyron repens). Ainsi que certaines mauvaises herbes a feuilles larges dans le blé d'hiver.

L'effet herbicide de l'herbicide Apyros 75 WG contre graminées et les mauvaises herbes dicotylédones a été estimé dans de nombreuses expériences de terrain. Aussi de nombreuses enquêtes

ont été réalisées sur le contrôle de diverses espèces de mauvaises herbes à l'aide de l'herbicide attribut 70 WG (Admczewskiet al., 2000).

1. Propriétés physico-chimiques :

Selon la fiche de sécurité élaborée par Monsanto Europe N.V du produit commercial «Apyros».

Les propriétés physico-chimiques de l'Apyros sont présentées dans le **tableau 9**.

NB : Ces données physiques sont des valeurs types basées sur le produit testé mais peuvent varier d'un échantillon à l'autre.

Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques de l'Apyros (Monsato Europe N.V, 2014).

Couleur / gamme de couleurs	Blanchâtre
Odeur	Inodore
Forme	Granulés, (fluide)
Point d'ébullition	Non applicable
Propriétés explosives	Pas de Propriétés explosives
Propriétés oxydantes	Néant
Densité	0,550 g/ cm ³
Solubilité	Eau : soluble
Ph	5,5 ; 10g/l
Coefficient de partage n-octanol/eau	Log pow :< 1 (sulfosulfuron)

2. Composition de l'herbicide Apyros :

La composition de l'herbicide Apyros (**annexe 6**) est présentée dans le **Tableau 10**, selon la fiche de sécurité élaborée par **Monsato Europe N.V. 2014**.

Tableau 10 : La composition de l'Apyros (Monsato Europe N.V, 2014).

Composants	% pondéraux (approximatif)
Sulfosulfuron	75
Support inerte	16
Ingrédients mineurs de Formulation	9
Principe actif	1-(4,6-diméthoxyrimidin-2-yl)-3 (ethylsulfonylimidaso(1,2-a)pyridine-3ylsulfonyl)- urée

3. Usage et dose appliqué de l'herbicide Apyros :

L'usage et la dose appliquée du produit commercial « Apyros » sont présentés dans le (tableau 11) Selon la fiche de sécurité élaboré par *Monsato Europe N.V. 2014*.

Tableau 11 : Usage et dose appliquée de l'herbicide *Apyros* *Monsato Europe N.V. 2014*.

Usages homologués	Doses
Céréales : Herbicide Anti-Brome, lutte contre l'autre adventice graminée (Phalaris, folle avoine, chiendent, repousses d'orge, ...etc.) et certaines dicotylédones (gaillet, matricaire, moutarde des champs, ravenelle.	26,5 g/ ha. A partir du stade (2-3 feuilles du brome) jusqu'au stade (2 nœuds du blé). APYROS s'emploie obligatoirement en mélange avec un agent mouillant non ionique (Genamin T-200 BM) à la dose de 200CC /hl de bouillie.

V . Processus de dégradation des pesticides

Dès leur application, les pesticides sont soumis à des processus de dégradation abiotique (physico-chimiques) ou biotique (biologiques). Les processus de dégradation abiotique plus courants sont l'hydrolyse, l'oxydation, la réduction, la décarboxylation, l'isomérisation et la photodégradation. La biodégradation des pesticides peut être aérobie ou anaérobie et conduit à la production de métabolites jusqu'à la minéralisation (*Coli., 2000*).

La représentation des cinétiques de dégradation des pesticides dans l'environnement est généralement fondée sur une loi de décroissance exponentielle avec un pas de temps journalier, où la vitesse est donnée par le temps de demi-vie (DT50). La DT50 est une propriété déterminée en laboratoire en conditions standardisées et au champ dans le cadre de la procédure d'homologation des pesticides.

La dégradation des herbicides s'accompagne de l'apparition de métabolites, avec changement de la structure chimique, ce qui provoque des modifications de leur toxicité et de leur comportement dans les sols par rapport à celui de la molécule mère. Les réactions de dégradation sont sensibles à différents paramètres environnementaux et dépendent de la structure chimique des pesticides. Les voies de dégradation prédominantes dans chaque compartiment de l'environnement sont présentées dans la (figure 6).

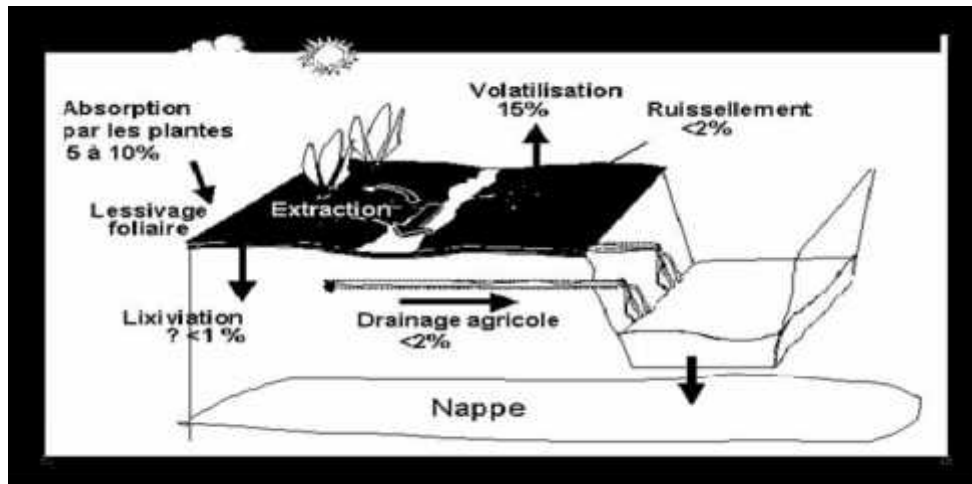


Figure 6: Taux de transfert des produits phytosanitaires hors de la parcelle agricole (*Robert et al ., 1996*).

1. Dégradation abiotique :

La dégradation abiotique correspond à une dégradation physique ou chimique du produit sans intervention de la biomasse. Les principales réactions sont dues :

- ✓ **au soleil** : les rayons incidents, notamment les rayons ultraviolets, mènent à la photolyse.
- ✓ **à l'eau** : les principales réactions sont l'hydrolyse, l'oxydation (principalement dans les eaux de surface) et la réduction dans les eaux anaérobies et en profondeur dans les sédiments.
- ✓ **aux particules solides du sol** : les particules d'argiles ou les acides humiques peuvent catalyser des réactions telles des complexassions ou des polymérisations.

L'ensemble de ces processus est influencé par des facteurs environnementaux tels que la température, le pH, les conditions d'oxydoréductions (présence d'oxygène...etc.).

2. La Biodégradation :

Cette dégradation a pour origine l'activité des microorganismes, le pesticide étant utilisé comme substrat nutritif et dégradé grâce à des enzymes. Généralement la biodégradation est plus importante que la dégradation abiotique, exception faite des pesticides récalcitrants. Il est important à ce stade de souligner que l'activité des microorganismes est importante notamment dans les premiers centimètres du sol (*Calvet et Charny, 2002*).

Les deux voies principales sont :

- **le métabolisme** : le pesticide est utilisé comme source d'énergie unique ou partielle.

➤ **le Co-métabolisme** : le pesticide ne peut être utilisé directement comme source de carbone ; ce mécanisme nécessite l'association de plusieurs souches complémentaires (et la présence d'un Co-substrat) ; ce phénomène est lent et peut être inachevé.

L'importance relative des phénomènes est déterminée par des facteurs édaphiques tels la température, le pH, l'humidité, l'aération et la fertilité. Toutefois un mécanisme peut être privilégié ou voir sa cinétique augmenter par l'utilisation répétée d'un pesticide sur un même sol : on parle alors d'**adaptation** de la population microbienne (qui peut conduire à la **sélection** d'une souche privilégiée) (*ECRIN, 2002*).

3. Persistance :

Initialement, la notion de persistance a été utilisée pour les pesticides ; elle reflète la capacité de la substance à ne pas être altérée par des processus physiques, chimiques et biologiques. « La persistance correspond donc à la stabilité des composés dans l'environnement, à leur résistance à une décomposition ou à une transformation dans la nature ». Il est important de souligner que les composés issus de la dégradation d'une substance initiale et ne pouvant être détruits dans la nature sont aussi considérés comme persistants mais persistants secondaires voire tertiaires. On fait par ailleurs une différence entre la persistance voulue et non désirée, dans le sens où la persistance non désirée induit un effet au-delà du temps prévu initialement (typiques des composés organiques chlorés comme le DDT). Cependant « il n'existe pas de mesure absolue de la persistance des composés. » On s'appuie plus sur des comparaisons entre différents composés. On s'aide alors des caractéristiques physicochimiques liées à la stabilité ou la réactivité des substances (comme la vitesse de réaction, le temps de demi-vie). (*Bliefert et Perraud, 2001*).

4. Produits de dégradation :

Une fois entrés dans l'environnement, la connaissance des produits de dégradation formés par les pesticides devient très importante afin d'évaluer leur toxicité pour la santé de l'homme et l'environnement (*Zamy et al., 2004*). En général les produits de dégradation sont moins toxiques que leurs composés parents (*Day et al., 1990*), sauf pour certaines exceptions (*Lanyi et Dinya, 2005*). Cela s'explique de plusieurs façons : le produit dégradé peut représenter la partie active du composé parent et peut être ainsi plus toxique pour l'environnement ou alors le produit de dégradation s'accumule en quantité plus importantes dans l'environnement ce qui le rend plus toxique que son composé parent.

L'évaluation de la toxicité des produits de dégradation de pesticides est récente. Il n'existe que peu d'études et de données sur les produits de dégradation des pesticides, il est donc difficile de tirer des généralités sur leur toxicité.

L'analyse des produits de dégradation est rendue difficile par leurs faibles concentrations dans le milieu et l'analyse de composés inconnus n'est pas aisée(*Sinclair et Boxall, 2003*).

Matériel et Méthodes

1. Enrichissement et isolement des microorganismes tolérants et dégradants l'herbicide Apyros :

1.1. Prélèvement des échantillons :

Les échantillons telluriques utilisés dans cette étude, ont été prélevés à partir d'un sol agricole traité par l'herbicide **Apyros** pendant plusieurs années, de la région d'Ain-alkarma, Par la méthode de *Pochon et Tradieux (1962)*, après avoir écarté les cinq premiers centimètres de sol, une quantité suffisante de terre est prélevée, jusqu'à 10 centimètres de profondeur, de plusieurs endroits de ce sol, Puis déposée à l'aide d'une spatule stérile sur une feuille d'aluminium stérile. Après un premier tri, écartant les pierres et les débris végétaux, les échantillons sont récupérés dans un flacon stérile, puis transportés au laboratoire où sont immédiatement analysés.

1.2. Mesure du pH des échantillons :

Cette mesure est réalisée dès l'arrivée du prélèvement au laboratoire. Par la technique de *Pochon et Tradieux (1962)*, qui consiste à déterminer la valeur du pH d'une suspension de sol en eau distillée (5g de sol dans 12,5 ml d'eau distillée).

1.3. Milieux et réactifs :

L'herbicide Apyros a été obtenu à partir des revendeurs des produits phytosanitaires d'El khroub Constantine.

Le milieu MSM minimal salt medium (**annexe1**) contenant l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie, est utilisé pour l'isolement des bactéries résistantes et dégradantes de cet herbicide (*Ying. H et al., 2011*).

Les milieux gélose nutritif GN et OGA (**annexe1**) sont utilisés pour le repiquage des colonies isolées.

1.4. Méthode d'isolement

Deux grammes de sol pollué par l'herbicide Apyros sont ajoutés dans un erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL du milieu MSM, supplémenté par l'Apyros comme seule source de Carbone et d'énergie à une concentration de 25 mg/L.

L'incubation se fait à 30°C, sous agitation (180 tours/minute) pendant 7 jours. Après cette période, Dix millilitres de la culture d'enrichissement sont transférés à 100 mL du milieu MSM frais, contenant 50 mg/L Apyros et incubés pendant 7 jours.

L'enrichissement a duré environ 4 semaines en augmentant progressivement la concentration initiale de l'Apyros jusqu'à 200 mg/L.

Pour chaque tour d'enrichissement des prélèvements sont effectués, puis ensemencés sur le milieu MSM solide additionné d'Apyros comme SSCE et incubés à 30°C pendant 3 jours (3 boîte pour chaque tour) pour sélectionner les souches tolérantes à chaque concentration.

la culture d'enrichissement final est diluée en série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-5}), et ensemencée sur le milieu MSM contenant 100 mg/L Apyros comme SSCE et 1.8% agar (**annexe1**). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 3 jours (*Ying.H et al., 2011*).

1.5. Purification des souches tolérantes de fortes concentration de l'herbicide Apyros et capables de l'utiliser comme SSCE :

Les colonies obtenues du dernier enrichissement (200 mg/L d'Apyros) et ayant une bonne croissance sur le milieu MSM solide additionné de l'herbicide Apyros comme SSCE sont repiquées et purifiées sur le milieu GN (**annexe1**) pour les colonies bactériennes et sur milieu OGA (**annexe1**) pour les colonies de moisissures.

2. Conservation des souches isolées

Les souches bactériennes isolées sont conservées sur milieu GN (**annexe1**), en gélose inclinée par ensemencement en stries, après incubation à 30 °C pendant 24 à 72 heures, les cultures sont conservées à 4°C.

Les souches de champignons sont ensemencées sur milieu PDA (**annexe1**), en gélose inclinée, après incubation à 28 °C pendant 7 jours, les cultures sont conservées à 4°C.

Un repiquage est réalisé tous les deux mois (*Bourdon.J et Marchal.N., 1982*).

3. Identification présomptives des souches isolées:

3.1. Identification des bactéries

3.1.1. Observation macroscopique:

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies isolées permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

D'après (*Joffin et Leyral, 2001*), les éléments d'identifications macroscopiques sont :

- La forme des colonies : punctiforme, irrégulières, ...etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre : petite ; moyenne ou grande taille.
- La pigmentation : couleur de la colonie.
- L'élévation : bossue, convexe, plane.
- L'opacité : opaque, translucides, transparente
- Aspect : lisse, rugueuse, sèche.

L'aspect macroscopique des colonies purifiées sur le milieu GN est noté.

3.1.2. Observation microscopique:

L'observation de l'aspect microscopique des colonies obtenue est effectuée par l'examen à l'état frais et la coloration de Gram.

➤ Examen a l'état frais :

L'état frais est une étape qui permet de mettre en évidence la forme des bactéries ainsi que le type de leur mobilité et leur regroupement (*Bousseboua H., 2002*). L'observation est réalisée comme suit :

Une petite goutte d'eau distillée stérile est déposée au centre d'une lame stérile ; une partie d'une colonie bactérienne pure est prélevée à l'anse et dissociée dans la goutte ; une lamelle stérile est ensuite appliquée sur la goutte en évitant la formation de bulles d'air ; l'observation microscopique est réalisée à l'objectif X40 puis X100, (*Joffin et Leyral, 2005*)

➤ Coloration de gram :

La coloration de gram est réalisée selon la méthode classique (**annexe5**).

3.1.3. Caractérisation biochimique:

• Test Mannitol mobilité :

Les tubes mannitol (**annexe2**) sont ensemencés par pique centrale à l'aide d'une pipette pasteur, puis incubés à 30⁰ C pendant 24h, l'utilisation du mannitol se manifeste par le virage de la couleur de l'indicateur de pH, du rouge au jaune et la mobilité se manifeste par un trouble toute au tour de la pique centrale (**annexe4**). (*Joffin et Leyral, 2006*).

• Test de TSI :

La gélose TSI(**annexe2**) permet la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et la production de la sulfure d'hydrogène (H₂S). L'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol) (**annexe4**). L'ensemencement du culot se fait par pique centrale, la pente par des stries serrées. L'incubation se fait à 30 °C pendant 24h (*Joffin et Leyral, 2006*).

• Utilisation de Citrate comme seule source de carbone :

La pente du milieu Citrate de Simmons(**annexe2**) est ensemencée par des stries à l'aide d'une pipette pasteur, puis incubées à 30 °C pendant 24h.

L'utilisation de citrate comme seule source de carbone se traduit par un virage de couleur du vert vers le bleu(**annexe4**). (*Joffin et Leyral, 2006*).

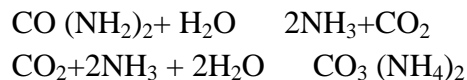
- **Test Clark et Lubs :**

Le bouillon Clark et Lubs(**annexe2**) permet l'étude des produits de fermentation du glucose et la différenciation entre les fermentations acides mixtes et butanediolique.

Les tubes de milieu Clark et Lubs sont ensemencés pour chaque souche et incubés à 30°C. Après 24h d'incubation, on ajoute dans un tube quelques gouttes de rouge de méthyle (une coloration rouge indique que la souche est RM⁺) et dans l'autre tube quelques gouttes de chacun des réactifs : VP1 et VP2 (une coloration rouge indique que la souche est VP⁺) (**annexe4**). (*Joffin et Leyral, 2006*).

- **L'hydrolyse de l'urée :**

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée et conduit à la formation d'ammoniac et de dioxyde de carbone. En solution, le produit final de la réaction est le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu selon la réaction suivante :



Le milieu urée indole(**annexe2**) est ensemencé puis incubés à 30 °C pendant 24h. La présence de l'uréase se traduit par une coloration rose à rouge violacée (**annexe4**). (*Joffin et Leyral, 2006*).

- **Production de l'indole à partir du tryptophane :**

Le milieu peptone exempt d'indole (**Annexe2**) permet la mise en évidence de la dégradation de tryptophanes en indole grâce à tryptophanase.

La culture est ensemencée sur des milieux riches en tryptophane (eau peptone exempte d'indole) puis incubés à 30 °C.

Après 24h d'incubation, l'indole produit est révélé par un réactif spécifique (Kovacs), en produisant un anneau rouge (**annexe4**). (*Joffin et Leyral, 2006*).

- **Recherche de la catalase :**

La catalase est une enzyme catalysant la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène), selon la réaction suivante :



Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée. Pour chaque souche, une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame stérile, sur laquelle quelques colonies sont réparties. Un dégagement gazeux abondant sous formes de mousse

Matériel et méthodes

ou de bulles d'air traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (*Joffin et Leyral, 2006*).

- **Recherche de l'oxydase :**

Les bactéries possédants l'oxydase peuvent oxyder le diméthyl-paraphénylène diamine. Pour mettre en évidence cette enzyme, un disque d'oxydase imprégné de diméthyl-paraphénylène diamine est sous mis en contact avec la culture bactérienne. La lecture se fait après 30 secondes. La présence d'une coloration rose pale à violet traduit l'oxydation de diméthyl-paraphénylène diamine (*Joffin et Leyral, 2006*).

- **Production des pigments sur les milieux King A et King B :**

Les milieux King A et King B permettent de différencier entre les espèces du genre *Pseudomonas*, par la mise en évidence de la production de pigment spécifique (pigment bleu sur le milieu King A et pigment jaune-vert fluorescents sur le milieu King B (**Annexe2**)).

La pente des milieux estensemencée par des stries à l'aide d'une pipette pasteur, l'incubation est réalisée en aérobiose à 30°C pendant 24h (*Joffin et Leyral, 2006*).

3.1.4. Caractérisation physiologique :

- **Détermination du type respiratoire**

Le milieu utilisé est la gélose VF (viande-fois) (**annexe1**), coulée dans des tubes à essais. L'effilure d'une pipette pasteur stérilisée par flamage, est plongée dans une suspension de la bactérie à étudier, l'inoculum est transporté dans le fond du tube puis on remonte la pipette en décrivant des tours de spires très serrés en prenant soin de ne pas aérer le milieu. L'incubation se fait à 37°C durant 24 H.

3. 2. Identification des moisissures :

3.2.1. Observation macroscopique des moisissures :

La détermination de l'aspect macroscopique des coloniesest faite directement sur la géloseOGA, en observant la face et le revers des boites. Ils 'agit de la détermination de la forme, la taille, la couleur, le contour et la texture de la souche(*Botton et al. 1990*), comme suit:

a) **Texture**

- laineuse : mycélium aérien abondant
- duveteux : mycélium aérien court
- poudreux : mycélium aérien produisant de nombreuses conidies créant une surface d'apparence poudreuse semblable à du sucre ou de la farine
- glabre : mycélium aérien peu abondant avec surface lisse

b) **Topographie** : plane, surélevée, cérébriforme, avec stries radiales

c) **Couleur** : surface, revers, pigment diffusible

- brun, gris, noir = champignon dématié
- blanc ou autre couleur (rouge, vert, jaune, mauve, etc.) = champignon hyalin

d) **Vitesse de croissance** (diamètre de la colonie à 7 jours)

- rapide : 3 cm
- modérée : entre 1 et 3 cm
- lente : 1 cm

3.2.2. Observation microscopique des moisissures :

✓ **Méthode directe :**

Un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant lactophénol, puis recouvert avec une lamelle couvre-objet qui fait écrasée la préparation.

L'observation est réalisée sous microscope optique à différents grossissements (40X) (*Botton et al., 1990, Chabasse et al., 2002*).

✓ **Méthode de Ruban adhésif :**

Un petit morceau du ruban adhésif est appliqué par la face collante sur la colonie puis déposé sur une lame porte-objet. Puis observer au microscope à l'objectif (×40) (*Joffin, 2013*).

4. Préparation des inoculums des souches sélectionnées :

Deux colonies obtenues du dernier enrichissement (200 mg/L d'Apyros) et ayant une bonne croissance sur le milieu MSM additionné d'Apyros comme SSCE sont sélectionnées pour des études plus approfondies.

4.1. Préparation de l'inoculum général

Les souches sélectionnées sont ensemencées sur GN, après incubation à 30°C pendant 48 heures, le contenu de chaque boîte est raclé à l'aide d'une anse de platine, puis mis en suspension dans des tubes de bouillon nutritif, cette suspension constitue l'inoculum général.

4.2. Préparation de l'inoculum lavé

50 ml du milieu liquide BN (**annexe1**) sont inoculés par cinq millilitres de l'inoculum général, et incubés sous agitation (180 tpm) à 30 °C pendant 48 heures.

Après incubation, la culture est centrifugée à 5000 tpm, pendant 30 minutes. Le surnageant est écarté et le culot est lavé deux fois à l'eau distillée stérile puis repris dans 50 ml de milieu MSM, cette suspension constitue l'inoculum lavé.

Pour chaque souche, l'inoculum lavé est préparé de telle manière à obtenir une densité optique égale à 1 pour une longueur d'onde de 600 nm.

5. Etude, *in vitro*, de la cinétique de dégradation de l'herbicide Apyros par les souches sélectionnées

La cinétique de dégradation de l'herbicide apyros par les souches sélectionnées est étudiée *in vitro*, par spectrophotométrie. Pour cela, 10 ml de l'inoculum lavé de chaque souche sont inoculés dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu minérale liquide, additionné de l'Apyros comme **SSCE** à une concentration équivalente à la dose recommandée (100mg/L), puis incubés sous agitation (180 tpm) à 30 °C, pendant 10 jours à. Toutes les expériences sont réalisées en double.

Un contrôle négatif non inoculer est préparé dans les mêmes conditions, pour contrôler la dégradation non biologique de l'herbicide.

Pour chaque souche, des prélèvements périodiques sont effectués à un intervalle de 48 heures, pendant 10 jours.

Pour estimer la croissance bactérienne, la densité optique est mesurée à 600 nm pour Chaque prélèvement.

Pour suivre la dégradation de l'Apyros, Chaque est centrifugé à 5000 tpm Pendant 30 min. Le surnageant est conservé à -20°C, pour une analysespectrophotométrique ultérieur.

5. 1. Mesure de la densité bactérienne

La variation de la densité bactérienne au cour des 10jours d'incubation est déterminée par spectrophotomètre d'adsorption moléculaire UV 1280 (**SHIMADZU**) Visible à une longueur d'onde de 600 nm.

5.2. Mesure de la variation de la concentration de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) au cours du temps d'incubation :

- **Courbe d'étalonnage :**

Une courbe d'étalonnage de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) est réalisée entre l'absorbance et différentes concentrations de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) (5, 10, 25, 75 et 100mg/L) dans l'eau distillée.

- La variation de la concentration de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) au cours du temps d'incubation est estimée par mesure de la densité optique des surnageants de cultures des souches sélectionnées (X2 et X3) sur MSM plus Apyros comme SSCE par spectrophotomètre d'adsorption moléculaire UV 1280 (**SHIMADZU**) Visible à une longueur d'onde 255 nm.

Résultats et Discussion

Résultats

1. Enrichissement et isolement des microorganismes tolérants et dégradants l'herbicide Apyros.

1.1. Caractéristiques et pH de l'échantillon :

L'échantillon tellurique est constitué d'un sol argileux, riche en humus, de couleur marron foncé à noir, de pH alcalin (8,22).

1.2. Isolement et sélection des souches résistantes à l'herbicide Apyros à différentes concentrations:

Pour chaque tour d'enrichissement, des prélèvements sont effectués, puis ensemencé sur le milieu MSM solide additionné l'Apyros comme SSCE et incubés en 30°C pendant 3 jours (3 boîtes pour chaque tour). Les résultats sont représentés dans le (tableau 12).

Tableau 12 : Dénombrement des colonies isolées de différentes concentrations de l'herbicide Apyros.

Période D'incubation (jour)	[Concentration d'Apyros (mg /L)]	Nombres des colonies Par boîtes			Nombres des boîtes qui présentent une croissance microbienne
		01	02	03	
7	25	256	192	221	3/3
14	50	0	0	32	1/3
21	100	0	0	28	1/3
28	200	75	62	48	3/3

1.3 Purification des souches tolérantes de fortes concentrations de l'herbicide Apyros et capables de l'utiliser comme seule source de carbone et énergie :

La culture d'enrichissement finale est diluée en série de dilutions décimales (jusqu'à 10⁻⁵), et ensemencée sur le milieu MSM contenant 100 mg/L Apyros comme SSCE et 1.8% agar (annexe 1). Les boîtes sont incubés à 30°C pendant 3 jours *Ying.Hetal.,(2011)*.



X1X2



X3X4



X5X6

Figure07 : Aspect macroscopique des colonies isolées du dernier enrichissement.

Résultats et discussion

Les colonies présentant une bonne croissance sont repiquées sur le milieu GN(**annexe1**) pour les bactéries et sur OGA(**annexe1**) pour les moisissures. L'aspect macroscopique des souches isolées est représenté sur la (**figure 07**).

2. Identification présomptive des souches isolées :

2.1. Identification des bactéries :

2.1.1. Aspect macroscopique :

La description morphologique des souches bactériennes isolées et purifiées sur milieu GN est représentée dans le **tableau13** :

Tableau13 : Aspect macroscopique des colonies bactériennes isolées.

Souches	Couleur	Taille	Forme	Aspect	Elévation	Bord	consistance	Opacité
X1	Jaune	Petite	Circulaire	Lisse	Bombée	Régulier	Muqueuse	Opaque
X2	Jaune	Petite	Circulaire	brillante	Bombée	Régulier	Muqueuse	Opaque
X3	Beige	Petite	Circulaire	Lisse	Plaine	Régulier	Muqueuse	Translucide
X4	Blanche	Petite	Circulaire	Lisse	Bombée	Régulier	Crémeuse	Opaque
X5	Beige	Moyenne	Circulaire	Lisse	Légèrement Bombée	Régulier	Muqueuse	Opaque

2.1.2. Observation microscopique

- **Etat frais :**

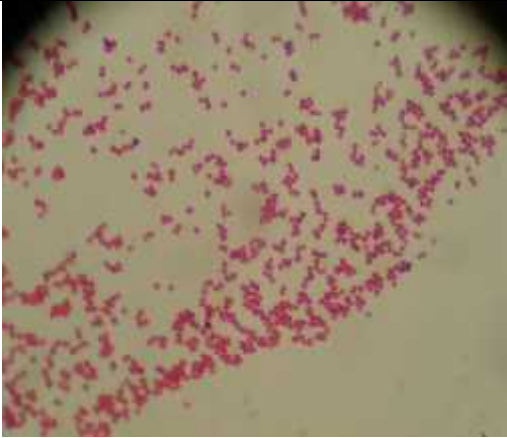
Les résultats de l'aspect microscopique de l'état frais sont représentés dans le **tableau14**.

Tableau 14 : Aspect microscopique des bactéries isolées

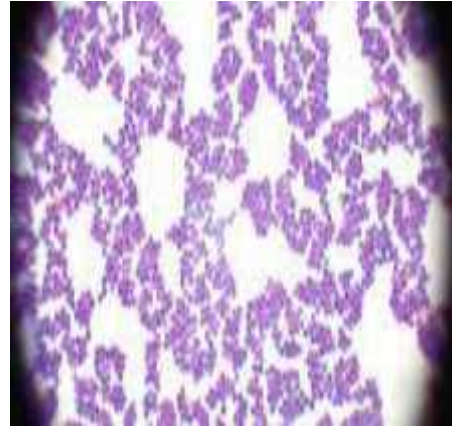
Souches	Forme	Regroupement	Mobilité
X1	Cocci	En amas	Immobile
X2	Cocci	En paire	Immobile
X3	Cocci	En amas	Immobile
X4	Cocci	En Chainette	Immobile
X5	Bacille	Isolé	Mobile

- **coloration de gram :**

Le type de Gram des bactéries isolées est représenté dans le la **figure 8** et le **tableau15**.

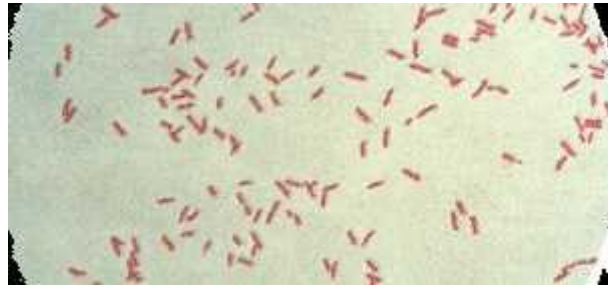


2



Cocci Gram -

Cocci Gram +



Bacille Gram-

Figure08 : Aspect microscopique des isolats après coloration de Gram (Gx100).

Résultats et discussion

Tableau 15 : Résultats de la coloration de Gram des souches bactériennes isolées.

Souches	Gram	Forme
X1	+	Cocci
X2	+	Cocci
X3	-	Cocci
X4	+	Cocci
X5	-	Bacille

2.1.3. Caractérisation biochimique:

Les caractères biochimiques des souches bactériennes isolées sont mentionnés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Caractères biochimiques des souches bactériennes isolées.

Souches Test	X1	X2	X3	X4	X5
Catalase	+	+	+	-	+
Oxydase	+	-	-	-	+
Mannitol	+	+	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	+
Citrate	+	+	+	+	+
Lactose	-	+	-	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Saccharose	-	+	-	+	+
Gaz	-	+	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
RM	+	+	+	-	-
VP	-	-	-	-	-
Urée Indole	-	-	-	-	-
Type respiratoire	A.S	A.S	A.S	A.F	AS
Nitrates	-	-	+	-	-
ONPG	-	-	-	-	-

AS : Aérobic Stricte, AF : Anaérobic Facultatif.

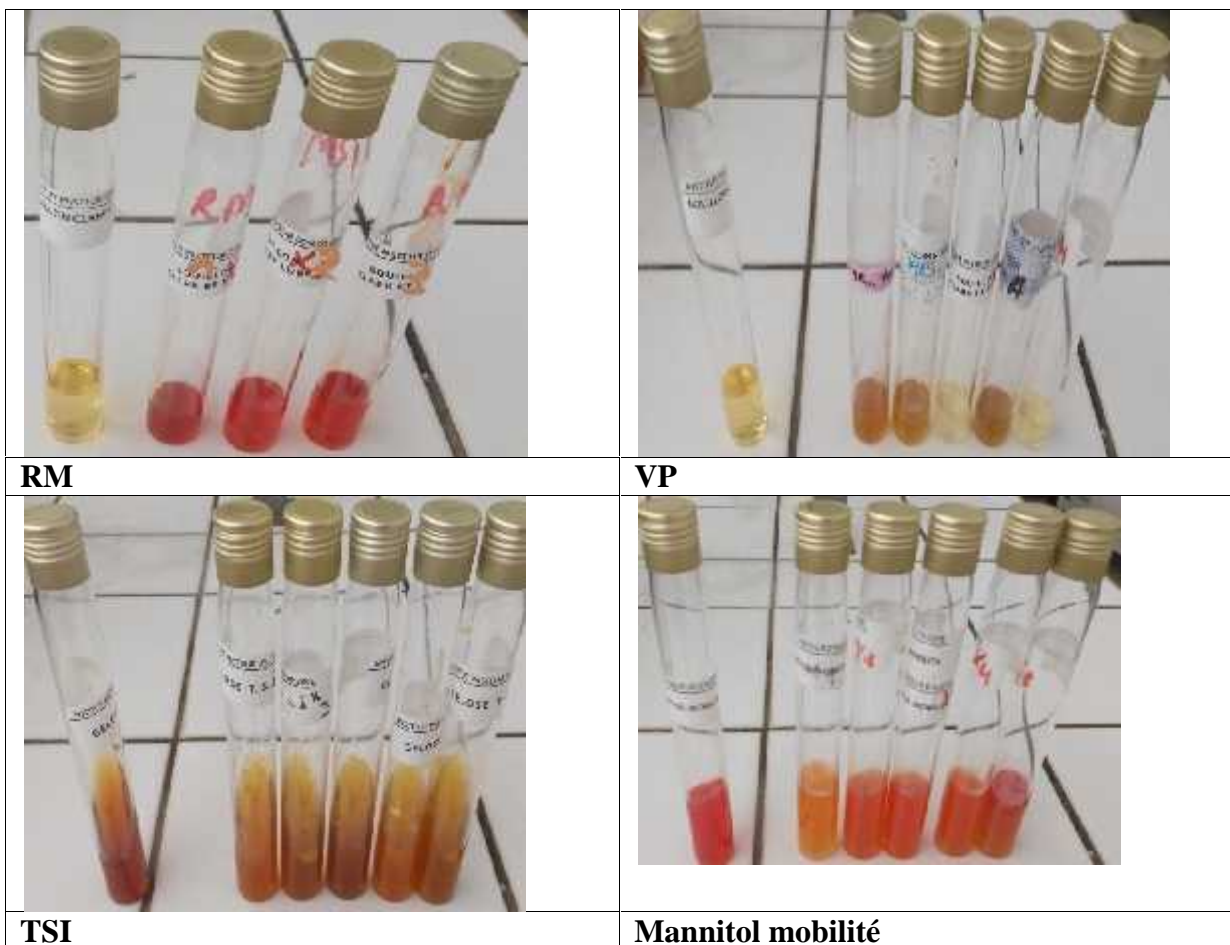
Résultats et discussion

Tableau 17: Production des pigmentations sur le milieu KingA et King B.

Souches	KingA	King B
X1	-	-
X2	-	-
X3	-	-
X4	-	-
X5	-	+

- : pas de pigmentation

+ : présence de pigmentation



Résultats et discussion





	
Viande foie	Urée indole
	
Citrate Simmons	King B

Figure 09: résultats de tests biochimiques

Résultats et discussion

2.2. Identification des moisissures :

2.2.1. Observation macroscopique des moisissures :

L'aspect macroscopique de la moisissure isolé (X6) est représenté dans la **figure 10** et le **tableau 18**.



Figure10: Aspect macroscopique de la souche X6 sur le milieu OGA.

Tableau18 : Caractères cultureux de la souche X6 sur le milieu OGA.



Texture	Topologie	Couleur	Vitesse de croissance (diamètre de la colonie à 7 jours)
Poudreuse	Plane	vert clair	modérée : entre 1 et 3

2.2.2. Observation microscopique des moisissures :

La technique de coloration de lactophénola permis d'observer des conidiophores isolés, des pénicilles constitués de phialides branchés directement à l'extrémité des conidiophores(**tableau 19**).

Résultats et discussion

Tableau19 : l'aspect microscopique de la souche X6.

Technique	Aspect microscopique	Caractères microscopiques
Ruban adhésif	 <p>A : Observation microscopique de la souche X6(G×40).</p>	Spores ovales de couleur verte, regroupées en chaînette
Coloration au lactophé	 <p>B : Observation microscopique de la souche X6(G×100).</p>	<p>Le conidiophore : simples ou ramifiés possède une forme ressemblant à celle d'un pinceau, terminé des phialides.</p> <p>Les phialides : sont disposées en verticilles à l'extrémité des Conidiophores . Les phialides sont serrées les unes contre les autres, l'ensemble donne une image de pinceau.</p> <p>Conidies : Unicellulaire, rondes disposées en chaînettes.</p> <p>Hyphe : cloisonné</p> <p>Le thalle est vert</p>

3. Etude, *in vitro*, de la cinétique de dégradation de l'herbicide Apyros par les souches sélectionnées

Les deux meilleures souches (X2 et X3) de point de vue croissance sur milieu MSM plus Apyros comme SSCesont choisis pour l'étude *in vitro* de la dégradation de ce même herbicide.

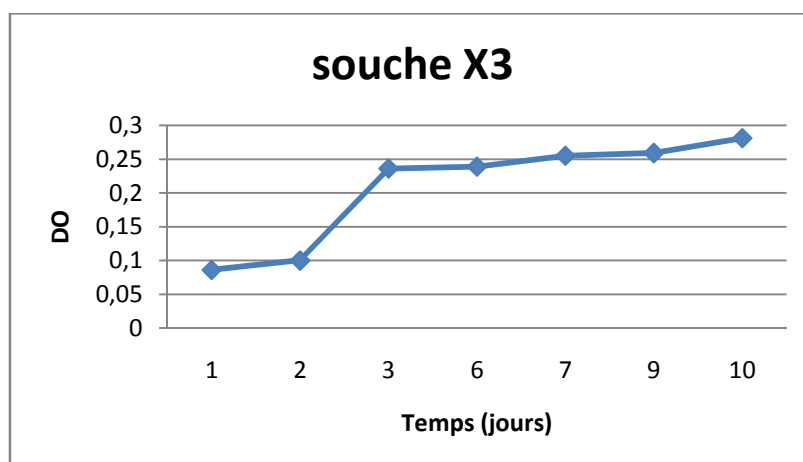
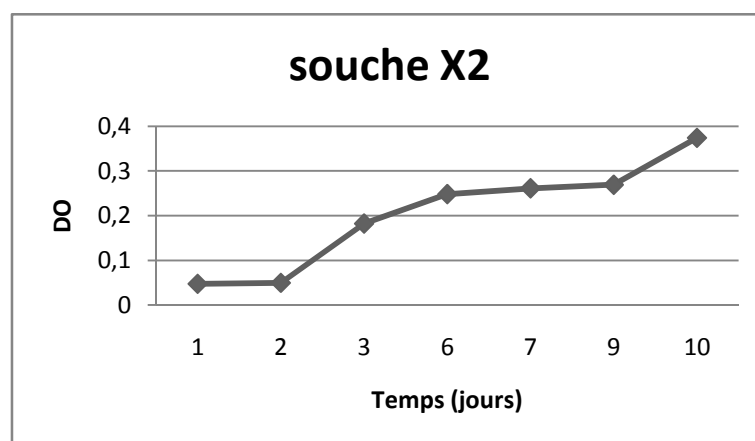
Résultats et discussion

3.1. Mesure de la densité bactérienne

La variation de la densité bactérienne, des deux souches sélectionnées, au cours des 10 jours d'incubation sur milieu MSM plus Apyros comme SSCE est représentée dans le **tableau 20**.

Tableau 20 : Variation de la densité bactérienne des deux souches X2 et X3, au cours des 10 jours d'incubation, sur milieu MSM plus Apyros comme SSCE.

Temps	X3	X2
24/05/2016	0.086	0.047
25/05/2016	0.100	0.049
26/05/2016	0.236	0.182
29/05/2016	0.239	0.248
30/05/2016	0.255	0.261
01/06/2016	0.259	0.269
02/06/2016	0.281	0.347



Figures 11 : Variation de la DO en fonction du temps des souches X2 et X3 en présence d'apyros comme SSCE.

Résultats et discussion

3.2. Mesure de la variation de la concentration de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) au cours du temps d'incubation :

- Courbe d'étalonnage :

Les densités optiques obtenues pour différentes concentrations d'Apyros sont représentées dans le **tableau 21**.

Tableau 21: Densités optiques obtenues pour différentes concentrations d'Apyros.

Concentration d'Apyros (mg/L)	5mg/L	10mg/L	25mg/L	50mg/L	75mg/L	100mg/L
DO	0.305	0.421	0.534	1.202	1.283	1.609

La courbe d'étalonnage de l'herbicide Apyros est représentée dans la **figure 12**.

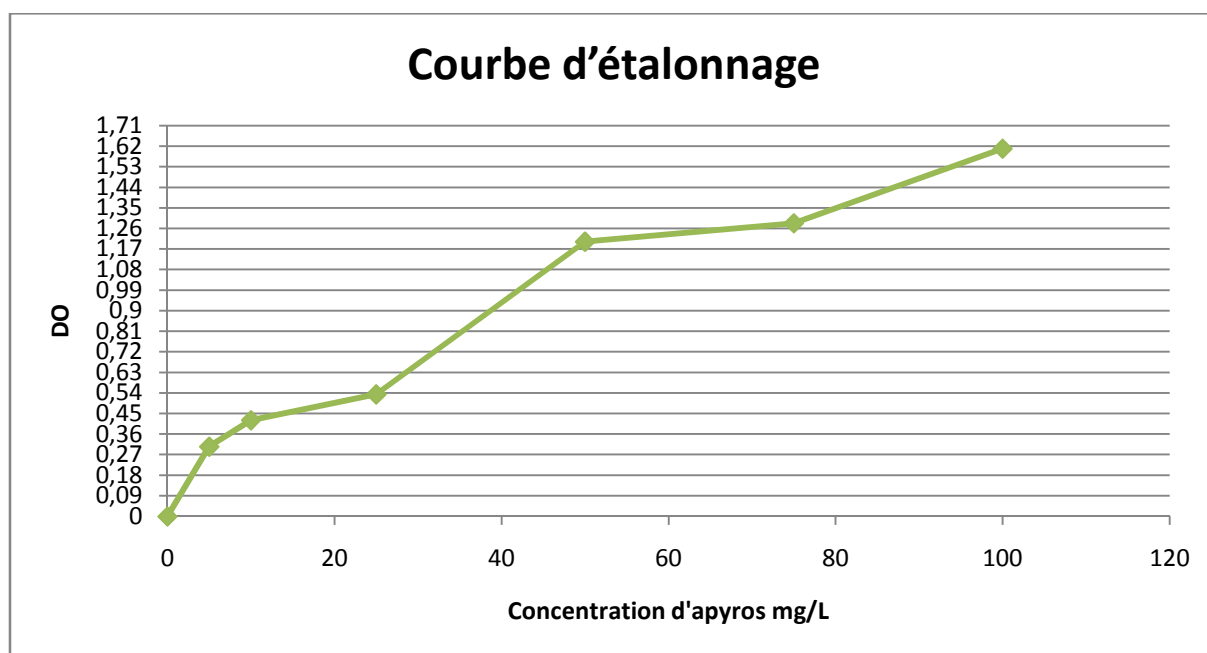


Figure 12: Courbe d'étalonnage de l'herbicide Apyros

La variation de la concentration de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) au cours du temps d'incubation, pour les souches X2 et X3 est estimée par la variation de l'absorbance des surnageants à 255 nm (**tableau 22, figure 13**).

Résultats et discussion

Tableau 22: Variation de l'absorbance des surnageants des souches X2 et X3 en fonction du temps en présence d'Apyros comme SSCE.

Souches	Après un jour d'incubation 25/05/2016	Après 3 jours D'incubations 26/05/2016	Après 6 jours d'incubation 29/06/2016	Après 7 jours d'incubation 30/05/2016	Après 10 jours d'incubation 02/06/2016
X2	0,135	0,051	0.026	0.003	0.003
X3	0,193	0,163	0,135	0,084	0,082

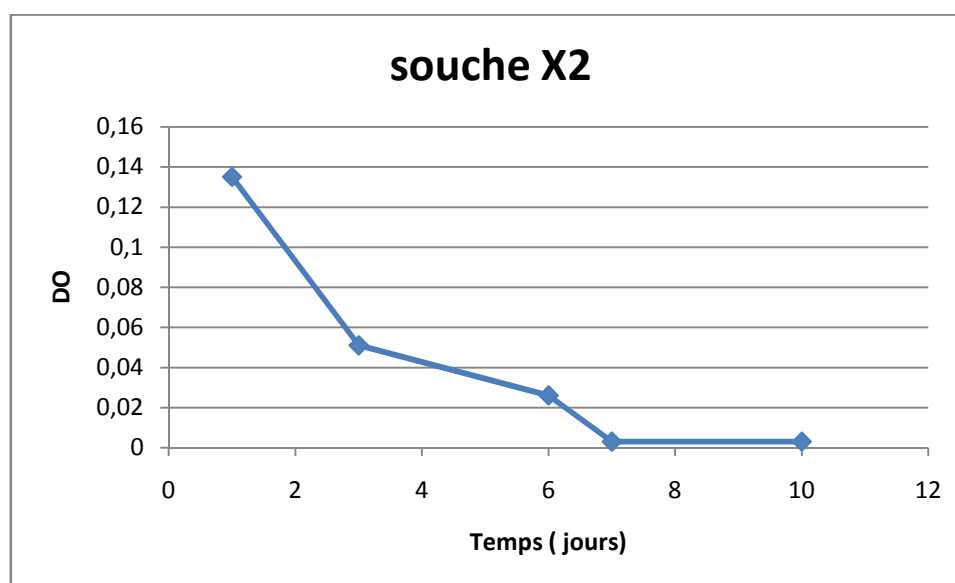


Figure 13 : Variation de l'absorbance de surnageant de la souche X2 au cours du temps d'incubation, en présence d'Apyros comme SSCE.

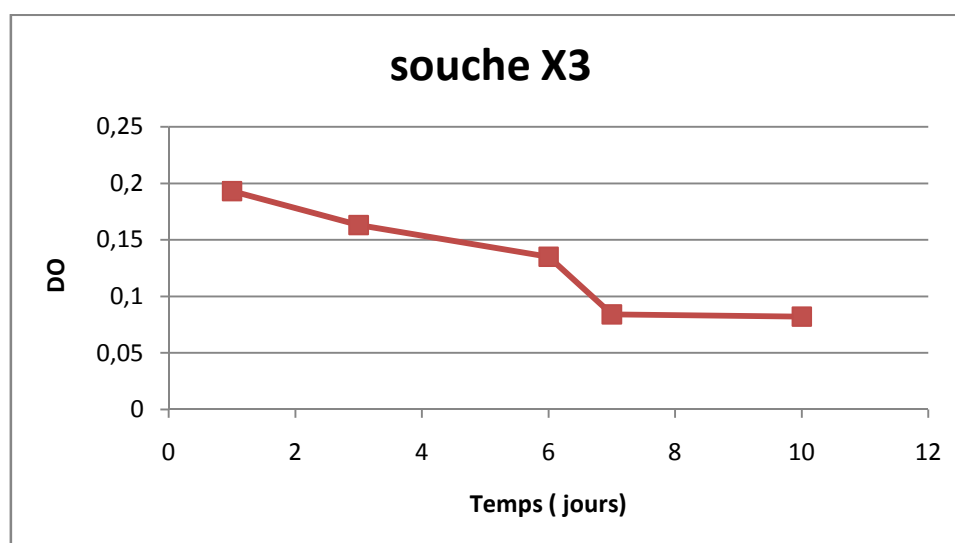


Figure14 : Variation de l'absorbance de surnageant de la souche X3 au cours du temps d'incubation, en présence d'Apyros comme SSCE.

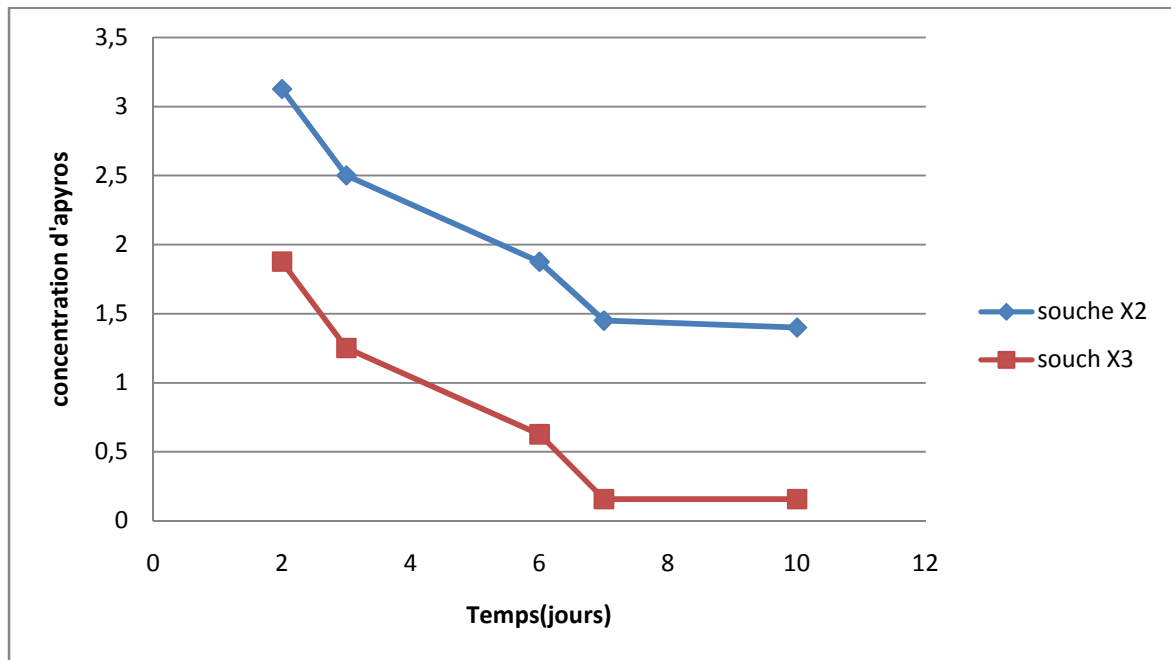


Figure 15 : Variation de la concentration de l’herbicide Apyros au cours du temps d’incubation, pour les deux souches X2 et X3.

N.B : Les concentrations d’Apyros (sulfosulfuron) sont déduites par projection des densités optiques des surnageants (obtenus à partir des cultures des souches X2 et X3 sur MSM plus Apyros comme SSCE) sur la courbe d’étalonnage.

Discussion

Dans le but d'isoler des souches bactériennes résistantes à l'herbicide Apyros et capables de l'utiliser comme SSCE, une méthode d'isolement par enrichissement à plusieurs tours, à différentes concentration de l'herbicide Apyros est utilisée.

Cette méthode a été utilisée dans plusieurs recherches : par *Ying et al.(2011)* pour l'isolement de bactéries dégradantes l'herbicide fenoxaprop-ethyl, par *Minghua et al.(2011)* pour l'isolement de microorganismes dégradants l'herbicide bensulfuron-methyl, ainsi que par *ji-ping et al.(2009)* pour l'isolement de microorganismes dégradants l'herbicide chlorimuron-ethyl.

C'est une méthode qui permet une meilleure adaptation des microorganismes aux herbicides utilisés comme seule source de carbone et d'énergie, en augmentant progressivement la concentration de ces herbicides dans le milieu de culture, qui sont normalement toxique à certaines concentrations, ce qui permet l'isolement du maximum de microorganismes ayant des capacités de résistance et de dégradation des herbicides étudiés et qui peuvent de ce fait utilisées dans les procédés de dépollution biologique, pour éliminer ces herbicides de l'environnement.

Dans ce travail l'herbicide à étudier (Apyros) est utilisé comme seule source de carbone et d'énergie dans le milieu de culture, c'est ainsi le cas de l'étude réalisé par *Nourouzi et al.,(2011)* et contrairement à la majorité des études qui utilisent les herbicides comme source de phosphore dans le milieu de culture (*Pipk et al., 1987 ; Jakob et al., 1988 ; Fitzgibbon et Braymer, 1990 ; Dick et Quinn, 1995*).

L'intervalle des concentrations d'Apyros utilisées dans cette études varie entre 25mg/l et 200mg/L (*Yang hou et al., 2011*).

D'après les résultats représentés dans le (**tableau12**), le nombre des boites qui présentent une croissance microbienne à la concentration 25mg/L est de 3/3, avec un nombre de colonies très élevés (256,192 et 221), ce qui indique qu'un nombre considérable de microorganismes de ce sol est doté d'une résistance vis-à-vis à l'herbicide Apyros. Cette tolérance peut être due à une ex-adaptation de ces microorganismes à l'herbicide dans le milieu natif qui est le sol déjà contaminé par ce même herbicide.

La diminution de nombre des boites qui présentent une croissance microbienne jusqu'à 1/3 (**tableau 12**) avec un nombre de colonie égal à 32, à la concentration 50 mg/L d'Apyros est due à une inhibition de certains microorganismes qui ne peuvent pas tolérer cette concentration.

Pour la concentration 100 mg/L d'Apyros, nous observons que le nombre de boites qui présentent une croissance microbienne reste constant (1/3), avec un nombre de colonie qui diminue jusqu'à 28, ce qui indique que d'autres microorganismes sont inhiber par cette concentration et ne peuvent pas se développer.

Résultats et discussion

Le nombre des boîtes qui présentent une croissance microbienne a augmenté à la concentration 200mg/L d'Apyros, avec un nombre de colonies égal à (75,62 et 48) (**Tableau12**), cela peut être dû à une adaptation des microorganismes avec l'herbicide et le développement d'une résistance vis-à-vis à ce dernier.

Les colonies obtenues du dernier enrichissement (200 mg/L d'Apyros) et ayant une bonne croissance sur le milieu MSM additionné d'Apyros comme SSCE sont purifiées et pré-identifiées en se basant sur des caractères morphologiques et biochimiques.

Les différentes caractéristiques réunies sur les isolats sont comparées avec celles décrites dans la neuvième édition du **Bergey's Manual of Determinative bacteriology (2007)**. L'identification reste cependant présomptive et non confirmative.

Les différentes caractéristiques réunies sur les isolats nous a permis de classer les souches résistantes à l'herbicide Apyros et qui sont capables de l'utiliser comme SSCE en deux groupes : trois souches : X1, X2 et X4 cocci à Gram positif et deux souches Gram négatif : X3 de forme cocci et X5 de forme bacille, et X6 qui a un aspect morphologique de moisissures.

Pour la souche X1 : selon les résultats obtenus, il s'agit d'une bactérie Gram positive, qui a une forme de cocci, regroupée en amas, oxydase positive, catalase positive ; De ce fait, cette souche peut être classée dans la famille des Micrococcaceae, ces caractères nous permettent de la rapprocher au genre *Micrococcus*.

Les caractères cocci, Gram positif immobile des souches X2 et X4 nous fait soupçonner que ces souches appartiennent à la famille : Micrococcaceae, Streptococcaceae, staphylococcaceae. Les caractères catalase positif, oxydase négatif de la souche X2 élimine les Streptococcaceae et nous oriente vers la famille Micrococcaceae, staphylococcaceae.

Le mode de regroupement de la souche X2 est en paire donc la souche X2 est rapprochée au genre *Arthrobacter*.

Les caractères catalase négatif plus le mode de regroupement en chaînette de la souche X4 élimine les Micrococcaceae et Staphylococcaceae donc la souche X4 est rapprochée au genre *Streptococcus*.

Pour la souche X3 : les résultats de la coloration de Gram (Gram négatif de forme cocci) (**tableau 15**) et les caractères catalase positive, aérobie stricte (**tableau16**) nous fait soupçonner que ces souches appartiennent aux genres *Moraxella*, *Acinetobacter*. Le cytochrome-oxydase négative de la souche X3 nous oriente vers le genre *Acinetobacter*.

Les caractères bacille, Gram négatif et mobile de la souche X5 nous fait penser que cette souche pouvait appartenir à la famille : Pseudomonaceae, Alcaligenaceae, Enterobacteriaceae. Le cytochrome-oxydase positive de la souche X5 nous oriente vers la famille Pseudomonaceae ou Alcaligenaceae (**tableau16**).

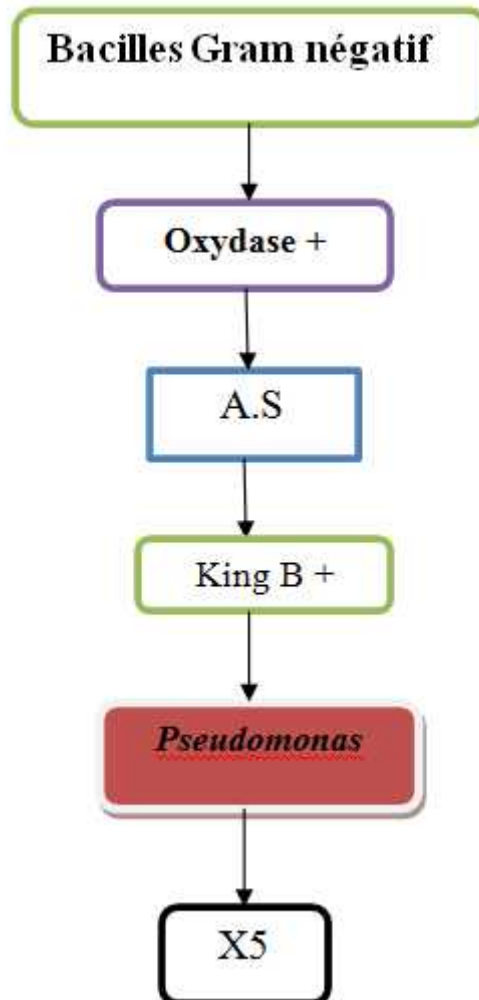
La production d'un pigment vert fluorescent par la souche X5 sur le milieu King B, nous confirme que cette souche appartient au genre *Pseudomonas* (**tableau 17**).

Résultats et discussion

Pour la souche X6 : la coloration de lactophénol a permis d'observer un conidiophore ramifié possédant une forme ressemblant à celle d'un pinceau terminé par des phialides. Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Les phialides sont serrées les unes contre les autres, l'ensemble donne une image de pinceau, le thalle est de couleur verte (**tableau 18**). Ces caractères nous permettent de rapprocher cette souche au genre *Penicillium*.

Tableau23 : Les différents genres bactériens suspectés.

		Souches	Genre suspecté
Cocci	Gram+	X1	<i>Micrococcus</i> sp.
		X2	<i>Arthrobacter</i> sp.
		X4	<i>Streptococcus</i> sp.
Bacill Moisissure	Gram-	X3	<i>Acinetobacter</i> sp.
	Garm-	X5	<i>Pseudomonas</i> sp.
		X6	<i>Penicillium</i> sp.



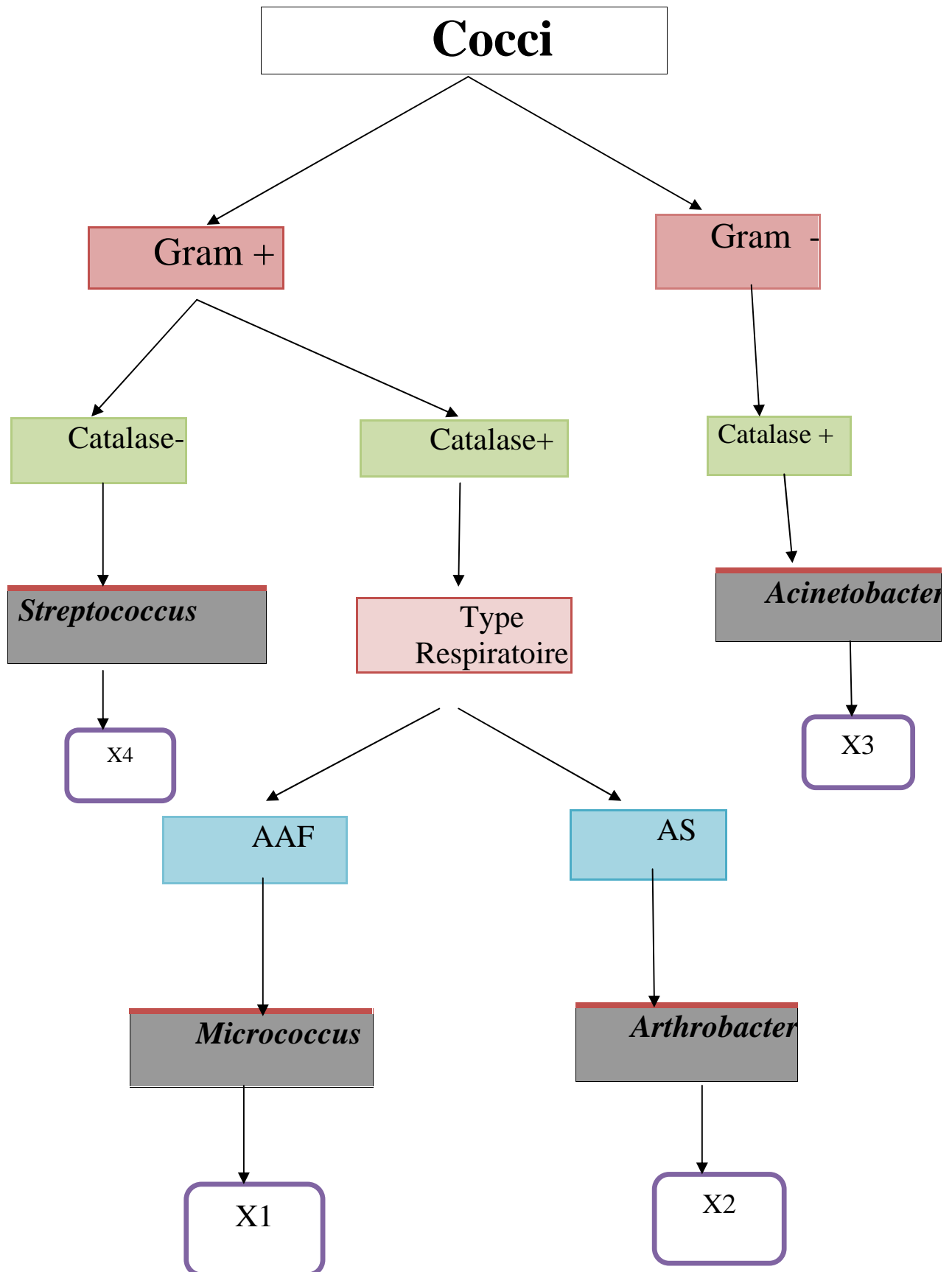


Figure 16: Plan d'identification des différentes souches isolées.

Résultats et discussion

D'après les résultats obtenus dans notre recherche les six souches (X1, X2, X3, X4, X5, X6) (**figure 16**) résistantes à la concentration 200mg/L de l'herbicide Apyros et capables de l'utiliser comme SSCE, sont rapprochées respectivement aux genres : *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* et *Penicillium*.

Peu d'études sont réalisées sur la dégradation des herbicides et en particulier l'Apyros(sulfosulfuron) par ces genres microbiens.

Le genre *Pseudomonas* est parmi les genres connus par leur capacité de dégrader divers composés xenobiotiques ;**Ji-Ping et al. (2009)**ont rapporté que ce genre est impliqué dans la biodégradation du chlorimuron-ethyl,un herbicide qui appartient à la famille des herbicides sulfonilurées, ils ont trouvé que l'efficacité de la dégradation dans le milieu liquide est environ 81% après 7 jours l'incubation.**Zanardini et al.(2002)**ont montré que le genre *pseudomonas* est aussi impliqué dans la biodégradation du chlorsulfuron et metsulfuron-methyl, en consortium, par co-métabolisme dans une période de 15 jours.

Jan kucharski,jadwigawiszowska. (2008)ont montré que *Pseudomonas* et *Arthrobacter*peuvent dégrader l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) et l'utilisent comme seule source de carbone et d'énergie.

Autres travaux montrent que *Streptococcus pneumoniae*produit l'enzyme EPSPS insensible à l'herbicide glyphosate (**Pollegioni et al., 2011**).

le genre *Acinetobacter*est impliqué dans la dégradation de diversmolécules de sulfonilurées(**Lu et al., 2011 ; Sondhia et al ., 2013 valle et all .,2006**).

Streptococcus oralis et *Micrococcusluteus*, sont capables d'utiliser les carbones des chaines de l'atrazine comme source nutritive (**cécilemonard,2009**).

La dégradation de glyphosate par les moisissures du genre *Penicillium* est mentionnée dans plusieurs études tel que : *Penicillium citrinum*(**Zboinska et al., 1992**), *Penicilliumnotatum*(**Bujacz et al., 1995**)et *Penicillium chrysogenum*(**Klimek et al., 2001**).

La tolérance d'une souche microbienne à un herbicide, n'est pas toujours un indice de sa capacité de le dégrader, en effet, **Singh et al. (1999)**ont rapportés que le champignon blanc *Trametes hirsutus*accumule l'herbicide Lindane sans le dégrader.

Pour cela, la cinétique de dégradation de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) est étudiée par deux souchessélectionnées (X2 et X3)sur le milieu MSM additionné de l'Apyros (0,1g/L)comme SSCE.

La capacité des souches sélectionnées à utiliser l'herbicide Apyros comme SSCE est estimée, par la variation de la densité optique de ces souches(ensemencées sur milieu minéral plus l'herbicide comme SSCE), au cours du temps, à 600 nm.

Résultats et discussion

D'après les résultats obtenus (**tableau20, figure11**), la densité bactérienne des deux souches X2 et X3 augmente progressivement au cours des 10 jours d'incubation, ce qui indique que les deux souches utilisent l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie.

La variation de la concentration de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) au cours du temps d'incubation est estimée par mesure de la densité optique des surnageants de culture des souches X2 et X3 sur MSM plus Apyros comme SSCE par spectrophotomètre (**SHIMADZU**) Visible à une longueur d'onde de 255 nm.

D'après les résultats obtenus (**figures 14 et 15**), l'absorbance des surnageants des cultures des deux souches X2 et X3 sur MSM plus Apyros comme SSCE diminue progressivement au cours des 10 jours d'incubation, ce qui indique une diminution de la concentration d'Apyros (sulfosulfuron) ; ce qui prouve la capacité de ces souches à dégrader cet herbicide, et qui peuvent être de ce fait utilisées dans le domaine de bioremédiation ou dépollution biologique des sites contaminés par cet herbicide.

Conclusion et perspectives

Conclusion

Les pesticides ré pondus sur les surfaces agricoles ou plus généralement sur tout type de sol, sont plus ou mois rapidement dégradés. La dégradation biologique, catalysée par les microorganismes telluriques, représente un thème très sollicité par les chercheurs, en raison de son avantage économique important par rapport aux procédés physico-chimiques classiques, souvent plus complexe dans leur réalisation et souvent onéreux.

Notre travail est basé sur trois objectifs principaux, **le premier** est un isolement des microorganismes résistants à l'herbicide Apyros (Sulfosulfuron) et capables de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie. **Le second objectif** est la caractérisation morphologique et biochimique de ces isolats. **Le troisième objectif** est l'étude de la cinétique de biodégradation de cet herbicide.

De ce fait plusieurs échantillons de sol traité par cet herbicide sont prélevés de la région d'Ain-alkarma où le sol est fortement contaminé par ce même herbicide. Le milieu MSM (mineralsaltmedium) contenant l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie a été servi pour l'isolement des microorganismes dégradants.

La mise en évidence de la biodégradation de l'Apyros par les souches tolérantes est effectuée sur le milieu MSM solide contenant l'Apyros à la dose recommandée (0,1g/L) comme seule source de carbone et d'énergie. Ainsi six souches seulement présentent une bonne croissance sur ce milieu, et sont de ce fait capables d'utiliser l'Apyros comme seule source de carbone et d'énergie.

Le repiquage est effectués sur le milieu gélose nutritive (GN) pour les bactéries et OGA pour les moisissures, Les microorganismes résistants à l'Apyros sont purifiés puis conservés à 4⁰C pour d'autres éventuelles études.

Parmi ces souches, deux bactéries capables d'utiliser l'Apyros comme seule source de carbone et d'énergie, sont testées pour leur aptitude à dégrader ce même herbicide sur le milieu Minéral liquide additionné de l'Apyros (0,1g/L). Le suivi de la dégradation de cet herbicide est réalisé par spectrophotométrie, les résultats montrent, une dégradation du sulfosulfuron traduite par une diminution de sa concentration, et s'accompagne par une croissance microbienne révélée par l'augmentation de l'absorbance du milieu.

Perspectives

L'importance de ces souches dans le domaine de dépollution biologique de l'environnement nous a orienté de vers les objectifs suivants :

- Confirmer l'identification de ces souches par des analyses phylogénétiques.
- Identification des résidus et métabolites de biodégradation de cet herbicide.
- Utilisation de souches actives en biotechnologie (dépollution biologique des sols contaminés par l'Apyros).

Référence
Bibliographique

Références bibliographique

Ait-Sai L., (1993). Modélisation stochastique du transfert des pesticides dans les sols et les eaux souterraines. Application à la vulnérabilité des puits. Thèse (docteur d'INRSEau du Québec). Chapitre 3 (25-26).

Adamczewski.,Praczyk T., Paradowski A. (1988). Ocenanowychherbicydów z grupysulfonilomocznikowej.Materiały 28.SesjiNauk. Inst. Ochr.Ro lin, cz. 2: 299–304.

Adamczewski K., Banaszak K., Snarska K. (2000). BiologicznaocenapreparatuAttribut 70 WG w zbozochzimych (Biological evaluation of MKH 6561 70 WG in winter cereals).Prog. Plant Protectin/Post. Ochr.Ro lin 40 (2): 775–778.

Achour S ; Khattabi A ; Rhalem N ; Ouammi L ; Mokhtari A ; Soulaymani A ; SoulaymaniBencheikhR . (2011). « L'intoxication par les pesticides chez l'enfantau Maroc : profil épidémiologique et aspects pronostiques (1990-2008) », SantéPublique. 23 :195-205.

Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, (1999). L'herbicide sulfosulfuron, document des décisions réglementaires. Coordination des publications. Ontario, Canada. p. 10.

Amatrop. C. G., (2000). Les herbicides. Agro écologie.cirad .fr/2007/docs 1015714804. P.1.

Atlas R. M. &Bartha R., (1992).Microbial ecology.Fundamentals and applications.3rdedition.The Benjamin/Cummings Publishing Company.San Francisco, California (USA), 563

AlterreBourgone , 2009.Agence régionale pour l'environnement et le développement soutenable en Bourgogne. Pesticides au quotidien Rapport technique .

AubertotJ.N., J.M. Barbier, A. Carpentier, J.J. Gril, L. Guichard, P. Lucas, S. Savary, I. Savini& M. Voltz, (2005). Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et limiter leurs impacts environnementaux. Expertise scientifique Collective, INRA et Cemagref, France. P. 15.

Barriuso E., Calvet R., Schiavon M. et Soulas G., (1996). Les pesticides et les polluants organiques des sols. *Forum « le sol, un patrimoine menacé? » numéro spécial: 279-295.*

Bergey's Manuel, (2007). Garrity.G.M.; Lilburn.T.G; Cole.J.R; Harrison. S.H.,Euzéby J. and Tindall. B. J. *In: Part 10: Taxonomic Outline of the Bacteria and Archeae.*Copyright, Michigan State University Board of Trustees.

Bérubé V.E., Boily M.H., Deblois C., Dassylva N., Spear P.A., (2005) “Plasma retinoid profile in bullfrogs, *Rana catesbeiana*, in relation to agricultural intensity of sub-watersheds in the Yamaska River drainage basin, Québec, Canada”, *Aquatic Toxicology*, 71:109-120.

Beyer E.C., Goodenough D. A., Paul D. L., (1988). The connexins : a family of related gap junction proteins .In : *Gap junctions*, ed., E. L.Hertzberg and R. G. Johnson, New York : Alan R. Liss, 167-175.

Blair M., Martin T. D., A., (1988). Review of the Activity, Fate and Mode of Action of Sulfonylurea Herbicides. *Pestic. Sci.* 22: 195-219.

Bliefert, C., Perraud, R., 2001. Chimie de l'environnement: air, eau, sols, déchets. De Boeck Université.

Bonnefoy nicole, (2012). RAPPORT D'INFORMATION FAIT au nom de la mission commune d'information sur les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement

Bourdon, J.-L. et Marchal, N. (1982). *Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Edition Doin, Paris.

Bousseboua H., 2002. Techniques d'étude des bactéries. Dans *Microbiologie générale*. Ed de l'université Mentouri, Constantine (Algérie), 145-157.

Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy PH., Larpent, J.P., Reymond, P., Bourrelier P. H., Berthelin J., (1998). **Introduction générale.** Dans : *Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion (rapport n= 42)*. Ed Technique & Documentation lavoisier Pari, XXXVII

Brown H. M., Cotterman, (1994). Recent advances in sulfonylurea herbicides In : *Chemistry of Plant Protection, Herbicides inhibiting Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis – Recent Developments*. J. Stetter (ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 10: 48

Brown H. M., (1990) Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pestic. Sci.* 29: 263-281.

Bujacz, B., Wieczorek, P., Krzysoko-Lupicka, T., Golab, Z., Lejczak, b. and Kavafarski, P., (1995). organophosphonate utilization by the wild-type strain of *Penicillium notatum*. *Appl Environ Microbiol* 61:2905-2910.

California department of pesticide regulation, (2008). Active Ingredient Sulfosulfuron. Public report. California. P. 8.

Références bibliographique

Calvet R., (2003). Le Sol. Propriétés et fonctions. Constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Tome 1. Ed France Agricole - Dunod, 82 - 93.

Calvet R., (2003). Le Sol. Propriétés et fonctions. Phénomènes physiques et chimiques. Applications agronomiques et environnementales. Tome 2. Ed France Agricole - Dunod, 381-391.

Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit C., Charnay M.-P. et Coquet Y., (2005). Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. *Éditions FranceAgricole*, 637 p.

Calvet R., Charnay M.-P.(2002).Le devenir dans le sol des substances phytopharmaceutiques. In : Pesticide et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement. Paris : ACTA,p. 805-833.

Cécile monard. (2009). Biodégradation des herbicides en sols tempérés – Contrôle des communautés bactériennes dégradantes par la bioturbation du sol thèse présentée devant l'université de rennes 1 pour obtenir le grade de docteur de l'université de rennes 1

Chabasse, D., Bouchara, J.P., Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. (edn) Bioforma. Paris. p.160.

Chafik N (2002) ., contribution à l'étude du comportement de l'herbicide triflurosulfuronmethyl dans les milieux aquatiques : Etude de la photo dégradation en milieux aqueux Préparation et étude de nouvelles formulations à libération contrôlée. Université Hassan II Maroc Ainchock, Thèse de doctorat., Chapitre 2 (p 10-31

Chassin P., Baize D., Cambier Ph. & Sterckeman T., 1996. Les éléments traces métalliques et la qualité des sols : impact à moyen et à long terme. Forum « le sol un patrimoine menacé ? ». Paris (France), 297-303.

Colin .F., (2000). Approche spatiales de la pollution chronique des eaux de surface par les produits phytosanitaires cas de l'atrazine dans le bassin versant du sousson (GERS, France). Thèse (docteur de l'ENGREF. Montpellier). Chapitre 1(p 6-10)

Columa, (1977). Les herbicides et le sol. *ACTA*, 143 p.

Conrad J. E., Colvin C., Sililo O., G rgens A., Weaver J. & Reinhardt C.,(1999). Assessment of the impact of agriculture practices on the quality of the ground water resources in South Africa. Water research commission, Pretoria, South Africa. Report **641/1/99.86.**

Coulibaly .H, (2005). Le SCV (Semis direct sous Couverture Végétale), un élément stratégique de gestion durable des terres agricoles : une expérience française comme base de réflexion pour le Mali. Mémoire (DEPA. France). Chapitre 2 (p13-20).

CPP, (2002). Comité de la Prévention et de la Précaution, Risques sanitaires liés à l'utilisation de produits phytosanitaires. p.9, 22-32

Davet P., (1996). Le milieu « sol ». Dans Vie microbienne du sol et production végétale. INRA, Paris, 21-87.

Day, K.E., Maguire, R.J., 1990. Acute toxicity of isomers of the pyrethroid insecticide deltamethrin and its major degradation products to *Daphnia magna*. Environmental toxicology and chemistry 9, 1297-1300.

Desbordes. A, (2000). La pollution des eaux souterraines en Picardie. Mémoire. Maîtrise B6, Faculté des Sciences, Amiens, 50 p A.

Devez, 2004. Caractérisation des risques induits par les activités agricoles sur les écosystèmes aquatiques. Thèse (docteur de L'ENGREF, Centre de Montpellier). Chapitre 1 (p 2-4).

Dick,R.e. and Quin, J.P., (1995) . Glycophosate-degrading isolates from environmental sample: occurrence and pathway of degradation. *ApplMicrobiolBiotechnol*43 : 545-550.

Document de terrain GCP/INT/650/NET. Rome, © FAO 2000. Collection FAO : Elimination des pesticides. Evaluation de la contamination des sols. Manuel de référence des notions .

Dorval, J, Leblond V., Deblois C., Hontela A., (2005).“Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals”, Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 24, no. 5: 1273-1280.

Downing A.L., DeVannaK.M., Rubeck-SchurtzC.N., Tuhela L., Grunkemeyer H., (2008).Community and ecosystem responses to a pulsed pesticide disturbance in freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 17:539-548.

ECRIN (2002). El habib EL AZZOUZI 2013 Thèse de doctorat Processus physico-chimique d'élimination des pesticides dans l'environnement : cas de l'imazéthapyr **P.24.**

EdelahiD. M.C, (2004). Contribution à l'étude de dégradation in situ des pesticides par procédés d'oxydation avancés faisant intervenir le fer. Application aux herbicides phénylurées. Thèse (docteur de l'Université de Marne la Vallée). Chapitre 1 (p22-25).

F. Fdil, (2004). Etude de la dégradation des herbicides chlorophénoxyalcanoïques par des procédés photochimique et électrochimique. Applications environnementales. Thèse (Docteur de l'Université de Marne-La-Vallée). Chapitre 1 (p 8-25).

Fitzgibbon, J.E and Braymer, H.d., (1990). Cloning of a gene from *Pseudomonas sp.* Strain PG982 conferring glyphosate resistance. *Appl. Environ.* **56**:3382-3388.

Flogeac K., (2004). Etude de la capacité de rétention de produits phytosanitaire par deux solides modèles des sols. Influence de la présence des cations métalliques. Thèse doctorat (université de Reims Champagne-Ardenne). Chapitre 1 (p10-20).

Gans J., Wolinsky M., Dunbar J., (2005). Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, **309** :1387-90.

Gatignol C., Étienne J.-C., (2010), *Pesticide et santé*. Paris, Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.

GregorD.J., Gummer W.D., (1989). Evidence of atmospheric transport and deposition of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Canadian arctic snow. *Environ. Sci. Tech.*, 23:561-565.

Gauvrit , c., (1996). Efficacité et sélectivité des herbicides. Edition Quae. Paris. **P.120**.

Gouvernement du Québec, (2002b). La régulation sur les permis et les certifications en bref .In gouv .ca .MDDEP. <http://www.mddep.gouv.qc.ca/pesticides/permis/index.htm> (page consultée le 10/28/2012).

Gendron A., Branchaud A., (1997). Impact potentiel de la contamination du milieu aquatique sur la reproduction du suceur cuivré (*Moxostoma hubbsi*) : synthèse des connaissances, Ministère de l'Environnement et de la Faune, Service de l'aménagement et de l'exploitation de la faune, Rapport technique, 16-02. Direction régionale de la Montérégie (France),.

Hay B., (1990). Sulfonyleurea herbicide esterification esterase from *Hanschleglia Zhihuaiae* S113. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1962-1968.

Inspection phytosanitaire Constantine 2016 .

Jacob, G.S., Garbow , J.R., Hallas , L.E., Kimack, N.M., Kishore, G.M. and Schaefer , J., (1988) .metabolism of glyphosate in *pseudomonas sp. strain LBr*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** :2953-2958.

Jan kucharski ,jadwigawiszowska.(2008). Biological properties of soil contaminated with the herbicide Apyros 75 WG, chair of Microbiology University of Warmia and in Olsztyn. *J. Elementol.*, (13)3: 357-371

Jeannot, R., Lemièrre B., Chiron S. Augustin F. & Darmendrail D., (2000). Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement. France.

Jean-baptistebraquenier.(2009). Etude de la toxicité développementale d'insecticides organophosphorés : Analyse comportementale de la souris CD1 –thèse présentée pour l'obtention de grade de doctorat)

Ji-ping M, Zhe W, Peng L, Hui-jie W, Shinawar W, Shun L and Xing H. (2009). Biodegradation of the sulfonylurea herbicide chlorimuron-ethyl by the strain *pseudomonassp.LW3.FEMSMicrobiol.* 296:203-209.

Joffin, J.N and Layeral,G., (2006). Microbiologie technique. Tom 1. Dictionnaire des techniques. Bordeaux, France: Centre Régional De Documentation Pédagogique, 368

Joffin, N. (2013). Les techniques de laboratoires utilisées en mycologie, p. 1-20.
<http://www.techmicrobio.eu/index.php/microbio/mycologie/laboratoire>

Joffin J.N., Leyral G., 2005. Microbiologie Technique. Tome 1 Dictionnaire des techniques. Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine, 171-189.

Joffin, J.N., & Leryral ,G (2001). Microbiologie. Dictionnaire des Techniques, 3^{ème} ED., Collection biologie Technique .CRDP d'aquitaine , Bordeaux .105p.

Khelifa N., Abrous O. & Aid F., (2003). Effets du sulfosulfuron sur la germination et la croissance des plantules de Soja (*Glycine max L.*). annales de l'institut national agronomique, El Harrach. **24 : 1 et 2.**

Klimek , M., Lejck , B ., Kafarski , P . and Forlani , G ., (2001). Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrateutilising strain of penicilliumchrysogenum. *PestMangSci* **57:815-821.**

La Directive de la Communauté Economique Européenne (91/414/CEE) La Directive DU CONSEIL du 15 juillet 1991 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques (91/414/CEE) (JO L 230 du 19.8.1991, p. 1)

Lányi, K., Dinya, Z., (2005). Photodegradation study for assessing the environmental fate of some triazine-, urea- and thiolcarbamate-type herbicides. *Microchemical journal* **80 :79-87**

Laurent C., Feidt C., Laurent F., (2005). Contamination des sols - Transferts des sols vers les animaux. EDP Sciences/ADEME, 19-20.

Lissalde S. (2010). Application et validation des échantillonneurs passifs de type POCIS pour l'échantillonnage passif des pesticides dans les eaux du bassin versant charentais. In: Thèse de Doctorat: Université de Poitiers.

Lu, P., Jin, L., Liang, B., Zhang, J., Li, S., Feng, Z., and Huang, X. (2011). Study of biochemical pathway and enzyme involved in metsulfuron-methyl degradation by *Ancylobacter* sp. XJ-412-1 isolated from soil. *Curr. Microbiol.* **62**, 1718–1725.

Maison de la consommation & de l'environnement, (2003). Les pesticides réglementation et effets sur santé et l'environnement. Rennes, **p. 2, 30.**

MDRGF(2004). Dossier Pesticides du Mouvement pour le droit et le respect des générations futures .

Merhi, M., (2008). Etude de l'impact de l'exposition à des mélanges de pesticides à faibles doses : caractérisation des effets sur des lignées cellulaires humaines et sur le système hématopoïétique murin. Thèse de doctorant. Université de Toulouse (France). **P.4**

Meyer A., Chrisman J., Moreira J.C., Koifman S., (2003). Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Res.*, **93**, :264-271.

Minghua X, Chunyan L, Junbo P, Xiaosong C and Chuanwu X. (2011). Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. BX2 capable of degrading bensulfuron-methyl. *African journal of microbiology research.* **5(25):4296-4302.j**

Nielsen K. M., Bones A. M., Smalla K., Van Elsas J. D., (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria : a rare event? *FEMS microbiology reviews*, **22** :79-103.

Monsato Europe N. V., (2014). Produit commercial Apyros, fiche de sécurité. Anvers, Belgique. **P. 10**

Nourouzi, M.M., Chauh, T.G., Choong, T.S.Y. and Lim, C.J., (2011). Glyphosate utilization as the source of carbon: isolation and identification of new bacteria. *E-Journal of Chemistry* **8(4)** : 1582-1587.

ORP, Observatoire des Résidus de Pesticides, site internet consulté en septembre 2008 : <http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/>

Palm H.L., Allison D. A. (1980). Worldwide review of new cereal herbicide – DPX 4189. The BCPC Conference – Weeds **1:1–6.**

- Perrin R., J.P. Scharff, (1997).** Chimie industrielle. 2ème édition, Paris. Chapitre 7 (p 873-897).
- Perry J. J., Staley J. T., Lory S., (2004).** Microbiologie. DUNOD (France), 848.
- Pipke, R., Amrhein, N., Jacob, G.S., Kishore, C.M. and Schaefer J., (1987).** Metabolism of glyphosate in *Arthrobacter* sp. GLP-1. *Eur J Biochem* **165**: 267-273.
- Pochon J. & Tradieux P., (1962).** Techniques d'analyses en microbiologie du sol. Edition de la tourelle, St Mandé. p.110-111.
- Pollegioni, L., Schonbrun, E. and Sieh, D., (2011).** Molecular basis glyphosate resistance: different approaches through protein engineering. *FEBS Journal* **278**. 2753-2766.
- Quénéa K., (2004).** Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).
- Ramade R., (2000).** Dictionnaire encyclopédique des pollutions. Ediscience international. Paris (France), 58-365
- Richard Y., GIROUX I., (2004).** Impact de l'agriculture sur les communautés benthiques et piscicoles du ruisseau Saint-Georges (Québec, Canada), Québec, Ministère de l'Environnement, Direction du suivi de l'état de l'environnement, 28 p.
- Robert, M., (1996).** Le Sol: interface dans l'environnement: ressource pour le développement.
- Roche F., (1998).** Transferts des produits phytosanitaires vers l'atmosphère, Mécanismes de transfert des produits phytosanitaires. Document provisoire de la Cellule Régionale d'Etude des Pollutions des Eaux par les Produits Phytosanitaires (CREPEPP), Pays de Loire,.
- Savadogo P. W., Traoré O., Topan M., Tapsoba K. H., Sedogo P. M., Bonzi-Coulibaly L.Y., (2007).** Variation de la teneur en résidus de pesticides dans les sols de la zone cotonnière du Burkina Faso. *Journal Africain des Sciences de l'environnement*, 1, 2007: 29-39.
- Schäfer R.B., Caquet T., Siimes K., Mueller R., Lagadic L., Liess M., (2007).** Effects of pesticides on community structure and ecosystem functions in agricultural streams of three biogeographical regions in Europe. *Sci. Total Environ.*, 382, , 272-285
- Schomburg C.T., Glotfelty D.E., (1991)** Pesticide occurrence and distribution in fog collected near Monterey, California. *Environ.Sci.Tech.*, 25:155-160.
- Singh BK, Kuhad RC, Singh A, Lal R & Tripathi K K., (1999).** Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Crit Rev Biotechnol*, **19**: 197-225.
- Sondhia, S., Waseem, U., and Varma, R.K. (2013).** Fungal degradation of an acetolactate synthase (ALS) inhibitor pyrazosulfuron-ethyl in soil. *Chemosphere*. In print.

Stephanie A. E., John A. B., Thomas M. S., (2007). Isolation and characterization of soil Bacteria That Define Terriglobus gen. nov; in the phylum Acidobactria. *Applied and environmental microbiology*, **73**: 2708-2717.

Sinclair, S.J. et Boxall, A.B.A. (2003). Assessing the Ecotoxicity of Pesticide Transformation Products. *Environmental Science and Technology*, **37** : 4617-4625.

UIPP, 2009. Rapport d'activité 2008-2009. Union des Industries et de la Protection des Plantes

Ertli .T., A. Marton, R. Földényi, (2004). Effect of pH and the role of organic matter in the adsorption of isoproturon on soils. *Chemosphere*, **57** :771-779.

Valle, A., Boschin, G., Negri, M., Abbruscato, P., Sorlini, C., D'Agostina, A., and Zanardini, E. (2006). The microbial degradation of azimsulfuron and its effect on the soil bacterial community. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 443–452.

Viel J.F., Challier B., Pitard A., Pobel D., (1998) Brain cancer mortality among French farmers: the vineyard pesticide hypothesis. *Arch. Environ. Health.*, **53**:65–70.

Yael G. Mishael, Tomas Undabeytia, Onn Rabinovitz, Baruch Rubin, & Shlomo Nir, (2003). Sulfosulfuron Incorporated in Micelles Adsorbed on Montmorillonite for Slow Release Formulations. *J. Agric. Food Chem.* **51**:2253-2259

Ying hou , Jiantao , Wenjingshen , Juan liu , Jinquan li , Yongfeng li , Huicao & Zhongli cui (2011) . *FEMS Microbiol Lett* **323**: 196-203 .

Zamy, C., Mazellier, P., Legube, B., (2004). Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. *Water research* **38**: 2305-2314.

Zboinska, E., Lejczak, B. and Kafarski, P., (1992). Organophosphore utilization by the wild-type strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ* **58** :2993-2999.

ZANARDIN E., A. ARNOLDI, G. BOSCHIN, A. D'AGOSTINA, M. NEGRI, C. SORLINI (2002). Degradation pathways of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Annals of Microbiology* **52**.25-37.

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture

Milieu Minimal Medium (MSM)

K_2HPO_4 :1.5g/L

KH_2PO_4 : 0.5 g/L

NH_4NO_3 :1g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$:0.1g/L

NaCl: 1g/L

PH=7

Eau distillée : 1000mL

Milieu Minimal Salts Medium solide (MSM)

K_2HPO_4 :1.5g/L

KH_2PO_4 : 0.5 g/L

NH_4NO_3 :1g/L

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$:0.1g/L

NaCl: 1g/L

PH=7

Eau distillée : 1000mL

Agar:20g/L

Gélos nutritive (GN)

Extrait de viande : 1,0g/L

Extrait de levure : 2,5g/L

Peptone : 5,0g/L

Chlorure de sodium : 5,0 g/L

Agar : 15,0 g/L

Eau distillée : 1000mL

PH : 7,0

Oxytétracycline-Glucose-Agar OGA :

Extrait de levure : 5,00 g/L

Glucose:20, 00g/L

Agar: 12, 00 g/L

Eau distillée : 1000mL

Le milieu prêt à l'emploi en boîtes de Pétri contient en plus du milieu de base Oxytétracycline 0,10 g/L

PH final à 25°C : 7,0 ± 0,2

Potato Dextrose Agar (PDA)gélose gélosé a extrait de pomme :

Pomme de terre : 200 g/L

Dextrose ou de sucre blanc de cannes : 15 g/L

Agar : 20 g/L

Eau distillée : 1000mL

PH 3,5 à 4,5

Bouillons nutritif (BN)

Peptone : 10,0g/L

Extrait de viande : 10,0g/L

Chlorure de sodium : 5,0 g/L

Ph=7

Eau distillée : 1000mL

Annexe 2

Testes biochimiques

Milieu Mannitol Mobilité

Peptone : 20 g/L

Nitrate de potassium : 1 g/L

Mannitol : 2 g/L

Rouge de phénol : 140 mg/L

Eau distillée 1000 mL

Agar : 4 g/L

pH = 8,1

Milieu Citrate de Simmons

Citrate de sodium : 1g/L

Chlorure de sodium : 5g/L

Sulfate de magnésium : 200mg/L

Dihydrogénophosphate d'ammonium : 1g/L

Monohydrogénophosphate de potassium 1g

Bleu de bromotymol : 80mg/L

Agar : 13g/L

Eau distillée : 1000mL

PH=6 ,8

Milieu urée- indol

L-Tryptophane : 3g

Phosphate monopotassique : 1g

Chlorure de sodium : 5g/L

Urée : 20g/L

Rouge de phénol : 0.025

Alcool à 95° 0.01mL/L

Eau distillée 1000 mL

PH=6,7

Milieu TSI (Triple Sugar Iron Bio-Rad)

Extrait de viande : 3g/L

Extrait de levure : 3g/L

Peptone : 20g/L

Chlorure de sodium : 5g/L

Lactose: 10g/L

Saccharose: 10g/L

Glucose: 1g/L

Sulfate ferreux ammoniacal : 300mg/L

Rouge de phénol : 24mg/L

Thiosulfate sodium anhydre: 300mg/L

Agar: 11g/L

Eau distillée 1000 ml

PH=7,4

N.B. L'ajustement des pH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou une solution d'HCl 1N selon le cas.

King A

Peptone: 20g/L

Glycerol: 10g/L

Sulfate de potassium : 10g /L

Chlorure de magnésium : 1,4g/L

Agar purifiés: 12g/L

Eau distillée 1000 ml

PH = 7, 2

King B

Peptone dite "B»:20,0 g/L

Glycérol : 10,0 g/L

hydrogénophosphate de potassium : 1,5 g/L

Sulfate de magnésium heptahydraté : 1,5 g/L

Agar purifié : 12,0 g/L

Eau distillée 1000 ml

pH = 7,2

Bouillons clark et lubs

Peptone : 5g/L

Glucose : 5g/L

Hydrogénophosphate de potassium : 5g/L

Eau distillée 1000 ml

Ph=7

Bouillons peptone exempt d'indole

Peptone : 20g/L

Sodium chlorure : 30g/L

Eau distillé 1000mL

Ph= 7,2

Annexe 3

Solutions et colorants

Violet de gentiane

Violet de gentiane : 1g

Ethanol : 10ml

Phénol : 2g

Eau distillée 100ml

Lactophenol

Phénol : 20g/L

Acide lactique : 20g/L

Glycérol : 40g/L

Bleu de méthyle : 0.5g/L

Eau distillée 1000mL

Ph 7.3

Annexe 4

Lecture des tests biochimique

Test Mannitol mobilité

- Lorsque l'indicateur coloré passe de rouge au jaune cela correspondant à l'acidification du milieu, le mannitol a été utilisé. le caractère de mobilité est défini dans ce milieu par un trouble envahissant toute la largeur de la gélose et de la piqure centrale, alors qu'une bactérie immobile ne se développe que la longe de la piqure centrale.

Test TSI

- Pente jaune : fermentation du glucose et/ou du saccharose.
- Pente rouge : non fermentation du glucose et du saccharose.
- Culot jaune : fermentation du glucose.
- Culot rouge : pas de fermentation du glucose.
- Décollement de la gélose ou présence de poches gaz : production du CO_2 .
- Couleur noire : production d' H_2S .

Clark et Lubs

- Une coloration rouge dans le tube contenant le rouge de méthyle cela correspond à l'acidification du milieu donc à une fermentation du glucose par la voie des acides mixtes, la souche est RM^+ .
- Une coloration rouge dans le second tube indique la présence d'acétoïne donc une fermentation du glucose par voie butanidiolique, la souche est VP^+ .

Utilisation de Citrate comme seule de carbone :

- Virage de l'indicateur au bleu cela correspond à l'alcalinisation du milieu, la souche est citrate positif.

L'hydrolyse de l'urée :

- Le milieu présent une coloration rose à rouge violacée : la souche est urease positive.
- Le milieu a une teinte jaune orangée : la souche est urease négative.







Production de l'indole à partir du tryptophane :

- Formation d'un anneau rouge en surface du milieu : la souche est indole positive.
- Formation d'un anneau brun en surface du milieu : la souche est indole négative.

King A et King B:

- La production de **pyocyanine**, due spécifiquement à *Pseudomonas aeruginosa*, est favorisée par la présence d'ions. La recherche de la production de pyocyanine est effectuée sur milieu King A.
- La production de **pyoverdine**, due à *Pseudomonas Sp*, est favorisée par une teneur élevée en phosphate. La recherche de la production de pyoverdine est effectuée sur milieu King B.

Tableau 24 : Tests biochimique effectués (*joffin et layral.2006*)

Milieux de culture	Teste recherché	Ensemencement	Incubation	Reactifs ajouter	Résultat positifs	Resultats nagatifs
Mannitol-mobilité	Fermentation Du Mannitol	Piqure central	24ha37°C		Rouge jaune	Rouge
	Mobilité				Formation d'un axe central	Absence de voile
Citrate de Simmons	Utilization du citrate De sodium comme source De Carbone etd'énergie	Stries longitudinale pente	24ha37°C		Vert bleu	Vert
TSI gélose Glucose Lactose saccharose	Fermentation du -lactose -glucose -saccharose	-Stries serrées pour la pente. -Simple piqûre pour le culot	24h à 37°C		Rouge brun -pente jaune -culot jaune - pente rouge -culot rouge	Rouge brun
	Production de gaz				Bulles d'air à l'intérieur de la gélose ou fissure de la gélose	Pas de changement de l'aspect de la gélose
	Production de l'H2S				Noircissement	Absence de noircissement
Eau peptone exempte d'indole	Production d'indole à partir du tryptophane	Quelques gouttes de la suspension bactérienne	24h à 37°C	Kovacs	Formation d'un anneau rouge à lasurface	Absence d'anneau ou anneau jaune
Clark et Lubs	Production d'acétoïne à partir du glucose	Quelques gouttes de suspension bactérienne	24h à 37°C	Rouge de méthyl (RM)	jaune  rouge 	Jaune 
	Production d'acide pyruvique à partir du glucose			Voges-Proskawer (Vp1 et Vp2)	jaune  rouge à rose 	Jaune 
Recherche de la catalase	Enzyme catalysant l'hydrolyse du peroxyde d'hydrogène formé lors de réactions en aérobiose.	Déposer une goutte d'eau oxygénée sur une lame et émulsionner directement une partie de la colonie prélevée avec l'anse. - ou verser 1ml d'H2O2 dans une culture de 24h en bouillon ou sur une gélose inclinée			Dégagement de Gaz	Pas de dégagement de gaz

Recherche de l'oxydase	détection de la phénylènediamine-oxydase enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction	un disque d'oxydase contenant de l'oxalate Ndimethylparanitrop hénylène-diamine est déposé une lame et mis encontact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée ou bien en contact avec le bouillon			Apparition d'une coloration Violette	Absence d'une coloration Violette
Gélose viande foie (VF)	Détermination du type respiratoire	Plonger l'effilure d'une pipette pasteur boutonnée dans la suspension bactérienne	24h à 37°C		-Aérobie strict : croissance dans lazone superficielle de gélose ; -Anaérobie strict : croissance dans lazone profonde de la gélose ; - Aéro-anaérobie facultative : croissance sur toute la hauteur dela gélose. -Micro-aérophile : croissance dans un cylindre de gélose d'environ 0.5cm de hauteur et situé à environ à 1à2 cm de la surface.	Absence de croissance
Urée-indole	Hydrolyse de l'urée	Quelques gouttes de suspension bactérienne	24h à 37°C		orange rouge violet	orange

Annexe 5

Protocole de coloration de Gram

- Etaler une goutte de suspension microbienne sur une lame.
- Laisser bien sécher à l'air.
- Recouvrir la lame avec du violet de Gentiane ou Crystal violet ; laisser agir 30s. puis ajouter le lugol 30s.
- Eliminer les colorants et décolorer rapidement à l'alcool 30sec.
- Rincer à l'eau pour arrêter la décoloration.
- Recouvrir la lame de Fuchsine ou safranine 1 min.
- Rincer à l'eau et laisser sécher à l'air (ou à la flamme).
- Observation à l'objectif X 100 avec l'huile à immersion.

Annexe 6



L'herbicide commercialisé « Apyros » (*Monsanto Europe N.V, 2014*)

Résumé :

Dans le but d'isoler des microorganismes résistantes à l'herbicide Apyros(Sulfosulfuron) et capable de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie, plusieurs échantillons ont été prélevés à partir d'un sol agricole (de la région d'Ain-Alkarma) traité par cet herbicide.

L'isolement des microorganismes a été réalisé par enrichissement sur le milieu MSM (minimalsalt medium), contenant l'herbicide étudié comme seule source de carbone et d'énergie. Ainsi, six souches ont été isolé et purifié (sur le milieu GN et OGA).

L'étude des caractères morphologiques, macroscopique, microscopique et biochimiques permet de rapprocher les souches isolées aux genres : *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* et *Penicillium*.

Parmi ces souches, deux bactéries sont testée pour leur aptitude à dégrader ce même herbicide sur le milieu Minéral liquide additionné de l'Apyros (0,1g/L). Le suivi de la dégradation de cet herbicide est réalisé par spectrophotométrie, les résultats montrent une croissance microbienne révélée par l'augmentation de l'absorbance du milieu, qui s'accompagne par une diminution des absorbance des surnageants de chaque culture, qui traduit une diminution de la concentration de cet herbicide au cour du temps d'incubation.

Mots clés : microorganismes, herbicide, Apyros, sulfosulfuron, tolérance, biodégradation.

Abstract:

In order to isolate microorganisms resistant to the herbicide Apyros (sulfosulfuron) and able to use as a sole source of carbon and energy, several samples were collected from a farm soil (in the region of Ain-Alkarma) processed by this herbicide.

The isolation of microorganisms was performed by enrichment on MSM medium (minimal salt medium) containing the herbicide studied as sole source of carbon and energy. Thus, six strains were isolated and purified (the GN and OGA middle).

The study of morphological, macroscopic, microscopic and biochemical enables matching of strains isolated genera *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* and *Penicillium*.

Of these strains, two bacteria are tested for their ability to degrade this herbicide on the same liquid mineral medium supplemented with the Apyros (0.1g / L). The monitoring of degradation of the herbicide is carried out by spectrophotometry, the results show microbial growth revealed by the increase in absorbance of the medium, which is accompanied by a decrease in absorbance of the supernatants of each culture, which reflects a decrease the concentration of the herbicide in the heart of the incubation time.

Keywords: microorganisms, herbicide, Apyros, Sulfosulfuron, tolerance, biodegradation.

:

من اجل عزل الكائنات الدقيقة المقاومة للمبيد الاعشاب أبيررس () على استخدامه كمصدر وحيد للكربون والطاقة حيث تم جمع عدة عينات من التربة الزاكية (من منطقة عين الكرمة) المعالجة به المبيد.

حيث تم عزل و توصيف الكائنات الدقيقة التي لها القدرة على تحليل و تفكيك اليبيروس في وسط معدني حيث يمثل مبيد الأعشاب المصدر وحيد للكربون والطاقة ، و هكذا تم تنقية 6 OGA. GN

يرافق انخفاض في تركيز سلفوسلفرون، زيادة في امتصاص الميكروبات، مشيراً إلى أن كلا من سلالات سلفوسلفرون كمصدر وحيد للكربون والطاقة من أجل النمو.

المورفولوجي ، العينية، المجهرية و البيوكيميائية بتقريب الكائنات الحية

الى الانواع التالية :

Micrococcus, Arthrobacter, Acinetobacter, Streptococcus, Pseudomonas et Penicillium.

: الكائنات الحية الدقيقة ، مبيد الأعشاب الضارة، ابيررس، سلفوسلفرون، المقاومة، هدم.

Isolement et caractérisation de microorganismes capables de dégrader l'herbicide Apyros (sulfosulfuron) à partir d'un sol agricole contaminé par le même herbicide.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en : **Ecologie Microbienne.**

Résumé :

Dans le but d'isoler des microorganismes résistantes à l'herbicide Apyros (Sulfosulfuron) et capable de l'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie, plusieurs échantillons ont été prélevés à partir d'un sol agricole (de la région d'Ain-alkarma) traité par cet herbicide.

L'isolement des microorganismes a été réalisé par enrichissement sur le milieu MSM (minimal salt medium), contenant l'herbicide étudié comme seule source de carbone et d'énergie. Ainsi, six souches ont été isolées et purifiées (sur le milieu GN et OGA).

L'étude des caractères morphologiques, macroscopique, microscopique et biochimiques permet de rapprocher les souches isolées aux genres : *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* et *Penicillium*.

Parmi ces souches, deux bactéries sont testées pour leur aptitude à dégrader ce même herbicide sur le milieu Minéral liquide additionné de l'Apyros (0,1g/L). Le suivi de la dégradation de cet herbicide est réalisé par spectrophotométrie, les résultats montrent une croissance microbienne révélée par l'augmentation de l'absorbance du milieu, qui s'accompagne par une diminution des absorbances des surnageants de chaque culture, qui traduit une diminution de la concentration de cet herbicide au cours du temps d'incubation.

Mots clés : microorganismes, herbicide, Apyros, sulfosulfuron, tolérance, biodégradation.

Laboratoire de recherche : Laboratoire De La Microbiologie Département tronc commun rez de chaussée Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, U.F.M. Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury :	M. BENHIZIA Yacine	Professeur. U.F.M. Constantine1.
Rapporteur :	Mme. ZERMANE Férial	Maître Assistante « A » - UFM Constantine1.
Examineur :	Mme. GUERGOURI Ibtissem	Maître Assistante « A » - U.F.M. Constantine1.

Date de soutenance : 22/06/2016