



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

**Isolement des souches d'actinomycètes d'un sol agricole contaminé par
l'herbicide Apyros et étude de leur capacité à le dégrader**

Présenté et soutenu par : SACI Khaoula
SAFANE Aziza

Le : 02 /07/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : ZERIZER Habiba (Maître de conférences « B » - INATAA UFM
Constantine)
Rapporteur : ZERMANE Férial (Maître Assistante « A » - UFM Constantine)
Examineur : RACHEDI Kounouz (Maître Assistante « A » - INATAA UFM
Constantine)

Année universitaire

2014 - 2015

Remerciements

Nos premiers remerciements s'adressent à Dieu le tout puissant, qui nous a donné la force et le courage afin d'élaborer ce mémoire.

Ce travail a été réalisé, au « Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Département de Microbiologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université des frères Mentouri-Constantine ».

Nous remercierons profondément, notre encadreur Mme Zermane F. pour le privilège et la confiance qu'elle nous accordées durant le stage pratique, pour son aide, sa patience, ainsi que pour ses précieux conseils. « Sincèrement madame, nous ne pouvons que vous exprimer notre respect et notre gratitude, grace à vos conseils et à votre supervision on est entré dans un nouveau monde de sciences et de savoir où on a connu des gens formidables qu'on n'aurait jamais rencontré ailleurs ».

Nous remercions Mme Zerizer H. « Maitre de conférences à l'INATAA à l'université des Frères Mentouri Constantine » qui était toujours là pour répondre à nos questions en microbiologie et en vie, merci de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Nos remerciements s'adressent aussi à M^{lle} Rachedi K « Maitre - Assistante à l'INATTA à l'université des Frères Mentouri Constantine » pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Nous exprimons notre sincère gratitude, à tous les chercheurs du laboratoire de Génie Microbiologique et Applications qui à un moment ou un autre nous ont conseillées et nous ont aidées :

Fateh, khaled & Maria vous étiez toujours présents à répondre à nos besoins et à nous aider du mieux que vous le pouviez et sans attendre de nous le moindre merci.

Nassima merci pour votre aide permanente et pour votre bon cœur.

Chouchou et Amira on ne trouve pas les mots pour exprimer nos remerciements et notre gratitude, avec modestie acceptez nos remerciements pour votre patience continue, votre générosité et votre gentillesse que vous nous avez accordé durant toute la formation. Sincèrement sans vous on ne saurait réaliser ce travail, on est très chanceux de vous connaître.

Karima Locif quelque soit les mots qu'on exprime pour vous remercier on ne peut égaler votre soutien, votre encouragement et votre aide et surtout votre générosité. Sincèrement une grande partie de ce travail n'a pu être réalisé sans votre présence avec nous.

Nous remercions sincèrement

Mr Haddi, Mr Benguedouar et Mr benhaizia de nous avoir accueillies dans leur laboratoire et d'avoir mis à notre disposition tous les moyens techniques et scientifiques afin de pouvoir réaliser nos expérimentations.

Nos remerciements s'adressent également

à toute l'équipe du laboratoire de biotechnologie, les doctorantes *Radja, Laila* et surtout *Mme Guergouri* pour leur soutien, leur sympathie et leurs encouragements.

Merci à tous les ingénieurs des laboratoires pédagogiques de microbiologie, immunologie et végétales, pour leur aide, patience et générosité, merci à vous : *Samia, Nadia, Razika, Laila, Hassiba, Noura, Samia (HPLC) et Hanane*.

Ainsi que tous ceux qui ont participé, de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

❖ *Merci à vous* ❖

Dédicaces

Je dédie ce travail

*A la mémoire de mon très cher frère **Housseem**, Je ne saurais exprimer mon grand chagrin en ton absence, J'aurais aimé que tu sois à mes côtés ce jour*

*Ames très chers **Parents : kamel et Dalila** que j'aime le plus au monde,*

Pour leur amour, Sacrifices, aide et soutien, qui m'ont toujours

Encouragé Tout au long de mes études

Que dieu les gardes et les protèges, en leur souhaitant une longue vie pleine de santé et de bonheur

*A ma très chère sœur **Roukia** et son mari **Bilale***

*A mes très chère sœurs **Malek et Riheb***

*A mon très chère frère **Djaber***

*A mon très chère nièce **Mouhemed amine (minou)** que j'aime beaucoup*

*A mes **grands-parents***

*A toutes les familles **SACI** et **BENDKARIE** petits et grand*

*A toutes les personnes qui sont très chères a mon cœur surtout tante **Yasmina**...et mes **amis intime** avec lesquels j'ai partagé mes moments de joie et de bonheur*

Pour leurs encouragements et leurs soutient

A tous ceux qui ne sont pas mentionnées dans ce modeste mémoire, mais ils sont dans notre cœur



Saci Khaoula



Je dédie ce travail

A la mémoire de mon père

✧ *Je ne suis peut-être pas vécue assez avec toi, sache que je ne t'ai jamais oubliée un jour, où que je sois. J'espère que tu es fière de moi...* ✧

A ma chère Mama

*pour ces longues années de soutien inconditionnel,
pour sa confiance permanente et l'acceptation de mes choix parfois ambitieux,
Elle m'a offert la possibilité de réaliser mes rêves. Elle m'a toujours fait preuve
de la plus grande des patiences et de la plus grande des compréhensions et d'amour. Malgré
toutes les difficultés qu'ont pu représenter ces longues années d'études, elle m'a toujours
facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts. Elle me sera impossible
de rendre tout ce qui m'a été offert.*

*Rien n'aurait été possible sans toi Mama, cette réussite est donc un peu la
mienne, mais surtout beaucoup la tienne. Aucun remerciement ne serait être
suffisant.* ✧

A mes chères tantes Sakina & Laila

*« Pour votre soutien de
tous les instants, quelque soit l'occasion, toujours avec moi.*

I love you so much »

En fin Je dédie ce travail A tous !!

*A Celui qui est rentré dans ma vie... qu'il m'a enseigné beaucoup par sa
présence & A celui qui est sortie de ma vie qu'il a béni par son absence.*

✧ *Aziza Safane* ✧

Tables des matières

| | |
|-------------------------------------|------|
| Liste des abréviations | vi |
| Liste des figures | viii |
| Liste des tableaux | ix |
| Introduction | 1 |

• Synthèse bibliographique

I. La pollution

| | |
|---|---|
| 1. Définition | 3 |
| 2. Les différents types de pollution | 3 |
| 2.1.Pollution de l'air..... | 3 |
| 2.2.Pollution du sol..... | 3 |
| 2.3.Pollution de l'eau..... | 4 |
| 3. Les origines de la pollution | 4 |
| 3.1.La pollution domestique..... | 4 |
| 3.2.La pollution industrielle..... | 4 |
| 3.3.La pollution naturelle..... | 4 |
| 3.4.La pollution agricole..... | 4 |
| 4. Les principales causes de la pollution d'origine agricole | 4 |
| 4.1.Les fertilisants..... | 4 |
| 4.2.Les pesticides..... | 5 |

II. Les pesticides

| | |
|---|---|
| 1. Définition | 5 |
| 2. Composition et formulation | 5 |
| 3. Classification des pesticides | 6 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Marché des pesticides | 6 |
| 5. Devenir et dispersion des pesticides dans l'environnement (Exemple des herbicides) | 7 |
| 5.1. Dispersion atmosphérique..... | 8 |
| 5.2. Rétention et dégradation dans le sol..... | 8 |
| 5.3. Transports par ruissellement et percolation..... | 8 |
| 6. Impact des pesticides sur l'environnement | 9 |
| 6.1. Impact des pesticides sur la santé humaine..... | 9 |
| 6.2. Impact des pesticides sur la faune sauvage..... | 9 |
| 6.3. Impact des pesticides sur les microorganismes du sol..... | 10 |
| 6.4. Impact des pesticides sur les plantes non visées..... | 10 |
| | |
| III. Les herbicides | |
| 1. Définition | 10 |
| 2. Classification des herbicides | 11 |
| | |
| IV. Les Herbicides Sulfonylurés | |
| 1. Historique | 11 |
| 2. Propriétés physico-chimiques des sulfonylurés | 12 |
| 3. Mode d'action | 12 |
| 4. Le comportement dans le sol | 13 |
| | |
| V. Le sulfosulfuron | |
| 1. Généralités | 13 |
| 2. Propriétés physico-chimiques | 14 |
| 3. Toxicité du sulfosulfuron | 14 |
| 4. Rémanence du sulfosulfuron dans le sol | 14 |
| | |
| VI. L'APYROS (Matière active : sulfosulfuron) | |

| | |
|--|-----------|
| 1. Propriétés générales..... | 14 |
| 2. Propriétés physico-chimiques de l'Apyros..... | 15 |
| 3. Composition, usage et dose de l'Apyros..... | 15 |
| 4. Usage et dose appliqué de l'herbicide Apyros..... | 15 |
| | |
| VII. La dégradation des pesticides..... | 15 |
| 1. Dégradation abiotique des pesticides..... | 16 |
| 2. Dégradation biologique des pesticides (la biodégradation) | 16 |
| 3. Les microorganismes impliqués dans la biodégradation..... | 17 |
| | |
| VIII. Les actinomycètes : agents de biodégradation dans la nature | |
| 1. Généralités..... | 17 |
| 2. Physiologie et écologie des actinomycètes..... | 18 |
| 3. Cycle de développement..... | 19 |
| 4. Classification des actinomycètes..... | 19 |
| 5. Identification des actinomycètes..... | 20 |
| 6. Importance environnementale des actinomycètes..... | 21 |
| | |
| • Matériel et méthodes | |
| | |
| Partie 1 : Isolement et purification des actinomycètes à partir d'un sol agricole traité par l'herbicide Apyros | |
| | |
| 1. Isolement des actinomycètes..... | 23 |
| 1.1. Prélèvement des échantillons..... | 23 |
| 1.2. Mesure du pH des échantillons..... | 23 |
| 1.3. Méthode d'isolement..... | 23 |
| 2. Coloration de Gram..... | 24 |
| 3. Conservation des souches d'actinomycètes isolées..... | 24 |
| 3.1. Sur gélose inclinée..... | 24 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2. Congélation des cultures sporulées..... | 24 |
| 4. Préparation des inocula des souches isolées..... | 25 |
| 4.1. Préparation de l'inoculum général..... | 25 |
| 4.2. Préparation de l'inoculum lavé..... | 25 |

Partie 2 : Mise en évidence de la capacité des actinomycètes isolées à tolérer et utiliser l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie

| | |
|--|-----------|
| 5. Etude de la tolérance des actinomycètes isolés à l'herbicide Apyros..... | 26 |
| 6. Etude de la capacité des actinomycètes à croître en présence de l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie..... | 26 |
| 7. Etude, <i>in vitro</i>, de la dégradation de l'herbicide Apyros par les souches actinomycètes actives..... | 26 |
| 7.1. Mesure de la densité bactérienne..... | 27 |
| 7.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)..... | 27 |

Partie 3 : Contribution à l'identification macroscopique, microscopique, physiologique et biochimique des actinomycètes actives

| | |
|---|-----------|
| 8. Identification présomptive des souches d'actinomycètes actives..... | 28 |
| 8.1. Aspect macroscopique..... | 28 |
| 8.2. Aspect microscopique..... | 28 |
| 8.3. Tests biochimiques..... | 29 |
| 8.3.1. Utilisation des glucides comme seule source de carbone..... | 29 |
| 8.3.2. Utilisation du citrate comme seule source de carbone..... | 29 |
| 8.3.3. Utilisation du Glucose, Lactose et saccharose et la production de l'H ₂ S.... | 29 |
| 8.3.4. Utilisation des sources azotées..... | 29 |
| 8.3.1.1. La réduction des nitrates..... | 29 |

| | |
|--|----|
| 8.3.1.2. Recherche de l'uréase..... | 30 |
| 8.3.1.3. Recherche de la production d'indole..... | 30 |
| 8.4. Tests physiologiques..... | 30 |
| 8.4.1. Détermination des Pigments mélanoïdes..... | 30 |
| 8.4.2. Hydrolyse de l'amidon..... | 31 |
| 8.4.3. Hydrolyse de la gélatine..... | 31 |
| 8.4.4. Hydrolyse de la caséine..... | 31 |
| 8.4.5. Action sur le lait écrémé..... | 31 |
| | |
| • Résultats et discussion | |
| | |
| 1. Isolement des actinomycètes..... | 32 |
| 1.1. Caractéristiques et pH de l'échantillon..... | 32 |
| 1.2. Dénombrement et purification des actinomycètes isolées..... | 32 |
| 2. Etude de la tolérance des souches d'actinomycètes à forte concentration de l'herbicide Apyros..... | 33 |
| 3. L'étude de la capacité des souches tolérantes à utiliser l'herbicide Apyros comme SSCE..... | 35 |
| 4. Etude, <i>in vitro</i> , de la dégradation de l'herbicide Apyros par les souches actinomycètes actives..... | 35 |
| 5. Identification présomptive des souches actives d'actinomycètes..... | 37 |
| 5.1. Caractères culturaux..... | 37 |
| 5.2. Identification microscopique..... | 39 |
| 5.3. Identification biochimique..... | 39 |
| • Conclusion et perspectives | 41 |
| • Référence bibliographiques | 43 |
| • Annexes | |

Liste des abréviations

A.L.S: L'acétolactate synthétase

ADN: L'acide désoxyribonucléique

ARN: L'acide ribonucléique

EC: Les concentrés émulsionnables

GC%: Coefficient de Chargaff

HAPs: Hydrocarbure Aromatiques Polycycliques

HPLC: Chromatographie Liquide à Haute Performance

ISP: Milieu « International *Streptomyces* Project »

Koc: Coefficient d'adsorption

LC : Concentration létale

LD : Dose létale

MA: Mycélium aérien

MS: Mycélium de substrat

N / A : *Not Available* (Non disponible)

S: Spiral

SC: Les suspensions concentrées

SCA: Starch Caséine Agar

SG: Les granulés solubles

SL: Les concentrés solubles composés de produits solubles dans l'eau

SSCE: Seule Source de Carbone et d'Energie

Tpm : Toure par minute

TSI: Triple Sugar Iron Bio-Rad

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Mécanismes de transferts et de transportations des pesticides dans les milieux : eau, air et sol | 8 |
| Figure 2 : Structure générale des sulfonilurées | 12 |
| Figure 3 : Structure moléculaire du sulfosulfuron | 13 |
| Figure 4 : Cycle de développement des actinomycètes (<i>Streptomyces</i>)..... | 19 |
| Figure 5 : Différents chaînes de spores chez les actinomycètes | 20 |
| Figure 6 : Croissance des souches A1 et A12 sur le milieu ISP9 additionné de l'herbicide Apyros comme SSCE..... | 35 |
| Figure 7 : Chromatogramme du substrat de l'Apyros (100mg/l)..... | 36 |
| Figure 8 : Chromatogramme montrant la dégradation de molécules active sulfosulfuron par la souche A1..... | 36 |
| Figure 9 : Chromatogramme montrant la dégradation de molécules active sulfosulfuron par la souche A12 | 36 |
| Figure 10 : Cinétique de la dégradation du sulfosulfuron par la souche A1..... | 36 |
| Figure 11 : Cinétique de la dégradation du sulfosulfuron par la souche A12..... | 36 |
| Figure 12 : Comparaison de la biodégradation du sulfosulfuron par A1 et A12 | 36 |
| Figure 13 : Comparaison de l'absorbance des souches A1 et A12 en fonction du temps..... | 36 |
| Figure 14 : Caractères culturels de la souche A1 et A12 sur les milieux ISP : ISP 2, ISP 4, ISP5 | 38 |
| Figure 15 : Aspect microscopique de la souche A1..... | 39 |
| Figure 16 : Aspect microscopique de la souche A12..... | 39 |

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différents classifications de pesticides6

Tableau 2 : Liste de quelques herbicides les plus utilisé dans la wilaya de Constantine7

Tableau 3 : Principaux groupes d’herbicides11

Tableau 4 : Propriétés physiques et chimiques du sulfosulfuron.....14

Tableau 5 : Toxicité du sulfosulfuron.....14

Tableau 6 : Propriétés physico-chimiques de l’Apyros.....15

Tableau 7 : Composition de l’Apyros 15

Tableau 8 : Usage et dose appliquée de l’herbicide Apyros16

Tableau 9 : Fréquence des divers genres d’actinomycètes dans le sol18

Tableau 10 : Clés de détermination des différents genres d’actinomycètes basées sur la composition chimique de la paroi.....21

Tableau 11 : Tolérance des souches d’actinobactéries du 1^{er} lot à l’herbicide Apyros33

Tableau 12 : Tolérance des souches d’actinobactéries du 2^{ème} lot à l’herbicide Apyros34

Tableau 13 : Capacité des souches tolérantes à utiliser l’herbicide Apyros comme seule source de carbone et d’énergie35

Tableau14 : Diminution des aires des pics du sulfosulfuron en fonction du temps.....36

Tableau 15 : Diminution de la concentration du sulfosulfuron (mg/L) en fonction du temps.....36

Tableau 16 : Absorbance des souches A1 et A12 e fonction du temps 36

Tableau 17 : Caractères cultureux des souches (A1 et A12).....37

Tableau 18 : Aspect microscopiques des souches actinomycètes active.....39

Tableau 19 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches (A1 et A12).....40

Introduction

Introduction

La pollution est définie comme une introduction dans l'environnement (air, eau, sol) de substances portant atteinte à la santé humaine et aux écosystèmes. Elle est essentiellement liée aux activités humaines, la révolution industrielle entamée au XIX^{ème} siècle a également contribué à l'état de pollution actuel de notre environnement (**Assink et Van den Brink, 1986**).

La pollution du sol est d'origine industrielle, agricole ou urbaine, ces différentes sources entraînent la présence de nombreuses molécules xénobiotiques différentes. Les polluants organiques d'origine industrielle incluent le pétrole et ses dérivés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les hydrocarbures chlorés. Les polluants d'origine agricole incluent les fertilisants et les pesticides (**Van der Perk, 2006**).

L'utilisation des pesticides par l'agriculture présente deux aspects aux conséquences totalement opposées : le premier concerne la nécessaire réduction des dégâts causés aux cultures par des organismes phytopathogènes et du développement des adventices pour maintenir la productivité alors que le deuxième tient à la nature même des pesticides qui en fait, dans certaines conditions, de possibles polluants de l'air, des eaux, des aliments et des sols (**Barriuso et al., 2005**).

En effet, une très grande partie des pesticides répandus n'atteint pas sa cible. Une partie importante est dispersée dans l'atmosphère, soit lors de leur application, soit par évaporation ou par envol à partir des plantes ou des sols, sur lesquels ils ont été répartis. Disséminés par le vent et parfois loin de leur lieu d'épandage, ils retombent avec les pluies directement sur les plans d'eau et sur les sols d'où ils sont ensuite drainés jusqu'aux milieux aquatiques par les eaux de pluie, ce qui présente une vraie menace pour tout l'environnement (**Fenske et al., 2002**).

Les recherches sont orientées depuis plusieurs années vers les techniques de bioremédiation des sols contaminés. Parmi elles il y a des techniques physico-chimiques qui sont très coûteuses et nécessitent des moyens généralement lourds. On assiste ces dernières années à l'émergence de techniques biologiques qui sont beaucoup moins onéreuses et très efficaces. Ces techniques font appel aux microorganismes très variés.

Parmi ces microorganismes, les actinomycètes constituent un groupe des procaryotes, Gram positif à structure végétative de type mycélienne (**Lacey, 1973**), ils sont connues pour leur aptitude à jouer un rôle très important dans la biodégradation de la matière organique et inorganiques présentes dans la nature (**Silini, 2012**).

Le travail entrepris dans ce mémoire a pour objectifs :

- L'isolement sélectif de souches d'actinomycètes capable de tolérer et de dégrader l'un de la famille de pesticides les plus utilisés dans le monde (**les sulfonilurées**), qui est l'Apyros (**Sulfosulfuron 75%**).
- Notre second objectif, est l'identification présomptive des souches actives.
- Le troisième objectif, c'est le suivi de la cinétique de biodégradation de cet herbicide.

Synthèse bibliographique

I. La pollution

1. Définition

La pollution est définie comme l'introduction par l'homme, dans l'environnement, de substances ou d'énergie susceptibles de provoquer des dommages à la santé des espèces vivantes (Homme, ressources vivantes et systèmes écologiques) et de mettre en cause le concept d'une utilisation légitime de l'environnement (**Alloway, 1995**).

2. Les différents types de pollution

2.1. Pollution de l'air (pollution atmosphérique)

Elle est définie comme « la présence dans l'atmosphère extérieure de substances ou de contaminants apportés par l'homme, en quantité ou à des concentrations, et pendant des périodes telles qu'ils gênent une proportion importante des habitants d'un secteur ou nuisent à la santé public, à la vie humaine, végétale ou animale ou aux biens, ou portent atteinte à l'agrément de l'existence ou à la jouissance des biens dans l'état, ou les zones qui sont touchées (**Gafsi, 2008**).

2.2. Pollution du sol

Les pollutions du sol sont d'origine industrielle, agricole ou urbaine et ces différentes sources entraînent la présence de nombreuses molécules xénobiotiques différentes.

Les polluants organiques d'origine industrielle incluent le pétrole et ses dérivés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (**HAPs**) et les hydrocarbures chlorés.

L'agriculture est aussi l'une des causes importantes de la pollution des sols. Pensons seulement aux engrais, aux insecticides et aux pesticides (**Van der Perk, 2006**).

La pollution du sol se présente sous deux formes : localisée et diffuse et chacune de ces deux formes peut être accidentelle ou chronique (**Jeannot et al., 2000**).

2.3.Pollution de l'eau

La pollution de l'eau est bien souvent directement liée à la pollution des sols. La pluie transporte rapidement les pesticides et les autres substances toxiques, de la terre ferme, aux mers et océans (**Web site N° 1**).

3. Les origines de la pollution.

Selon l'origine de substances polluantes, quatre catégories de la pollution sont à distinguer :

3.1.La pollution domestique

Elle provient des habitations et elle est, en général, véhiculée par les réseaux d'assainissement jusqu'à la station d'épuration (**Gilli *et al.*, 2004**).

3.2.La pollution industrielle

Elle provient des usines et elle est caractérisée par la présence d'une grande diversité des polluants (**Calvet *et al.*, 2005**).

3.3.La pollution naturelle

Certains auteurs considèrent que divers phénomènes naturels sont aussi à l'origine de la pollution (les éruptions volcaniques) (**Crosclaude, 1999**).

3.4.La pollution agricole

Elle provient des fermes ou des cultures et elle se caractérise par la forte teneur en sel minéraux (ex : NO₂, P, K) et la présence des produits chimiques du traitement (pesticides, engrais) (**Crosclaude, 1999**).

4. Les principales causes de la pollution d'origine agricole

4.1.Les fertilisants

Les engrais chimiques sont dispersés dans les sols afin d'accroître les rendements des végétaux cultivés. Parmi les éléments principaux au développement des plantes, nous avons : l'azote, le phosphate, le potassium, et dans une moindre mesure le soufre, le calcium, le magnésium et d'autres oligo-éléments. L'usage intensif et successif de ces

produits, contamine donc les eaux superficielles et même les nappes phréatiques (**Conrad et al., 1999**).

4.2. Les pesticides

L'usage des pesticides a connu une expansion considérable, non seulement dans les pays développés et sur les cultures tropicales d'exportation, mais aussi dans l'ensemble des pays de tiers monde où la révolution verte a augmenté les exigences en traitement antiparasitaire car elle a propagé des variétés moins résistantes aux divers ravageurs de culture que les souches cultivées autochtones. Cependant, ces pesticides s'accumulent dans les sols et les nappes phréatiques (**Lemercier, 2003**).

II. Les pesticides

1. Définition

Le mot « pesticide », terme générique dérivé des termes latins « caedere » (tuer) et « pestis » (fleau), intégré à la langue anglaise, dès les années 1940, puis à la langue française à la fin des années 1950, est utilisé aussi bien dans le langage courant que scientifique (**Baldi et al., 2013**).

Les pesticides sont des produits « phytopharmaceutiques », ou plus communément produits phytosanitaires, destinés à protéger les plantes cultivées et les récoltes des attaques d'insectes, d'acariens, de rongeurs champêtres et de celles des champignons parasites, et à détruire les adventices. D'autres pesticides (produits « biocides ») sont réservés à des usages domestiques, comme la destruction des rats, souris, blattes, la protection des tissus contre les mites et la protection des bois contre les champignons, les termites...etc. (**Devillers et al., 2005**).

2. Composition et formulation

Un pesticide est composé de 2 types de substances :

Tableau 1 : Les différentes classifications de pesticides (Conrad *et al.*, 1999 ; Crosclaude, 1999 ; Lemerrier, 2003 ; Calvet *et al.*, 2005 ; Devillers *et al.*, 2005 ; Merhi, 2008 ; El Azzouzi, 2013 ; Isabelle *et al.*, 2013)

| 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 | <ul style="list-style-type: none"> * 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 oiseaux ravageurs de culture et surtout | |
| Les corvifuges | les corbeaux | |

- **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, vomitif, 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. Classification des pesticides

Les pesticides disponibles aujourd'hui sur le marché, sont caractérisés par une telle variété de structures chimiques, de groupes fonctionnels et d'activité que leur classification est complexe (**Merhi, 2008**) dont les herbicides sont les pesticides les plus utilisés dans le monde en tonnage et en surface (**tableau 1**).

4. Marché des pesticides

En Europe : Exemple type la France

En 2003, environ 74500 tonnes de pesticides (substances actives) ont été utilisées en France (53400 tonnes de produits de synthèse et 21000 tonnes de cuivre et de soufre) dont 1500 tonnes par les jardiniers amateurs et pour les utilisations « espaces verts » (**Devillers et al., 2005**).

Tableau 2 : liste de quelques herbicides les plus utilisés dans la wilaya de Constantine (Metatla et Touati, 2013)

| Nom commercial | Matière active | Famille chimique | La dose | Culture |
|-------------------|---|--------------------|------------|------------|
| Herbasate | Glyphosate | Amino-phosphanates | 1l/ha | Céréales |
| Roundup | Glyphosate | Amino-phosphanates | 1l/ha | Maïs |
| Zoom | Mesosulfuron methyl+ lodosulfuron methyl sodium | Sulfonylurées | 120g/ha | Blé-Orge |
| Apyros | Sulfosulfuron | | 26,5g/ha | Céréales |
| Axial | Pinoxadan | phénylpyrazolines | 0,6l/ha | Céréales |
| Traxos | Pinoxadan | | | Blé |
| Mamiba | Glyphosate | Amino-phosphanates | 2,4kg/ha | Blé |
| Glyphosate | Glyphosate | | | Maïs + Blé |
| chevalier | Lodosulfuron sod + Mesosulfuron sod | Sulfonylurées | 0, 33kg/ha | Blé |
| Atrazine | Atrazine | Triazines | 0, 33kg/ha | Maïs |
| Oscar | Glyphosate | Amino-phosphanates | 12,5kg/ha | Blé-Orge |

Compte tenu de sa superficie cultivée (plus de la moitié du territoire), la France est le premier consommateur européen en tonnage, mais un utilisateur moyen en terme de dose (4kg /ha), par rapport à des pays très utilisateurs (pays bas) ou très peu utilisateurs (Portugal) (Devillers *et al.*, 2005).

Pour chaque produit, les quantités totales dépendent de l'importance de la culture et des doses autorisées qui vont de quelques grammes à 1 ou 2 kilogrammes par hectare (Devillers *et al.*, 2005).

En Afrique : Exemple type l'Algérie

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 utilisées que les fongicides et les herbicides. Il en est de même dans la région Est où les données sont similaires à la région Centre (Moussaoui *et al.*, 2011) (tableau 2).

5. Devenir et dispersion des pesticides dans l'environnement (Exemple des herbicides)

Après application par l'agriculteur, les produits phytopharmaceutiques seront concernés par de nombreux phénomènes, physiques, chimiques et biologiques. Pour une partie, les produits seront alors dégradés complètement ou partiellement.

L'autre partie sera simplement déplacée dans le milieu. Elle aura quitté le champ, ce qui, pour l'agriculteur, correspondra à une perte d'efficacité du traitement. En réalité, d'un point de vue écologique, l'élimination ne sera qu'apparente puisque le produit se retrouvera dans les profondeurs du sol et/ou dans l'air et/ou dans les eaux et éventuellement sur les végétaux à l'état de trace (Association de Coordination Technique Agricole, 2002). La figure 1, illustre les différentes voies parcourues par les pesticides dans la nature.

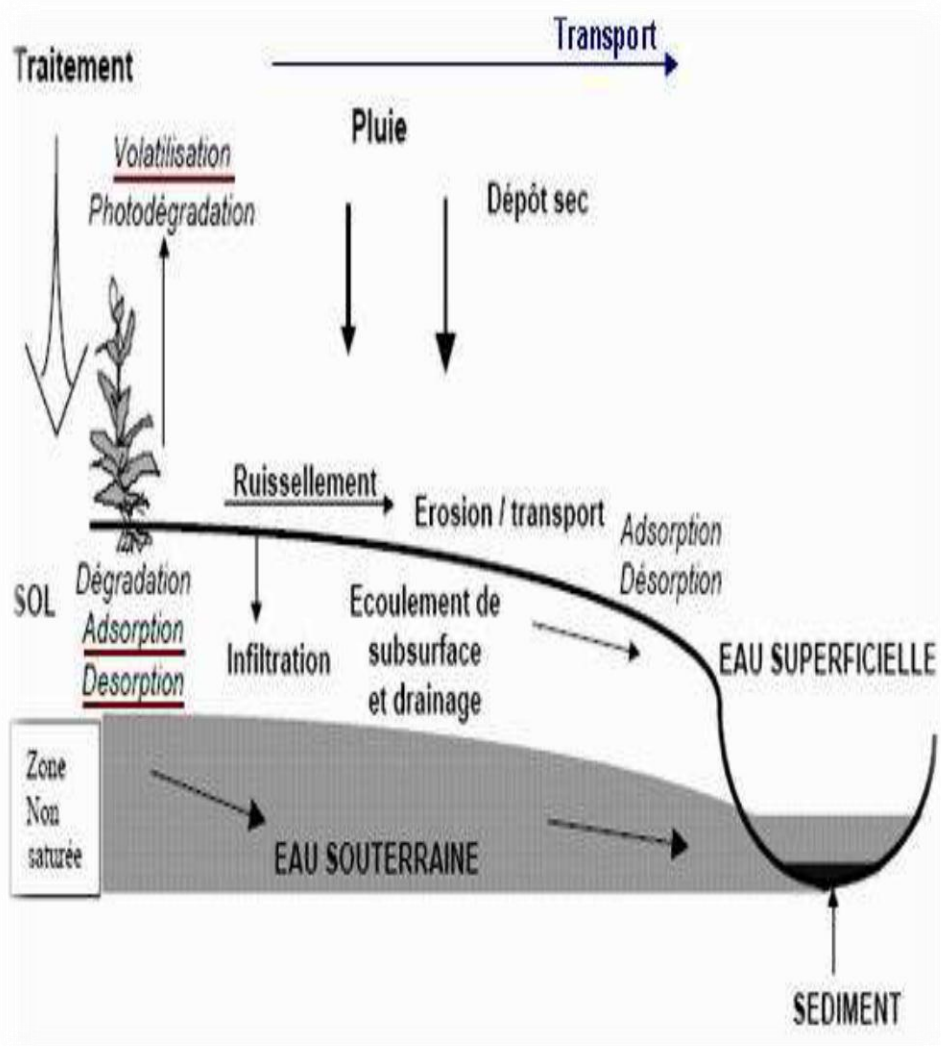


Figure 1 : Mécanismes de transferts et de transformations des pesticides dans les milieux : eau, air et sol (Merhi, 2008)

5.1. Dispersion atmosphérique

De nombreux travaux expérimentaux ont étudié les transferts atmosphériques qui ont lieu pendant les applications par pulvérisation, nommés **dérive** (Aubertot *et al.*, 2005). Les pertes par volatilisation sont parfois importantes notamment après le traitement (jusqu'à 90 % de pertes) (Fabrice, 2000). A plus large échelle, le transport de certains pesticides à grande distance a été mis en évidence par leur détection dans des lieux éloignés de toute utilisation (montagnes, lac). Cependant, il est actuellement difficile d'estimer le potentiel de transport des pesticides (Aubertot *et al.*, 2005).

5.2. Réention et dégradation dans le sol

Les processus de réention des pesticides dans le sol réduisent leur mobilité et diminuent ainsi, au moins temporairement, leur transfert vers l'air ou l'eau (Aubertot *et al.*, 2005).

La réention des pesticides dépend des propriétés des pesticides (**K_d** : coefficient de partage et **K_{oc}** : coefficient d'adsorption), mais également des propriétés du sol (taux de matière organique, taux d'argiles,...) (Schiavon, 1988).

La réention des pesticides dans le sol est un processus cinétique au même titre que la dégradation qui débute avec l'application du pesticide et se poursuit jusqu'à atteindre un niveau de réention seuil (Schiavon, 1988).

A l'heure actuelle les insecticides utilisés (organophosphorés, pyréthriinoïdes, carbamates et autres) se dégradent rapidement, par contre les herbicides sont assez persistants dans les sols et leurs produits de dégradation sont souvent stable.

5.3. Transports par ruissellement et percolation

Les pertes de la plupart des pesticides lors des phénomènes de ruissellement et d'érosion se font en solution, le transport particulaire n'étant important que pour les pesticides les plus retenus (hydrophobes ou peu solubles dans l'eau) (Aubertot *et al.*, 2005).

Le risque maximal de contamination des eaux de surface correspond aux fortes averses qui se produisent peu de temps après l'application ou l'arrivée du produit au sol, c'est-à-

dire quand la disponibilité de la substance est maximale dans le sol et que les états de surface du sol sont potentiellement dégradés ; les pertes durant ces quelques événements peuvent constituer la majorité de la contamination annuelle (**Aubertot *et al.*, 2005**).

Pour la contamination des eaux souterraines, le risque est essentiellement lié au régime pluviométrique, à l'épaisseur de la zone non saturée (l'eau souterraine), aux interactions nappes-rivières et à la nature et à la vitesse des écoulements à travers le sol et le sous-sol. Cependant le transport dans l'eau de certaines substances est parfois observé pendant plusieurs années après leur application, ce qui illustre le risque significatif de remobilisation de résidus fortement retenus sur la matrice du sol (**Aubertot *et al.*, 2005**).

6. Impact des pesticides sur l'environnement

L'impact des pesticides sur l'environnement varie en fonction d'un grand nombre de facteurs dont : la persistance du pesticide dans l'environnement (durée de demi-vie), le temps d'exposition, la dose et la toxicité, la sensibilité relative des organismes ou de l'écosystème exposés et l'âge de l'organisme exposé. Les pesticides peuvent donc être responsables de pollutions diffuses chroniques et/ou aiguës et accidentelles, lors de leur épandage sur les surfaces agricoles mais également lors de leur fabrication, transport ou élimination (**Margni *et al.*, 2002**).

6.1. Impact des pesticides sur la santé humaine

Les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme par contact cutané, par ingestion ou inhalation. Les effets peuvent être bénins à mortels (**Mollier *et al.*, 2010**). Le niveau de toxicité dépend de plusieurs facteurs, le plus important étant les caractéristiques chimiques du pesticide en question (**Giroux, 2004**).

6.2. Impact des pesticides sur la faune sauvage

Tous les organismes sont susceptibles d'être exposés aux pesticides et d'en subir des effets néfastes. Les effets sur les oiseaux, les poissons et les mammifères ont été souvent décrits. Les insectes non viés n'y échappent pas également et le cas le plus médiatisé est celui des abeilles (**Clavet. R *et al.*, 2005**).

L'empoisonnement de la faune sauvage dépend de la toxicité d'un pesticide, de la quantité appliquée, de la fréquence, du moment et de la méthode de pulvérisation (par exemple, la pulvérisation fine a tendance à être emportée par le vent), du climat, de la structure de la végétation et du type de sol. Les insecticides, rodenticides, fongicides (pour le traitement des semences) et les herbicides, encore plus toxiques, menacent la faune sauvage qui y est exposée (**Isenring, 2010**).

6.3. Impact des pesticides sur les microorganismes du sol

L'importance du rôle des microorganismes dans le sol explique que de nombreuses études aient été menées pour connaître les effets des pesticides sur leurs populations et sur leurs activités. Les effets des pesticides sont très divers et affectant plusieurs fonctions de la microflore des sols (**Clavet R. et al., 2005**).

6.4. Impact des pesticides sur les plantes non visées

Les insecticides n'ont pas vraiment d'effets marqués sur les végétaux. Toutefois, des perturbations de croissance des plantes par des composés organochlorés ont été observées ainsi que des effets toxiques sur les algues. En revanche, les herbicides peuvent avoir des effets très dommageables et cela en deux circonstances. Le premier correspond aux dérives et aux transferts sur les végétaux voisins d'une culture traitée et relève des pratiques de traitement mise en œuvre. La deuxième concerne la persistance des herbicides (**Clavet R. et al., 2005**).

III. Les herbicides

1. Définition

Les herbicides sont des produits faisant partie de la famille des pesticides, substance élaborées afin de contrôler ou détruire des organismes jugés indésirables.

Le premier herbicide synthétique l'acide 2,4dichlorophénoxyacétique fut conçu en 1945. A partir de ce moment, plusieurs substances chimiques furent développées telles les triazines (1955) et les chloroacetamides (1956) (**Edelahi, 2004**).

Tableau 3 : 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 ; El Azzouzi, 2013)

| 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 aminés | Les aryloxyacides Ils sont constitués d'un noyau benzénique, naphthénique 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. |
| | Inhibiteur de la division cellulaire | 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 synthèse des caroténoïdes | |
| | Inhibiteur de synthèse des chlorophylles découplant | |
| Perturbateurs de croissance | | |

Dans les années 70-80, de nouvelles familles d'herbicides à faible dose d'application se sont développées, comme les sulfonyles 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. Classification des herbicides

Plusieurs classifications des herbicides sont possibles. On se base sur leur formule chimique, sur leur cible, sur leur formulation, sur les symptômes qu'ils occasionnent aux mauvaises herbes (**tableau 3**). Il n'existe pas de classification idéale, mais certaines peuvent être mieux appropriées à tel ou tel but (**Gauvrit, 1996**).

IV. Les Herbicides Sulfonyles

1. Historique

La famille des sulfonyles est composée d'une vingtaine d'herbicides développés principalement par **Du Pont (Brown et Cotterman, 1994)**.

Les propriétés herbicides des sulfonyles ont été rapportées pour la première fois en 1966 par **Koog** avec le composé I dérivé de la Propazine. L'activité de I était très similaire à celle de la molécule mère (Propazine) (**Hay, 1990**). Au début des années 70, **Levitt** nota que la sulfonyle II, dérivée du 4-Cyanoaniline avait une faible action sur la croissance des plantes.

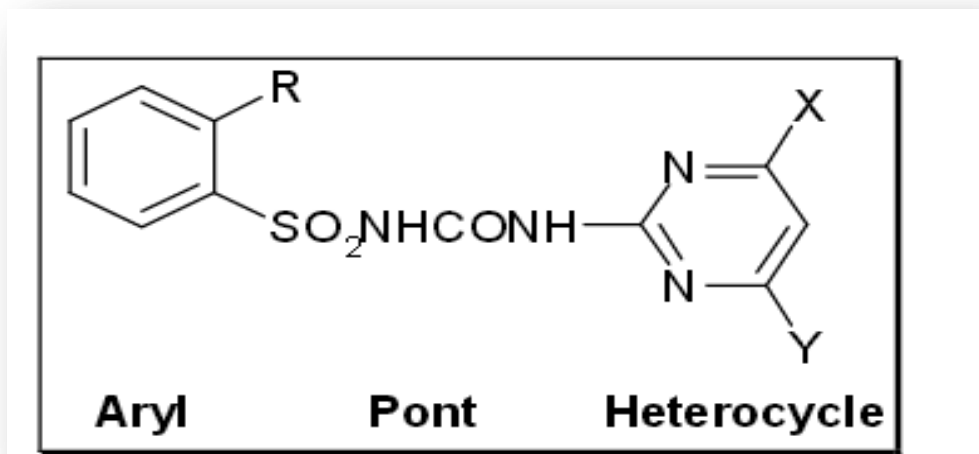


Figure 2 : Structure générale des sulfonamides (Beyert *et al.*,1988)

- **Groupements R activateurs** : CO₂CH₃; NO₂; F; Cl; Br; SO₂CH₃; SCH₃; SO₂N(CH₃)₂; CF₃;CH₃; CH₂OCH₃; OCF₃.
- **Groupements non activateurs** : COOH; OH; X=CH₃; Y=OCH₃.

La modification de l'un des deux phényles du composé II ne permit pas d'aboutir à l'activité souhaitée. Ce n'est qu'en 1975 que Levitt a pu synthétiser la sulfonylurée III, en substituant la cyanoaniline par l'aminopyrimidine. Une action herbicide considérable fut dès lors observée (2 kg ha⁻¹). C'est ainsi qu'un large programme de recherche dans l'histoire des produits phytosanitaires commença (**Hay, 1990**).

La structure générale des sulfonylurées (**figure 2**) est composée de trois éléments : une partie aryle (sauf pour l'amidonsulfuron), le pont sulfonylurée et un hétérocycle (qui est une triazine chez les premières sulfonylurées). Les variations portent presque toujours sur la partie aryle et sur l'hétérocycle (**gauvrit, 1996**).

Le premier herbicide sulfonylurée commercialisé fut le chlorsulfuron en 1981 (**Brown et Cotterman, 1994**).

2. Propriétés physico-chimiques des sulfonylurées

Les sulfonylurées sont des composés non volatils avec des pressions de vapeur inférieures à 10⁻¹⁰ mm Hg (**Blair et Martin, 1988**). Elles présentent une solubilité dans l'eau variable en fonction du pH, du fait qu'elles sont des acides faibles, l'hydrogène échangeable est porté par l'azote proche de la fonction sulfonyle. En solution dans l'eau, elles peuvent exister sous deux formes, la forme neutre et la forme anionique résultant de la perte de cet ion hydrogène (**Gauvrit, 1996**).

3. Mode d'action

Le fait que la plupart des sulfonylurées sont à l'état dissous dans la cuve du pulvérisateur est favorable à leur pénétration par les organes aériens : généralement plus de 50% de la quantité appliquée pénètre dans le végétal. Pour celles qui présentent une certaine persistance dans le sol (triasulfuron, chlorsulfuron, metsulfuron méthyle), la pénétration par les racines intervient également (**Gauvrit, 1996**).

Les sulfonylurées se déplaçant dans les végétaux en suivant à la fois la sève brute et la sève élaborée (**Gauvrit, 1996**), ce sont des inhibiteurs de l'acétolactate synthase (ALS), une enzyme végétale impliquée dans la synthèse de trois acides aminés : la leucine, l'isoleucine et la valine. L'inhibition de l'enzyme par ces herbicides stoppe la synthèse de

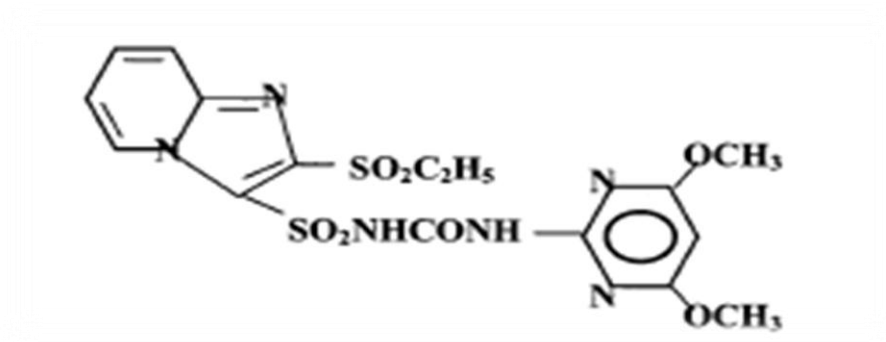


Figure 3 : La structure moléculaire du sulfosulfuron (Yael *et al.*, 2003)

ces trois acides aminés indispensables au développement de la plante et provoquent l'arrêt de sa croissance, puis sa mort (**Delabays *et al.*, 2006**).

4. Le comportement dans le sol

L'hydrolyse a évidemment plus d'importance dans le sol ; la dégradation des sulfonylurées y est le résultat d'une attaque chimique et d'une dégradation microbienne. Cette dernière contribue à la majeure part de la disparition de l'herbicide à pH alcalin puisque l'hydrolyse est lente. Leur rémanence, notable pour le triasulfuron, ainsi que pour le chlorsulfuron et le metsulfuron, est limitée par les facteurs suivants :

- Une humidité et une température du sol élevées
- Un caractère acide
- Un faible taux de matières organiques
- Une texture légère.

Les conditions opposées favorisent la rémanence (**Gauvrit, 1996**).

V. Le sulfosulfuron

1. Généralités

Le sulfosulfuron appartient à la famille des herbicides du type sulfonylurées, largement utilisés dans le monde entier pour réprimer les latifoliées et les graminées adventices dans diverses cultures, notamment les céréales et le maïs (**figure 3**).

Essentiellement, le sulfosulfuron, à l'instar de tous les herbicides du type sulfonylurées, 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**).

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

Tableau 4 : Les propriétés physiques et chimiques du sulfosulfuron (**California department of pesticide regulation, 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 |

Tableau 5 : La toxicité du sulfosulfuron (**California department 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 irritant dermique |
| Sensibilité dermique | N/A | Ce n'est pas un sensitif dermique |
| Mots signal | N/A | Caution |

2. Propriétés physico-chimiques

- Les propriétés physico-chimiques du sulfosulfuron sont présentées par California department of pesticides regulation dans le **tableau 4**.

3. Toxicité du sulfosulfuron

- Les types, les valeurs et les catégories de toxicité du sulfosulfuron sont présentées par California department of pesticides regulation dans le **tableau 5**

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 de réglementation de la lutte antiparasitaire, 1999**).

VI. L'APYROS (Matière active : Sulfosulfuron)

L'herbicide Apyros est commercialisé sous plusieurs formulations commerciales parmi lesquelles l'Apyros qui est largement utilisé en Algérie.

1. Propriétés Générales

Sulfosulfuron :750 g / kg

CHPPUA N° **99.877.855**

Emballage Flacon de **53 g**

APYROS est un produit :**MONSANTO**

Utilisation du produit : herbicide (**Monsanto Europe N.V, 2014**) (**Annexe 3**).

Tableau 6 : 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 noctano/eau | Log pow :< 1 (sulfosulfuron) |

Tableau 7 : 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-diméthoxypyrimidin-2-yl)-3 (ethylsulfonylimidaso(1,2-a)pyridine-3-ylsulfonyl)- urée |

2. Propriétés physico-chimiques

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

Les propriétés physico-chimiques de l'Apyros sont représentées dans le **tableau 6**

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

3. Composition, usage et dose de l'Apyros

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

- La composition de l'Apyros est présenté dans le **tableau 7**

4. Usage et dose appliqué de l'herbicide Apyros

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

- L'usage et la dose appliqué de l'Apyros sont représentés dans le **tableau 8**

VII. La dégradation des pesticides

La dégradation des pesticides est un des processus clés de leur devenir dans le sol et les sédiments, et joue un rôle majeur dans leur dissipation et leur élimination des milieux naturels.Elle est due à de nombreuses transformations chimiques qui modifient la composition et la structure des molécules apportées au sol. Ces modifications peuvent être limitées à l'élimination d'un groupe fonctionnel, conduire à divers produits de transformation et aller jusqu'à la complète dégradation avec la production de molécules minérales (minéralisation) (**Clavet *et al.*, 2005**).

Tableau8 : Usage et dose appliquée de l'herbicide Apyros (**Web site N°2**)

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

1. Dégradation abiotique des pesticides

Les transformations abiotiques sont dues à des réactions chimiques qui ne sont pas catalysées par des systèmes enzymatiques. On distingue trois groupes de transformations chimiques :

Les transformations chimiques dues à la présence en solution d'espèces chimiques particulières, telles que : l'eau ou ses produits de dissociation (H^+ et OH^-) à l'origine des réactions d'hydrolyse, des composés oxydants ou réducteurs à l'origine des réactions d'oxydoréduction, des composés organiques à l'origine de réaction de combinaison.

Les transformations chimiques résultant d'interactions avec des surfaces adsorbants, ce sont des transformations chimiques en phase adsorbée.

Les transformations chimiques résultant de l'action de la lumière, ce sont les réactions photochimiques (**Clavet *et al.*, 2005**).

2. Dégradation biologique des pesticides (la biodégradation)

La biodégradation consiste à décomposer un substrat organique comme, les hydrocarbures, les solvants, les composés organochlorés...etc., par l'action des microorganismes vivants (bactéries et champignons essentiellement). Elle a lieu dans les milieux naturels comme les sols, les sédiments et les eaux mais elle peut aussi se produire dans les organismes végétaux et animaux (**Clavet *et al.*, 2005**).

Les polluants sont digérés par les microbes et transformés en composés plus simples non toxiques (**Lucas *et al.*, 2008**). Diverses bactéries et champignons sont capables de dégrader à différents degrés, des xénobiotiques dont certains sont totalement oxydés en CO_2 , alors que d'autres ne peuvent être que partiellement dégradés.

En présence d'oxygène, deux types de biodégradation de composés organiques peuvent avoir lieu : minéralisation ou biotransformation. La biotransformation est une biodégradation incomplète qui peut transformer un composé en métabolites organiques stables. Ces derniers peuvent être inoffensifs ou parfois plus toxiques que le polluant initial (**Kaufmann,2004**). La minéralisation est une biodégradation oxydative complète de molécules organiques en composés inorganiques (eau, dioxyde de carbone, ions minéraux) (**Alexander,1994**).

La biodégradation est basée sur deux processus : la croissance et le Co- métabolisme microbien. Dans le cas de croissance, les polluants organiques sont utilisés comme source de carbone et d'énergie. Le Co-métabolisme est défini comme un métabolisme d'un composé organique en présence d'un substrat de croissance qui est utilisé comme source primaire de carbone et d'énergie.

3. Les microorganismes impliqués dans la biodégradation

Dans les sols, les champignons, les algues, les protozoaires et les bactéries y sont impliqués (Clavet *et al.*, 2005).

Parmi les champignons qui jouent le rôle dans la décomposition de la matière organique et dégradent la cellulose et la lignine des végétaux sont les Mucorales (*Mucor*, *Mortierella*, *Rhizopus*) et les Deutéromycètes (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria* et *Botrytis*) (Maieretal., 2000).

Parmi les bactéries à Gram négatif hétérotrophes, de très nombreuses espèces peuvent utiliser une grande variété de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Ce groupe d'une grande importance agronomique comprend les genres fixateurs d'azote : *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Azospirillum*, *Klebsiella* (Davet, 1996).

Parmi les bactéries à Gram positif, les actinomycètes jouent un rôle très important dans la biodégradation des matières organiques (Tsiko,2007).

VIII. Les actinomycètes : agents de biodégradation dans la nature

1. Généralités

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positif avec un coefficient de Chargaff (GC%) élevé, saprophytes, largement distribuées dans le sol, l'eau et les plantes, montrant une diversité chimique et morphologique marquée (Goodfellow et O'Donnell, 1989). Elles présentent des similitudes avec les eubactéries et les champignons. Il existe des formes de transition, mycéliennes typiques et unicellulaires, présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié (Mincer *et al.*, 2002).

Tableau 9 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents (**Lechevalier et Lechevalier, 1967**)

| Genres | Fréquence (%) |
|--------------------------|---------------|
| <i>Streptomyces</i> | 95,34 |
| <i>Nocardia</i> | 1,94 |
| <i>Micromonospora</i> | 1,40 |
| <i>Thermomonospora</i> | 0,22 |
| <i>Actinoplanes</i> | 0,20 |
| <i>Microbispora</i> | 0,18 |
| <i>Mycobacterium</i> | 0,14 |
| <i>Streptosporangium</i> | 0,10 |
| <i>Actinomadura</i> | 0,10 |
| <i>Micropolyspora</i> | 0,10 |
| <i>Pseudonocardia</i> | 0,06 |

Lorsqu'il croît sur un substrat solide comme la gélose, le réseau ramifié d'hyphes formé par les actinomycètes se développent à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de ce dernier pour former le mycélium végétatif. Des septums divisent habituellement les hyphes en longues cellules ($> 20 \mu\text{m}$) contenant plusieurs nucléoïdes. Parfois, il se forme une masse qui ressemble à un tissu qui porte le nom de thalle (**Basilio, 2003**). Le diamètre des filaments des formes mycéliennes est toutefois environ deux fois plus faible ($0,5$ à $1,2 \mu\text{m}$) que celui des mycéliums de champignons (**Mincer et al., 2002**).

Les spores d'actinomycètes se développent par septation des extrémités du filament, habituellement, en réponse à une privation en éléments nutritifs. La plupart ne sont pas particulièrement résistantes à la chaleur mais supportent bien la dessiccation et ont, de ce fait, une importante valeur adaptative.

Les actinomycètes ne sont pas mobiles, lorsqu'il y a mobilité, elle est confinée aux spores flagellées (**Basilio, 2003**).

2. Physiologie et écologie des actinomycètes

Physiologiquement, les actinomycètes sont des bactéries aérobies mais certaines sont aérobies facultatives. Ces bactéries sont hétérotrophes ou chimiotrophes mais la plupart sont des chimio-hétérotrophes capables d'utiliser une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes (**Lechevalier, 1988 ; Zimmerman, 1990**), mais quelques-unes peuvent être pathogènes ou symbiotes des plantes et des animaux (**Suzuki et al., 1994**).

Les actinomycètes sont retrouvés presque partout dans la nature. Ils constituent une part importante de la microflore tellurique : 10 à 20% ou parfois plus (**Dommergues et Mangenot, 1970 ; Ishizawa et Araragi, 1976**). Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et divers autres substrats. Il représente 80 à 95 % du total des actinomycètes (**Lacey, 1973 ; Elwanet al., 1985**). Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur d'humus caractéristique des sols (**Omura, 1992 ; Zaitlinet al., 2003**).

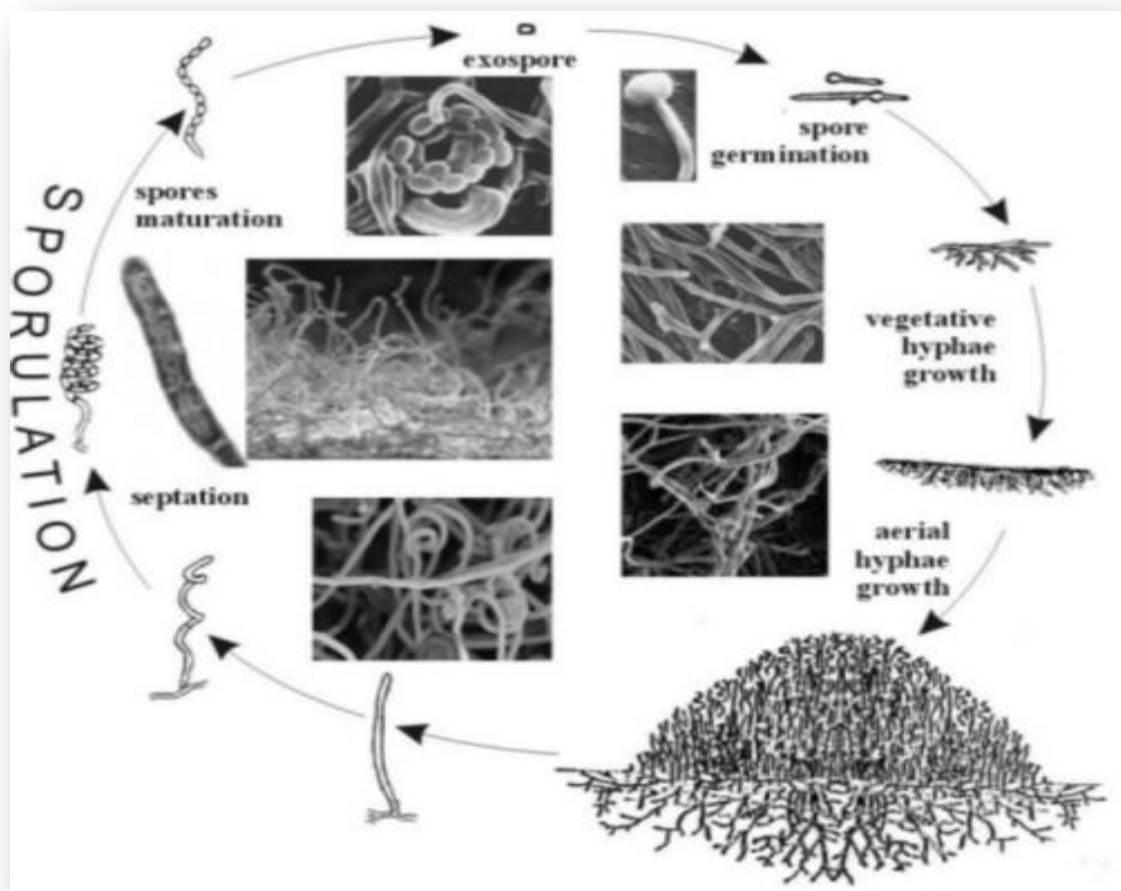


Figure 4 : Cycle de développement des Actinomycètes (*Streptomyces*) sur milieu solide (Jakimowicz, 2007)

Après *Streptomyces*, les genres les plus fréquents sont *Nocardia* et *Micromonospora* (Dommergues et Mangenot, 1970). Les autres genres ne constituent qu'une fraction minimale et sont parfois peu fréquents ou même assez rares (Suzuki *et al.*, 1994)(tableau 9).

Comme les autres bactéries du sol, les actinomycètes se comportent comme des bactéries mésophiles avec croissance optimale située entre 25 et 30°C (Edwards, 1993), et dans une gamme de pH 5,0 à 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité (Williams et Wellington, 1982a ; Goodfellow et Williams, 1983).

Toutefois, il existe des souches thermophiles isolées à une température située entre 50° et 60 °C (Edwards, 1993).

3. Cycle de développement

Les actinomycètes possèdent une structure des procaryotes, mais un cycle biologique qui ressemble à celui de certains champignons (Larpen et Sanglier, 1989), il débute par la germination d'une spore, qui donne naissance à un mycélium primaire formé des hyphes, qui se ramifie. Le développement du mycélium du substrat vers la partie superficielle donne le mycélium "secondaire" ou aérien, les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores, qui sont des agents de dissémination (Kim *et al.*, 2004 ; Smaoui, 2010) (Figure 4).

4. Classification des actinomycètes

Le phylum Actinomycètes tel qu'il figure dans le **Bergey's Manual (2004)** renferme une seule classe : Actinomycètes, cette classe est subdivisée en 5 sous classe, 6 ordres, 13 sous ordre (dont 9 appartiennent à l'ordre des Actinomycétales), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces.

Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en G + C %, et présentent une grande différenciation quant au développement de leur cycle de vie.

L'ordre des Actinomycétales comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant de la forme cocci ex. (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci ex. (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent ex. (*Nocardia*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié

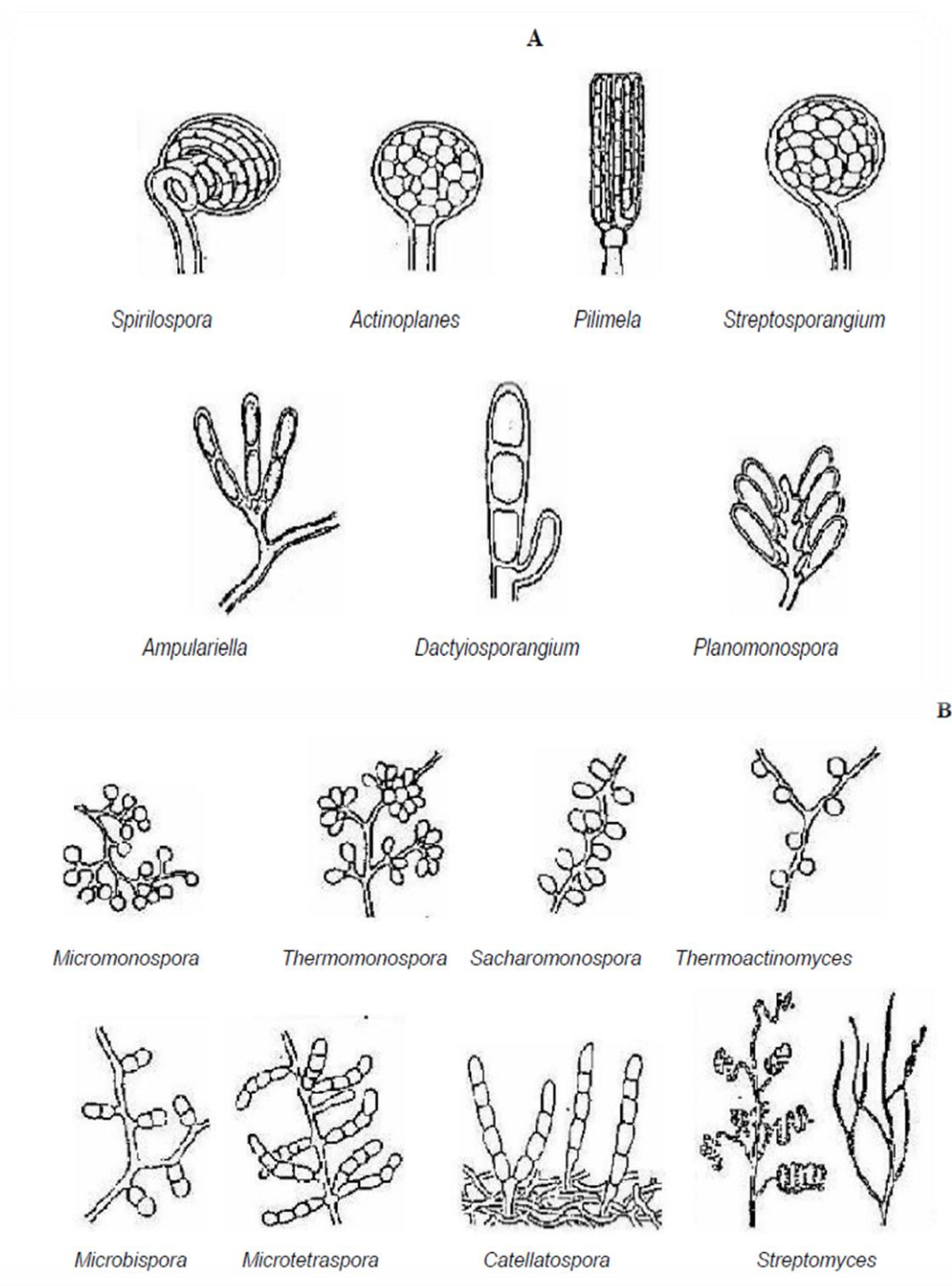


Figure 5 : Différentes chaînes de spores chez les actinomycètes ; spores endogènes (A) spores exogènes (B) (**Breton et al, 1989**).

ex. (*Streptomyces, Actinomadura, Micromonospora...etc.*) (Oskay et al., 2004 ; Srivibool et Sukchotiratana, 2006).

Dans le **Bergey's manual (2004)**, les Streptomycètes représentent l'un des taxa appartenant à l'ordre des Actinomycétales qui renferment une diversité de morphotypes, comprenant des formes unicellulaires sphériques, des hyphes fragmentés et des mycéliums ramifiés). En effet, la famille *Streptomycetaceae* comprend 10 genres :

Streptoverticillium, Streptacidiphilus, Microellobosporia, Kitasatospora, Kitasatoa, Elytrosporangium, Chainia, Actinosporangium, Actinopycnidium et Streptomyces et plus d'une centaine d'espèces. Cependant, les genres *Actinosporangium, Actinopycnidium, Elytrosporangium, Chainia, Microellobosporia et Kitasatoa*, suite à l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire, notamment, le séquençage de l'ADNr 16S, ont été assimilés au genre *Streptomyces*.

5. Identification des actinomycètes

L'étude des caractéristiques physiologiques, biochimiques et morphologiques, constituent une approche classique d'identification des actinomycètes. Cette méthode décrite par Nonomura (1974) dans le **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** s'est révélée très utile dans l'identification et la classification des souches notamment les streptomycètes. Les caractéristiques les plus couramment employées dans cette taxonomie sont :

- ** La couleur du mycélium aérien (blanc, gris, rouge, vert, bleu ou violet).
- ** La production des pigments mélanoides.
- ** La couleur du mycélium du substrat.
- ** La production de pigments solubles (rouge, orange, vert, jaune, bleu ou violet).
- ** L'assimilation des glucides (arabinose, xylose, inositol, mannitol, fructose, rhamnose, saccharose, raffinose).
- ** Morphologie des chaînes de spores (Rectiflexibles : RF, Retinaculiaperti : RA ou spiral : S) (**Figure 5**).
- ** Aspect de la surface des spores (lisse, épineuse, velues ou verruqueuses).
- ** Présence ou absence de structure particulière : sporanges, sclérotés...etc.

Tableau 10 : Clés de détermination des différents genres d'actinomycètes basée sur la Composition chimique de la paroi (**Lechevalier et Lechevalier, 1980**).

| Type de la paroi | Constituants majeurs | Genres |
|------------------|--|----------------------|
| I | LL- D. A. P et glycine | <i>Streptomyces</i> |
| II | méso- D. A. P. et glycine | <i>Micromonospra</i> |
| III | méso- D. A. P. | <i>Actinomadura</i> |
| IV | méso-. D. A. P, arabinose et galactose | <i>Nocardia</i> |
| V | lysine et ornithine | <i>Actinomyces</i> |
| VI | Lysine | <i>Oerskovia</i> |
| VII | D. A. B et glycine | <i>Agromyces</i> |
| VIII | Ornithine | <i>Cellulomonas</i> |

L'étude de composition chimique de la paroi des actinomycètes constitue un autre outil de différenciation. Cette méthode connue sous le nom chimio taxonomie, se base sur l'étude des variations chimiques des organismes et l'utilisation des critères chimiques (marqueurs) sélectionnés dans la classification et l'identification des organismes (**Collins et al., 1985**). Les différents groupes d'actinomycètes sont définis par la présence de l'acide diaminopimélique qui s'ajoute à certains acides aminés et sucres (ou les deux à la fois)(**Pridham, 1965**) (**Tableau10**).

L'étude physiologique est très importante pour l'identification des espèces. Ils consistent en des tests de dégradation de nombreuses substances ; des glucides, des lipides et des protéines, ces critères physiologiques sont primordiaux dans le cas de la taxonomie numérique, laquelle est appliquée pour certains genres par de nombreux auteurs (**Goodfellow, 1971 ; Cross et Goodfellow, 1973; Goodfellow et al, 1979**).

Cependant, avec la prolifération des espèces, l'application des méthodes chimiques et morphologiques s'est avérée insuffisante pour la distinction d'organisme proche ou pour déterminer un groupement rationnel des genres actinomycétiques (**Goodfellow et al., 1988**). Ainsi, plusieurs études ont suggéré l'utilisation des techniques moléculaires pour la classification des actinomycètes, à savoir la détermination du taux d'hybridation ADN/ADNou ADN/ARN et le séquençage partiel ou total de l'ARN et/ou l'ADN ribosomiaux (**Goodfellow et Cross, 1984 ; Kieser et al., 2000**).

6. Importance environnementale des actinomycètes.

Les actinomycètes ont un rôle important dans les processus de recyclage et de biodégradation de la matière organique et des éléments minéraux et contribuent ainsi à la fertilisation des sols (**Goodfellow et al., 1984**).

Ils ont un grand pouvoir de transformation des substances organiques complexes difficilement ou non dégradables par les autres microorganismes, tels que les polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine...etc. (**Lechevalier, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983**).

Ils sont aussi capables de dégrader certaines toxines produites par des champignons toxinogènes et réduire aussi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire (**Holzapel *et al.*, 2002**). Leur pouvoir antagoniste prononcé leur confère un rôle dans la distribution écologique des microorganismes et dans la lutte biologique contre certains agents phytopathogènes du sol (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Matériel et méthodes

Partie 1 : Isolement et purification des actinomycètes à partir d'un sol agricole traité par l'herbicide Apyros

1. Isolement des actinomycètes

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 du sol jusqu'à 10 centimètres de profondeur, puis déposée à l'aide d'une spatule sur une feuille d'aluminium stérile. Après un premier tri, écartant les pierres et les débris végétaux, l'échantillon est récupéré dans un flacon stérile. Les échantillons sont transportés au laboratoire et 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 pour 12,5 ml d'eau distillée).

➤ **Herbicide étudié :**

L'herbicide étudié au cours de ce travail est l'herbicide Apyros (Sulfosulfuron 75%) sous sa formulation commerciale, qui est largement utilisé en Algérie, il est obtenu à partir des fournisseurs de produits phytosanitaires, c'est un herbicide de la famille des herbicides sulfonyles et utilisé dans la lutte contre le brome, ainsi que d'autres adventices graminées et certaines dicotylédones.

➤ Sa composition chimique est mentionnée dans la partie bibliographique (**tableau 4**).

1.3. Méthode d'isolement

Selon **Lara et al. (2005)**, 1g d'échantillon de sol traité par l'herbicide Apyros est dilué dans 9 ml d'eau distillée stérile, puis agité à haute vitesse. A partir de cette suspension, une

série de dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-5}) est effectuée, puis 0,1 ml de chaque dilution est ensemencé sur milieu Amidon Caséine Agar (SCA) modifié (**Annexe 1**) additionné de la polymixine (1 mg / l) et de l'herbicide Apyros à la dose recommandée (0,1 g / l).

Les solutions d'antibiotique et d'herbicide sont préparées puis stérilisées par filtration sur membrane type millipore (de 0,45 μm de porosité) et sont ajoutées stérilement au milieu d'isolement refroidi à 45°C. Les boîtes sont incubées à 28 ± 2 °C et observées quotidiennement pendant une durée de 21 jours.

Selon la méthode **Ouhdouch et al. (2001)**, les colonies des actinomycètes sont repérées d'après leur aspect **macroscopique** caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose). Puis par leur aspect **microscopique** (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique (**Leica DMLS**) (**G x 10**). Toutes les colonies répondant aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques des actinomycètes sont repiquées sur milieu Amidon Caséine Agar modifié et incubées à 28 ± 2 °C pendant 7 à 21 jours. La pureté des souches est contrôlée par observation microscopique directe (**G x 10**).

2. Coloration de Gram

Elle est effectuée selon la méthode classique. Des frottis de colonies répondant aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques des actinomycètes sont préparés, colorés puis observés sous microscope optique (**G x 100**). Les colonies Gram positif sont toutes repiquées sur le milieu Amidon Caséine modifié.

3. Conservation des souches d'actinomycètes isolées

3.1. Sur gélose inclinée

Selon la méthode utilisée par **Boughachiche et al. (2005)**, Les souches sont ensemencées sur milieu ISP2 (**annexe 1**), en gélose inclinée, après incubation à 28 ± 2 °C pendant 21 jours, sont conservées à 4°C. Un repiquage est réalisé tous les deux mois.

3.2. Congélation des cultures sporulées

D'après **Isik et al. (1999)**, Les souches sont ensemencées sur milieu gélosé ISP2, puis incubées jusqu'à sporulation, une suspension de spores est préparée par raclage de surface de la culture puis conservée par congélation à -20 °C en présence de glycérol à 20%.

4. Préparation des inocula des souches isolées

4.1. Préparation de l'inoculum général

Selon la méthode de **Shirling et Gottlieb (1966)**, Les souches d'actinomycètes testées sont ensemencées en stries serrées, sur milieu ISP3 (**annexe 1**) et incubées à 28 ± 2 °C pendant 7 jours. Après croissance, 20 ml d'eau distillée stérile sont versés dans chaque boîte de Pétri, les colonies sont raclées à l'aide d'un râteau puis récupérées par pipette Pasteur dans un tube stérile. L'inoculum ainsi récupéré, contenant des fragments de mycélium et de spores, sert à ensemencer, tous les milieux utilisés, à l'exception du milieu ISP9 (**annexe 1**), pour lequel, on utilise l'inoculum lavé.

4.2. Préparation de l'inoculum lavé

D'après **Shirling et Gottlieb (1966)**, 50 ml du milieu liquide ISP1 (**annexe 1**) sont inoculés par cinq millilitres de l'inoculum général, et incubés sous agitation (180 tpm) à 28 ± 2 °C pendant 48 heures. Après l'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 d'eau distillée stérile, 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.

Partie 2 : Mise en évidence de la capacité des actinomycètes isolées à tolérer et utiliser l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie

5. Etude de la tolérance des actinomycètes isolées à l'herbicide Apyros

Les actinomycètes isolées et purifiées sont testées, *in vitro*, pour leur capacité à croître en présence de l'herbicide Apyros (sulfosulfuron 75%) à une concentration 10 fois supérieure à la dose recommandée, selon la méthode de **Zakia et al. (2012)**, les souches isolées sont ensemencées sur milieu Amidon Caséine Agar modifié supplémenté par l'herbicide Apyros à une concentration 10 fois la dose recommandée (1g/l). Les boîtes sont ensuite incubées à 28 ± 2 °C pendant 10 jours. La croissance des Actinomycètes est estimée par comparaison avec celle obtenue sur milieu Amidon Caséine Agar modifié exempt d'Apyros et enregistrée en tant que : nulle(-), faible (+), modérée (++) et abondante (+++).

6. Etude de la capacité des actinobactéries à croître en présence de l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie

Les souches d'Actinomycètes qui tolèrent l'herbicide Apyros, sont testées pour leur capacité à utiliser ce dernier comme seule source de carbone et d'énergie. Cette étude est réalisée selon la méthode de **Pridham et Gottlieb (1948)**, sur le milieu ISP9 contenant l'Apyros à la dose recommandée (0,1g/l) comme seule source de carbone et d'énergie, les boîtes sont ensemencées en stries à partir de l'inoculum lavé, puis incubées à 28 ± 2 °C pendant 7 jours. L'utilisation de l'Apyros est appréciée en comparant les cultures avec la croissance obtenue sur le milieu ISP9 sans source de carbone servant de contrôle négatif et avec le milieu ISP9 additionné de glucose servant de contrôle positif.

7. Etude, *in vitro*, de cinétique de dégradation de l'herbicide Apyros par les souches actinomycètes actives

Les souches capables d'utiliser l'Apyros comme **SSCE**, sont testées pour leur aptitude à dégrader ce même herbicide. Selon **Lara et al. (2005)**, 10 ml de l'inoculum lavé de

chaque souche sont inoculés dans un Erlenmeyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu ISP9 liquide additionné de l'Apyros comme SSCE à une concentration équivalente à la dose recommandée (100mg/l), puis incubés sous agitation (180 tpm) à 28 ± 2 °C, pendant 15 jours à l'abri de la lumière pour éviter la photodégradation. Toutes les expériences sont réalisées en double.

Deux contrôles sont réalisés dans les mêmes conditions, l'un est négatif non inoculer, pour contrôler la dégradation non biologique de l'herbicide, l'autre est positif, ne contient pas l'herbicide, pour contrôler la croissance bactérienne en absence de l'herbicide.

Pour chaque souche, des prélèvements périodiques sont effectués à un intervalle de 5 jours, pendant 15 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 échantillon est centrifugé à 5000 tpm pendant 30 min à 4° C. Le surnageant est conservé en l'absence de la lumière à -20°C, pour une analyse chromatographique ultérieure.

7.1. Mesure de la densité bactérienne

La variation de la densité bactérienne au cour des 15 jours d'incubation est déterminée par spectrophotomètre d'adsorption moléculaire UV / Visible à une longueur d'onde de 600 nm.

7.2. Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

La détermination quantitative du la matière active de l'Apyros : sulfosulfuron 75% au cour du temps d'incubation est réalisée d'après **Sanjana et al. (2006)**, par injection des surnageants filtrés sur membrane millipores (**0.22 µm**) dans le système HPLC dont les caractéristiques sont les suivantes :

- La phase mobile est un mélange, acétonitrile : eau ultra pure (80 : 20 v/v).
- La colonne d'analyse est une Colonne 180 DS avec **une longueur de 25× 0, 46 cm** et un **diamètre de 5µm**.
- Le débit utilisé dans la colonne est **de 1ml/mn**.

-La détection est réalisée au moyen d'un détecteurs UV –visible : UV-2075 couplé d'un ordinateur menés d'un logiciel pour visualisé les signaux enregistrée par le détecteur.

Partie 3 : Caractérisation macroscopique, microscopique, physiologique et biochimique des actinomycètes actives

8. Identification présomptive des souches d'actinomycètes actives

8.1. Aspect macroscopique

D'après **Shirling et Gottlieb (1966)** et **Mocheva et al. (2002)** et **Oskay et al. (2004)**, l'aspect macroscopique (couleur, forme, etc.) des actinomycètes est déterminé par ensemencement sur les milieux de l'International *Streptomyces* Project : ISP2, ISP4, ISP5 (**annexe 1**), et observé après 21 jours d'incubation à 28 ± 2 °C. Les caractères cultureux sont observés pendant une semaine.

8.2. Aspect microscopique

L'observation de la morphologie des chaînes de spores, du mycélium aérien et du mycélium du substrat est effectuée selon la technique des lamelles obliques :

Selon la méthode de **Williams et Cross (1971)** et de **Liu et al. (2005)**, Une partie d'une colonie isolée est broyée stérilement avec une tige en verre, puis introduite dans 3 à 4 gouttes d'eau distillée et déposée sur une lamelle fermement fixée au milieu ISP2 en faisant un angle de 45°. Les boîtes sont ensuite incubées à 28 ± 2 °C. Après 7, 14 et 21 jours d'incubation les lamelles sont retirées puis déposées sur une lame et observées sous microscope (**G x 100**).

Le mycélium aérien et celui du substrat sont photographiés à l'aide d'un appareil photographique numérique de marque **Canon Axis 8 × Zoom**. Les structures de chaque isolat sont comparés avec ceux déterminés dans le guide pratique de l'identification morphologique des actinomycètes (**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1994**).

8.3. Tests biochimiques

8.3.1. Utilisation des glucides comme seule source de carbone

Le milieu de base utilisé est l'ISP9 préconisé par **Goodfellow (1971)**. Les glucides sont ajoutés au milieu de culture à raison de 1 %. Les lectures se font par comparaison de la croissance des actinomycètes en présence des glucides ou en leur absence (témoin négatif).

Le milieu contenant du glucose sert de témoin positif. Les glucides testés comme seule source de carbone sont les suivants : Arabinose, Inositol, Fructose, Maltose, Xylose, Galactose, Glucose, Lactose.

8.3.2. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

La pente du milieu de citrate de Simmons (**Annexe 1**) estensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une anse de platine avec l'inoculum lavé des souches actives. L'incubation s'effectue à 28 ± 2 °C. L'observation de la croissance se fait quotidiennement durant une semaine (**Camille, 2007**).

8.3.3. Utilisation du Glucose, Lactose et saccharose et la production de l'H₂S

La pente du milieu TSI (**Annexe 1**) estensemencée par des stries et le culot par piqure avec l'inoculum lavé des souches actives. Après incubation à 28 ± 2 °C. La lecture est faite au niveau du culot pour le glucose et au niveau de la pente pour le lactose et le saccharose. L'utilisation des sucres est traduite par un virage de couleur du milieu vers le jaune. Dans le cas où le dégagement d'H₂S, un noircissement est provoqué dans le culot (**Smriti et al., 2012**).

8.3.4. Utilisation des sources azotées

8.3.4.1. La réduction des nitrates

10 ml de bouillon nutritif (ISP2) contenant 0,1% de nitrate de potassium sontensemencés et incubés à 28 ± 2 °C. Aux 5^{ème}, 10^{ème} et 14^{ème} jours d'incubation, 3 gouttes de chacun des réactifs de Griess I et II (**Annexe 2**) sont ajoutées à 1 ml de culture. La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration

rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés. Selon **Gordon et Smith (1953)**, s'il y a :

- Apparition de la coloration rouge: les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche (**résultat négatif**).
- Absence de coloration: les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites (**résultat positif**).

8.3.4.2. Recherche de l'uréase

4.5 ml d'eau physiologique (**Annexe 2**) contenant 4 gouttes du milieu Urée-indole sontensemencés par 0.5 ml de chaque souche. La lecture est effectuée après incubation à 28 ± 2 °C pendant 24 heures :

- Si la couleur du milieu vire vers le rouge donc Uréase positive.
- Si la couleur du milieu reste jaune donc Uréase négative (**Camille, 2007**).

8.3.4.3. Recherche de la production d'indole

4,5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes du milieu Urée-indole (**annexe 1**) sontensemencés par 0,5 ml de chaque souche. La lecture est effectuée après incubation à 28 ± 2 °C pendant 24 heures. Selon **Smriti et al. (2012)**, 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs (**Annexe 2**) sont ajoutées à 1 ml de la culture. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface.

8.4. Tests physiologiques

8.4.1. Détermination des Pigments mélanoïdes

Selon la méthode de **Shirling et Gottlieb (1966)** et de **Mocheva et al. (2002)**, Les milieux gélosés ISP6 et ISP7 (**annexe 1**) sontensemencés pour mettre en évidence la production de pigments mélanoïdes produits par les actinomycètes. Un tube nonensemencé sert de témoin. L'observation de la couleur brune noire caractéristique des pigments mélanoïdes se fait au 2^{ème} jour et au 4^{ème} jour, en comparant les tubesensemencés avec le témoin. L'incubation des tubes est faite à 28 ± 2 °C.

8.4.2. Hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé (**Annexe 1**) contenant 1% d'amidon soluble selon la méthode de **Gordon et Smith (1953)**. Après 14 jours d'incubation à 28 ± 2 °C, la gélose est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

8.4.3. Hydrolyse de la gélatine

Selon la méthode de **Williams et Cross (1971)**, les souches sont ensemencées sur gélose nutritive contenant 0.4% de gélatine, puis incubées 14 jours à 28 ± 2 °C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique à 15% est reversée sur la gélose. Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine.

8.4.4. Hydrolyse de la caséine

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de **Williams et Cross (1971)**, et de **Gordon et Smith (1953)** sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé. L'apparition de zone claire autour des colonies, après 14 jours d'incubation, à 28 ± 2 °C témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

8.4.5. Action sur le lait écrémé

Selon la méthode de **Williams et Cross (1971)**, des tubes contenant une solution de lait écrémé (**Annexe 2**) en poudre à 10% dans l'eau distillée sont ensemencés et incubés à 28 ± 2 °C. Des observations régulières, pendant 14 jours, permettent de noter la coagulation ou peptonisation du lait provoquée par les souches.

Résultats et discussions

1. Isolement des actinomycètes

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. Dénombrement et purification des actinomycètes isolées

Au bout de 7 jours d'incubation à 28°C, les actinomycètes apparaissent sous forme de colonies dures incrustées dans la gélose, et se développent lentement sur le milieu Amidon Caséine modifié additionné de l'herbicide Apyros et de la polymixine.

À partir du milieu sélectif utilisé, 18 colonies d'actinomycètes ont été prélevées, elles sont repérées d'après leur aspect macroscopique (colonies dures incrustées dans la gélose) et leur aspect microscopique (aspect filamenteux à coloration de Gram positive).

En effet, les actinomycètes sont considérés comme le groupe microbien majeur de la population tellurique et sont largement distribués dans les sols (**Küster et Williams, 1964**). Elles se développent très lentement, avec un temps de génération relativement long, par rapport à la plupart des bactéries et des champignons, leur croissance sera donc masquée sur des milieux de culture ordinaires (**Ottow et Glathe, 1968**), pour cela, les milieux d'isolement doivent être destinés à favoriser leur développement et inhiber les autres microorganismes (**Hayakawa, 2008**).

La présence dans le milieu d'isolement, de la chitine, de l'amidon, du glycérol, de l'arginine, de l'asparagine, de la caséine et des nitrates conduit à un isolement sélectif des actinomycètes alors que les bactéries et les champignons poussent faiblement (**Williams et Davies, 1965**).

Dans cette étude, le milieu Amidon-Caséine a été utilisé, il contient des substrats sélectifs pour la croissance des actinomycètes (l'amidon et la caséine) et il est utilisé dans de nombreux travaux d'isolement d'actinomycètes à partir des écosystèmes variés. **Williams et Davies (1965)** ont utilisé ce milieu pour un isolement sélectif des actinomycètes de sol. De même **Hagedorn (1976)** a pu isoler une variété de *Streptomyces* à partir de sols arides. **Suzuki (2001)** a utilisé ce milieu pour l'isolement des actinomycètes appartenant aux genres rares comme *Actinomonospora*, *Actinopolyspara*, *Planomonospora* et *Planobispora*. Ce milieu a été également utilisé par **Benimeli et al. (2003)** pour

Tableau 11 : Tolérance des souches d'actinobactéries du 1^{er} lot à l'herbicide Apyros.

| Souches d'actinobactéries | Croissance en présence de 1 g / l d'Apyros |
|--------------------------------------|---|
| G1 | ++ |
| G2 | ++ |
| G3 | ++ |
| G4 | ++ |
| G5 | ++ |
| G6 | +++ |
| G7 | ++ |
| G8 | +++ |
| G9 | +++ |
| G10 | ++ |
| G11 | ++ |
| G12 | ++ |
| G13 | ++ |
| G14 | ++ |
| G15 | ++ |
| G16 | ++ |
| G17 | ++ |
| G18 | ++ |

l'isolement des actinomycètes à partir des eaux usées contaminées par les pesticides organochlorés, ainsi que par **Lara et al. (2005)** pour l'isolement des actinomycètes résistants à l'herbicide Alachlor additionné au milieu Amidon Caséine à des concentrations ascendantes.

Les actinomycètes sont souvent en interaction compétitive avec d'autres microorganismes du sol (**Hayakawa, 2008**), plusieurs techniques ont été utilisées pour leur isolement sélectif, elles reposent essentiellement sur le traitement à la chaleur des échantillons et l'addition aux milieux d'isolement des substances inhibitrices, stoppant la croissance des germes envahisseurs (**Larpent et Sanglier, 1989 ; Hilali et al., 2002**).

Pour empêcher l'envahissement des champignons et des bactéries à Gram négatif, une mixture de propionate de sodium (4 g/l) et de polymixine (1mg/L) est ajoutée au milieu Amidon Caséine. Selon **Takizawa et al. (1993)**, l'addition d'antifongiques et d'antibactériens contre les bactéries à coloration de Gram négative, aux milieux de culture entraîne une augmentation du nombre de bactéries actinomycétales isolées.

Le développement des bactéries à coloration de Gram positive comme les bactéries du genre *Bacillus*, est un problème délicat lors de l'isolement des actinomycètes parce qu'elles forment des plages rendant toute observation ou purification des souches isolées très difficile.

L'utilisation de l'antibiotique anti-gram positif permet de réduire, de façon considérable, le nombre de ces bactéries, mais ces antibiotiques ont des effets indésirables sur la croissance des actinomycètes qui appartiennent au groupe des Gram positive (**Kitouni, 2007**).

L'ajout de l'herbicide Apyros (0,1 g/l) au milieu d'isolement, permet l'isolement sélectif des actinomycètes résistants à cet herbicide.

2. Etude de la tolérance des souches d'actinomycètes à forte concentration de l'herbicide Apyros

L'étude de la tolérance à forte concentration de l'herbicide Apyros a été faite sur 2 lots de souches d'actinomycètes, le premier lot comprend les 18 souches isolées, le 2^{ème} lot comprend 50 souches aimablement fournies par **Mme Zermane. F** (enseignante attaché au laboratoire de Génie microbiologique et applications).

Tableau 12 : Tolérance des souches d'actinobactéries du 2^{ème} lot à l'herbicide Apyros

| Souches d'actinobactéries | Croissance en présence de 1 g/L d'Apyros | Souches d'actinobactéries | Croissance en présence de 1 g/L d'Apyros |
|---------------------------|--|---------------------------|--|
| A+ | ++ | S9 | - |
| A1 | +++ | S10 | - |
| A3 | - | S11 | - |
| A7 | + | S12 | - |
| A8 | ++ | S13 | - |
| A5 | ++ | S14 | + |
| A9 | - | S15 | + |
| A10 | + | S16 | - |
| A11 | - | S18 | - |
| A11+ | - | S30 | ++ |
| A12 | +++ | S34 | - |
| A104 | - | S35 | + |
| B11 | - | S37 | + |
| B11+ | - | S42 | - |
| B12 | ++ | S44 | - |
| B12+ | - | S63 | ++ |
| B104 | ++ | S66 | ++ |
| S+ | ++ | S73 | - |
| S1 | ++ | S100 | - |
| S2 | - | S101 | - |
| S3 | - | S102 | - |
| S4 | - | S104 | - |
| S105 | ++ | S138 | - |
| S108 | ++ | S151 | ++ |
| S118 | ++ | S151+ | ++ |

(+++): Bonne croissance, (++) : croissance modérée, (+) : croissance faible,

(-) : pas de croissance.

En premier temps, les souches d'actinomycètes du 1^{er} et du 2^{ème} lot sont testées, pour leur tolérance vis à vis à l'herbicide Apyros, à une concentration 10 fois plus grande que la dose recommandée (1 g / l).

Cette étude est réalisée selon une méthode qui repose sur l'appréciation de la croissance développée ou non, sur le milieu Amidon Caséine modifié, en présence de l'herbicide Apyros à forte concentration (10 supérieur que la dose recommandée), en le comparant avec celle obtenue sur le même milieu sans Apyros.

Parmi les 18 souches de 1^{er} lot ,trois souches (G6,G8,G9) présentent une bonne croissance et 15 souches (G1, G2, G3, G4, G5, G7, G10, G11, G12, G13, G14, G15, G16, G17, G18) présentent une croissance modérée, sur le milieu de tolérance (**tableau11**).

Parmi les 50 souches du 2^{ème} lot, 2 souches (A1 et A12) présentent une bonne croissance sur le milieu de tolérance, 15 souches (A+, A8, A5, B12, B104, S+, S1, S30, S63, S66, S105, S108, S118, S151, S151+) présentent une croissance modérée, 6 souches (A7, A10 , S14, S15, S35, S37) présentent une croissance faible, et 27souches (A3, A9, A11, A11+, A104, B11, B11+, B12+, S2, S9, S10, S11, S12, S13, S3, S4, S16, S18, S34, S42, S44, S73, S100, S101, S102, S104, S138) ne tolèrent pas une forte concentration de l'herbicide Apyros dans le milieu (**tableau 12**).

De nombreuses étude sont montré la résistance de souches d'actinomycètes isolées de différentes rhizosphères contaminées par de nombreux herbicides :

Zaki et al. (2012) ont étudié la tolérance de 100 souches d'actinomycètes isolées de différentes rhizosphères contaminées par 2 herbicides, Basta (Glufosinate) et Sencor (Metribuzine), ils ont trouvé que 70 parmi les 100 isolats testées peuvent pousser sur la dose recommandée de Sencor (0,75 g/ l), alors que 24 seulement présentent une bonne croissance sur le même herbicide, 10 fois plus concentré que la dose recommandée. Pour l'herbicide Basta, 38 parmi les 100 isolats poussent sur la dose recommandée (2g/l) et 18 seulement présentent une croissance modérée sur 20 g/ l de cet herbicide.

Lara et al. (2005) ont testé la tolérance de 53 actinomycètes isolées d'un sol contaminé par l'herbicide Alachlor, ils ont trouvés que 16 sur 53 actinomycètes testées croissent sur l'Alachlor à des fortes concentrations (720 mg/l), ces dernier souches sont sélectionnées pour des tests de dégradation de même herbicide.

Tableau 13 : Capacité des souches tolérantes à utiliser l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie.

| Les souches | A1 | A12 | A5 | A+ | A8 | G6 | G8 | G9 | G10 | G13 |
|--|---------|---------|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| Croissance sur milieu ISP9+ Apyros (SCE) | ++ + | ++ + | ++ | ++ | + | + | + | ++ | - | - |

(+++): Bonne croissance, (++): Croissance modérée, (-): Croissance faible.

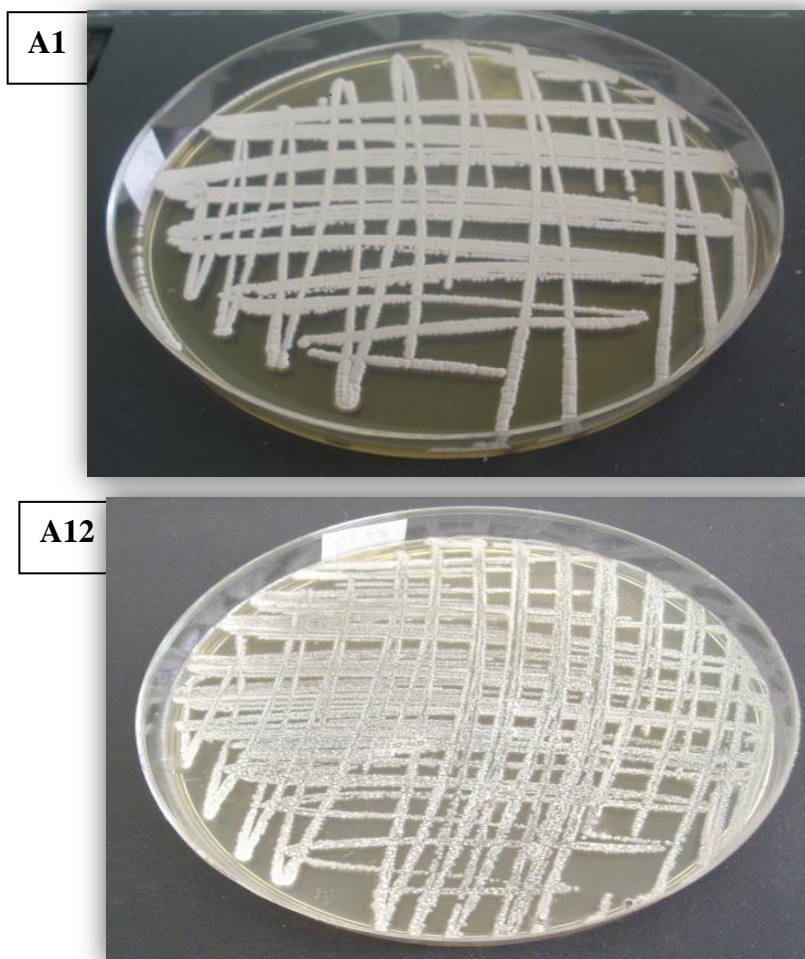


Figure 6 : Croissance des souches **A1** et **A12** sur le milieu ISP9 additionné de l'herbicide Apyros comme **SSCE**

3. L'étude de la capacité des souches tolérantes à utiliser l'herbicide Apyros comme SSCE

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, les souches d'actinomycètes tolérantes sont soumises à un deuxième test, elles sont ensemencées sur le milieu ISP 9 contenant l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie, la dégradation ou non de l'Apyros est appréciée en comparant la croissance avec celle obtenue sur le milieu ISP 9 additionné de glucose (**contrôle positif**) et celle obtenue sur le milieu ISP 9 sans aucune source de carbone (**contrôle négatif**).

Dix souches d'actinomycètes reconnues pour leur bonne tolérance à l'Apyros sont criblées à partir du 1^{er} et 2^{ème} lot, pour étudier leur capacité à utiliser l'Apyros comme seule source de carbone et d'énergie.

Sur les dix souches d'actinomycètes testées, seulement les deux souches A1 et A12 présentent une bonne croissance sur le milieu ISP9 contenant l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie, les souches A5, A+ et G9 présentent une croissance modérée, et une faible croissance est observée pour les souches A8, G6 et G8 tandis que les souches G10 et G13 sont incapables d'utiliser l'Apyros comme **SSCE (tableau 13)**.

D'après les résultats obtenus, seules les souches (A1 et A12) ayant une bonne croissance sur le milieu de tolérance, sont capables d'utiliser l'herbicide Apyros comme seule source de carbone et d'énergie.

4. Etude, *in vitro*, de la cinétique de dégradation de l'herbicide Apyros par les souches actinomycètes actives

Dans nos conditions expérimentales, le standard de l'herbicide étudié (Sulfosulfuron 75%) a un temps de rétention qui correspond à 1.9 min (**Figure 7**).

Les résultats de l'analyse par chromatographie à haute performance en phase liquide, révèlent une dégradation progressive du produit au cours du temps : après 5 jours d'incubation, la concentration du Sulfosulfuron, varie de 75 mg/l à 2,43 mg/l pour la

Tableau 14: Diminution des aires des pics du Sulfosulfuron en fonction du temps

| | Standard | Après 5 jours (31/05/2015) | Après 10 jours (04/06/2015) | Après 15 jours (09/06/2015) |
|------------|----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| A1 | 91,16% | 3,25% | 2,80% | 1,63% |
| A12 | | 3,73% | 1,63% | 0,81% |

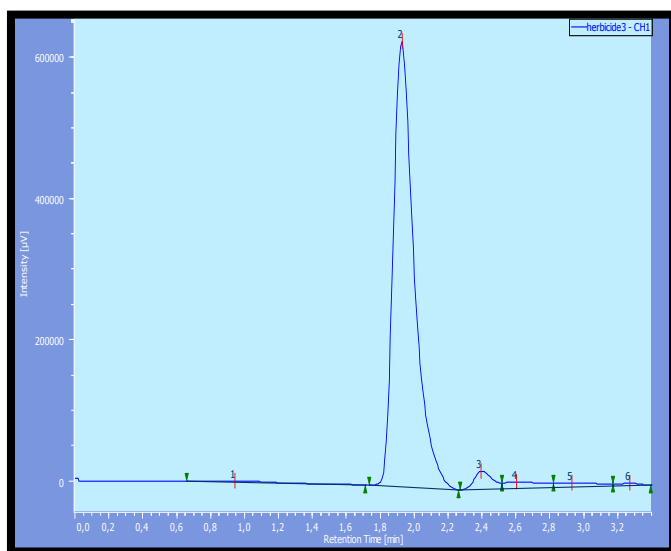


Figure 7 : Chromatogramme du standard de l'herbicide Apyros (100mg/l), la molécule active sulfosulfuron correspond au pic N°2 (aire =91.16%, Rt=1.90).

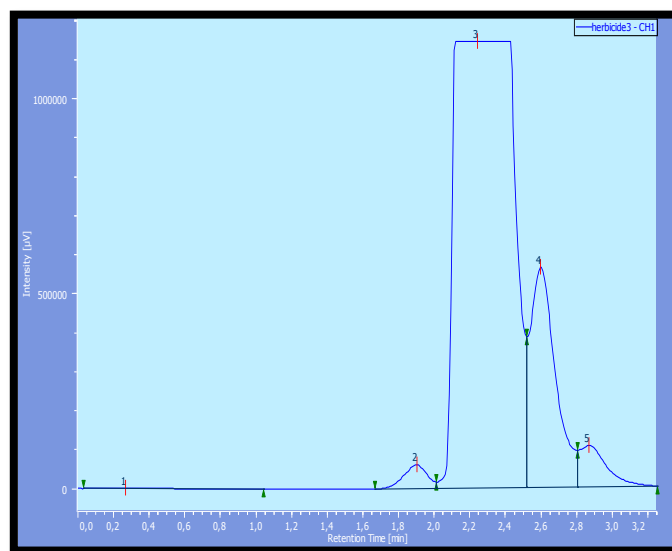


Figure 8 : chromatogramme montrant la dégradation de la molécule active sulfosulfuron (pic N°2) par la souche A1 après 15 jours (aire=1.63%) et la production des métabolites (pics N° 3, 4, 5).

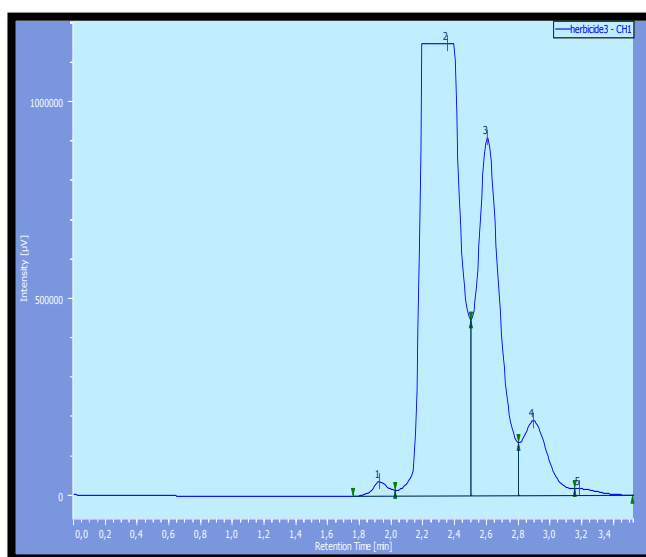


Figure 9 : chromatogramme montrant la dégradation de la molécule active sulfosulfuron (pic N°1) par la souche A12 après 15 jours (aire=0,811%) et la production des métabolites (pics N° 2, 3, 4, 5).

souche A1 et à 2,79 mg/l pour la souche A12. À partir du 5^{ème} jour, les taux de diminution devient faibles, jusqu'au 15^{ème} jour où la concentration du sulfosulfuron atteint une valeur de 1,22 mg/l pour A1 (**Figure 8**) et 0,60 mg/l pour A12 (**Figure 9**).

Plusieurs genres et espèces de la famille des actinomycètes sont impliqués dans la biodégradation des xénobiotiques, parmi eux les herbicides :

Triazine et Simazine (**Shelton et al., 1996**), Alachlor (**Lara et al., 2005**), Fenoxaprop-ethyl (**Ying et al., 2011**).

Romesser et al. (1986) révèlent, que *Streptomyces griseolus* métabolisent plusieurs herbicides de la famille sulfonylurée, via l'hydrolyse de group phenyl, ainsi que **Minghua et al. (2011)** qui ont étudié la capacité d'un actinomycète appartenant au genre *Rhodococcus* à dégrader un herbicide sulfonyluré qui est le bensulfuron-methyl

L'analyse par chromatographie à haute performance en phase liquide a permis aussi de détecter plusieurs pics, dont les temps de rétention sont différents à celui du sulfosulfuron (Rt= 1,90), ces pics correspondent aux métabolites qui résultent de la dégradation de l'herbicide étudié (**Figure 8 ; 9**).

L'augmentation des aires des pics de ces métabolites est proportionnelle à la diminution de l'aire de pic du sulfosulfuron, selon **Chandran et al. (2013)**, le métabolite majeur du sulfosulfuron est L'aminopyrimidine.

Des résultats similaires sont obtenus lors d'une étude de la biodégradation de deux herbicides qui appartient à la famille des sulfonylurées (chlorsulfuron et metsulfuron), réalisée par **Boschin et al. (2003)**, où deux métabolites microbiens sont produits par le clivage du pont des sulfonylurées. Ces métabolites sont identifiés par une comparaison avec leurs standards.

La diminution de la concentration du sulfosulfuron s'accompagne avec une augmentation de l'absorbance microbienne de 0,03 pour les deux souches dans le jour 0, puis varie, pour la souche A12 de 0,142 dans le 5^{ème} jour jusqu'à 0,302 dans le 15^{ème} jour (**figure11**). Pour la souche A1, l'absorbance décroît de 0,074 à 0,057 dans une période des premiers 5 jours, mais augmente une autre fois pour atteindre la valeur de 0,069 dans le 15^{ème} jour (**figure 10**). Ce décroissement est du, peut-être à une erreur technique, car les

Tableau 15: Diminution de la concentration du Sulfosulfuron (mg/L) en fonction du temps

| | Standard | Après 5 jours (31/05/2015) | Après 10 jours (04/06/2015) | Après 15 jours (09/06/2015) |
|-----|----------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| A1 | 75 | 2,43 | 2,1 | 1,22 |
| A12 | | 2,79 | 1,22 | 0,6 |

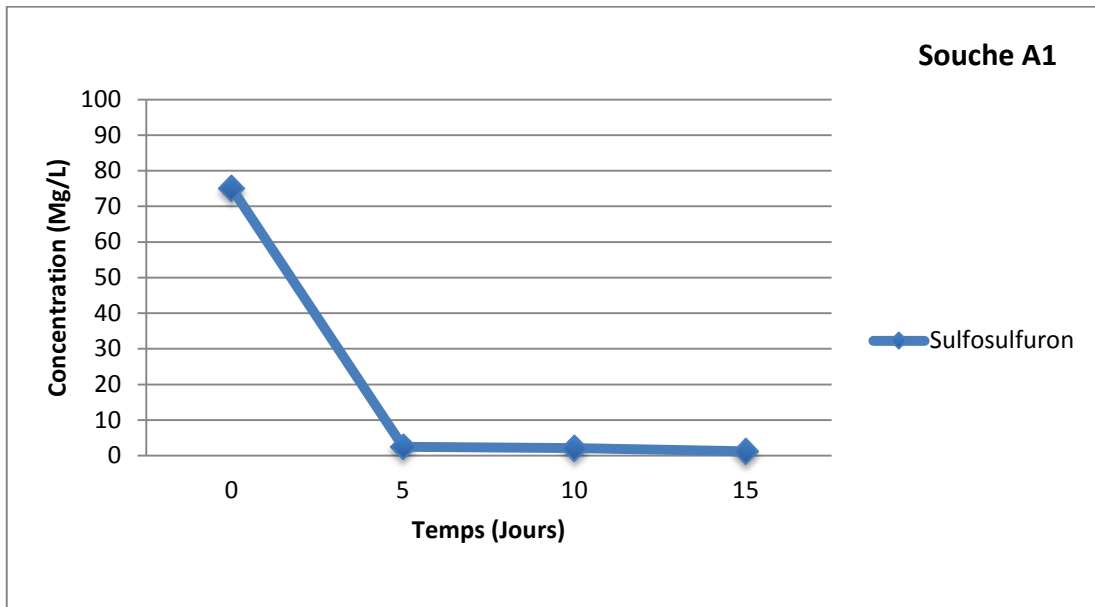


Figure 10 : Cinétique de dégradation du Sulfosulfuron par la souche A1

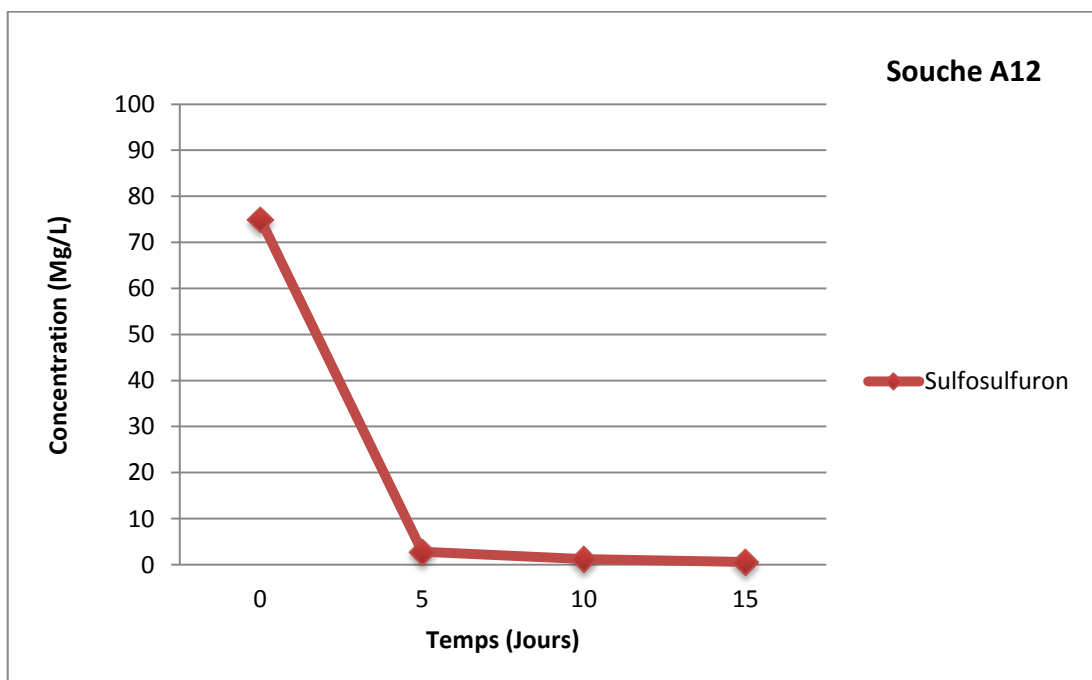


Figure 11 : Cinétique de dégradation du Sulfosulfuron par la souche A12

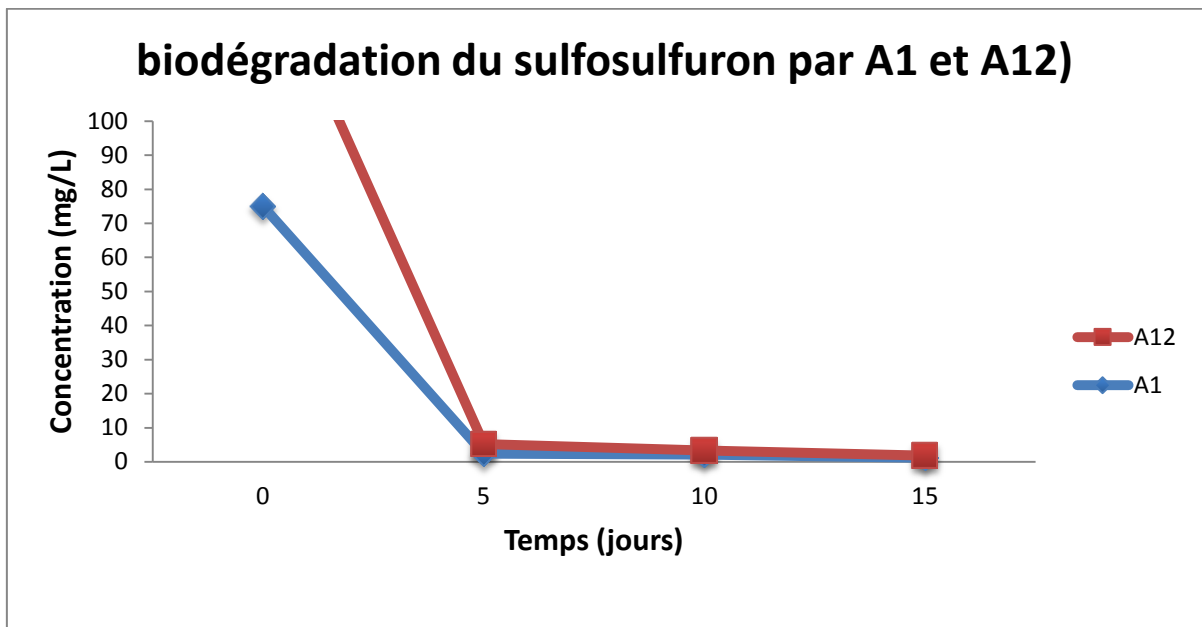


Figure 12 : Comparaison de la biodégradation du Sulfosulfuron par A1 et A12

Tableau 16 : Absorbance des souches A1 et A12 en fonction du temps

| | Jour 0 | Après 5 jrs (31/05) | Après 10 jrs (4/06) | Après 15 jrs (9/06) |
|------------|--------|------------------------|------------------------|------------------------|
| A1 | 0,03 | 0,074 | 0,057 | 0,069 |
| A12 | | 0,142 | 0,160 | 0,302 |

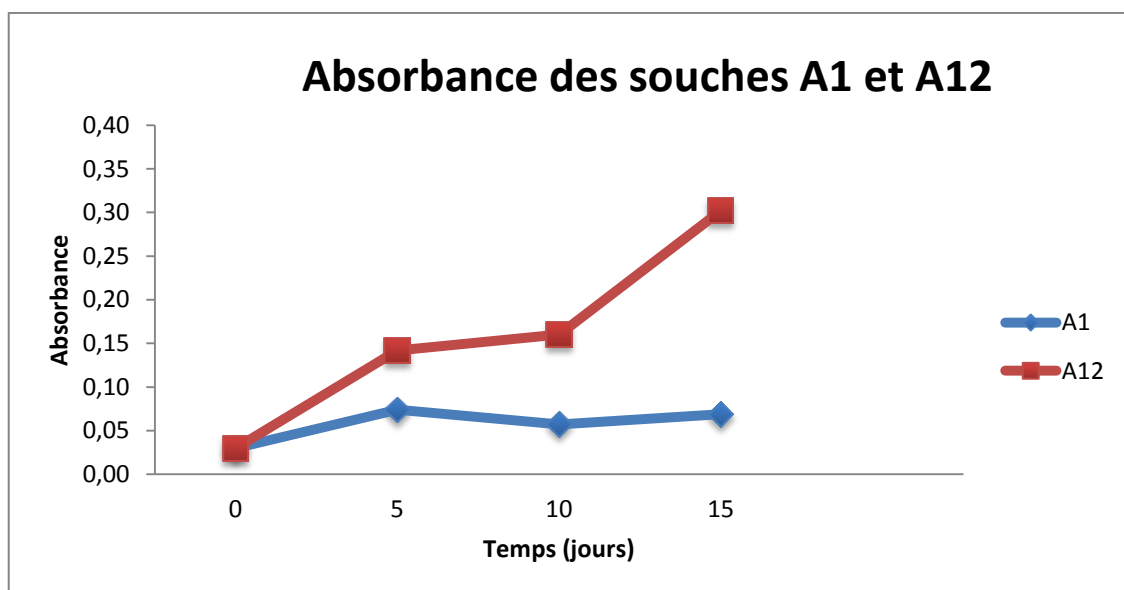


Figure 13 : Comparaison de l'absorbance des souches A1 et A12 en fonction du temps

Tableau 17 : Caractères cultureux des souches (A1 et A12)

| | | ISP2 | ISP4 | ISP5 |
|----|-----------------------------------|---|---|--|
| A1 | Mycélium I^{aire} | Transparent | Transparent | Transparent |
| | Mycélium II^{aire} | Gris blanchâtre | Gris clair | Gris |
| | Masse sporale | Blanche | Blanchâtre | Blanchâtre |
| | Pigmentation | - | - | - |
| | Aspect de la colonie | Colonies bien incrustées dans la gélose, rondes, à bordure régulière, d'aspect poudreux | Colonies bien incrustées dans la gélose, rondes, à bordure régulière, légèrement bombées, d'aspect cotonneux. | Colonies bien incrustées dans la gélose, rondes, à bordure régulière, légèrement bombées, d'aspect poudreux, lisses, de petites tailles par rapport à celle des colonies apparaissent sur le milieu ISP2 et ISP4 |
| | Croissance | +++ | +++ | ++ |

| | | ISP2 | ISP4 | ISP5 |
|-----|-----------------------------------|--|---|--|
| A12 | Mycélium I^{aire} | Jaune à marron | Rose | Beige |
| | Mycélium II^{aire} | Beige | Beige | Rose |
| | Masse sporale | Gris-Blanc | Blanche | Gris-blanc |
| | Pigmentation | - | Pigmentation non diffusible orangé | - |
| | Aspect de la colonie | Colonies bien incrustées dans la gélose, rondes, à bordure régulière, surélevées en pic, d'aspect poudreux | Colonies bien incrustées dans la gélose, rondes, à bordure régulière, surélevées en pic, d'aspect cotonneux | Colonies bien incrustées dans la gélose, rondes, à bordure régulière, surélevées en pic, d'aspect poudreux |
| | Croissance | ++ | ++ | + |

(+++): Bonne croissance, (++): Croissance modérée, (-): Croissance faible

mesures de l'absorbance de chaque prélèvement sont réalisées avec des spectrophomètres différents.

L'augmentation de l'absorbance est due à une augmentation de la croissance microbienne dans le milieu, qui n'est pas le cas dans le contrôle sans herbicide où la densité optique est en diminution progressive, ce qui indique que les deux souches (A1 et A12), utilisent le sulfosulfuron comme seule source de carbone et d'énergie pour leur croissance,

Il est remarquable qu'à partir du 5^{ème} jour, le taux de dégradation du sulfosulfuron par la souche A12 est plus grand que celui de la souche A1 (**figure 12**). La même remarque pour les valeurs de l'absorbance d'A12 qui sont plus grand que celui d'A1 (**figure 13**). Cela, signifie que la souche A12 est plus performante que la souche A1 pour la dégradation du sulfosulfuron, ainsi, elle peut être utilisée dans la bioremédiation des sols contaminé par cet herbicide.

5. Identification présumptive des souches actives d'actinomycètes

L'étude des caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques des souches d'actinomycètes est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes.

Les critères de détermination que nous avons utilisés sont essentiellement ceux de la classification (Taxonomie Outline of the procaryotes, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2004).

5.1. Caractères cultureux

Après l'ensemencement des souches (A1 et A12) sur les milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5, des colonies d'actinomycètes incrustées dans la gélose, apparaissent au bout de 5 jours d'incubation à 28°C, leurs caractères cultureux sont rassemblés dans **le tableau 17**.

Les deux souches se développent sur les milieux utilisés avec différents degrés de croissance allant d'une croissance faible à une croissance abondante, formant des colonies typiques des bactéries appartenant à la classe des actinomycètes (rondes et de contours réguliers).

A1



a

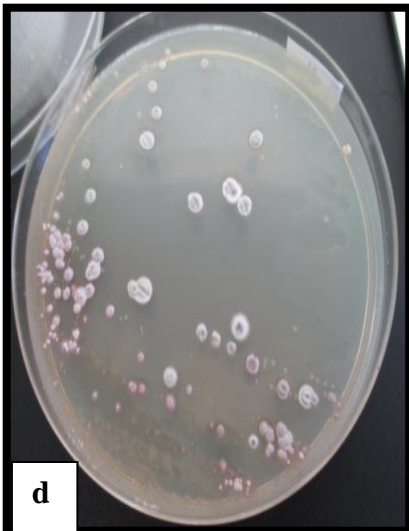


b



c

A12



d



e



f

Figure14: Caractères cultureux de la souche A1 et A12 sur les milieux ISP :

(a et d) : ISP5, (b et e) : ISP4, (c et f) : ISP2.

➤ Pour la souche A1

Sur le milieu ISP2, la surface des colonies est poudreuse. Après maturation, La souche développe une masse sporale de couleur blanchâtre, il n'y a pas production de pigments diffusibles.

A la surface du milieu ISP4, la souche A1 forme des colonies cotonneuses de couleur grise au centre et blanche aux bords. Il n'y a pas de production des pigments diffusibles.

A la surface du milieu ISP5, la souche A1 forme des colonies poudreuse, lisse, légèrement bombées, de petites tailles en comparaison avec celles qui apparaissent sur les milieux ISP2 et ISP4. Il n'y a pas de production des pigments diffusibles (**figure 14**).

➤ Pour la souche A12

Sur les trois milieux de culture ISP2, ISP4 et ISP5, la souche A12 forme des colonies bien incrustées dans la gélose et surélevées en pic.

Sur le milieu ISP2, les colonies sont poudreuses de couleur grise au centre, blanche aux bords, l'envers des colonies est jaune à marron. Il n'y a pas de production des pigments diffusibles.

Sur le milieu ISP4, les colonies sont de surface cotonneuse, après maturation elles forment une masse sporale de couleur blanchâtre. L'envers des colonies est de couleur rose. Il faut également noter la présence d'un pigment non diffusible de couleur jaune.

Sur le milieu ISP5, les colonies sont de surface poudreuse de couleur rose, donnent après maturation, une masse sporale de couleur grise blanchâtre, l'envers des colonies est de couleur beige. Il n'y a pas production de pigments diffusibles.

La croissance pour les deux souches actives débute par la formation d'un mycélium très ramifié et pâteux dans le milieu et aussi à la surface de la gélose, c'est le mycélium de substrat. Il est important de signaler l'importance de l'utilisation de plusieurs milieux de culture dans l'étude morphologique, puisque l'observation des chaînes de spores ne s'effectue que sur les milieux donnant une bonne croissance (maturation complète) (**figure 14**) (Aouar, 2006).

Tableau 18 : Aspect microscopiques des souches actinomycètes active.

| Les souches | MS | | MA | | |
|-------------|---------------|-------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------|
| | Fragmentation | Sporulation | Forme de chaînes de spores | Longueur de chaînes de spores | Forme de la spore |
| A1 | Non fragmenté | Non sporulé | Spirale | >20 | Ovale |
| A12 | Non fragmenté | Non sporulé | Rectiflexible | >20 | Ovale |

MS : Mycélium de substrat ; **MA** : Mycélium aérien.

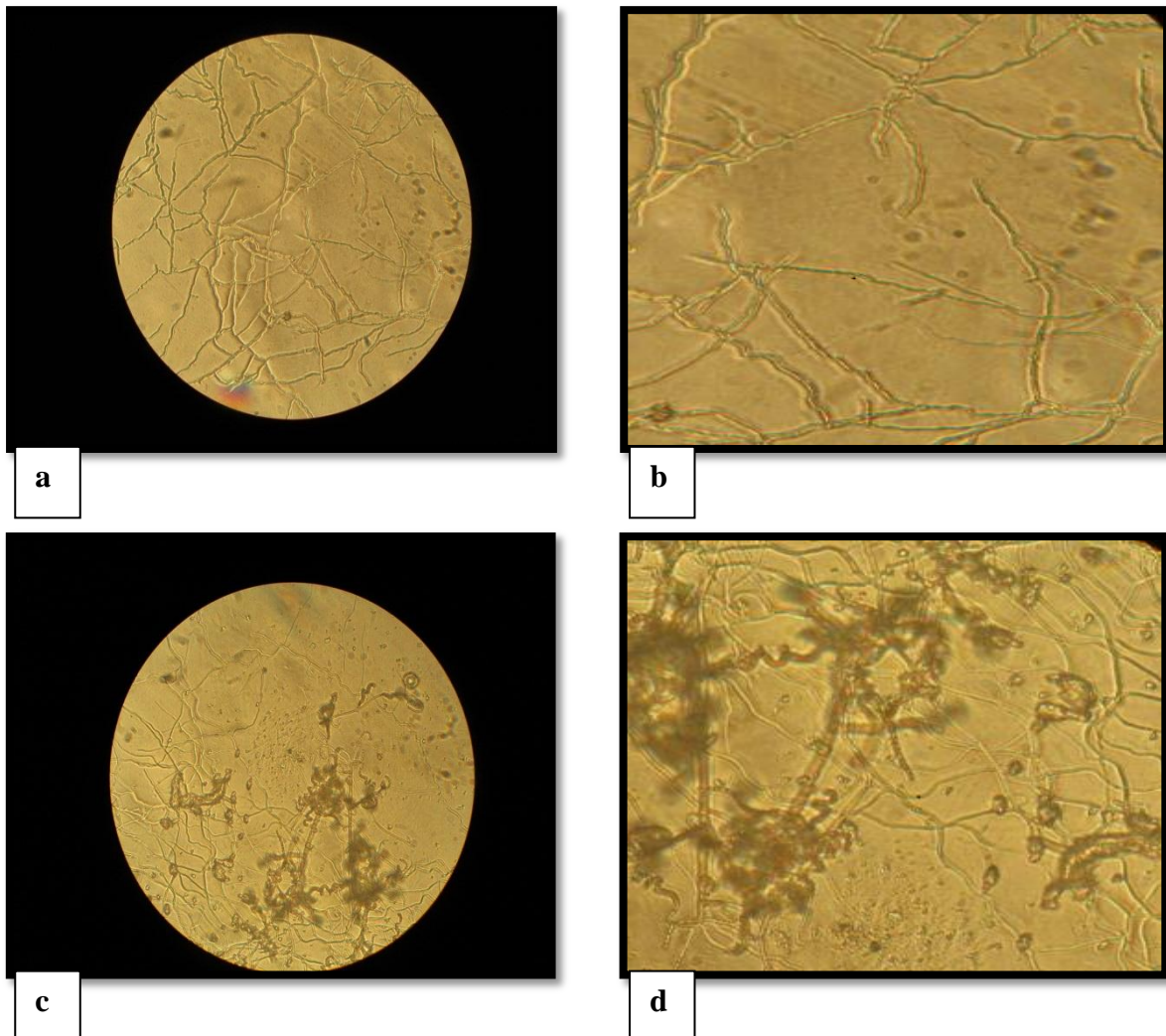


Figure 15: Aspect microscopique de la souche A1 (G×100).
(a et b) : Mycélium du substrat; (c et d) : Mycélium aérien et masse sporale.

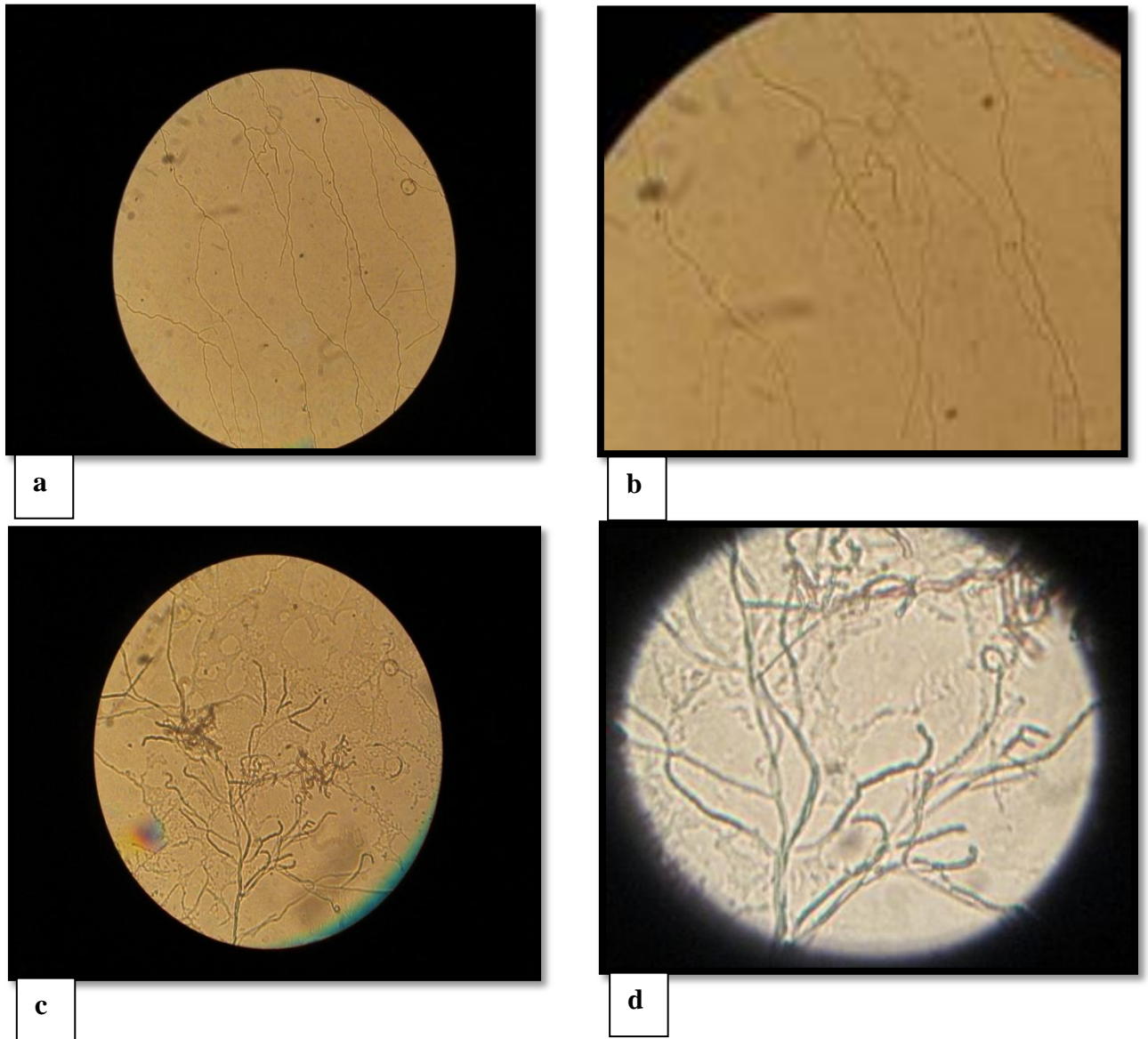


Figure 16: Aspect microscopique de la souche A12 (G×100).

(a et b) : Mycelium du substrat ; (c et d) : Mycelium aérien avec la chaîne sporale.

Plusieurs auteurs ont pu déterminer les genres des actinomycètes à partir des caractéristiques morphologiques comme **Zaitlin *et al.* (2003)** dont les travaux ont permis d'identifier le genre par simple observation microscopiques d'une souche actinomycétales par observation des chaines de spores au microscope optique (**Balagurunathan *et al.*, 1996**).

5.2. Identification microscopique

La technique de la culture sur lamelle oblique permet de caractériser les actinomycètes par leurs aspects morphologiques du mycélium aérien et celui du substrat. Après 7 jours d'incubation, les lamelle sont retirées de la gélose et déposées sur une lame puis observées au microscope optique (**G×100**). Les résultats sont représentés dans **le tableau 18**.

➤ Pour la souche A1

Les hyphes du mycélium végétatif sont fins, très ramifiés, non fragmentés, non sporulés. Il se développe en surface et pénètre dans la gélose, pour ensuite donnant naissance à un mycélium aérien long, fin et très ramifié, il porte de longue chaîne de spores plus de 20 spores par chaîne. Les chaînes de spores sont formées par fragmentation du mycélium aérien, elles sont en doubles spires, ces caractères permet de rapprocher cette souche au genre *Streptomyces* (**figure15**).

➤ Pour la souche A12

L'observation microscopique du mycélium de substrat de la souche A12 montre des filaments très fins, très ramifiés, et non fragmentés. Le mycélium aérien est très ramifié et porte de longues chaînes de spores. Les chaînes de spores se forme par septation du mycélium aérien, et sont de forme crochet, ces caractères permet de rapprocher cette souche au genre *Actinomadura* (**figure16**).

5.3. Identification biochimique

Les résultats des différents caractères physiologique est biochimiques des souches actives A1 et A12 sont réunis dans **le tableau 19**.

Tableau 19 : Caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches (A1 et A12).

| Caractéristiques | Souches | |
|--|---------|-----|
| | A1 | A12 |
| Utilisation des glucides | | |
| Arabinose | + | + |
| Inositol | + | + |
| Fructose | + | + |
| Maltose | + | + |
| Xylose | + | + |
| Galactose | + | + |
| Glucose | + | + |
| Lactose | + | + |
| Utilisation du Citrate | - | + |
| Activité de dégradation | | |
| Amidon | + | + |
| caséine | - | - |
| gélatine | - | - |
| Urée | + | - |
| Réduction des nitrates | + | + |
| Production de l'indole | - | - |
| Production de l'H₂S | - | - |
| Production de pigments mélanoides | | |
| milieu ISP 6 | + | - |
| milieu ISP 7 | - | - |
| Action sur le lait écrémé | | |
| Coagulation | - | - |
| Peptonisation | - | - |

(-): Absence , (+): Présence

Les 2 souches A1 et A12 cultivées sur le milieu ISP9, se développent sur les différentes sources de carbone étudiées, à l'exception du citrate, dont la souche A1 est incapable de l'utiliser comme seule source de carbone.

L'étude des activités de dégradation montre que les deux souches A1 et A12 ne dégradent que l'amidon. L'urée est dégradée seulement par la souche A1, le lait écrémé ne présente aucune coagulation ou peptonisation et les deux souches, ne produisent pas d'indole ou d' H_2S , mais elles réduisent les nitrates en nitrites, la dégradation de la gélatine est de la caséine n'est pas marquée pour les deux souches testées (A1 et A12).

La production des pigments mélanoïdes diffusibles est observée sur le milieu ISP6 pour la souche A1 mais pas sur le milieu ISP7, contrairement à la souche A12, dont leur production est absente dans les deux milieux de culture ISP6 et ISP7.

L'étude biochimique et physiologique, comme l'utilisation de différents sources de carbone, la production de mélanine et la dégradation de l'urée, de l'amidon, de la caséine et de la gélatine, est une étape cruciale pour arriver à une classification au niveau de l'espèce (**Shirling et Gottlieb, 1966; Lechevalier, 1968**). **Goodfellow (1971)** fut l'un des premiers chercheurs à avoir appliqué cette analyse aux actinomycètes. Les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus sur le genre *Streptomyces*. En effet, nombre d'espèces de ce genre, qui a été de 463 a été réduit à 142 (**Pridham et Tresner, 1974 ; Williams et al., 1989**).

Une étude d'identification morphologique, biochimique et moléculaire des souches d'actinomycètes tolérantes aux Silinium est réalisée par **El-Meleigy et al. (2011)** a montré que les caractères physiologiques et biochimiques d'une des souches identifiée (*Streptomyces variabilis*), sont similaires à ceux de souches (A1 et A12), comme : la réduction des nitrates en nitrites et l'absence des pigments mélanoïdes sur l'ISP6 et ISP7 pour la souche A12. La présence des pigments mélanoïdes est notée sur l'ISP6 pour la souche *Streptomyces fradiae*, qu'est le même cas de la souche A1.

Conclusion

Conclusion

Notre travail est basé sur trois objectifs principaux, le premier est l'isolement des souches d'actinomycètes à partir d'un sol agricole traité par l'herbicide Apyros (Sulfosulfuron) et tester leur capacité de le tolérer et le dégrader, le second objectif est la caractérisation morphologique et biochimique des souches actives, le troisième objectif est l'étude de la cinétique de biodégradation de cet herbicide.

De ce fait, un échantillon du sol agricole traité par l'herbicide Apyros est prélevé de la région de Ain-Karma – Constantine. Le milieu d'isolement utilisé dans cette recherche est l'Amidon-Caséine modifié additionné d'Apyros à la dose recommandée et d'antibiotiques, ainsi 18 souches d'actinomycètes ont été isolées et purifiées par nous-même et 50 souches fournies par Mme Zermane. La tolérance des souches vis-à-vis à l'Apyros à forte concentration (1g/l) a été déterminé, seule 10 souches présentent une bonne tolérance à cet herbicide.

La mise en évidence de la biodégradation de l'Apyros par les souches tolérantes est effectuée sur le milieu de base ISP9 gélosé contenant l'Apyros à la dose recommandé (0,1g/l) comme seule source de carbone et d'énergie, ainsi, deux 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.

Les deux souches 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 ISP9 liquide additionné de l'Apyros (0,1g/l). Le suivi de la dégradation de cet herbicide est réalisé par analyse par chromatographie liquide à haute performance (HPLC), 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.

L'étude de quelques caractères macroscopiques et microscopique, biochimiques et physiologiques, permet de rapprocher les deux souches actives aux genres *Streptomyces* et *Actinomadura*.

Perspectives

- Confirmer l'identification du genre notamment par la chimiotaxonomie et pousser l'identification des souches étudiées jusqu'à au niveau de l'espèce par les techniques de biologie moléculaire.
- Identification des résidus et métabolites de biodégradation de cet herbicide.
- L'utilisation des souches actives en biotechnologie (dépollution biologique des sols contaminés par l'Apyros).

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

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

Alexander, M., (1994). Biodégradation and Bioremediation. Academic Press, New York (USA).

Alloway B.J., (1995). Themobilisation of trace éléments in soils. proceedings of contaminated soils, 3rd International conference on biogeochemistry of trace elements, Paris ,France ,15-19May1995.les colloques ,n 85,INRA : Paris, **p. 133-145.**

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

Anjana Srivastava, Vikas Agarwal, P.C. Srivastava, S.k. Guru & Govindra Singh, (2006). Leaching of sulfosulfuron from two texturally different soils under saturated moister regime. Journal of food, Agriculture & environnement, **Vol. 4, 2: 287-290.**

Aouar L. (2006). Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturales des souches isolées et purifiées .Thèse de magistère.Faculté des Sciences .Université Mentouri Constantine .Algérie. **P. 65.**

Assink, J. W. and W. J. Van den Brink, (1986). Contaminated soil. In: J. W. Assink and W. J. Van den Brink (Eds.), 1st Int. TNO Conf. on contaminated soil, Martinus, Nijhoff ,Dordrecht, Utrecht, the Netherlands.

Association de Coordination Technique Agricole, (2002).Pesticides et protection phytosanitaire dans une agriculture en mouvement. Paris codex, Paris. **P.976.**

Aubertot J.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.**

Balagurunathan R., Xu L. & Jiang C., (1996). Diversity of Actinomycetes from south India and south China. *Actinomycetes*. **4(3),89-94.**

Baldi I., Sylvaine, C. Xavier, C. Alexis, E. Laurence, G. Pierre, L. Luc, M. Roger, R. Johan, S. & Genevieve, V., (2013). Pesticides effets sur la santé. Genevieve Van Maele-Fabry, Centre d'expertise collective de l'Inserm, Faculte de medecine Xavier Bichat, Paris, france, **P. 1.**

Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Calvet R., Charnay M.P. & Coquet Y., (2005). Le devenir des pesticides dans le sol et les risques de pollution de l'environnement .In : Les pesticides dans le sol : Conséquences agronomiques et environnementales. Edition France agricole, paris. **481.**

Benimeli C. S., Amoroso M. J., Chaile A. P., Castro G. R., (2003). Isolation of four aquatic *Streptomyces* strains capable of growth on organochlorine pesticides. *Biores Technol.* **89, 133-138.**

Bergey's Manual, (2004). Systematic of bacteriology, Taxonomic outline of the prokaryotes. Second edition. Garrity. G.M; Bell. J. A; Lilburn.T.G, Springer, New York Berlin Heidelberg.

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.

Beyert 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.**

Boughachiche, F., S. Reghioua, L. Oulmi, H. Zirezer, M. Kitouni, A. Boudemagh & A. Boulahrouf, (2005). Isolement d'actinomycètes productrices de substances antibactériennes à partir de la sebkhah de Ain Mlila. *Scienc. Techno.* **23: 5-10.**

Breton A., Theilleux J., Sanglier J. J. & Vobis G., (1989). Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In biotechnologie des antibiotiques. Larpent J. P. et Sanglier J. J. Masson, Paris. **P. 32-70.**

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, **Vol 10, 48**

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

Calvet R., Barriuso E., Bedos C., Benoit P., Charnay M. P. & Coquet Y., (2005). Les pesticides dans le sol, conséquences agronomiques et environnementales. Edition France Agricole. **P. 255, 257, 272, 489, 491.**

Camille Delarras, (2007). Microbiologie pratique pour laboratoire : d'analyse ou de contrôle sanitaire. Edition Tech & Doc. Lavoisier, Paris. **P. 476.**

Chandran L. & Atmakuru R., (2014). Research and reviews. Journal of ecology and environmental sciences. Vol.2(1).

Collins M. D., Goodfellow M., Minnikin D. E. & Alderson G., (1985). Menaquinone composition of mycolic acid containing actinomycetes and some sporoactinomycetes. Journal of applied bacteriology, **Vol 58 (1): 77-86.**

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

Crosclaude G. C., (1999). L'eau, Tome II, usage et polluants, institut national de la recherche agronomique. Paris. France. **P. 210.**

Davet, P., (1996). Vie microbienne du sol et production végétal. INRA. (ed.), Paris.

Delabays, G. MermillodetBohren C., (2006). First case of resistance to sulfonylurea herbicides reported in Switzerland: a biotype of loose silky-bent (*Aperaspicaveni* (L.) Beauv.) .Journal of Plant Diseases and Protection, **89-94**.

Deville J., R. Farret, P. Girardin, J.-L. Rivière, G. Soulas, (2005). Indicateurs pour évaluer les risques liés à l'utilisation des pesticides. Edition Tech & Doc, Londres, Paris, New York. **P. 11**.

Document d'aide technique pour les normes directives et objectif associés à la qualité de l'eau potable en Ontario.(2003). Ontario. Canada. **P. 15-20**.

Dommergues Y., et Mangenot F., (1970). Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.), Paris.

Edelahi D. M. C., (2004). Contribution à l'étude de dégradation un 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, p. 22-25**.

Edwards C., (1993). Isolation properties and potential application of thermophilic actinomycetes. Appl Biochem. Biotechnol, **42(2), 161-179**.

El Azzouzi, E., (2013). Processus Physico-chimiques d'Elimination des pesticides dans l'environnement : Cas de l'Imazéthapyr.thèse de doctorant.Université de Mohammed V – AGDAL (Rabat-Maroc).**P. 16-18**.

El-Meleigy, M. A., Mokhtar, M. M., Mohamed, H.F., Salem & M. S., (2011). Morphological, biochemical and sequence based identification of some selenium tolerant Actinomycetes. New York science journal, **4: 8**.

El-Nakeeb, M. & H. Lechevalier, (1962). Isolation of aerobic actinomycetes. Appl. Microbiol. **11: 75-77**.

Elwan S.H., Dab A. and Al-Gounaim Y., (1985). Ecology of the *Streptomyces* flora in the desert soil of Kuwait. Syst. Appl. Microbiol., **6, 99-104**.

Fdil F., (2004). Etude de la biodégradation des herbicide chlorophenoxyalcanoïques par des procédés photochimique et électrochimiques, applications environnementales. Thèse de Doctorat Université de Marne-La-Vallée (France). Chapitre1, **p. 8-25.**

Fenske R. A., Kedan G., Luc, Fisker Andersen J.A., Curl C. L., (2002). Assessment of organophosphorus pesticide exposures in the diets of preschool children in Washington State. *J. Exposure analysis environ. Epidermal*, p. **21-28.**

Gafsi I., (2008). Contribution à l'étude d'impact des polluants atmosphériques d'origine industriel par le réseau Sama Safia sue les asmathiques, cas station d'El Bouni. Mémoire de fin d'étude.

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

Gilli E., Mangan C. & Mudry J., (2004). Hydrogeologie : objects, Méthodes et application. Edition Dunod. Paris. **P. 19- 125.**

Giraud J. Galzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires, Collection Génie alimentaire, Edition de l'Usine, **P. 240.**

Giroux I., (2004). La présence de pesticides dans l'eau en milieu agricole au Québec. Québec, ministère de l'Environnement du Québec. **40.**

Goodfellow & Williams, (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann revmicrobiol.vol 37 : 189-216.*

Goodfellow M., (1971). Numerical taxonomy of somenocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol. 69 : 33-90*

Goodfellow M., Cross T., (1984). Classification. In: biology of the actinomycetes. Goodfellow M., Mordarski M. & Williams S. T. (Eds.), London: Acad. Press: 7- 164.

Goodfellow M., Mordarski M. & Williams S. T., (1988). Actinomycetes in biotechnology. London.

Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M., (1984). Introduction to and importance of the actinomycetes. In: « The biology of the actinomycetes », Goodfellow M., Williams S. and Mordarski M. (Eds.). London: Academic Press, p. 1-6.

Goodfellow, M. & A. G. O'Donnell, (1989). Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. Proceeding of the 44th Symposium on Society for General Microbiology, (SCGM'89).Cambridge University Press, Cambridge. 343-383.

Gordon, R.E., Barnett, D.A., Handarhan, J.E., Pang & C.H.N., (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strains. Int. J. Syst. Bacteriol. 24: 54–63.

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

Guy Soulas, (2004). La biodégradation des pesticides : caractéristiques et conséquences en matière de gestion et de bioremédiation. Académie d'Agriculture de France, France. P. 1.

Hagedorn, C., (1976). Influences of soil activity on *Streptomyces* population inhabiting forest soils. Appl. Environ. Microbiol. 32 : 868-375.

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

Hayakawa, M., (2008). Studies on the isolation of rare actinomycetes in soil. Actinomycetol. 22: 12-19.

Holzapfel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K-D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P. S., Teniola D., Addo P., (2002). Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone .PCT Int. Appl., p. 19.

Isenring R., (2010). Les pesticides et la perte de la biodiversité. Pesticide Action Network Europe. 5-8.

Ishizawa S. and Araragi M., (1976). Composition of actinomycetes population in soil. *In: Actinomycetes, the boundary microorganisms.* Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, **97-107.**

Isik k., Chun J., Hah Y.C. and Goodfellow M., (1999). *Nocardiasalmocida*: a fish pathogen. *Inter .J. Syst. Bacteriol.* **49 :833-837.**

Jakimowicz D., (2007). Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of *Streptomyces*. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **61: 565-575.**

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.

kaufmann k., (2004). Assessment of microbial community changes and limiting factors during bioremediation of hydrocarbon-polluted soil with new miniaturized physiological methods. *Ecol polytechnique fédérale de Lausanne (France).*

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.* **Vol. 24, 1 et 2.**

Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater M. F. & Hopwood D. A., (2000). *Practical Streptomyces Genetic.* John Innes Foundation. Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7 UH, England.

Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., & Goodfellow M., (2004). Taxonomic study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil. *Land description of Streptomyces yeochonensis sp. nov.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,* **54, 211-214.**

Kitouni M., (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaires des souches actives et caractérisation préliminaires des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine (Algérie). **P. 100, 118.**

Küster E. & S. T. Williams., (1964). Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature, London.* **202: 928.**

Lacey J., (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser., **2**, 231-51.

Laperto M., (2006). A strategy for xenobiotic removal using Photocatalytic treatment, microbial degradation or integrated photocatalytic-biological process. Ecole polytechnique fédérale de lausanne (France).

Lara D. Sette, Valéria M. de Oliveira & Gilson P. Manfio, (2005). Isolation and characterization of alchlor-degrading actinomycètes from soil. *Tonie van Leeuwenhoek*. **87** : 81-89.

Larpent J.P. et Sanglier J.J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481.

Lechevalier H.A., Lechevalier M.P. (1967). Biology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **21**: 71-100.

Lechevalier M. P., (1988). Actinomycetes in agriculture and forestry. In "Actinomycetes in Biotechnology". Goodfellow M. G., Williams S. T. and Modarski M. Ed, Academic Press London, New-York. **327-358**.

Lechevalier M.P. & Lechevalier H. A., (1980). Chémical composition as a criterion classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. syst. Bacteriol.* **Vol 20** : 435-443.

Lechevalier M.P., (1968). Identification of aerobic actinomycetes of clinical importance. *J. Lab. Clin. Med.*, **p. 71: 934-944**.

Lechevalier M.P., (1981). Ecological associations involving *Actinomycetes*. In: *Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. suppl.*, **11**, 159-166.

Lemercier B., (2003). La pollution par les matières phosphorées en Bretagne. Sources, transfert et moyennes de lutte. Direction régional de l'environnement, Bretagne. **P. 85**.

Liu Z., Shi Y., Zhang Y., Zhou Z., Lu Z., Li W., Huang Y., Rodriguez C. & Goodfellow M., (2008). Classification of *Streptomyces griseus* (Krainsky, 1914) Waksman and Henrici (1948) and related species and the transfer of « *Microstreptosporacinerea* » to

the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp. nov. Int. J. Syst.Evol. Microbiol, **55:1605-16100**.

Lucas N., Bienaime C., Belloy C., Queneudec M., Silvestre F. & Nava-Saucedo J. E., (2008). Polymer biodegradation : Mechanisms and estimation Techniques .chemosphere ,**73 :429-442**.

Maier, R. M., I. L. Pepper & C. P. Gerba., (2000). Environmental microbiology.Microorganisms in surface soils.In: Acadimic press. A Harcourt science and technology company. Canada, p.**79-82**.

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

Margni M., Rossier D., Crettaz P. & Jolliet O., (2002). Life cycle impact assesment of, pesticides on human health and ecosystems. Agriculture, Ecosystems & Environment. **93 (1-3): 379-392**.

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**.

Metatla I. et Touati M., (2013). Contribution à l'étude de certaines aptitudes de biodégradation des bactéries actinomycétales provenant des boues activées de la station d'épuration IBN-Ziad de Constantine. Mémoire de fin d'étude. Université Constantine. **P.63**.

Mincer, T. L., P. R. Jensen, C. A. Kauffman & W. Fenical, (2002). Wide spread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. App. Environ. Microbiol. **68: 5005-5011**.

MinghuaXiong, Chunyan Li, Junbo Pan, Xia Osong Cheng & Chuanwu Xi, (2011). Isolation and characterization of Rhodococcus Sp. BX2 capable of degrading bensulfuron methyl. African journal of microbiology research, vol.5 (**25**), **P.4296-4302**.

Mocheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S. & Bogatzevska N., (2002). Characteristics of actinomycetes from Antarctica. *J. Cult. Collect.* **3**, 3-14.

Mollier P., Chabriat G., (2010). Pour une agriculture compétitive plus économe en pesticides. *INRA magazine.* **12-35.**

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

Moussaoui K., Boussahel R., Tchoulak Y., Haouchine O., Benmami M. & Dalachi N., (2011). Utilisation, Evaluation et Impact des pesticides en Algérie. Laboratoire des Sciences et Techniques de l'environnement. Ecole national polytechnique.

Omura S., (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Ed: Springer Verlag: New York. Inc. 281-303. actinomycetes. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **42**: 161-179.

Oskay M., Tamer A. and Azeri C., (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol.*, **3(9)**, 441–446.

Ottow, J. C. G. & H. Glathe, (1968). Rose Bengal- malt extract- agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* **16, 1**: 170-171.

Ouhdouch Y., Barakate M. & Finance C., (2001). Actinomycetes of maroccan habitats : isolation and screening for antifungal activities .*Eur.j. Biol.* **37**: 69 -74.

Pochon J. & Tradieux P., (1962). Techniques d'analyses en microbiologie du sol .Edition de la tourelle, St Mandé.**p.110-111.**

Pridham T.G. & Gottlieb D., (1948). The utilization of carbon compounds by some, *actinomycetes* as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56** : 107-114.

Pridham T.G. & Tresner H. D., (1974). Family VII. *Streptomyetaceae* Waksman and Henrici . In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed., Buchanan R. E. and Gibbons N. E., the Williams and Wilkins Co., Baltimore, **p. 747-845.**

Pridham, T. G. Colour & streptomycetes, (1965). Report of an international workshop on determination of colour of *streptomycetes*. Appl. Microbiol. **13**: 43-61.

Romesser, J.A., O'Keefe, D.P., (1986). Induction of cytochrome P-450- dependent sulfonylurea metabolism in *Streptomyces griseolus*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **140**, 650–659.

Schiavon M., (1988). Studies of the movement and the formation of bound residues of atrazine, of its chlorinated derivatives, and of hydroxyatrazine in soil using ¹⁴C ring-labelled compounds under outdoor conditions. Ecotoxicol. Environ.Safety. **15**: 55-61.

Shirling E.B. & Gottlieb D., (1966). Methods of characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Sys. Bacteriol. **16 (3)**: 313-340.

Silini S., (2012). Contribution à l'étude de la biodégradation de la méthyléthylcétone en réacteur batch par les actinomycètes isolés à partir des boues activées de la station d'épuration d'EL Atmania. Thèse de Magistère. Faculté des Sciences. Université Mentouri Constantine. Algérie .**101**.

Singh BK, Kuhad RC, Singh A, Lal R & TriapthiK K., (1999). Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. Crit Rev Biotechnol, **19**: 197–225.

Smaoui S., (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, (France). **P. 251**.

Srivibool R. and Sukchotiratana M., (2006). Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. Song klanakaran J. Sci. Technol., **28**, 493-499

Suneetha V., Karthick Raj & Prathusha K., (2011). Isolation and identification of *Streptomyces* ST1 and ST2 strains from Tsunami affected soils: Morphological and biochemical studies. Journal of Oceanography and Marine Science, **Vol. 2 (4)**, pp. 96-101.

Suzuki K., Nagai K., Shimizu Y. and Suzuki Y., (1994). Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Actinomycetologica*, **8**, 122–127.

Suzuki, S. I., T. Okuda & S. Komatsubara, (2001). Selective isolation and study on global distribution of the genus *Planobisporain* soil. *Cana. J. Microbiol.* **47, 11: 979-986.**

Takizawa, M., R.R. Colwell & R.T. Hill, (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Applied Environ. Microbiol.*,**59: 997-1002.**

Tsiko I., (2007). Chracterisation of actinobacteria degrading and tolerating organic pollutants. Division of microbiol. department of applied chemistry and microbiology. Faculty of agriculture and forestry.University of Helsinki.

Van der Perk, M., (2006). Soil and water contamination, Taylor & Francis group plc. London,UK.

Williams D.H. & Fleming I., (1989). Spectroscopic methods in organic chemistry. Fourth Edition . McGraw Hill book company, London. **P. 264.**

Williams S. T. & Cross T., (1971).“Actinomycetes” In: Methods in microbiology. Booth C. Ed., Academic Press, London. **4, 295-343.**

Williams S.T. & Davies F.L. (1965). Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.* **38, 251-261.**

Williams, S. T. & Wellington E., (1982). Actinomycetes. *In* Methodes of soil analysis, Part 2. Chemical and Microbiological Properties. Agronomy monograph N°. 9 (Second Edition).Ed., A. L., ASA-SSSA.Madison. **P. 969-987.**

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, Jian Tao, WenjingShen, Juan Liu, Jingquan Li, Yongfeng Li, Hui Cao & Zhongli Cui, (2011). Isolation of the fenoxaprop-ethyl (FE)-degrading bacterium *Rhodococcus* sp. T1, and cloning of FE hydrolase gene feh. Jiangsu Agricultural Academy, Nanjing, China.**10.1111/j.1574-6968.**

Zaitlin B., Watson S.b., Ridal J., Satchwill T. & Parkinson D., (2003). Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res. J. Can.* **95 (2), 113-118.**

Zaki M.M., E.A. Saleh, A. Rahal & Sonya H. & Mohamed, (2012). *Streptomyces* species able to utilize some herbicides as nitrogen and carbon sources. *Pak. J. biotechnol.* **9(2): 57-70.**

Zimmerman W. (1990). Degradation of lignin by bacteria. *J. Biotechnol.* **13:** 129-130.

Site web N° 1: [www. L'environnement. Blogspot.com.](http://www.L'environnement.Blogspot.com)

Site web N°2: [www. Aci-algérie.com/ index.php/aci/content/pdf/472.](http://www.Aci-algérie.com/index.php/aci/content/pdf/472)

Annexes

Annexe 1

Milieux de culture

Milieu Amidon -Caséine Agar

Amidon soluble **10 g**

Caséine **1 g**

K₂HPO₄ **0,5 g**

Eau distillée **1000 ml**

Agar **20 g**

pH = **7 - 7,5**

Milieu ISP 1

Tryptone **5g**

Extrait de levure **3 g**

Eau distillé **1000ml**

PH=**7-7.1**

Milieu ISP 2

Extrait de levure **4 g**

Extrait de malt **10 g**

Glucose **4 g**

Eau distillée **1000 ml**

Agar **20 g**

pH = **7,3**

Milieu ISP 3

Solution d'avoine **1000ml(Annexe2)**

Solution d'oligo-éléments **1ml(Annexe2)**

Agar **20g**

pH = **7,2**

Milieu ISP 4

Amidon soluble **10 g**

K₂HPO₄1 g

MgSO₄ 7H₂O1 g

NaCl1 g

(NH₄)₂SO₄2 g

CaCO₃2 g

Solution d'oligo-éléments 1 ml (Voir Annexe N° 6)

Eau distillée 1000 ml

Agar 20 g

pH = 7,0 - 7,4

Milieu ISP 5

Glycérol 10 g

L-Asparagine1 g

Solution d'oligo-éléments 1 ml(Annexe 2)

Eau distillée 1000 ml

Agar20 g

pH = 7,0-7,4

Milieu ISP 6

Peptone 15 g

Proteose–Peptone5 g

Citrate de fer ammoniacal 0,5 g

Thiosulfate de sodium0,08 g

Extrait de levure 1 g

K₂HPO₄1 g

Eau distillée 1000 ml

Agar 20 g

pH = 7,0-7,2

Milieu ISP 7

Glycérol15 g

L-Tyrosine0,5 g

L-Asparagine1 g

K₂HPO₄0,5 g

MgSO₄ 7H₂O **0,8 g**

NaCl **0,5 g**

FeSO₄ 7H₂O **0,01 g**

Solution d'oligo-éléments **1 ml (Annexe 2)**

Eau distillée **1000 ml**

Agar **20 g**

pH = **7,2-7,4**

Milieu ISP9

(NH₄)₂SO₄ **2,64 g**

KH₂PO₄ **2,38 g**

K₂HPO₄ · 3H₂O **5,65 g**

MgSO₄ · 2H₂O **1 g**

Solution saline **21 ml (Annexe 2)**

Eau distillée **1000 ml**

pH = **6,8-7,0**

Milieu Mannitol Mobilité

Peptone **20 g**

Nitrate de potassium **1 g**

Mannitol **2 g**

Rouge de phénol **40 mg**

Eau distillée **1000 ml**

Agar **4 g**

Eau distillée **1000 ml**

pH = **8,1**

Milieu Citrate de Simmons

Citrate de sodium **1 g**

Chlorure de sodium **5 g**

Sulfate de magnésium **200 mg**

Dihydrogénophosphate d'ammonium **1 g**

Monohydrogénophosphate de potassium **1 g** Bleu de bromotymol **80 mg**

Agar **13 g**

Eau distillée **1000 ml**

PH=6,8

Milieu urée- indol

L-Tryptophane **3g**

Phosphate monopotassique **1g**

Chlorure de sodium **5g**

Urée **20g**

Rouge de phénol **0.025**

Alcool à 95° **0.01mL**

Eau distillée **1000 ml**

PH=6,7

Milieu TSI (Triple SugarIron Bio-Rad)

Extrait de viande **3g**

Extrait de levure **3g**

Peptone **20g**

Chlorure de sodium **5g**

Lactose **10g**

Saccharose **10g**

Glucose **1g**

Sulfate ferreux ammoniacal **300mg**

Rouge de phénol **24mg**

Thiosulfate sodium anhydre **300mg**

Agar **11g**

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.

Annexe 2

Solutions et colorants

Solution d'oligo – éléments.

FeSO₄ 7H₂O **0,1 g**

MnCl₂ 4H₂O **0,1 g**

ZnSO₄ 7H₂O **0,1 g**

Eau distillée **100 ml**

Solution saline 2

CuSO₄ 5H₂O **0,64 g**

FeSO₄ 7H₂O **0,11 g**

MnCl₂ 4H₂O **0,79 g**

ZnSO₄ 7H₂O **0,15 g**

Eau distillée **100ml**

Solution d'avoine

Grains d'avoine **20 g**

Eau distillée **1000 ml**

*Faire bouillir pendant 20 minutes, filtrer sur la gaze et réajuster le volume à 1000ml.

Eau distillée 100 ml

Violet de gentiane

Violet de gentiane 1g Ethanol **10ml**

Phénol**2g** Eau distillée**100ml**

Annexe 3



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

Résumé

A partir d'un sol agricole traité par l'herbicide Apyros (Sulfosulfuron), 68 souches d'actinomycètes sont isolées sur le milieu Amidon-Caséine modifié supplémenté par l'herbicide Apyros (Sulfosulfuron) à la dose recommandée (0,1g/l) et d'antibiotiques.

Les souches isolées sont testées pour leur capacité à tolérer ce même herbicide sur le milieu Amidon-Caséine modifié, supplémenté avec une forte concentration d'Apyros (10 fois plus grande que la dose recommandée (1g/l)). Seule 10 souches présentent une bonne tolérance à cet herbicide, les souches tolérantes sont ensuite tester pour leur capacité à utiliser ce même herbicide comme seule source de carbone et d'énergie, sur le milieu ISP9, les résultats montrent que deux souches seulement le sont.

L'étude de la cinétique de biodégradation du même herbicide par les 2 souches actives, est réalisée par analyse par chromatographie liquide à haute performance, les résultats montrent que les 2 souches sont capables de dégrader le sulfosulfuron, l'une des souches dégrade 98% de cet herbicide, l'autre dégrade jusqu'à 99% du même herbicide.

La diminution de la concentration du sulfosulfuron s'accompagne avec une augmentation de l'absorbance microbienne, ce qui indique que les deux souches utilisent le sulfosulfuron comme seule source de carbone et d'énergie pour leur croissance.

L'étude des caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopique), biochimiques et physiologiques, a permis de rapprocher les deux souches actives au genre *Streptomyces*.

Mot clés : actinomycètes, herbicide, Apyros, sulfosulfuron, tolérance, biodégradation.

Abstract:

From an agricultural soil treated by the herbicide Apyros (Sulfosulfuron), 68 strains of actinomycetes were isolated on the medium Amidon-Caseine modified, fortified by the herbicide Apyros (Sulfosulfuron) at the recommended dose (0.1 g/l) and antibiotics.

The isolated strains were tested for their ability to tolerate this same herbicide on the medium Amidon-Caseine modified, fortified with a high concentration of Apyros (10 times greater than the recommended dose (1g/l). Only 10 strains had a good tolerance to this herbicide, the tolerant strains were, then, tested for their ability to use this same herbicide as sole source of carbon and energy, on the medium ISP9, the results showed that two strains only were.

The study of the kinetics of biodegradation of the same herbicide by the 02 active strains was carried out by analysis using high-performance liquid chromatography (HPLC), the results showed that the 02 strains were capable of degrading the sulfosulfuron : one of them degraded 98% of this herbicide, the other one had an ability up to 99%.

The decrease of the concentration of sulfosulfuron was accompanied with an increase of the microbial absorbance, which indicated that the two strains were using the sulfosulfuron as sole source of carbon and energy for their growth.

The study of the morphological characteristics (macroscopic and microscopic), the biochemical and the physiological ones, allowed us to bring the two active strains in the genus *Streptomyces*.

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

ملخص :

تم عزل 68 أكتينومييسات من تربة زراعية معالجة مسبقا بمبيد الأعشاب الضارة " أبيضوس " , على وسط نشاء- كازيين مضاف إليه : هذا المبيد بتركيز (0,1 غال)(التركيز المعتمد) و المضادات الحيوية. السلالات المعزولة, تم إختبار مقاومتها لتركيز عالي من الأبيروس و ذلك على الوسط نشاء-كازيين مضاف إليه المبيد بتركيز (1 غال)(10 أضعاف التركيز المعتمد).

يظهر أن 10 من بين 68 أكتينومييسات, أعطت نمو جيدا على الوسط, فتم إختبار قدرتها على إستعمال الأبيروس كمصدر وحيد للكربون و الطاقة, و ذلك على وسط معدني خالي من كل مصدر للكربون عدا الأبيروس. أظهرت النتائج قدرة سلالتين فقط على إستعمال هذا الأخير كمصدر وحيد للكربون و الطاقة.

لدراسة حركية هدم الأبيروس مخبريا إختبرت السلالتين السابقتين. النتائج المتحصل عليها بتحليل الكروماتوغرافي عالي الكفاءة, تبين قدرة هاتين السلالتين على هدم من 98% (السلالة A1) إلى 99% (السلالة A12) من المادة الفعالة (سلفوسلفرون) و إستعمالها كمصدر غذائي لنموها.

الدراسات المورفولوجية و التحاليل الكيميوحيوية و الفيزيولوجية سمحت بتقريب نوع السلالتين إلى *Streptomyces*.

الكلمات المفتاحية: أكتينومييسات, مبيد الأعشاب الضارة, أبيضوس, سلفوسلفرون, المقاومة, الهدم .

| | |
|--|---|
| Nom et prénom : SACI Khaoula SAFANE Aziza | Date de la soutenance : 02/07/2015 |
| Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Microbiologie Spécialité : Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes | |
| Thème : Isolement des souches d'actinomycètes d'un sol agricole contaminé par l'herbicide Apyros et étude de leur capacité à le dégrader | |
| <p>Résumé :</p> <p>A partir d'un sol agricole traité par l'herbicide Apyros (Sulfosulfuron), 68 souches d'actinomycètes sont isolées sur le milieu Amidon-Caséine modifié supplémenté par l'herbicide Apyros (Sulfosulfuron) à la dose recommandée (0,1g/l) et d'antibiotiques.</p> <p>Les souches isolées sont testées pour leur capacité à tolérer ce même herbicide sur le milieu Amidon-Caséine modifié, supplémenté avec une forte concentration d'Apyros (10 fois plus grande que la dose recommandée (1g/l)). Seule 10 souches présentent une bonne tolérance à cet herbicide, les souches tolérantes sont ensuite tester pour leur capacité à utiliser ce même herbicide comme seule source de carbone et d'énergie, sur le milieu ISP9, les résultats montrent que deux souches seulement le sont.</p> <p>L'étude de la cinétique de biodégradation du même herbicide par les 2 souches actives, est réalisée par analyse par chromatographie liquide à haute performance, les résultats montrent que les 2 souches sont capables de dégrader le sulfosulfuron, l'une des souches dégrade 98% de cet herbicide, l'autre dégrade jusqu'à 99% du même herbicide.</p> <p>La diminution de la concentration du sulfosulfuron s'accompagne avec une augmentation de l'absorbance microbienne, ce qui indique que les deux souches utilisent le sulfosulfuron comme seule source de carbone et d'énergie pour leur croissance.</p> <p>L'étude des caractéristiques morphologiques (macroscopiques et microscopique), biochimiques et physiologiques, a permis de rapprocher les deux souches actives au genre <i>Streptomyces</i>.</p> | |
| Mot clés : actinomycètes, herbicide, Apyros, Sulfosulfuron, tolérance, biodégradation | |
| Laboratoire de recherches : Laboratoire de génie microbiologique et application | |
| <p>Président du jury : ZERIZER Habiba (Maître de conférences « B » - INATAA UFM Constantine)</p> <p>Rapporteur : ZERMANE Férial (Maître Assistante « A » - UFM Constantine)</p> <p>Examineur : RACHEDI Kounouz (Maître Assistante « A » - INATAA UFM Constantine)</p> | |