

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE

N° d'ordre : 40/TS/2011
Série : 05/SN/2011

THESE

PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT *EN* SCIENCES EN BIOLOGIE

**ETUDE DE LA BIODEGRADATION DE L'HERBICIDE ACIDE
2,4-DICHLOROPHENOXYACETIQUE (2,4-D) DANS DES
SOLS AGRICOLES DE LA REGION DE CONSTANTINE**

OPTION : BIOTECHNOLOGIES

PAR

Mr. Bachir BOUSEBA

Devant le jury :

Président	: M. A. BENGUEDOUAR	Professeur	Univ. Constantine
Rapporteur	: M. A. ZERTAL	Professeur	Univ. Mentouri Constantine
Co-Directeur	: M. F. MARTIN-LAURENT	Directeur de Recherche	INRA. Dijon, France
Examineur	Mme. O. RACHED	Professeur	Univ. Mentouri Constantine
Examineur	: M. N. KARAM	Professeur	Univ. Esania, Oran
Examineur	: M. L. LAROUS	Professeur	Univ. Sétif

Thèse soutenue publiquement le 23/05/2011

Remerciements

Cette étude a été réalisée au Laboratoire des Techniques Innovantes de Préservation de l'Environnement (LTIPE) de l'Université Mentouri de Constantine et au Laboratoire de Microbiologie du Sol et de l'Environnement (LMSE), INRA UMR 1229-Université de Bourgogne, Dijon, France.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Catroux pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire LMSE et également à Monsieur Philippe Lemencau qui dirige l'UMR 1229 (Microbiologie et Géochimie des Sols).

Je souhaite exprimer ma sincère reconnaissance à Monsieur F. MARTIN-LAURENT co-encadreur et directeur de recherche au LMSE pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Je lui adresse également mes remerciements pour sa gentillesse, ses nombreux conseils scientifiques et techniques, et pour la confiance qu'il m'a accordée.

Merci à Monsieur A. ZERTAL, mon directeur de thèse, Professeur au département de chimie, faculté des sciences exactes et directeur du laboratoire LTIPE, qui a toujours su me faire confiance et m'apporter l'aide nécessaire, tant sur le plan scientifique que moral.

Je remercie vivement Monsieur A. BENGUEDOUAR, Professeur au département de biochimie et microbiologie, faculté des sciences de la nature et de la vie, qui me fait l'honneur de présider ce jury et en étant examinateur de cette thèse.

Je remercie également Mme. O. RACHED, Professeur à l'Université de Constantine, Monsieur N. KARAM, Professeur à l'université d'Essania, Oran, Monsieur A. LAROUS, Professeur à l'université de Sétif pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et d'avoir accepté de juger cette thèse.

Je tiens également à remercier Mmes N. ROUARD et M. DIVERS, pour leur gentillesse et pour l'intérêt qu'elles ont porté à ce travail.

Je suis très heureux de pouvoir exprimer ma profonde gratitude à Monsieur A. BOULKAMH, Professeur à l'Université de Constantine, Monsieur Talaat EL SEBAI, Docteur en Agrochimie au centre national de la recherche d'Egypte, pour leur gentillesse et l'aide qu'ils m'ont toujours prodigués.

Merci du fond du cœur aux membres des Labo LMSE et LTIPE, ainsi que tous les amis et collègues, pour leur aide, leur amitié, leur gentillesse et leur soutien moral.

Dédicace

*A la mémoire de mes parents,
A ma femme et mes enfants,
A mes frères et ma sœur,
A tous ceux qui me sont chers*

Liste des abréviations

2,4-D :	2,4-Dichlorophénoxyacétique
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
ADNr :	ADN dont la transcription donne lieu à l'ARN ribosomal
ARNr :	ARN ribosomale
DGGE:	denaturing gradient gel electrophoresis
DO:	Densité Optique
dNTP :	Désoxyribonucléotide Triphosphate
ddNTP :	didésoxyribonucléotide Triphosphate
DDBJ:	DNA databank of Japan
EDTA:	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EMBL:	European Molecular Biology Laboratory
FISH:	fluorescence in situ hybridization
FAO:	Food and Agriculture Organization
IGS:	Intergenic Spacer
ITS- PCR:	internal transcribed spacer- Polymerase Chain Reaction
IUPAC:	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kb:	Kilo base
K_{ow} :	Koeficient Octanol Water
OMS :	Organisation mondiale de la santé
Pb :	Paire de base
PES :	Poids Equivalent Sec
PCR:	Polymerase Chain Reaction
RAPD:	randomly amplified polymorphic DNA
RT-PCR:	real-time- Polymerase Chain Reaction
REP- PCR:	Repetitive Extragenic Palindromic- Polymerase Chain Reaction
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RISA:	Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
Rpm:	rotation par minute
SDS:	Sodium Dodecyl Sulfate
STARFISH:	substrate-tracking autoradiographic fluorescence in situ hybridization
SAU :	Surface Agricole Utile
T-RFLP :	terminal restriction fragment length polymorphism
TBE :	Tris borate EDTA
UV :	Ultra violet

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.A. Agriculture et produits phytosanitaires en Algérie.....	4
I.A.1. Agriculture en Algérie.....	4
I.A.2. Produits phytosanitaires en Algérie.....	5
I.A.3. Généralités sur le 2,4-D.....	11
I.A.3. 1. Caractéristiques physico-chimiques du 2,4-D.....	11
I.A.3. 2. Mode d'action, sélectivité et toxicité du 2.4-D.....	13
I-B. Devenir du 2,4-D dans l'environnement.....	17
I-B.1. Ecodynamique du 2,4-D dans les principaux compartiments environnementaux.....	17
I-B.2 Devenir du 2,4-D dans le sol.....	20
I-B. 3 Dégradation du 2,4-D par les microorganismes.....	23
I-B.4 Facteurs affectant l'écodynamique du 2,4-D dans le sol	25
I-B.4.1 Effet des propriétés physico-chimiques de l'herbicide et sa disponibilité comme substrat.....	26
I-B.4.2 Effet des propriétés physico-chimiques du sol.....	27
I-B.4.3 Effet de conditions climatiques.....	28
I-B.4.3.1 Température.....	28
III.4.3. 2 Aération.....	29
III.4.3.3 Humidité.....	29
I.C Base génétique et méthodes de biologie moléculaire.....	31
I.C.1 Base génétique de la biodégradation de 2,4-D.....	31
I.C. 2 Méthodes de biologie moléculaire utilisées pour la caractérisation et la classification de bactéries dégradantes	37
I.C.2.1 Taxonomie des bactéries dégradantes.....	37
I.C.2.2 Méthodes de biologies moléculaires utilisées.....	41
a- Polymerase chain reaction (PCR).....	41
b- Analyse du polymorphisme de restriction (RFLP).....	45
c- Séquençage.....	46
I.D Bioaugmentation.....	50

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

II.A. Paramètres affectant la minéralisation	52
II.A.1 Capacité des trois sols agricoles à minéraliser le 2,4-D.....	52
II.A.1.1 Sols étudiés et Échantillonnage.....	52
II.A.1.2 Caractéristiques physico-chimiques des sols.....	53
II.A.1.3 Cinétique de minéralisation du 2,4-D.....	53
II.A.2 Effets d'humidité.....	54
II.A.3 Effets de température.....	54
II.A.4 Modélisation de la cinétique de minéralisation du 2,4-D.....	54
II.A.5 Analyse de la structure globale des communautés microbiennes du sol.....	57
II.A.5.1 Extraction directe de l'ADN à partir du sol.....	57
II.A.5.2 Quantification d'ADN.....	58
II.A.5.3 - Analyse RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis).....	58
II.A.6 Extraction des résidus de 2,4-D.....	60
II.A.6.1 Extraction des résidus extractibles.....	60
II.A.6.2 Evaluation des résidus non extractibles.....	60
II.B Isolement et caractérisation des souches dégradantes	62
II.B.1 Échantillons du sol.....	62
II.B.2 Cinétique de minéralisation du 2,4-D et technique d'enrichissement.....	62
II.B.2.1 Cinétique de minéralisation de 2,4-D.....	62
II.B.2.2 Technique d'enrichissement.....	63
II.B.3 Isolement et purification des souches bactériennes dégradantes.....	64
II.B. 4 Test de dégradation du 2,4-D.....	66
II.B.5 Caractérisation des souches bactériennes dégradantes.....	66
II.B.5.1 Technique RFLP (restriction fragment length polymorphism).....	66
a) Extraction de l'ADN.....	66
b) Amplification du gène ADNr 16S.....	67
c) Analyse de restriction	67
II.B.5.2 Séquençage d'ADNr 16S	68
a) Amplification d'ADNr 16S avec les amorces 926r et 515r.....	68
b) Réaction de Séquençage.....	69
c) Traitement des séquences.....	69
II.B.6 Effet d'enrichissement sur la structure des communautés microbiennes du sol : Estimation par RISA.....	69

II.B.7 Gènes <i>tfdA</i> , <i>tfdB</i> et <i>tfdC</i>	69
II.B.7.1 Amplification des gènes <i>tfdA</i> , <i>tfdB</i> et <i>tfdC</i>	69
II.B.7.2 Taille des trois gènes <i>tfdA</i> , <i>tfdB</i> et <i>tfdC</i>	70
II.B.7.3 Digestion des produits PCR avec les enzymes de restriction <i>MspI</i> et <i>HaeIII</i> ..	70
II.C. Test de bioaugmentation	71
II.C. 1 Choix du sol.....	71
II.C. 2 Choix de la souche d'inoculation.....	72
II.C. 3 Test de bioaugmentation.....	76

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.A Paramètres affectant la minéralisation du 2,4-D	77
III. A.1 Capacité des trois sols agricoles à minéraliser le 2,4-D.....	77
III.A.1.1 Caractéristiques physicochimiques.....	77
III.A.1.2 Minéralisation du 2,4-D.....	78
III.A.1.3 Interprétation par analyse en composante principale (ACP).....	82
III.A.1.4 Structure globale des communautés bactériennes des trois sols.....	84
III.A. 2 Impact de la température du sol sur la capacité minéralisation du 2,4-D et sur la structure globale des communautés bactériennes.....	86
III.A. 2.1 capacité de minéralisation.....	86
III.A.2.2 Structure globale des communautés bactériennes.....	89
III.A.3 Impact de l'humidité du sol sur la capacité de minéralisation du 2,4-D et sur la structure globale des communautés bactériennes.....	92
III.A. 3.1 capacité de minéralisation.....	92
III.A.3.2 Structure globale des communautés bactériennes.....	96
III.A.4. Les résidus du 2,4-D.....	97
III.B Isolement et caractérisation des souches dégradantes	100
III.B.1 Technique d'enrichissement et minéralisation du 2,4-D.....	100
III.B.2 Isolement et purification des souches bactériennes dégradant le 2,4-D.....	105
III.B.3 Test de dégradation du 2,4-D.....	107
III.B.4 Caractérisation des souches dégradantes par les méthodes de biologie moléculaire...	110
III.B.4.1 technique RFLP (restriction fragment length polymorphism).....	110
III.B.4.2 Séquençage du gène ADNr 16S.....	114
III.B.5 Effet d'enrichissement sur la structure globale des communautés microbiennes du sol: Estimation par RISA.....	117

III.B.6 Gènes <i>tfdA</i> , <i>tfdB</i> et <i>tfdC</i>	120
III.B.6. 1 Présence des gènes <i>tfdA</i> , <i>tfdB</i> et <i>tfdC</i> dans 18 isolats.....	120
III.B.6. 2 Taille des trois gènes <i>tfdA</i> , <i>tfdB</i> et <i>tfdC</i>	122
III.B.6. 3 Digestion des produits PCR avec les enzymes de restriction <i>MspI</i> et <i>HaeIII</i>	123
III.C. Test de Bioaugmentation	129
III.C. 1 Choix du sol.....	129
III.C. 2 Choix de la souche d'inoculation.....	130
III.C. 3 Test de bioaugmentation.....	134
Conclusion Générale	136
Recommandations et Perspectives	138
Références Bibliographiques	139
Annexes	

Liste des figures

Figure I.A.1 : Répartition de la superficie totale de l'Algérie (FAO, 2005)	4
Figure I.A.2 : Occupation des terres agricoles en Algérie (FAO, 2005)	4
Figure I.A.3 : Formule commune des acides phénoxyalcanoïques.....	11
Figure I.A.4 : Formes commerciales du 2,4-D.....	13
Figure I.A.5 : Translocation des herbicides et notamment du 2,4-D dans les plantes (http://www.oznet.ksu.edu/library/crpsl2/c715.pdf)	15
Figure I.B.1 : Dispersion des pesticides dans les différents compartiments environnementaux. S : Solubilité, BCF : facteur de bioconcentration (Linde, 1994)	17
Figure I.B.2 : Principaux processus impliqués dans le comportement des pesticides après leur application. C_g , C_w et C_s représentent les concentrations de pesticide dans les phases gaz, aqueuses et solides respectivement (Bedos et al, 2002)	18
Figure I.B.3 : Principaux mécanismes gouvernant le 2,4-D dans l'environnement (http://www.cdpr.ca.gov/docs/emppm/pubs/fatememo/24-d.pdf)	20
Figure I.B.4 : Les horizons du sol (http://soils.usda.gov/education/resources/k_12/lessons/profile/)	21
Figure I.B.5 : Les différentes interactions affectant le devenir des pesticides dans les sols (Arnold et Briggs, 1990)	26
Figure I.C.1 : Carte génétique du plasmide pJP4. La carte linéaire correspond à un zoom de plasmidique comprenant les gènes <i>de tfd</i> (Filer and Harker, 1997).....	33
Figure I.C.2 : A) voies de dégradation du 2,4-D. B) organisation génétique des gènes <i>tf</i> <i>d</i> sur le plasmide pJP4. (Filer and Harker, 1997.....	34
Figure I.C.3 : Première étape de la dégradation du 2,4-D (Evans et al, 1971 ; DON et al, 1985 ; Bhat et al, 1994 ; Leveau et al., 1999 ; Pelmont, 2005).....	34
Figure I.C.4 : Transformation de dichlorophénol (Evans et al, 1971 ; DON et al, 1985 ; Bhat et al, 1994 ; Leveau et al., 1999 ; Pelmont, 2005).....	34
Figure I.C.5 : Transformation du 3,5-dichlorocatéchol en 3-oxoadipate par la voie ortho (Evans et al, 1971 ; DON et al, 1985 ; Bhat et al, 1994 ; Leveau et al., 1999 ; Seibert et al., 2004 ; Pelmont, 2005).....	35
Figure I.C.6 : Différences entre les trois plasmides pEMT1, pEMT3 et pJP4 (Top et al, 1995).....	37
Figure I.C.7 : Les différentes méthodes utilisées pour la caractérisation et la classification des communautés microbiennes du sol et de la rhizosphère (Thies , 2008)....	38
Figure I.C.8 : Niveau taxonomique de l'information de certaines techniques (Vandamme et al, 1996).....	39
Figure I.C.9 : Arbre phylogénétique à base des séquences du gène ARNr 16S chez <i>Ralstonia</i> (Garrity, 2005).....	40

Figure I.C.10 : Arbre phylogénétique, à base des séquences du gène ARNr 16S, du genre <i>Burkholderia</i> (Garrity, 2005).....	41
Figure I.C.11 : Représentation schématique de l'opéron d'ADN ribosomique bactérien. fD1 et rD1 sont les amorces universelles 27f et 1429r (Miyajima et al, 2002).....	42
Figure I.C.12 : Les trois premiers cycles de la PCR (Doggett, 1992).....	43
Figure I.C.13 : Principe du séquençage d'ADN, méthode de Sanger (Men <i>et al.</i> , 2008).....	47
Figure I.C.14 : Exemple de séquençage automatique.....	48
Figure I.D.1 : Effet de l'inoculation et le transfert ultérieur des plasmides sur la dégradation du 2, 4-D dans l'horizon B. ▲ Sol non inoculé + 2, 4-D ; ◆ sol + 2,4-D + pEMT1::lacZ; ■ sol + 2,4-D + pJP4::lacZ.....	50
Figure II.A.1 : Plan d'échantillonnage. Sol 45IB : Ibn Badis (El-Haria) ; Sol 46BM : Boudjriou Messaoud (Ain Karma) ; Sol 47AA : Ain-Abid.....	52
Figure II.A.2 : Organigramme de la minéralisation du 2,4-D par radiorespirométrie (panneau A).....	55
Figure II.A.2 : Organigramme de la minéralisation du 2,4-D par radiorespirométrie (panneau B).....	56
Figure II.A.3 : Organigramme de l'analyse de la structure globale des communautés bactériennes par Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA).....	59
Figure II.B.1 : Organigramme de la méthode d'enrichissement et isolement des souches bactériennes dégradantes.....	65
Figure II.C.1 : Plan d'échantillonnage. Sol 48CC : Campus de l'université Mentouri-Constantine ; Sol 49MC : M'chira (Mechtat Elgabel), wilaya de Mila ; Sol 50DM : Didouche Mourad, Wilaya de Constantine.....	72
Figure II.C.2 : Emplacement des isolats testés dans les puits des deux microplaques.....	74
Figure II.C.3 : Organigramme du test de minéralisation sur microplaque 24 puits.....	75
Figure III.A.1 Cinétiques de minéralisation du ¹⁴ C-2,4-D dans les trois sols algériens [45 Ibn Badis (El-Haria), 46 Boudjriou Messaoud (Ain Karma) et 47 (Ain Abid)] (n = 3 par sol).....	79
Figure III.A.2 : Plan factoriel (CP1 x CP2) de l'analyse en composante principale (ACP) réalisée sur les différents paramètres physico-chimiques caractérisant les trois sols étudiés.....	83
Figure III.A.3. Panneau (a) : RISA d'ADN extrait à partir des trois sols 45IB, 46BM et 47AA. Dernière piste : marqueur de taille moléculaire (Boehringer Mannheim). Panneau (b) : ACP de la structure de la communauté bactérienne globale du sol.....	85
Figure III.A.4 : Effet de la température du sol sur le taux de minéralisation du ¹⁴ C- 2,4-D dans les trois sols agricoles (à 25% d'humidité) après 36 jours d'incubation.....	86
Figure.III.A.5 : Estimation de l'impacte de la température du sol sur la cinétique de minéralisation du ¹⁴ C-2,4-D dans les trois sols incubés à 25% d'humidité [Panneau A: sol 45 Ibn Badis (El-Haria), panneau B: sol 46 Boudjriou Messaoud (Ain Karma) et panneau C: sol 47 (Ain Abid)].....	88

Figure III.A.6 : Profils de RISA d'ADN extrait des sols incubés à différentes températures étudiées (10, 20 ou 28 °C). BVIII : Marqueur de taille moléculaire.....	91
Figure III.A.7. Impact de la température sur la structure globale des communautés microbiennes du sol. <i>- Les nombres représentent les répétitions de chaque traitement [1-3 pour 10°C, 4-6 pour 20°C et 7-9 pour 28°C] et les ellipses représentent la variance dans les empreintes de RISA pour chaque traitement.</i> <i>- Les pourcentages de variance expliqués par les axes d'analyse en composantes principales 1 et 2 sont indiqués dans chaque panneau sur les axes x et y respectivement.....</i>	92
Figure III.A.8: Effet de l'humidité du sol sur le taux de minéralisation du ¹⁴ C- 2,4-D dans les trois sols agricoles incubés à 20 °C.....	93
Figure III.A.9. Estimation de l'impacte de l'humidité du sol sur la cinétique de minéralisation du ¹⁴ C-2,4-D dans les trois sols incubés à 20 °C [Panneau A: sol 45 Ibn Badis (El-Haria), panneau B: sol 46 Boudjriou Messaoud (Ain Karma) et panneau C: sol 47 (Ain Abid)].....	94
Figure III.A.10: Effet de l'humidité du sol (10, 15 ou 25%). Empreintes de la RISA d'ADN extrait des sols. BVIII : Marqueur de taille moléculaire.....	96
Figure III.A.11. Impact de l'humidité sur la structure globale des communautés microbiennes du sol. <i>- Les nombres représentent les répétitions de chaque traitement [1-3 pour 45IB, 4-6 pour 46BM et 7-9 pour 47AA] et les ellipses représentent la variance dans les empreintes de RISA pour chaque traitement.</i> <i>- Les pourcentages de variance expliqués par les axes d'analyse en composantes principales 1 et 2 sont indiqués dans chaque panneau sur les axes x et y respectivement.....</i>	97
Figure III.B.1: Cinétique de minéralisation de 2,4-D durant le premier enrichissement (A) et le deuxième enrichissement (B).....	101
Figure III.B.2: Partie des 108 isolats donnant la couleur rouge sur la préparation de Loos (1975) modifiée (dégradation du 2,4-D).....	107
Figure III.B. 3 : Différents profils de la digestion des produits PCR du gène 16S ADNr, de 16 isolats, par les enzymes de restriction <i>RsaI</i> (A) et <i>AluI</i> (B). VIII : Marqueur de taille moléculaire (Boehringer Mannheim).....	112
Figure III.B.4: Fréquences des différents groupes microbiens isolés à partir des trois sols (45IB, 46BM et 47AA).....	113
Figure III.B.5 : Profils RISA des produits PCR de l'ADN extrait de la suspension d'enrichissement, à la fin de l'incubation, et de l'ADN extrait des isolats représentant les différents types RFLP. Enrichissement du sol 45IB (A), du sol 46BM (B) et du sol 47AA (C).....	118
Figure III.B.6 : Confirmation de la présence des gènes <i>tfdA</i> , <i>tfdB</i> , et <i>tfdC</i> dans les isolats purifiées. La séparation de ces gènes a été réalisée sur un gel d'agarose (1%). T : témoin (produits PCR sans ADN). 1kb : Marqueur de taille moléculaire.....	121

Figure III.B.7: Taille des gènes <i>tfdA</i> , <i>tfdB</i> , et <i>tfdC</i> . BVIII : Marqueur de taille moléculaire.....	122
Figure III.B.8: RFLP des gènes <i>tfdA</i> , <i>tfdB</i> , et <i>tfdC</i> . BVIII : Marqueur de taille moléculaire.....	124
Figure III.C.1: Test de minéralisation du 2,4-D dans les trois sols agricoles algériens (48CC, 49MC et 50DM)	130
Figure III.C.2 : Emplacement d'isolats testés sur les filtres.....	131
Figure III.C.3 : Test de minéralisation par radiorespirométrie sur microplaque 24 puits.....	133
Figure III.C.4 : Test de bioaugmentation avec le sol 49MC « M'chira » et l'isolat 67 isolé à partir du sol 45IB « Constantine ».....	135

Liste des tableaux

Tableau I.A.1 : Caractéristiques physico-chimique du 2,4-D.....	12
Tableau III.A.1 : Histoire, propriétés physico-chimiques des trois sols algériens [45 Ibn Badis (El-Haria), 46 Boudjriou Messaoud (Ain Karma) et 47 (Ain Abid)].....	78
Tableau III.A.2. Paramètres cinétiques de minéralisation de 2,4-D, déterminés par l'utilisation du modèle Gompertz modifié (n = 3, par sol). <i>a</i> : plateau ou pourcentage maximum de minéralisation (en% du ¹⁴ CO ₂ libéré à partir du ¹⁴ C-2,4-D initialement ajouté au sol microcosme); <i>k</i> : constante de vitesse de minéralisation du 2,4-D, (en % du ¹⁴ C-CO ₂ . jour ⁻¹); <i>t_i</i> (constante) : abscisse du point d'inflexion (jour).....	80
Tableau III.A.3. Impact de la température d'incubation des trois sols sur l'évolution des paramètres cinétiques de minéralisation de 2,4-D, déterminés par l'utilisation du modèle Gompertz modifié (n = 3, par sol). <i>a</i> : plateau ou pourcentage maximum de minéralisation (en% du ¹⁴ CO ₂ libéré à partir du ¹⁴ C-2,4-D initialement ajouté au sol microcosme); <i>k</i> : taux de la minéralisation du 2,4-D, (en% du ¹⁴ C-CO ₂ . jour ⁻¹); <i>t_i</i> (constante) : abscisse du point inflexion (jour).....	89
Tableau III.A.4. Impact de l'humidité des trois sols sur l'évolution des paramètres cinétiques de minéralisation de 2,4-D, déterminés par l'utilisation du modèle Gompertz modifié (n = 3, par sol) <i>a</i> : plateau ou pourcentage maximum de minéralisation (en% du ¹⁴ CO ₂ libéré à partir du ¹⁴ C-2,4-D initialement ajouté au sol microcosme); <i>k</i> : taux de la minéralisation du 2,4-D, (en% du ¹⁴ C-CO ₂ . jour ⁻¹); <i>t_i</i> (constante) : abscisse du point inflexion (jour).....	95
Tableau III.A.5 : Quantités des résidus ¹⁴ C-2,4-D-extractibles et ¹⁴ C-2,4-D-liés mesurés, à la fin de la cinétique de minéralisation de l'herbicide, dans les trois sols 45IB, 46BM et 47AA. <i>(i)</i> Sols maintenus à 25% d'humidité et incubés à 10, 20 et 28 °C ou <i>(ii)</i> Sols maintenus à 10, 15 et 25 % d'humidité et incubés à 20 °C.....	98
Tableau III.B. 1. Impact des quatre enrichissements des trois sols sur l'évolution des paramètres cinétiques de minéralisation de 2,4-D, déterminés par l'utilisation du modèle Gompertz modifié. <i>a</i> : plateau ou pourcentage maximum de minéralisation (en% du ¹⁴ CO ₂ libéré à partir du ¹⁴ C-2,4-D initialement ajouté au sol microcosme); <i>k</i> : taux de la minéralisation du 2,4-D, (en% du ¹⁴ C-CO ₂ . jour ⁻¹); <i>t_i</i> (constante) : abscisse du point inflexion (jour).....	102
Tableau III.B.2 : Temps des phases d'adaptation dans les trois sols durant les quatre enrichissements.....	102
Tableau III.B.3 : Temps d'incubation nécessaire pour atteindre le maximum de minéralisation dans les trois sols durant les quatre enrichissements.....	103

Tableau III.B.4 : Temps et taux de minéralisation des deux prélèvements de chaque enrichissement.....	106
Tableau III.B.5 : Test de minéralisation des 49 isolats sur le milieu Cardiff (2,4-D 250 mg. L ⁻¹)	108
Tableau III.B.6 : Types RFLP et isolats correspondants.....	113
Tableau III.B.7 : isolats représentant les différents groupes bactériens utilisés pour la réaction de séquençage.....	114
Tableau III.B.8 : Différents types RFLP et souches bactériennes correspondantes.....	116
Tableau III.B.9 : Présence et absence des gènes <i>tfdA</i> , <i>tfdB</i> et <i>tfdC</i> dans les isolats obtenus	123

Liste des annexes

- Annexe 1 :** Préparation du tampon d'extraction de l'ADN du sol
- Annexe 2 :** Préparation d'acétate de sodium 3M (pH 5,5)
- Annexe 3 :** Préparation d'une colonne de sépharose 4B
- Annexe 4 :** Préparation d'une colonne de PVPP
- Annexe 5 :** Purification de l'ADN
- Annexe 6 :** Profils de la digestion enzymatique (*RsaI* et *AluI*) d'ADN extrait à partir de 108 souches isolées à partir des trois sols agricoles de la région de Constantine.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Plus de 20000 produits de pesticides avec presque 900 substances actives sont utilisés comme herbicides, insecticides, fongicides, rodenticides, miticides, préservatifs de bois, fumigène, et régulateurs de croissance des plantes (**Weiss *et al.*, 2004**). Ces produits sont essentiellement utilisés pour protéger les cultures et assurer une certaine qualité de la production végétale. Lorsqu'ils se retrouvent dans des compartiments environnementaux, ils sont dits « contaminants » et posent de graves problèmes écotoxicologiques. Ils ont été détectés dans la nourriture, l'eau, les maisons, les écoles, les lieux de travail, les pelouses et les jardins.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la détoxification de ces produits chimiques, mais un nombre croissant de chercheurs s'est intéressé à l'utilisation de populations ou souches microbiennes pour les éliminer rapidement en toute sécurité et à un moindre coût. Ces microorganismes (bactéries et/ou champignons) proviennent directement de sites contaminés ou sont purifiés au laboratoire pour fournir des souches épuratrices dotées de capacités cataboliques remarquables (**Chen et Mulchandani, 1999**).

Le devenir environnemental d'un pesticide dans le sol dépend de plusieurs facteurs, y compris ses caractéristiques physico-chimiques (**Davis et Madsen, 1996**). Par conséquent plusieurs mécanismes sont impliqués : ceux d'ordre physico-chimique (sorption, volatilisation...) ou d'ordre biologique (biodégradation,...) (**Leisrta, 1980; Estrella *et al.*, 1993**).

Les taux de biodégradation peuvent être influencés par des facteurs tels que : la disponibilité d'éléments inorganiques nutritionnels, les substrats multiples ainsi que leur concentration (**Davis and Madsen, 1996**), l'aération, la température, l'humidité et le pH du sol (**Okeke, 1996 ; Greer et Shelton, 1992; Ian Harrison *et al.*, 1998 ; Tu *et al.*, 2001**). Cependant la capacité d'un écosystème à dégrader des pesticides et sa réponse aux changements des conditions, c'est-à-dire la réponse adaptative des microorganismes, est fortement liée aux populations microbiennes présentes dans l'écosystème (**Hu *et al.*, 1999**). Il a également été rapporté que les taux de biodégradation pour un pesticide, varient d'un sol à un autre. Cette variation résulte des propriétés physicochimiques du sol telles que, la différence du pH, le contenu organique, l'humidité et la profondeur (**Davis et Madsen, 1996**).

La température et l'humidité du sol sont parmi les facteurs qui affectent considérablement la diversité et l'activité des communautés microbiennes du sol, y compris la communauté dégradante des pesticides (**Sowerby *et al.*, 2005 ; Sardans et Penuelas, 2005**). Il a été observé que la teneur du sol en eau (humidité du sol) a un effet majeur sur l'activité microbienne et par conséquent sur la biodégradation aérobie des pesticides (**Sowerby *et al.*, 2005**).

Récemment, il a été rapporté que les conditions climatiques extrêmes de l'été 2003 ont causé des changements structuraux et fonctionnels spécifiques dans les communautés microbiennes impliquées dans la biodégradation de l'isoproturon (herbicide de la famille des phénylurées). Ces changements ont conduit à une réduction importante de la biodégradation de cet herbicide et à une forte augmentation de sa persistance dans le sol (**Levy *et al.*, 2007**).

Dans la majorité des études d'écologie microbienne, l'objectif principal est de comprendre la réponse adaptative des communautés microbiennes aux changements du milieu (**Schmalendberger *et al.*, 2001**). Dans ce contexte, les nouvelles techniques liées au développement de la biologie moléculaire offrent des alternatives intéressantes pour l'analyse de l'impact des facteurs du milieu sur l'abondance et l'activité de ces communautés.

Le 2,4-D est un herbicide de la famille des acides phénoxyalkyles les plus répandus dans le monde. Après la 2^{ème} guerre mondiale, il est devenu l'un des herbicides systémiques sélectifs les plus importants (**Tomlin, 1994; Ian Harrison *et al.*, 1998**). Il a été l'un des constituants de l'agent orange utilisé extensivement comme défoliant dans la guerre du Vietnam entre 1962 et 1971 (**Huong *et al.*, 2007**).

Cet herbicide est typiquement utilisé comme désherbant dans le domaine agricole en Algérie (**Index des produits phytosanitaires, 1999 et 2005**).

Dans le sol, bien que le 2,4-D subisse une photodécomposition, il est principalement dégradé par une fraction de la microflore (**Crespin *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2001**). Les populations microbiennes impliquées présentent une voie catabolique impliquant l'hydroxylation, la décarboxylation, le clivage de la chaîne latérale acide, et l'ouverture du cycle benzénique (**Tomlin, 1994**).

Les souches microbiennes isolées et caractérisées, dégradantes le 2,4-D, appartiennent à de nombreux genres. Ces genres sont répartis en trois sous-groupes: α , β et γ – *Protéobactéries*.

D'autre part, **Soulas (1993)** a suggéré l'existence d'au moins deux groupes microbiens responsables de la dégradation du 2,4-D dans le sol.

Des études extensives effectuées avec *Ralstonia eutropha* JMP 134, autrefois *Alcaligenes eutrophus*, ont mené à la caractérisation de la voie catabolique du 2,4-D. Cette voie est constituée de 6 enzymes codés par les gènes *tfdA-F*. Ces enzymes sont responsables de la transformation du 2,4-D en 2-chloromaleylacetate qui, par la suite, est entièrement minéralisé.

A notre connaissance, aucune étude expérimentale sur la biodégradation du 2,4-D n'a été réalisée en Algérie.

Les objectifs de ce travail sont :

- La caractérisation de la capacité de biodégradation du 2,4-D dans des sols agricoles algériens ;
- L'étude de l'influence de certains facteurs environnementaux tels que la température et l'humidité du sol sur la biodégradation du 2,4-D ;
- L'isolement et la caractérisation des bactéries responsables de la dégradation du 2,4-D à partir des sols prélevés dans la région Constantinoise. Ces deux opérations ont été réalisées par la technique d'enrichissement et par les méthodes de biologie moléculaire respectivement;
- L'essai de bioaugmentation sur un autre sol agricole algérien, non traité par le 2,4-D, à l'aide de l'une des souches isolées et caractérisées précédemment.

L'étude de l'influence des facteurs environnementaux et l'isolement des bactéries responsables de la dégradation du 2,4-D, ont été réalisés sur des sols agricoles, collectés en trois lieux différents de la région de Constantine (Est de l'Algérie) : Ibn Badis (El-Haria) (45IB), Boudjriou Messaoud (Ain Karma) (46BM), Ain Abid (47AA), présentant un historique de culture et de traitements phytosanitaires connus. Le test de bioaugmentation a été effectué sur un sol agricole, n'ayant subi aucun traitement préalable au 2,4-D, collecté à partir de la région de M'chira (Mechtat Elgabel), wilaya de Mila.

Une conclusion générale ainsi que des perspectives seront présentées à la fin de ce document.

Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.A. Agriculture et produits phytosanitaires en algérie

I.A. 1 AGRICULTURE EN ALGERIE

La surface agricole utile (SAU) en Algérie est d'environ 8,2 millions hectares dont presque la moitié est habituellement mise en jachère. Les cultures herbacées couvrent 3,8 millions d'hectares (**Figure I.A.1 et I.A.2**) (**Abdelguerfi et Zeghida, 2005**).

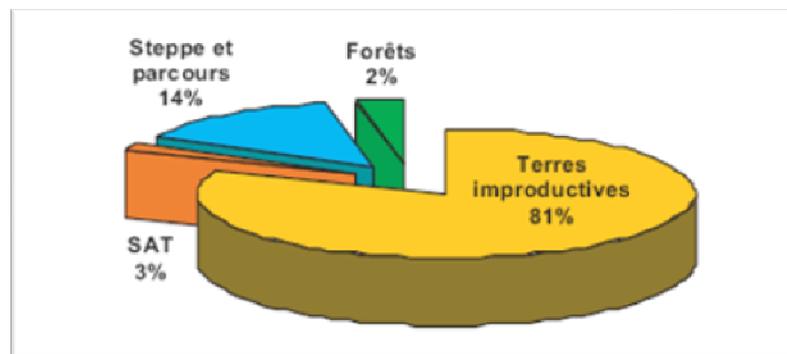


Figure I.A.1 : Répartition de la superficie totale de l'Algérie (**Abdelguerfi et Zeghida, 2005**).

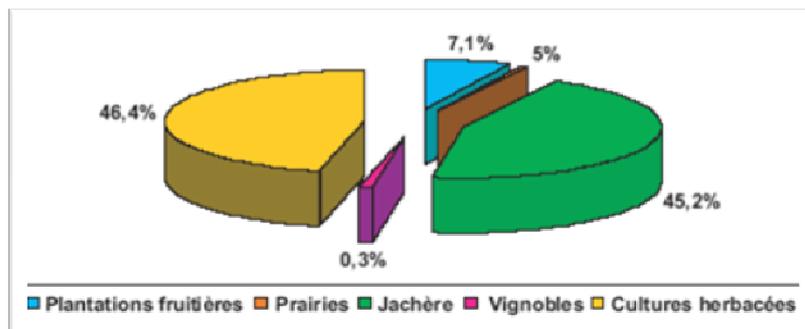


Figure I.A.2 : Occupation des terres agricoles en Algérie (**Abdelguerfi et Zeghida, 2005**).

Les cultures annuelles telles que : les céréales, les fourrages et les légumineuses alimentaires et la pomme de terre sont prédominant (**Abdelguerfi et Zeghida, 2005**).

La politique agricole Algérienne favorise l'intensification de la production agricole, ce qui consiste à améliorer des systèmes de cultures en fonction des zones agroécologiques du pays et à encourager la réduction de la jachère.

L'intensification de la production agricole est très souvent accompagnée par l'augmentation de l'utilisation de certains engrais et pesticides afin d'améliorer la quantité et la qualité de la production végétale.

I.A. 2 Produits phytosanitaires en Algérie

L'utilisation des pesticides en Algérie contre les pestes des cultures est assez ancienne. A titre d'exemple, l'arséniate de plomb a été employé en 1888 pour lutter contre l'Endémie de la vigne (**Calvet *et al.*, 2005**).

Actuellement, les pesticides sont utilisés à travers le monde, y compris l'Algérie, dans le domaine agricole pour lutter principalement contre les insectes (insecticides), les rongeurs (raticides), les champignons (fongicides), et les plantes adventices (herbicides).

Ces xénobiotiques restent indispensables pour l'agriculture moderne (**Don and Pemberton, 1981 ; Marliere, 2000 ; Tadeo *et al.*, 2008**).

On distingue différentes classes de pesticides. Il y'a ceux qui sont employés dans la lutte contre les plantes adventices qui peuvent réduire énormément le rendement des cultures par leur concurrence pour les nutriments du sol, l'eau, et la lumière avec les plantes agricoles.

Un herbicide se compose de deux types de constituants, la matière active qui lui confère son activité herbicide et l'adjuvant qui lui complète sa formulation commerciale.

Les herbicides sont classés en plusieurs groupes (**Tadeo *et al.*, (2008)**) :

1 – AMIDES

Ce groupe est constitué d'une grande variété de composés présentant la formule générale :

$R_1-CO-N R_2 R_3$.

- **Acetochlor:** 2-Chloro-N-ethoxymethyl- 6'-ethylacet-o-toluidide.
- **Alachlor:** 2-Chloro-2',6'-diethyl-N-methoxymethylacetanilide.
- **Butachlor:** N-Butoxymethyl-2-chloro-2',6'-diethylacetanilide.

- **Metolachlor** : 2-Chloro-6-ethyl-N-(2-methoxy-1-methylethyl) acet-o-toluidide.
- **Propachlor** : 2-Chloro-N-isopropyl acetanilide.
- **Propanil**: 30,40-Dichloro propionanilide.

2 - ACIDES BENZOÏQUES

Il s'agit essentiellement des dérivés chlorés des acides benzoïques substitués.

- **Chloramben** : 3-Amino-2,5-dichlorobenzoic acid.
- **Chlorthal-dimethyl** : Dimethyl tetrachloroterephthalate.
- **Dicamba** : 3,6-Dichloro-omethoxybenzoic acid.

3 - CARBAMATES

Ce sont des produits constitué d'esters de l'acide carbamique (R1 - O - CO - NR2R3).

- **Chlorpropham** : Isopropyl-3-chlorocarbanilate.
- **Desmedipham** : Ethyl-3-phenylcarbamoyloxyphenylcarbamate.
- **EPTC**: S-Ethyl dipropylthiocarbamate.
- **Molinate**: S-Ethyl azepane-1-carbothioate.
- **Phenmedipham**: Methyl-3-(3-methylcarbaniloxy) carbanilate.
- **Propham**: Isopropyl phenylcarbamate.
- **Thiobencarb**: S-4-Chlorobenzyl-diethylthiocarbamate.
- **Triallate**: S-2,3,3-Trichloroallyl-diisopropyl(thiocarbamate).

4 – NITRILES

Ce groupe est constitué de bromoxynil et d'ioxynil formulés comme sels ou esters d'octanoate.

- **Bromoxynil** : 3,5-Dibromo-4- hydroxybenzonnitrile.
- **Ioxynil** : 4-Hydroxy-3,5-diiodobenzonnitrile.

5 – NITROANILINES

Ce groupe est dérivé du 2,6-dinitroaniline.

- **Butralin**: N-sec-Butyl-4-tert-butyl-2,6-dinitroaniline.

- **Ethalfuralin:** N-Ethyl-a,a,a-trifluoro-N-(2-methylallyl)-2,6-dinitro-toluidine.
- **Pendimethalin:** N-(1-Ethylpropyl)-2,6-dinitro-3,4-xylidine.
- **Trifluralin:** a,a,a-Trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine.

6 – ORGANOPHOSPHORES

Parmi les herbicides organophosphorés, le glyphosate et le glufosinate sont les plus commercialisés.

- **Glyphosate :** N-(Phosphonomethyl) glycine.
- **Glufosinate-ammonium:** Ammonium4-[hydroxy(methyl) phosphinoyl]-DLhomoalaninate.

7 – PHENOXYACIDES

Il s'agit d'un groupe constitué de composés portant un radical phénoxy lié à un acide alcanoïque de nombre bas en carbone, tel que l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D, acide acétique) ou mecoprop (acide propionique). Quelques herbicides de ce groupe sont constitués par les stéréo-isomères commercialisés comme simples énantiomères ou mélanges racémiques.

- **2,4-D:** 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid.
- **Diclofop:** (RS)-2-[4-(2,4-Dichlorophenoxy) phenoxy]propionic acid.
- **Fenoxaprop-P:** (R)-2-[4-(6-Chloro-1,3-benzoxazol-2-yloxy)phenoxy]propionic acid.
- **Fluazifop-P:** (R)-2-[4-(5-Trifluoromethyl-2-pyridyloxy)phenoxy]propionic acid.
- **MCPA:** 4-Chloro-(2-methylphenoxy)acetic acid.
- **Mecoprop-P:** (R)-2-(4-Chloro-o-tolyloxy)propionic acid.
- **Triclopyr:** 3,5,6-Trichloro-2-pyridyloxyacetic acid.

8 – PYRIDINES ET COMPOSÉS D'AMMONIUM QUATERNAIRE

Le groupe d'herbicide de pyridines, également appelé bipyridylum, est constitué par le paraquat et diquat.

- **Diquat dibromide :** 1,1'-Ethylene-2,2'-bipyridyldiylum dibromide

- **Paraquat dichloride** : 1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride.
- **Chlormequat chloride** : 2-Chloroethyltrimethyl ammonium.
- **Mepiquat chloride** : 1,10-Dimethyl-piperidiniumchloride.

9 – PYRIDAZINES ET PYRIDAZINONES

Les Pyridates et pyridazinones, comme le norflurazon et le chloridazon, sont inclus dans ce groupe.

- **Chloridazon**: 5-Amino-4-chloro-2-phenylpyridazin-3(2H)-one.
- **Norflurazon**: 4-Chloro-5-methylamino-2-(α, α, α -trifluoro-m-tolyl)pyridazin-3(2H)-one.
- **Pyridate**: 6-Chloro-3-phenylpyridazin-4-yl-S-octylthiocarbonate.

10 – TRIAZINES

Dans ce cas, les herbicides présentent des structures chimiques basées sur les dérivés substitués de la triazine.

- **Atrazine** : 6-Chloro-N²-ethyl-N⁴-isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine.
- **Cyanazine**: 2-(4-Chloro-6-ethylamino-1,3,5-triazin-2-ylamino)-2-methylpropionitrile.
- **Metribuzin**: 4-Amino-6-tert-butyl-4,5-dihydro-3-methylthio-1,2,4-triazin-5-one.
- **Prometryn**: N²,N⁴-Diisopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine.
- **Simazine**: 6-Chloro-N²,N⁴-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine.
- **Terbutryne** : N²-tert-Butyl-N⁴-ethyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine.

11 – URÉES

11.1. PHENYLUREES

Les phénylurées comptent parmi les herbicides les plus répandus dans le monde et dérivent d'une molécule élémentaire simple : l'urée, $\text{H}_2\text{NC}(=\text{O})\text{NH}_2$.

- **Chlorotoluron** : 3-(3-Chloro-p-tolyl)-1,1-dimethylurea

- **Diuron** : 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea
- **Fenuron** : 1,1-Dimethyl-3-phenylurea
- **Isoproturon** : 3-(4-Isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea
- **Linuron** : 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea

11.2 . SULFONYLUREES

Ce groupe d'urées substituées a été développé très récemment. En générale, ces produits ont une activité herbicide plus élevée que les phénylurées. En effet, ils présentent l'avantage d'être applicables à une faible dose (1gramme/hectare).

- **Azimsulfuron** : 1-(4,6-Dimethoxypyrimidin-2-yl)-3-[1-méthyl-4-(2-méthyl-2H-tétrazol-5-yl)-pyrazol-5-ylsulfonyl]urea.
- **Chlorsulfuron** : 1-(2-Chlorophenylsulfonyl)-3-(4-méthoxy-6-méthyl-1,3,5-triazin-2-yl) urea.
- **Flazasulfuron** : 1-(4,6-Diméthoxypyrimidin-2-yl)-3-(3-trifluorométhyl-2-pyridylsulfonyl) urea.
- **Imazosulfuron** : 1-(2-Chloroimidazo[1,2-a]pyridin-3-ylsulfonyl)-3-(4,6-diméthoxypyrimidin-2-yl)urea.
- **Metsulfuron-méthyl** : Méthyl-2-(4-méthoxy-6-méthyl-1,3,5-triazin-2-ylcarbamoïlsulfamoïl)benzoate.
- **Rimsulfuron** : 1-(4,6-Diméthoxypyrimidin-2-yl)-3-(3-éthylsulfonyl-2-pyridylsulfonyl)urea.
- **Thifensulfuron-méthyl** : Méthyl 3-(4-méthoxy-6-méthyl-1,3,5-triazin-2-ylcarbamoïlsulfamoïl)thiophen-2-carboxylate.
- **Triasulfuron** : 1-[2-(2-Chloroéthoxy)phénylsulfonyl]-3-(4-méthoxy-6-méthyl-1,3,5-triazin-2-yl)urea.
- **Tribenuron-méthyl** : Méthyl 2-[4-méthoxy-6-méthyl-1,3,5-triazin-2-yl(méthyl)carbamoïlsulfamoïl]benzoate.

L'utilisation légale des herbicides en Algérie est régie par la réglementation phytosanitaire N° 87-17 du 01 août 1987. Cette loi régit les aspects relatifs à l'homologation, l'emballage, la fabrication et l'utilisation des produits de protection des plantes (PPP_S) (**Index des produits phytosanitaires, 1999**).

L'index des PPP_s autorisés est destiné aux inspecteurs de la protection des végétaux pour accomplir leur mission de contrôle des pesticides dans le cadre de la loi N° 87-17, aux importateurs, revendeurs et utilisateurs pour leur permettre de prendre connaissance des spécialités commerciales autorisées en Algérie. Chaque édition de l'Index est valable jusqu'à la parution d'une autre édition. L'Index de l'année 1999 correspond à la douzième édition.

L'Index décrit aussi les conditions principales d'utilisation des pesticides dans les différentes cultures, ainsi que les précautions d'usage pour leur emploi (protection du manipulateur).

L'acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique (2,4-D) est un herbicide largement utilisé dans l'agriculture en Algérie, notamment pour contrôler le développement des adventices des cultures céréalières (blé tendre, blé dure, orge, avoine, ...). Le 2,4-D est aussi préconisé pour des usages non agricoles qui consistent à éliminer les plantes indésirables le long des routes, les pelouses, les terrains industriels, les voies ferrées, les jardins et les terres non cultivées. Il est utilisé aussi pour détruire les plantes aquatiques indésirables. Ce produit est appliqué généralement sous forme de préparations de sels alcalins, de sels d'amine et d'esters.

Selon l'**Index des produits phytosanitaires (2005)**, les formes qui sont disponibles en Algérie sont :

- Le DESORMONE LOURD D (2,4-D ESTER 600 g/L) à la dose recommandée de 0,7 à 1 L/ha et le DAMINE 600 (2,4-D ESTER 600 g/L) avec une dose de 1 L/ha. Ces formulations sont utilisées pour lutter contre les adventices qui peuvent se développer dans les cultures de céréales d'hiver (blé tendre, blé dure, orge, avoine, et triticale) ;
- L'AGROXONE A (2,4-D ESTER BUTYL GLYCOL 600 g/L) à la dose recommandée de 1L/ha, utilisé contre les adventices non graminiformes des céréales ;
- L'ESTERYAM 60 (2,4-D ESTER 600 g/L) à la dose recommandée de 1,25 L/ha, utilisé contre les adventices des céréales d'été et d'hiver.

Pour obtenir de meilleurs résultats, l'application du produit doit être faite dans les premiers stades de développement des adventices lorsqu'elles sont juvéniles.

Le 2,4-D ainsi que le 2,4,5-T et le MCPA, ont été classés par le CIRC (Centre international de recherche sur le cancer) dans le groupe IIB (produits pouvant être cancérogènes pour les humains) (<http://dsp-psd.pwgsc.gc.ca/Collection/H48-10-1-40-1993F.pdf>).

Le 2,4-D peut contaminer les différents compartiments de l'environnement et notamment les eaux de surface et les nappes phréatiques par l'intermédiaire des effluents provenant du rinçage des pulvérisateurs utilisés pour les traitements des cultures et lors de déversements liés à sa fabrication et son transport, ainsi que directement, au moment de son utilisation comme agent détruisant les mauvaises herbes.

Le 2,4-D appliqué au champ peut se disperser dans l'environnement par le mouvement d'air (évaporation), d'eau de ruissellement (lixiviation), ou du sol, en particulier pendant des périodes de pluie, de forts vents, ou canicule.

Le devenir du 2,4-D dans le sol est affecté par plusieurs paramètres, et la dégradation par voie microbienne est reconnue comme étant le facteur le plus important. De nombreuses études ont été réalisées sur la photo et la biodégradation de cette molécule ainsi que sur d'autres herbicides de la même famille (**Stenson and Walker, 1956 ; Stenson and Walker, 1957 ; Djebbar et al., 1999; Zertal et al., 2001**).

En complément des recherches réalisées dans notre laboratoire sur la phototransformation du 2,4-D, nous nous sommes intéressés, dans ce travail, à l'étude de la biodégradation de cet herbicide dans les sols agricoles algériens.

I.A. 3 GENERALITES SUR LE 2,4-D

I.A. 3. 1 CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU 2,4-D

Le 2,4-D appartient à la famille des acides phénoxyalcanoïques dont la structure chimique de base est la suivante :

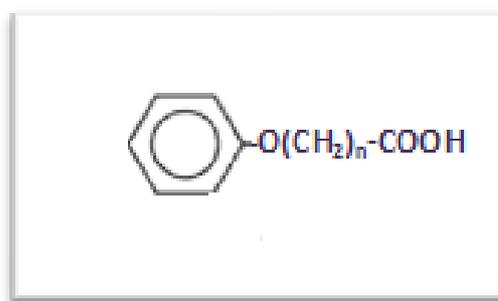
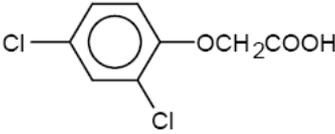


Figure I.A.3 : Formule commune des acides phénoxyalcanoïques

Quelques caractéristiques physico-chimiques du 2,4-D sont représentées dans le **tableau I.A.1**.

Tableau I.A.1 : Caractéristiques physico-chimique du 2,4-D

Nom commun	2,4-D	Références
• IUPAC	Acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique	OMS., 1970 Tomlin., 2004
• Formule empirique	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	
• Structure chimique		
• Masse molaire	221,04 g.mol ⁻¹	
• Etat physique	Podre cristalline blanche	
• Odeur	Odeur phénolique	
• Point de fusion	140,5°C	
• Point d'ébullition (53 Pa)	160,5°C	
• Densité à 20°C	1,563	
• Solubilité dans l'eau	620 ppm (25°C) 311 ppm (25°C) 900 ppm (25°C)	
• Solubilité dans les solvants	Ethanol (1250 g/kg) Toluène (6,7 g/kg) Xylène (5,8 g/kg) Heptane (1,1 g/kg) Ether diéthylique (243 g/kg)	Tomlin., 1994
• Pression de vapeur (160°C)	0,4 mm Hg	OMS., 1970
• Constante de dissociation (pKa)	2,64	Tomlin, 1994
• Coefficient K_{ow}	2,58-2,83	Tomlin, 1994
• Demi-vie DT ₅₀ (jours)	4-7 (dans la plupart des sols)	OMS., 2003
	Six semaines (les sols acides)	OMS., 2003
	14 - 41	Foster et Mckercher., 1973
	2 – 12 (17-25°C)	WSDE., 2001
	≈ deux semaines	Merini <i>et al.</i> , 2008

- Le 2,4-D est stable sous l'action de la chaleur (**Fiche technique toxicologique 208, INRS., 1987**).
- Dans les milieux aqueux naturels, le 2,4-D se trouve essentiellement sous la forme anionique ($pK_a=2,64$).
- Le 2,4-D est généralement formulé sous la forme d'esters, sel de sodium ou sel d'amines. Les formulations incluent des liquides, des poudres hydrosolubles, des granules, ou des granules de 2,4-D seuls ou mélangés avec d'autres herbicides tels que le Picloran et le Clopyralid.

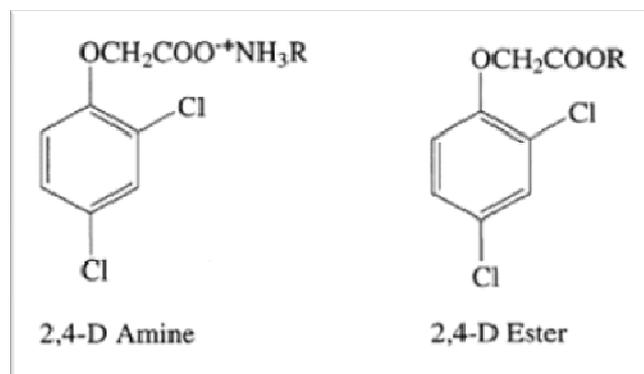


Figure I.A.4 : Formes commerciales du 2,4-D

- Après leur application dans le sol, les produits commerciaux sont rapidement converti à la même forme anionique (**Foster and McKercher, 1973 ; Wilson and Cheng, 1976 ; Sánchez-Brunete et al, 1996 ; Walters Johanna, (1998)**).

I.A. 3. 2 Mode d'action, sélectivité et toxicité du 2.4-D

Le mode d'action d'un herbicide est le mécanisme biochimique ou physique par lequel il détruit les plantes cibles. Cela comprend l'ensemble des phénomènes qui concourent à la destruction d'une plante sensible. (i) pénétration du produit dans le végétal, (ii) son déplacement vers son site d'action, (iii) son interaction avec sa cible biochimique, (iv) ses séquences physiologiques jusqu'à la mort de la plante, (iv) métabolisation de l'herbicide une fois qu'il a pénétré dans le végétal (**Gauvrit, 1996**).

Les herbicides peuvent agir avec différents modes d'action. Les plus communs sont :

- Action auxiniques (hormones).
- Inhibiteurs de la division cellulaire.
- Inhibiteurs de la photosynthèse.
- Inhibiteurs de la synthèse d'acides aminés.
- Inhibiteurs de la synthèse des lipides.

En se basant sur leur comportement vis-à-vis des végétaux, les herbicides sont divisés en trois types (**Fogarty and Tuovinen, 1991**) :

- ✓ herbicides « de contact », demeurant sur les organes traités (feuilles, tiges du végétal) ;
- ✓ herbicides « systémiques », absorbés par le tissu vasculaire et se déplacent à l'intérieur de la plante, soit par le xylème ou par le phloème ;
- ✓ herbicides stérilisants, appliqués directement dans le sol, ils inhibent la germination des adventices.

Ils peuvent aussi être classés sur la base de la synchronisation de leur application :

- ✓ les herbicides « pré-émergents » qui sont appliqués sur le sol avant que les adventices ne germent afin de perturber leur germination ou de tuer les plantules adventices ;
- ✓ les herbicides « post-émergents » sont appliqués directement sur les cultures et/ou plante.

Le 2,4-D est un herbicide post-émergent sélectif et systémique (**Bailey, 1969; McCalla et al., 2004 ; Hall et Swanton, 1988**), étant très mobile il est transporté dans la plante par le phloème (**Figure I.A.3**).

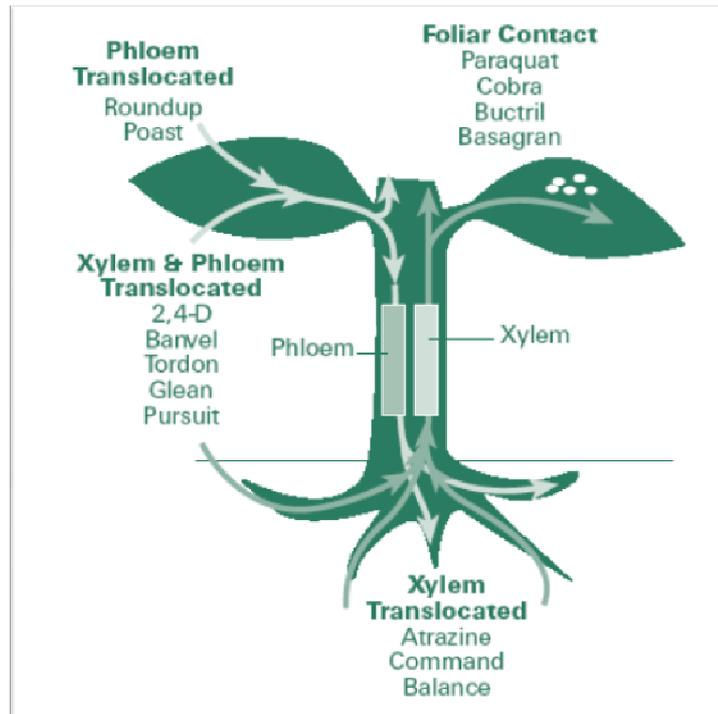


Figure I.A.5 : Translocation des herbicides et notamment du 2,4-D dans les plantes (<http://www.oznet.ksu.edu/library/crpsl2/c715.pdf>)

Le 2,4-D est généralement appliqué sur les cultures ou directement sur le sol soit sous forme aqueuse ou granulaire respectivement.

Le 2,4-D est un analogue structural de l'hormone végétale acide indole acétique (Auxine). Il agit par conséquent comme un régulateur de la croissance des plantes en contrôlant l'élongation et la division des cellules (Lloyd *et al.*, 1980 ; Charles *et al.*, 1996 ; Campanoni and Nick, 2005 ; Christian *et al.*, 2008). A fortes concentrations, l'auxine comme le 2,4-D peut aussi être utilisée comme herbicide sélectif.

Le mode d'action exact du 2,4-D comme herbicide n'est pas encore connu. Il cause plusieurs effets qui, conjugués, conduisent à la mort de la plante (Tu *et al.*, 2001).

Lloyd *et al.*, 1980 ont étudié l'influence du 2,4-D sur l'élongation des cellules de carotte. Ils ont montré que la division et l'élongation des cellules étaient fortement liées et énormément perturbées par les concentrations élevées du 2,4-D.

La sélectivité du 2,4-D pour les dicotylédones, a été prouvée par plusieurs auteurs (Leguay and Guern, 1977 ; Hall et Swanton, 1988).

La toxicité du 2,4-D, ainsi que d'autres pesticides est la capacité de ces molécules de causer des maladies ou des problèmes de santé. Elle dépend de plusieurs facteurs en particulier la quantité de la substance active (dose toxique).

Le terme «exposition au 2,4-D» signifie habituellement que cette molécule a pénétré dans l'organisme par l'une des trois voies suivantes : ingestion (voie orale), inhalation ou cutanée (contact avec la peau).

Plus de 60 études de toxicologie ont été entrepris par le groupe *Industry Task Force II*. Les résultats obtenus ont montré que les différentes formes de 2,4-D présentent une toxicologie presque semblable (**Bus and Hammond, 2007**).

Les études de toxicité aiguë disponibles indiquent que le 2,4-D est faiblement à légèrement toxique pour les voies d'expositions orale, cutanée ou par inhalation (**Samuel et al., 2006**).

D'après cette référence,

- l'inhalation peut causer une sensation de brûlure dans la gorge et la poitrine, faiblesse, perte d'appétit, perte de poids, sudation, mictions réduites, étourdissements, perte de coordination, hémorragie gastro-intestinale et effets sur le système nerveux ;
- l'exposition cutanée peut causer des nausées, vomissements, diarrhée, maux de tête, étourdissements, faiblesse, perte de réflexes de certains muscles, sensation de douleur et de brûlures et picotements aux extrémités ;
- l'ingestion peut causer les mêmes effets et en plus, selon le degré d'exposition, des brûlures douloureuses de la langue, la gorge et l'estomac, une température corporelle anormale, de la léthargie, une paralysie, de la congestion des organes internes, des dommages au cerveau, de l'œdème pulmonaire, des convulsions, des pertes de réflexes, de l'hypotonie et le coma.

I-B. Devenir du 2,4-D dans l'environnement

I.B.1. Ecodynamique du 2,4-D dans les principaux compartiments environnementaux

Lorsque le pesticide est appliqué sur la parcelle agricole, il est soumis à de nombreux processus : sédimentation, adsorption, volatilisation, dégradation chimique et dégradation biologique. Ainsi appliqués dans les agro-systèmes, les pesticides se dispersent dans les différents compartiments de l'environnement (**Figure I.B.1**) : Eau, air, sol et biota (organismes vivants) (**Linde, 1994**).

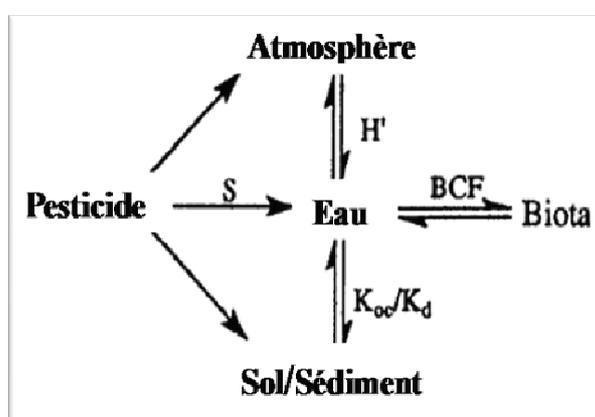


Figure I.B.1 : Dispersion des pesticides dans les différents compartiments environnementaux. S: Solubilité, BCF: facteur de bioconcentration (**Linde, 1994**)

En général, les processus de dégradation chimiques se produisent dans l'eau ou l'atmosphère soit par oxydation, réduction, hydrolyse, soit par photolyse. Les mécanismes biologiques dans le sol et les organismes vivants contribuent à la biodégradation des pesticides par oxydation, réduction, hydrolyse ou conjugaison moléculaire (**Linde, 1994**).

La fraction de pesticide entrant dans chaque compartiment de l'environnement dépend de ses propriétés physico-chimiques, de celles du sol, de la méthode de traitement, du biote et des conditions pédoclimatiques (**Gavrilescu, 2005**). L'effet de certains facteurs, tel que les substances humiques, ont été étudiés et approuvés (**Su, 1980**).

La **Figure I.B.2** présente les principaux processus impliqués dans le comportement des pesticides après leur application au sol ou aux plantes (**Bedos et al., 2002**).

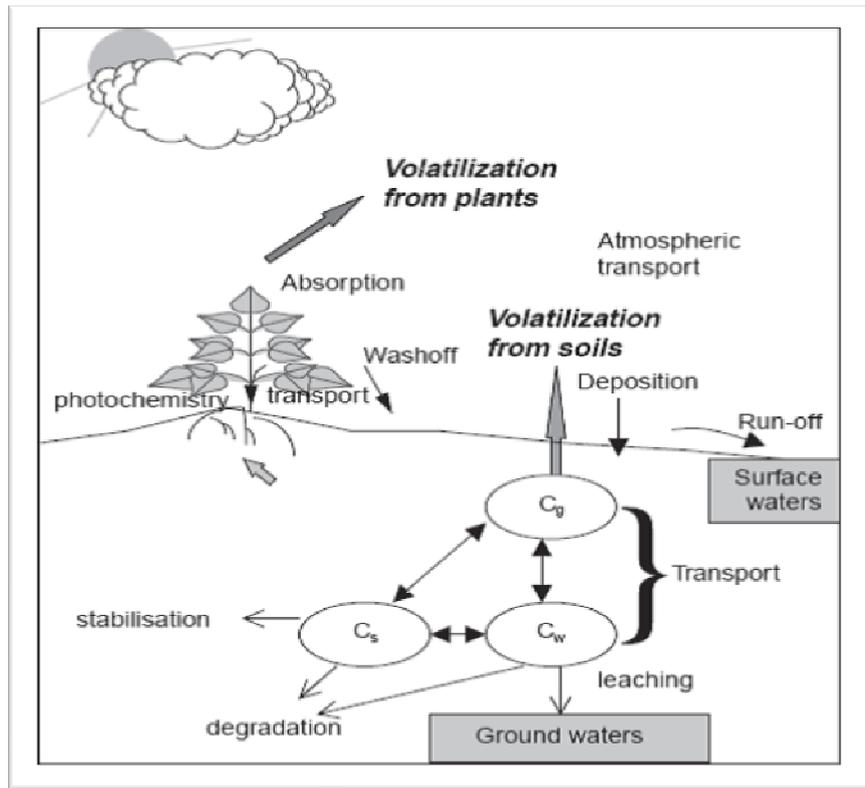


Figure I.B.2 : Principaux processus impliqués dans le comportement des pesticides après leur application. C_g , C_w et C_s représentent les concentrations de pesticide dans les phases gaz, aqueuses et solides respectivement (Bedos *et al.*, 2002).

La contamination de l'atmosphère par le 2,4-D et par d'autres pesticides a été rapportée dans de nombreux études (Grover *et al.*, 1976 ; Foreman *et al.*, 2000 ; Nishioka *et al.*, 2001 ; Waite *et al.*, 2002 ; Baraud *et al.*, 2003 ; Wait *et al.*, 2005 ; Yao *et al.*, 2007 ; Qiu *et al.*, 2008). Elle est considérée comme un problème majeur de l'agriculture moderne. Malheureusement, la réversibilité de ses effets sur l'environnement et la santé des animaux et des hommes reste peu documenter à ce jour (Gil et Sinfort, 2005).

La contamination de l'air résulte de plusieurs phénomènes différents : (i) la dérive (ou spray-drift) dans lequel les gouttelettes les plus fines forment d'aérosols voyageant sur de longues distances ; (ii) la volatilisation de *post-application* et iii) l'érosion éolienne des sols traités (Yao et al, 2006).

Une fois dans l'atmosphère, les produits phytosanitaires volatilisés peuvent revenir au sol via les précipitations. Tandis que les phytoparticulaires retombent sur le sol.

Dans l'atmosphère les phytoparticulaires sont souvent dégradés partiellement par voie photochimique.

Par ailleurs, le 2,4-D ainsi que d'autres herbicides et leurs principaux métabolites sont fréquemment détectés dans les eaux superficielles et souterraines à des concentrations variables (**Asma Aleem, Abdul Malik, 2005 ; Woudneh et al., 2006**).

Dans certains cas, les pesticides sont appliqués directement sur les eaux de surface pour le contrôle des algues, macrophytes, insectes, parasites des poissons, et parfois même les poissons eux-mêmes (**Larson et al., 1998**).

Le niveau de contamination des ressources en eau diffère d'un site à un autre. Dans le but de limiter la contamination des ressources en eau plusieurs décrets ont été élaborés. Ainsi, l'Union Européen a fixé la concentration maximale acceptable dans l'eau potable à 0,5 µg/L pour le total de tous les pesticides et à 0,1 µg/L pour chaque pesticide (**Gan and Bondarenko, 1996**).

Le 2,4-D peut s'introduire dans l'environnement soit par l'intermédiaire des effluents, lors des déversements liés à sa fabrication et son transport (pollution ponctuelle), soit directement au moment de son utilisation comme herbicide (contamination diffuse).

Les données disponibles indiquent que les résidus de 2,4-D excèdent rarement 1 mg/kg dans le sol, plusieurs µg/litre dans l'eau, plusieurs µg/m³ dans l'air et quelques mg/kg dans les sources de nourriture (**OMS, 1984**).

La **Figure I.B.3** montre les principaux mécanismes gouvernant le devenir du 2,4-D dans l'environnement.

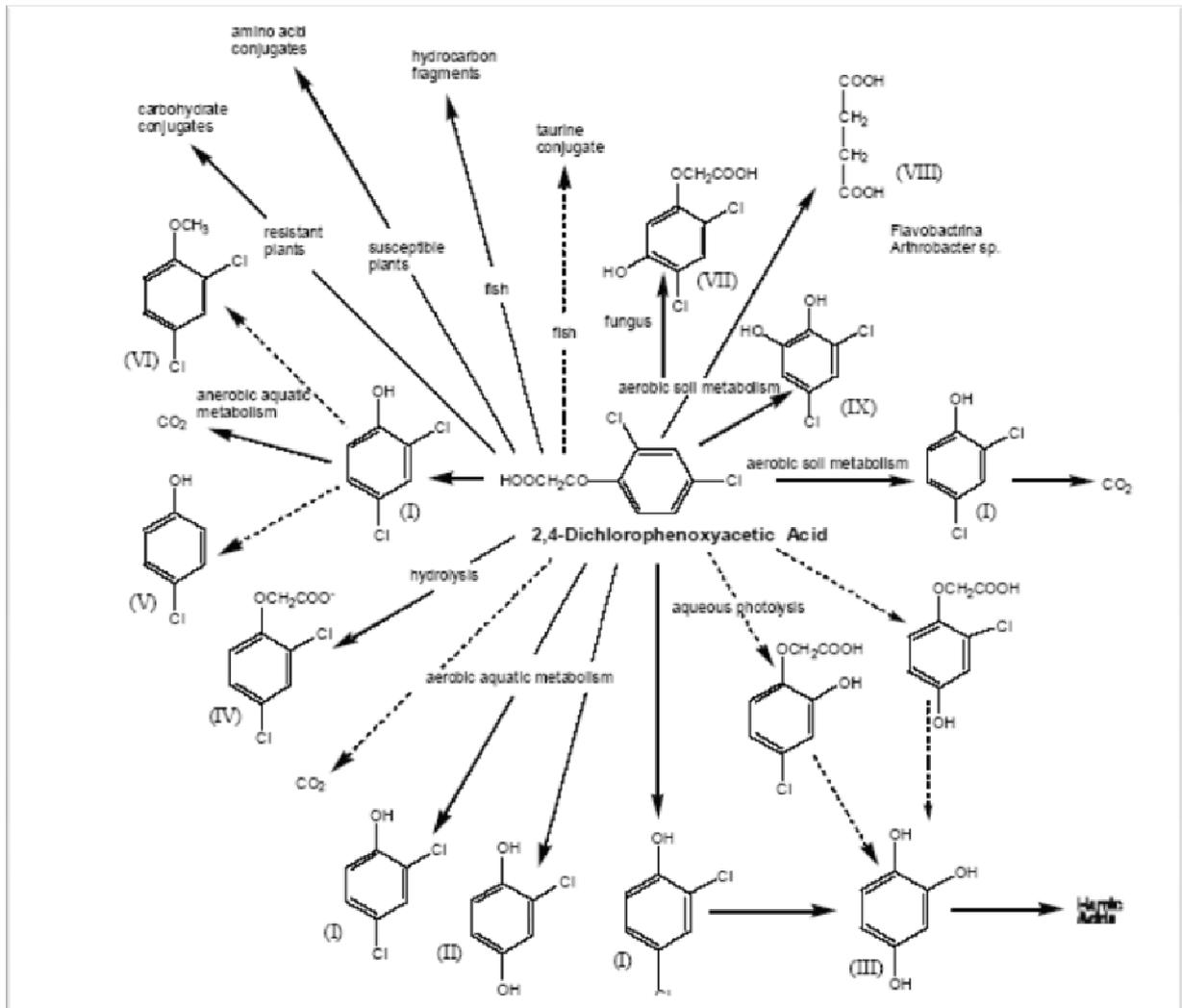


Figure I.B.3 : Principaux mécanismes gouvernant le 2,4-D dans l'environnement (Walters Johanna, 1998)

I-B.2 Devenir du 2,4-D dans le sol

Le sol est un écosystème complexe hétérogène et oligotrophe hébergeant une communauté vivante constituée de micro et macro-organismes (Racke *et al.*, 1997).

Les sols sont classés en divers groupes en fonction de leur composition physicochimique, du climat et de la végétation. Ils peuvent également être définis par des techniques pédologiques, qui consistent à organiser le sol en pratiquant une carotte ou une coupe verticale (Figure I.B.4).

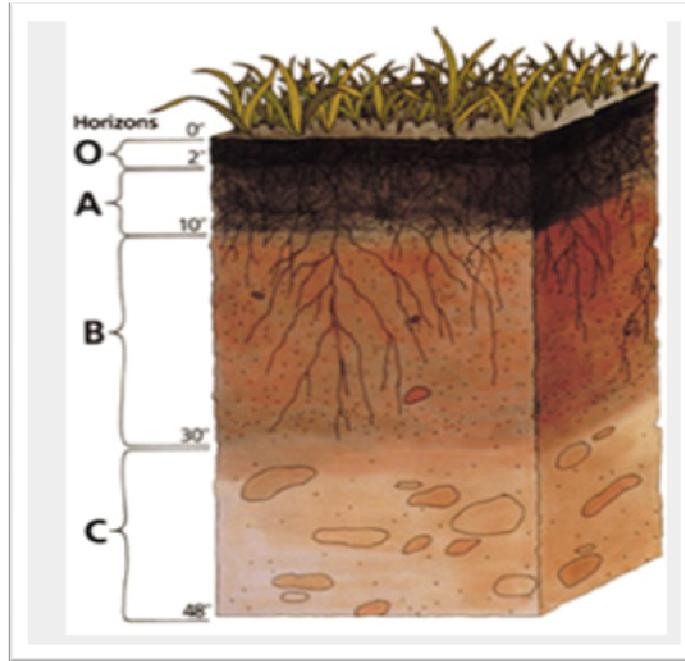


Figure I.B.4 : Les horizons du sol
 (http://soils.usda.gov/education/resources/k_12/lessons/profile/)

L'identification des horizons se fait par une simple numérotation décomptée depuis l'horizon de surface vers l'horizon profond, ainsi l'horizon situé à la surface est de couleur foncée en raison de sa richesse en matière organique. L'horizon A, caractérisé par l'incorporation de matière organique humifiée. Généralement illuvial. L'horizon B, plus profond, est une zone caractérisée par l'accumulation d'argile silicatée, de fer et d'aluminium. L'horizon C, est un horizon minéral généralement non consolidés ou faiblement consolidés qui conserve la structure de roche (Coleman *et al.*, 2004., Perry *et al.*, 2004 ; Bardgett, 2005).

La composante biologique du sol, au-delà des systèmes racinaires des plantes, est constituée de la macrofaune (vers de terre,..) microfaune (nématodes,...) mais aussi de la composante microbienne comprenant bactéries, champignons et algues. Les bactéries sont les plus représentants et les plus importants de ces microcosmes (Meyer *et al.*, 1984).

Dejonghe *et al.*, 2000 ont déterminé l'activité microbienne dans les deux horizons A et B par des mesures de CO₂ provenant de la respiration du sol. Ils ont trouvé que cette activité dans l'horizon A est de 1,97 mg de C-CO₂.kg de sol⁻¹.jour⁻¹. Dans l'horizon B, cette valeur diminue jusqu'à 0,52 mg de C-CO₂.kg de Sol⁻¹.jour⁻¹.

Par ailleurs, **Dictor et Soulas, 1992** ont observé une augmentation de la température avec la profondeur. Cette dernière suit les fluctuations de température de l'air mais elle reste stable à cinq mètres de profondeur.

En ce qui concerne la présence des pesticides dans les sols, les molécules peuvent atteindre ce compartiment par différentes manières (**Sánchez-Brunete et al., 1996**) :

- ❖ par application directe dans le sol ;
- ❖ indirectement, quand les fractions de pesticide sont appliquées sur la partie aérienne des plantes ou par transport à partir des autres compartiments, par exemple, avec l'eau d'irrigation ou par le dépôt atmosphérique.

Les principaux processus affectant le devenir des pesticides dans le sol sont réalisés dans les horizons supérieurs caractérisés par une activité biologique très élevée. Ainsi, **Galiulin et al., 2001** ont constaté que la biodégradation du 2,4-D dans le sol de la région côtière du fleuve Oka (Russie) était plus rapide dans la couche superficielle (0 à 20 centimètres) que dans la couche profonde (40 à 50 centimètres).

Chaque herbicide présente une persistance variable dans les sols, encore appelée demi-vie (temps nécessaire pour transformer 50% de l'herbicide). Le temps de demi-vie ($t_{1/2}$) dépend de plusieurs facteurs : propriétés de la molécule, propriétés physico-chimique du sol, activité biologique et conditions environnementales. Elle est calculée comme suit (**Weed et al., 1995**) :

$$C = C_0 e^{-kt}$$

C : quantité de pesticide dans le sol au temps t ,
C₀ : quantité de pesticide dans le sol au temps $t = 0$,
k : constante de vitesse de disparition,
t : temps.

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

En général, le 2,4-D est caractérisé par une demi-vie relativement courte dans les sols (**Foster et McKercher, 1973**). Il est absorbé soit par les plantes ou par les particules du sol, ou dégradé biotiquement ou, par d'autres facteurs, abiotiquement. La minéralisation totale du 2,4-D conduit à la formation de CO₂, H₂O et d'ions chlorure (**Li-Tse et al., 1978**).

La capacité des plantes à dégrader les herbicides de la famille des acides phénoxyalkyls a été étudiée depuis les années cinquante (**Weintraub *et al.*, 1951 ; Fang and Butts, 1953; Crosby, 1964 ; Hamilton *et al.*, 1971**). Trois mécanismes de dégradation ont été proposés :

- dégradation de la chaîne latérale,
- hydroxylation du cycle aromatique,
- conjugaison avec les constituants de la plante (**Loos, 1969**).

Le pesticide et/ou ses produits de transformation peuvent interagir avec les constituants du sol pour former des résidus « non extractibles » (**Grebil *et al.*, 2001**). Ces derniers ainsi que les résidus extractibles « non liés et non dégradés » conditionnent le transfert de ces molécules dans le sol et leur biodisponibilité aux microorganismes dégradants. Ce conditionnement dépend de plusieurs facteurs tels que la teneur en matière organique, le pH du sol, le limon et l'argile (**Bolan and Baskaran, 1996 ; Picton et Farenhorst, 2004 ; Farenhorst *et al.*, 2001 ; Rodriguez-Rubio *et al.*, 2006**).

L'adsorption du 2,4-D sur les particules du sol peut être influencée par d'autres facteurs spécifiques tels que la présence du phosphate, d'aluminium échangeable ou encore de chlorure mercurique (**Stephens *et al.*, 2002 ; Vasudevan et Cooper, 2004**).

I-B. 3 Dégradation du 2,4-D par les microorganismes

Au laboratoire, l'étude de la dégradation microbiologique des herbicides consiste à suivre la disparition de la molécule mère en déterminant sa concentration résiduelle et à suivre l'apparition et la disparition des molécules filles.

La transformation du pesticide ne signifie pas nécessairement que le danger pour l'environnement est réduit, puisque par voie co-métabolique il peut être converti en d'autres formes non détectables, mais pouvant présenter dans certains cas une toxicité supérieure à celle du composé initial (**Fogarty and Tuovinen, 1991**).

Il est à noter que trois stratégies principales de la dégradation des pesticides sont exhibées par les microorganismes : Catabolisme, Co-métabolisme, et les enzymes sécrétées dans les sols (**Soulas *et al.*, 1983 ; Coats, 1990**).

- Le catabolisme est l'ensemble des processus qui permettent la réduction des pesticides en éléments simples, avec libération d'énergie. Les microorganismes utilisent ces

molécules comme source de carbone et d'énergie, c'est-à-dire le produit final de cette dégradation peut être utilisé pour la synthèse de certaines macromolécules cellulaires essentielles.

- Le co-métabolisme est la biotransformation d'une molécule de pesticide coïncidente aux fonctions métaboliques normales du processus de la vie microbienne (croissance, reproduction, dispersion), c'est-à-dire la transformation de cette molécule n'est pas nécessaire pour la vie des microorganismes. Ce phénomène dépend principalement de la présence des microorganismes dégradants et de la source d'énergie nécessaire pour leur prolifération (**Torstensson, 1977**).

Plusieurs chercheurs ont essayé d'exploiter le co-métabolisme pour stimuler ou augmenter la biodégradation des herbicides. Certains d'entre eux ont arrivé à diminuer le temps de la dégradation du 2,4-D par l'addition d'autres sources de carbone et d'énergie aux microorganismes dégradants (**Kunc et al., 1984 ; Kunc et Rybářová 1984**).

Les différentes transformations que subissent les fractions organiques du sol et les xénobiotiques ne sont pas seulement le fait de microorganismes vivants, mais aussi d'enzymes diverses qui interviennent indépendamment de ces microorganismes (**Dommergues et Mangénot, 1970**). Les enzymes du sol proviennent non seulement de la microflore mais aussi de la végétation et de la microfaune. Elles se trouvent sous trois états : libres, adsorbées sur les colloïdes et renfermées dans des cellules mortes ou des fragments cellulaires.

La biodégradation du 2,4-D catalysée par les microorganismes du sol est le principale mécanisme de la disparition de cette herbicide (**Walters Johanna, 1998 ; Tu et al., 2001**). La vitesse de cette dégradation varie selon deux facteurs essentiels, la taille de la population microbienne dégradante et la concentration de la molécule elle-même (**Hemmett and Faust, 1969 ; Voos and Groffman, 1997**).

Soulas, 1991 a observé clairement l'existence de deux populations dégradantes. La première intervient dès le premier raclement avec cet herbicide ; elle est particulièrement efficace à faible concentration. A forte concentration, son activité régresse au profit d'une seconde population qui se manifeste plus tardivement en raison d'une taille initiale plus faible et qui nécessite sa multiplication préalable.

Les souches microbiennes dégradant le 2,4-D, décrites dans la littérature, appartiennent à différents genres, tels que : *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Mycoplana*, *Flavobacterium*, *Sporocytophaga*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Variovorax*, *Mesorhizobium* and *Bradyrhizobium* (Steenson and Walker, 1956 ; Loos, 1969 ; Evans *et al.*, 1971; Chaudhry et Chapalamadugu, 1991; KA *et al.*,1994; Fulthorpe *et al.*, 1996; Kamagata *et al.*, 1997; Vallaeys *et al.*, 1998 ; Macur *et al.*, 2007).

Ces genres appartiennent à trois sous-groupes (Kamagata *et al.*, 1997., Lindberg, 2007 ; Bælum *et al.*, 2006; Huong *et al.*, 2007) :

- Le premier groupe appartient au β et au γ - *Proteobacteria* (*Achromobacter*, *Burkholderia*, *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Variovorax*). Dans ce groupe les gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC* sont semblables, 76, 34 et 55% respectivement, à ceux qui sont dans la souche *Alcaligenes eutrophus* JMP134.
- Le deuxième et le troisième groupe qui forment l' α -*Proteobacteria* comprennent des bactéries appartenant au genre *Sphingomonas* et *Bradyrhizobium*, respectivement.

La taille de la communauté microbienne dégradant le 2,4-D peut être augmentée sous l'effet d'un traitement répété par cet herbicide (Smith and Aubin, 1991 ; Robertson et Alexander, 1994). Ce phénomène, appelé aussi biodégradation accélérée, est le résultat de l'interaction microflore- herbicides- sol. La biodégradation accélérée résulte (i) du développement de la communauté préexistante ou encore (ii) de l'apparition de nouvelles capacités métaboliques suite à des mutations (Charnay et Fournier, 1991).

I-B.4 Facteurs affectant l'écodynamique du 2,4-D dans le sol

Les principaux facteurs gouvernant l'écodynamique d'un composé organique xénobiotique dans un sol sont représentés dans la **Figure I.B.5**.

Cette figure suggère que le devenir d'un pesticide dans le sol est affecté par trois composantes essentielles :

- (i) propriétés physico-chimiques de la molécule et sa disponibilité comme substrat,
- (ii) propriétés physico-chimiques, paramètres biologiques et paramètres microbiologiques du sol,
- (iii) conditions climatiques.

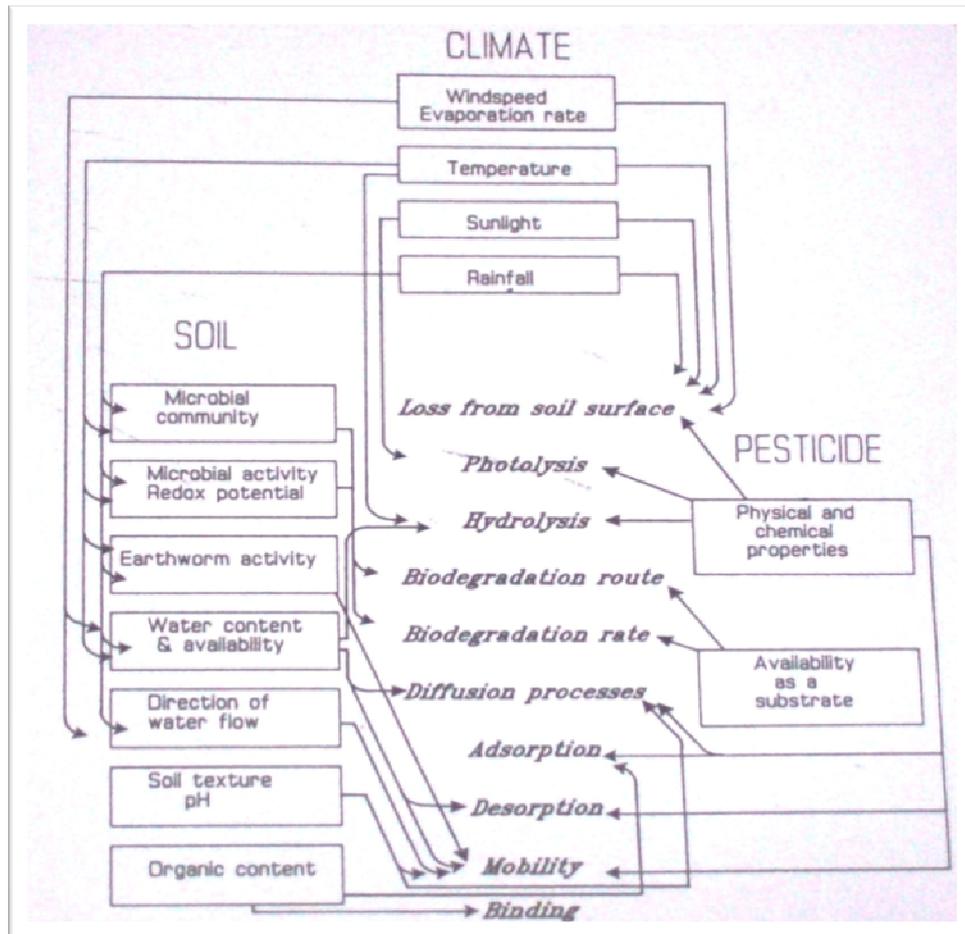


Figure I.B.5 : Les différentes interactions affectant le devenir des pesticides dans les sols (Arnold et Briggs, 1990)

I-B.4. 1 Effet des propriétés physico-chimiques de l'herbicide et sa disponibilité comme substrat

Les propriétés physico-chimiques, qui diffèrent d'un herbicide à un autre, jouent un rôle très important dans le devenir de ces produits dans le sol. Elles peuvent être l'origine de trois phénomènes essentiels : (i) adsorption/désorption, (ii) dissipation (photolyse, biodégradation, ...), (iii) volatilisation.

Par exemple, la solubilité dans l'eau a un effet majeur sur le ruissellement et la lixiviation des produits phytosanitaires contaminant les eaux de surface et les nappes phréatiques respectivement. La solubilité des produits conditionne aussi leur biodisponibilité aux communautés microbiennes dégradantes, jouant sur leur persistance.

Ainsi des substances non polaires tels que certains pesticides aromatiques, voient leur biodisponibilité augmenter via leur transport facilité à travers les membranes cellulaires dues à des coefficients de partition et aux conditions dynamiques d'équilibres favorables (**Fogarty and Tuovinen, 1991**).

D'après **MacRea and Alexander (1965)**, la persistance des dichlorophénols, en raison de leur résistance à la biodégradation, est essentiellement due à la présence du chlore en position méta de l'hydroxyle phénolique.

Norris and Greiner (1967), ont observé l'importance de la formulation du 2,4-D sur sa biodégradation.

L'augmentation de la dose du 2,4-D modifie par ailleurs sa cinétique de dégradation. Elle peut être la cause de l'apparition d'une longue phase de latence (**Soulas et Fournier 1987**).

Bedos et al, 2002 ont observé que la volatilisation des produits phytosanitaires appliqués sur le sol ou les cultures peut représenter une voie de dissipation majeure, pouvant atteindre dans certains cas 90 % de la dose appliquée, et les facteurs clés conditionnant ce processus sont les caractéristiques physico-chimiques du composé, ainsi que les conditions environnementales (température, contenu en eau du sol, nature du sol et de la culture) et les pratiques culturales.

I-B.4. 2 Effet des propriétés physico-chimiques du sol

La dégradation du 2,4-D diffère d'un sol à un autre, elle dépend principalement de la composition physico-chimique de chaque type du sol (**Li-Tse et al., 1978 ; Picton et Farenhorst, 2004 ; Khoury et al., 2006**).

Généralement la différence de minéralisation de cette molécule ainsi que d'autres herbicides observée entre les sols est attribuée à plusieurs facteurs telles que : la matière organique, le carbone organique, le pH, la teneur en argile, la teneur en eau, le rapport C/N, la texture du sol et l'activité microbienne (**Audus, 1952 ; Seibert et al., 1982 ; Fogarty and Tuovinen, 1991 ; Bolan and Baskaran, 1996 ; Khoury et al., 2006**).

Il est à noter que le carbone organique est un facteur très important. Il peut favoriser la dégradation des herbicides, en particulier si leur quantité excède le 12% des constituants du sol (**Bolan and Baskaran, 1996 ; Picton et Farenhorst. (2004)**). Ceci peut être lié à l'activité biologique du sol.

Le rapport C/N est un autre facteur qui caractérise surtout les sols agricoles. Il influence le pH du sol et l'activité microbienne (**Fogarty and Tuovinen, 1991**).

L'adsorption des herbicides par les particules du sol et par d'autres substances particulières peut diminuer la possibilité de contact entre ces molécules et les microorganismes dégradants. Cependant, elle peut aussi diminuer la concentration résiduelle nécessaire pour l'induction des systèmes enzymatiques dégradants (**Fogarty and Tuovinen, 1991**).

I-B.4. 3 Effet des conditions climatiques

Les conditions climatiques ont une grande influence sur la prolifération des microorganismes telluriques et par conséquent sur le taux de dégradation des herbicides (**Torstensson et al, 1975 ; Vischetti et al 2000**).

I-B.4. 3. 1 Température

La température du sol est un facteur très important qui affecte sérieusement le devenir et la persistance des pesticides dans les champs (**Audus, 1952**).

Les différences régionales importantes de température du sol sont principalement déterminées par les variables météorologiques tels le rayonnement solaire, la température de l'air et les précipitations; par ailleurs, les variations locales ou faibles résultent des différences des sols, des caractéristiques de surface et des propriétés thermiques des sols (**Williams et Gold, 1977**).

Comme il été signalé précédemment (§**I-B.2**), la température du sol augmente avec la profondeur jusqu'à 5 mètres.

En sachant que l'essentiel de l'activité microbienne du sol se concentre dans les premiers centimètres du sol (0 - 40 cm), **Dictor et Solas, 1992** ont trouvé que le niveau de la microflore totale et celui des bactéries aérobies variaient peu (respectivement, 10^6 - 10^7 et 10^5 germes/g de sol en surface et en profondeur). La population fongique est de l'ordre de 10^4 colonies/g de sol en surface et disparaît au-delà de 1,5 m.

Sur la base de leur activité optimale en fonction de la température, les microorganismes sont classés en trois groupes : psychotrophiles (température de croissance entre 10°C et 15°C), mésophiles (20°C-40°C) et thermophiles (45°C-70°C).

L'effet de la température sur la biodégradation du 2,4-D ainsi que sur d'autres herbicides a été étudié soit dans le laboratoire ou dans le champ. Ces études ont montré que ce processus est étroitement lié à la température du sol (**Walker, 1976 ; Veeh et al., 1996 ; El Sebai et al., 2010**).

Dans un autre travail de recherche sur le 2,4-D et d'autres acides phénoxyalcanoïques, **Smith et al., 1994** ont montré que la température optimale de leur biodégradation dans un milieu minéral est située entre 20°C et 30°C.

Enfin, la température semble agir directement sur les processus biochimiques de base de la vie des microorganismes dégradants (**Richter et al., 1996**).

III.4.3.2 Aération

Pour une dégradation optimale des pesticides, les microorganismes dégradant aérobies nécessitent un milieu qui soit bien oxygéné. Ainsi, la dégradation des herbicides aromatiques est plus efficace dans les conditions aérobies.

Le clivage du cycle benzénique par les microorganismes nécessite la présence d'oxygène (accepteur des électrons) dont l'activité des oxygénases dépend. Ces enzymes sont responsables de l'ouverture du cycle benzénique essentiel à la minéralisation totale du 2,4-D.

D'après **Fogarty and Tuovinen, 1991** l'aération a des fonctions multiples :

- (i) elle fournit l'oxygène pour soutenir le métabolisme aérobie (fonction d'oxygénase et respiration aérobie),
- (ii) elle contrôle la température,
- (iii) elle contrôle l'humidité du sol aussi bien que le CO₂ et d'autres gaz.

L'aération excessive limite l'activité microbienne en raison de l'humidité réduite et du refroidissement associé (**Fogarty and Tuovinen, 1991**). Cela dépend des conditions climatiques du sol.

III.4.3.3 Humidité

L'eau est un élément indispensable pour les différentes réactions biochimiques, et par conséquent il est parmi les facteurs les plus importants qui limitent l'activité des microorganismes et la dégradation des pesticides dans le sol.

Par exemple dans les sols arides traités par les herbicides de nature hormonale, l'humidité faible peut maintenir la toxicité de ces produits jusqu'à plus d'un an, alors que dans les sols humides elle ne dépasse pas quelques semaines (**Audus, 1952**).

L'humidité du sol peut influencer sur les taux de biodégradation des herbicides, soit directement par inhibition de l'activité microbienne ou indirectement en affectant la disponibilité du substrat (**Shelton and Parkin, 1991**).

L'humidité excessive empêche le métabolisme aérobie en raison des limitations de diffusion de l'oxygène (**Fogarty and Tuovinen, 1991 ; Wilke, 2005**).

Dans le cas du 2,4-D, l'effet de l'humidité du sol sur sa biodégradation, comme celui de la température, a été également étudié et confirmé (**Parker and Doxtader, 1983., Ok Han and New, 1994., William et al., 1995., Shymko and Farenhorst, 2008**).

Selon **Parker and Doxtader, 1983**, la biodégradation du 2,4-D est fortement affectée par l'humidité en raison de l'impact remarquable de ce paramètre sur l'activité des micro-organismes dégradants et la concentration du substrat.

Enfin, dans une étude sur la disponibilité de l'eau pour la biodégradation du 2,4-D, **Han and New, 1994** ont montré que la communauté des micro-organismes dégradants cet herbicide était beaucoup plus sensible aux conditions sèches que la communauté des aérobie hétérotrophes culturales.

I.C - Base génétique et méthodes de biologie moléculaire

I.C.1 Base génétique de la biodégradation de 2,4-D

Comme tous les êtres vivants, les microorganismes responsables de la dégradation de 2,4-D sont capables de se reproduire, c'est-à-dire de se multiplier. La reproduction conforme nécessite la présence d'une mémoire qui contient les informations permettant l'expression des propriétés et potentialité de l'espèce et qui soit transmise héréditairement. Cette mémoire est sauvegardée au niveau d'un ensemble de structures spécialisées : le matériel génétique (**Guiraud, 1993**).

Chez les microorganismes procaryotes, le matériel génétique principal est constitué par une seule structure bicaténaire d'ADN appelée Chromosome, il est circulaire.

A côté du chromosome, la bactérie peut contenir d'autres éléments génétiques non chromosomiques tels que les virus, les plasmides, les génomes organelles et les éléments transposables (**Madigan and Martinko, 2007**).

La grande majorité des *plasmides* sont des ADN bicaténaire circulaire, ils se répliquent indépendamment et plus rapidement que le chromosome bactérien (**Madigan and Martinko, 2007**).

Certains plasmides sont présents dans la cellule à seulement de 1 à 3 copies, tandis que d'autres peuvent être présents à plus de 100 copies (**Madigan and Martinko, 2007**).

La transmission des plasmides de cellule à cellule se fait selon deux types de mécanismes :

- (i) Les plasmides conjugatifs de grande taille (plus de 30 Kb) qui sont transmis par conjugaison bactérienne entre deux cellules (contact sans fusion). Les gènes codant la dégradation du 2,4-D sont souvent localisés sur des plasmides conjugatifs (**Don and Pemberton, 1981 ; Friedrich et al., 1983 ; Fulthorpe et al., 1995**),
- (ii) Les plasmides non conjugatif qui sont transmis uniquement par un processus de transformation.

Les plasmides portent des gènes responsables de la production de toxines, facteurs de virulence, facteurs d'induction de tumeurs chez les plantes, antibiotiques, ...gènes qui confèrent aux bactéries hôtes la capacité de dégrader les xénobiotiques récalcitrants (appelés également dégradative plasmids).

Le rôle des plasmides dans la dégradation des pesticides a été discuté pour la première fois par **Pemberton and Fisher, 1977** et qui ont démontré qu'un plasmide/ou plasmides était(ent) impliqué(s) dans la dégradation du 2,4-D.

En générale, deux voies cataboliques principales sont proposées pour le 2,4-D. La première commence par la lyse du résidu carboxy de la chaîne latérale aboutissant à la formation du glyoxylate et du 2,4-DCP. La deuxième est caractérisée par l'hydroxylation en position 6 du 2,4-D, suivi par le détachement de la chaîne latérale d'acétate en formant le 3,5-dichlorocathéchol (**Amy et al., 1985**). Le chlore est enlevé par déshalogénéation réductrice (**Figure I.C.5**).

Les bactéries utilisant le 2,4-D comme source de carbone pour leur croissance libèrent des ions Cl^- et provoquent ainsi l'acidification du milieu de culture. A titre d'exemple, le pH diminue de 7,4 à 5 (**Evans et al., 1971**).

Les enzymes clefs du métabolisme des phénols sont des oxygénases catalysant la fixation de l'oxygène sur le substrat ou bien des oxydases transférant à l'oxygène les électrons arrachés au substrat avec formation d'eau.

Ils existent deux types d'oxygénases :

- Mono-oxygénases : encore parfois appelées hydroxylases qui fixent un ou deux atomes d'une molécule d'oxygène sur le substrat et réduisent le second à l'état d'eau en même temps que l'oxydation d'un cofacteur souvent NAD ou NADP. Leur action fait ainsi apparaître une fonction phénol. Cette dernière peut encore résulter de l'hydrolyse d'un groupement méthoxy ($-\text{OCH}_3 \longrightarrow \text{OH}$).
- Dioxygénases : l'ouverture du cycle benzénique est assurée par l'action des dioxygénases sur le cycle phénolique. La coupure peut se faire en « ortho » entre les deux fonctions phénols (o-diphénols) ou bien en « méta » entre des fonctions phénols et l'atome de carbone voisin.

La dégradation aérobie de 2,4-D a été caractérisée en extenso chez *Ralstonia eutropha* (autrefois *Ralstonia metallidurans* et *Alcaligenes eutrophus*) JMP 134, présentant le plasmide pJP4 (environ 80 Kb) (**Figure I.C.1**). Cette bactérie est devenue le modèle pour l'étude des voies enzymatiques et la régulation génétique du métabolisme des composés aromatiques halogénés (**DiGiovanni et al., 1996 ; Pepper et al., 2002; Goris, 2003**).

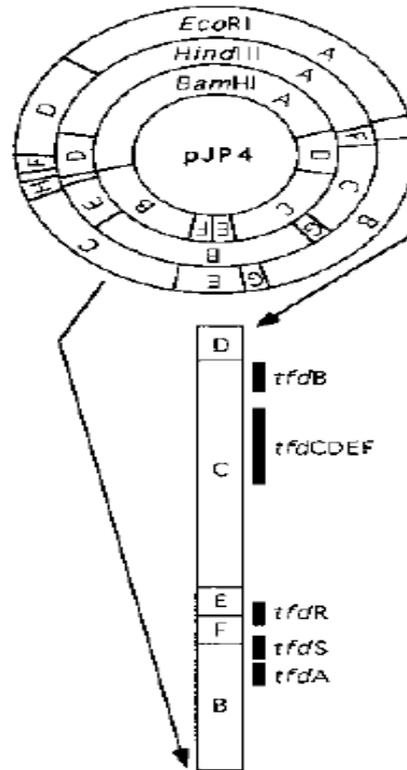


Figure I.C.1 : Carte génétique du plasmide pJP4. La carte linéaire correspond à un zoom de plasmidique comprenant les gènes de *tfd* (Filer and Harker, 1997).

Le plasmide pJP4, appartient au groupe d'incompatibilité plasmidique. Il est caractérisé par sa résistance aux ions mercure et acétate phényle-mercurique (Don and Pemberton, 1985 ; Kukor *et al.*, 1989). En culture pure, il est facilement transféré par conjugaison bactérienne à des souches telles que : *Escherichia coli*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rhizobium sp.*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, et *Acinetobacter calcoaceticus* (Don and Pemberton, 1981). Il a aussi été montré que ce plasmide conjugatif peut être transféré à des populations microbiennes indigènes du sol (Kinkle *et al.*, 1993; DiGiovanni *et al.*, 1996). Toutefois l'expression du potentiel de dégradation du 2,4-D transféré n'a pas été observée dans toutes les souches réceptrices, suggérant l'existence de processus de régulation dépendant des facteurs transportés par les souches réceptrices. (Don and Pemberton, 1981 ; Kinkle *et al.*, 1993).

Chez pJP4, un fragment d'ADN de 22 Kb porte l'information génétique, il s'agit des gènes *tfdABCDEF* qui codent les enzymes de dégradation du 2,4-D (Leveau *et al.*, 1999) (Figure I.C.2).

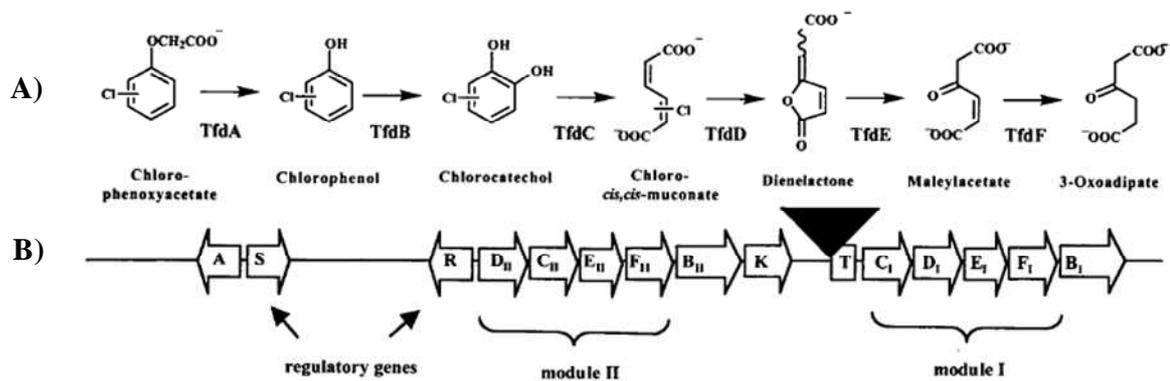


Figure I.C.2 : A) voies de dégradation du 2,4-D.

B) organisation génétique des gènes *tfd* sur le plasmide pJP4
(Plumeier *et al.*, 2002).

La première étape de la dégradation du 2,4-D est catalysée par le 2,4-D alpha-ketoglutarate dioxygénase codée par le gène *tfdA* (Figure I.C.3). Elle aboutit à la formation du dichlorophénol.

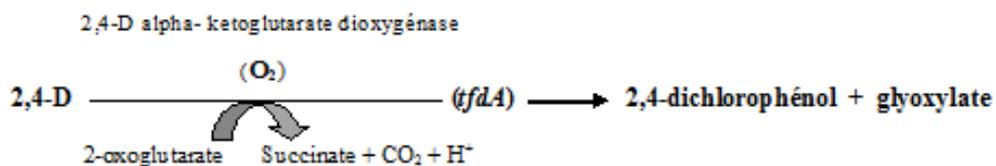


Figure I.C.3 : Première étape de la dégradation du 2,4-D
(Evans *et al.*, 1971 ; Don *et al.*, 1985 ; Bhat *et al.*, 1994 ; Leveau *et al.*, 1999 ; Pelmont, 2005 ;
http://umbbd.msi.umn.edu/2,4-d/2,4-d_map.html)

Le dichlorophénol est alors transformé à son tour par la 2,4-dichlorohydroxylase codée par le gène *tfdB* (Figure I.C.4). Cette enzyme est une mono-oxygénase fonctionnant comme une hydroxylase aboutissant à la formation de 3,5-dichlorocatéchol.

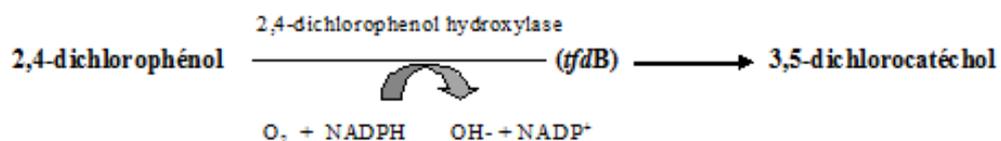


Figure I.C.4 : Transformation de dichlorophénol
(Evans *et al.*, 1971 ; DON *et al.*, 1985 ; Bhat *et al.*, 1994 ; Leveau *et al.*, 1999 ; Pelmont, 2005 ;
http://umbbd.msi.umn.edu/2,4-d/2,4-d_map.html)

Il est intéressant de noter que les chlorocatéchols sont des métabolites intermédiaires obtenus dans la dégradation de la majorité des composés phénoliques naturels ou xénobiotiques (**Bhat et al., 1994 ; Göbel et al., 2002**).

Ainsi le 3,5-dichlorocatéchol est transformé en 3-oxoadipate par la voie ortho. Les différentes réactions de cette transformation sont représentées ci-dessous (**Figure I.C.5**) :

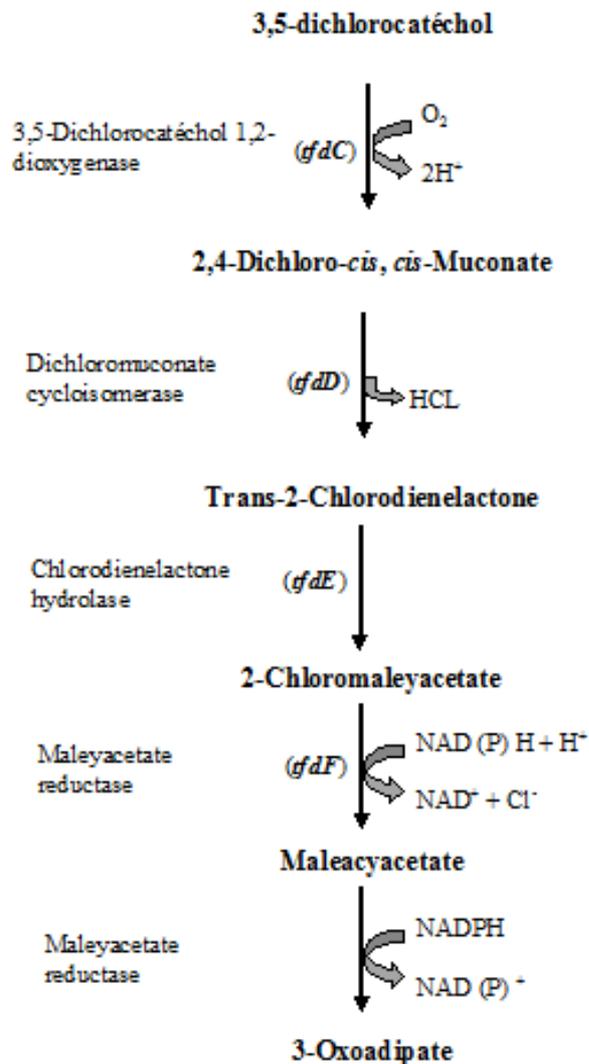


Figure I.C.5 : Transformation du 3,5-dichlorocatéchol en 3-oxoadipate par la voie ortho (Evans et al., 1971 ; Don et al., 1985 ; Bhat et al., 1994 ; Leveau et al., 1999 ; Seibert et al., 2004 ; Pelmont, 2005 ; http://umbbd.msi.umn.edu/2,4-d/2,4-d_map.html)

Par la suite, le 3-oxoadipate est dégradé via le métabolisme microbien qui le transforme en succinate et acétyl-CoA (Leveau et al., 1999 ; Pepper et al., 2002). Ce dernier reste alors dans le cycle de Krebs afin de contribuer à la production d'énergie (ATP) (Fukumori and Hansinger, 1993).

Par conséquent, la dégradation du 2,4-D est une source de carbone et d'énergie pour le développement des populations microbiennes dégradantes.

La transcription des gènes *tfdA* et *tfdB* se fait séparément des autres gènes *tfd*, alors que le gène *tfdC* se trouve dans un seul opéron avec les gènes *tfdDEF* (Fulthorpe *et al.*, 1995).

L'activité des gènes *tfd* est contrôlée par deux gènes *tfdR* et *tfdS* codant potentiellement pour des protéines régulatrices *tfdR*, de la famille LysR (Figure I.C.2). Ils sont situés à 8 Kb loin de l'opéron *tfdCDEF*. Un troisième gène régulateur de 684 pb, *tfdT*, codant pour une protéine de 25 Kda, est localisé directement en amont du *tfdC* (Leveau and Meer, 1996 ; Plumeier *et al.*, 2002). Ces trois gènes régulateurs sont impliqués dans la régulation de la dégradation du 2,4-D et d'autres composés chlorophénoxyacétiques et aromatiques. En l'absence d'inducteur, ces gènes agissent comme répresseurs et tendent à bloquer la transcription dans les deux directions. Dans ce contexte, Filer and Harker, 1997 ont montré que c'est le dichloromuconate, l'intermédiaire métabolique du 2,4-D, qui induit l'activation de transcription de l'opéron *tfdCDEF*. Selon ces auteurs il est probable que le dichloromuconate et ses analogues induisent aussi la transcription des gènes *tfdA* et *tfdB*.

La bactérie *Ralstonia eutropha* JMP 134 peut se développer sur des composés analogues du 2,4-D tels que 3-chlorobenzoate (3CB), 4-chloro-2-méthyl- et 2-méthylphénoxyacétate (Don *et al.*, 1985 ; Pieper *et al.*, 1988 ; Harker *et al.*, 1989).

Plusieurs études ont montré que diverses espèces bactériennes sont capables d'utiliser le 2,4-D comme source de carbone, mais ne portent pas nécessairement des plasmides similaires au pJP4 de la bactérie *Ralstonia eutropha* JMP 134 (Amy *et al.*, 1985 ; Chaudhry et Huang, 1988 ; KA *et al.*, 1994 ; Bhat *et al.*, 1994 ; Top *et al.*, 1995 ; Kamagata *et al.*, 1997 ; Kitagawa, 2002 ; Huong *et al.*, 2007).

A titre d'exemple, la figure I.C.6 montre la différence entre les trois plasmides pEMT1, pEMT3 et pJP4. Cette différence est représentée, notamment par la taille et la distance entre les gènes *tfdA* et *tfdC* chez pEMT1 et pJP4 (Top *et al.*, 1995).

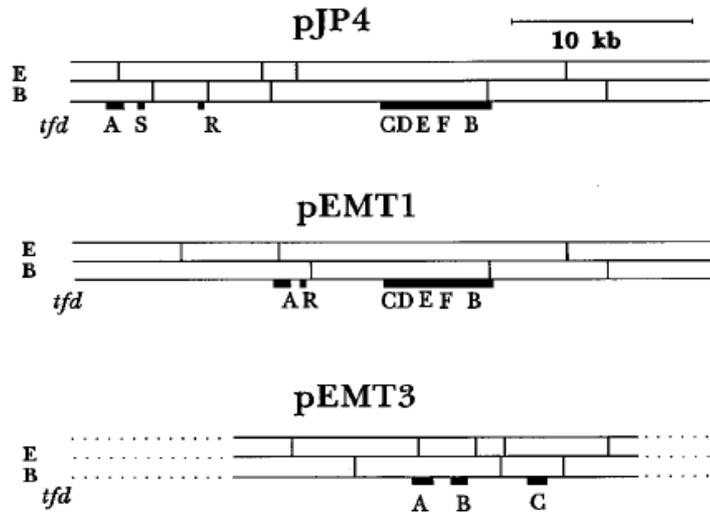


Figure I.C.6 : Différences entre les trois plasmides pEMT1, pEMT3 et pJP4
(Top *et al.*, 1995)

I.C. 2 Méthodes de biologie moléculaire utilisées pour la caractérisation et la classification de bactéries dégradantes.

I.C.2.1 Taxonomie des bactéries dégradantes.

La taxonomie est généralement prise comme synonyme de la systématique ou la biosystématique (Vandamme *et al.*, 1996). C'est une science faite pour étudier les relations entre les organismes. Elle englobe la classification, la nomenclature et l'identification (Vandamme *et al.*, 1996 ; Zakhia et Lajudie, 2006).

Il est nécessaire de rajouter la phylogénie et la génétique des populations pour avoir une taxonomie complète (Vandamme *et al.*, 1996). La figure I.C.7 présente les différentes méthodes qui ont été utilisées pour la caractérisation et la classification des communautés microbiennes du sol et de la rhizosphère.

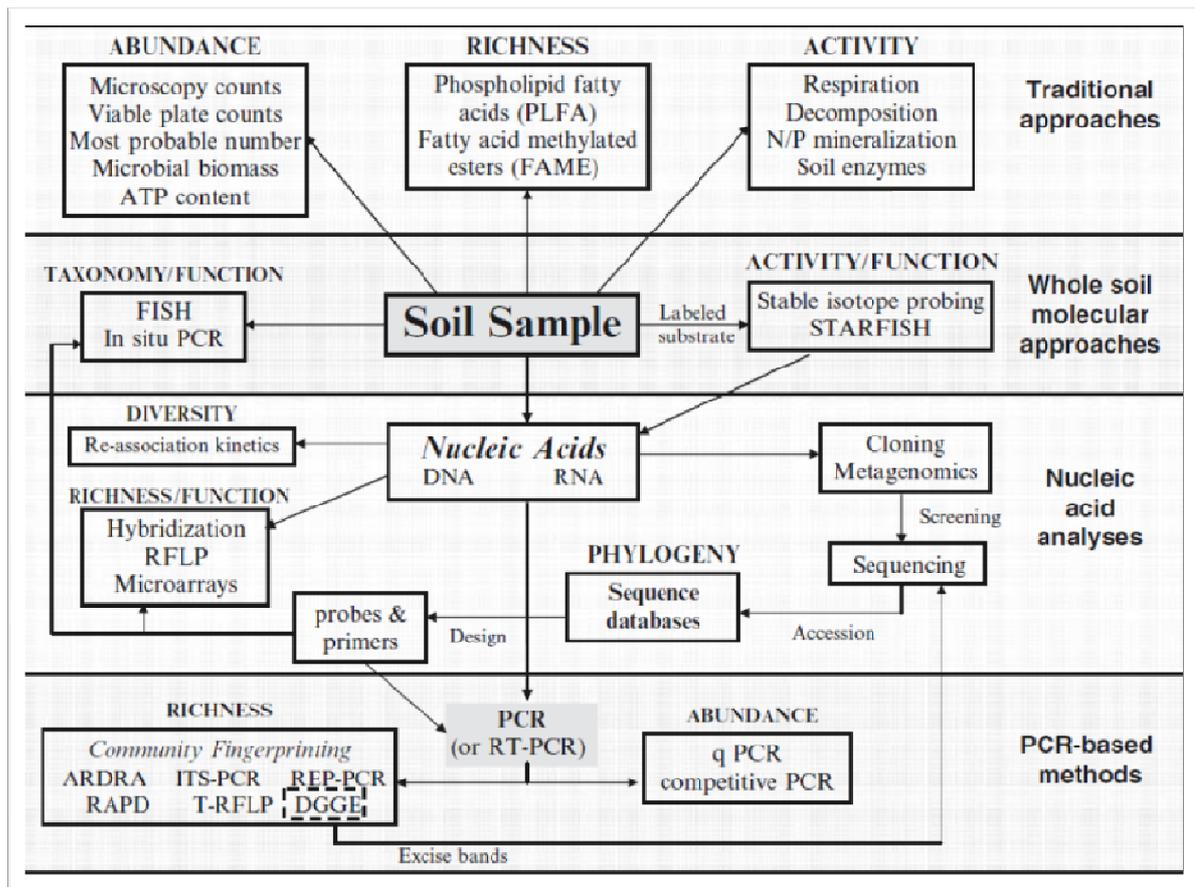


Figure I.C.7 : Les différentes méthodes utilisées pour la caractérisation et la classification des communautés microbiennes du sol et de la rhizosphère (Thies , 2008).

Le niveau taxonomique de l'information de certaines de ces techniques est illustré dans la figure I.C.8.

La caractérisation phénotypique repose sur l'étude morphologique des cellules bactériennes (la forme des cellules, les endospores, les flagelles, la forme des colonies,...etc.) mais aussi sur différents tests biochimiques et physiologiques (Goris, 2003).

Les méthodes phénotypiques peuvent aussi comporter la chimiotaxonomie qui consiste à caractériser ce qui se base sur l'étude des constituants cellulaires tels que : polyamines, peptidoglycanes, lipides polaires, lipopolysaccharides, acides gras, quinones, protéines, et d'autres.

Les méthodes génotypiques quant à elles sont basées sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN). Elles comportent la détermination du pourcentage en G + C, pourcentage d'homologie des hybridations d'acides nucléiques (ADN-ADN), séquences des différents gènes.

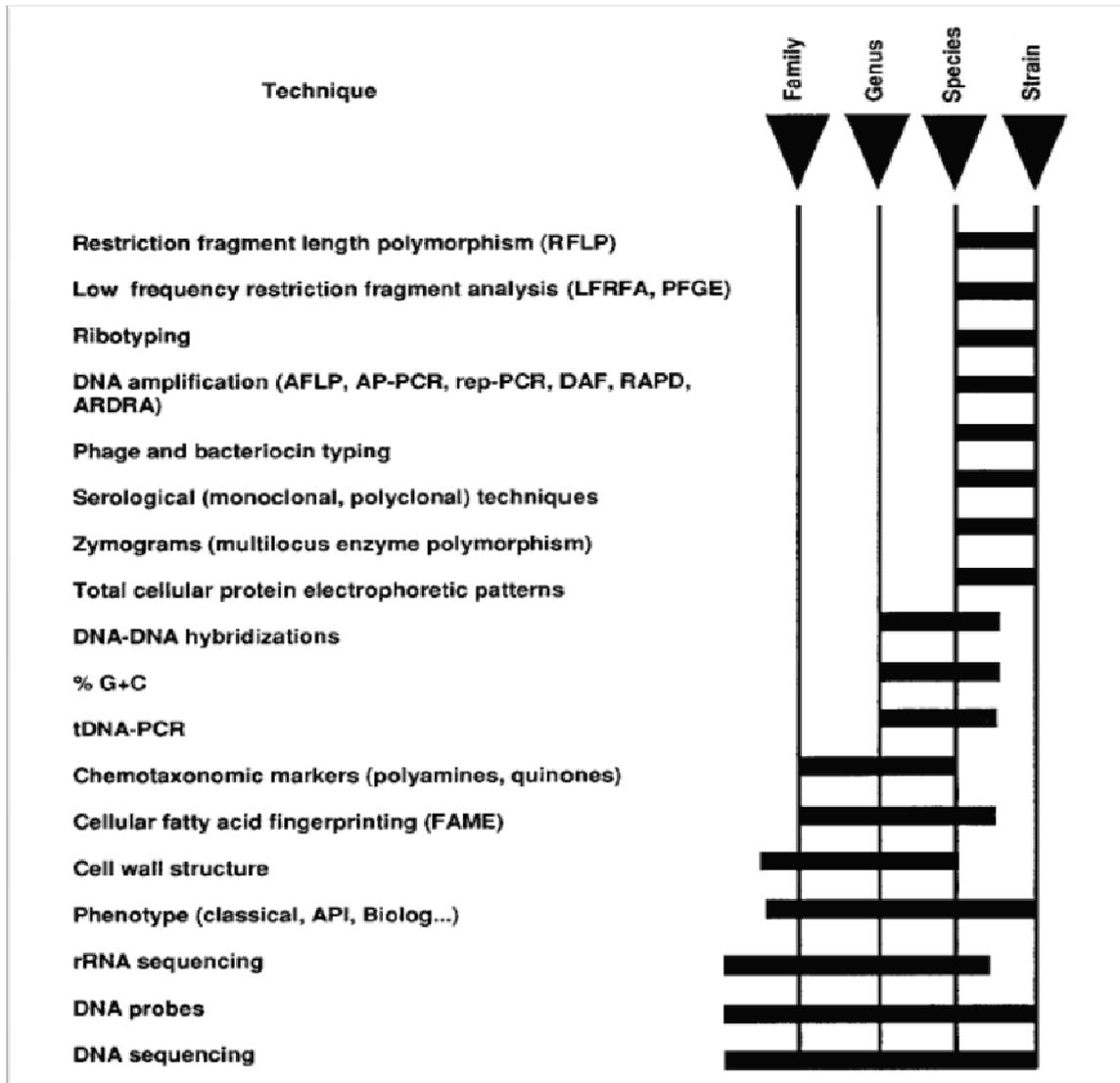


Figure I.C.8 : Niveau taxonomique de l'information de certaines techniques (Vandamme *et al.*, 1996).

Le gène codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomique constitue un marqueur moléculaire pertinent, permettant de classer et d'identifier les microorganismes selon leur relation phylogénétique. Aujourd'hui le séquençage de l'ADNr 16S des communautés bactériennes (basé sur l'amplification de l'ADN extrait des échantillons environnementaux) permet de caractériser leur biodiversité.

Sur la base des données de séquençage, il est possible de comparer les séquences entre elles et de dégager des relations phylogénétiques liant les différentes bactéries dégradantes.

Jusqu'à présent les souches isolées dégradant le 2,4-D et l'utilisant comme source de carbone et d'énergie, appartiennent généralement aux β et γ – *Protéobactéries*, aux genres tels que *Ralstonia*, *Burkholderia*, et *Cupriavidus*.

Le genre *Ralstonia* a été proposé en 1995 pour représenter les espèces *Burkholderia pickettii*, *Burkholderia solanacearum* et *Alcaligenes eutrophus* (Yabuuchi *et al.*, 1995). Depuis sa proposition, plusieurs espèces ont été rajoutées à ce genre (Goris, 2003 ; Coenye *et al.*, 2005). Actuellement, ce genre est composé de 11 espèces validées (Garrity, 2005) (Figure I.C.9).

Le genre *Burkholderia* appartient à la famille des *Burkholderiaceae*, ordre des *Burkholderiales*, classe des *Betaproteobacteria*, phylum des *Proteobacteria*. Il a connu de nombreux remaniements. La Figure I.C.10 représente son arbre phylogénétique, basé sur les séquences du gène ARNr 16S des espèces des *Burkholderia*, [*Pseudomonas*] et *Ralstonia*.

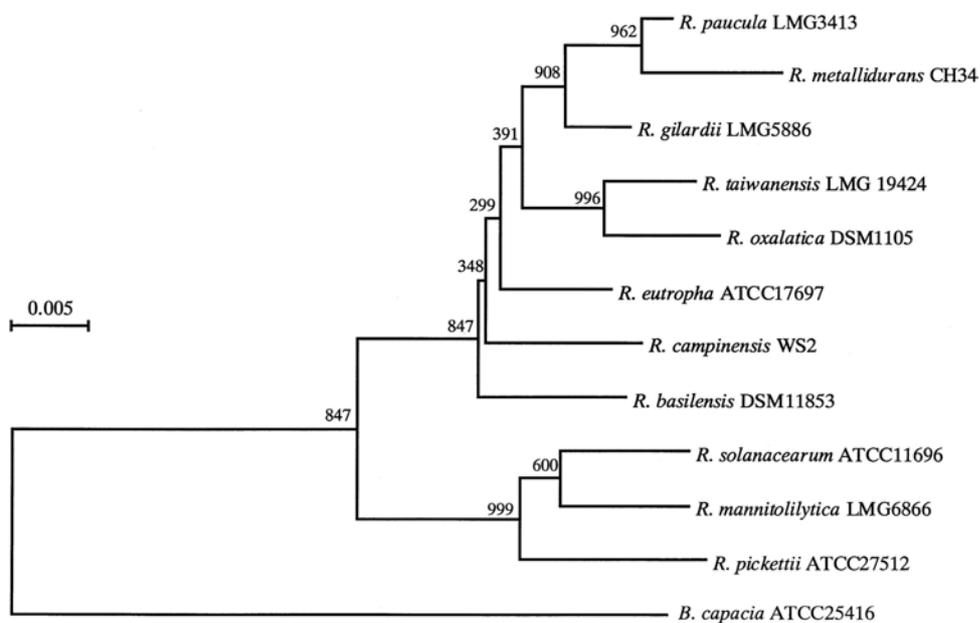


Figure I.C.9 : Arbre phylogénétique à base des séquences du gène ARNr 16S chez *Ralstonia* (Garrity, 2005).

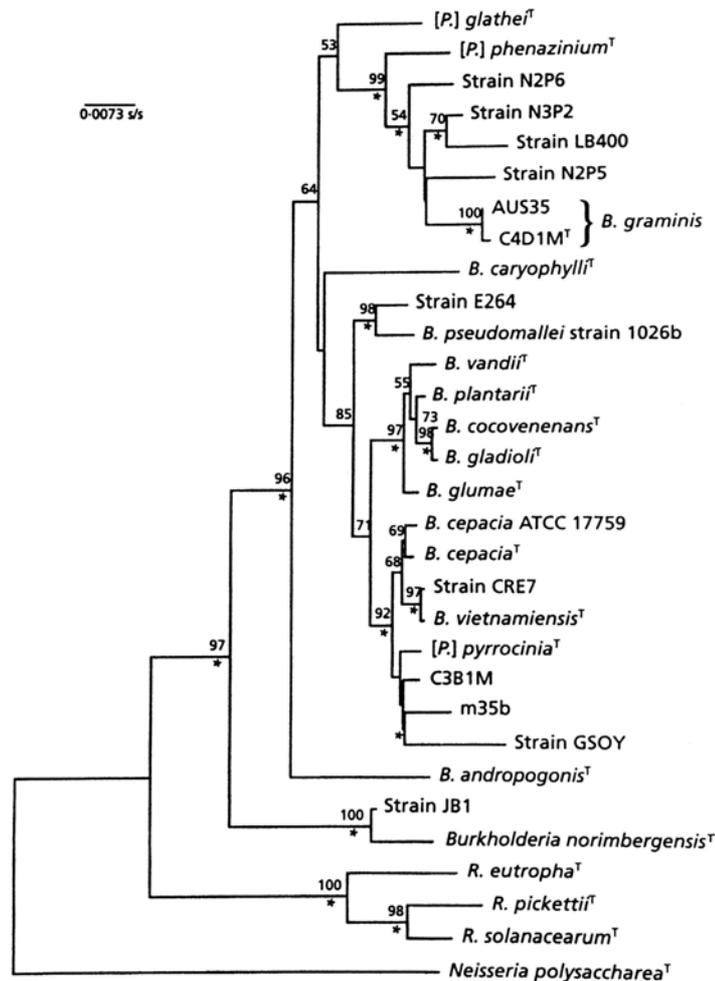


Figure I.C.10 : Arbre phylogénétique, à base des séquences du gène ARNr 16S, du genre *Burkholderia* (Garrity, 2005).

I.C.2.2 Méthodes de biologie moléculaire utilisées.

a) Polymerase chain reaction (PCR)

La réaction par polymérisation en chaîne (PCR) permet la multiplication exponentielle d'une séquence ciblée. Cette méthode permet d'analyser des échantillons faiblement concentrés. Elle est caractérisée par trois Ss : Sélectivité, Sensibilité et Vitesse (Speed) (Arnheim and Erlich, 1992).

Mise au point en 1985 par Kary Mullis, la PCR a ouvert aux laboratoires de microbiologie un vaste choix d'applications, tels que l'amplification des gènes ADNr (avec ou sans régions intergéniques) à l'aide des amorces universelles (Vandamme *et al.*, 1996). Elle est maintenant couramment utilisée dans les laboratoires. Ainsi, White, 1996 a estimé que plus de 40000 publications scientifiques ont été réalisées en utilisant la PCR.

La technique connaît un essor considérable à partir de la commercialisation (vers 1988) d'une ADN polymérase (la Taq polymérase) et des premiers thermocycleurs permettant l'automatisation des cycles de la PCR. L'enzyme a été isolée à partir de la bactérie *Thermus aquaticus*, isolée de sources chaudes et par conséquent très résistante aux températures élevées. Les derniers développements de la bactériologie ont permis la production de la Taq recombinantes améliorant leur processivité et leur sensibilité. Certaines enzymes permettent maintenant l'amplification de fragments d'ADN ≥ 50 Kb.

Actuellement, il est conseillé de séquencer plusieurs marqueurs pour obtenir une information taxonomique. Au delà de ses approches, les derniers développements des méthodes de pyroséquençage permettent d'obtenir un grand nombre de séquences à un coût moindre autorisant l'utilisation de plusieurs marqueurs génétiques à des fins taxonomiques.

Les derniers développements de la PCR au travers de la PCR en temps réel, encore appelée PCR quantitative, permettent de détecter et quantifier des populations microbiennes dans des environnements complexes y compris dans des sols contaminés soumis à des traitements de bioremédiation (Degrange et Bardin, 1995 ; Van Elsas *et al.*, 1997 ; El-Fantroussi *et al.*, 1997 ; Lévesque *et al.*, 1997).

Certaines parties dans la structures des ARN ribosomiques, ARNr 16S et ARNr 23S, sont identiques chez toutes les bactéries et donc utilisables comme sites de complémentarité pour les amorces universelles d'amplification. D'autres parties de séquences sont propres au groupe et permettent ainsi l'identification de séquences dites signatures caractéristiques d'ordre taxonomiques différents (espèce, genre, famille, ou royaume) (Moyer *et al.*, 1994).

La **Figure I.C.11** montre la structure de l'opéron ribosomique bactérien constitué de 3 gènes ADNr 16S, ADNr 23S et ADNr 5S. Les amorces universelles 27f et 1429r permettent d'amplifier par PCR l'ADNr 16S (Miyajima *et al.*, 2002).



Figure I.C.11 : Représentation schématique de l'opéron d'ADN ribosomique bactérien.

fD1 et rD1 sont les amorces universelles 27f et 1429r (Miyajima *et al.*, 2002)

fD₁ = position des nucléotides : 8-27, séquence : AGAGTTTGATCCTGGCTCAG.

rD₁ = position des nucléotides : 1492-1510, séquence : GGCTACCTTGTTACGACTT.

En générale la technique de PCR est basée sur une répétition de cycles de dénaturation, hybridation et extension par polymérase. Chaque produit de polymérisation obtenu après un n cycles est utilisé comme matrice pour le cycle suivant (Mulis *et al.*, 1986).

Elle est réalisée dans un thermocycleur, appareil automatique programmable en temps et en température, en quelques heures. Le thermocycleur délivre à chaque instant au mélange réactionnel une température permettant la réalisation d'une étape de polymérisation dans un temps précis. Le mélange réactionnel doit contenir :

- l'ADN, contenant la séquence à amplifier,
- les deux amorces oligonucléotidiques nécessaires pour l'amplification,
- les désoxynucléotides libres dATP, dCTP, dGTP et dTTP,
- la Taq polymérase,
- la solution tampon contenant le $MgCl_2$.

La figure **I.C.12** montre le mélange réactionnel et les produits des trois premiers cycles de la PCR (Doggett, 1992).

Chaque cycle PCR est caractérisé par trois phases avec trois différentes températures :

1. phase de dénaturation : l'ADN double brin est chauffé à $95^\circ C$ pendant 0 à 1 minute. Les deux chaînes de la double hélice d'ADN sont séparées par la dissociation des liaisons hydrogènes.
2. phase d'hybridation des amorces : après la séparation des brins d'ADN, la température est abaissée à un degré thermodynamiquement favorable pour l'hybridation des deux amorces sens et anti-sens aux brins d'ADN matrice, généralement entre $55^\circ C$ et $65^\circ C$.
3. phase d'élongation : à partir de l'amorce oligonucléotidique la Taq polymérase catalyse la synthèse du brin complémentaire de la matrice en présence des désoxynucléotides libres.

Figure 1. The Polymerase Chain Reaction

Reaction mixture includes DNA sample: two single-stranded primers, each with a 20-base sequence identical to the 5' end of one strand of the target sequence; heat stable *Taq* polymerase; and deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs).

Phase 1
Denature unamplified DNA at 95°C to form single-stranded templates.

Phase 2
Anneal primers to template at about 60°C.

Phase 3
Synthesize new strands at 72°C.

Phases 1 and 2
Denature products of Cycle 1 and anneal primers to template strands.

Phase 3
Synthesize new strands.

Phases 1 and 2
Denature products of Cycle 2 and anneal primers to template strands.

Phase 3
Synthesize new strands.

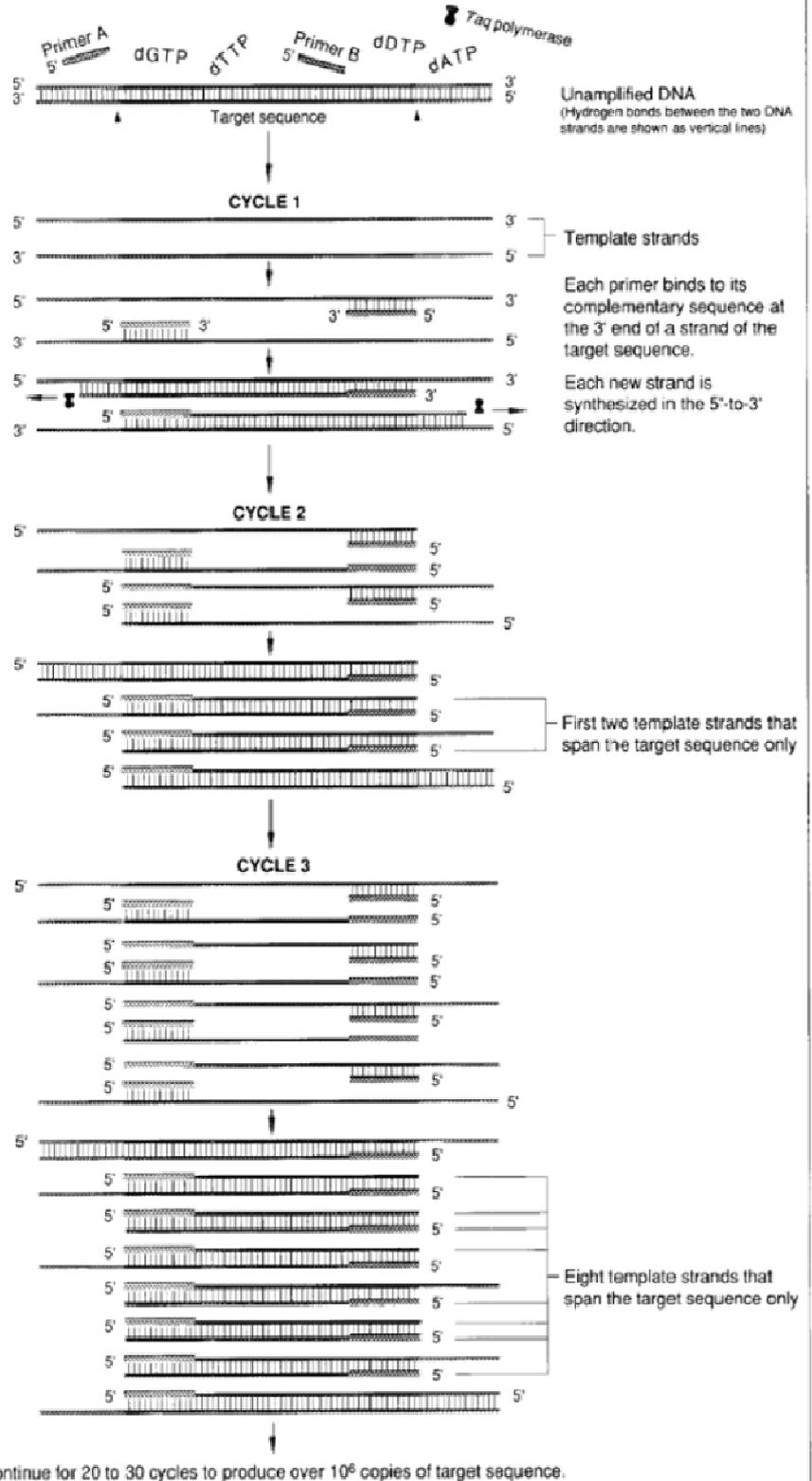


Figure I.C.12 : Les trois premiers cycles de la PCR (Doggett, 1992).

Les amplifications PCR peuvent être regroupées en trois catégories (**Grunenewald, 2003**) :

- PCR Standard : qui implique l'amplification d'une séquence simple d'ADN, moins de 5 kb de longueur, et utile pour une variété d'applications, telles que séquençage, clonage, mutation, détection,... etc.
- PCR Longue : est employée pour l'amplification d'une séquence simple, entre 5 kb et 40 kb de longueur. Son application implique le séquençage longue-rang et l'amplification des gènes complets.
- PCR Multiplex : est employée pour l'amplification des séquences multiples qui sont moins de 5 kb de longueur. Son application concerne les études légales, l'identification du pathogène, analyse de liaison génétique (linkage analysis), quantification de la matrice, diagnostique génétique des maladies et génétique des populations.

L'optimisation de la réaction de la PCR pour une séquence cible peut s'avérer être un exercice long et compliqué en raison des divers paramètres qui sont impliqués (**Grunenewald, 2003**). Ces paramètres sont :

1. qualité et concentration de l'ADN matrice,
2. définition et concentration des amorces oligonucléotidiques,
3. concentration en $MgCl_2$,
4. concentration des désoxynucléotides (dNTPs),
5. tampon de PCR,
6. sélection et concentration d'ADN polymérase,
7. conditions des cycles de PCR,
8. addition et concentration des additives/co-solvants de PCR,
9. utilisation de la technique «hot start » reposant sur l'utilisation de billes de cire contenant l'enzyme ou l'enzyme activé après une incubation à 95°C.

b) Analyse du polymorphisme de restriction (RFLP).

L'analyse du polymorphisme de restriction est une méthode souvent utilisée pour caractériser rapidement les microorganismes (**Laguerre et al., 1994 ; Moyer et al, 1994**). Le principe de cette technique est basé sur le fait que le produit PCR est digéré par une enzyme de restriction. Les produits de la digestion enzymatique sont séparés par une électrophorèse conduite sur un gel d'agarose.

Les bandes des profils représentant les différents fragments d'ADN sur le gel d'agarose sont visualisés par la coloration du gel dans le bromure d'éthidium, suivie par la prise d'une image de ce gel coloré à l'aide du système Bioprint.

Une comparaison, entre les différentes bandes, est réalisée dans le but d'avoir les différents types RFLP, représentant les différences entre les microorganismes.

Afin d'obtenir un grand nombre de fragments, la digestion se fait généralement avec au moins deux enzymes de restriction.

Si l'ADN est amplifié par la technique PCR avant la digestion enzymatique, la méthode est appelée analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction d'ADN amplifié (PCR-RFLP).

La PCR-RFLP présente de nombreux avantages pour la caractérisation de la diversité microbienne : relativement rapide, faible coût, possibilité d'application à l'ensemble des taxons bactériens, bonne reproductibilité, possibilité d'analyse simultanée d'un grand nombre de souches, évaluation taxonomique (Neyra *et al.*, 1998).

Dans le cas de l'analyse de l'ADNr 16S ou 23S avec ou sans spacer régions par la PCR-RFLP, la technique est appelée Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) (Heyndrickx *et al.*, 1996).

c) Séquençage

Le séquençage d'une ADN est la technique par laquelle on peut déterminer la succession des nucléotides constitutifs de cette molécule. Elle est développée, en 1977, par l'équipe de Frederick Sanger et celle de Walter Gilbert (Mardis, 2008 ; Men *et al.*, 2008).

La méthode de Sanger, en raison de sa simplicité, s'est avéré être "la technique de choix " pour les projets de séquençage de l'ADN (Nunnally, 2005).

La technique de séquençage d'une ADN implique trois étapes (Nunnally, 2005) :

- (i) réactions de séquençage,
- (ii) séparation par électrophorèse sur gel polyacrylamide,
- (iii) détection et analyse des données.

Le principe de cette technique est basé sur l'utilisation d'un mélange réactionnel contenant les différents produits de polymérisation : les fragments d'ADN à séquencer, la Taq polymérase, les amorces, et les nucléotides libres.

Les nucléotides libres sont un mélange des dNTPs (au moins un d'entre eux est marqué au phosphore 32, au soufre 35 ou au Phosphore 33) en grand nombre et une faible proportion d'un didésoxyribonucléotide (ddNTP) à Adénine, ou Guanine, ou Thymine, ou Cytosine.

Au cours de la polymérisation, l'incorporation de l'un des quatre ddNTP dans la chaîne de l'ADN à la place du dNTP correspondant va provoquer la terminaison de cette chaîne, puisqu'il n'y aura pas un groupement OH libre en 3' permettant la formation de la liaison phosphodiester suivante. Par conséquent, quatre réactions de polymérisation indépendante doivent être réalisées. A la fin des réactions, un mélange de molécules partiellement synthétisées d'ADN double brin marqué doit être obtenu. La longueur des fragments d'ADN obtenus varie en fonction du point d'intégration du didésoxyribonucléotide (**Figure I.C.13.**)

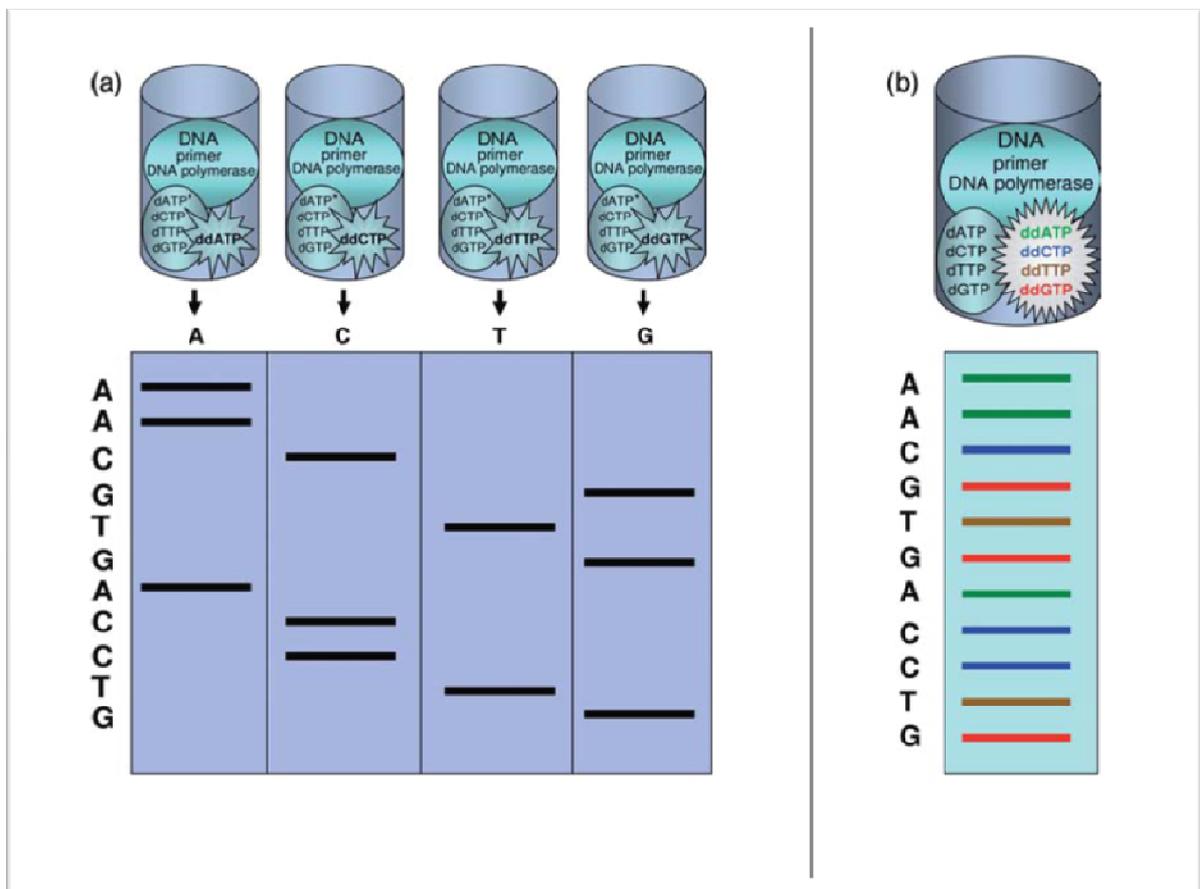


Figure I.C.13 : Principe du séquençage d'ADN, méthode de Sanger (Men *et al.*, 2008).

- Quatre réactions de polymérisation indépendante, chacune contient un mélange de molécules partiellement synthétisées d'ADN double brin marqué.
- Adaptation de la technique du séquençage (un seul mélange au lieu de quatre réactions indépendantes) dont les quatre ddNTP sont marqués avec marqueurs fluorescents de différentes couleurs.

Les fragments obtenus doivent être ensuite séparés par électrophorèse sur un gel polyacrylamide en fonction de leur taille. Après autoradiographie, la lecture de la séquence doit se faire en partant du bas du gel vers le haut.

La très grande majorité des séquences obtenues jusqu'à maintenant sont réalisées sur des séquenceurs automatiques. Ceux-ci sont capables de réaliser les réactions de séquençage, puis leur lecture.

Le principe de la réaction de séquençage utilisée dans les séquenceurs reste le même, mais le marquage (chaque ddNTP marquée par un fluorochrome de couleur différente) et le mode de détection sont différents.

En général l'automatisation requiert l'emploi :

- des marqueurs fluorescents de différentes couleurs qui sont révélés après excitation par une cellule CCD.
- d'un système d'électrophorèse piloté par ordinateur,
- des logiciels permettant l'analyse des signaux sortant de l'appareil et leur mise en forme de pics dont la couleur représente le ddNTP correspondant. (**Figure I.C.14**).

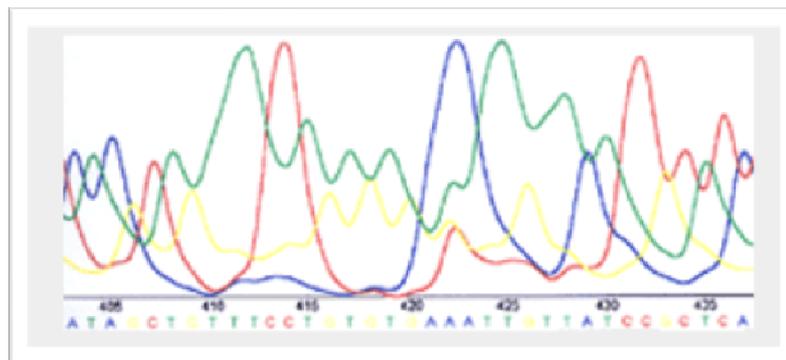


Figure I.C.14 : Exemple de séquençage automatique

En bleu : Adénine. En vert : Thymine. En jaune : Guanine. En rouge : Cytosine.

(<http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/sequencage/sequence.htm>)

Les séquences d'ADN de plusieurs gènes provenant de diverses sources ont été déterminées, et les informations sont stockées dans des banques de données internationales telles que LEBM, GenBank et DDBJ (**Hugh G. Griffin and Annette M. Griffin, 1993**).

Il est à noter que le séquençage a été décrit il y a environ 30 ans et n'a cessé d'évoluer depuis cette période. Actuellement, il est devenu un outil essentiel en biologie moléculaire tant en médecine que dans de nombreuses autres disciplines des sciences de la vie (**Lamoril *et al.*, 2008**).

En écologie microbienne, le séquençage d'ADN est une activité très importante pour la découverte de nouvelles propriétés génétiques, l'exploration des affiliations phylogénétiques et le développement des amorces spécifiques et des gènes sondes pour répondre aux questions écologiques particulières (**Thies, 2008**).

Le séquençage du gène ARNr 16S a été largement utilisé pour estimer les rapports entre les bactéries (phylogénie). Il est devenu également un moyen très important d'identification des bactéries inconnues au niveau du genre ou de l'espèce (**Sacchi *et al.*, 2002**). Dans la plupart du temps, cette technique est remplacée par le séquençage partiel ou entier des gènes ADNr 16S et 23S en employant la technique de PCR et le choix des amorces appropriées (**Vandamme *et al.*, 1996**).

I.D La Bioaugmentation

Il est bien connu que les sols naturels contiennent diverses espèces microbiennes capables d'utiliser les produits phytosanitaires comme source de carbone et d'énergie.

Certains composés organiques synthétiques biodégradables peuvent persister dans les sols vu que la capacité catabolique exigée n'est pas présente ou que la population et l'activité des microorganismes provoquant leur destruction n'est pas suffisante (Dejonghe *et al.*, 2000).

Par conséquent, il est nécessaire d'introduire dans les sites contaminés certains microorganismes ayant la capacité de dégradation nécessaire afin d'améliorer l'activité biologique.

Le processus appelé bioaugmentation a été utilisé. Il consiste en l'introduction des microorganismes dégradant ou des gènes caractérisés par leur transfert horizontale dans le milieu. Ces gènes confèrent aux populations indigènes le pouvoir de dégradation.

A titre d'exemple, Dejonghe *et al.*, 2000 ont observé que les bactéries indigènes de l'horizon B (profondeur, 30 à 60 cm) ont commencé à dégrader le 2,4-D après 22 jours, alors que dans les mêmes sols inoculés, 80 à 90 % de la dose initiale du 2, 4-D a été dégradé en 6 jours et 100 % a été dégradé entre 6 et 14 jour (Figure I.D.1).

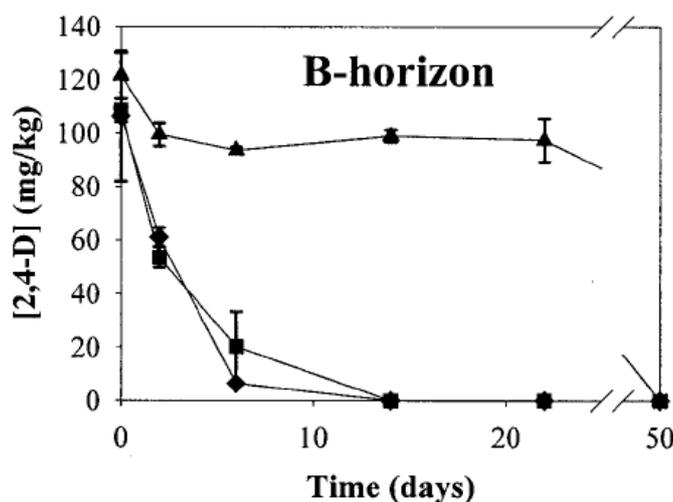


Figure I.D.1 : Effet de l'inoculation et le transfert ultérieur des plasmides sur la dégradation du 2, 4-D dans l'horizon B (Dejonghe *et al.*, 2000).

▲ Sol non inoculé + 2, 4-D ; ◆ sol + 2,4-D + pEMT1::lacZ; ■ sol + 2,4-D + pJP4::lacZ.

L'efficacité de ce processus dépend non seulement de la capacité élevée de dégradation mais également de la stabilité des bactéries actives dans les différentes conditions opératoires notamment le pH, la température et la concentration des ions NH_4^+ et PO_4^{3-} (**Pattanasupong et al., 2004**).

Cette efficacité peut dépendre également du degré de la contamination et du délai indispensable de la remédiation (**Pepper et al., 2002**).

Les principaux problèmes liés à la bioaugmentation sont (**Pepper et al., 2002**) :

- ❖ La diminution rapide ou la disparition complète des microorganismes qui peuvent se produire en raison des stress biotiques et abiotiques,
- ❖ La difficulté d'avoir une dispersion homogène des microorganismes dans le site contaminé.

D'après **DiGiovanni et al., 1996** ces problèmes peuvent être résolus par l'inoculation et le transfert des gènes de dégradation aux populations indigènes du sol.

En général certaines conditions sont nécessaires pour la réussite de l'inoculation du sol par les microorganismes, il s'agit essentiellement (**Greer and Shelton, 1992**) :

- ✓ de la nature et des caractéristiques du sol, qui doivent être favorables pour la survie et la prolifération des souches microbiennes utilisées,
- ✓ de la capacité de dégradation du substrat, à des concentrations initiales favorables, par les souches de l'inoculum,
- ✓ des taux de désorption, qui doivent être suffisants pour la prolifération de la population de l'inoculum,
- ✓ de la dispersion des souches de l'inoculum dans le sol ; plus elle est homogène moins sont les contraintes de diffusion.

Dans notre travail et concernant le test de bioaugmentation, nous nous sommes particulièrement intéressés au choix :

1. du sol favorable à la prolifération des souches mais caractérisé par un faible taux de dégradation du 2,4-D,
2. d'une souche ayant une capacité de dégradation efficace.

Chapitre II : MATERIEL ET METHODES

II.A : Paramètres affectant la minéralisation du 2,4-D

II.A.1 – Capacité des trois sols agricoles à minéraliser le 2,4-D

II.A.1.1 – Sols étudiés et Échantillonnage

Dans cette étude, les sols agricoles utilisés ont été collectés à partir de trois lieux différents (**Figure II.A.1**) [Ibn Badis (El-Haria) (45IB) ; Boudjriou Messaoud (Ain Karma) (46BM) ; et Ain-Abid (47AA)] de la région de Constantine [Est de l'Algérie ($36^{\circ}15' - 36^{\circ}35'$) Nord, de longitude et ($6^{\circ}30' - 6^{\circ}45'$) Est, de latitude)].



Figure II.A.1: Plan d'échantillonnage. Sol 45IB : Ibn Badis (El-Haria) ; Sol 46BM : Boudjriou Messaoud (Ain Karma) ; Sol 47AA : Ain-Abid

A notre connaissance les sols 46BM et 47AA étaient traités avec le 2,4-D pendant plus de 15 ans, alors que le 45IB l'a été pendant trois ans seulement.

Les prélèvements ont été réalisés à partir de la couche supérieure (0-15 cm) puis tamisés, au laboratoire, à l'aide d'un tamis de 2,5 mm. Les racines libres et les débris des plantes ont été ainsi éliminés.

Tous les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

II.A.1.2 - Caractéristiques physico-chimiques des sols

Les paramètres physico-chimiques des sols étudiés ont été déterminés au Laboratoire d'analyse des sols (INRA, Arras, France). Voir **Tableau III.A.1 (page 79)**.

II.A.1.3 - Cinétique de minéralisation du 2,4-D

La minéralisation du 2,4-D a été déterminée par radiorespirométrie avec le 2,4-D marqué au ^{14}C sur le cycle (^{14}C -cycle]-2,4-D) (pureté analytique > 99%, activité spécifique 4.6×10^8 Bq mmol⁻¹) selon la méthode décrite par **Soulas G., 1993**.

Pour chaque type de sol, trois répétitions (10 g de sol équivalent poids sec) ont été préparées (ajustement de l'humidité à 25%) et incubées à 20 °C dans des dispositifs radiorespirométriques étanches (**Figure II.A.2 panneau A et B**).

Le dispositif utilisé est un bocal de 1 litre, fermé hermétiquement par un joint de caoutchouc, dans lequel on place :

- Un pot en verre (250 ml) contenant 10 g de sol équivalent poids sec.
- Une fiole à scintillation liquide (20 ml) contenant 5 ml de soude (NaOH 0,2 N) qui assure le piégeage du $^{14}\text{CO}_2$ dégagé lors de l'incubation.
- Une fiole à scintillation liquide (20 ml) contenant 10 ml d'eau distillée afin de saturer l'atmosphère du bocal.

Les pièges de soude ont été remplacés régulièrement (après 1, 5, 7, 14, 25, 28, et 36 jours d'incubation), ce qui a permis :

- (i) d'aérer le système d'incubation,
- (ii) d'assurer le non saturation du piège par le CO_2 marqué ou non au ^{14}C .

Le $^{14}\text{CO}_2$ piégé dans la soude a été estimé à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Packard 1900 TR-Tricarb) après l'ajout de 10 ml de liquide scintillant (ACSII, Amersham).

II.A.2 Effet d'humidité

La teneur de l'humidité du sol a été mesurée par gravimétrie après avoir séché les sols à 110°C pendant 24 heures.

L'humidité de chaque sol a été ajustée à 10%, 15% et 25% par l'addition de l'eau distillée en tenant compte des volumes de solutions 2,4-D rajoutées. Le traitement s'effectuait en rajoutant la solution 2,4-D à la surface des échantillons des sols, suivi d'une homogénéisation à l'aide d'un cône.

Pour chaque humidité, trois répétitions ont été préparées. Pour chaque type de sol, trois dispositifs radiorespirométriques contenant le sol traité par une solution de 2,4-D (3 µg de 2,4-D et 2000 Bq de ¹⁴C-2,4-D par échantillon) ont été également préparés (**Figure II.A.2 panneau A et B**). Le 2,4-D et le ¹⁴C-2,4-D (pureté analytique > 99%, activité spécifique 4.6 × 10⁸ Bq mmol⁻¹) ont été fournis par sigma (France).

Une autre série de sols traités par le ¹²C-(2,4-D), a été préparé et réservé pour l'analyse moléculaire basée sur l'extraction d'acides nucléiques du sol et l'amplification par la PCR (afin d'éviter la contamination de l'appareil moléculaire avec le ¹⁴C).

Les dispositifs radiorespirométriques ont été incubés à l'obscurité dans une salle climatisée à 20°C.

II.A.3 Effet de température

Dans cette partie, le protocole expérimental est le même que celui de l'effet de l'humidité (**Figure II.A.2 panneau A et B**), sauf que cette dernière a été maintenue à 25% pour tous les échantillons. Les dispositifs radiorespirométriques ont été incubés dans des salles climatisées à 10°C, 20°C, et 28 °C.

II.A.4 Modélisation de la cinétique de minéralisation du 2,4-D

La cinétique de minéralisation de 2,4-D, de premier ordre a été adaptée avec le modèle de Gompertz modifié [$y = a e^{-e^{-k(t-t_i)}} + c.t$], qui prend en compte le turnover du ¹⁴C-carbone de la biomasse, en utilisant le programme de SigmaPlot 4.00.

Y : ¹⁴CO₂ résultant de la minéralisation de ¹⁴C-2,4-D.

Quatre paramètres ont été déterminés :

a : plateau ou pourcentage maximum de minéralisation du 2,4-D,

t_i : abscisse de la vitesse maximale de minéralisation,

k : constante de la vitesse de minéralisation,

c.t: terme linéaire qui tient compte du turn-over du ¹⁴C et de la minéralisation cométabolique.

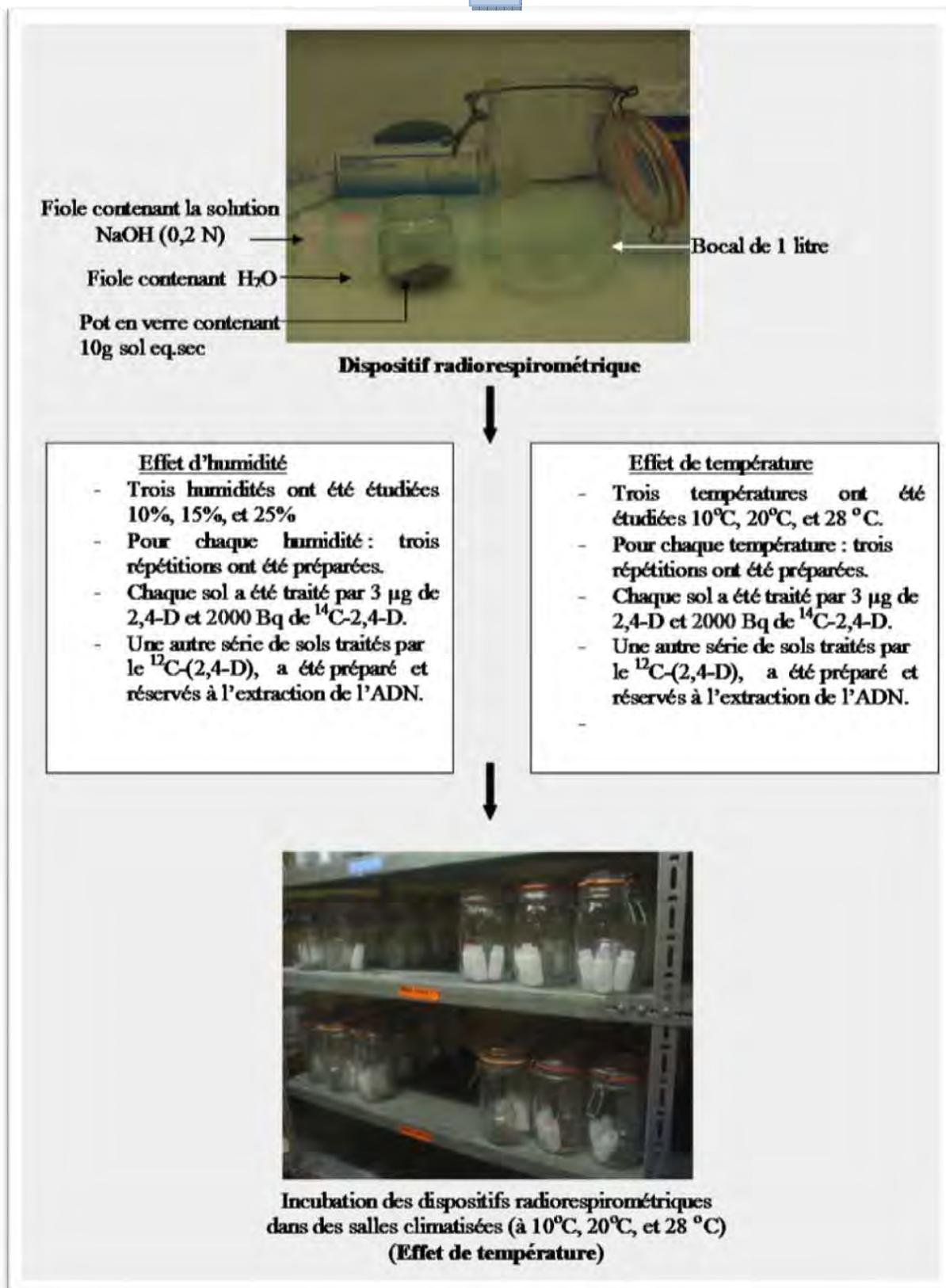


Figure II.A.2: Organigramme de la minéralisation du 2,4-D par radiorespirométrie (panneau A)

B

Piégeage du CO₂ résultant de la minéralisation dans 5ml de NaOH (0,2 N)



Remplacement régulier des pièges de soude (après 1, 5, 7, 14, 25, 28, et 36 jours d'incubation)



Ajout de 10ml de liquide à scintillation à chaque fiole



Dosage de la radioactivité à l'aide d'un compteur à scintillation

Figure II.A.2 : Organigramme de la minéralisation du 2,4-D par radiorespirométrie (panneau B)

II.A.5 Analyse de la structure globale des communautés microbiennes du sol

II.A.5.1 Extraction directe de l'ADN à partir du sol

Après 5 à 7 jours d'incubation, trois quantités de 250 mg de sol (trois répétitions) ont été prélevé à partir de chaque dispositif contenant le sol traité par le 2,4-D non marqué.

L'ADN a été extrait directement du sol selon la méthode décrite par **Martin-Laurent *et al.*, 2001** :

- 1) L'extraction a été refaite trois fois ;
- 2) 0,5 g de billes de 106 µm, préalablement lavées, et 2 billes d'1 mm de diamètre ont été rajouté au tube (ependorf 1 ml) contenant l'échantillon du sol (250 mg).

Le protocole de conditionnement des billes est le suivant :

- a) Mettre les billes dans un tube flacon de 12 ml, les recouvrir d'HCl 1 N. Secouer le tube puis centrifuger à 1200 g pendant 5 mn, puis enlever le surnageant.
 - b) Recommencer l'opération une deuxième fois.
 - c) Rincer les billes deux fois avec de l'eau MilliQ et centrifuger à 1200 g pendant 5 mn, puis enlever le surnageant.
 - d) Sécher les billes en mettant 2 ml d'Ethanol 95° et centrifuger à 1200 g pendant 5 min, puis enlever le surnageant.
 - e) Faire sécher les billes en laissant le tube dans l'étuve à 80° C pendant une nuit.
- 3) Les 250 mg de sol ont été homogénéisés dans 1 ml de tampon d'extraction (**annexe 1**) [Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), EDTA 100 mM (pH 8,0), NaCl 100 mM, 1% (W/V) polyvinylpyrrolidone (PVPP), 2% (W/V) sodium dodecyl sulfate (SDS)] dans un tube à vis (2 ml).
 - 4) Les échantillons ont été agités à 16000 rpm pendant 30 secondes à l'aide d'un broyeur mécanique (Mikro-Dismembrator S ; B Braun, Biotech International).
 - 5) Le broya a été incubé pendant 10 min à 65°C puis centrifugé à 14000 g pendant 1 min à 4°C (Sigma Bioblock Scientific 3K15).
 - 6) Après récupération du surnageant, les protéines ont été précipitées par l'ajout du 1/10^{ème} du volume d'acétate de sodium 3M (pH 5,5) (**annexe 2**), et par incubation dans la glace pendant 10 min.

- 7) Après centrifugation à 14000 g et à 4°C pendant 5 min, le surnageant a été récupéré dans des tubes eppendorf de 2 ml puis homogénéisé dans un volume équivalent d'isopropanol froid (conservé à -20°C).
- 8) Les échantillons ont été centrifugés à 13000 g et à 4°C pendant 30 min. Par la suite, le surnageant a été éliminé avec précaution et le culot lavé à l'éthanol 70% froids (conservé à -20°C) (sans remettre l'ADN en suspension, c'est-à-dire l'éthanol a été versé en face du culot et non par-dessus).
- 9) Après centrifugation à 13000 rpm pendant 5 min, l'alcool a été éliminé et le culot a été laissé sécher pendant 15 min à 37°C (jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de traces d'alcool sur les parois du tube). Le culot d'ADN a été repris dans 50 µl d'H₂O MilliQ.
- 10) Les échantillons d'ADN ont été purifiés par passage sur une colonne de PVPP (Sigma), ensuite sur une colonne de sépharose 4B (**annexes 3, 4 et 5**).
- 11) Les échantillons ont été conservés à -20°C.

II.A.5.2 Quantification de l'ADN

La qualité et l'intégrité d'ADN extraite a été vérifiée par séparation électrophorétique sur un gel à 1% d'agarose (Seakem LE, BM). Par la suite, l'ADN a été quantifié par BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg, Germany) à 260 nm. Les extraits d'ADN du sol ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

II.A.5.3 Analyse RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

Le principe de la RISA consiste à analyser le polymorphisme de longueur de l'intergène 16S-23S de l'opéron ribosomique bactérien. Les différentes étapes de cette analyse sont représentées sur la **figure II.A.3**.

L'intergène 16S-23S de l'ADNr de 20 ng d'ADN du sol a été amplifié dans un volume final de 25 µl à l'aide de 1 µM des amorces universelles 38r (5'-CCG GGT TTC CCC ATT CGG-3') et 72f (5'-TGC GGC TGG ATC TCC TT-3') (**Gurtler and Stanisich, 1996**), 5 µM MgCl₂, 1 µl of T4 gen 32 (Qbiogene, France) et 0.625 U de Taq DNA Polymerase (Qbiogene, France).

La réaction PCR a été réalisée dans un Thermocycleur de type PTC 200 Gradient cyler, avec le programme suivant : un cycle de 4 min à 95°C, suivi de 34 cycles de (1 min à 94°C, 1 min à 55°C, 2 min à 72°C) et un cycle terminal de 15 min à 72°C.

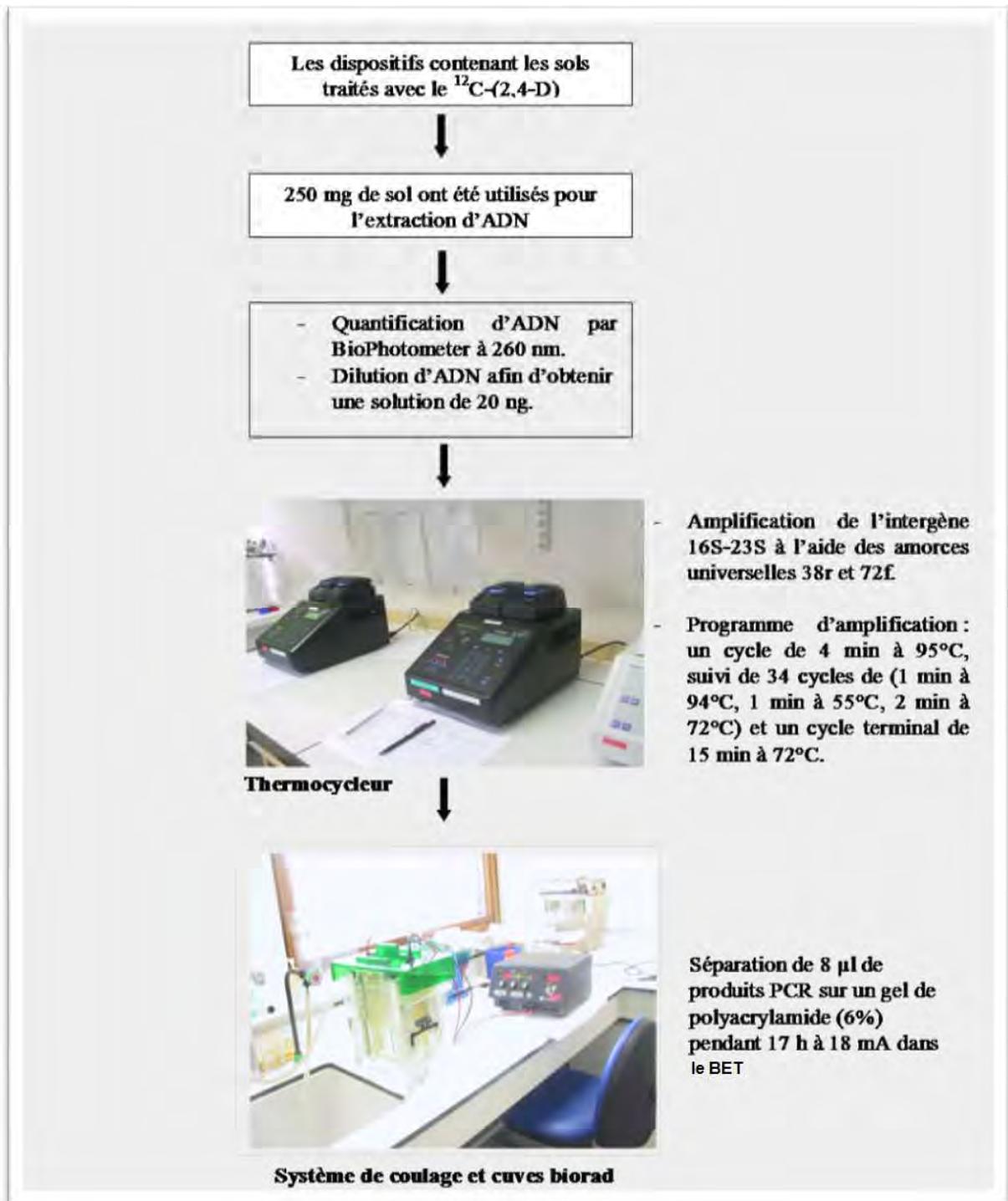


Figure II.A.3: Organigramme de l'analyse de la structure globale des communautés bactériennes par Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA)

Les produits PCR ont été quantifiés après leur séparation sur un gel à 1% d'agarose, à l'aide du logiciel Storm 860 (Molecular Dynamics).

Pour chaque échantillon de sol, une quantité équivalente de produits PCR (8 µl) a été séparée sur un gel natif à 6% de polyacrylamide (22x 20x 0,1 cm) pendant 17 h à 18 mA dans le TBE 1X. Les gels polyacrylamide sont des gels de résolution plus fine que les gels d'agarose. Ils sont utilisés pour la visualisation des échantillons d'ADN de faible taille.

Le gel polyacrylamide a été préparé comme suit : 4,5 ml de TBE 10x, 31,5 ml de H₂O MilliQ, 9 ml d'Acrylamide-bis (29:1), 170 µl de persulfate d'ammonium (APS) à 10% et 45 µl de Temed.

Le marqueur de taille moléculaire utilisé est de type BVIII.

Le gel a ensuite été coloré pendant 20 min à l'obscurité dans une solution de SYBR GreenII (Molecular Probes, Leiden, the Netherlands). La solution de SYBR GreenII a été préparé comme suit : TBE 10X 40 ml, H₂O MilliQ 210 ml, SYBR Green 40 µl.

Enfin le gel a été révélé au storm 960 (Molecular Dynamics, USA).

Les profils de RISA ont été analysés avec One-D Scan 2.03 program (Scanalytics program) pour établir les données des matrices (présence/absence, taille et intensité relative de chaque bande). Ces données ont été alors soumises à l'analyse de composant principal (ACP) à l'aide du logiciel ADE-4 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/ADE-4.html>).

II.A.6 Extraction des résidus de 2,4-D

II.A.6.1 Extraction des résidus extractibles

Après l'étude de la minéralisation de 2,4-D, les échantillons des sols ont été extraits au méthanol selon le protocole suivant : 8 g de sol ont été additionnés de 16 ml de méthanol, placés dans un tube de centrifugation (250 ml) et agités à 150 rpm à 28°C pendant 16 heures. Ensuite les échantillons ont été centrifugés pendant 10 min à 6000 rpm. Le surnageant a été récupéré et filtré sur un filtre en fibre de verre (GF/A, Wattman). Une aliquote (1ml) a été dosée au compteur à scintillation liquide pour en déterminer le carbone radioactif extractible.

II.A.6.2 - Evaluation des résidus non extractibles

L'évaluation des résidus liés a été réalisée à partir du culot issu des échantillons de sol extraits par le méthanol. Les culots ont été séchés à température ambiante, broyés et mélangés.

Le ^{14}C présent sous forme de résidus liés a été déterminé à partir de 0.5 g sol sec de chaque échantillon. Il a été extrait avec le méthanol sous un flux d' O_2 à 900 °C pendant 4 minutes (Oxydizer biologique Ox-500, instruments d'EG&G, France). Le $^{14}\text{C-CO}_2$ a été piégé dans 10 ml de mélange (Oxysolve C - 400 scintillant) et la radioactivité a été déterminée par un compteur à scintillation liquide. Le pourcentage de résidus liés est calculé et exprimé par rapport à la quantité de radioactivité initialement apportée.

II.B : Isolement et caractérisation des souches dégradantes

II.B.1 Échantillons du sol

Dans cette étude, les échantillons du sol sont les mêmes que ceux utilisés précédemment, à savoir : Ibn Badis (45IB), Boudjriou Messaoud (46BM) et Ain-Abid (47AA).

Dans la partie II.A, nous avons confirmé la présence de microorganismes dégradants le 2,4-D dans les trois sols. Dans le cas du sol 46 BM, le taux de minéralisation était légèrement supérieur à ceux de 45 IB et 47 AA.

II.B.2 Cinétique de minéralisation du 2,4-D et technique d'enrichissement

Les deux méthodes ont été réalisées dans les mêmes conditions.

II.B.2.1 Cinétique de minéralisation du 2,4-D

Le but de cette manipulation est de suivre les taux de minéralisation des trois sols, afin de déterminer le temps nécessaire pour les prélèvements utilisés dans les isolements au cours de la technique d'enrichissement.

La minéralisation du substrat a été déterminée par radiorespirométrie avec le 2,4-D marqué au ^{14}C sur le cycle (^{14}C -cycle]-2,4-D) (pureté analytique > 99%, activité spécifique 4.6×10^8 Bq mmol^{-1}).

Pour chaque échantillon (type de sol), 10 g de sol ont été mise en suspension dans le milieu minéral Cardiff contenant le 2,4-D comme seule source de carbone.

La composition du milieu Cardiff (Vallaey, 1992) est la suivante :

- K_2HPO_4 (1.5 g/l) ; KH_2PO_4 (0.5 g/l) ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/l) ; oligo-éléments (500 μl) ; MgSO_4 (0.2 g/l) ; extrait de levure (0.005 g/l) et 2,4-D (663 mg/l).

La composition de la solution oligo-éléments est la suivante :

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (400 mg/l) ; $\text{MgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (20 mg/l) ; Acide borique (10 mg/l) ; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; CuSO_4 (200 mg/l) ; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/l) ; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (500 mg/l) ; EDTA 250 mg/l et H_2O QSP (1000 ml).

Les trois échantillons 45IB, 46BM, 47AA et un témoin (100 ml Cardiff sans sol) ont été incubés, dans une salle climatisée à 28°C sous agitation à 150 rpm, dans des dispositifs radiorespirométriques étanches.

Le dispositif radiorespirométrique est un bocal de 1 litre dans lequel on place (**Figure II.A.2 panneau A**) :

- Un flacon en verre (250 ml) contenant la suspension (10g sol + 100 ml Cardiff).
- Une fiole à scintillation liquide (20 ml) contenant 10 ml de soude (NaOH 0,2 N) qui assure le piégeage du $^{14}\text{CO}_2$ dégagé lors de l'incubation.
- Une fiole à scintillation liquide (20 ml) contenant 10 ml d'eau permutée afin de saturer l'atmosphère du bocal.

Les pièges de soude ont été remplacés régulièrement, ce qui a permis :

- (i) d'aérer le système d'incubation
- (ii) d'assurer la non saturation du piège par le CO_2 marqué ou non au ^{14}C .

Le $^{14}\text{CO}_2$ piégé dans la soude a été estimé à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Packard 1900 TR-Tricarb) après l'ajout de 10 ml de liquide scintillant (ACSII, Amersham).

II.B.2.2 Technique d'enrichissement

L'isolement des microorganismes dégradants le 2,4-D a été conduit par une technique d'enrichissement microbien qui consiste à :

- ✓ mettre en suspension les échantillons des trois sols dans le milieu minéral Cardiff, à la même composition que précédemment, contenant le 2,4-D comme seule source de carbone (663 mg/l).
- ✓ mettre en suspension 10 g de chaque échantillon dans 100 ml du milieu Cardiff dans un Erlen de 500 ml.
- ✓ placer 4 échantillons (trois Erlen contenant les trois sols différents et un Erlen sans sol utilisé comme témoin) dans une salle climatisée à 28°C. L'agitation était de 150 rpm.
- ✓ prélever 1ml de chaque échantillon le jour même pour l'analyse d'ADN.
- ✓ utiliser directement deux prélèvements de 1ml de la suspension de chaque échantillon pour l'isolement des bactéries dégradantes.
- ✓ Inoculer, à la fin de chaque enrichissement, 10 ml de la suspension bactérienne de chaque échantillon dans 90 ml du milieu Cardiff frais contenant 663 mg/l de 2,4-D; 1ml de chaque suspension bactérienne a été conservé à -20°C (pour l'analyse d'ADN).

Quatre enrichissements successifs ont été réalisés avec la même procédure (voir l'organigramme de la **figure II.B.1**).

II.B.3 Isolement et purification des souches bactériennes dégradantes

Afin de réaliser ces deux étapes nous avons procédé comme suit :

- ❖ La suspension prélevée pour l'isolement (1 ml) a été mise en dilutions successives (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}) dans des tubes à essai contenant le milieu Cardiff sans 2,4-D (9 ml pour chaque tube).
- ❖ Des aliquotes de 100 μ l des suspensions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} ont été étalées sur des boîtes de pétri contenant le milieu de Cardiff solide. Ce dernier contient 15 g agar purifié et 663 mg de 2,4-D.
- ❖ Le milieu solide a été stérilisé à 121°C pendant 20 mn.
- ❖ Après l'étalement, les boîtes de pétri ont été incubées à 28°C pendant 6 jours.
- ❖ Afin d'isoler et de purifier les souches dégradantes, les différentes colonies formées ont été étalées à leur tour sur des boîtes de pétri contenant le même milieu solide.
- ❖ Par la suite, ces boîtes de pétri ont été incubées à 28°C pendant 6 jours.
- ❖ Enfin, les isolats purifiés ont été conservés à 4°C.

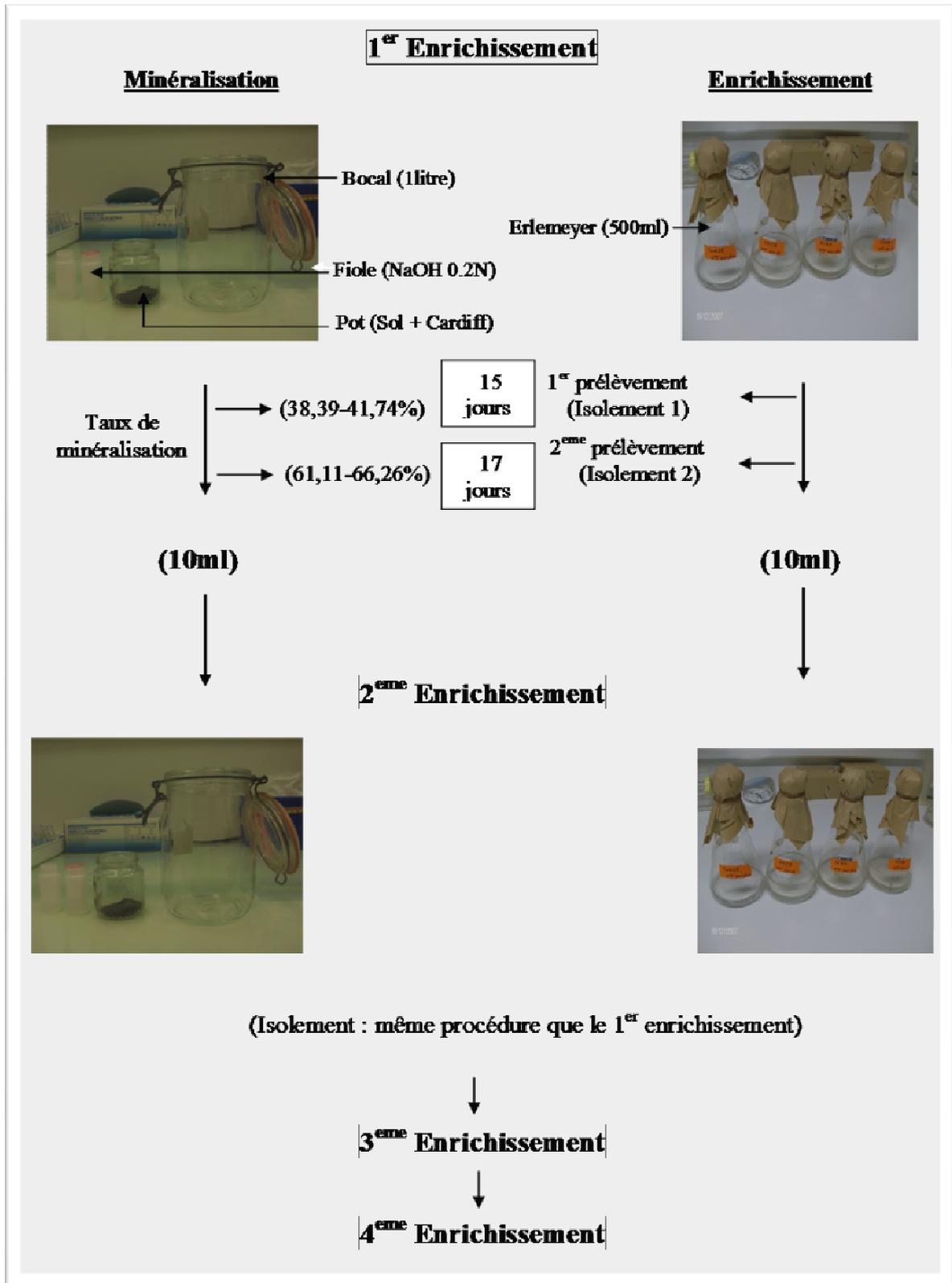


Figure II.B.1 : Organigramme de la méthode d'enrichissement et isolement des souches bactériennes dégradantes

II.B.4 Test de dégradation du 2,4-D

Afin de déterminer la capacité de dégradation du 2,4-D, les isolats purifiés ont été étalés sur un milieu de 2,4-D solide, préparation de Loos (1975) modifiée (Vallaey *et al.*, 1998). La composition du milieu est la suivante : Eosine B (0.040 g/l) ; Bleu de Méthylène (0.0065 g/l) ; 2,4-D (0.250 g/l) ; Oligo-éléments (500 µl) ; MgSO₄ (1 g/l) ; Extrait de levure (0.005 g/l) ; Agar (20 g/l).

Après agitation à une température de 100 °C, le pH du milieu a été ajusté à 7 par l'ammoniaque. A la fin, le milieu de Loos a été stérilisé à 121°C pendant 20mn.

Les cellules, responsables de la minéralisation du 2,4-D dans ce milieu, ont formés des colonies pourpres foncées (elles provoquent le changement du pH par déhalogénéation du 2,4-D).

Afin de confirmer la dégradation dans une solution aqueuse, les mêmes isolats ont été inoculés en même temps dans des tubes de 12 ml contenant 5 ml du milieu Cardiff + 250 mg.L⁻¹ du 2,4-D.

Le pourcentage de la dégradation du 2,4-D restant a été déterminé par la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Les échantillons ont été analysés par l'utilisation d'une phase stationnaire inverse, avec une colonne Microsorb-MV C₁₈ (Longueur 25 cm, diamètre 4,6 mm, Varian) en mode isocratique. La phase mobile est constituée d'acétonitrile + un tampon phosphate : 6g de K₂HPO₄ et 3ml d'acide phosphorique concentré (H₃PO₄) dans un litre d'eau MQ. Le débit d'écoulement de la phase mobile est de 0,5 ml/min et la longueur d'onde de détection est de 215 nm.

II.B.5 Caractérisation des souches bactériennes dégradantes

II.B.5.1 Technique RFLP (restriction fragment length polymorphism)

a) Extraction de l'ADN

Le protocole de l'extraction de l'ADN est le suivant :

- Les isolats purifiés ont été cultivées sur un milieu TY pendant une nuit à 28°C. Le milieu est composé de Tryptone (5 g/l) et d'extrait de levure (3 g/l).
- Après stérilisation à 121°C pendant 20 min, 10 ml de CaCl₂ (60 mM) ont été ajoutés au milieu.
- Après l'incubation, 100 µl de suspension bactérienne, de densité optique comprise entre 0.2 et 0.3 u.a., ont été centrifugé à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C.

- Par la suite, le surnageant a été éliminé et le culot a été remis en suspension dans 50 µl d'eau ultra-pure stérile additionné de 50 µl de tris HCl (10 mM. pH 8,2).
- 6,5 µl de solution protéinase K (1mg/ml) ont été ajoutés aux échantillons mélangés au vortex et le tout a été incubé dans un bain-marie à sec pendant 2h à 55°C.
- Pour détruire les membranes des cellules bactériennes et dénaturer la protéinase K, les échantillons ont été placés dans un bain-marie à 100°C pendant 10 minutes puis dans un bain de glace + éthanol pendant 5 minutes. Cette opération a été répétée trois fois.
- Les échantillons ont été centrifugés à 13000 rpm durant 5min pour éliminer les débris cellulaires.
- Finalement, le surnageant contenant l'ADN bactérien a été récupéré et conservé à -20 °C jusqu'à son utilisation.

b) Amplification du gène ADNr 16S

Le gène ADNr 16S a été amplifié à l'aide des amorces universelles (**Weisburg *et al.*, 1991 ; Rousseaux *et al.*, 2001**) : 27f (5'-AGAGTTTGAT[C/A]TGGTCAG-3') et 1492r (5'-TACGG[A/T/C]TACCTTGTTACGACTT-3'). Ces amorces occupent respectivement les positions 8-27 et 1492-1513 sur le gène 16S rRNA d'*E. coli* (**Yang-Jie *et al.*, 2005**).

Le mélange réactionnel des 24 échantillons est constitué de : 824.4 µl H₂O stérile, 120 µl tampon 10x + MgCl₂, 9,6 µl de dNTP (25 mM), 60 µl de chaque amorce oligonucléotidique (0.5 µM) et 6 µl de Taq polymérase (2.5 UI).

Enfin, 5 µl d'ADN de chaque échantillon ont été ajoutés à 45 µl du mélange réactionnel pour avoir un volume finale de 50 µl. Ce dernier a été analysé par la PCR.

La réaction PCR a été réalisée dans un Thermocycleur de type PTC 200 Gradient cyler, avec le programme suivant : un cycle de 4 min à 95°C, suivi de 34 cycles de (1 min à 94°C, 1 min à 55°C, 2 min à 72°C) et un cycle terminal de 15 min à 72°C.

Les produits d'amplification ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose (1% dans le TBE 1x) puis colorés par le bromure d'éthidium (200 µg/l) afin de visualiser les bandes. Les images ont été enregistrées sur le système Bioprint (Vilbert Lourmat).

c) Analyse de restriction

L'analyse du polymorphisme de longueur de restriction de 16S rDNA a été réalisée après la digestion des produits PCR par les enzymes de restriction *RsaI* et *AluI* (Appligene-Oncor). La préparation des deux mélanges réactionnels, d'un volume total de 10 µl, est la suivante : 4 µl

d'H₂O MQ stérile, 1 µl de tampon réactionnel 10x spécifique de l'enzyme de restriction utilisée, 1 µl d'enzyme et 4 µl de produits PCR. Le mélange a été incubé à 37°C pendant une nuit.

Les fragments de restriction ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur un gel à 3% d'agarose haute résolution (Appligene-Oncor) à 80 volts pendant 4 heures dans le tampon TBE 1x (Interchim).

La coloration du gel a été réalisé avec le bromure d'éthidium et les images des profils de restriction ont été enregistrées sur le système Bioprint (Vilbert Lourmat, France).

II.B.5.2 Séquençage d'ADNr 16S

a) Amplification d'ADNr 16S avec les amorces 926r et 515r

Afin d'identifier les isolats purifiés, les produits PCR des gènes ADNr 16S de ces isolats ont été utilisés pour la réaction de séquençage qui a été réalisée selon les étapes suivantes :

- ★ Les produits PCR ADNr 16S ont été purifiés sur des plaques de réaction. Ces plaques, contenant le séphadex imbibé dans l'eau MQ (300 µl/puit), ont été placées à 4°C pendant 4 heures, puis centrifugées pendant 5 minutes à 910 rpm et 20°C. Les produits PCR sont déposés ensuite sur le séphadex. Enfin, la purification est obtenue par une deuxième centrifugation.
- ★ Le mélange réactionnel des PCR utilisés pour le séquençage, a été effectué dans un volume total de 15 µl. Le mélange est composé de : 9,6 µl H₂O MQ stérile, 0,4 µl d'amorce, 4 µl de DTCS (mélange contenant les 4 di-déoxy Nucléotide Triphosphates (ddNTPs) marqués avec un colorant spécifique à chaque base) et 1 µl de produit PCR 16S rDNA purifié.
- ★ Les deux réactions, PCR avec l'amorce 926r et PCR avec l'amorce 515r, ont été réalisées dans un thermocycleur de type PTC 200 Gradient cycler, avec le programme Seq-58 : Après chauffage à 94°C pendant 2 min les cycles de réaction étaient comme suit : 25 cycles de 30 sec à 94 °C, 30 sec à 55 °C et 4 min à 60°C.
- ★ Enfin, les produits des deux réactions ont été purifiés avec la même procédure précédente.

b) Réaction de Séquençage

Les produits d'amplification avec les amorces 926r et 515r ont été chargés dans des barrettes et analysés par un séquenceur à 8 capillaires du type CEQ 2000XL (Beckman, Fullerton, USA). Les données générées par le séquenceur ont été traitées à l'aide du logiciel CEQ Sequence Analysis qui permet de générer un spectre de séquençage et d'aboutir à la détermination de la séquence nucléotidique de l'ADN étudié.

c) Traitement des séquences

La recherche des similarités entre les séquences nucléotidiques obtenues et les séquences connues, stockées dans des bases de données (GenBank), a été réalisée avec le programme Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) du NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Cette recherche permet d'identifier la séquence de 16S rDNA présentant le plus de similitude avec celle de 16S rDNA de la souche dégradant le 2,4-D.

II.B.6 Effet d'enrichissement sur la structure des communautés microbiennes du sol :

Estimation par RISA.

L'influence des quatre enrichissements sur la structure des communautés microbiennes a été évaluée par l'application de la technique Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA).

Dans cette partie, le protocole expérimental est le même que celui de la partie II (voir § II.A.5.3), sauf que dans ce cas l'ADN des souches représentant les différents types RFLP a été rajoutée afin de déterminer leur présence dans ces enrichissements.

II.B.7 Gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC*

La présence et la diversité des gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC* dans l'ADN total de chaque isolat, ont été examinées par amplification à l'aide des amorces spécifiques.

tfdA : 5'-AAC-GCA-GCG-(G/A)TT-(G/A)TC-CCA-3' et 5'-ACG-GAG-TTC-TG(C/T)-GA(C/T)-ATG-3' et *tfdB* : 5'-ATA-GCG-CTG-(A/G)TT-CAT-(C/T)TC-3' et 5'-CG-CA(C/T)-ATC-CCAA(C/T)-CA(G/A)-C-3' (Vallaeyns *et al.*, 1996).

tfdC : 5'-GGC CGG CTS AAG ACH TAC GA3' et 5'-GCG GGY TCG ATV ACG AAG T 3' (Cavalca *et al.*, 1999).

II.B.7.1 Amplification des gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC*

La présence des gènes *tfd* (*tfdA*, *tfdB* et *tfdC*) dans les isolats obtenus, a été déterminée par l'amplification de ces gènes par la technique PCR et la migration sur gel d'agarose (1%).

18 isolats ont été testés : 17, 69, 70, 82, 88, 107, 108, 23, 81, 30, 20, 22, 105, 65, 71, 72, 76, 96. Ces isolats représentent les différents types RFLP du gène 16S des 49 isolats purifiés.

Le mélange réactionnel (pour 20 échantillons) a été réalisé dans un volume final de 25 µl : 323,5 µl H₂O ultra-pure, 50 µl de tampon, 4 µl de dNTP, 25 µl de chaque amorce oligonucléotidique, 2,5 µl de Taq polymérase, 20 µl de T4 gen 32 et 2,5 µl d'ADN.

La réaction PCR a été réalisée dans un Thermocycleur de type PTC 200 Gradient cyler, avec les programmes suivants :

- Programme *tfdA* : un cycle de 4 min à 95°C, suivi de 34 cycles (1 min à 95°C, 1 min à 59°C, 2 min à 72°C) et un cycle terminal de 7 min à 72°C.
- Programme *tfdB* et *tfdC* : cycle de 4 min à 95°C, suivi de 10 cycles de (1 min à 94°C et 1 min à 61°C suivi par une diminution de 0,5°C par cycle, 2 min à 72°C), 25 cycles de (1 min à 94°C, 1 min à 57°C, 2 min à 72°C) et un cycle terminal de 7 min à 72°C.

II.B.7.2 Taille des trois gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC*

Afin de déterminer la taille des gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC*, les produits PCR de l'ADN de certains isolats (69, 70 et 105) ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose (1% dans le TBE 1X) et colorées par le bromure d'éthidium (200 µg/l). Le marqueur utilisé est le BVIII. Les images ont été enregistrées sur le système Bioprint (Vilbert Lourmat).

II.B.7.3 Digestion des produits PCR avec les enzymes de restriction *MspI* et *HaeIII*

La digestion des produits PCR des différents gènes *tfd* de tout les isolats (49 isolats) a été réalisée avec les enzymes de restriction *MspI* et *HaeIII* (Q-Biogene). La préparation des deux mélanges réactionnels, d'un volume total de 10 µl, est la suivante : 4 µl d'H₂O MQ stérile, 1 µl de tampon réactionnel 10x spécifique de l'enzyme de restriction utilisée, 1 µl d'enzyme, et 4 µl de produits PCR. Le mélange a été incubé à 37°C pendant une nuit.

Les fragments de restriction ainsi obtenus ont été séparés par électrophorèse sur un gel à 3,5% d'agarose haute résolution (Q-Biogene, MP Biomedicals Europe) à 80 volts pendant 4 heures dans le tampon TBE 1x (Interchim).

La coloration du gel a été réalisée avec le bromure d'éthidium et les images des profils de restriction ont été enregistrées sur le système Bioprint (Vilbert Lourmat).

II.C. Test de bioaugmentation

II.C. 1 Choix du sol

Dans cette étude, les sols utilisés ont été collectés à partir de trois lieux différents de la région de Constantine et de Mila, Est de l'Algérie, (**Figure II.C.1**) :

- Campus de l'université Mentouri-Constantine (48CC) ;
- M'chira (Mechtat Elgabel), wilaya de Mila (49MC) ;
- Didouche Mourad, wilaya de Constantine (50DM).

Les échantillons des sols ont été collectés à partir de la couche supérieure (15 cm) puis tamisés au travers d'un tamis de 2,5 mm.

À notre connaissance, et contrairement au sol 50DM, les sols 48CC et 49MC n'étaient pas traités avec le 2,4-D.

Tous les échantillons ont été conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Le choix du sol utilisé pour la bioaugmentation a été basé sur les résultats de la technique de minéralisation du substrat par radiorespirométrie avec le 2,4-D marqué au ^{14}C ([^{14}C -cycle]-2,4-D) (chaque échantillon du sol (10g) a été traité par 3 μg de 2,4-D et 2000 Bq de ^{14}C -2,4-D).

La teneur en humidité de chaque sol a été mesurée par gravimétrie après avoir séché les sols à 110°C pendant 24 heures.

Avant utilisation, l'humidité de chaque sol a été ajustée à 25% par addition de l'eau distillée en tenant compte des volumes de solutions du 2,4-D rajoutés. Le traitement s'effectuait en rajoutant la solution 2,4-D à la surface des échantillons des sols, suivi d'une homogénéisation à l'aide d'un cône.

Les trois échantillons 48CC, 49MC, et 50DM ont été incubés à 20°C dans les mêmes dispositifs radiorespirométrique utilisés précédemment (§ II.A.1.3).



Figure II.C.1 : Plan d'échantillonnage. Sol 48CC : Campus de l'université Mentouri-Constantine ; Sol 49MC : M'chira (Mechtat Elgabel), wilaya de Mila ; Sol 50DM : Didouche Mourad, wilaya de Constantine

Il est à noter que les pièges de soude ont été remplacés régulièrement, ce qui a permis d'aérer le système d'incubation et d'assurer le non saturation du piège par le CO₂ marqué ou non au ¹⁴C.

Le ¹⁴CO₂ piégé dans la soude a été estimé à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Packard 1900 TR-Tricarb) après l'ajout de 10 ml de liquide scintillant (ACSII, Amersham).

II.C. 2 Choix de la souche d'inoculation

Dans ce travail le choix de la souche d'inoculation a été fait suite aux résultats de la technique de minéralisation sur microplaques (**Figure II.C.3**). Cette technique comporte plusieurs étapes :

- a) le test de dégradation a été réalisé sur deux microplaques 24 puits (Evergreen Scientific),

- b) une culture bactérienne de chaque isolat e a été préparée dans un tube de 5ml contenant 2ml du milieu TY + 250mg/litre de 2,4-D. Les tubes ont été incubés à 28°C pendant une nuit,
- c) les cellules bactériennes ont été récupérées par centrifugation à 6000 rpm et à 4°C pendant 2min,
- d) les cellules bactériennes ont été lavées trois fois avec le tampon Knapp constitué de : K_2HPO_4 (1 g/l), KH_2PO_4 (1 g/l), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1 g/l) et $FeCl_3$ (4 mg/l),
- e) la densité optique de chaque culture bactérienne a été mesurée à 600 nm et ajustée à 1 unité arbitraire (u.a.) par l'addition d'un volume du milieu Cardiff sans 2,4-D (dilution),
- f) un volume de 250 μ l de la solution 2,4-D (250 mg/l) marquée au ^{14}C ($[^{14}C\text{-cycle}]$ -2,4-D) a été introduit, sous la hotte, dans chaque puits.
- g) 250 μ l de chaque culture bactérienne ont été utilisés pour l'inoculation du puits correspondant pour avoir 0,5 ml de suspension bactérienne (125 mg/l de 2,4-D) avec une densité optique de 0,5,
- h) un filtre Wattman a été imbibé dans une solution saturée d'hydroxyde de baryum et déposé sur chaque microplaque 24 puits ;
- i) chaque plaque a été bien fermée par un couvercle en acier (coté plastifier sur le filtre Wattman).
- j) Enfin, les plaques ainsi préparées ont été incubées à 20°C.

L'emplacement des isolats testés dans les puits des deux microplaques est représenté sur la **Figure II.C.2.**

En ce qui concerne la lecture de ces microplaques, le dosage de la radioactivité résultant de la libération du $^{14}CO_2$ a nécessité les étapes suivantes :

- 1) lors d'un prélèvement le papier filtre est remplacé par un autre pour la lecture suivante,
- 2) trois prélèvements successifs ont été effectués (24, 48 et 72 heures),
- 3) après séchage à la température ambiante, c'est-à-dire élimination de l'hydroxyde de baryum résiduel, les papiers filtres des trois prélèvements sont déposés dans une cassette spéciale, de façon que leurs faces contenant le $^{14}CO_2$ soient en haut (**Figure II.C.3**). Ces papiers sont recouverts par un écran permettant le dosage de la

- radioactivité. La cassette est ensuite incubée pendant 24 heures à l'ombre et à la température ambiante afin de permettre le passage du $^{14}\text{CO}_2$ des papiers à l'écran,
- 4) le dosage de la radioactivité est réalisé par l'analyse de l'écran à l'aide du Phosphorimager Storm 860 (Molecular Dynamics),
 - 5) Enfin, la radioactivité obtenue est estimée à partir des intensités de la tache formée et de la gamme. La gamme étant une série de concentrations croissantes en $^{14}\text{CO}_2$ préparée sur un autre papier de la même manière que précédemment puis insérée dans la cassette en même temps que les autres papiers des différents prélèvements.

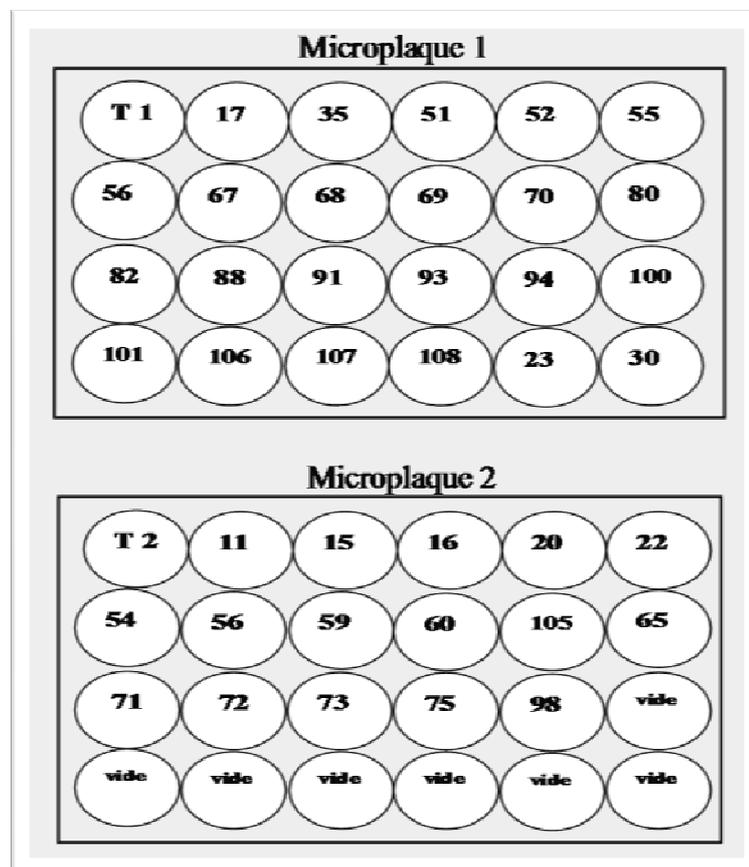


Figure II.C.2 : Emplacement des isolats testés dans les puits des deux microplaques

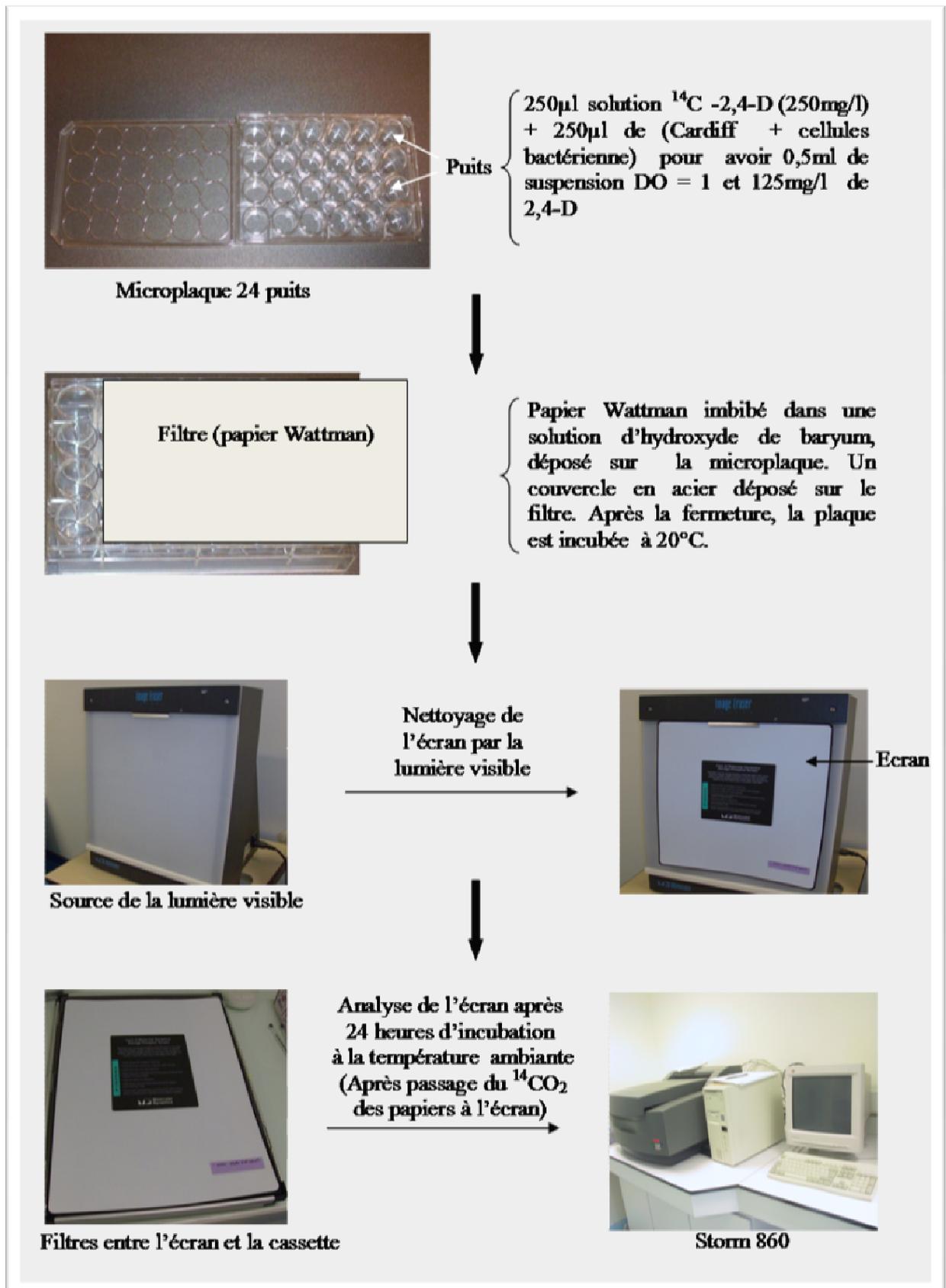


Figure II.C.3 : Organigramme du test de minéralisation sur microplaque 24 puits

II.C.3 Test de bioaugmentation

Le test de bioaugmentation a été effectué par la technique de minéralisation du substrat par radiorespirométrie avec le 2,4-D marquée au ^{14}C ($[^{14}\text{C} \text{-cycle}]$ -2,4-D). Chaque échantillon du sol (10 g) a été traité par $3\mu\text{g}$ de ^{14}C -2,4-D.

D'après les résultats obtenus, le sol 49MC présente une minéralisation du 2,4-D plus faible par rapport au deux autres sols 48CC et 50DM.

Les résultats obtenus ont également montré que l'isolat 67 choisi est caractérisé par un pouvoir de minéralisation totale du 2,4-D en moins de 24 heures.

Il est à noter que cet isolat a été obtenu à partir du sol 45IB représentant le type II (RFLP-16S).

Le test de bioaugmentation a été réalisé, dans des dispositifs radiorespirométriques étanches (§ II.A.1.3), selon le mode opératoire suivant :

1. L'humidité du sol a été ajustée à 15%, 18%, 21%, et 25% par l'addition de l'eau distillée en tenant compte du volume de la solution du 2,4-D rajouté et de la culture contenant les cellules bactériennes. La culture bactérienne est préparée comme précédemment (§II.C.2).
2. Le traitement effectué consiste à verser la solution du 2,4-D et la suspension bactérienne sur la surface des échantillons des sols, suivi d'une homogénéisation à l'aide d'un cône.
3. Le nombre de cellules bactériennes ($3,4 \times 10^6$ cellule/gr sol) utilisé pour l'inoculation a été déterminé par la méthode des délutions successives.
4. Le $^{14}\text{CO}_2$ piégé dans la soude a été estimé à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Packard 1900 TR-Tricarb) après l'ajout de 10 ml de liquide scintillant (ACSII, Amersham).

Chapitre III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.A : Paramètres affectant la minéralisation du 2,4-d

III.A.1 Capacité des trois sols agricoles à minéraliser le 2,4-D

III.A.1.1 Caractéristiques physicochimiques

Il est bien connu que le type de sol a une influence très significative sur la persistance des pesticides et leurs produits de dégradation (**Sethunathan *et al.*, 1991**). Avant de discuter les résultats de la minéralisation de notre substrat et afin de mieux comparer l'aptitude de sa dégradation dans les trois sols algériens, nous avons jugé utile de présenter d'abord les résultats des principales caractéristiques physicochimiques de ces sols et que nous avons rassemblé dans le **tableau III.A.1**.

La lecture minutieuse des valeurs reportées sur tableau permet de noter les remarques suivantes :

- Parmi les trois sols étudiés, le 47AA est le moins riche en argile,
- Du point de vue composition organique, le 46BM semble être le plus pauvre en azote total, en carbone organique et en matière organique (moins de la moitié que celles de 45IB et 47AA),
- Le 46BM contient moins de sables grossiers que celui de 45IB, alors que ce dernier ne possède environ que la moitié de celui de 47AA. Il est bien connu qu'un sol sableux est généralement caractérisé par la persistance des herbicides et leurs sous-produits à cause de la faible activité microbienne (**Sethunathan *et al.*, 1991**),
- Par ailleurs, les deux sols 45IB et 46BM contiennent respectivement trois fois et deux fois plus de matière minérale (phosphore et magnésium) que le 47AA.

D'après ces résultats, on peut prévoir une activité microbienne plus importante pour les deux sols 45IB et 46BM.

Cependant, la persistance des produits phytosanitaires ne dépend pas uniquement de ces paramètres mais peut être également attribuée à d'autres facteurs tels que : le pH, la teneur en eau, le rapport C/N, la texture du sol et l'activité microbienne.

Tableau III.A.1 Histoire, propriétés physico-chimiques des trois sols algériens [45 Ibn Badis (El-Haria), 46 Boudjriou Messaoud (Ain Karma) et 47 (Ain Abid)].

Sol	45	46	47
Histoire du traitement par le 2,4-D (année)	3	15	15
Humidité équivalente (g/100g)	32.40	26.30	31.40
Argile (< 2 μm) (g.kg^{-1})	550	498	405
Limons fins (2/20 μm) (g.kg^{-1})	113	240	205
Limons grossiers (20/50 μm) (g.kg^{-1})	106	95	100
Sables fins (50/200 μm) (g.kg^{-1})	131	98	97
Sables grossiers (200/2000 μm) (g.kg^{-1})	100	69	193
Azote (N) total (g.kg^{-1})	1.84	1.19	2.01
Carbone organique (g.kg^{-1})	20.10	10.70	19.60
C/N	10.90	9.02	9.77
Matière organique (g.kg^{-1})	34.80	18.50	33.90
pH (AU)	7.54	8.43	8.36
Phosphore (P_2O_5) (g.kg)	0.35	< 0.002	< 0.002
Magnésium (Mg) (C mole. kg^{-1})	5.73	3.87	2.07
Magnésium (MgO) (g.kg^{-1})	1.16	0.87	0.417
Magnesium (Mg) (g.kg^{-1})	0.70	0.47	0.251

III.A.1.2 Minéralisation du 2,4-D

Dans ce travail, l'étude de l'influence du type de sol sur la minéralisation du 2,4-D a été réalisée dans des microcosmes et dans des conditions de laboratoires bien déterminés (25 °C et 25% d'humidité).

Les résultats obtenus sont représentés sur la **figure III.A.1**.

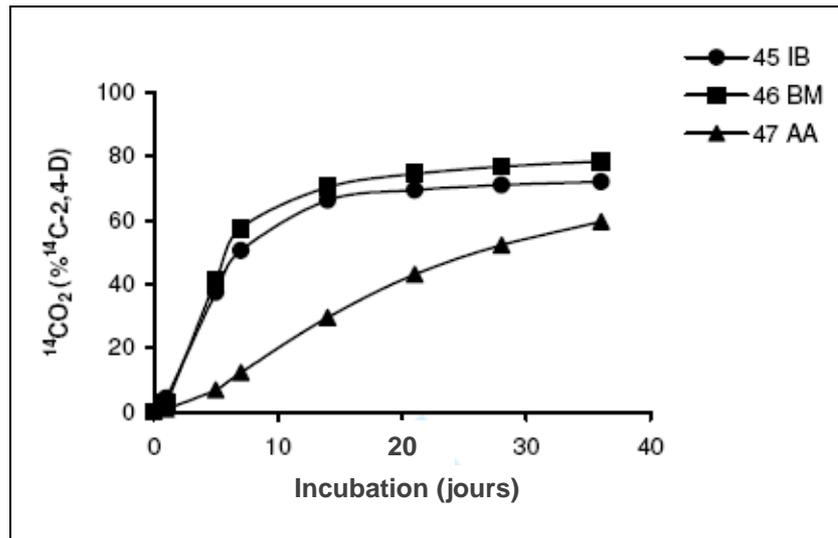


Figure III.A.1 Cinétiques de minéralisation du ^{14}C -2,4-D dans les trois sols algériens [45 Ibn Badis (El-Haria), 46 Boudjriou Messaoud (Ain Karma) et 47 (Ain Abid)] (n = 3 par sol)

Les résultats de cette figure montrent clairement que les trois sols agricoles présentent des courbes cinétiques de minéralisation de forme sigmoïde de premier ordre.

Après 36 jours d'incubation, 60 à 75% de la dose de ^{14}C -2,4-D, initialement ajoutée aux sols des microcosmes, a été libéré sous forme de $^{14}\text{CO}_2$.

Afin de mieux discuter les résultats cinétiques de la minéralisation, nous avons fait recours au modèle de Gompertz modifié qui est le mieux adapté pour décrire les cinétiques du premier ordre en utilisant le programme SigmaPlot 4,00 :

$$y = ae^{-e^{-k(t-t_i)}} + c.t$$

avec :

Y : $^{14}\text{CO}_2$ résultant de la minéralisation de ^{14}C -2,4-D.

a : plateau ou pourcentage maximum de minéralisation du 2,4-D,

t_i : abscisse de la vitesse maximale de minéralisation,

k : constante de la vitesse de minéralisation,

c.t : terme linéaire qui tient compte du turn-over du du ^{14}C -carbone de la biomasse.

D'après ce modèle, nous avons pu déterminer quatre paramètres cinétiques pour chaque sol étudié. Il s'agit de a, t_i , k et c. Les valeurs correspondantes sont reportées sur le **Tableau III.A.2.**

Tableau III.A. 2. Paramètres cinétiques de minéralisation de 2,4-D, déterminés par l'utilisation du modèle Gompertz modifié (n = 3, par sol)

a : plateau ou pourcentage maximum de minéralisation (en% du $^{14}\text{CO}_2$ libéré à partir du ^{14}C -2,4-D initialement ajouté au sol microcosme); *k* : constante de vitesse de minéralisation du 2,4-D, (en % du ^{14}C - CO_2 . jour $^{-1}$); *ti* (constante) : abscisse du point d'inflexion (jour).

	45IB	46BM	47AA
a (% évolution du $^{14}\text{CO}_2$)	70,25 ^a	75,47 ^a	62,40 ^b
k (% évolution du $^{14}\text{CO}_2$.jour $^{-1}$)	3,6 ^a	4,1 ^b	1,1 ^c
ti (jour)	4,63 ^a	3,62 ^b	11,65 ^c

Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement (p < 0,05, test de Fischer).

Ainsi, les micro-organismes de ces trois sols, exposés régulièrement au 2,4-D, ont pu minéraliser rapidement cet herbicide, tout au moins dans les conditions du laboratoire.

Ces résultats confirment par ailleurs que les micro-organismes des trois sols sont capables de s'adapter à la minéralisation du 2,4-D, suite à l'exposition répétée.

Cependant, bien que la cinétique de minéralisation du 2,4-D ait montré les mêmes tendances générales, les profils enregistrés sont significativement différents.

En effet, aucune phase de latence initiale n'a été observée durant la production du $^{14}\text{CO}_2$ dans les deux sols 45 et 46, ce qui suggère que le métabolisme du 2,4-D a été immédiat, alors que cette phase a été observée dans le sol 47. Ce dernier a également présenté un maximum de minéralisation aussi faible (a = 62,40 % évolué du $^{14}\text{CO}_2$) (**tableau III.A.2**).

Ces résultats semblent être en contradiction avec ce qui a été prévu du fait que le sol 47 a été traité au 2,4-D durant 15 ans.

La présence de la phase de latence, dans les cinétiques de minéralisation du 2,4-D dans les sols exposés à cet herbicide, a déjà été signalée et attribuée à une petite population dégradante initiale (**Estrella et al., 1993**).

Ainsi, même si les micro-organismes du sol se sont adaptés à la minéralisation du 2,4-D, l'expression de cette capacité a été probablement influencée par les paramètres intrinsèques tels que les propriétés physico-chimiques du sol. Cela a été signalé pour d'autres pesticides, tels que l'isoproturon (phényl-urée substitué), pour lequel une activité de la population dégradante a montré une corrélation positive avec le pH du sol. L'activité dégradante de l'isoproturon a également été observée par une approche géostatistique, elle a été affectée par le pH du sol en plein champ (**Bending et al., 2003 ; El Sebai et al., 2006**).

Dans notre travail, la présence ou l'absence de la phase de latence peut être expliquée par la conjonction de plusieurs paramètres.

D'après ces résultats et ceux de la littérature, nous pouvons envisager une relation entre les caractéristiques physico-chimiques des sols et les taux de biodégradation des pesticides. Cette relation peut être considérée sous deux aspects. Le premier concerne l'influence des caractéristiques sur la disponibilité du substrat à dégrader. Le deuxième se rapporte souvent au processus de dégradation lui-même (**Walker et Roberts, 1993**).

Par exemple, le taux de la dégradation du 2,4-D a diminué avec l'augmentation de carbone organique du sol, qui est attribué à l'augmentation de l'adsorption. Ce dernier diminue la concentration de 2,4-D disponible pour la dégradation microbienne (**Bolan and Baskaran, 1996**).

Nous pouvons donc déduire que plus l'adsorption est importante, plus faible seront la disponibilité des produits chimiques et le taux de dégradation.

Par ailleurs, **Boivin et al., 2005** ont montré que le devenir et le transport du 2,4-D dans la sous-surface du sol sont affectés par un effet complexe et dépendant du temps entre la sorption et le processus de minéralisation. D'après ces auteurs le phénomène adsorption/désorption est affecté par la matière organique et le pH du sol.

Ces auteurs ont également prouvé que dans les sols argileux et les sols glaiseux, 45 et 48% de la dose de 2,4-D appliquée ont été minéralisés après 10 jours, mais dans le sol sableux la minéralisation était plus lente en raison des temps de latence plus longs.

Il est à noter également que de nombreux chercheurs ont montré que dans les sols contenant une forte teneur en matière organique, les taux de dégradation du 2,4-D sont généralement plus faibles que ceux des sols à faible masse organique. Ceci a été attribué aux faibles taux de désorption et de croissance microbienne (**Hurle et Walker, 1980; Greer et Shelton, 1992**).

Cependant d'autres chercheurs ont souligné l'augmentation de l'activité de la microflore dégradante dans les sols riches en matières organiques (**Greaves et Malkomes, 1980 ; Sethunathan et al., 1991 ; Topp et al., 1997**).

Les deux résultats ne sont pas contradictoires dans la mesure où l'activité microbienne dépend non seulement de la masse organique mais aussi, et en même temps, des autres paramètres

notamment la composition des sols en argile, en azote et en matière minérale (phosphore et magnésium).

III.A.1.3 Interprétation par analyse en composantes principales (ACP)

Dans notre cas et compte tenu des multiples variables caractérisant les trois sols et à fin de déterminer le paramètre ayant la part la plus importante dans la minéralisation du substrat étudié, nous avons procédé à une analyse statistique des données du **tableau III.A.1**. Parmi les méthodes d'analyses de données existants, nous avons choisi l'analyse en composantes principales (ACP).

L'analyse en composantes principales (ACP) a été appliquée à la matrice des corrélations obtenues à partir des différentes variables physicochimiques (**tableau III.A.1**). Les deux premiers axes sont retenus et serviront par la suite à l'étude de la distribution des individus (sols) et des variables (caractéristiques physicochimiques) dans des plans à deux dimensions. Les résultats de cette analyse sont représentés sur la **figure III.A.2**.

On voit bien que les deux premiers axes expliquent ensemble 100,00% de la variation totale des variables initiales. Donc ces deux axes résument mieux l'information apportée par les variables physicochimiques initiales.

A l'intérieur du cercle de corrélations du plan factoriel 1-2, on distingue 5 groupes de variables (**figure III.A.2**) :

- Le premier groupe est constitué des deux variables Limon fins et le pH,
- Le deuxième groupe regroupe les sables grossiers, l'azote total, le carbone organique et la matière organique.
- Le troisième groupe est composé de C/N et des limons grossiers.
- Le quatrième groupe est constitué des sables fins et du phosphore.
- Enfin, le cinquième groupe comprend le Mg, MgO et l'argile.

L'analyse Proc Reg-SAS, option stepwise, indique que le taux de minéralisation (k) du ¹⁴C-2,4-D est liée principalement aux teneurs en argile et MgO selon l'équation suivante :

$$k = 257,6 - 0,76 \times [\text{compositions en argile}] + 141,9 \times [\text{MgO}] \quad (r^2 = 0,98)$$

En effet, la plus faible capacité de minéralisation du 2,4-D a été observée dans le sol 47, le plus faible en argile et le plus riche en sable grossier par rapport aux deux sols 45 et 46. Ceci est en accord avec des rapports précédents qui confirment que les cinétiques de minéralisation de cet herbicide dans les sols sableux sont caractérisées par la présence d'une phase de latence et un faible taux de minéralisation. Ce dernier est très fort dans les sols argileux et limoneux. Ce résultat est en accord avec les données bibliographiques (**Soulas, 1993**).

On peut donc supposer que la biodégradation du 2,4-D serait favorisée dans les sols argileux limoneux.

En effet, d'après les données bibliographiques, ce type de sols favorisent considérablement l'activité microbologique (**Dommergues et Mangenot, 1970 ; Huang, 2008**).

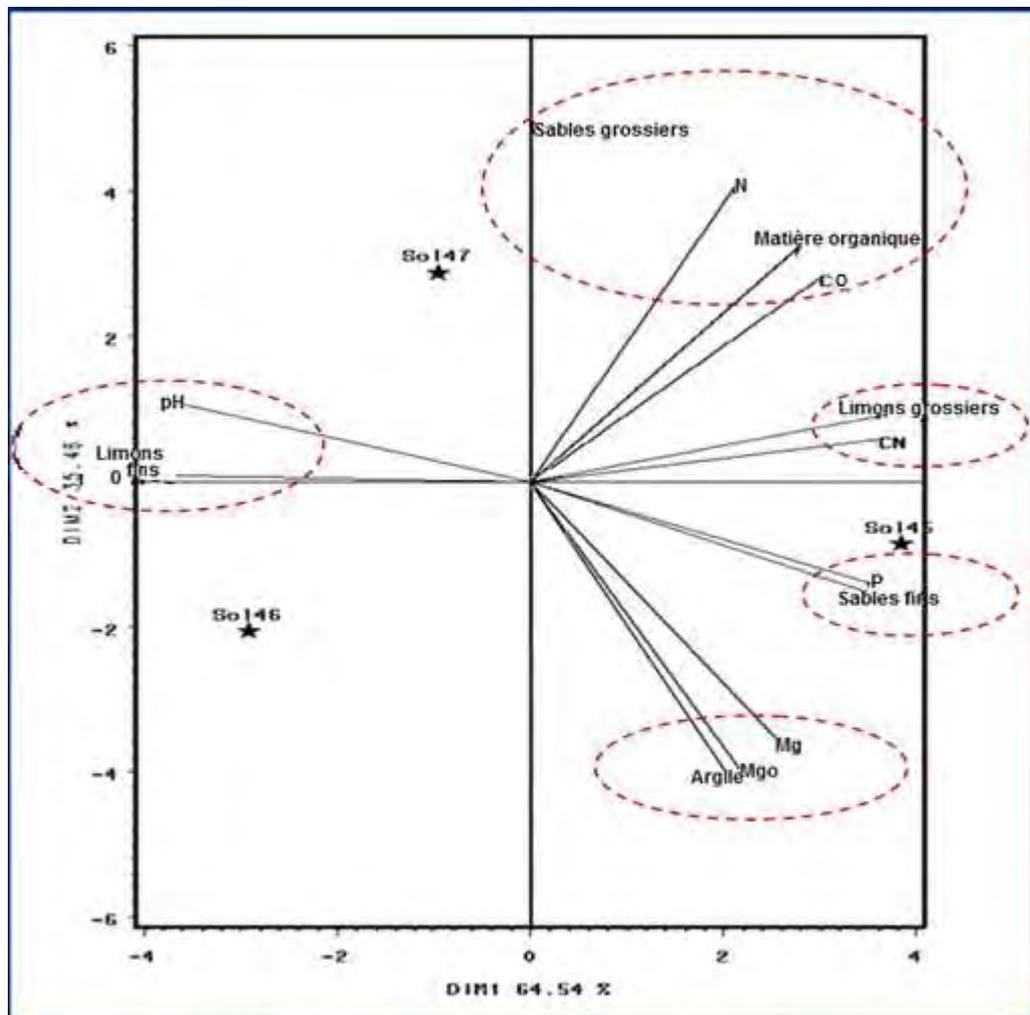


Figure III.A.2 : Plan factoriel (CP1 X CP2) de l'analyse en composante principale (ACP) réalisée sur les différents paramètres physico-chimiques caractérisant les trois sols étudiés

III.A.1.4 Structure globale des communautés bactériennes des trois sols

La structure globale des communautés bactériennes des trois sols, a été évaluée par la technique Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) sur l'ADN extrait directement du sol selon la méthode décrite par **Martin-Laurent *et al.*, 2001**.

Il est à noter que la technique RISA permet de révéler le polymorphisme de longueur de l'espace intergénique (IGS) entre les gènes codant pour l'ARNr16S et les gènes codant pour l'ARNr 23S.

Le polymorphisme de taille de l'IGS varie pour la grande majorité des espèces de procaryotes entre 74 pb (espèces appartenant aux Firmicutes à faible teneur en base GC) et 1529 pb (sous-division des β -Proteobactéries) (**Richaume *et al.*, 2006**).

Dans le cas de nos trois sols, les profils obtenus à l'aide de cette technique ont été relativement complexes (environ 30 bandes par piste). Cependant et dans la plupart des cas, nous constatons une similarité entre les répétitions du traitement, ce qui met en évidence la bonne reproductibilité relative de l'extraction de l'ADN du sol, de l'amplification par PCR et de la séparation par électrophorèse (**Figure.III.A. 3**).

D'après cette figure, les trois sols présentent des profils similaires et ne sont pas donc faciles à distinguer.

Les empreintes de la RISA ont été analysées par la méthode de comparaison par paires (pairwise analysis), basée sur le nombre et l'intensité des bandes observées ainsi que l'analyse en composantes principales, qui a permis d'ordonner les communautés microbiennes associées aux différents sols sur un plan défini par les deux premières composantes principales (**Figure.III.A.3, Panneau b**). Environ 42% des données de la variance ont été expliqués par la première composante principale et 28% par la seconde (**Figure.III.A.3, Panneau b**).

L'analyse ACP représentée par le panneau b, et appelée également carte factorielle, montre que les communautés microbiennes du sol 45 ne peuvent pas être clairement distinguées de ceux des sols 46 et 47 par positionnement sur le PC1, ce qui n'est pas directement lié à l'activité dégradante du 2,4-D observée dans ces sols.

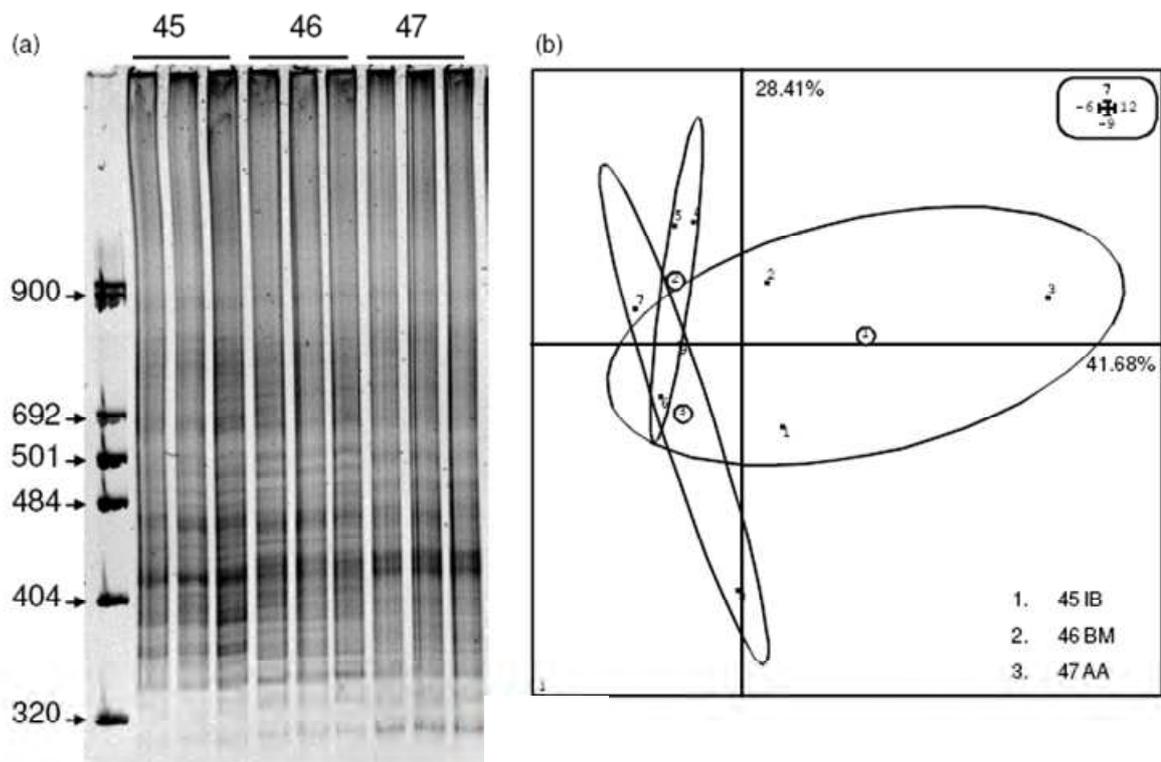


Figure III.A.3. Panneau (a) : RISA d'ADN extrait à partir des trois sols 45IB, 46BM et 47AA. Dernière piste : marqueur de taille moléculaire (Boehringer Mannheim).
 Panneau (b) : ACP de la structure de la communauté bactérienne globale du sol.

- Les nombres représentent les répétitions de chaque traitement [1-3 pour 45IB, 4-6 pour 46BM et 7-9 pour 47AA] et les ellipses représentent la variance dans les empreintes de RISA pour chaque traitement.
- Les pourcentages de variance expliqués par les axes d'analyse en composantes principales 1 et 2 sont indiqués dans chaque panneau sur les axes x et y respectivement.

D'après ces résultats et bien que l'analyse RISA a été efficace pour l'étude des communautés bactériennes associées aux différents microenvironnements (**Ranjard et al., 2000**) ou à la couverture végétale (**Borneman et Triplett, 1997**), elle ne permet pas, dans notre cas, la distinction entre les trois sols algériens, malgré que le sol 46 se distingue par rapport aux deux autres sols par sa faible teneur en matières organiques.

Ce résultat suggère donc que les phylotypes bactériens dominants, révélés par RISA dans les trois sols sableux, ne sont pas très différents et ne sont pas liés au potentiel de la biodégradation du 2,4-D mais plutôt aux caractéristiques principales de ces trois sols comme il a été indiqué au paragraphe précédent. (**III.A.1.1**).

III.A. 2 Impact de la température du sol sur la capacité de minéralisation du 2,4-D et sur la structure globale des communautés bactériennes

III.A. 2.1 Capacité de minéralisation

L'Algérie a un climat typiquement méditerranéen avec de faibles précipitations et des températures extrêmes.

Dans cette étude, la température du sol varie largement, allant de 5 à 15 °C pendant l'hiver et de 25 °C à 35 °C au cours de l'été (jusqu'à 50 °C dans certaines régions).

La température est l'un des principaux paramètres extrinsèques connus par leurs influences sur l'activité microbienne, c'est pourquoi son impact sur la capacité de minéralisation du 2,4-D a été abordé.

Ce paramètre a été évalué sur les sols des microcosmes incubés à une humidité constante (25% équivalent poids sec).

Les résultats des taux maximaux et des cinétiques de minéralisation sont représentés sur les deux figures III.A.4 et III.A.5.

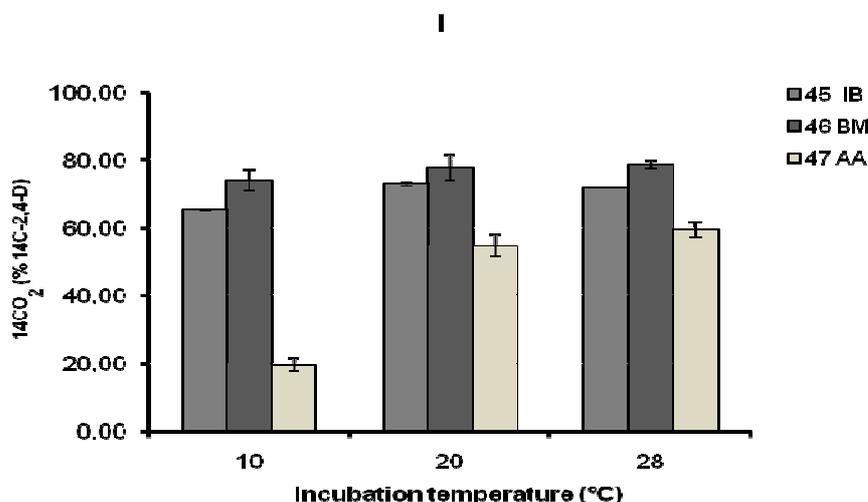


Figure III.A.4: Effet de la température sur le taux de minéralisation du ¹⁴C- 2,4-D dans les trois sols agricoles (à 25% d'humidité) après 36 jours d'incubation

L'examen des résultats obtenus montre que :

- ❖ les courbes cinétiques de la minéralisation du 2,4-D dans les trois sols agricoles (figure III.A.5) sont aussi des sigmoïdes et peuvent donc être représentées par le

modèle de Gompertz modifié. Ces courbes confirment également l'adaptation de ces sols à la biodégradation rapide du 2,4-D.

- ❖ les sols 46 et 45 montrent un taux de dégradation plus élevé que celui du sol 47 quelque soit la température d'incubation (**figure III.A.4**), ceci confirme les résultats obtenus précédemment concernant l'effet du type de sol,
- ❖ la dégradation du 2,4-D à 10°C est faible quelque soit le sol étudié (**figure III.A.5**). En effet, la minéralisation a été fortement réduite (une diminution d'environ 50 % par rapport à 20 et 28 °C) dans le sol 47 qui a montré le plus faible taux de dégradation du 2,4-D, alors que ce pourcentage a légèrement diminué dans les deux sols 45 et 46 (environ 6,72 % et 4,46 % respectivement). Il est à noter que ces deux sols présentent une capacité de dégradation plus élevée.

Ces résultats étaient prévus dans la mesure où les microorganismes telluriques présentent en générale des activités faibles à basses températures.

- ❖ la capacité de minéralisation du 2,4-D ne diffère pas significativement entre les sols des microcosmes incubés à 20 °C et 28 °C. Ces résultats semblent indiquer que, dans nos conditions expérimentales, les populations microbiennes dégradantes ont présenté une activité optimale dans cette gamme de températures mésophiles et avec une teneur en eau maintenue constante.

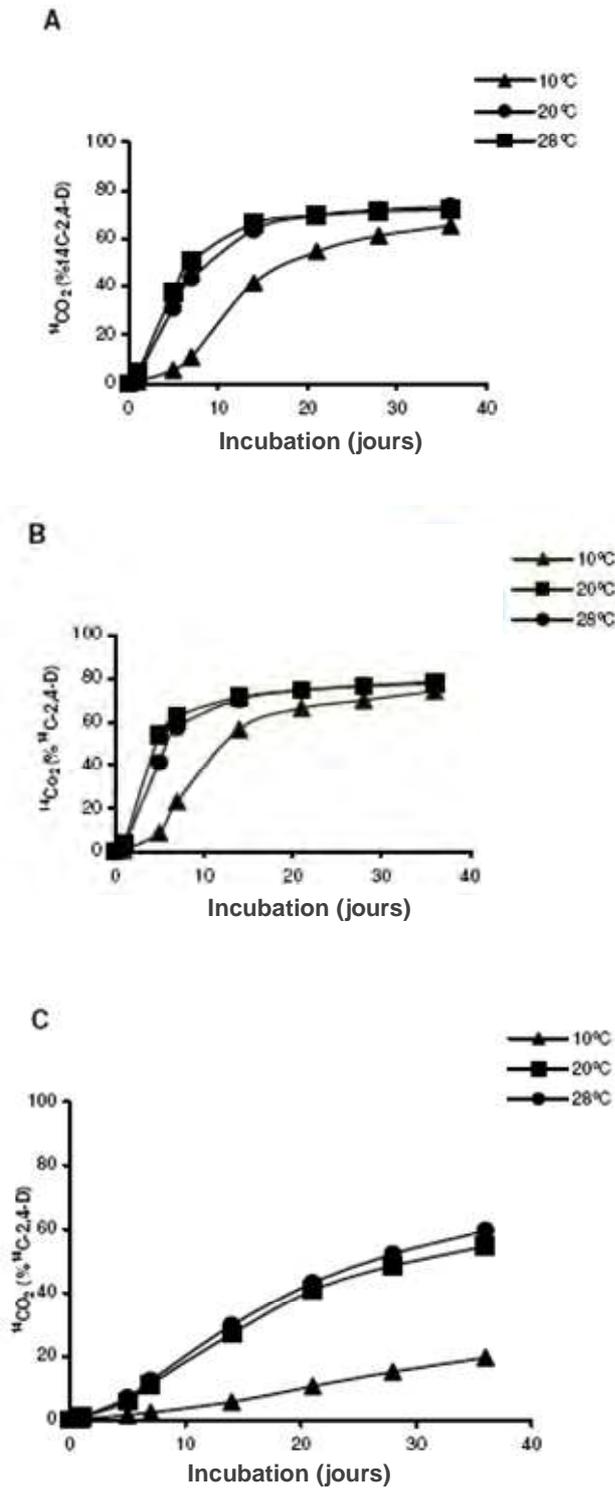


Figure.III.A. 5 Estimation de l'impacte de la température du sol sur la cinétique de minéralisation du $^{14}\text{C-2,4-D}$ dans les trois sols incubés à 25% d'humidité [Panneau A: sol 45 Ibn Badis (El-Haria), panneau B: sol 46 Boudjriou Messaoud (Ain Karma) et panneau C: sol 47 (Ain Abid)]

Par ailleurs et du point vue modélisation, nous avons encore appliqué le modèle de Gompertz modifié. Pour les trois sols étudiés, les données de l'influence de la température sur la minéralisation du 2,4-D sont parfaitement décrites par ce modèle.

Les valeurs des paramètres cinétiques, à savoir le plateau ou pourcentage maximum de minéralisation (a), le taux de minéralisation du 2,4-D (k) et l'abscisse du point inflexion (t_i) sont reportées dans le tableau **III.A.3**.

Tableau III.A.3. Impact de la température d'incubation des trois sols sur l'évolution des paramètres cinétiques de minéralisation de 2,4-D, déterminés par l'utilisation du modèle Gompertz modifié (n = 3, par sol)

a : plateau ou pourcentage maximum de minéralisation (en% du $^{14}\text{CO}_2$ libéré à partir du ^{14}C -2,4-D initialement ajouté au sol microcosme); k : taux de la minéralisation du 2,4-D, (en% du ^{14}C - CO_2 . jour⁻¹); t_i (constante) : abscisse du point inflexion (jour).

Sol	Température (°C)	a	k	ti
45IB	10	44,43 ^a	1,8 ^a	9,96 ^a
	20	71,17 ^b	2,8 ^b	4,58 ^b
	28	70,25 ^b	3,6 ^b	3,80 ^b
46BM	10	71,72 ^a	2,3 ^a	7,83 ^b
	20	69,41 ^a	5,1 ^b	3,88 ^b
	28	75,47 ^a	4,1 ^b	3,81 ^b
47AA	10	26,97 ^a	0,7 ^a	19,98 ^a
	20	57,14 ^b	1,2 ^b	11,63 ^b
	28	62,40 ^b	1,1 ^b	11,69 ^b

Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement ($p < 0,05$, test de Fischer).

III.A.2.2 Structure globale des communautés bactériennes

L'impact de la température du sol sur la structure globale des communautés bactériennes a été également évalué.

Les empreintes de l'analyse RISA ont été relativement complexes, composées de 20 à 35 bandes, et la plupart des répétitions étaient similaires (**Figure III.A.6**).

Cependant et de manière inattendue, nous avons obtenus quelques empreintes différentes des autres pour le même sol (répétitions non similaires). Afin de discuter des résultats homogènes nous avons jugé utile d'écarter ces empreintes de la nouvelle analyse.

L'analyse en composantes principales des empreintes de la RISA a pu représenter jusqu'à 99% de la variance des données pour le plan 1-2 (**figure III.A. 7**).

Dans ce cas, la carte factorielle a permis la distinction des communautés microbiennes des échantillons de chacun des trois sols incubés à 28 °C de ceux incubés à 10 °C et 20 °C.

Il convient de noter que, dans le cas des sols 45 et 47, les résultats révélés par PC2 permettent seulement la distinction des communautés microbiennes du sol incubés à 10 °C de ceux incubés à 20 °C.

Ces résultats confirment que la température du sol est un paramètre clé dans la détermination de la structure globale des communautés bactériennes.

En effet, la température n'affecte pas seulement l'activité des communautés bactériennes minéralisatrices du 2,4-D, mais aussi la structure globale de la microflore du sol.

Cependant, la température du sol n'a pas affecté la structure des communautés bactériennes ou l'activité de minéralisation du 2,4-D dans les trois sols de la même manière, à titre d'exemple le taux de minéralisation du 2,4-D a été légèrement réduit dans les sols 45 et 46, alors qu'il a considérablement diminué dans le sol 47. Ceci suggère que les changements dans les communautés minéralisatrices du 2,4-D, induites par la température du sol, ne sont pas totalement conformes à ceux de la structure globale de la microflore du sol.

Enfin et d'après ces résultats, nous pouvons conclure que la minéralisation optimale du 2,4-D dans les sols algériens se produit à des températures mésophiles et peut considérablement être réduite, en fonction des propriétés du sol, sous les conditions psychrophiliques.

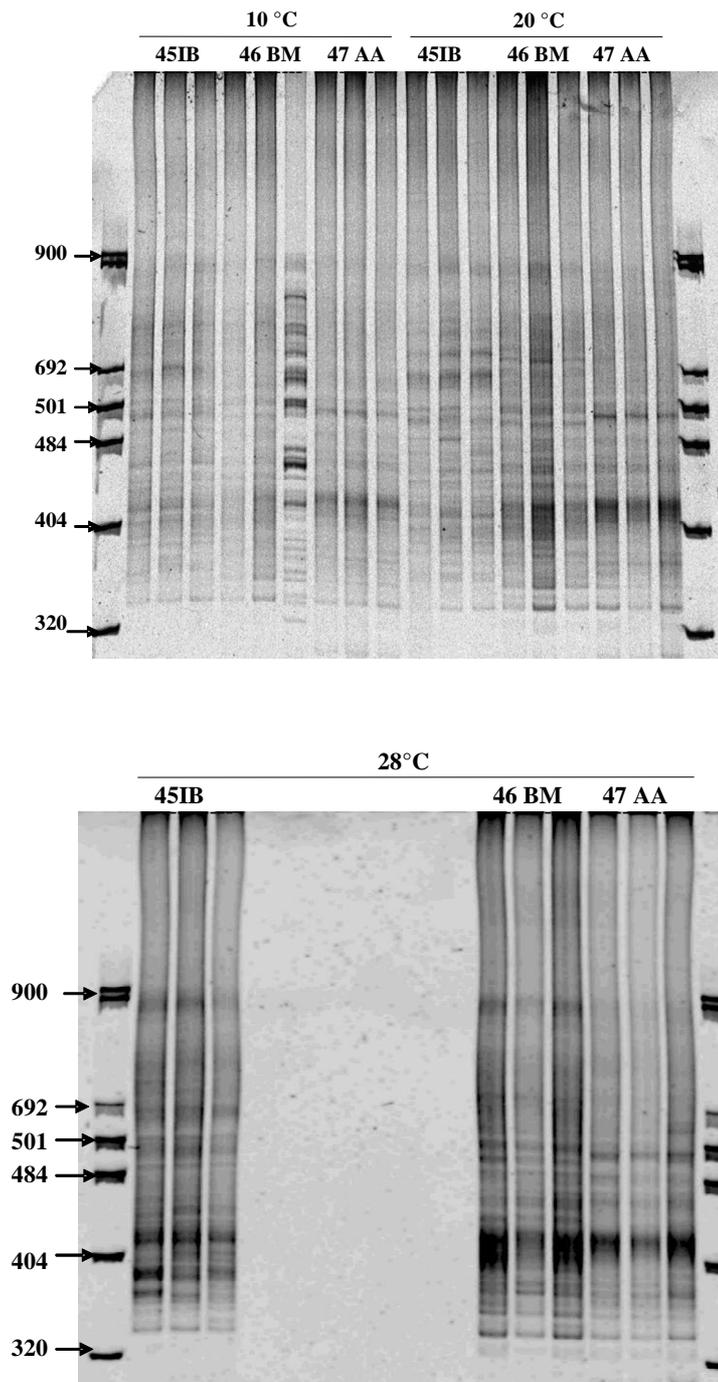


Figure III.A.6 : Profils RISA d'ADN extrait des sols incubés à différentes températures étudiées (10, 20 ou 28 ° C). *BVIII* : Marqueur de taille moléculaire

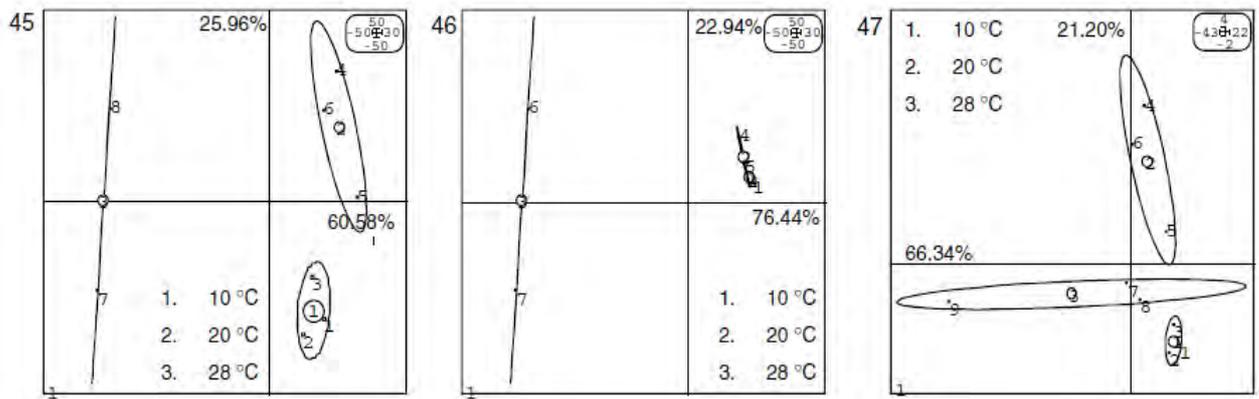


Figure III.A.7. Impact de la température sur la structure globale des communautés microbiennes du sol.

- Les nombres représentent les répétitions de chaque traitement [1-3 pour 10°C, 4-6 pour 20°C et 7-9 pour 28°C] et les ellipses représentent la variance dans les empreintes de RISA pour chaque traitement.

- Les pourcentages de variance expliqués par les axes d'analyse en composantes principales 1 et 2 sont indiqués dans chaque panneau sur les axes x et y respectivement.

III.A.3 Impact de l'humidité sur la capacité de minéralisation du 2,4-D

et sur la structure globale des communautés bactériennes

III.A. 3.1 capacité de minéralisation

Les sols cultivés peuvent être caractérisés par la teneur en eau et par la capacité de rétention d'eau en raison des précipitations et des propriétés texturales du sol. Étant donné que la teneur en humidité du sol est l'un des facteurs extrinsèques les plus importants pouvant affecter l'activité microbienne du sol, nous avons donc tenté d'évaluer son impact sur la capacité de minéralisation du 2,4-D dans le sol des microcosmes incubés à 20 ° C. Sur la base des valeurs généralement enregistrées dans la région de Constantine, caractérisée par un climat de transition entre la zone tempérée et la zone tropicale, trois valeurs de la teneur en humidité du sol ont été sélectionnées : 10%, 15% et 25%.

Les résultats de minéralisation sont représentés sur les **Figures III.A.8, III.A.9.**

L'examen des résultats obtenus indiquent clairement que :

- ★ la variation de l'humidité entre 10 et 15 % n'a pratiquement aucun effet sur le processus de minéralisation, malgré que les micro-organismes de ces sols soient bien adaptés à la minéralisation du 2,4-D, à la suite de l'application répétée de l'herbicide,

- ★ le taux de minéralisation dépend fortement de l'humidité des sols étudiés dans la gamme 15 - 25 %,
- ★ les deux sols 45 et 46 présentent des taux de minéralisation presque similaires mais nettement supérieur à celui de 47 quelque soit l'humidité du sol.

Ces résultats sont en parfait accord avec plusieurs travaux qui confirment l'effet d'humidité sur la biodégradation des herbicides et leurs devenir dans le sol (**Cattaneo *et al.*, 1997**; **Garcia-Valcarcel et Tadeo, 1999** ; **Atagana *et al.*, 2003**).

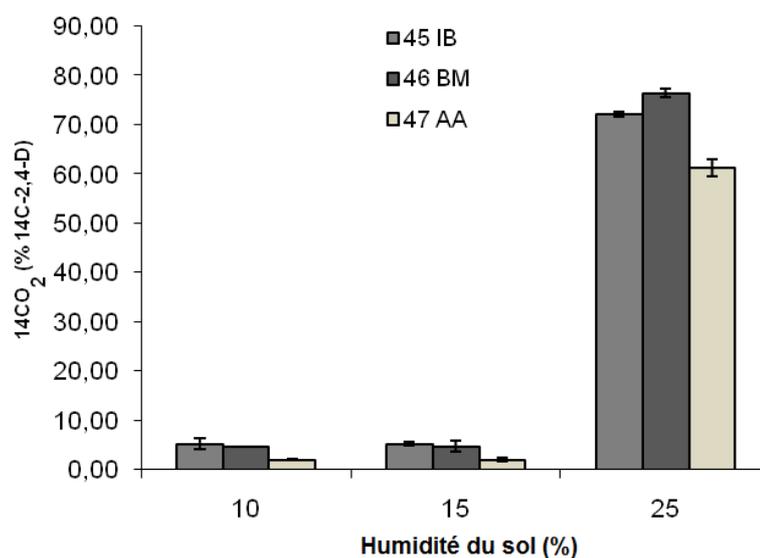
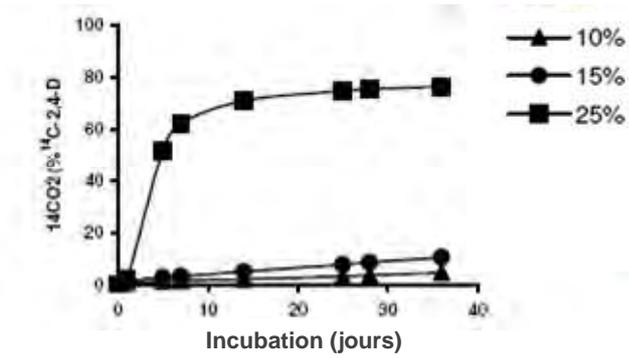
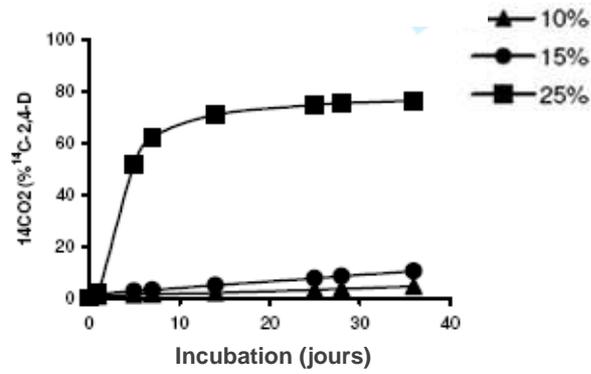


Figure III.A.8: Effet de l'humidité du sol sur le taux de minéralisation du ^{14}C - 2,4-D dans les trois sols agricoles incubés à 20 °C

A



B



C

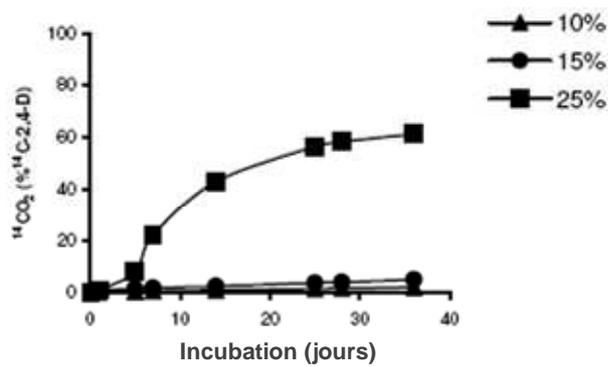


Figure III.A.9. Estimation de l'impacte de l'humidité du sol sur la cinétique de minéralisation du ^{14}C -2,4-D dans les trois sols incubés à 20 °C [Panneau A: sol 45 Ibn Badis (El-Haria), panneau B: sol 46 Boudjriou Messaoud (Ain Karma) et panneau C: sol 47 (Ain Abid)]

L'augmentation de l'activité biologique (biodégradation) avec l'humidité peut être attribuée directement ou indirectement à l'eau, indispensable au développement des microorganismes et transporteur de diverses substances, notamment les substrats énergiques et certains éléments de la microflore comme il a été signalé par **Dommergues et Mangenot, 1970**.

Par ailleurs, la figure **III.A.9** montre que les courbes représentant l'évolution de la minéralisation du 2,4-D dans les trois sols à 25 % d'humidité sont bien des sigmoïdes.

Ces cinétiques peuvent donc être décrites par le modèle de Gompertz modifié. Les paramètres cinétiques de ce modèle ont été calculés et représentés sur le tableau **III.A.4**.

Tableau III.A.4. Impact de l'humidité des trois sols sur l'évolution des paramètres cinétiques de minéralisation de 2,4-D, déterminés par l'utilisation du modèle Gompertz modifié (n = 3, par sol)

a : plateau ou pourcentage maximum de minéralisation (en% du $^{14}\text{CO}_2$ libéré à partir du ^{14}C -2,4-D initialement ajouté au sol microcosme); *k* : taux de la minéralisation du 2,4-D, (en% du ^{14}C - CO_2 . jour⁻¹); *ti* (constante) : abscisse du point d'inflexion (jour).

Sol	Humidité (%)	a	k	ti
45IB	10	7,99 ^a	0,5 ^a	19,13 ^a
	15	21,10 ^b	0,5 ^a	22,67 ^a
	25	70,86 ^c	5,6 ^b	2,96 ^b
46BM	10	6,47 ^a	0,5 ^a	14,99 ^a
	15	12,20 ^b	0,7 ^b	11,94 ^b
	25	72,48 ^c	8,3 ^c	4,80 ^c
47AA	10	2,52 ^a	0,7 ^a	13,78 ^a
	15	5,76 ^b	0,7 ^a	10,88 ^b
	25	59,93 ^c	1,9 ^b	7,81 ^c

Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement (p < 0,05, test de Fischer).

III.A.3.2 Structure globale des communautés bactériennes

L'impact de la teneur en humidité du sol sur la structure globale des communautés bactériennes a également été évalué.

Les résultats obtenus sont représentés sur la figure (figure III.A.10).

L'analyse en composantes principales des empreintes RISA représente environ 99% de la variance des données (figure III.A.11).

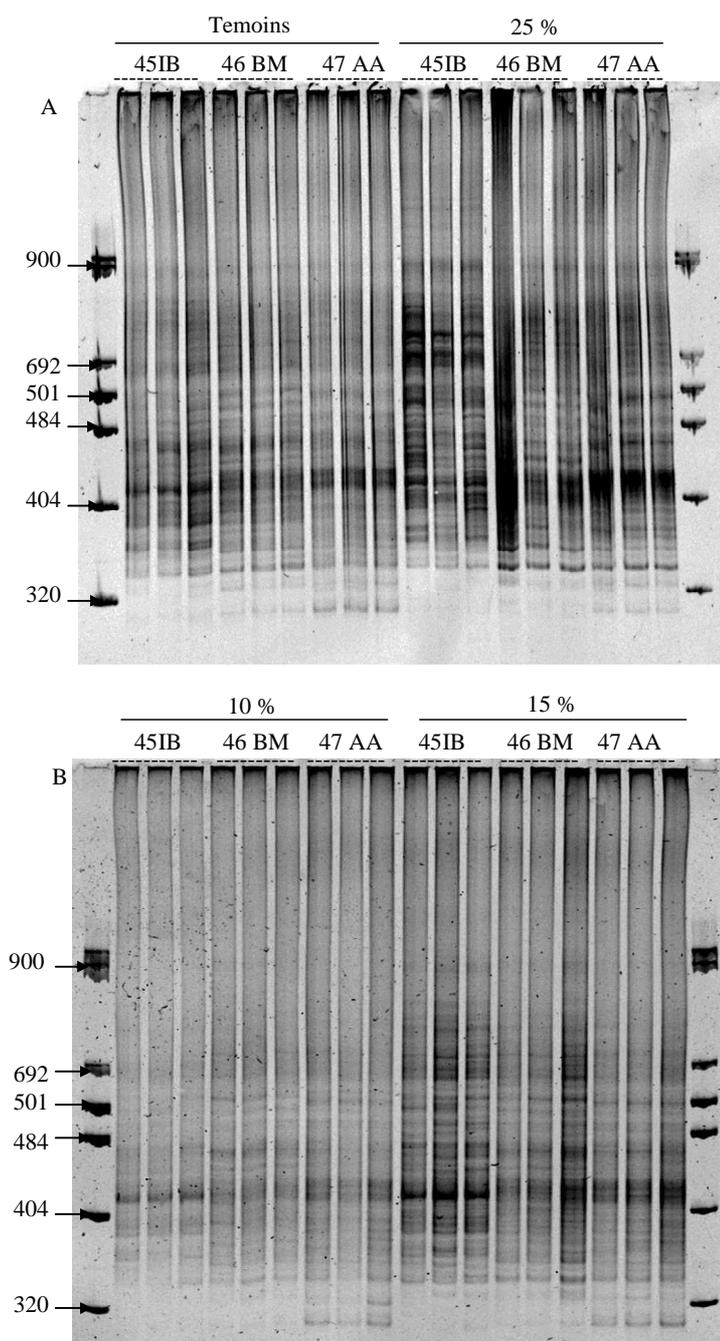


Figure III.A.10: Effet de l'humidité du sol (10, 15 ou 25%). Empreintes de la RISA d'ADN extrait des sols. BVIII : Marqueur de taille moléculaire

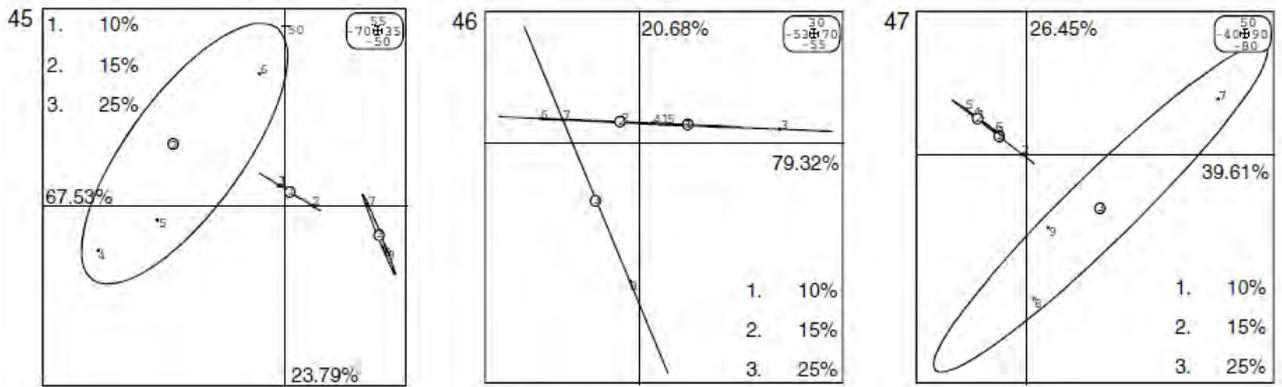


Figure III.A.11. Impact de l'humidité sur la structure globale des communautés microbiennes du sol.

- Les nombres représentent les répétitions de chaque traitement [1-3 pour 10%, 4-6 pour 15% et 7-9 pour 25%] et les ellipses représentent la variance dans les empreintes de RISA pour chaque traitement.

- Les pourcentages de variance expliqués par les axes d'analyse en composantes principales 1 et 2 sont indiqués dans chaque panneau sur les axes x et y respectivement.

La carte factorielle a permis la distinction des communautés microbiennes des échantillons des sols 45 et 47 à 25% d'humidité de ceux à 10 et 15%. La même tendance a été observée dans le cas du sol 46, mais les différences n'étaient pas statistiquement significatives en raison des écarts entre les répétitions.

Ainsi, l'humidité des sols affecte non seulement l'activité des communautés bactériennes minéralisatrices mais aussi la structure de la communauté bactérienne globale.

III.A.4. Les résidus du 2,4-D

Dans ce travail, l'extraction des résidus extractibles a été réalisée au méthanol, alors que les résidus liés ont été évalués par l'analyse des culots issus de cette extraction (voir § II.A.6.1 et II.A.6.2).

Il est à noter que cette méthode d'extraction de résidus de pesticides permet la préservation de la nature chimique de ces résidus (Reuter *et al.*, 1999; Catriona *et al.*, 2005).

Les pourcentages de résidus calculés et exprimés par rapport à la quantité de radioactivité initialement apportée sont donnés au **tableau III.A.5**.

Du point de vue impact du type de sol sur la minéralisation de l'herbicide, les résultats d'incubation des trois sols étudiés à 20 °C et 25% sont presque similaires aussi bien pour les résidus extractibles que les non-extractibles.

Tableau III.A.5 : Quantités des résidus ^{14}C -2,4-D-extractibles et ^{14}C -2,4-D-liés mesurés, à la fin de la cinétique de minéralisation de l'herbicide, dans les trois sols 45IB, 46BM et 47AA.

(i) Sols maintenus à 25% d'humidité et incubés à 10, 20 et 28 °C ou
(ii) Sols maintenus à 10, 15 et 25 % d'humidité et incubés à 20 °C.

	Sol	Humidité 25 %			Température 20 °C		
		Température (°C)			Humidité (%)		
		10	20	28	10	15	25
Résidus extractibles (% ^{14}C -2,4-D initialement introduit)	45	0.99 ^a	0.80 ^a	1.29 ^a	3.28 ^a	1.08 ^a	0.89 ^a
	46	0.79 ^a	0.66 ^a	1.40 ^a	2.09 ^a	1.27 ^a	0.73 ^a
	47	0.65 ^a	0.68 ^a	0.67 ^b	2.24 ^a	0.94 ^a	0.98 ^a
Résidus liés (% ^{14}C -2,4-D initialement introduit)	45	13.8 ^a	14.71 ^a	10.4 ^a	29.55 ^a	14.30 ^a	13.04 ^a
	46	10.22 ^a	11.35 ^a	9.31 ^a	16.15 ^b	15.04 ^a	9.22 ^b
	47	21.97 ^b	16.37 ^a	17.22 ^b	33.97 ^a	26.73 ^b	13.38 ^a

Les valeurs suivies de la même lettre ne diffèrent pas significativement ($p < 0,05$, test de Fischer).

En effet, moins de 1% de ^{14}C -2,4-D initialement ajoutée aux sols des microcosmes ont formé des résidus extractibles à la fin de l'incubation, et environ 15% ont formé des ^{14}C -résidus liés, ceci suggère donc que le devenir de cet herbicide a été similaire dans les trois sols algériens.

En outre, la quantité des résidus ^{14}C -2,4-D extractibles est restée très faible (c'est-à-dire en dessous de 1% de la quantité du ^{14}C -2,4-D initiale) comme on l'a déjà observé dans les trois sols et n'a pas montrée de changement significatif en réponse aux variations de la température et d'humidité du sol.

Dans le cas de la variation de température, la quantité des résidus ^{14}C -2,4-D liés varie de 10 à 20% de la quantité initiale.

En ce qui concerne l'effet d'humidité, les résultats obtenus montrent que l'accumulation de ces résidus liés peut atteindre 30 % de la quantité du ^{14}C -2,4-D initiale.

Dans les deux cas, la plus grande quantité de ces résidus a été observée dans le sol 47 présentant la plus faible capacité de minéralisation du 2,4-D. La quantité des ^{14}C -résidus liés semble être donc inversement proportionnelle à la minéralisation du 2,4-D. Ce résultat est en accord avec ceux de la bibliographie (**Boivin *et al.*, 2005**).

Comme il a été suggérer par quelques études de recherches sur d'autres sols (**Calvet, 1980; Boivin *et al.*, 2005**), deux aspects peuvent contribuer à la compréhension de la différence des quantités de résidus non-extractibles entre le 47AA et les deux autres sols :

- Le premier concerne le pH du milieu. Etant donné que ce dernier est supérieur à 7 pour les trois sols étudiés, la molécule du 2,4-D se trouve sous la forme anionique. La charge négative lui confère donc une plus grande tendance à se rapprocher du sol suite aux forces électrostatiques établies.
- Le deuxième aspect, qui est dominant, a relation directe avec la composition du sol. En effet l'adsorption de l'herbicide varie d'un sol à un autre selon la nature d'argile et de la matière organique.

III.B Isolement et caractérisation des souches dégradantes

III.B.1 Technique d'enrichissement et minéralisation du 2,4-D

Pour isoler les microorganismes dégradants le 2,4-D à partir des sols Algériens, nous avons adopté et utilisé la technique d'enrichissement et la méthode d'isolement utilisées par d'autres chercheurs sur la même molécule et sur d'autres substances également (**Stenson and Walker, 1956 ; Bollag et al., 1967 ; Amy et al., 1985 ; Topp et al., 2000 ; Rousseaux et al., 2001 ; Marrón-Montiel et al., 2006**).

Nous rappelons que le principe de la technique d'enrichissement repose sur l'utilisation de l'herbicide comme source de carbone et d'énergie. La concentration de ces produits est augmentée au fur et à mesure de l'accroissement du nombre de transfert jusqu'à l'obtention des souches adaptées à la dégradation.

Dans ce travail, nous avons utilisé quatre transferts successifs avec la même dose en 2,4-D (663 mg). Cette concentration est relativement plus forte que celle utilisée par certains chercheurs (**Stenson and Walker, 1956 ; Ditzelmüller et al., 1989 ; Kamagata et al., 1997**).

Dans les mêmes conditions, nous avons évalué les taux de minéralisation de l'herbicide par la méthode d'analyse radiorespirométrique avec le 2,4-D marqué uniformément au ^{14}C sur le cycle ($[^{14}\text{C}\text{-cycle}]\text{-2,4-D}$) (pureté analytique $> 99\%$, activité spécifique $4.6 \times 10^8 \text{ Bq mmol}^{-1}$). Ceci a permis la détermination du temps d'incubation nécessaire pour l'isolement.

D'après les résultats représentés sur la **figure III.B.1** et le **tableau III.B. 1**, on peut noter les remarques suivantes :

- dans les trois sols, les taux de minéralisation enregistrés dans les quatre enrichissements confirment la présence des microorganismes indigènes dégradants le 2,4-D à cette concentration (663 mg),

- la présence d'une même phase d'adaptation (estimée par la production du $^{14}\text{CO}_2$), d'environ 13 jours durant le premier enrichissement (**panneau A**) dans les trois sols,

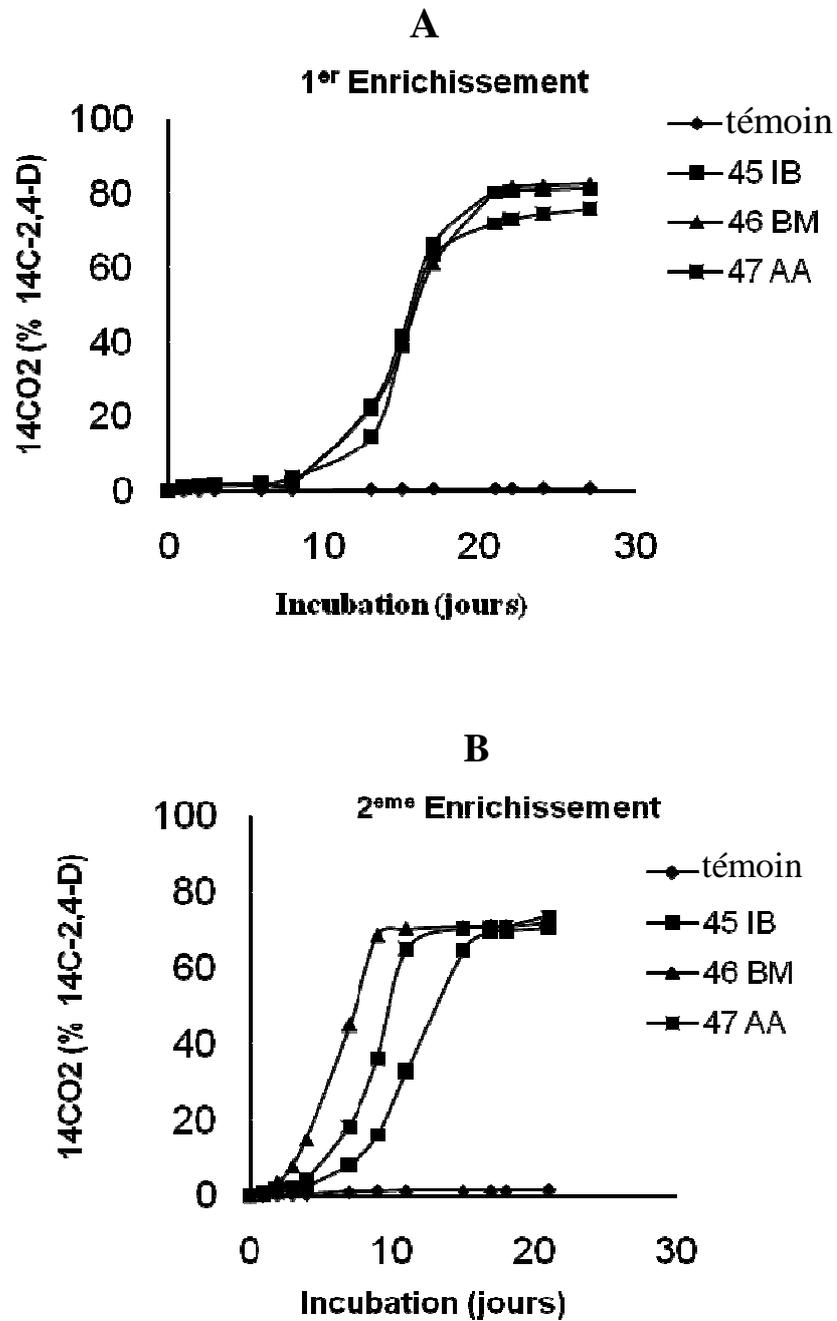


Figure III.B.1: Cinétique de minéralisation de 2,4-D durant le premier enrichissement (A) et le deuxième enrichissement (B).

Tableau III.B.1. Impact des quatre enrichissements des trois sols sur l'évolution des paramètres cinétiques de minéralisation de 2,4-D, déterminés par l'utilisation du modèle Gompertz modifié.

a : plateau ou pourcentage maximum de minéralisation (en% du $^{14}\text{CO}_2$ libéré à partir du ^{14}C -2,4-D initialement ajouté au sol microcosme); *k* : taux de la minéralisation du 2,4-D, (en% du ^{14}C - CO_2 . jour⁻¹); *t_i* (constante) : abscisse du point inflexion (jour).

Enrichissement	Sol	a	k	t _i
I	45IB	81.44	2.37	13.85
	46BM	83.70	2.76	14.12
	47AA	73.46	1.87	14.11
II	45IB	72.28	2.75	10.32
	46BM	70.64	2.03	5.06
	47AA	71.12	1.95	7.91
III	45IB	83.83	2.56	11.12
	46BM	69.43	1.25	4.33
	47AA	64.80	0.59	2.37
IV	45IB	84.40	1.52	7.15
	46BM	106.65	3.42	10.21
	47AA	70.52	0.54	5.93

Tableau III.B.2 : Temps des phases d'adaptation dans les trois sols durant les quatre enrichissements

Enrichissement	Temps de la phase de latence (jours)		
	45IB	46BM	47AA
1	13	13	13
2	7	3	4
3	7	3	2
4	3	6	2

- la diminution importante de ce temps durant les trois autres enrichissements (**panneau B et Tableau III.B.2**),
- en générale et pour les quatre enrichissements, le temps de la phase d'adaptation du sol 45IB est légèrement supérieur à ceux enregistrés pour les deux autres sols 46BM et 47AA (**Tableau III.B.2**),
- la diminution du temps de la phase d'adaptation est directement proportionnelle au pourcentage maximal de la radioactivité cumulée (**Tableau III.B.1 et III.B.2**),
- le taux de disparition du 2,4-D varie légèrement entre les trois sols durant les trois derniers enrichissements.
- l'abaissement du temps d'incubation nécessaire pour la minéralisation maximale du 2,4-D, représentée par le paramètre **a**, avec le nombre d'enrichissement (**tableau III.B.3**).

Tableau III.B.3 : Temps d'incubation nécessaire pour atteindre le maximum de minéralisation dans les trois sols durant les quatre enrichissements.

Enrichissement	Temps d'incubation (jours)		
	<u>45IB</u>	<u>46BM</u>	<u>47AA</u>
1	17	21	21
2	15	9	15
3	14	8	4
4	10	15	8

La présence d'une longue phase d'adaptation durant le premier enrichissement des trois sols suivi d'une phase rapide, a été observée aussi lors de l'étude de la biodégradation du 2,4-D dans le sol par certains chercheurs (**Audus, 1952 ; Parker and Doxtader, 1982 ; Macur et al., 2007**).

Dans le cas des concentrations élevées en 2,4-D et d'après **Macur et al., (2007)**, le prolongement dans le temps de la phase d'adaptation est essentiellement due à une pression sélective significative sur les microorganismes dégradants ou sur les organismes tolérants de telles concentrations.

Dans le milieu d'enrichissement, cette phase peut dépendre à la fois de l'espèce bactérienne, de la densité de population bactérienne dégradante initiale et de la composition du milieu minéral utilisé. Elle peut être aussi influencée par l'herbicide lui-même, notamment sa concentration initiale.

L'effet de la concentration des herbicides sur la durée de leur biodégradation, la croissance et l'activité des microorganismes dégradants soit dans le sol soit dans la culture, a été étudié et confirmée par plusieurs auteurs (**Tyler et Finn, 1974 ; Greer *et al.*, 1990 ; Pampulha et Oliveira, 2006 ; Vieublé-Gonod *et al.*, 2006 ; Pampulha *et al.*, 2007**).

Dans ce contexte, **Greer *et al.*, 1990** ont observé que le temps de la phase de latence et le temps nécessaire à la dégradation totale du 2,4-D sont linéairement liés à la densité de la population bactérienne initiale et à la dose de l'herbicide utilisée.

Par ailleurs, l'âge des bactéries est également considéré comme étant un facteur principal conditionnant le temps d'adaptation. Les cellules provenant d'une culture jeune, c'est à dire en phase de croissance exponentielle durant l'enrichissement, sont capables de se diviser très rapidement. Par contre, les cellules provenant d'une culture en phase stationnaire, où se trouve de nombreuses cellules mortes et des cellules viables mais dans un état physiologique peu favorable à la division, ont besoin d'un certain temps pour qu'elles puissent incorporer les nutriments nécessaires à la fabrication des enzymes et d'autres métabolites nécessaires pour se diviser.

Dans notre cas, ce facteur est certainement l'un des causes essentielles de l'augmentation du temps correspondant à la phase d'adaptation ainsi que le temps d'incubation nécessaire pour atteindre le maximum de la minéralisation durant les différents enrichissements, notamment le quatrième (**Tableau III.B.2 et III.B.3**).

Après la phase d'adaptation, la dégradation rapide du 2,4-D, partie exponentielle de la courbe, peut être expliquée par les différents mécanismes avec lesquels les bactéries indigènes développent leurs capacités de croissance et d'adaptation.

En effet, durant la phase d'adaptation, un certain nombre de changements peut se produire dans les bactéries responsables de la synthèse des enzymes dégradantes (**Torstensson, 1977 ; Kearney et Kellogg, 1985**).

Il est également bien connu que l'adaptation des organismes à leur environnement repose sur l'augmentation de la diversité de leur potentiel génétique (création de diversité génétique) d'une part et sur la sélection des individus les plus aptes à survivre ou à se reproduire (sélection naturelle) d'autre part.

Généralement, l'isolement des microorganismes par la technique d'enrichissement nécessite une série importante de transfères dans le même milieu minéral, afin d'obtenir une adaptation aux contraintes abiotiques et biotiques de ce nouveau milieu.

Ainsi, **Kamagata *et al.*, 1997** ont pu isolé six souches bactériennes capables de dégrader le 2,4-D à partir des sols qui n'ont été jamais traité précédemment par cette molécule. Dans ce cas, la technique d'isolement a nécessité huit transferts successifs avec une concentration décroissante de l'herbicide. Aucune souche n'a été isolée durant les deux premiers enrichissements.

Dans notre travail, le phénomène d'adaptation est bien clair à partir du deuxième enrichissement, puisque le temps de la phase d'adaptation a été réduit de 13 jours à 7, 3, et 4 jours dans les sols 45IB, 46BM, et 47AA respectivement (**Tableau III.B.2**).

D'après ces résultats, on peut supposer également la présence de certaines espèces microbiennes ayant une capacité de dégradation importante, dans les trois sols étudiés, qui peut être directement liée à l'activité des enzymes préalablement adaptées à la dégradation de cette molécule. Cette adaptation est le résultat du traitement de ces sols par le 2,4-D durant une longue période, plus de 15 ans.

L'effet des applications répétées en 2,4-D sur sa dégradation ultérieure a été étudié et confirmé précédemment par **Torstensson *et al.*, 1975**. Les résultats observés démontrent que le temps de dégradation est réduit d'une façon remarquable.

La différence entre les temps d'adaptation durant le deuxième enrichissement (**Tableau III.B.2**) montre que le pouvoir de biodégradation n'est pas le même dans les trois sols. Cette différence peut être attribuée au pouvoir dégradant de la population microbienne indigène initiale, influencée précédemment par la composition et la texture du sol.

III.B.2 Isolement et purification des souches bactériennes dégradant le 2,4-D

Au cours de la technique d'enrichissement, deux prélèvements de 1ml de la suspension de chaque échantillon ont été utilisés directement pour l'isolement des bactéries dégradantes. Le temps de prélèvement et le taux de minéralisation de chaque enrichissement sont représentés dans le **tableau III.B.4**.

Tableau III.B.4 : Temps et taux de minéralisation des deux prélèvements de chaque enrichissement.

Enrichissement	Prélèvement	Temps (jours)	Taux de minéralisation
1	1	15	41,74% (45 IB)
		15	38,80% (46 BM)
		15	38,39% (47 AA)
	2	17	66,26% (45 IB)
		17	61,11% (46 BM)
		17	63,26% (47 AA)
2	1	7	8,40% (45 IB)
		7	44,92% (46 BM)
		7	18,46% (47 AA)
	2	9	68,68% (46 BM)
		11	65,08% (47 AA)
		15	64,82% (45 IB)
3	1	4	18,85% (46 BM)
		4	64,72% (47 AA)
		8	8,04% (45 IB)
	2	8	68,88% (46 BM)
		8	66,03% (47 AA)
		14	66,92% (45 IB)
4	1	9	62,59% (45 IB)
		9	26,15% (46 BM)
		9	73,45% (47 AA)
	2	14	68,88% (46 BM)
		14	83,07% (46 BM)
		14	74,26% (47 AA)

Durant le premier enrichissement le milieu Cardiff solide a été utilisé sans cycloheximide. Dans ce cas, aucune colonie ne semblait pousser sur les boites de pétri.

A partir du deuxième enrichissement nous avons ajouté le cycloheximide au milieu Cardiff solide (100 mg/l). Dans ce cas, plus de 201 isolats ont été purifiés.

Au cours de l'isolement, deux couleurs différentes ont été observées chez les différentes colonies, une couleur blanche et une autre rose (présence du pigment caroténoïde). Cette observation est en accord avec les données bibliographiques (Amy et al, 1985).

III.B.3 Test de dégradation du 2,4-D

Après 6 jours d'incubation à 28°C, 108 isolats ont pu dégrader le 2,4-D. Cette dégradation est exprimée par la coloration rouge de la préparation de Loos modifiée (1975). Une partie de ces résultats est représentée sur la **Figure III.B.2**.

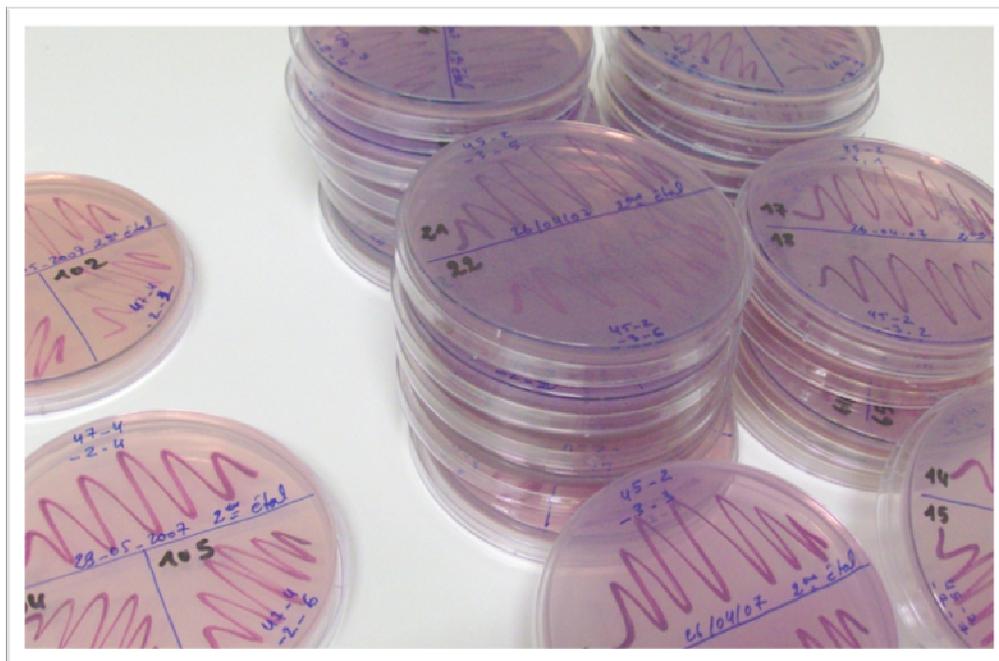


Figure III.B.2: Partie des 108 isolats donnant la couleur rouge sur la préparation de Loos (1975) modifiée (dégradation du 2,4-D)

Par ailleurs, le **tableau III.B.5** représente la capacité de dégradation des 108 isolats dans une solution aqueuse (milieu Cardiff liquide contenant la même concentration, 250 mg. L⁻¹ du 2,4-D). Dans ce cas, le pourcentage de dégradation a été estimé par analyse HPLC en comparant la surface des pics obtenus à celle du témoin à la même concentration en 2,4-D dans le même milieu minéral.

Dans certains cas, l'analyse par HPLC a montré la présence de quelques pics dans le même chromatogramme, c'est-à-dire du même isolat.

Dans cette étude, nous avons retenus uniquement les pics correspondant au substrat de départ puisque l'objectif est le suivie de l'évolution et plus précisément la minéralisation de ce dernier, c'est-à-dire de tester la capacité des isolats à dégrader la molécule et non pas l'identification des métabolites.

**Tableau III.B.5 : Test de minéralisation des 49 isolats sur le milieu Cardiff
(2,4-D 250 mg. L⁻¹)**

Isolat	Source (Sol)	Capacité de dégradation (% de 2,4-D restant)	Temps de rétention (min)
11	45IB	1,20	8,187
15	"	1,28	8,154
16	"	0,00	0,00
17	"	0,00	0,00
20	"	0,00	0,00
22	"	0,00	0,00
23	47AA	0,00	0,00
30	"	2,28	8,085
35	45IB	1,01	8,011
51	47AA	2,46	8,122
52	"	0,38	8,533
54	45IB	0,87	7,826
55	"	1,55	7,893
56	"	ND	ND
59	"	ND	ND
60	"	0,00	0,00
65	"	0,30	8,444
66	"	ND	ND
67	"	3,16	8,329
68	"	ND	ND
69	"	99,43	8,479
70	"	2,53	8,100
71	46BM	2,82	7,968
72	"	4,80	8,020
73	"	2,81	7,978

Tableau III.B.5 (Suite)

Isolat	Source (Sol)	Capacité de dégradation (% de 2,4-D restant)	Temps de rétention (min)
74	"	3,61	7,960
75	"	4,61	8,077
76	"	3,87	7,984
77	"	4,06	7,979
78	"	4,04	7,983
80	47AA	0,00	0,00
81	"	3,93	7,965
82	"	0,00	0,00
88	"	3,40	7,976
91	45IB	0,00	0,00
92	"	0,00	0,00
93	"	0,00	0,00
94	"	0,00	0,00
95	46BM	3,45	7,451
96	"	2,62	7,337
97	"	2,24	7,221
98	"	2,66	7,221
99	"	ND	ND
100	47AA	0,00	0,00
101	"	0,00	0,00
105	"	4,91	8,099
106	"	ND	ND
107	"	5,58	8,078
108	"	4,03	8,080

ND : capacité de dégradation qui n'a pas pu être déterminée

Dans une étude sur la biodégradation du 2,4-D, **Haugland et al., 1990** ont obtenu des résultats similaires, à savoir la présence de certains pics d'absorbance avec des temps de rétention différents. L'apparition de ces différents pics a été attribuée à l'accumulation de la chlorohydroquinone qui peut être légèrement métabolisée à son tour par les microorganismes utilisés et conduire ainsi à d'autres métabolites.

Durant la période d'incubation, qui ne dépasse pas 15 jours, certains isolats dégradent complètement l'herbicide sans apparition d'autres pics, par exemple les isolats : **16, 17, 20, 22, 23, 60, 80, 82, 91, 92, 93, 94, 100 et 101 (tableau III.B.5)**. Dans le cas des autres isolats dégradants, le pourcentage du 2,4-D restant est généralement moins de 5%.

La disparition totale de 1 mM de 2,4-D durant deux semaines d'incubation à 30°C, a été obtenue par **Hogan et al., 1997**. L'évolution de la dégradation de cette molécule par *Alcaligenes eutrophus* JMP134 et *Burkholderia sp* a été déterminée par une analyse chromatographique (HPLC).

III.B.4 Caractérisation des souches dégradantes par les méthodes de biologie moléculaire

III.B.4.1 Technique RFLP (restriction fragment length polymorphism)

La composition bactérienne et la fréquence de différents isolats bactériens obtenus à partir des trois sols algériens, 45IB, 46BM et 47AA, ont été déterminés par l'analyse du gène ADNr 16S en utilisant la technique RFLP (restriction fragment length polymorphism).

Il est à noter que l'ADN est extrait à partir des isolats purifiés.

L'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction d'ADN amplifié (PCR-RFLP) présente de nombreux avantages cités précédemment dans le chapitre **I.C (§I.C.2.2.b)**.

Les produits PCR du gène ADNr 16S de 108 isolats dégradants le 2,4-D (couleur rouge sur milieu Loos solide) ont été clivés par deux enzymes de restriction *RsaI* et *AluI*, considérées parmi les enzymes les plus efficaces et les plus utilisées dans la différenciation entre les gènes ADNr 16S bactériens.

Les fragments ainsi produits sont séparés par électrophorèse (gel 3 % d'agarose haute résolution). Généralement, les isolats d'une même espèce ont des profils de restriction semblables.

Afin de déterminer le nombre de profils distincts générés par chaque enzyme individuellement ou par les combinaisons systématiques des deux enzymes, les profils de la digestion obtenus (voir **Annexes 6**) ont été comparés entre eux.

Les résultats obtenus montrent clairement que l'enzyme *AluI* est le plus utile pour faire une bonne comparaison entre les différents profils de restriction.

A titre d'exemple, nous allons discuter les résultats de la digestion des produits PCR du gène ADN_r16S, de 16 isolats, par les enzymes de restriction *RsaI* et *AluI* (**Figure III.B.3**).

La figure **III.B.3** est composée de deux images. La première correspond aux résultats de l'enzyme *RsaI* (**A**) et la seconde à l'enzyme *AluI* (**B**).

Les deux images indiquent clairement la présence des types RFLP II, V et VIII. Chaque type peut représenter une ou plusieurs isolats, mais dans les deux cas, les isolats bactériens identiques doivent posséder les mêmes bandes (fragments).

Ainsi, les isolats 93, 94, 100, 101, 106, 107 et 108 se caractérisent par des bandes identiques sur les deux images. Nous pouvons donc conclure que ces isolats sont du même type RFLP (II).

Dans certains cas, les résultats des deux images, pour une ou plusieurs pistes, peuvent ne pas être superposables. Nous pouvons citer comme exemple le cas des deux pistes 96 et 105. Les bandes sont similaires sur *RsaI*, alors qu'elles sont complètement différentes sur *AluI*. Ces deux isolats appartiennent donc à deux types RFLP différentes (II et V respectivement).

Enfin et de la même manière, la comparaison de l'ensemble des images de tout les isolats, présentées en **Annexe 6**, a permis l'obtention des résultats consignés dans le tableau **III.B.6**.

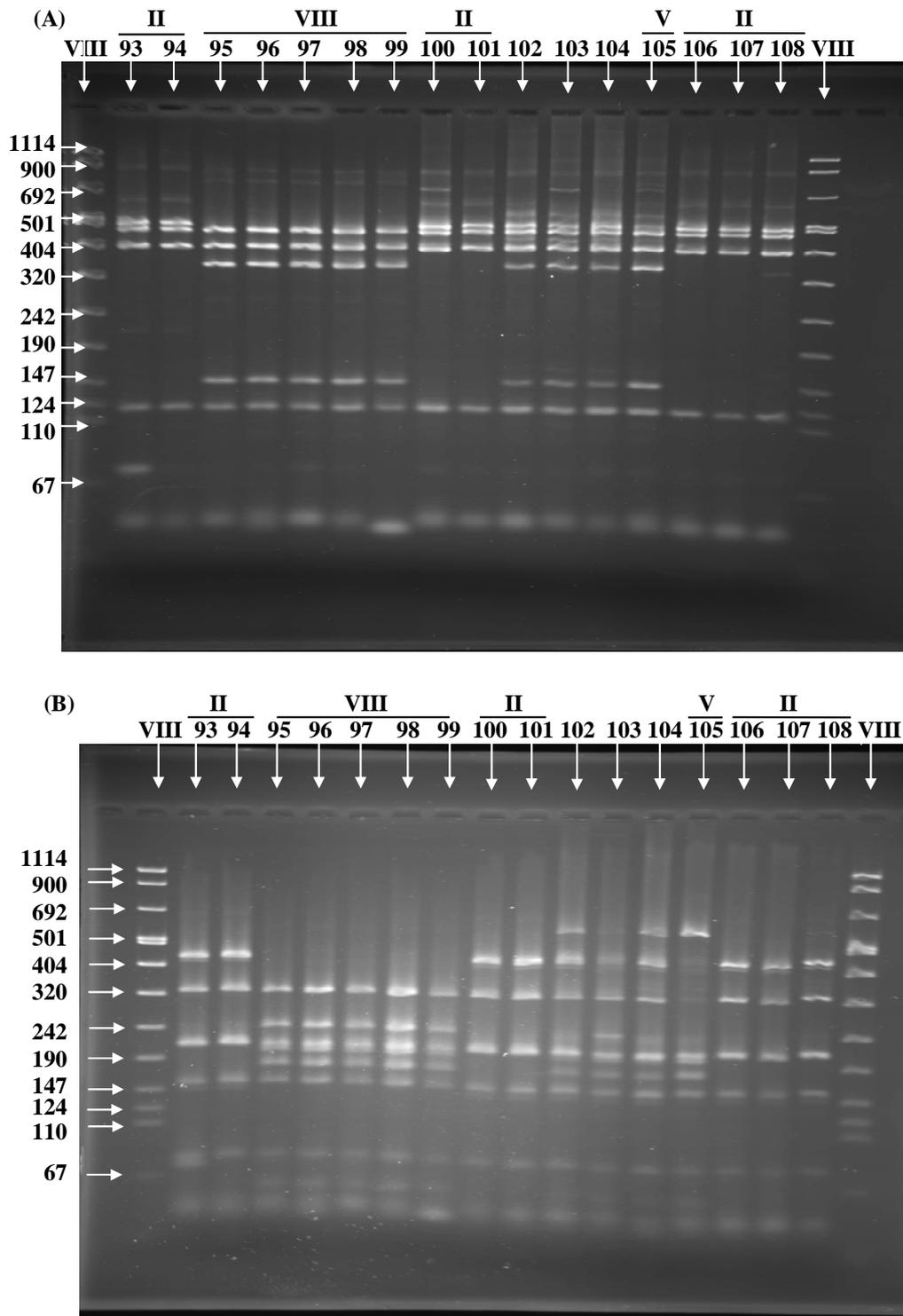


Figure III.B. 3 : Différents profils de la digestion des produits PCR du gène 16S ADNr, de 16 isolats, par les enzymes de restriction *RsaI* (A) et *AluI* (B).
VIII : Marqueur de taille moléculaire (Boehringer Mannheim).

Tableau III.B.6 : Types RFLP et isolats correspondants

Type RFLP	Isolat
I	17
II	35, 51, 52, 55, 66, 67, 68, 69, 70 80, 82, 88, 91, 92, 93, 94, 100 101 106, 107, 108
III	23
IV	30, 81
V	11, 15, 16, 20, 54, 56, 59, 60, 105
VI	65
VII	71
VIII	72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 95, 96 97, 98, 99

Nous constatons que chacun des types FRLP I, III, VI et VII est représenté par un seul isolat, alors que les profils II, V et VIII, correspondant à plusieurs isolats, sont les plus répandus dans les trois sols comme le montre également la **Figure III.B.4**.

Enfin, nous pouvons confirmer la présence de 49 isolats bactériens purs dans les sols étudiés.

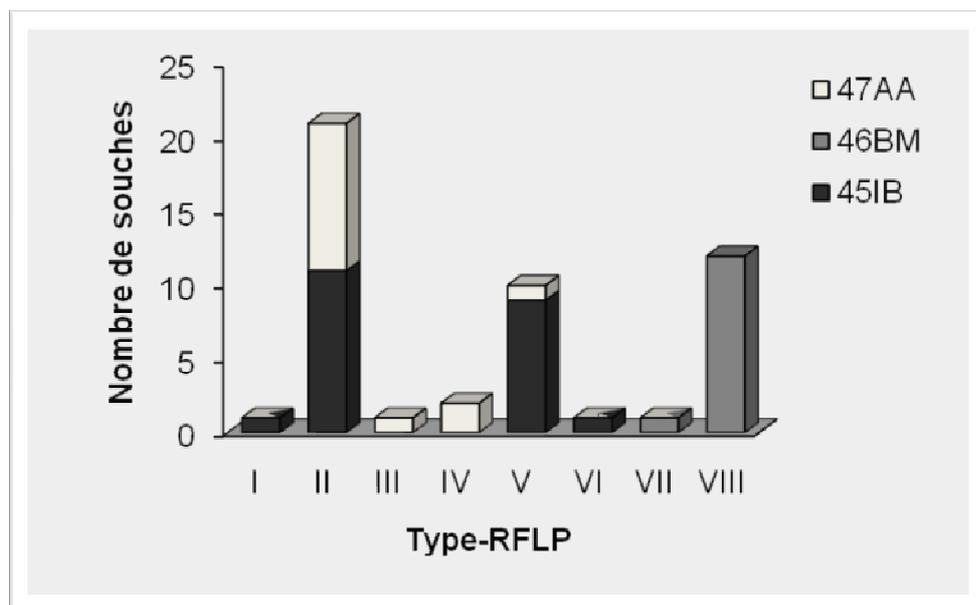


Figure III.B.4: Fréquences des différents groupes microbiens isolés à partir des trois sols (45IB, 46BM et 47AA)

Les différents profils obtenus montrent qu'il y a une diversité de bactéries dominantes responsables de la dégradation du 2,4-D dans les trois sols agricoles Algériens.

Cette conclusion est en parfait accord avec les résultats de certains travaux de recherche. Par exemple, **Vallaey et al., 1997** ont examiné la diversité de 68 isolats des bactéries responsables de la dégradation du 2,4-D, en utilisant l'analyse PCR-RFLP du gène ADNr 16S et les gènes *tfd*. Ils ont montré la participation de diverses espèces bactériennes et des gènes dans la dégradation du 2,4-D dans le sol. De même, **Macur et al., 2007**, ont observé la présence d'une diversité de bactéries dégradantes dominantes dans des sols agricoles, cette diversité est influencée par la concentration du 2,4-D.

Huong et al., 2007 ont aussi isolés diverses bactéries capables d'utiliser le 2,4-D et le 2,4,5-T comme source de carbone et d'énergie. 353 isolats ont été regroupés dans trois catégories principales ; *Burkholderia* spp (43,3%), *Sphingomonas* spp (40,2%), *Ralstonia* (15%) et deux catégories mineures ; *Bradyrhizobium* sp (0,8%) et *Nocardioides* sp (0,3%).

III.B.4.2 Séquençage du gène ADNr 16S

Afin d'identifier les genres et les espèces des 49 isolats purifiés précédemment, les produits PCR du gène ADNr 16S de quelques isolats représentant les différents groupes bactériens ont été utilisées pour la réaction de séquençage (**Tableau III.B.7**).

Tableau III.B.7 : Isolats représentant les différents groupes bactériens utilisés pour la réaction de séquençage

Isolat	Famille RFLP	Source
17	I	45IB
69, 70	II	45IB
107, 108	II	47AA
23	III	47AA
81	IV	47AA
105	V	47AA
65	VI	45IB
71	VII	46BM
72, 76, 77, 96	VIII	46BM

D'après les résultats de la comparaison de la séquence ADNr 16S des isolats dégradants (**Annexe 7**) avec les séquences disponibles dans GenBank (§**II.B.5.2 c**), nous avons pu faire le classement des isolats correspondants aux différents profils suivants (tableau **III.B.8**):

- Isolats de type RFLP I et II : Bacteria; embranchement *Proteobacteria*; classe *Betaproteobacteria*; ordre *Burkholderiales*; famille *Alcaligenaceae*. Elles sont identifiées comme *Achromobacter xylosoxidans*.
- Isolats de type RFLP III : n'a pas pu être séquencée.
- Isolats de type RFLP IV : Bacteria; embranchement *Proteobacteria*; classe *Betaproteobacteria*; ordre *Burkholderiales*; famille *Burkholderiaceae*; genre *Cupriavidus*. Elles sont identifiées comme *Cupriavidus respiraculi*.
- Isolats de type RFLP V : Bacteria; embranchement *Proteobacteria*; classe *Betaproteobacteria*; ordre *Burkholderiales*; famille *Burkholderiaceae*; genre *Ralstonia*. Elles sont identifiées comme *Ralstonia sp.*
- Isolats de type RFLP VI : n'a pas pu être séquencée.
- Isolats de type RFLP VII : Bacteria; embranchement *Proteobacteria*; classe *Betaproteobacteria*; ordre *Burkholderiales*; famille *Burkholderiaceae*; genre *Cupriavidus*. Elles sont identifiées comme *Cupriavidus respiraculi*.
- Isolats de type RFLP VIII : Bacteria; embranchement *Proteobacteria*; classe *Betaproteobacteria*. Elles sont identifiées comme *beta-proteobacterium*.

Le tableau **III.B.8** représente les différents types RFLP avec les souches bactériennes correspondantes.

Il est à noter que les séquences de l'ADNr 16S des souches *Achromobacter xylosoxidans*, *Cupriavidus respiraculi*, *Ralstonia sp* et *beta-proteobacterium* sont mentionnées dans le GenBank sous les numéros d'accèsion DQ659433 ; AF500583 ; AF525456 et DQ223129 respectivement.

Tableau **III.B.8** : Différents types RFLP et souches bactériennes correspondantes

Type RFLP	Souche correspondante
I et II	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
III	n'a pas pu être séquencée
IV	<i>Cupriavidus respiraculi</i>
V	<i>Ralstonia sp</i>
VI	n'a pas pu être séquencée
VII	<i>Cupriavidus respiraculi</i>
VIII	<i>beta-proteobacterium</i>

Nous rappelons, ci-dessous, quelques informations supplémentaires sur les souches isolées :

- toutes les souches isolées appartiennent à l'ordre des *Burkholderiales*. Ce dernier est défini sur la base des séquences de l'ARNr 16S et constitué de quatre familles : *Alcaligenaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae* et *Oxalobacteraceae* (**Euzéby, 2006**).
- Le genre *Achromobacter*, appartenant à la famille *Alcaligenaceae*, contient trois espèces : *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter piechaudii* et *Achromobacter ruhlandii* (**Coenye et al., 2003**).
- *Achromobacter xylosoxidans* est un bacille aérobie, gram-négative, largement dispersée dans l'environnement (**Liu et al., 2002**). Cette espèce a été également isolée à partir d'autres sols et sa capacité de dégrader le 2,4-D a été étudiée et confirmée par certains chercheurs (**Yoriko et al., 2007**).
- La famille des *Burkholderiaceae* est constituée des genres : *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Lautropia*, *Pandoraea*, *Paucimonas*, *Polynucleobacter*, *Ralstonia* et *Thermothrix* (**Garrity et al., 2004 ; Euzéby, 2006**).
- Le genre *Cupriavidus* a été proposé en 1987 pour une unique espèce, *Cupriavidus necator* (**Euzéby, 2006**). Les analyses des séquences du gène 16S ARNr indiquent que cette espèce est rattachée au genre *Ralstonia* (**Yabuuchi et al., 1995**).

Cependant, *C. necator* diffère de la plupart des espèces phylogénétiquement proches de *Ralstonia* (*R. eutropha*) par deux caractères : elle n'utilise pas le benzoate comme source de carbone et ne provoque pas d'hémolyse sur gélose au sang (**Garrity, 2005**).

- Le genre *Ralstonia* (§I.C.2.1) regroupe 11 espèces confirmées. Les souches de l'espèce *R. eutropha* ont un potentiel biotechnologique remarquable (**Garrity, 2005**).
- *Cupriavidus necator* (anciennement *Ralstonia eutropha*) JMP134 est un modèle pour la biodégradation des chloroaromatiques tels que le 2,4-D, les halobenzoates, les chlorophénols et les nitrophénols (**Trefault et al., 2004 ; Pelmont, 2005 ; Manzano et al., 2007 ; Pérez-Pantoja et al., 2008**).

III.B.5 Effet de l'enrichissement sur la structure globale des communautés microbiennes du sol : Estimation par RISA.

L'application des pesticides sur les sols peut affecter les communautés microbiennes indigènes par deux effets majeurs :

- 1) un effet toxique par la molécule elle-même,
- 2) un effet stimulant, qui favorise la croissance des microorganismes dégradants spécifiques, capables d'utiliser la molécule comme source de carbone et d'énergie.

Dans le cas d'enrichissement, dans les conditions du laboratoire, les deux effets peuvent survenir simultanément.

L'influence des quatre enrichissements sur la structure des communautés microbiennes indigènes dans les trois sols, a été évaluée par l'application de la technique Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA).

Cette technique a été réalisée sur l'ADN extraite directement à partir de la suspension à la fin de l'incubation de chaque enrichissement.

Les résultats de cette étude sont représentés sur la **figure III.B.5 (Panneau A, B et C)**.

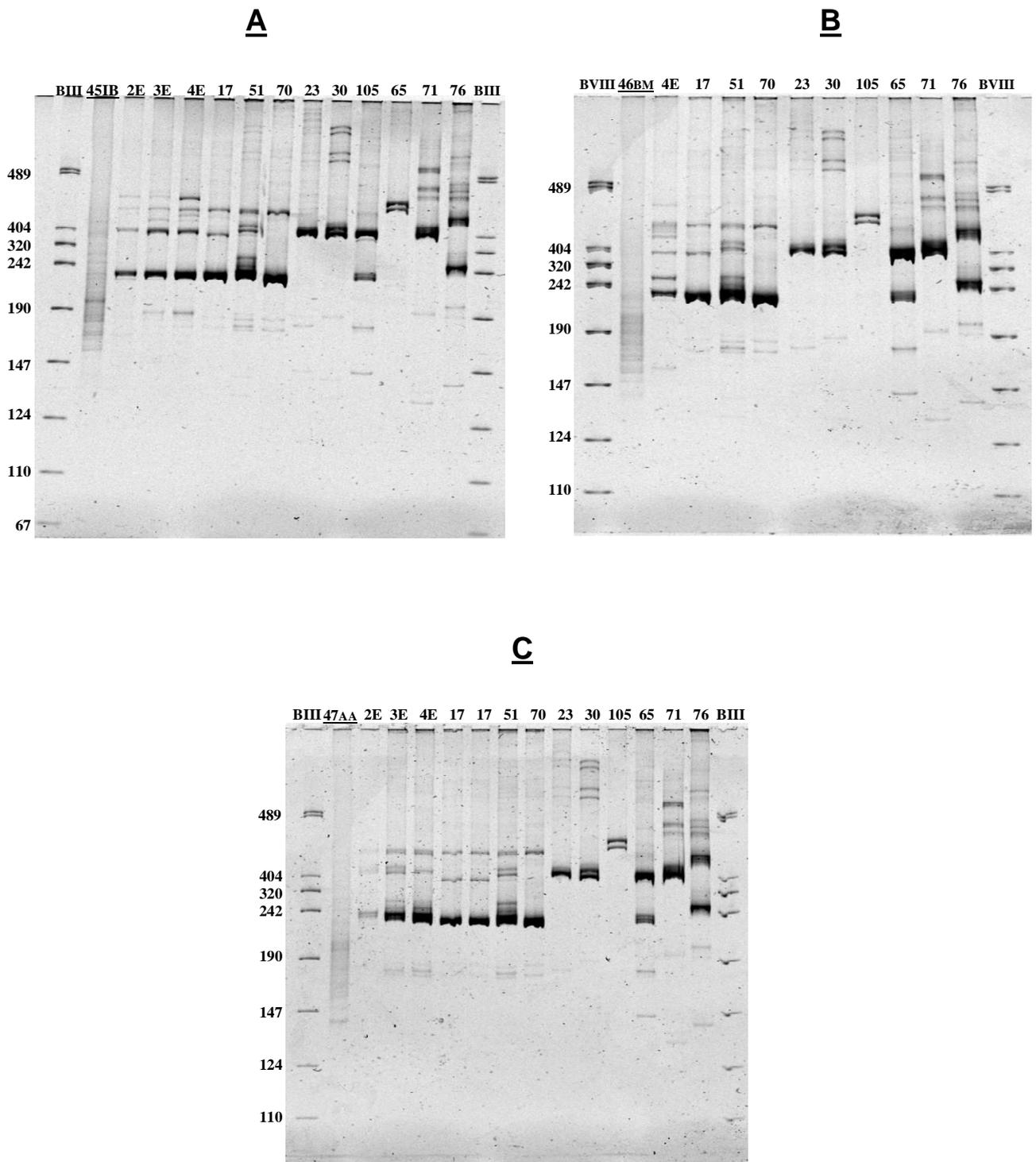


Figure III.B.5 : Profils RISA des produits PCR de l'ADN extrait de la suspension d'enrichissement, à la fin de l'incubation, et de l'ADN extrait des isolats représentant les différents types RFLP.

*Enrichissement du sol 45IB (A), du sol 46BM (B) et du sol 47AA (C)
BVIII : marqueur de taille moléculaire (Boehringer Mannheim).*

L'examen et la comparaison des trois panneaux montrent que :

- le nombre et l'intensité des bandes représentant les différents types RFLP dans les trois panneaux, sont identiques pour chaque isolat, ceci confirme la bonne reproductibilité de la méthode RISA.
- l'effet significatif des enrichissements sur la structure des communautés microbiennes dans les trois sols est traduit par la diminution du nombre de bandes et l'augmentation de l'intensité de certaines autres bandes (voir les pistes des trois sols et leurs enrichissements),
- le nombre et l'intensité des bandes varient d'un sol à un autre. Le quatrième enrichissement montre clairement cette différence, notamment entre le 47AA et les deux autres sols. Ce résultat est vraisemblablement dû à la diversité des populations microbiennes et aux caractéristiques physico-chimiques différentes des sols,
- les bandes des isolats 17, 51 et 70 (isolées à partir des sols 45, 47 et 45 respectivement) apparaissent également sur la piste du 4^{ème} enrichissement du sol correspondant (source d'isolat).

En principe cette remarque est valable pour les autres isolats, mais la différence due à l'intensité fait que les isolats présentent des bandes qui ne figurent pas sur les pistes des enrichissements. C'est le cas des isolats 30 (isolées du sol 47), 71 et 76 (isolées du sol 46). Cela peut être expliqué par le nombre des enrichissements réalisés qui n'est pas suffisant pour l'apparition des bandes de tous les isolats obtenus. Autrement dit, il faut faire plus que 4 enrichissements notamment avec le sol 46 pour voir apparaître les bandes correspondants aux différents isolats.

La diminution du nombre des bandes des profils RISA dans les trois sols, peut être expliquée par le fait que l'ajout du 2,4-D à 663 mg. L⁻¹, considérée comme concentration élevée, participe au changement ou à la destruction partielle de la population microbienne. Par la suite la technique d'enrichissement peut favoriser aussi la prolifération sélective des microorganismes dégradants, ce qui se traduira par une augmentation de l'intensité de certaines bandes et la disparition des autres.

Nos résultats concordent avec ceux de **Macur et al., 2007** qui ont observé que l'addition de 500 mg/kg 2,4-D à l'enrichissement en batch provoque un changement significatif dans la

structure de la communauté microbienne. Ce changement a comme résultat une réduction dans le nombre des bandes 16S et une augmentation dans la densité des bandes prédominantes. Ce résultat n'a pas été observé dans le cas des autres concentrations utilisées : 0, 10 et 100 mg/kg 2,4-D.

III.B.6 Gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC*

III.B.6. 1 Présence des gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC* dans 18 isolats

Nous rappelons que, le gène *tfdA* code pour l'enzyme 2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygénase impliquée dans la première étape de la voie catabolique du 2,4-D. il convertit le 2,4-D au 2,4-dichlorophénol, alors que le gène *tfdB* code pour l'enzyme 2,4-dichlorophenolhydroxylase qui convertit le 2,4-dichlorophénol au 3,5-dichlorocathéchol.

Le gène *tfdC* code pour l'enzyme 3,5-dichlorocatéchol 1,2-dioxygénase qui convertit le 3,5-dichlorocathéchol au 2,4-Dichloro-*cis*, *cis*-Muconate (§ I.C.1).

La présence des gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC* dans l'ADN total de certains isolats représentant les différents types RFLP ont été examinés par une amplification par PCR suivi d'une migration sur gel d'agarose (1%).

Les résultats de la **Figure III.B.6** montrent :

- la présence du gène *tfdA* dans la majorité des 18 isolats utilisés, ce qui témoigne de leur participation dans la première étape de dégradation du 2,4-D, c'est-à-dire la transformation de ce dernier en 2,4-dichlorophénol (2,4-DP). Les isolats 22 (type V) et 65 (type VI), par contre, semblent être inactives vis-à-vis de cette dégradation.
- l'absence du gène *tfdB* dans les isolats correspondant aux types III, IV, VII et VIII. Ceci indique que le 2,4-DP obtenu par le gène *tfdA* n'est pas converti en 3,5-dichlorocathéchol (2,4-DC). Autrement dit, il y'aurait certainement une accumulation du 2,4-DP dans le milieu.
- l'apparition du gène *tfdC* dans tous les isolats étudiés à part les deux isolats 22 (type V) et 65 (type VI). Ceci met en évidence la capacité des isolats à minéraliser le cycle benzénique. La 3,5-dichlorocatéchol 1,2-dioxygénase étant une enzyme clé dans la minéralisation complète des produits aromatiques (Cavalca *et al.*, 1999),
- l'absence des trois gènes dans les deux isolats 22 et 65. Ces derniers ne peuvent donc dégrader le substrat.

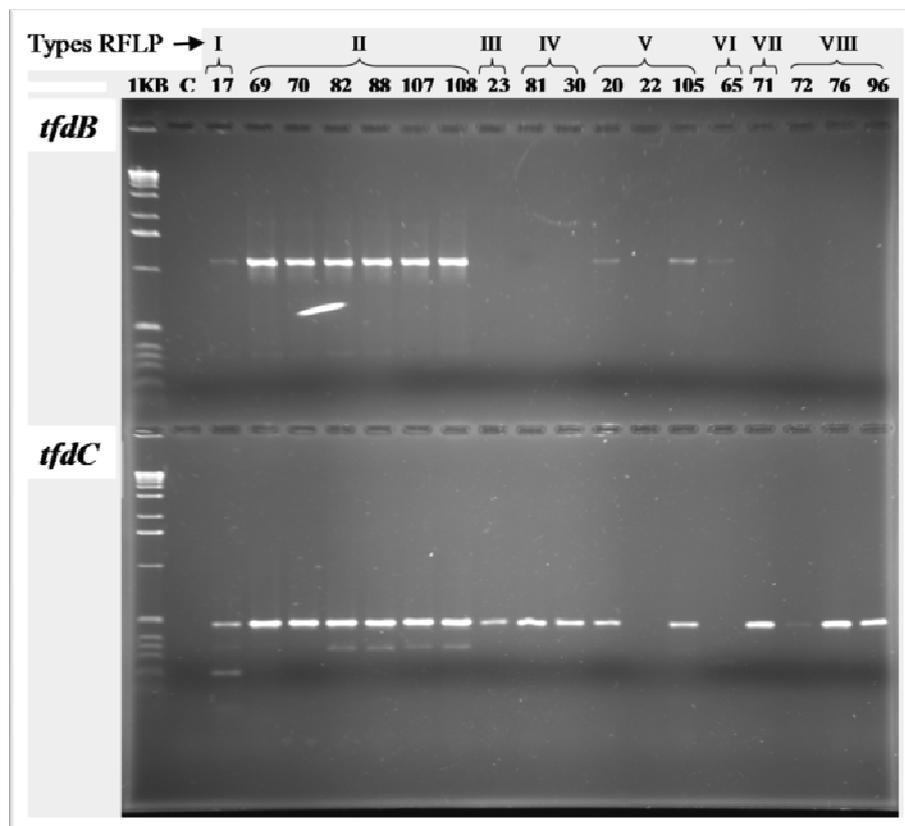
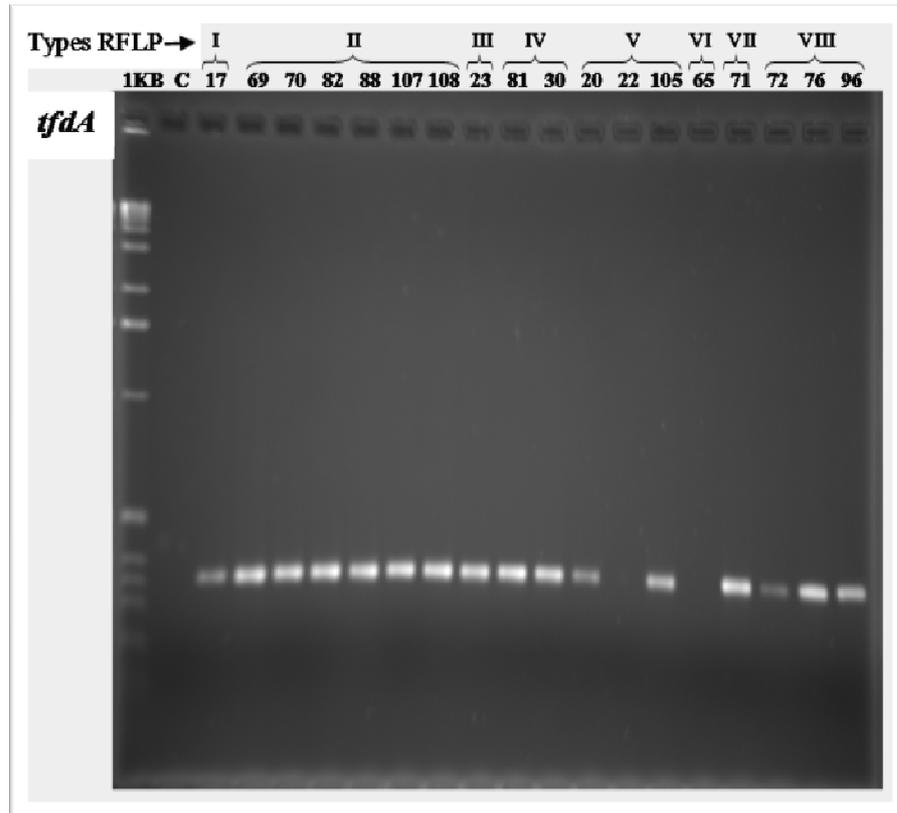


Figure III.B.6 : Confirmation de la présence des gènes *tfdA*, *tfdB*, et *tfdC* dans les isolats purifiés. La séparation de ces gènes a été réalisée sur un gel d'agarose (1%). C : témoin (produits PCR sans ADN). **1kb** : Marqueur de taille moléculaire.

Le test de vérification de la présence des trois gènes a été réalisé sur 18 isolats seulement, mais qui représentent les différents types RFLP. Afin d'élargir les résultats de ce test sur l'ensemble des isolats étudiés, 49 isolats, et pour ne pas refaire le même travail, nous avons préféré passer directement à l'analyse de la digestion enzymatique de tous les isolats (§.II.B.6.3). Cette analyse nécessite préalablement une amplification des gènes par la technique PCR qui a constitué la première étape lors de notre travail sur les 18 isolats.

Cependant, avant de présenter les résultats de cette analyse et pour mieux comprendre et discuter les résultats, il est préférable de déterminer en premier lieu la taille des gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC*.

III.B.6. 2 Taille des trois gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC*

Afin de déterminer la taille des trois gènes, les produits PCR de l'ADN de certains isolats (69, 70 et 105) ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose (1%) en utilisant le marqueur BVIII (Boehringer Mannheim). La **Figure III.B.7** montre que la taille approximative est de 360 pb, 1,1 kb et 495 pb pour *tfdA*, *tfdB* et *tfdC* respectivement. Ces valeurs sont très proches de celles rencontrées généralement dans la littérature (Vallaeyts *et al.*, 1996 ; Hogan *et al.*, 1997).

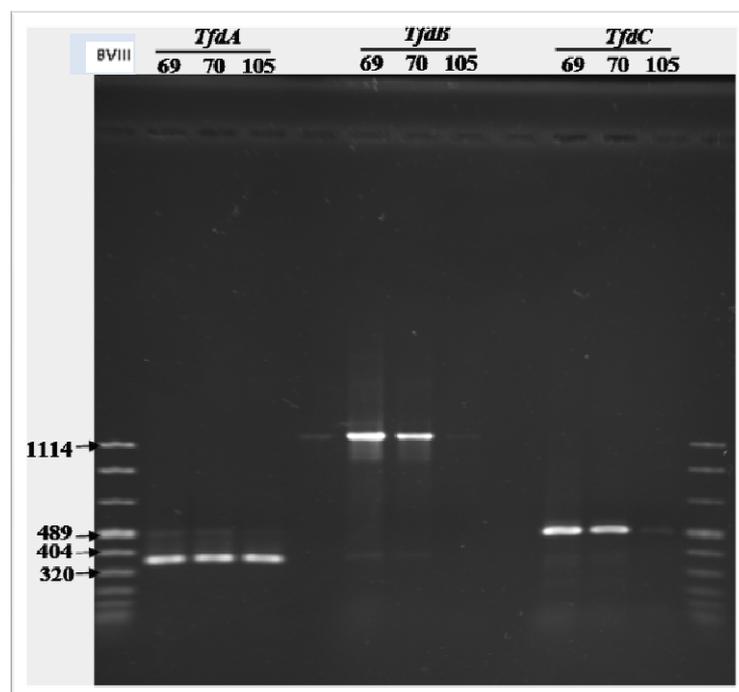


Figure III.B.7: Taille des gènes *tfdA*, *tfdB*, et *tfdC*.
BVIII : marqueur de taille moléculaire (Boehringer Mannheim).

II.B.6. 3 Digestion des produits PCR avec les enzymes de restriction *MspI* et *HaeIII*

Nous rappelons que, la digestion des produits PCR des trois gènes *tfd* de tous les isolats purifiés (49 isolats) a été réalisé avec les enzymes de restriction *MspI* dans le cas de *tfdA* et *HaeIII* dans le cas des deux gènes *tfdB* et *tfdC*.

Il est à noter également que les produits de la digestion ont été séparés sur le gel d'agarose de haute résolution, en respectant l'ordre des différents RFLP 16S (de I à VIII).

Les résultats obtenus sont représentés sur la **Figure III.B.8**.

Dans le but de faciliter la lecture des différents profils de cette figure, nous avons résumé les données concernant la présence et l'absence des gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC* dans le tableau **III.B.9**.

Tableau **III.B.9** : Présence et absence des gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC* dans les isolats obtenus.

Type RFLP	Isolats	<i>tfdA</i>	<i>tfdB</i>	<i>tfdC</i>
I	17, 51, 52, 55, 66, 67, 68, 69, 70.	+	+	+
	35.	+	-	-
II	80, 82, 88, 91, 92, 93, 94, 100, 101, 106, 107, 108.	+	+	+
III	23.	+	-	+
IV	30.	+	-	+
	81.	+	-	-
V	11, 15, 16, 20, 54, 59, 60, 105.	+	-	-
	22, 56.	-	-	-
VI	65.	-	-	-
VII	71.	+	-	+
VIII	74, 75, 76, 77, 78, 95, 96, 97, 98.	+	-	+
	72, 73, 99.	+	-	-

(+) présence,

(-) absence.

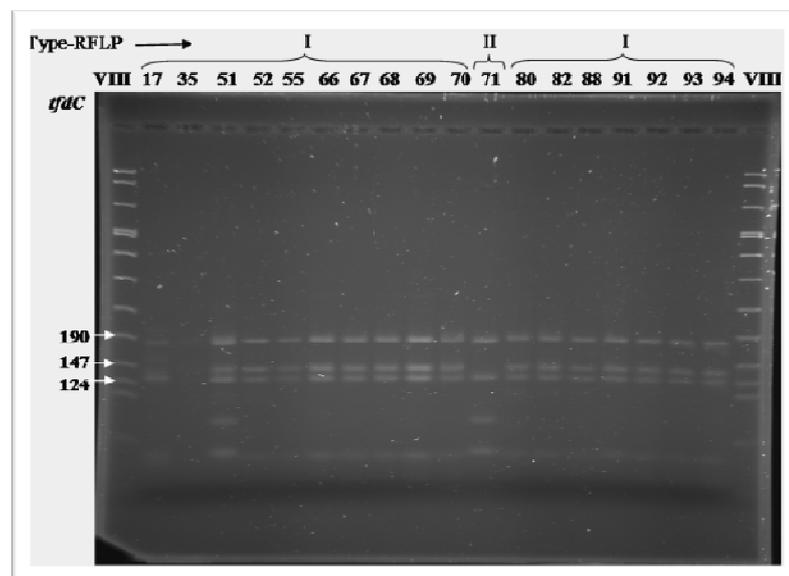
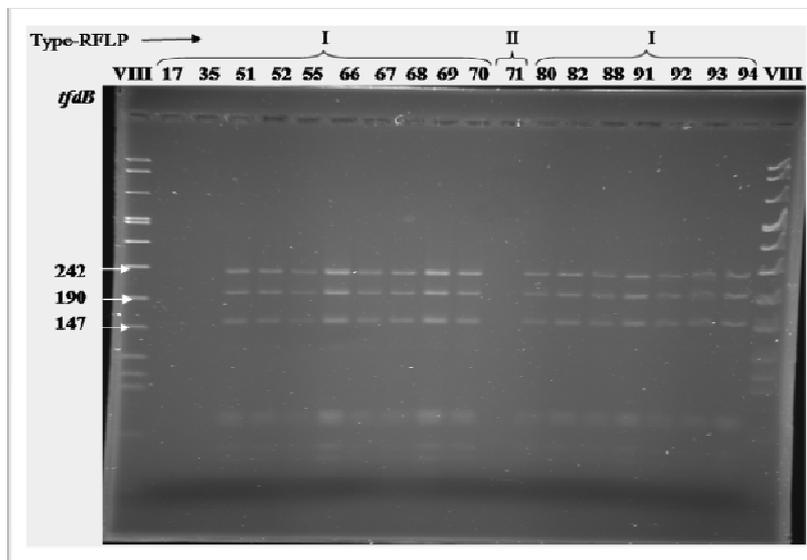
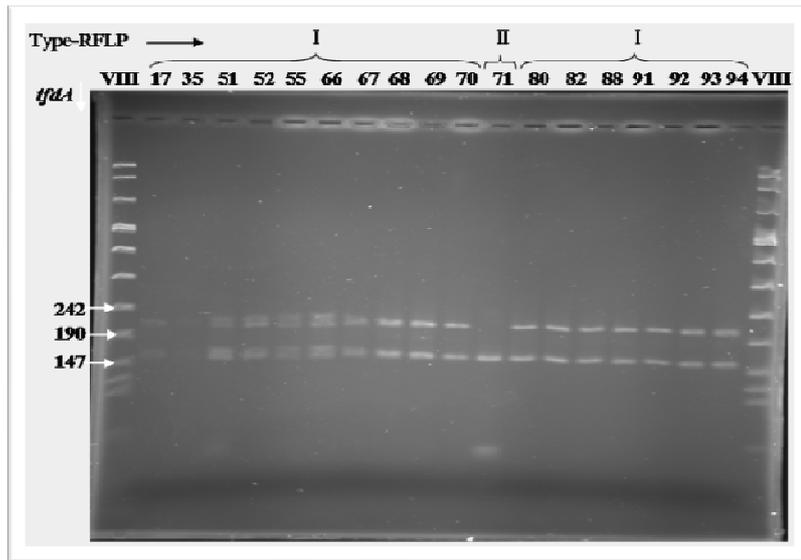


Figure III.B.8: RFLP des gènes *tfdA*, *tfdB*, et *tfdC* [type RFLP (16S) I et II]

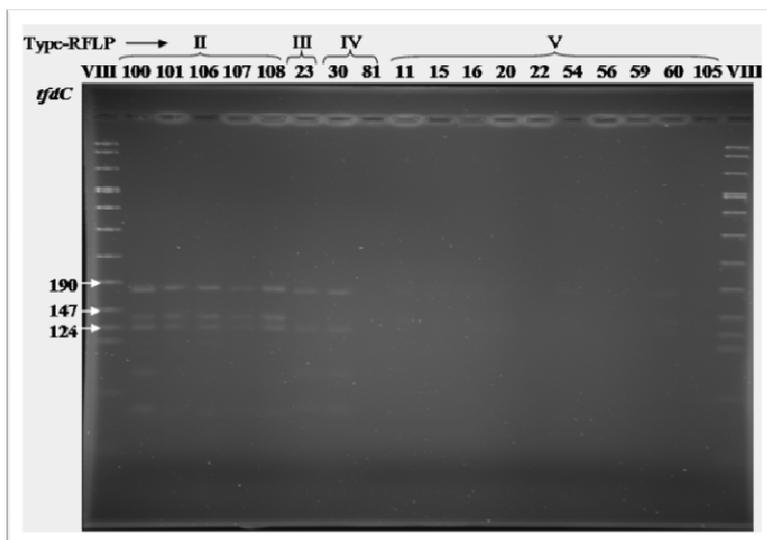
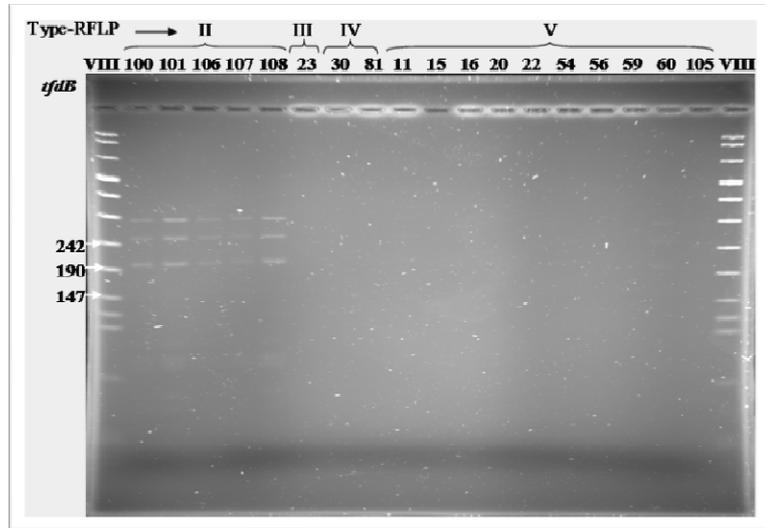
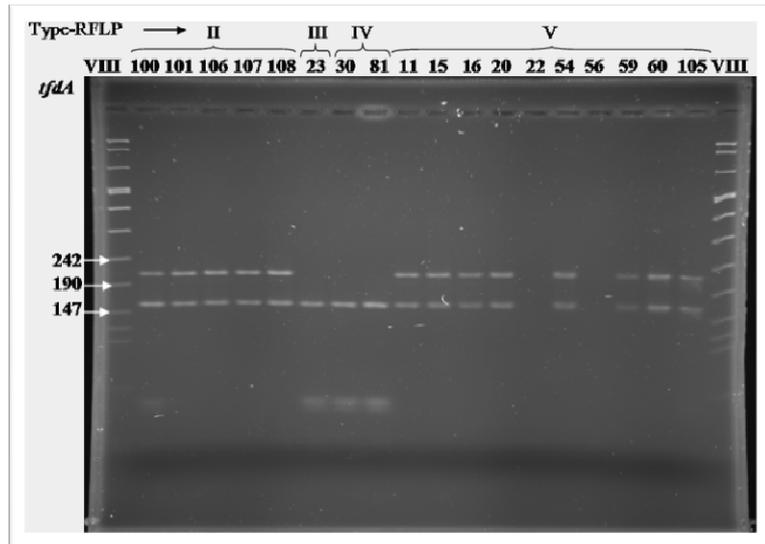


Figure III.B.8: RFLP des gènes *tfdA*, *tfdB*, et *tfdC*. [type RFLP (16S) II, III, IV, et V]

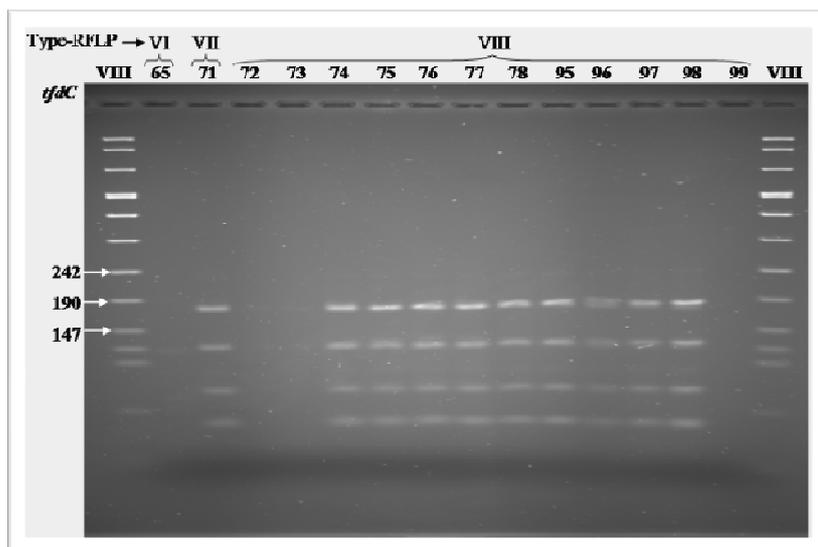
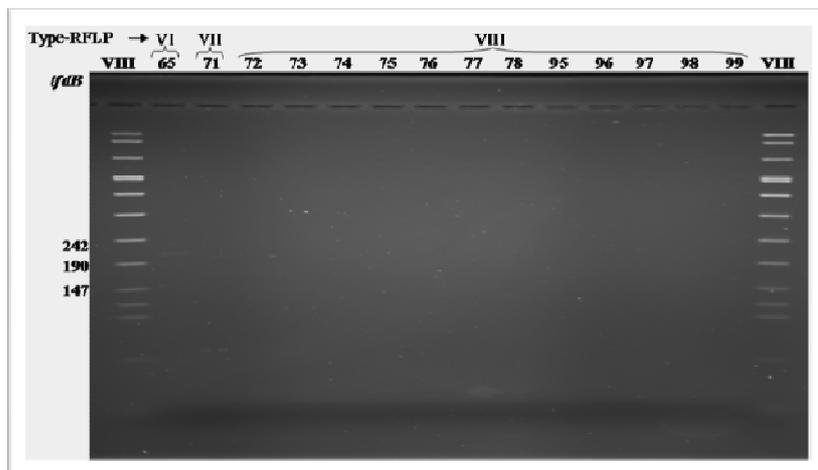
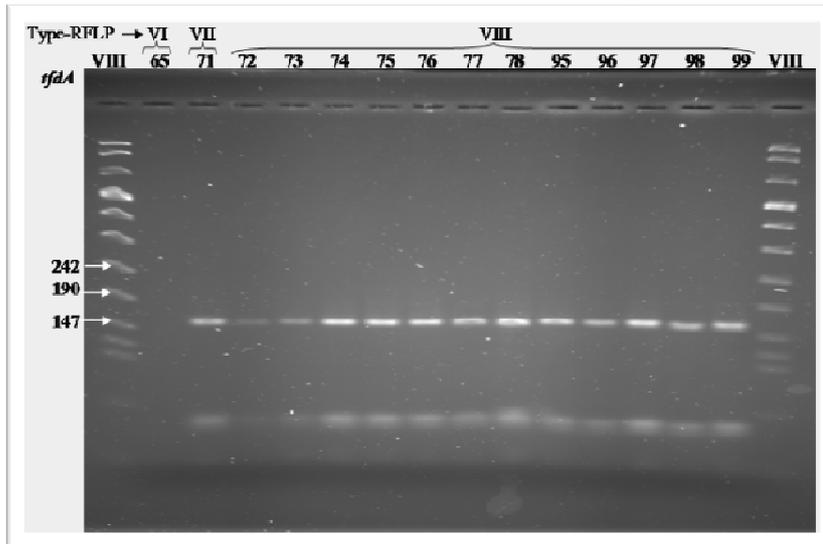


Figure III.B.8: RFLP des gènes *tfdA*, *tfdB*, et *tfdC* [type RFLP (16S) VI, VII et VIII]
III (première et dernière pistes) : marqueur de taille moléculaire (Boehringer Mannheim)

L'examen des résultats de la digestion enzymatique des gènes *tfdA*, *tfdB*, et *tfdC*, montre que :

- les 49 isolats purifiés, à l'exception des isolats 35, 22, 56 et 65, possèdent le gène *tfdA*,
- la présence du gène *tfdB* dans les isolats appartenant au type I et II (exception 35) seulement,
- l'absence du gène *tfdC* dans tous les isolats correspondant aux types V et VI ainsi que les isolats 35 (type I), 81 (type IV), 72, 73 et 99 (type VIII).

Ces remarques semblent être en contradiction avec les résultats des tests de minéralisation, qui ont indiqué la disparition quasi totale de la molécule dans le milieu Cardiff avec certains isolats (voir **Tableau III.B.5**). Ce phénomène peut être expliqué comme suit :

- ❖ Lors du processus d'enrichissement, les isolats qui ne possèdent aucun gène de dégradation, par exemple les isolats 22 et 65, ont tendance à accueillir ces gènes suite au transfert des plasmides des autres souches dégradantes et que cette activité disparaîtra facilement au cours de l'extraction de l'ADN.
- ❖ L'absence des bandes représentant le gène *tfdB* dans la plupart des isolats, malgré la présence de celles correspondantes aux deux autres gènes (*tfdA*, *tfdC*), est vraisemblablement due à la diversité, de ce gène, qui nécessite d'autres amorces spécifiques lors du processus d'amplification.

Cette interprétation est basée sur les résultats de certains travaux de recherches qui confirment la diversité des trois gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC* (**Lee et al., 2005 ; Cavalca et al., 1999 ; Vallaeyts et al., 1996**).

Par ailleurs, les profils de restriction obtenus ont été également comparés entre eux afin de déterminer le nombre de profils distincts générés par chaque enzyme individuellement ou par les combinaisons systématiques des deux enzymes. Trois profils distincts ont été donc générés.

Ces trois types de profils, résultant de la digestion du *tfdC* par *HaeIII*, ne correspondent pas à celui de *Ralstonia eutropha* JMP 134 observé par **Cavalca et al., 1999**, mais l'un de ces types est identique à celui observé par les mêmes auteurs et qui représente les souches PLAE6 et ID9 isolées à partir du sol Cîteaux (France), il s'agit par exemple des souches 67, 68 et 69. Les séquences de *tfdC* des souches PLAE6 et ID9 sont aussi identiques à celles de la souche *Pseudomonas putida* PaW85.

Par conséquent, **Cavalca *et al.*, 1999** ont adopté l'hypothèse qui montre que le gène *tfdC* du *Pseudomonas putida* PaW85 et d'autres gènes relatifs au *tfdC* pourraient être les gènes d'ancêtre pour 3,5-dichlorocatéchol 1,2-dioxygénase impliqué principalement dans la voie de dégradation des composés naturels et réutilisé par la suite dans la dégradation du 2,4-D.

III.C Test de Bioaugmentation

Dans ce travail, le test de bioaugmentation est basé sur deux éléments principaux :

1. Le choix d'un sol historiquement non traité avec le 2,4-D et favorable à la prolifération des micro-organismes dégradants.
2. Le choix d'une souche ayant une capacité de dégradation efficace.

III.C.1 Choix du sol

Nous rappelons que les sols utilisés dans cette étude ont été collectés à partir de trois lieux différents de la région de Constantine et de Mila (Est de l'Algérie) :

- Campus de l'université Mentouri-Constantine (48CC),
- M'chira (Mechtat Elgabel), wilaya de Mila (49MC),
- Didouche Mourad «Constantine » (50DM).

D'autre part, le choix du sol est basé sur la technique de minéralisation du substrat par radiorespirométrie avec le 2,4-D marqué uniformément au ^{14}C (voir § II.C.1).

Les résultats obtenus par cette technique sont représentés sur la figure III.C.1.

D'après les courbes de cette figure, on peut noter les remarques suivantes :

- la présence des microorganismes dégradants dans les trois sols, malgré la faible minéralisation du 2,4-D notamment dans les dix premiers jours d'incubation,
- le taux de minéralisation du 2,4-D dans le sol 49MC toujours inférieur à ceux de 48CC et 50DM quelque soit le temps d'incubation,
- les trois sols sont favorables pour la survie et la prolifération des microorganismes dégradants le 2,4-D. En effet, après 36 jours d'incubation, la dégradation de cette molécule est d'environ 53% pour 48CC et 50DM et 38% pour 49MC.

Il est à noter également que la phase de latence observée dans les trois sols est relativement longue, en particulier dans le sol 49MC (environ 10 jours). Ce résultat semble être logique dans la mesure où les bactéries ne sont pas adaptées à la présence de l'herbicide.

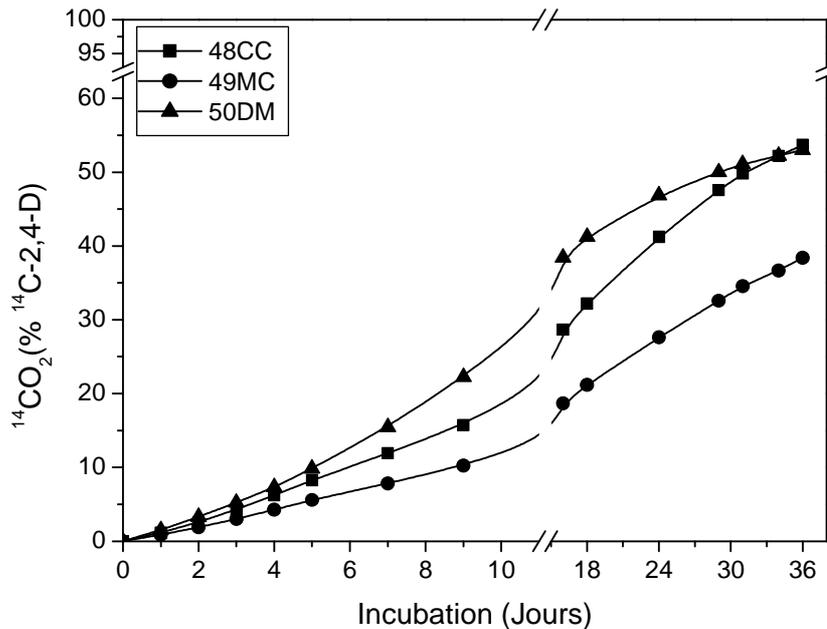


Figure III.C.1: Test de minéralisation du 2,4-D dans les trois autres sols agricoles algériens (48CC, 49MC et 50DM)

La période de latence peut varier d'un sol à un autre. A titre d'exemple, **Ka et al., 1994** ont constaté que les sols non traités par le 2,4-D présentent une phase de latence d'environ deux semaines.

Dans la suite de ce travail et sur la base des résultats obtenus, le sol 49MC, présentant une faible dégradation du substrat, a été sélectionné pour l'étude de l'effet d'inoculation (test de bioaugmentation).

III.C.2 Choix de la souche d'inoculation

La réussite dans l'utilisation des micro-organismes pour la bioremédiation exige le choix de souches d'inoculation capables de dégrader efficacement les polluants environnementaux sur une large gamme de concentrations (**Greer et al., 1992**).

Dans notre cas, comme il a été cité précédemment, le choix de la souche d'inoculation a été effectué par la technique de minéralisation sur microplaques 24 puits.

Dans ce contexte, deux plaques ont été préparées et 39 isolats ont été testés.

L'emplacement des isolats testés sur les deux filtres des différents prélèvements sont représentés sur la **Figure III.C.2**.

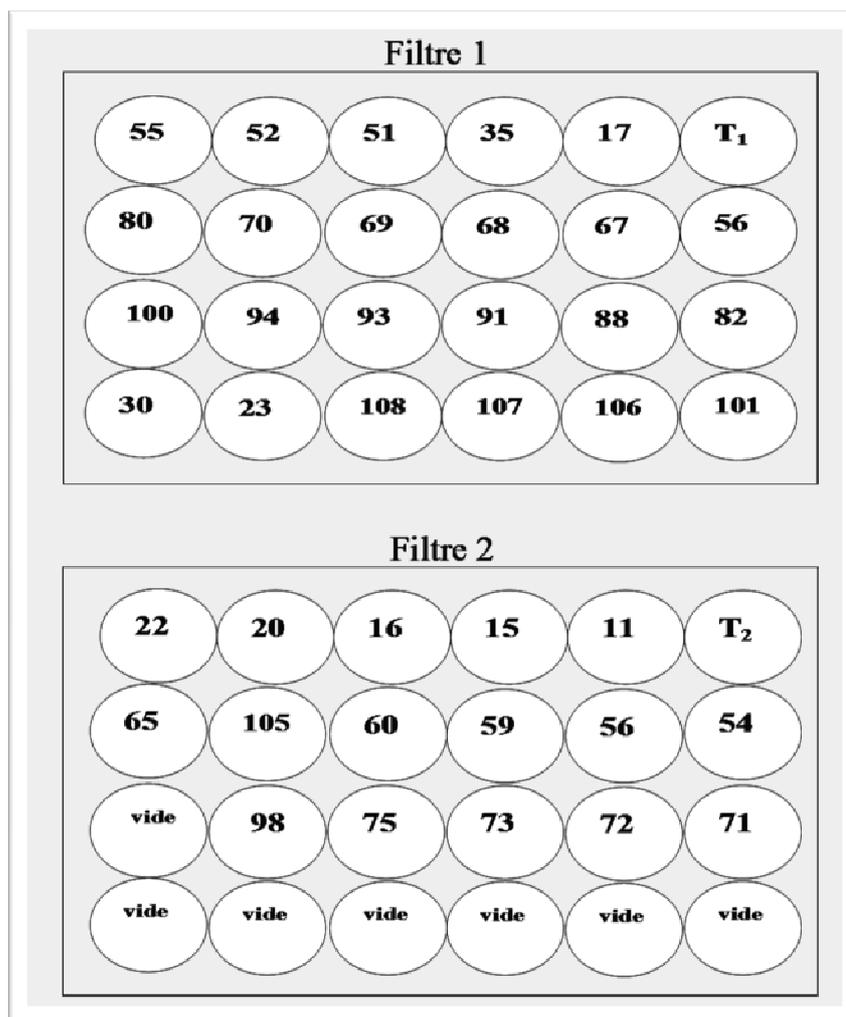


Figure III.C.2 : Emplacement des isolats testés sur les filtres

Il est à noter que cette position est l'inverse de celle des plaques, c'est-à-dire ce qui était à gauche de la plaque devient à la droite du filtre et vice versa.

D'après les résultats de la **Figure III.C.3**, la majorité des isolats testés ont pu minéralisées entièrement le ^{14}C -2,4-D initial durant le premier jour d'incubation. Nous rappelons également que plus la tache issue de la minéralisation est sombre, plus la radioactivité est importante. Autrement dit, l'intensité de la tache est en relation directe avec le taux de dégradation.

La faible intensité des taches correspondant au deuxième et troisième prélèvement, pour les souches dégradantes, indique clairement que la dégradation totale du substrat est rapide puisque elle s'effectue en moins de 24 heures d'incubation, temps correspondant au premier prélèvement.

Nous avons choisi la souche 67 en se basant sur cette capacité de minéralisation ainsi que les résultats très satisfaisants obtenus antérieurement notamment ceux concernant :

- ✓ le test de minéralisation sur le milieu solide de **Loos (1975)** modifié,
- ✓ le test de minéralisation sur le milieu liquide **Cardiff**,
- ✓ les profils de la PCR-RFLP du gène ADN 16S,
- ✓ la présence des trois gènes *tfdA*, *tfdB* et *tfdC*.

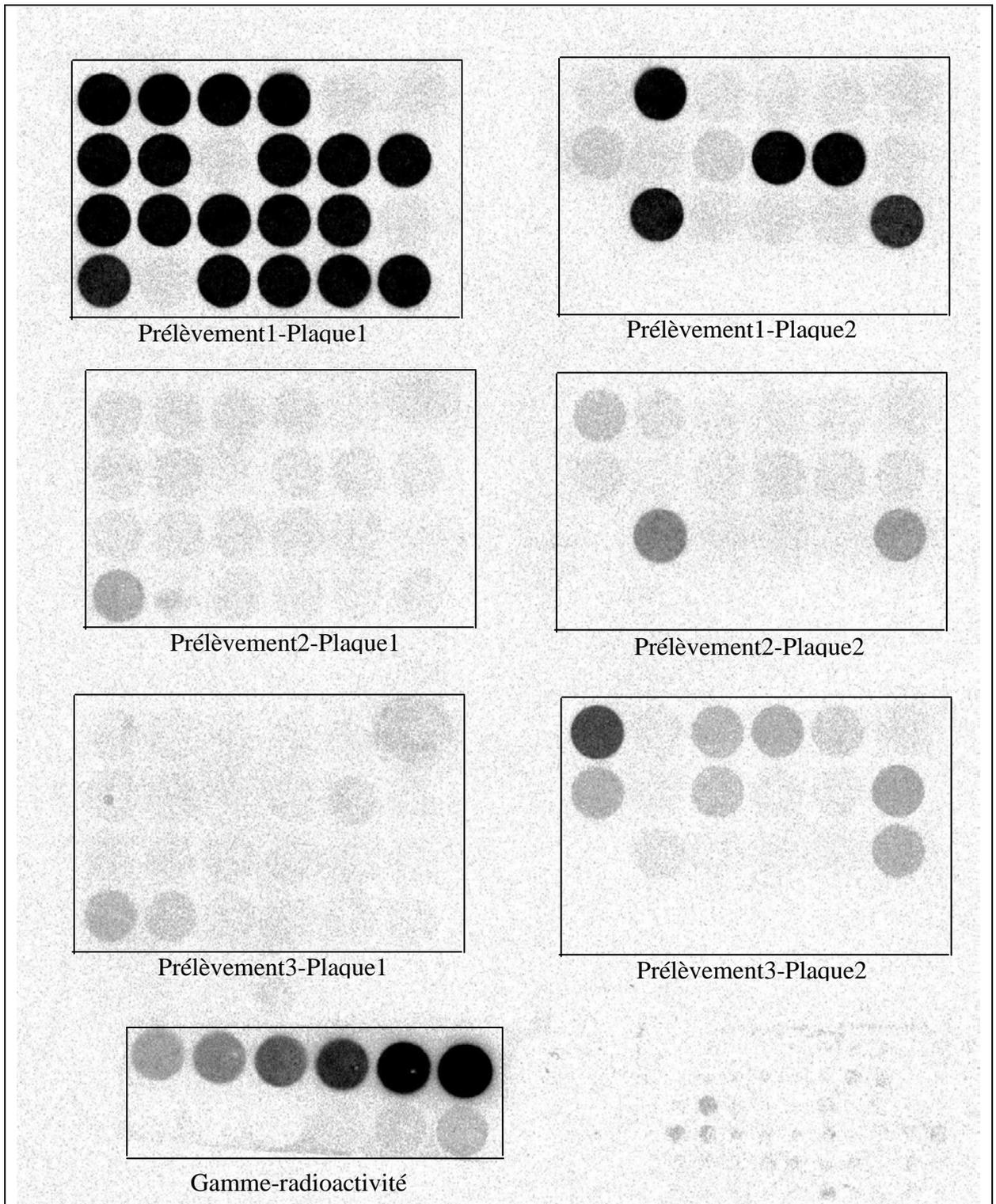


Figure III.C.3 : Test de minéralisation par radiorespirométrie sur microplaque 24 puits

III.C.3 Test de bioaugmentation

Le test de bioaugmentation a été effectué par la technique de minéralisation du substrat par radiorespirométrie avec le 2,4-D marqué uniformément au ^{14}C ($[^{14}\text{C}\text{-cycle}]\text{-2,4-D}$) ($0,3 \mu\text{g/g}$ sol).

Nous rappelons également que le sol 49 MC, utilisé dans ce test, présente une minéralisation de 2,4-D relativement faible par rapport aux deux autres sols 48CC et 50DM. Par contre, l'isolat 67 conduit à une minéralisation presque totale du substrat pendant moins de 24 heures. Cet isolat, représentant le type RFLP I, a été isolé à partir du sol 45IB.

Dans ce travail le nombre de cellules bactériennes utilisées pour l'inoculation est de $3,4 \times 10^6$ cellules/gramme sol. Ce nombre est similaire à celui fréquemment cité dans la littérature, en particulier lors des recherches ayant pour objectif l'amélioration de la biodégradation du 2,4-D, ainsi que d'autres pesticides (Greer and Shelton., 1992; Singh *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus (**figure III.C.4**) montrent clairement la différence importante entre la minéralisation du 2,4-D en présence de la souche adaptée (sol inoculé) et des souches dégradantes indigènes non adaptées (sol non inoculé). De plus, le taux de minéralisation dépend fortement de l'humidité du sol étudié. En effet, la dégradation du 2,4-D augmente d'une manière très significative avec la quantité d'eau dans ce sol.

Dans le cas du sol non inoculé, le taux de minéralisation ne dépasse pas 10% durant 8 jours d'incubation. Ceci prouve la présence de bactéries dégradantes mais avec une activité faible et/ou une population insuffisante. Ce résultat confirme les données du choix du sol 49MC, discutées précédemment.

L'inoculation du sol conduit, par contre, à une amélioration considérable de la dégradation. Ainsi, des taux de minéralisation dépassant 64 % ont été enregistrés durant la même période d'incubation avec les humidités 18, 21 et 25 %, alors qu'elle est d'environ 49% avec l'humidité 15%. Ce résultat concorde parfaitement avec ceux de l'impact de la teneur en humidité du sol sur la capacité de minéralisation du 2,4-D (§ III.A.3).

La dégradation du substrat dans le sol inoculé, peut être expliquée par la présence des deux types de souches, adaptée et non adaptée, dans la mesure où la bioaugmentation peut non seulement augmenter la dégradation du substrat, mais aussi réduire les effets délétères de la molécule sur les populations microbiennes indigènes.

Nous pouvons donc conclure que le 2,4-D est un produit facilement dégradable par les microorganismes telluriques et que sa persistance dans le sol est principalement liée à la présence des souches adaptées.

Enfin, les résultats cités ci-dessus concernent l'horizon A du sol étudié. Cependant, les données bibliographiques indiquent que le rendement de la bioaugmentation d'un sol contaminé par le 2,4-D est plus élevée dans l'horizon B, où la communauté indigène ne peut dégrader l'herbicide ou elle le dégrade mais très lentement (Dejonghe et al, 2000).

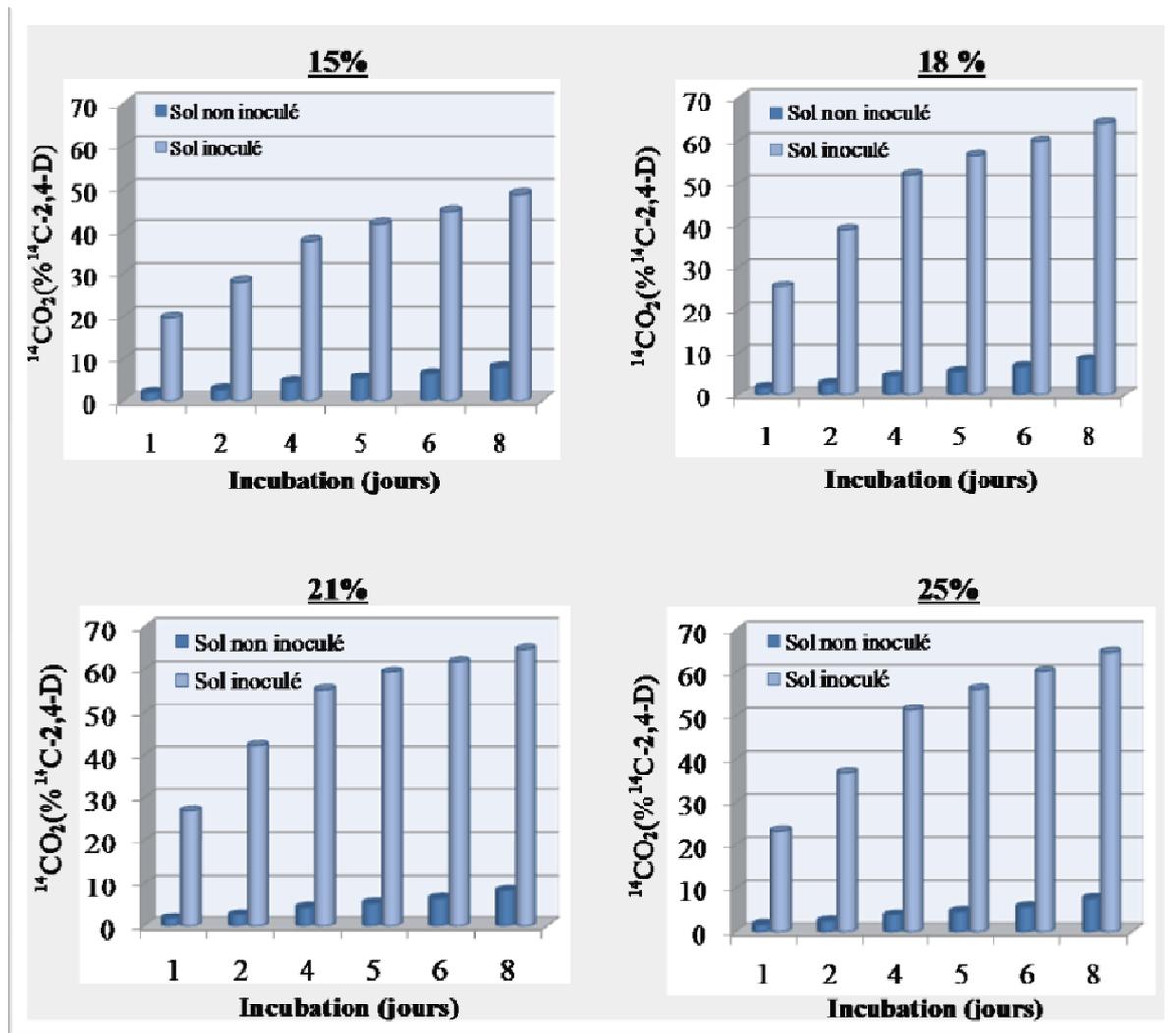


Figure III.C.4 : Test de bioaugmentation avec le sol 49MC « M'chira» et l'isolat 67 obtenu à partir du sol 45IB « Constantine »

CONCLUSION GENERALE

Le travail réalisé au cours de cette thèse s'inscrit dans le cadre général de la biotechnologie de l'environnement. Il a eu pour objectifs (i) la caractérisation de la capacité de biodégradation du 2,4-D dans des sols agricoles algériens, (ii) l'étude de l'impact de certains paramètres opératoires tels que la température et l'humidité du sol sur le processus de biodégradation, (iii) l'isolement et la caractérisation des bactéries responsables de la dégradation du 2,4-D à partir des sols prélevés dans la région Constantinoise, (iv) l'essai de bioaugmentation sur un sol agricole algérien à l'aide d'une souche locale, isolée à partir d'un autre sol adapté à la biodégradation du 2,4-D.

L'étude de l'influence des facteurs environnementaux et l'isolement des bactéries responsables de la dégradation du 2,4-D, ont été réalisés sur des sols agricoles, collectés en trois lieux différents de la région de Constantine (Est de l'Algérie) : Ibn Badis (El-Haria) (45IB), Boudjriou Messaoud (Ain Karma) (46BM), Ain Abid (47AA), présentant un historique de culture et de traitements phytosanitaires connus. Le test de bioaugmentation a été effectué sur un sol agricole, n'ayant subi aucun traitement préalable au 2,4-D, collecté à partir de la région de M'chira (Mechtat Elgabel), wilaya de Mila (49MC).

Le microbiote des trois sols arables Algériens avait réussi à s'adapter à la rapidité de minéralisation du 2,4-D, suite à l'exposition répétée à cet herbicide. Cependant, l'activité microbienne semble dépendre essentiellement des propriétés physico-chimiques intrinsèques des sols notamment la teneur en argile et MgO.

Les paramètres extrinsèques, liés au processus de biodégradation, tels que la température et l'humidité du sol affectent considérablement l'activité des micro-organismes dégradants le 2,4-D et peuvent également inhiber presque entièrement leurs capacités de biodégradation. Ces résultats sont de première importance dans notre région, où la température est élevée et les précipitations sont limitées. Ces conditions peuvent gravement nuire à la biodégradation des pesticides et augmenter ainsi leur persistance dans l'environnement.

Dans le but d'appréhender les mécanismes biologiques dans la biodégradation accélérée de cet herbicide, nous avons conduits des cultures microbiennes par enrichissement à partir de ces trois sols afin d'isoler des populations bactériennes dégradant le 2,4-D.

A partir de colonies pures obtenus, deux tests de dégradation du 2,4-D ont été réalisés, l'un sur le milieu solide de Loos (1975) modifié et l'autre dans le milieu Cardiff liquide. Dans le premier test, la dégradation du substrat est détectée par la coloration rouge du milieu, alors que le milieu Cardiff a nécessité une analyse chromatographique par HPLC. Suite à ces deux tests, 49 isolats ont été sélectionnés (populations bactériennes dégradant le 2,4-D).

De plus, ces différentes populations ont été caractérisées taxonomiquement par une analyse du polymorphisme de séquence de l'ADNr 16S de l'opéron ribosomique bactérien. Pour chaque groupe taxonomique identifié sur la base du profil de restriction, un clone a été séquencé. Les séquences de l'ADNr 16S obtenues ont été comparées à des bases de données.

Au-delà de la caractérisation des populations dégradant le 2,4-D isolées à partir des sols Algériens, la composition du potentiel génétique dégradant le 2,4-D a été analysée par PCR en ciblant les gènes *tfdA*, *B* et *C* codant les trois premières enzymes de la voie de dégradation du 2,4-D. La diversité des gènes *tfdA*, *B* et *C* a été étudiée par une analyse du polymorphisme de séquences révélée par une digestion enzymatique. Trois profils distincts ont été générés dont l'un est identique à celui qui représente les souches PLAE6 et ID9 isolées à partir du sol Cîteaux (France).

La compilation des résultats a permis d'identifier des populations bactériennes particulièrement bien adaptées à la biodégradation accélérée du 2,4-D et qui peuvent être utilisées dans les expérimentations de bioremédiation.

Afin de proposer des solutions permettant de limiter le temps de résistance des pesticides dans les sols étudiés, l'inoculation du sol 49MC par une population microbienne locale adaptée à la dégradation du 2,4-D (test de bioaugmentation) a conduit à une augmentation très significative du taux de dégradation de cet herbicide, même dans des conditions abiotiques défavorables (température élevée et humidité équivalente faible).

Ces travaux précurseurs ouvrent des perspectives intéressantes en termes de définition de pratiques culturales dans le contexte Méditerranéen.

RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES

En se basant sur les résultats obtenus dans ce travail, plusieurs recommandations et perspectives peuvent être suggérées :

- 1- Identification des métabolites de la biodégradation du 2,4-D dans les sols étudiés et élucidation du mécanisme réactionnel.
- 2- Etude de l'effet du 2,4-D et ses métabolites sur la faune et la flore.
- 3- Réalisation du même travail sur d'autres sols prélevés des différentes régions du territoire national : Est, Ouest, Centre et Sud.
- 4- Réalisation d'un travail similaire sur les nouveaux pesticides utilisés dans le domaine agricole.
- 5- Etude de la biodégradation des formulations commerciales du 2,4-D (amine et ester) et d'autres pesticides à usage intensif, dans le territoire national, par les souches locales, par exemple la souche 67.
- 6- Etude de la complémentarité de la photo et de la biodégradation du 2,4-D.
- 7- Optimisation des conditions de la biodégradation du 2,4-D dans les solutions aqueuses : Etude de l'effet du pH, de la température, de la dose du substrat...
- 8- Analyses qualitative et quantitative des pesticides dans les barrages et les nappes phréatiques qui constituent la source principale d'eau potable.
- 9- Enfin, la mise en place d'un système de détoxification naturelle des effluents phytosanitaires par la microflore du sol, notamment dans les fermes où les effluents proviennent du rinçage des pulvérisateurs utilisés pour les traitements des cultures (Système bio-bed).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelguerfi A. et A. Zeghida (2005).** Utilisation des engrais par culture en Algérie. Première édition, publiée par la FAO, Rome.
- Amy P. S; J. W. Schulke; L. M. Frazier and R. J. Seidler (1985).** Characterization of aquatic bacteria and cloning of genes specifying partial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 49, 5: 1237-1245.
- Arnheim N. and H. A. Erlich (1992).** Polymerase chain reaction strategy. *Annual Review of Biochemistry*, Vol. 61: 131-156.
- Arnold D. J. and G. G. Briggs (1990).** Fate of pesticides in soil: predictive and practical aspects. In «Environmental fate of pesticides». Edited by D. H. Hutson., and T. R. Roberts. John Wiley and Sons. Chichester. England : 100-122.
- Asma Aleem Abdul Malik (2005).** Genotoxicity of the Yamuna River water at Okhla (Delhi), India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61 : 404–412.
- Atagana H. I; R. J. Haynes and F. M. Wallis (2003).** Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation*. 14: 297-307.
- Audus L. J. (1952).** Fate of sodium 2,4-dichlorophenoxyethyl sulfate in the soil. *Nature* (London, United Kingdom), 170: 886-7.
- Bælum J; T. Henriksen; H. C. B. Hansen and C. S. Jacobsen (2006).** Degradation of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid in top- and subsoil is quantitatively linked to the class III *tfdA* gene. *Applied and Environmental Microbiology*: 1476–1486.
- Bailey D. R. (1969).** The effect of post-emergence herbicides on the vegetative and reproduction growth of *Centrosema Fubescens* Benth. *Queensland Weed Research*. Vol. 9. Issue 1: 9-19.
- Baraud L. T. D; J. J. Aaron; J. P. Quisefit and J. Pinart (2003).** A multi-residue method for characterization and determination of atmospheric pesticides measured at two french urban and rural sampling sites. *Anal Bioanal Chem.* 377(7-8): 1148-52.
- Bardgett R. D. (2005).** The biology of soil. *A Community and Ecosystem Approach*. Oxford University Press: 255 pages.
- Bedos C; P. Cellier; R. Calvet; E. Barriuso and B. Gabrielle (2002).** Mass transfer of pesticides into the atmosphere by volatilization from soils and plants: *Overview Agronomie*. 22: 21–33.
- Bending G. D; S. D. Lincoln; S. R. Sorensen; J. A. W. Morgan; J. Aamand and A. Walker (2003).** In-field spatial variability in the degradation of the phenyl-urea herbicide is the result of interactions between degradative *Sphingomonas* sp. and soil pH. *Appl Environ Microbiol*. 69: 827–834.

- Bhat M. A; M. Tsuda; K. Horhike; M. Nozaki; C. S. Vaidyanathan and T. Nakazawa (1994).** Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, No. 1: 307-312.
- Boivin A; S. Amellal; M. Schiavon and M. T. Van Genuchten (2005).** 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. *Environmental pollution*. 138(1): 92-9.
- Bolan N. S and S. Baskaran (1996).** Biodegradation of 2,4-D herbicide as affected by its adsorption-desorption behaviour and microbial activity of soils. *Australian Journal of Soil Research*. 34(6): 1041 – 1053.
- Bollag J. M; C. S. Helling and M. Alexander (1967).** Metabolism of 4-Chloro-2-methylphenoxyacetic acid by soil bacteria. *Applied Microbiology*: 1393–1398.
- Borneman J and E. Triplett (1997).** Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Applied Environmental Microbiology*. 63: 2647–2653.
- Bus J. S and L. E. Hammond (2007).** Regulatory progress, toxicology, and public concerns with 2,4-D: where do we stand after two decades?. *Crop Protection*. 26(3) : 266-269.
- Calvet R; E. Barriuso; C. Bedos; P. Benoit; M. P. Charnay and Y. Coquet (2005).** Les pesticides dans le sol. Conséquences agronomiques et environnementales. Editions France Agricole. France.
- Calvet R. (1980).** Adsorption-Desorption Phenomena. In **R.J.Hance (ed.)** Interactions between herbicides and the soil. *European Weed Research Society*, Academic Press. London: 1-30.
- Campanoni P. and P. Nick (2005).** Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology*. Vol. 137: 939-948.
- Catriona J. M; B. Gevao; C. J. Kevin and T. S. Kirk (2005).** Formation of non-extractable pesticide residues: observations on compound differences, measurement and regulatory issues. *Environmental pollution*. 133: 25-34.
- Cattaneo M. V; C. Masson; and C. W. Greer (1997).** The influence of moisture on microbial transport, survival and 2,4-D biodegradation with a genetically marked *Burkholderia cepacia* in unsaturated soil columns. *Biodegradation*. 8:87–96.
- Cavalca L; A. Hartmann; N. Rouard and G. Soulas (1999).** Diversity of *tfdC* genes: distribution and polymorphism among 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degrading soil bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*. 29:45–58.
- Charles J. M; D. M. Bond; T. K. Jeffries; B. L. Yano; W. T. Stott; K. A. Johnson; H. C. Cunny; R. D. Wilson AND J. S. Bus (1996).** Chronic dietary toxicity/oncogenicity studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rodents. *Fundamental and Applied Toxicology*. 33 : 166-172.

- Charnay M. P. et J. C. Fournier (1991).** Etude de la dégradation de quelques carbamates pesticides par des souches microbiennes isolées du sol. 21. *congrès du groupe français des pesticides*. 22-23 Mai. Nancy-Brabois (FRA).
- Chaudhry G. R. and G. H. Huang (1988).** Isolation and characterization of a new plasmid from a flavobacterium sp. Which carries the genes for degradation of 2,4 dichlorophenoxyacetate. *Journal of Bacteriology*. Vol. 170: 3897-3902.
- Chaudhry G. R. and S. Chapalamadugu (1991).** Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiological Reviews*. Vol. 55 (1): 59-79.
- Chen W. et A. Mulchandani (1999).** La détoxification des pesticides. *Biofutur*. 187. Mars: 41-43.
- Christian M; W. B. Hannah; H. Lüthen and A. M. Jones (2008).** Identification of auxins by a chemical genomics approach. *Journal of Experimental Botany*. 59(10): 2757-2767.
- Coats J. R. (1990).** Pesticide degradation mechanisms and environmental activation. In « Pesticides transformation products. Fate and significance in the environment». Edited by Somasundaram L., and J. R. Coats. ACS, Washington: 11-30.
- Coenye T; M. Vancanneyt; M. C. Cnockaert; E. Falsen; J. Swings and P. Vandamme (2003).** *Kerstersia gyiorum* gen. nov., sp. nov., a novel *Alcaligenes faecalis*-like organism isolated from human clinical samples, and reclassification of *Alcaligenes denitrificans* Ruiger and Tan 1983 as *Achromobacter denitrificans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53: 1825-1831.
- Coenye T; T. Spilker; R. Reik; P. Vandamme and J. J. LiPuma (2005).** Use of PCR analyses to define the distribution of *Ralstonia* species recovered from patients with cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 43 (7): 3463-3466.
- Coleman D. C; D. A. Crossley and Jr. Paul F. Hendrix (2004).** Fundamentals of soil ecology. 2nd ed. *Elsevier's Science & Technology*. Oxford, UK.
- Crespin M. A; M. Gallego; M. Valcarcel and J. L. Gonzalez (2001).** Study of the degradation of the herbicides 2,4-D and MCPA at different depths in contaminated agricultural soil. *Environ Sci Technol*. Vol. 35 (21): 4265-70.
- Crosby D. G (1964).** Metabolites of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in bean plants. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 12 (1): 3-6.
- Davis J. W and S. Madsen (1996).** Factors affecting the biodegradation of toluene in soil. *Chemosphere*. Vol. 33 (1): 107-130.
- Degrange V. and R. Bardin (1995).** Detection and counting *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2093-2098.
- Dejonghe W; J. Goris; S. El Fantroussi; M. Hofte; De Vos. W. Verstraete and Eva M Top (2000).** Effect of dissemination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) degradation plasmids on 2,4-D degradation and on bacterial community structure in

two different soil horizons. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 66 (8): 3297–3304.

Dictor M. C. et G. Soulas (1992) - Activité Microbienne dans le sol et le sous-sol. In «Pesticides et environnement». *GFP, XXII CONGRES*. Dijon. France: 228-229.

DiGiovanni G. D; J. W. Neilson; I. L. Perrer and N. A. Sinclair (1996). gene transfer of *Alcaligenes eutrophus* JMP134 plasmid pJP4 to indigenous soil recipients. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62 (7): 2521-2526.

Ditzelmüller G; M. Loidl and F. Streichsbier (1989). Isolation and characterization of a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading soil bacterium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 31 (1): 93-96.

Djebbar K. et T. Sehili (1999). Kinetics of heterogeneous photocatalytic decomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid over titanium dioxide and zinc oxide in aqueous solution. *Pest Management Science*. Vol. 54 Issue 3 : 269-276.

Doggett N. A. (1992) - The polymerase chain reaction and sequence-tagged sites. *Los Alamos Science*. Number 20: 128-134.

Dommergues Y. and F. Mangenot (1970). Ecologie microbienne du sol. Masson et C^{ie}. Paris. Imprimé en Belgique.

Don R. H. and J. M. Pemberton (1981). Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 145: 681-686.

Don R. H. and J. M. Pemberton (1985). Genetic and physical map of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pJP4. *Journal of Bacteriology*. Vol. 161 (1): 466-468.

Don R. H., A. J. Weightman., H. J. Knackmuss., and K. N. Timmis (1985). Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJP4). *Journal of Bacteriology*. Vol. 161 (1): 85-90.

EL Fantroussi S; Mahillon J; H. Naveau and S. N. Agathos (1997) - Introduction of anaerobic dechlorinating bacteria into soil slurry microcosms and nested-pcr monitoring. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63 (2): 806-811.

El Sebai T; B. Lagacherie ; G. Soulas and F. Martin-Laurent (2006). Spatial variability of isoproturon mineralizing activity within an agricultural field: Geostatistical analysis of simple physicochemical and microbiological soil parameters. *Env Microbiol* 145: 680-690.

- El Sebai T; M. Divers; B. Lagacherie; N. Rouard; G. Soulas and F. Martin-Laurent (2010).** Diuron mineralisation in a mediterranean vineyard soil: impact of moisture content and temperature. *Pest Management Science*, Articles online in advance of print. Published Online: 3 Jun 2010.
- Estrella M. Rocio; M. L. Brusseau; Robert S. Maier; Ian L. Pepper; Peter J. Wierenga and Raina M. Miller (1993).** Biodegradation, sorption, and transport of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in saturated and unsaturated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59 (12): 4266-4273.
- Euzéby J. P. (2006).** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. SBSV. Société de bactériologie systématique et vétérinaire, Blagnac. France.
- Evans W. C; B. S. W. Smith; H. N. Fernley and J. I. Davies (1971).** Bacterial metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Biochem. J.* 122: 543-551.
- Fang S. C. and J. S. Butts (1953).** Studies in plant metabolism III. Absorption, translocation, and metabolism of radioactive 2,4-D in corn and wheat plants. *Plant Physiology* : 56-60.
- Farenhorst A; D. Muc; C. Monreal and I. Florinski (2001).** Sorption of herbicides in relation to soil variability and landscape position. *J Environ Sci Health B*. Jul. 36(4): 379-87.
- Fiche technique toxicologique No 208. Edition (1987).** 2,4-D, ses sels et esters. INRS. France.
- Filer K. and A. R. Harker (1997).** Identification of the inducing agent of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pathway encoded by plasmid pJP4. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63 (1): 317-320.
- Fogarty A. M. and O. H. Tuovinen (1991).** Microbiological Degradation of Pesticides in Yard Waste Composting. *Microbiological Reviews*. Vol. 55 (2): 225-233.
- Foreman W. T., M. S. Majewski; D. A. Goolsby; F. W. Wiebe and R. H. Coupe (2000).** Pesticides in the atmosphere of the mississippi river valley, part II--air. *Sci Total Environ.* 248 (2-3): 213-26.
- Foster R. K. and R. B. McKercher (1973).** Laboratory incubation studies of chlorophenoxy acetic acids in chernozemic soils. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 5: 333-337.
- Friedrich B; M. Meyer and H. Schlegel. (1983).** Transfer and expression of the herbicide-degrading plasmid pJP4 in aerobic autotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* 134: 92-97.
- Fukumori F. and I. R. P. Hausinger (1993).** Alcaligenes eutrophus JMP134 "2,4-dichlorophenoxyacetate monooxygenase" Is an a-ketoglutarate-dependent dioxygenase. *Journal of Bacteriology*. Vol. 175 (7): 2083-2086.
- Fulthorpe R. R; C. McGowan; O. V. Maltseva; W. E. Holben and J. M. Tiedje (1995).** 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria contain mosaics of catabolic genes. *Applied Environmental Microbiol.* 61: 3274-3281.

- Fulthorpe R., A. N. Rhodes and J. M. Tiedje (1996).** Pristine soils mineralize 3 chlorobenzoate and 2,4-dichlorophenoxyacetate via different microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*. Apr. Vol. 62 (4): 1159-1166.
- Galiulin R. V; V. N. Bashkin and R. R. Galiulina (2001).** Behaviour of 2,4-D herbicide in coastal area of Oka river, Russia. *Water, air and soil pollution*. Vol. 129 (1-4): 1-12.
- Gan J. and S. Bondarenko (1996)** - Determination of Pesticides in Water. In « Analysis of pesticides in food and environmental samples / editor, Jose L. Tadeo. Printed in the United States of America. Taylor & Francis Group, LLC, pp: 232-256.
- Garcia-Valcarcel A. I. and J. L. Tadeo (1999).** Influence of soil moisture on sorption and degradation of hexazinone and simazine in soil. *J Agric Food Chem*. 47(9): 3895-900.
- Garrity G. M; J. A. Bell and T. G. Lilburn (2004).** Bergey's manual_of systematic bacteriology, *Second Edition. Taxonomic Outline of the Prokariotes*. Release 5.0. Printed in the United States of America. Pages : 399.
- Garrity G. M. (2005).** Bergey's manual_of systematic bacteriology, *Second Edition*. Volume Two. *The Proteobacteria, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Printed in the United States of America. Pages : 1388.
- Gauvrit C. (1996).** Efficacité et sélectivité des herbicides. Editions Quae, INRA. PARIS, pages : 168.
- Gavrilescu M. (2005).** Fate of pesticides in the environment and bioremediation. *Engineering in life sciences*. 5 (6): 497-526.
- Gil Y. and C. Sinfort (2005)** - Emission of pesticides to the air during sprayer application: A bibliographic review. *Atmospheric Environment*. 39: 5183-5193.
- Göbel M; Kerstin Kassel-Cati; Eberhard Schmidt and Walter Reineke (2002).** Degradation of Aromatics and Chloroaromatics by *Pseudomonas* sp. Strain B13: Cloning, Characterization, and Analysis of Sequences Encoding 3-Oxoadipate:Succinyl-Coenzyme A (CoA) Transferase and 3-Oxoadipyl-CoA Thiolase. *Journal of Bacteriology*. Vol. 184 (1): 216-223.
- Gonod L. V; F. Martin-Laurent; and C. Chenu (2006).** 2,4-D impact on bacterial communities, and the activity and genetic potential of 2,4-D degrading communities in soil. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol 58 (3): 529-537.
- Goris J. (2003).** Characterisation of Metal-Resistant and Chloroaromatics-Degrading Bacteria. Thèse présentée pour obtenir le degré de Docteur ès sciences en biotechnologie. Faculté des sciences. Département de biochimie, physiologie et de la microbiologie. Laboratoire de Microbiologie. Université de Gand. 200 pages.
- Greaves M. P and H. P. Malkomes (1980).** Effects on Soil Microflora. In **R.J.Hance (ed.)** Interactions between herbicides and the soil, *European Weed Research Society*, Academic Press. London. pp: 223-253.

- Grebil G ; S. Novak ; C. Perrin-ganier et M. Schiavon (2001).** La dissipation des produits phytosanitaires appliqués au sol = Dissipation of soil applied pesticides. *Congrès du Groupe français des pesticides*. N°31. Lyon , France.
- Greer C. W; J. Hawari and R. Samson (1990).** Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. *Arch Microbiol.* 154 (4): 317–322.
- Greer L. E. and D. R. Shelton (1992).** Effect of Inoculant Strain and Organic Matter Content on Kinetics of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradation in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 58 (5): 1459-1465.
- Greer L. E; J. A. Robinson and D. R. Shelton (1992).** Kinetic comparison of seven strains of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 58 (3): 1027–1030.
- Grover R; L. A. Kerr; K. Wallace; K. Yoshida and J. Maybank (1976).** Residues of 2, 4-D in air samples from Saskatchewan: 1966-1975. *J Environ Sci Health B.* 11 (4): 331-47.
- Grunenwald H. (2003).** Optimization of polymérase chain reactions. In “Methods in molecular biology” Volume 226: PCR Protocols. Second edition. Edited by J. M. S. Bartlett and D. Stirling. Humana press: 89-100.
- Guiraud J. P. (1993).** Génétique Microbienne. Bases théoriques et introduction aux applications pratiques. *Technique et Documentations – Lavoisier*. Paris - France.
- Gürtler V. and V. A. Stainisich (1996).** New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiology*. 142: 3-16.
- Hall J. C. and C. J. Swanton (1988).** Selectivity of 2.4-D in solanum ptycanthum dun. and lycopersicon esulentum Mill. *Weed Research*. 28 (2): 117-126.
- Hamilton R. H; J. Hurter; J. K. Hall and C. D. Ercegovich (1971).** Metabolism of Phenoxyacetic Acids. Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by bean plants. *J. Agr. Food Chem.* Vol. 19 (3): 480-483.
- Harker A. R; R. H. Olsen and R. J. Seidler (1989).** Phenoxyacetic acid degradation by the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (TFD) pathway of plasmid pJP4: mapping and characterization of the TFD regulatory gene, tfdR. *J. Bacteriol.* 171: 314–320.
- Haugland R. A; D. J. Schlemm; R. P. Lyons; P. R. Sferra and A. M. Chakrabarty (1990).** Degradation of the chlorinated phenoxyacetate herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by pure and mixed bacterial cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 56 (5): 1357-1362.
- Hemmett R. B. and S. D. Faust (1969).** Biodegradation kinetics of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by aquatic microorganisms. *Residue Rev.* 29: 191-207.
- Heyndrickx M; L. Vauterin; P. Vandamme; K. Kersters and P. De Vos (1996).** Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J Microbiol Meth.* 26: 247-259.

- Hogan D. A; Buckley D. H; Nakatsu C. H; Schmidt T. M and R. P. Hausinger (1997).** Distribution of the *tfdA* Gene in soil bacteria that do not degrade 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). *Microbial Ecology*. 34: 90-96.
- Hu H-Y; K. Fujie; H. Nakagome; K. Urano and A. Katayama (1999).** Quantitative analyses of the change in microbial diversity in a bioreactor for wastewater treatment based on respiratory quinines. *Wat. Res.* Vol. 33 (15): 3263-3270.
- Huang P. M (2008).** Soil physical-chemical-biological interfacial interactions: an overview. In «Soil mineral-microbe-organic interactions. Theories and applications». Edited by Dr. Qiaoyun Huang ; Dr. Pan Ming Huang and Dr. Antonio Violante. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 3-38.
- Hugh G. Griffin and Annette M. Griffin (1993).** DNA Sequencing. In «Methods in molecular biology», Vol. 23. DNA sequencing protocols. Edited by. H. and A. Griffin. Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp: 1-8.
- Huong N. L; K. Itoh and K. Suyama (2007).** Devrsity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)-degrading bacteria in Vietnamese soils. *Microbes Envoron.* Vol 22 (3): 243-256.
- Hurle K. and A. Walker (1980).** Persistence and its Prediction. In «Interactions between herbicides and the soil» Edited by R. J. Hance. *European Weed Research Society*, Academic Press. London, pp: 83-122.
- Ian Harrison; U. Rachel Leader; Jenny J.W. Higgs and M. Williams Geoffrey (1998).** A study of the degradation of phenoxyacid herbicides at different sites in a limestone aquifer. *Chemosphere*, Vol. 36 (6): 1211-1232.
- Index des produits phytosanitaires à usage agricole (1999).** Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques. Ministère de l’agriculture et du développement rural. Algérie.
- Index des produits phytosanitaires à usage agricole (2005).** Direction de la protection des végétaux et des contrôles techniques. Ministère de l’agriculture et du développement rural. Algérie.
- Ka. J. O; W. E. Holben and J. M. Tiedje (1994).** Genetic and phenotypic diversity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid degrading bacteria isolated from 2,4-d-treated field soils. *Applied Environmental Microbiology*. Vol. 60 (4): 1106-1115.
- Kamagata Y; R. R. Fulthorpe; K. Tamura; H. Takami; L. J. Forney And J. M. Tiedje (1997).** Pristine environments harbor a new group of oligotrophic 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 63 (6): 2266-2272.
- Kearney P. C. and S. T. Kellogg (1985).** Microbial adaptation to pesticides. *Pure & App. Chem.* Vol. 57 (2): 389-403.
- Khoury R ; C. M. Coste and N. S. Kawar (2006).** Degradation of metribuzin in two soil types of Lebanon. *J Environ Sci Health B*. 41(6): 795-806.

- Kinkle B. K; A. J. Sadowsky; E. L. Schmidt and W. C. Koskinen (1993).** Plasmids pJP4 and r68.45 can be transferred between populations of bradyrhizobia in nonsterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1762-1766.
- Kitagawa W; S. Takami; K. Miyauchi; E. Masai; Y. Kamagata; J. M. Tiedje and M. Fukuda (2002).** Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. Strain HW13 isolated from a pristine environment. *Journal of bacteriology.* Vol. 184 (2): 509-518.
- Kukor J. J; R. H. Olsen and J. S. Siak (1989).** Recruitment of a chromosomally encoded maleylacetate reductase for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by plasmid pJP4. *J Bacteriol.* 171(6): 3385-3390.
- Kunc F. and J. Rybářová (1984).** Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil previously enriched with organic substrates. *Folia Microbiol.* 29: 156-161.
- Kunc F; J. Rybářová and J. Lasik (1984).** Mineralization of 2,4-dichlorophénoxyacétique acid in soil simultaneously enriched with saccharides. *Folia Microbiologica.* 29: 148-155.
- Laguerre G; M. Allard; F. Revoy and Amarger N. (1994).** Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-Amplified 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology.* Vol. 60 (1) : 56-63.
- Lamoril J; N. Ameziane ; J-C. Deybach ; P. Bouizegarène and M. Bogard (2008).** Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* Volume 23, Issue 5 : 260-279.
- Larson S. J; Paul D. Capel and Michael S. Majewski (1998).** Pesticides in Surface Waters. Distribution, Trends, and Governing Factors. Volume Three of the Series Pesticides in the Hydrologic System. Edited by Robert J. Gilliom, Series , Ann Arbor Press, Inc. Chelsea, Michigan: 287 pages.
- Lee T.H; S. Kurata; C.H. Nakatsu and Y. Kamagata (2005).** Molecular Analysis of Bacterial community based on 16s rDNA and functional genes in activated sludge enriched with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) under different cultural conditions. *Microbial Ecology.* Volume 49: 151-162.
- Leguay J.J. and J. Guern (1977).** Quantitative Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on growth of suspension-cultured acer pseudoplatanus cells. II. Influence of 2,4-D metabolism and intracellular pH on the control of cell division by intracellular 2,4-D concentration. *Plant Physiol.* 60: 265-270.
- Leisrta M. (1980).** Transport in solution. In «Interactions between herbicides and the soil» Edited by R. J. Hance. *European weed research society.* Academic Press. London, pp: 31-58.
- Leveau J. H. J and J. R. van der Meer (1996).** The tfdR gene product can successfully take over the role of the insertion element-inactivated *tfdt* protein as a transcriptional activator of the tfdCDEF gene cluster, which encodes chlorocatechol degradation in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). *J Bacteriol.* 178: 6824-6832.

- Leveau Johan H. J; Franziska KoÈ nig; Hanspeter FuÈ chslin; Christoph Werlen and Jan Roelof van der Meer (1999).** Dynamics of multigene expression during catabolic adaptation of *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Molecular microbiology*. 33(2): 396-406.
- Lévesque M. J ; S. Boissière ; J. C. Thomas; R. Beaudet ; R. Villemum and S. Boissière (1997).** Rapid method for detecting *Desulfitobacterium frappieri* strain PCP-1 in soil by the polymerase chain reaction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Volume 47 (6): 719-725.
- Levy W; V. Radl; B. Ruth; M. Schmid; J. C. Munch and R. Schroll (2007).** Harsh summer conditions caused structural and specific functional changes of microbial communities in an Arable soil. *European journal of soil science*. 58: 736-745.
- Lindberg E. (2007).** Detection and quantification of subsurface pesticide degrading microbial populations. PhD thesis. Institute of Environment & Resources. Technical University of Denmark.
- Linde C. D. (1994).** Physico-chemical properties and environmental fate of pesticides. *Environmental protection agency*. California.
- Li-Tse O. U; D. F. Rothwell; W. B. Weeler and J. M. Davidson (1978).** The effect of high 2,4-D concentration on degradation and carbon dioxide evolution in soils. *J. Environ. Qual.* Vol. 7 (2): 241-246.
- Liu L; Tom Coenye; Jane L. Burns; Paul W. Whitby; Terrence L. Stull and John J. LiPuma (2002).** Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 40 (4): 1210-1213.
- Lloyed C. W; S. B. Lowe and G. W. Peace (1980).** The mode of action of 2,4-D in counteracting the elongation of carrot cells grown in culture. *J. CM Set.* 45: 257-268.
- Loos M. A. (1969).** Phenoxyalkanoic acids. In «Degradation of herbicides» Edited by Marel Dekker and D. D. Kaufman. New York, pp: 1- 49.
- MacRae I. C. and M. Alexander (1965).** Microbial degradation of selected herbicides in soil. *J. Agric. Food Chem.* 13: 72-76.
- Macur R. E; J. T. Wheeler; M. D. Burr and W. P. Inskip (2007).** Impact of application on soil microbial community structure and on populations associated with 2,4-D degradation. *Microbiological Research*. 162: 37-45.
- Madigan M. T. and Martinko J. M. (2007).** Brock biologie des microorganismes. traduction française, de «brock biology of microorganisms» 11th edition, dirigée par Daniel Prieur, université de Bretagne Occidentale. Publié par Pearson Education France: 1047 pages.
- Manzano M; Ana C. Morán ; Bruno Tesser and Bernardo González (2007).** Role of eukaryotic microbiota in soil survival and catabolic performance of the 2,4-D

herbicide degrading bacteria *Cupriavidus necator* JMP134. *Antonie van leeuwenhoek*. Vol. 91 (2) : 115-126.

Mardis E. R. (2008). An overview of new dna sequencing technology. In «Genome sequencing technologand algorithms». Edited by Sun Kim; Haixu Tang and Elaine R. Mardis. Artech house. INC. LONDON, pp: 3-14.

Marliere F. (2000). Mesure des pesticides dans l'atmosphère. INERIS DRC-00-23449-AIRE -569a-CDu-FMr.

Martin-Laurent F ; L. Philippot; S. Hallet; R. Chaussod; J. C. Germon; G. Soulas and G. Catroux (2001). DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 67, No. 5, pp: 2354-2359.

Marrón-Montiel E; N. Ruiz-Ordaz; C. Rubio-Granados; C. Juárez-Ramírez and C.J. Galíndez-Mayer (2006). 2,4-D-degrading bacterial consortium: Isolation, kinetic characterization in batch and continuous culture and application for bioaugmenting an activated sludge microbial community. *Process biochemistry*. Volume 41, Issue 7 : 1521-1528.

McCalla J. H, Jr; Richardson M. D; Karcher D. E. and J. W. Boyd (2004). Tolerance of seedling bermudagrass to postemergence herbicides. *Crop science society of America*. 44: 1330-1336.

Men A. E; Peter Wilson; Kirby Siemering and Susan Forrest (2008). Sanger DNA Sequencing. In «Next-generation genome sequencing: Towards personalized medicine». Edited by Michal Janitz Copyright _ 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp: 3-12.

Merini Luciano Jose; Virginia Cuadrado and Ana María Giulietti (2008). Spiking solvent, humidity and their impact on 2,4-D and 2,4-DCP extractability from high humic matter content soils. *Chemosphere*. Volume 71, Issue 11: 2168-2172.

Meyer A; J. Delana et H. Leclerc (1984). Cours de microbiologie générale. Doin éditeurs – Paris. France: 307 pages.

Miyajima M; M.Matsuda; S. Haga; S. Kagawa; B. C. Millar and J. E. Moore (2002). Cloning and sequencing of 16S rDNA and 16S-23S rDNA internal spacer region (ISR) from urease-positive thermophilic *Campylobacter* (UPTC). *Letters in applied microbiology*. 34: 287-289.

Moyer C. L; F. C. Dobbs and D. M. Karl (1994). Estimation of diversity and community structure through restriction fragment length polymorphism distribution analysis of bacterial 16S rRNA genes from a microbial mat at an active, Hydrothermal Vent System, Loihi Seamount, Hawaiiit. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 60 (3): 871-879.

Mullis K. B; F. A. Faloona; S. Scharf; R. K. Saiki; G. Horn; H. A. Erlich (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*.

- NEYRA M; KHBAYA B; LAJUDIE PHILIPPE DE; DREYFUS BERNARD and NORMAND P. (1998).** Computer-assisted selection of restriction enzymes for rrs genes PCR-RFLP discrimination of rhizobial species. *In* : Colloque BRG/USTL «Méthodologies de gestion et de conservation des ressources génétiques = methodologies of genetic resources management and conservation». *Genetics Selection Evolution*. 30 (suppl. 1): 297-309.
- Nishioka M. G; Robert G. Lewis; Marielle C. Brinkman; Hazel M. Burkholder; Charles E. Hines and John R. Menkedick (2001).** Distribution of 2,4-d in air and on surfaces inside residences after lawn applications: Comparing exposure estimates from various media for young children. *Environmental health perspectives*. Vol. 109 (11): 1185-1191.
- Norris L. and Greiner (1967).** The Degradation of 2,4-d in forest litter. *Bulletin of environmental contamination & toxicology*. Vol. 2 (2): 65-74.
- Nunnally Brian K. (2005).** Analytical techniques in DNA sequencing. Taylor & Francis Group, LLC. Printed in the United States of America: 237 pages.
- Ok Han S. and New P. B (1994).** Effect of water availability on degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-d) by soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 26, Issue 12 : 1689-1697.
- Okeke B. C; J. E. Smith; A. Paterson and I. A. Watson-Craik (1996).** Influence of Environmental parameters on pentachlorophenol biotransformation in soil by *lentinula edodes* and *phenerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 45: 263-266.
- OMS. Genève (1970).** Evaluations of some pesticides residues in food.
- OMS. Genève (1984).** 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). (<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc29.htm>).
- OMS. (2003).** 2,4-D in drinking-water. background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. prepared by Dr P. Toft, Canada.
- Pampulha M.E. and A.Oliveira (2006).** Impact of an herbicide combination of bromoxynil and prosulfuron on soil microorganisms. *Current Microbiology*. Vol 53: 238-243.
- Pampulha M. E; M. A. S. S. Ferreira and A. Oliveira (2007).** Effects of a phosphinothricin based herbicide on selected groups of soil microorganisms. *Journal of Basic Microbiology*. Vol. 47 Issue 4 : 325-331.
- Parker L. W. and K. G. Doxtader (1982).** Kinetics of Microbial Decomposition of 2,4-D in soil: Effects of herbicide concentration. *J. Environ. Qua.* Vol. 11 (4): 679-684.
- Parker L. W. and K. G. Doxtader (1983).** Kinetics of microbial decomposition of 2,4-d in soil: Effect of temperature and moisture. *J. Environ. Qua.* Vol. 12: 553-558.
- Pattanasupong A; H. Nagase; E. Sugomoto; Y. Hori; K. Hirata; K. Tani; M. Nasu and K. Miyamoto (2004).** Degradation of Carbendazim and 2,4-Dichlorophenoxyacetic

acid by immobilized consortium on Loofa Sponge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. Vol. 98 (1): 28-33.

Pelmont J. (2005). Biodégradation et Métabolismes. Les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences. Grenoble. France.

Pemberton J. M and P. R. Fisher (1977). 2,4-D plasmids and persistence. *Nature* (London) 268: 732-733.

Pepper I. L; T. J. Gentry; D. T. Newby; T. M. Roane and K. L. Josephson (2002). The role of cell bioaugmentation and gene bioaugmentation in the remediation of co-contaminated soils. *Environmental health perspectives*. Vol. 110 (supplement 6): 943-946.

Pérez-Pantoja D; Rodrigo De la Iglesia; Dietmar H. Pieper and Bernardo González (2008). Metabolic reconstruction of aromatic compounds degradation from the genome of the amazing pollutant-degrading bacterium *Cupriavidus necator* JMP134. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 32, Issue 5: 736-794.

Perry J. J; J. T. Staley et S. Lory (2004). Microbiologie (cours et questions de révision). L'édition originale publiée aux états unis par Sinauer, Associates, Inc. Sous le titre « Microbiology life 2002 ». Dunod, Paris, 2004 pour la traduction française.

Picton P. et A. Farenhorst (2004). Factors influencing 2,4-D sorption and mineralization in soil. *J Environ Sci Health B*. 39 (3): 367-79.

Pieper D.H; W. Reineke; K. H. Engesser and H. J. Knackmuss (1988). Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *Arch Microbiol*. 150: 95-102.

Plumeier I; D. Pérez-Pantoja; S. Heim; B. Gonzalez and D. H. Pieper (2002). Importance of different *tfd* genes for degradation of chloroaromatics by *Ralstonia eutropha* JMP134. *Journal of Bacteriology*, pp: 4054-4064.

Qiu X; T. Zhu ; F. Wang and J. Hu (2008). Air-water gas exchange of organochlorine pesticides in Taihu Lake, China. *Environ Sci Technol*. 42(6): 1928-32.

Racke K. D; M. W. Skidmore; D. J. Hamilton; J. B. Unsworth; J. Miyamoto and S. Z. Cohen (1997). Pesticide fate in tropical soils (Technical report). *Pure & App. Chem*. Vol. 69 (6): 1349-1371.

Ranjard L; F. Poly; J. Combrisson; A. Richaume; F. Gourbiere; J. Thioulouse and S. Nazaret (2000). Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). *Microb Ecol*. 39: 263-272.

Reuter S; M. Ilim; J. C. Munch; F. Andreux and I. Scheunert (1999). A model for the formation and degradation of bound residues of the herbicide ¹⁴C-isoproturon in soil. *Chemosphere*. Vol. 39 (4): 627- 639.

- Richaume A ; A. Pourcelot ; R. Rama et S. Nazaret (2006).** Évaluation des modifications quantitatives, qualitatives et fonctionnelles induites par la conservation de consortiums bactériens extraits de sols. *Les Actes du BRG*. 6: 371-389.
- Richter O ; B. Diekkriiger and P. Nortersheuser (1996).** Environmental fate modelling of pesticides. *From the laboratory to the field scale*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany: 288 Pages.
- Robertson B. K. and M. Alexander (1994).** Growth-linked and cometabolic biodegradation: Possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide biodegradation. *Pesticide Science*. Vol. 41 (4): 311-318.
- Rodriguez-Rubio P ; E. Morillo and C. Maqueda (2006).** Sorption of 2,4-d on natural and organic amended soils of different characteristics. *J Environ Sci Health B*. 41 (2): 145-57.
- Rosseaux S; A. Hartmann and G. Soulas (2001).** Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*. 36: 211-222.
- Sacchi Claudio T; Anne M. Whitney; Leonard W. Mayer; Roger Morey; Arnold Steigerwalt; Arijana Boras; Robin S. Weyant and Tanja Popovic (2002).** Sequencing of 16S rRNA Gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases*. Vol. 8 (10) : 1117-1123.
- Samuel O; L. St-Laurent; B. Gingras and M. Valcke (2006).** Profil toxicologique du 2,4-D et risque à la santé associée à l'utilisation de l'herbicide en milieu urbain. *Groupe scientifique sur les pesticides*. Institut national de santé publique. Québec: 54 pages.
- Sánchez-Brunete C; B. Albero and J. L. Tadeo (1996).** Determination of Pesticides in Soil. In « Analysis of pesticides in food and environmental samples». Edited by Jose L. Tadeo. Printed in the United States of America. Taylor & Francis Group, LLC, pp: 208-231.
- Sardans J. and J. Penuelas (2005).** Drought decreases soil enzyme activity in a Mediterranean Quercus ilex L. forest. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 455-461.
- Schmalenberger A; F. Schwieger and C. C. Tebbe (2001).** Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67 (8): 3557-3563.
- Seibert K; F. Fuhr and W. Mittelstaedt (1982)** – Experiments on the influence of roots and soils on 2,4-D degradation. *Landwirtsch.Frosch*. 35 (1-2): 5-13.
- Seibert V; Monika Thiel and Isabelle-S. Hinner (2004).** Characterization of a gene cluster encoding the maleylacetate reductase from *Ralstonia eutropha* 335T, an enzyme recruited for growth with 4-fluorobenzoate. *Microbiology*. 150: 463–472.
- Sethunathan N; T. K. Adhya; S. Barik and M. Sharmila (1991).** Degradation products of commonly used insecticides in indian soils degradation and signification. In «

Pesticides transformation products: Fate and signification in environment». Edited by L. Somasundaram and Joel R. Coats. Developed From a Symposium Sponsored by the Division of Agrochemicals at the 200th National Meeting of the American Chemical Society, Washington: 43-60.

Shelton D. R. and Timothy B. Parkin (1991). Effect of moisture on sorption and biodegradation of carbofuran in soil. *J. Agric. Food Chem.* 39 (11): 2063-2068.

Shymko Janna L. and Annemieke Farenhorst (2008). 2,4-D mineralization in unsaturated and near-saturated surface soils of an undulating, cultivated Canadian prairie landscape. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*, Vol. 43, Issue 1: 34-43.

Singh B. K; Allan Walker; J. Alun W. Morgan and Denis J. Wright (2004). Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70 (8): 4855-4863.

Smith Allan E. and Andrew J. Aubin (1991). Metabolites of [¹⁴C]-2,4 dichlorophenoxyacetic acid in saskatchewan soils. *J. Agric. Food Chem.* 39: 2019-2021.

Smith Allan E; Knud Mortensen; Andrew J. Aubin and Margaret M. Molloy (1994). Degradation of MCPA, 2,4-D, and other phenoxyalkanoic acid herbicides using an isolated soil bacterium. *J. Agric. Food Chem.* 42 (2): 401-405.

Soulas G; P. Codaccioni and J. C. Fournier (1983). Effect of cross-treatment of the subsequent breakdown of 2,4-D, MCPA and 2,4,5-T in the soil. Behaviour of the degrading microbial populations. *Chemosphere*. Vol. 12 (7/8): 1101-1106.

Soulas G. et J. C. Fournier (1987). Cinétiques comparées des dégradations dans le sol du 2,4-D et du 2,4-dichlorophénol seuls ou en mélange. Conséquences sur le comportement des biomasses dégradantes correspondantes. *Agronomie*. 7 (3) : 193-199.

Soulas G. (1991). La biodégradation des pesticides dans le sol. XXI Congrès du GFP, 22-23 mai 1991, Nancy : 120-137.

Soulas G. (1993). Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial community responsible for 2,4-D mineralization in soil. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 25 (4): 443-449.

Sowerby A; B. Emmett; C. Beier; A. Tietema; J. Penuelas and M. Estiarte (2005). Microbial community changes in heathland soil communities along a geographical gradient: interaction with climate change manipulations. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 1805-1813.

Stenson T. I. and N. Walker (1956). Observations on the bacterial oxidation of chlorophenoxy acetics acids. *Plant and Soil*. VIII(1): 17-31.

- Stenson T. I. and N. Walker (1957).** The pathway of breakdown of 2,4-dichloro- and 4-chloro-2-methyl-phenoxyacetic acid by bacteria. *J. gen. Microbiol.* 16: 146-155.
- Stephens K. D; A. Farenhorst and G. Les Fuller (2002).** Effect of soil sterilization by mercuric chloride on herbicide sorption by soil. *J Environ Sci Health B.* 37 (6): 561-71.
- Su K. (1980).** Determining the role of human substances in the fate of pesticides in the environment. *J Environ Sci Health B.* 15 (6): 1071-90.
- Tadeo José L; C. Sánchez-Brunete and L. González (2008).** Pesticides: Classification and properties. In « Analysis of pesticides in food and environmental samples». Edited by Jose L. Tadeo. Printed in the United States of America. Taylor & Francis Group, LLC: 1-30.
- Tyler J. E. and R. K. Finn (1974).** Growth rates of a pseudomonad on 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenol. *Applied Microbiology.* Vol 28 (2): 181-184.
- Thies J. E. (2008).** Molecular Methods for Studying Microbial Ecology in the Soil and Rhizosphere. In «Molecular mechanisms of plant and microbe coexistence». *Soil Biology.* Volume 15. Edited by Professor Dr. Chandra Shekhar Nautiyal and Professor Dr. Patrice Dion. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 411-436.
- Tomlin C. (1994).** The Pesticides Manual. 10th Ed. The Bath Press Bath, p.271.
- Top E; W. E. Holben and L. J. Forney (1995).** Characterization of Diverse 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-degradative plasmids isolated from soil by complementation. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 61 (5): 1691-1698.
- Topp E., Vallaey T. and Soulas G. (1997).** Pesticides: Microbial degradation and effects on microorganisms. In «Modern Soil Microbiology» Edited by Jan Dirk Van Elsas, Jack T. Trevors and Elizabeth M. H. Wellington. Marcel Dekker. New York, pp: 547-575.
- Topp E; Walter M. Mulbry; Hong Zhu; Sarah M. Nour and Diane Cuppels (2000).** Characterization of S-Triazine Herbicide Metabolism by a *Nocardioides* sp. Isolated from Agricultural Soils. *Applied and environmental microbiology.* Vol. 66 (8): 3134-3141.
- Torstensson N. T. L; J. Stark and B. Goransson (1975).** The effect of repeated applications of 2,4-D and MCPA on their breakdown in soil. *Weed Res.* 15: 159-164.
- Torstensson N. T. L. (1977).** Effect of repeated applications on degradation of some herbicides. Proc. EWRS Symp. *Methods Weed Control and Their Integr.* pp: 113-120.

- Trefault N; R. De La Iglesia; A. M. Molina; M. Manzano; T. Ledger; D. Pérez-Pantoja; M. A. Sánchez; M. Stuardo and B. González (2004).** Genetic organization of the catabolic plasmid pjp4 from *ralstonia eutropha* jmp134 (pjp4) reveals mechanisms of adaptation to chloroaromatic pollutants and evolution of specialized chloroaromatic degradation pathways. *Environmental Microbiology*. Volume 6, issue 7: 655-668.
- Tu et al. (2001).** 2,4-D. Weed control methods hand book, the Nature Conservancy. (Internet).
- Vallaey T. (1992).** Isolement d'une communauté microbienne dégradant l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique à partir d'un sol de Dijon. Caractérisations cinétique et génétique des souches impliquées. Thèse nouveau doctorat, discipline : Microbiologie. Université de Lille 1, Villeneuve-d'Ascq, France : 180 pages.
- Vallaey T; R. R. Fulthorpe; A. M. Wright and G. Soulas (1996).** The metabolic pathway of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation involves different families of *tfdA* and *tfdB* genes according to PCR-RFLP analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 20: 163-172.
- Vallaey T; F. Persello-Cartieaux; N. Rouard; C. Lors; G. Laguerre and G. Soulas (1997).** PCR-RFLP analysis of 16 rRNA, *tfdA* and *tfdB* genes reveals a diversity of 2,4-D degraders in soil aggregates. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24: 269-278.
- Vallaey T; L. Albino; G. Soulas; A. D. Wright and A. T. Weightman (1998).** Isolation and characterisation of stable 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid degrading bacterium, *Variovorax paradoxus*, using chemostat culture. *Biotechnology letters*. Vol. 20 (11): 1073-1076.
- Van Elsas J. D; V. Mäntynen and A. C. Wolters (1997).** Soil DNA extraction and assessment of the fate of *Mycobacterium chlorophenicum* strain PCP-1 in different soils by 16S ribosomal RNA gene sequence based most-probable-number PCR and immunofluorescence. *Biology and Fertility of Soils*. Vol. 24 (2): 188-195.
- Vandamme P; B. Pot; M. Gillis; P. De Vos; K. Kersters and J. Swings (1996).** Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. *Microbiological reviews*. Vol. 60 (2): 407-438.
- Vasudevan D. and E. M. Cooper (2004).** 2,4-D sorption in iron oxide-rich soils: role of soil phosphate and exchangeable Al. *Environ Sci Technol.* Jan 1. 38 (1): 163-70.
- Veeh R. H; W. P. Inskeep and A. K. Camper (1996).** Soil depth and temperature effects on microbial degradation of 2,4-D. *J Environ Qual.* 25:5-12.
- Vieublé-Gonod L; F. Martin-Laurent and C. Chenu (2006).** 2,4-D impact on bacterial communities, and the activity and genetic potential of 2,4-D degrading communities in soil. *FEMS Microbiology Ecology.* 58: 529-537.
- Vischetti C; P. Perucci and L. Scarponi (2000).** Relationship between rimsulfuron degradation and microbial biomass content in a clay loam soil. *Biology and fertility of soils*. Vol. 31 (3-4): 310-314.

- Voos G. and P. M. Groffman (1997).** Relationships between microbial biomass and dissipation of 2,4-D and dicamba in soil. *Biology and Fertility of Soils*. 24 (1): 106-110.
- Waite D. T; A. J. Cessna; R. Grover; L. A. Kerr; A. D. Snihura (2002).** Environmental concentrations of agricultural herbicides: 2,4-d and triallate. *J Environ Qual*. 31 (1): 129-44.
- Waite D. T; P. Bailey; J. F. Sproull; D. V. Quiring; D. F. Chau; J. Bailey and A. J. Cessna (2005).** Atmospheric concentrations and dry and wet deposits of some herbicides currently used on the Canadian Prairies. *Chemosphere*. 58: 693-703.
- Walker A. (1976).** Simulation of herbicide persistence in soil .II. Simazine and linuron in long-term experiments. *Pest Management Science*. Volume 7 Issue 1: 1- 96.
- Walker A. and S. J. Roberts (1993).** Degradation, biodegradation and enhanced biodegradation. In «Mobility and degradation of xenobiotics». *IX Symposium Chemistry*. Edizioni G. Biagini- Lucca.
- Walters Johanna (1998).** Environmental Fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. California Department of Pesticide Regulation: 18 Pages.
- Washington State Department of Ecology (WSDE) (2001).** herbicide risk assessment for the aquatic plant management final supplemental environmental impact statement. supplemental environment impact statement assessments of aquatic herbicides: Volume 3 – 2,4-D, Section 1 – LABEL DESCRIPTION & HISTORY.
- Weed D. A. J; R. S. Kanwar; D. E. Stoltenberg and R. L. Pfeiffer (1995).** Dissipation and Distribution of Herbicides in the Soil Profile. *J. Environ Qual*. 24: 68-79.
- Weintraub R. L; J. W. Brown; M. Fields and J. Rohan (1951).** Metabolism of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid. i. C¹⁴O₂ production by bean plants treated with labeled 2,4-dichlorophenoxyacetic acids. *Plant Physiology*: 293- 301.
- Weisburg W. G; S. M. Brans; D. A. Pelletier and D. J. Lane (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol*. 173: 697-703.
- Weiss B; S. Almer and R. W. Almer (2004).** Pesticides. *Pediatrics*, Vol. 113 (4): 1030-1036.
- White T. J. (1996).** The future of PCR technology: diversification of technologies and applications. *Trends Biotechnology*. 14 (12): 478-83.
- Wilke B. M. (2005).** Determination of chemical and physical soil properties. In «Soil biology». Volume 5. Manual for Soil Analysis. R. Margesin, F. Schinner (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg : 47-95.
- William G. Johnson; Terry L. Lavy and Edward E. Gbur (1995).** Sorption, mobility and degradation of triclopyr and 2,4-d on four soils. *Weed Science*. Vol. 43 (4): 678-684.
- Williams G. P. et L. W. Gold (1977).** Les températures du sol. CBD-180-F . Conseil national de recherches Canada.

- Wilson R. G. and H. H. Cheng (1976).** Breakdown and movement of 2,4-D in the soil under field conditions. *Weed Science*. Vol 24, issue 5: 461-466.
- Woudneh M. B; M. Sekela; T. Tuominen and M. Gledhill (2006).** Isotope dilution high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry method for analysis of selected acidic herbicides in surface water. *Journal of Chromatography A*. 1133: 293-299.
- Yabuuchi E; Y. Kosako; I. Yano; H. Hotta and Y. Nishiuchi (1995).** Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov. *Microbiol Immunol*. 39: 897-904.
- Yang-jie Tian; Yang Hong; Wu Xiu-juan and LI Dao-tang (2005).** Molecular analysis of microbial community in a groundwater sample polluted by landfill leachate and seawater. Tian et al. / *J Zhejiang Univ SCI*. 6B (3):1 65-170.
- Yao Y; L. Tudurib; T. Harnera; P. Blancharda; D. Waitec; L. Poissantd; C. Murphye; W. Belzerf and F. Aulagnierd (2006).** Spatial and temporal distribution of pesticide air concentrations in Canadian agricultural regions. *Atmospheric Environment*. 40 : 4339-4351.
- Yao Y; E. Galarneau ; P. Blanchard ; N. Alexandrou ; K. A. Brice and Y. F. Li (2007).** Atmospheric atrazine at Canadian IADN sites. *Environ Sci Technol*. 41 (22): 7639-44.
- Yoriko S; O. Naoto; F. Takeshi; S. Kazuo; M. Kiyotaka and H. Akira (2007).** 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading genes from bacteria isolated from soil in Japan : Spread of *Burkholderia cepacia* RASC-type Degrading Genes Harbored on Large Plasmids. *Microbes and environments*. Vol 22 (2): 45-156.
- Zakhia F. et P. Lajudie (2006).** La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques-application à la caractérisation des bactéries nodulants les légumineuses (BNL). *Canadian Journal of Microbiology*. 52 (3) : 169-181.
- Zertal Abdennour ; Tahar Sehili and Pierre Boule (2001).** Photochemical behaviour of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid: Influence of pH and irradiation wavelength. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol. 146, Issues 1-2 : 37-48.

ANNEXES

Annexe 1

Préparation du tampon d'extraction de l'ADN du sol

- **Tris-HCl 1M (pH 8,0)** Pour 500 ml :
 - 60,57 g Tris
 - 25 ml HCl pour ajuster le pH à 8
 - H₂O ultra pure : qsp 500 ml
- **EDTA 0,5M (pH 8,0)** Pour 500 ml :
 - 93,085 EDTA
 - H₂O ultra pure : 400 ml
 - NaOH concentrée pour ajuster le pH à 8
 - H₂O ultra pure : qsp 500 ml
- **NaCl 1M** Pour 500 ml :
 - 29,22 g de NaCl
 - H₂O ultra pure : qsp 500 ml
- **Sodium dodecyl sulfate (SDS) 20%** Pour 500 ml :
 - 100 g dans 400 ml d'eau ultra pure puis chauffer (dissolution).
 - H₂O ultra pure : qsp 500 ml
 - Stériliser par filtration et conserver à la température ambiante.

Annexe 2

Préparation d'acétate de sodium 3M (pH 5,5)

- Pour 100 ml :
 - 60 ml d'acétate de sodium 5M
 - 11,5 ml d'acide acétique 100%
 - H₂O ultra pure : qsp 500 ml
 - Stériliser par filtration et conserver à la température ambiante.

Annexe 3

Préparation d'une colonne de sépharose 4B

- Percer le fond d'un tube de 0,5 ml avec une aiguille.
- Mettre un peu de coton cardé au fond du tube.
- Placer le tube de 0,5 ml dans un tube de 2 ml.
- Déposer 0,5 ml de sépharose 4B et centrifuger 2 minutes à 100 g.
- Mettre la colonne dans un tube propre et conserver bouché à 4°C.

Annexe 4

Préparation d'une colonne de PVPP

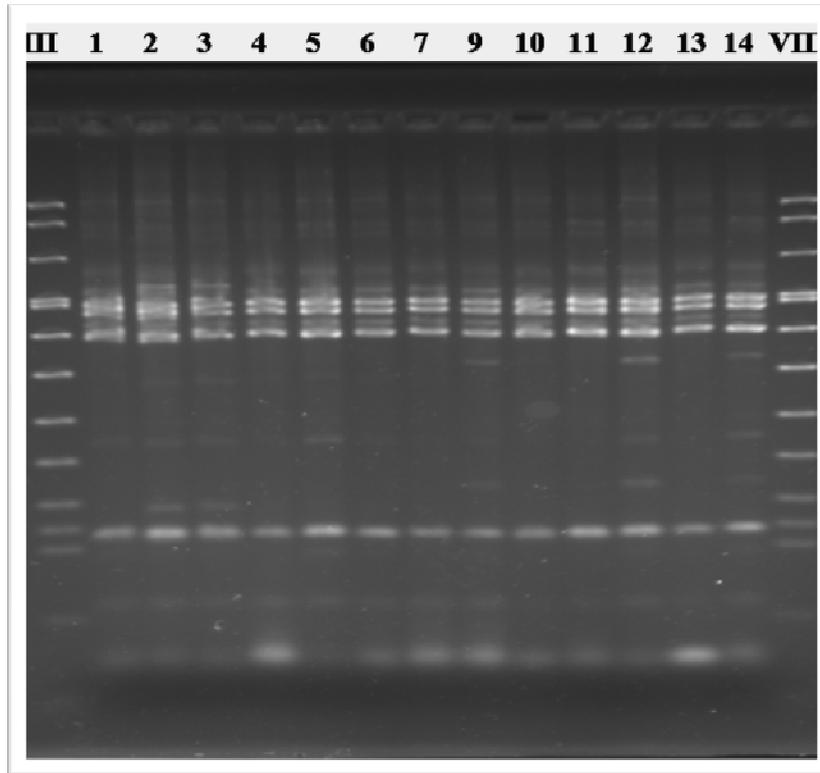
- Placer la colonne dans un tube de 2 ml.
- Remplir la colonne de PVPP (polyvinyl-polypyrrolidone sigma P6755) : environ 1,2 cm de hauteur = 92 à 95 mg.
- Ajouter 400 µl H₂O filtrée puis centrifuger pendant 2 minutes à 1000xg et 10°C.
- Récupérer environ 200 µl.
- Ajouter 400 µl H₂O filtrée puis centrifuger pendant 2 minutes à 1000xg et 10°C.
- Ajouter 400 µl H₂O filtrée et conserver à 4°C.

Annexe 5

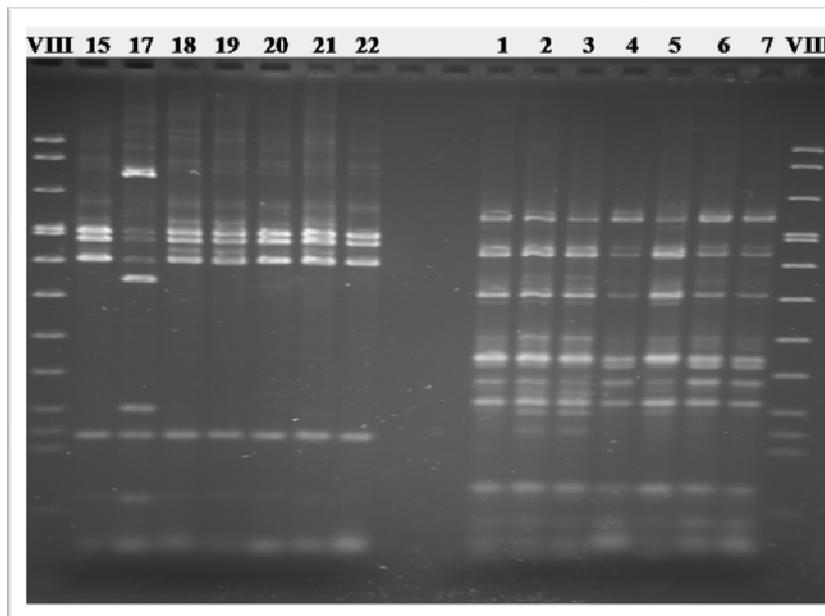
Purification de l'ADN

- Centrifuger les colonnes de PVPP pendant 2 mn à 1000xg et 10°C puis jeter le liquide.
- Placer la colonne dans un tube propre de 2 ml.
- Déposer l'ADN délicatement au centre de colonne.
- Laisser l'ADN pénétrer dans la colonne pendant 5 minutes (dans la glace).
- Centrifuger pendant 4 minutes à 1000xg et 10°C.
- Déposer l'ADN récupérée (100 à 150 µl) sur la colonne de sépharose 4B (au centre) puis centrifuger pendant 4 minutes à 1500xg et 10°C.
- Récupérer l'ADN et conserver à – 20°C jusqu'à l'utilisation.

Annexe 6 : Profils de la digestion enzymatique (*RsaI* et *AluI*) d'ADN extrait à partir de 108 isolats obtenus à partir des trois sols agricoles de la région de Constantine.

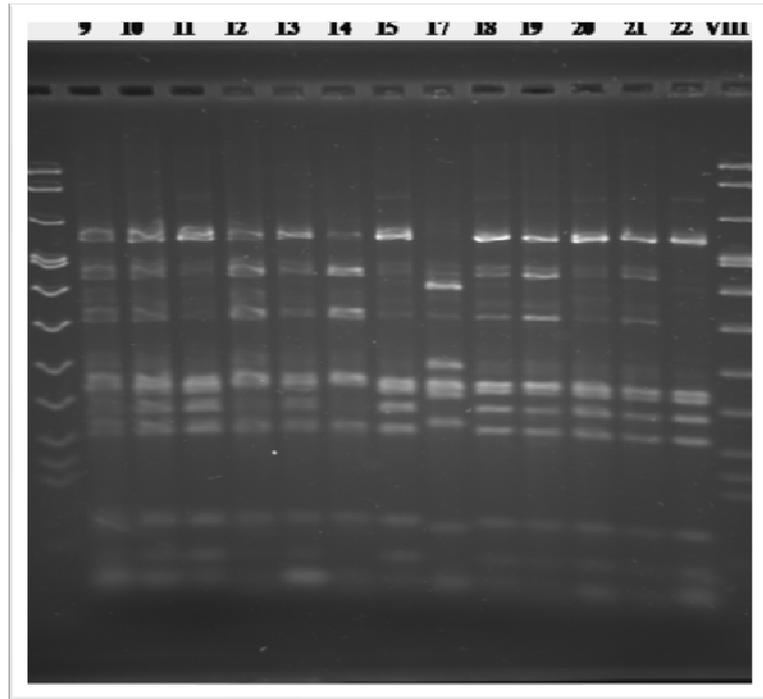


Profils de la digestion enzymatique (*RsaI*) d'ADN extrait à partir des isolats 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14.

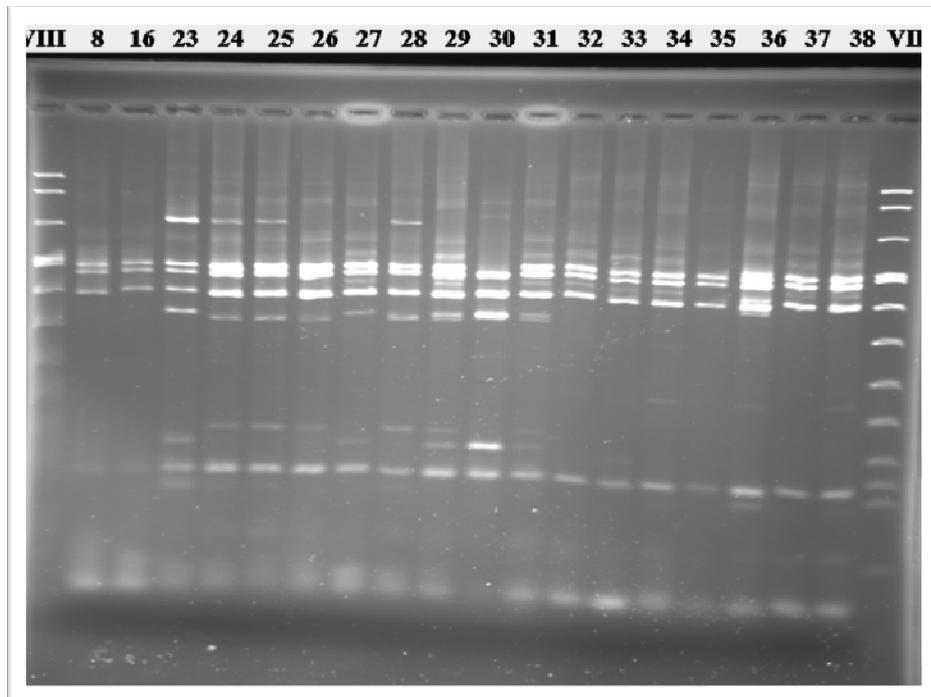


- Profils de la digestion enzymatique (*RsaI*) d'ADN extrait à partir des isolats 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22.

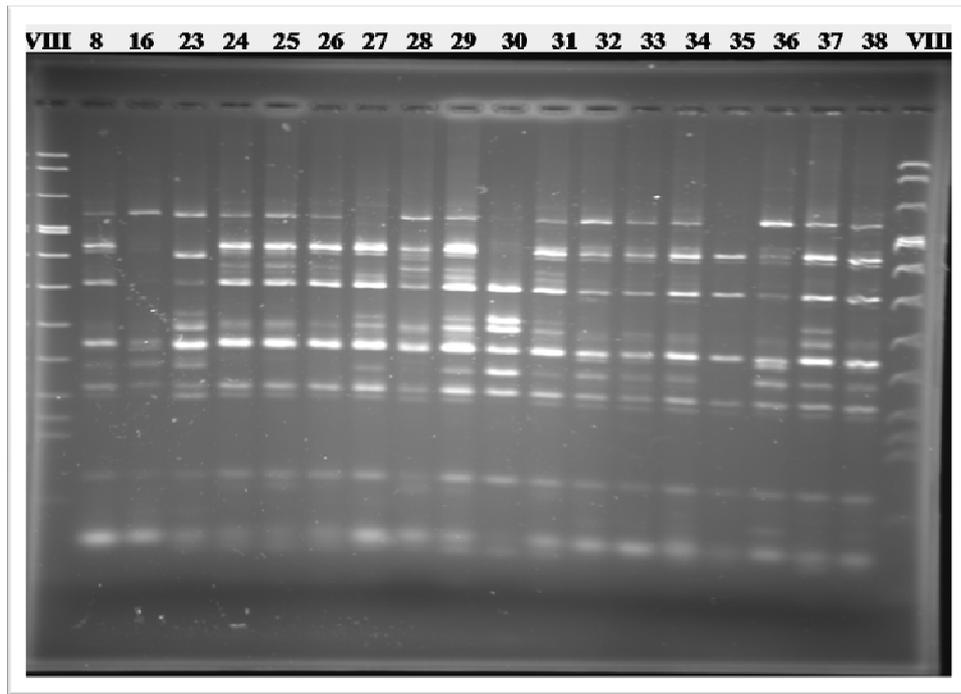
- Profils de la digestion enzymatique (*AluI*) d'ADN extrait à partir des isolats 1, 3, 4, 5, 6, 7.



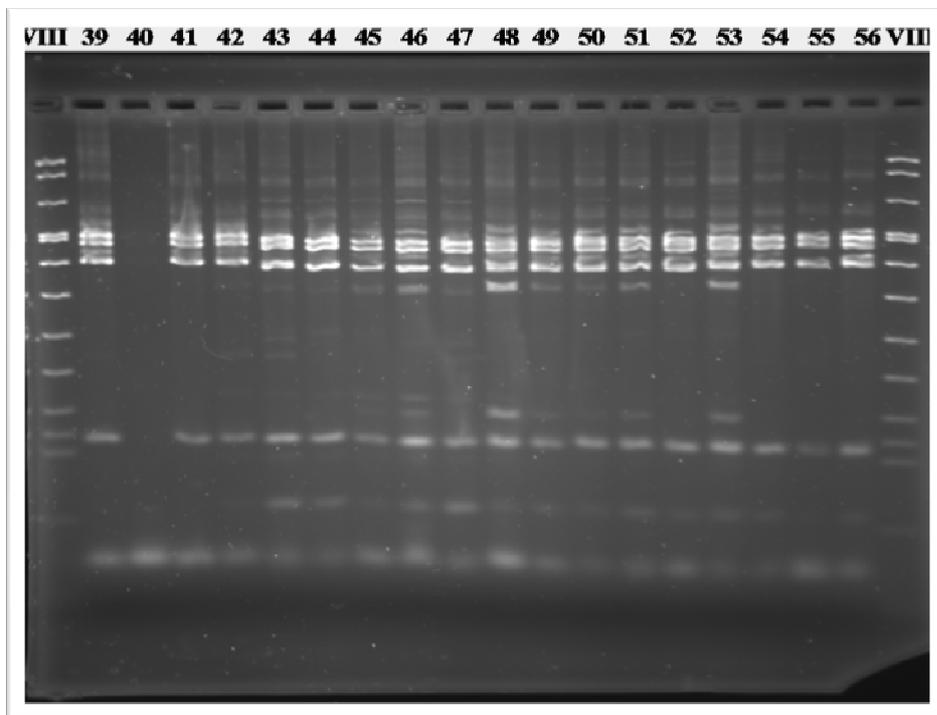
Profils de la digestion enzymatique (*AluI*) d'ADN extrait à partir des isolats 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22.



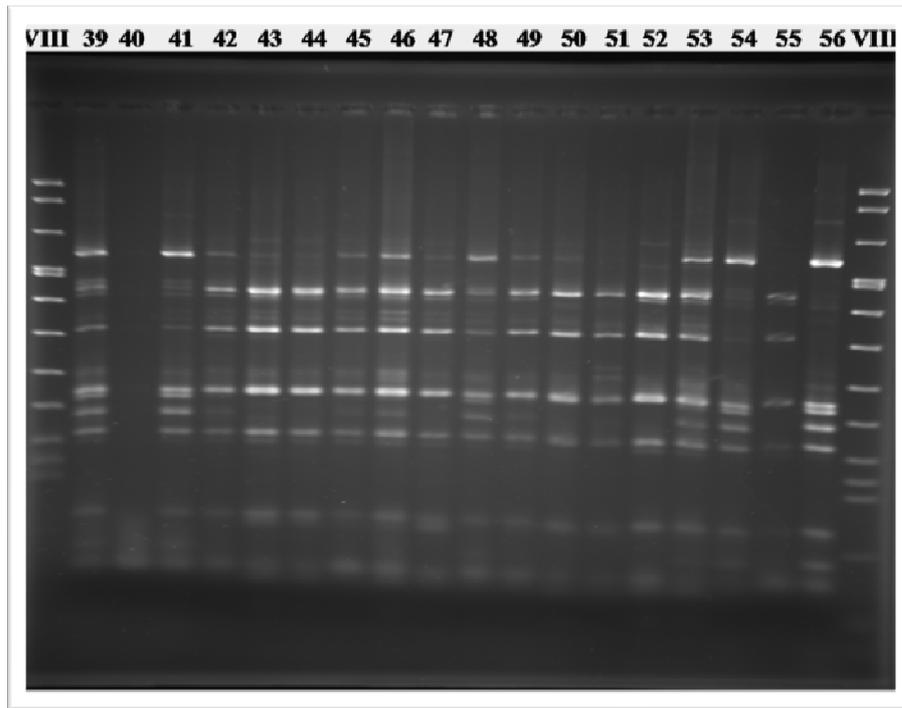
Profils de la digestion enzymatique (*RsaI*) d'ADN extrait à partir des isolats 8, 16, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38.



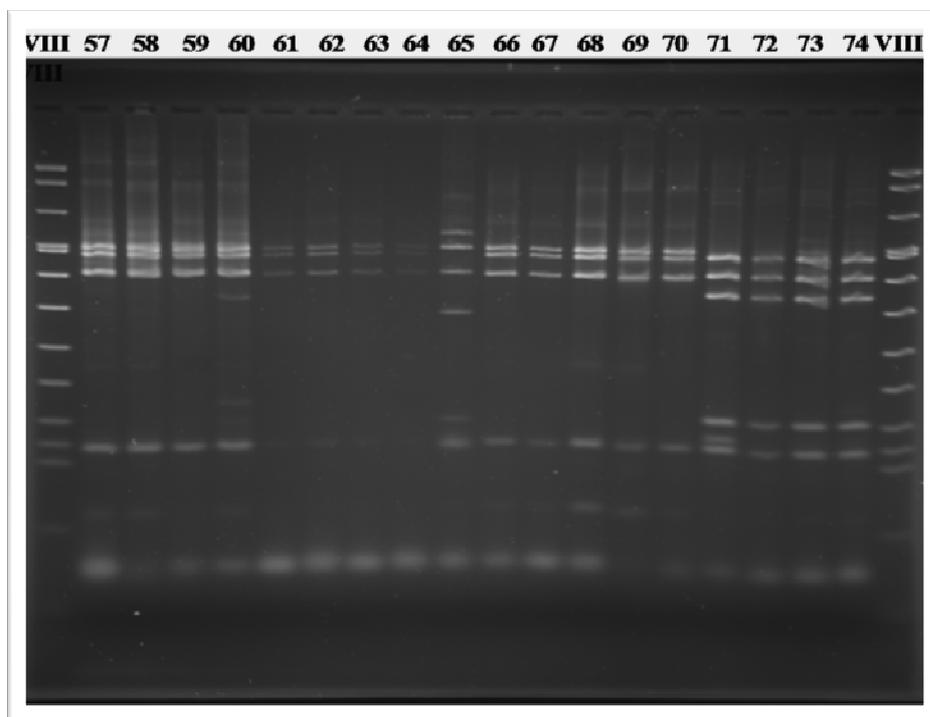
Profils de la digestion enzymatique (*AluI*) d'ADN extrait à partir des isolats 8, 16, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38.



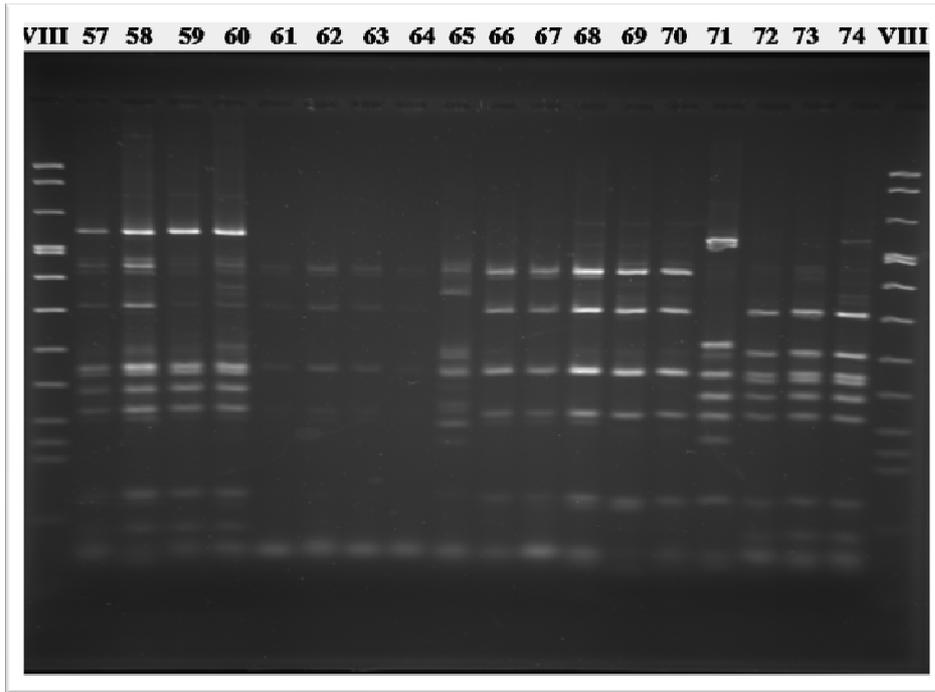
Profils de la digestion enzymatique (*RsaI*) d'ADN extrait à partir des isolats 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56.



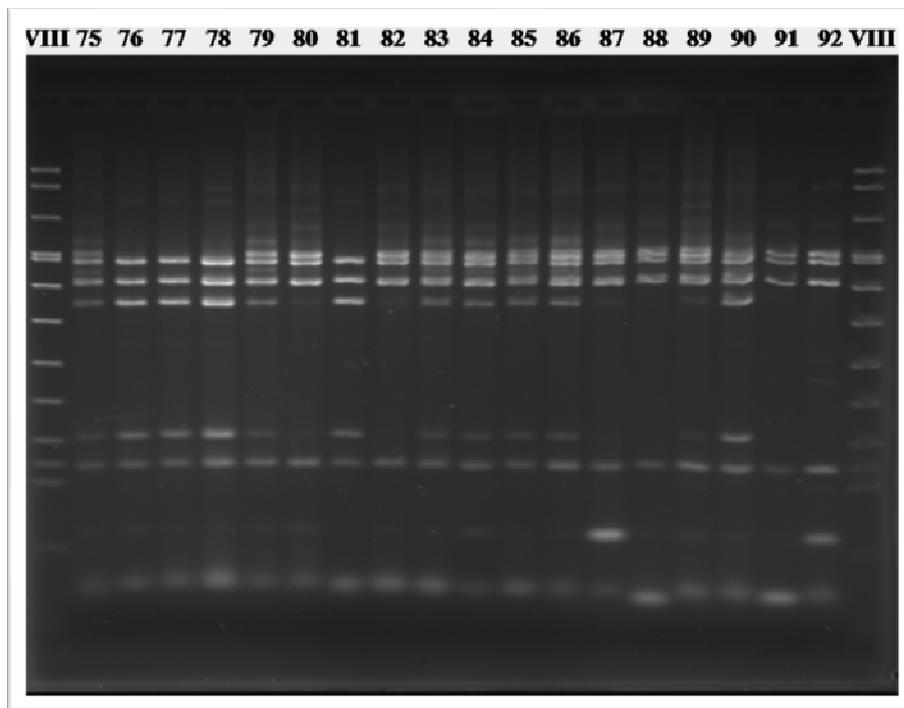
Profils de la digestion enzymatique (*AluI*) d'ADN extrait à partir des isolats 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56.



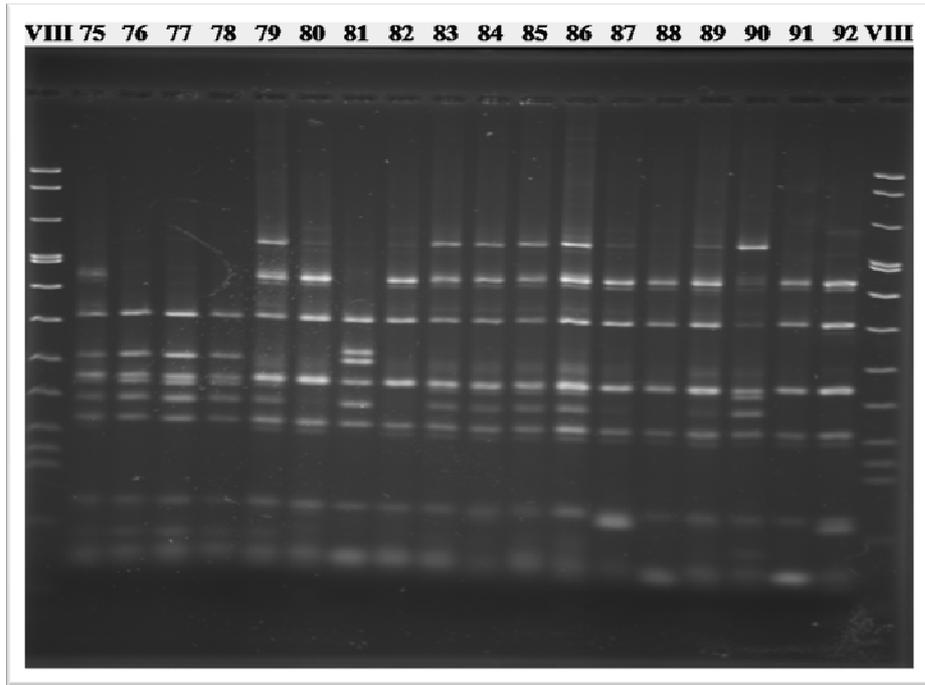
Profils de la digestion enzymatique (*RsaI*) d'ADN extrait à partir des isolats 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74.



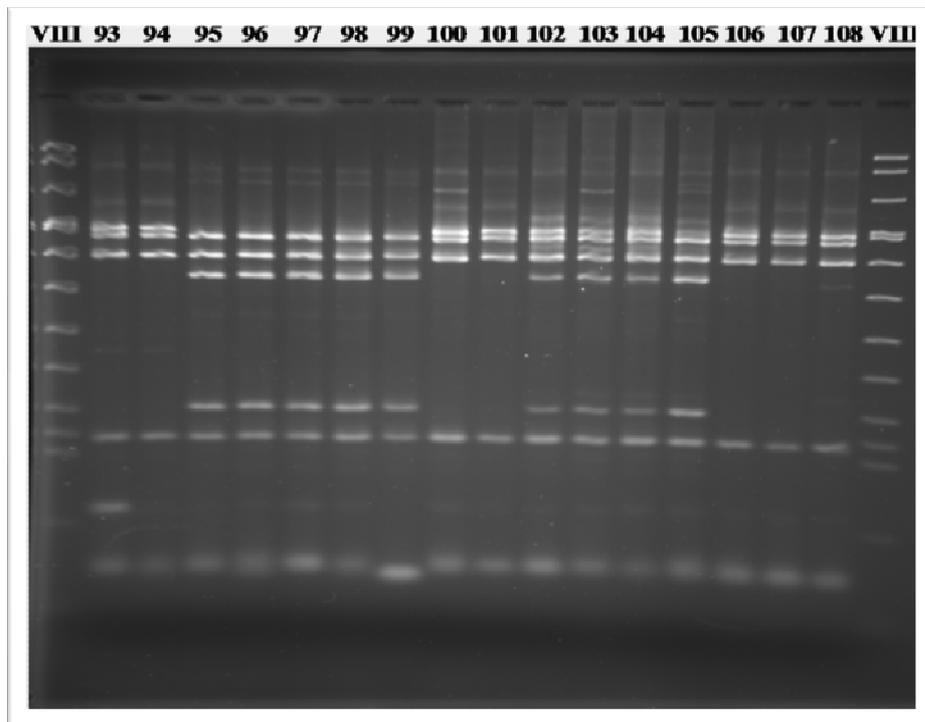
Profils de la digestion enzymatique (*AluI*) d'ADN extrait à partir des isolats 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73,74.



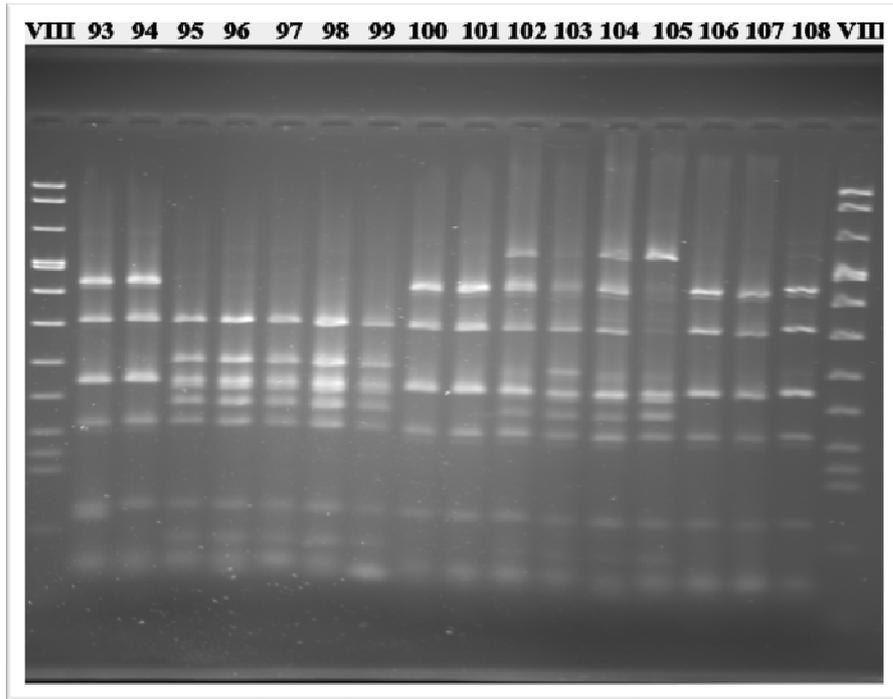
Profils de la digestion enzymatique (*RsaI*) d'ADN extrait à partir des isolats 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92.



Profils de la digestion enzymatique (*AluI*) d'ADN extrait à partir des isolats 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92.



Profils de la digestion enzymatique (*RsaI*) d'ADN extrait à partir des isolats 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108.



Profils de la digestion enzymatique (*AluI*) d'ADN extrait à partir des isolats 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108.

Annexe 7 : Résultats du séquençage des produits PCR du gène ADNr 16S de quelques souches représentant les différents groupes bactériens isolés à partir des trois sols algériens.

>Souches 72-76-77-96

```

ATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTC
GTGCATGAGCGTCAGTGACGTCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCTTCC
ACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGACATACTC
TAGCCTGGCAGTCACAAGCGCCATTCCCAAGTTGAGCTCGGGGATTTACGCCTG
TCTTACCAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGC
ACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCGG
TACCGTCATCGACCCCGGGTATTAACCAGAGCCATTTCTTTCCGGACAAAAGTGC
TTTACAACCCGAAGGCCTTCTTACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTGCC
CCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAG
TCCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTAGGC
CTTTACCCACCAACTAGCTAATCAGACATCGGCCGCTCCTATCGCGCGAGGCCT
TACGGTCCCCCGCTTTACCCCTCAGGTCGTATGCGGTATTAGCTAATCTTTCGACT
AGTTATCCCCACGACAGGGCACGTTCCGATGTATTACTACCCGTTCCGCACTC
GCCGCCAGGCCGAAGCCCGCGCTGCCGTTTCGACTTGATGTGTAAGGCATGCCGC
CAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAAAACATATA

```

> Souches 69-70

```

CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTGTTAT
CCCAGGAGGCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGC
TACACGCGGAATTCCACCTCCCTCTGACACACTCTAGCCCGGTAGTTAAAAATGC
AGTTCCAAAGTTgAAGCTCTGGGATTTACATCTTTCTTTCCGAACCGCCTGCGCA

```

CGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTG
CTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGCAGGTACCGTCAGTTTCACGGGGTA
TTAGCACCATGACGTTTCTTTCCTGCCAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCA
TCGCACACGCGGGATGGCTGGATCAGGGTTTCCCCATTGTCCAAAATTCCCCAC
TGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGTCGTCC
TCTCAAACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCCACCAACTAGCT
AATCCGATATCGGCCGCTCTAATAGTGCAAGGTCTTGCATCCCCTGCTTTCCCCC
GTAGGGCGTATGCGGTATTAGCTACGCTTTCGCGTAGTTATCCCCGCTACTAGG
CACGTTCCGATACATTACTACCCGTTCCGCCACTCGCCACCAGACCGAAGTCCGT
GCTGCCGTTGACTTGCATGTGTAAGGCATCCCGCTAGCGT

> Souche 81

CGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGT
GCATGAGCGTCAGTGACGTCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCAC
ATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGACATACTCTA
GCCTTGCAGTCACAAGCGCCATTCCCAAGTTGAGCTCGGGGATTTACGCCTGTC
TTACAAAACCGCCTGCGCACGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCAC
CCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCGGTA
CCGTCATCAACGCCGGGTATTAGCCAGCGCCATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTT
TACAACCCGAAGGCCTTCTTACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTGCCCCC
ATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC
CCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTAGGCCT
TTACCCACCAACTAGCTAATCAGACATCGGCCGCTCCTATTGCGCGAGGCCTTG
CGGTCCCCCGCTTTCACCCTCAGGTCGTATGCGGTATTAGCTAATCTTTCGACTAG
TTATCCCCACAACAGGGCACGTTCCGATGTATTACTACCCGTTCCGCCACTCGCC
ACCAGACCGAAGTCCGTGCTGCCGTTGACTTGCATGTGTAAGGCATGCCGCCAG
CGTTCAATCTGAGCCATGATCAAAACATATA

> Souche 105

ACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTCTC
GTCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCCTCCACATCTCTACGCATTTCACT
GCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGACGCACTCTAGCCTTGCAGTCACAAGC
GCCATTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACGTCCTGTCTTACAAAACCGCCTGC
GCACGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCG
GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCGGTACCGTCATCCACGCCAG
GTATTAGCCAGCGCGATTTCTTTCCGGACAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCT
TCTTACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTGCCCCCATTGTCCAAAATTCCCC
ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCG
TCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTGCCCTTTACCCACCAACTAG
CTAATCAGACATCGGCCGCTCCTATTGCGCGAGGCCTTGACGGTCCCCCGCTTTC
ACCCTCAGGTCGTATGCGGTATTAGCTAATCTTTCGACTAGTTATCCCCACAACA
GGGCACGTTCCGATGTATTACTACCCGTTCCGCCACTCGCCGCCAGGCCGAAGCC
CGCGCTGCCGTTTCGACATGCATGTGTAAGGCATGCCGCCAGCGTACAATCTGAGC
CATGATCAAAACATATAAGTTGGAA

> Souche 107

CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTG
TTATCCCAGGAGGCTGCCTTCGCCATCGGTGTTTCTCCGCATATCTACGCATTTCA
CTGCTACACGCGGAATTCACCTCCCTCTGACACACTCTAGCCCGGTAGTTAAAA

ATGCAGTTCCAAAGTTAAGCTCTGGGATTTACATCTTTCTTTCCGAACCGCCTGC
GCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCG
GCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGCAGGTACCGTCAGTTTCCCGG
GGTATTAACCCGAGACGTTTCTTCTGCCAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCC
TTCATCGCACACGCGGGATGGCTGGATCAGGGTTTCCCCCATTGTCCAAAATTCC
CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGGT
CGTCCTCTCAAACCAGCTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCCACCAAC
TAGCTAATCCGATATCGGCCGCTCTAATAGTGCAAGGTCTTGCGATCCCCTGCTTT
CCCCCGGAGGGCGTATGCGGTATTAGCTACGCTTTCGCGTAGTTATCCCCCGTA
CTAGGCACGTTCCGATACATTACTCACCCGTTCCGCCACTCGCCACCAGACCGAAG
TCCGTGCTGCCGTTGACTTGCATGTGTAAGGCATCCCGCTAGCGT

> Souche 71

CAACTTCACGCGTTAGCTACGTTACTGAAGAAATGAATCCCCAACAACTAGTTGA
CATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAAGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTT
CGTGCATGAGCGTCAGTCACGTCCCAGGGGGCTGCCTTCGCCATCGGTATTCTC
CACATCTCTACGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCCCCCTCTGACGCACT
CTAGCCTTGCAGTCACAAGCGCCATTCCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACGCCT
GTCTTACAAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCG
CACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTATTCTTCCA
GGTACCGTCATCAACGCCGGGTATTAGCCAGCGCCATTTCTTTCCGGACAAAAGT
GCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTACACACGCGGCATTGCTGGATCAGGGTTGC
CCCCATTGTCCAAAATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTC
AGTCCCAGTGTGGCTGATCGTCCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCCTTGGTA
GGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCAGACATCGGCCGCTCCTATTGCGCGAGG
CCTTGCGGTCCCCCGCTTTCACCCTCAGGTCGTATGCGGTATTAGCTAATCTTTCG
ACTAGTTATCCCCACAACAGGGCACGTTCCGATGTATTACTCACCCGTTCCGCA
CTCGCCACCAGGCCGAAGCCCGTGCTGCCGTTGACTTGCATGTGTAAGGCATGC
CGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATA

ملخص

نقوم بتفحص العوامل الرئيسية التي تؤثر على التحلل الحيوي لمبيد الأعشاب 2,4-D في ثلاثة أنواع من الأتربة الزراعية في الجزائر 45IB، 46BM و47AA، وبشكل خاص الرطوبة والحرارة.

ونسعى إلى تحديد حركية تعدين مبيد الأعشاب 2,4-D بواسطة تقنية radiorespirométrie، والمتمثلة في اقتناص $^{14}\text{CO}_2$ داخل محلول هيدروكسيد الصوديوم وتقديره بواسطة جهاز compteur à scintillation liquide.

تؤكد النتائج المتحصل عليها على تواجد البكتيريا المحللة للـ 2,4-D واعتماد التحليل الحيوي لهذا المبيد على الخصائص الفيزيائية - الكيميائية للتربة، وبشكل خاص على محتواها من الطين وMgO. وقد أظهر نوع التربة 46BM الذي يتميز بانخفاض في كمية المواد العضوية والرمال الخشنة معدلات تعدين أعلى بقليل من النوع 45IB. وكانت معدلات التحلل منخفضة بشكل واضح في النوع 47AA، الغني بالرمال الخشنة. وبعد 10 أيام من الحضانة تحت درجة حرارة 28° مئوية ورطوبة 25% تم تسجيل عملية تحلل حيوي تقدر بـ 65%، 60% و30% من جرعة 2,4-D المطبقة في البداية في الأتربة 47AA و45 IB و46BM، على الترتيب.

تشير النتائج أيضا، إلى وجود علاقة وثيقة بين الآثار الناجمة عن عاملي الحرارة والرطوبة، ولكن يبدو أن تأثير العامل الأول أقل أهمية من الثاني.

كما تبين النتائج أن بقايا مبيد الأعشاب 2,4-D الحرة أو المرتبطة التي حصلنا عليها تتناسب عكسيا مع معدلات عملية التعدين لهذا المبيد في مختلف أنواع الأتربة الثلاث.

تأثرت بنية المجاميع الميكروبية، المقدره بواسطة تقنية RISA، وبشكل ملحوظ بالعوامل الثلاثة المدروسة.

وباستخدام التقنية الانتقائية للزرع المخصب، وتواجد 663 ملغ من 2,4-D/لتر من البيئة المعدنية كمصدر للكربون، نحصل على 49 عزلة قادرة على تحليل المبيد. نجحنا في تعريف هذه العزلات المختلفة بواسطة نوعين من اختبارات تحليل المبيد وبواسطة تقنية RFLP للجين 16S rDNA المضاعف بواسطة PCR.

بالاعتماد على سلاسل جينات الـ 16S rDNA المتحصل عليها وبمقارنتها مع بنك المعلومات جمعنا العزلات في أربع فئات : *Ralstonia sp*، *Cupriavidus respiraculi*، *Achromobacter xylosoxidans* و *beta-proteobacterium*.

وقمنا أيضا بتحليل تركيب الجهد الوراثي المحلل لمبيد الأعشاب 2,4-D باستخدام تقنية PCR مستهدفين بذلك الجينات *tfdB*، *tfdB* و *tfdB* التي تشفر الإنزيمات الثلاثة الأولى في مسلك تهديم المبيد، كما درسنا تنوع الجينات الثلاثة باستعمال تقنية تعدد أشكال قطع السلاسل الناتجة عن عملية الهدم الإنزيمي. حصلنا على ثلاثة أنواع من الملامح المميزة، يشبه أحدها ذلك الذي يمثل السلالتين PLAE6 وID9 المعزولتين من تربة Cîteaux (فرنسا).

ساعد تجميع هذه النتائج على تعريف مجاميع الكائنات الحية الدقيقة المتكيفة بشكل خاص مع عملية الهدم السريع لمبيد الأعشاب 2,4-D والتي من الممكن استعمالها في تجارب زيادة قدرة التحلل الحيوي للتربة.

ومن أجل اقتراح الحلول التي تسمح بتقليص مدة مقاومة المبيدات لعمليات التحلل في التربة، أدت عملية تلقيح التربة 49MC بواسطة مجموعة بكتيرية محلية إلى زيادة قدرة التحلل الحيوي لهذا المبيد.

الكلمات المفتاحية : 2,4-D، التربة، درجة الحرارة، الرطوبة، الكائنات الحية الدقيقة، تعدين، RISA، Bioaugmentation، PCR-RFLP.

Résumé

Les principaux facteurs conditionnant la biodégradation du 2,4-D dans trois sols agricoles algériens (45IB, 46BM et 47AA), notamment l'humidité et la température, ont été examinés.

Les cinétiques de minéralisation de l'herbicide ont été déterminées par radiorespirométrie, qui consiste à piéger et estimer le $^{14}\text{CO}_2$ formé dans une solution de soude à l'aide d'un compteur à scintillation liquide.

Les résultats obtenus confirment la présence de microorganismes dégradants le 2,4-D et la biodégradation de cet herbicide semble dépendre essentiellement des propriétés physico-chimiques intrinsèques des sols notamment la teneur en argile et MgO. Le sol 46BM, caractérisé par de faibles quantités en sables grossiers et en matière organique, présente des taux de minéralisation légèrement supérieurs à ceux de 45 IB. Les taux de dégradation sont nettement ralentis dans le sol 47AA, riche en sables grossiers. Après 10 jours d'incubation à 25 % d'humidité et 28 °C, des taux de 65 %, 60 % et 30 % de minéralisation de la dose du 2,4-D initialement appliquée sont obtenus pour le 46BM, 45IB et 47AA respectivement.

Les résultats indiquent également l'existence d'une relation étroite entre les effets de la température et de l'humidité, mais l'effet du premier paramètre semble être moins important que celui du second.

Les quantités des résidus extractibles et non-extractibles obtenus sont inversement proportionnelles aux taux de minéralisation dans les trois sols.

La structure des communautés microbiennes des trois sols, estimée par RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), a été significativement affectée par les différents facteurs étudiés.

A l'aide de la technique d'enrichissement sélective et en présence de 663 mg de 2,4-D /litre (milieu minéral) comme source de carbone, 49 isolats dégradants ont été obtenus. Ces différents isolats ont été caractérisés par deux tests de dégradation et une analyse du polymorphisme de longueur de restriction (RFLP) du gène 16S rDNA amplifié par PCR.

En se basant sur les séquences des gènes 16S rDNA obtenues et par comparaison à des bases de données, les isolats ont été regroupés dans quatre catégories : *Achromobacter xylosoxidans*, *Cupriavidus respiraculi*, *Ralstonia* sp et *beta-proteobacterium*.

La composition du potentiel génétique dégradant le 2,4-D a été analysé par PCR en ciblant les gènes *tfdA*, *tfdB*, et *tfdC* codant les trois premières enzymes de la voie de dégradation de cet herbicide. La diversité de ces trois gènes a été étudiée par une analyse du polymorphisme de séquences révélée par une digestion enzymatique. Trois profils distincts ont été obtenus dont l'un est identique à celui représentant les souches PLAÉ6 et ID9 isolées à partir du sol Cîteaux (France).

La compilation de ces résultats a permis d'identifier des populations bactériennes particulièrement bien adaptées à la biodégradation accélérée du 2,4-D et qui peuvent être utilisées dans des expérimentations de bioremédiation.

Afin de proposer des solutions permettant de limiter le temps de résistance des pesticides dans les sols étudiés, l'inoculation du sol 49MC par une population microbienne locale adaptée à la dégradation du 2,4-D (test de bioaugmentation) a conduit à une augmentation très significative du taux de dégradation de cet herbicide.

Mots clés : 2,4-D, Sols, Température, Humidité, microorganismes, minéralisation, RISA, PCR-RFLP, bioaugmentation.

Summary

The main factors influencing the 2,4-D biodegradation in three Algerian agricultural soils (45IB, 46BM and 47AA) are examined, particularly moisture and temperature.

The herbicide kinetics of mineralization were determined by radiorespirometry, which consist of trapping and estimating the $^{14}\text{CO}_2$ formed in a sodium hydroxide solution using a liquid scintillation counter.

The results obtained confirm the presence of microorganisms able to degrade 2,4-D and the biodegradation of this herbicide seems to depend mainly on intrinsic physic-chemical properties of soil especially clay content and MgO. The soil 46BM, characterized by low quantities in coarse sand and organic material, presents a mineralization rates slightly higher than 45IB. Rates degradation are clearly slowed in soil 47AA, rich in coarse sands. Thus, after 10 days of incubation at 25% humidity and 28°C, 65%, 60% and 30% of mineralization of the initially applied dose of 2,4-D are obtained for the 46BM, 45IB and 47AA respectively.

The results indicate also the existence of a close relationship between the effects of temperature and humidity, but the effect of the first parameter seems to be less important than the second.

Extractable and non-extractable residues obtained are inversely proportional to rates of mineralization in the three soils.

The structure of microbial communities of the three soils, estimated by RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), has been significantly affected by the three studied factors.

Using the selective enrichment technique and in the presence of 663 mg of 2,4-D/liter (mineral medium) as carbon source, 49 degrading isolates were obtained. These isolates were characterized by two tests of degradation and by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of 16S rDNA genes amplified by PCR.

Based on the sequences of 16S rDNA genes obtained and by comparison to databases, isolates were grouped in four categories: *Achromobacter xylosoxidans*, *Cupriavidus respiraculi*, *Ralstonia* sp and *beta-proteobacterium*.

The composition of the genetic potential degrading the 2,4-D was analyzed by PCR by targeting *tfdA*, *tfdB*, and *tfdC* genes coding the first three enzymes of the way degradation of this herbicide. The diversity of these three genes was studied by an analysis of the polymorphism of sequences revealed by an enzymatic digestion. Three distinct profiles were obtained which one is identical to that represents ID9 and PLAE6 strains isolated from Citeaux soil (France).

The compilation of these results helped to identify bacterial populations particularly well adapted to the accelerated 2,4-D biodegradation which can be used in experiments of bioremediation.

To propose solutions allowing to limit the resistance time of pesticides in the studied soils, inoculation of 49MC soil with a local microbial population adapted to the degradation of 2,4-D (bioaugmentation test) led to a significant increase in the degradation rate of this herbicide.

Key words: 2, 4-D, soil, temperature, humidity, microorganisms, mineralization, RISA, PCR-RFLP, bioaugmentation.