

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique
Université Constantine I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications



N° de série : 16/D3C/2014

N° d'ordre : 05/MIB/2014

Thèse

Pour obtenir le diplôme de Doctorat Troisième Cycle (LMD)

En Biotechnologie microbienne, Génome et Environnement

Présentée et soutenue publiquement par

ARABET DALLEL

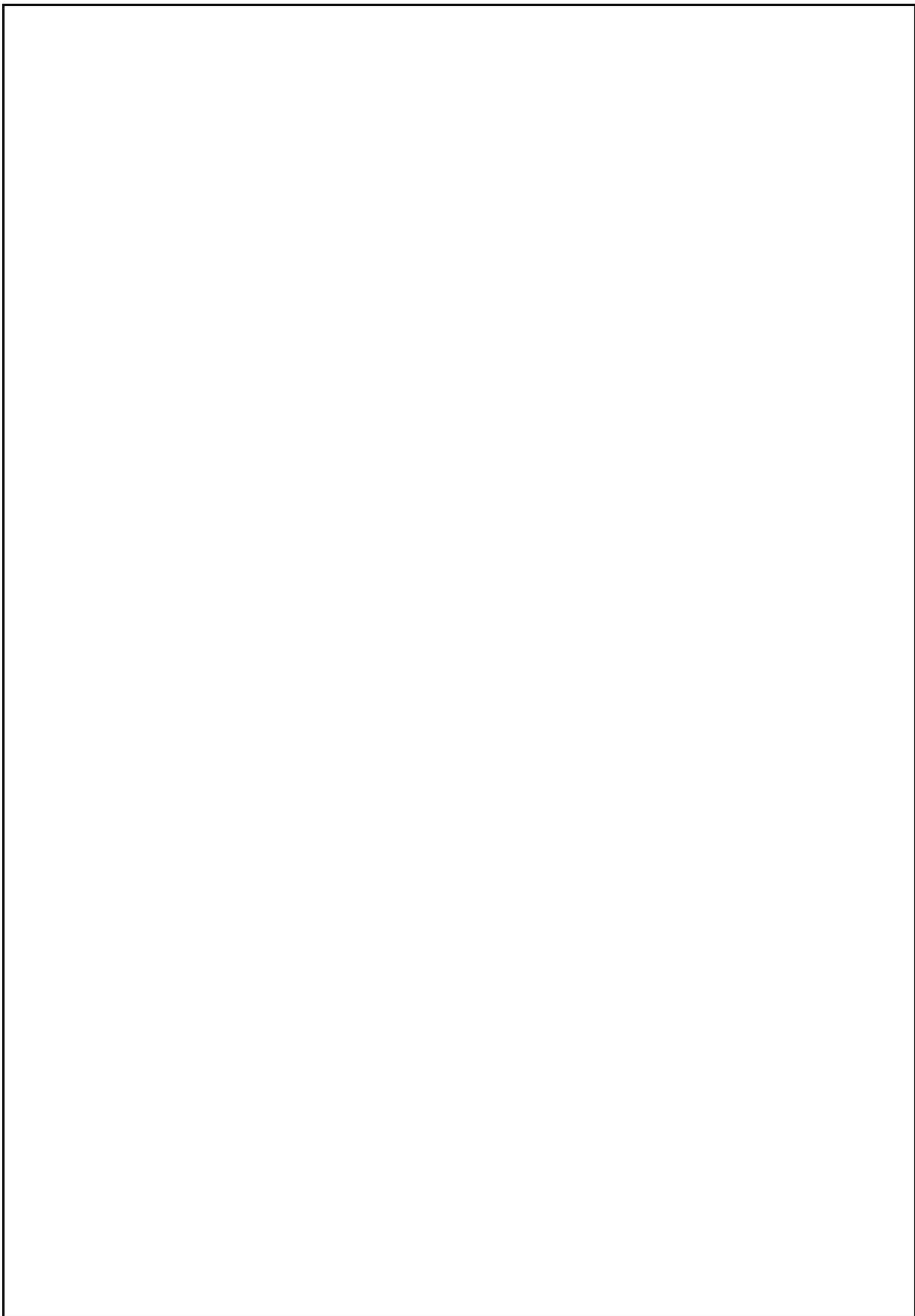
Le 23 Juin 2014

**Effets d'un herbicide de la famille des Sulfonylurées sur la
communauté bactérienne d'un sol agricole, étude de cas : le
Chevalier® OnePass**

Jury

M. Haddi Mohamed Laïd	Professeur à l'université Constantine I	Président du jury
M. Boulahrouf Abderrahmane	Professeur à l'université Constantine I	Directeur de thèse
M. Méjean Vincent	Directeur de recherche, CNRS Marseille	Co-directeur de thèse
M. Karam Noureddine	Professeur à L'université d'Oran	Examineur
M. Nancib Nabil	Professeur à l'université Sétif I	Examineur
Mme. Iobbi-Nivol Chantal	Chargée de recherche, CNRS Marseille	Membre invité

Année Universitaire **2013/2014**



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Karam Noureddine et M. Nancib Nabil, les examinateurs de ma thèse qui ont accepté d'évaluer mon travail. Merci également à M. Haddi Mohamed Laïd d'avoir présidé ce jury.

Merci à M. Déhimat Laïd, le doyen de la faculté des sciences de la nature et de la vie, ainsi qu'à M. Rouabah Abdelkader, le vice doyen de la faculté, pour leur soutien et leur disponibilité et surtout pour leur confiance et leurs encouragements qui m'étaient toujours une très grande motivation.

Un immense merci à mon directeur de thèse M. Boulahrouf Abderrahmane qui m'a accueillie dans son laboratoire depuis mon master. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis pendant ces longues années que ce soit en tant qu'enseignant ou en tant que directeur de recherche. Merci pour votre patience et votre compréhension. Je sais que je n'ai pas toujours été facile comme étudiante mais vous avez toujours su m'assimiler, maîtriser mon énergie débordante et l'orienter vers le meilleur chemin. Merci également pour votre confiance et d'avoir toujours cru en mes capacités. J'espère avoir appris de vous le calme et la persévérance.

Merci infiniment à mes « *chefs* », Chantal Iobbi-Nivol et Vincent Méjean. Ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans vous deux. Merci Chantal, pour ton soutien sans relâche, le temps que tu m'as toujours consacré même quand je ne faisais plus partie de ton équipe. Merci d'avoir toujours cru en moi. Merci pour les dizaines de projets que tu as conçus pour m'avoir de nouveau dans ton équipe. Merci aussi pour les diners délicieux chez toi et les soirées passées à papoter. Tu as fourni beaucoup d'effort pour que cette thèse voie le jour et pour que j'évolue dans ma carrière scientifique. J'espère l'avoir mérité. J'espère avoir appris de toi ton honnêteté, ta patience et ton amour pour la science.

Vincent, comme je te l'ai toujours dit : « je ne veux rien sans toi !! ». T'as bien su faire de ce projet (qui m'était bizarre) un vrai projet de thèse. Moi et toi avons soulevé tous les défis et nous les avons tous remportés ! Une thèse et un beau papier en trois mois ! C'est vrai que ce n'était pas facile mais ce qui est certain c'est que c'était très agréable. Avec toi j'ai appris comment être forte, croire à mes rêves et aller toujours de l'avant. Merci pour nos

conversations, pour les à côtés (sorties, balades, bateaux....). Merci à Sylviane de m'avoir accueillie chez vous, pour sa gentillesse et son hospitalité. Aucun mot ne me paraît suffisant pour t'exprimer ma reconnaissance. J'espère que je ne t'ai pas déçu.

J'aimerais aussi remercier Cécile et Michel. Merci d'avoir corrigé mon article en un temps record. Je vous remercie pour les discussions qui me faisaient toujours apprendre une nouvelle chose. Merci pour votre disponibilité, patience et gentillesse. Des profs comme vous ne sont pas nombreux, c'est un véritable bonheur pour moi de vous avoir rencontré, côtoyé et d'avoir appris de vous sur quelles bases se construit la relation entre le prof et ses étudiants.

Josh, David et Sophie ! Nous faisons un groupe exceptionnel, pas toujours facile à gérer ! C'était un véritable plaisir de travailler avec vous dans une même équipe. Avec vous j'ai appris le sens du travail de groupe et d'être toujours disponible pour aider l'autre. David et Josh, merci d'avoir toujours été là pour me résoudre mes problèmes de calculs et d'informatique, grâce à vous, je suis devenue maintenant autonome...enfin, presque ! Merci Sophie pour nos conversations, nos sorties, le sport, la mer et surtout le *shopping* !! Je te souhaite bonne chance pour la fin de ta thèse et comme je te l'ai toujours dit : « Plein de papiers ! ».

Josh, David et Sophie, mes voyages en France m'ont offert un très beau cadeau...votre amitié.

*L'équipe TMAO ! Avec vous j'ai passé les meilleurs moments de ma vie...Je vous adore
tous*

Je n'oublie pas de remercier Sébastien Tempel et Yann Denis, je sais que je vous ai beaucoup fatigués ! Merci pour votre disponibilité et votre efficacité. C'était un véritable plaisir de vous connaître et une énorme joie de collaborer avec vous. Je souhaite pouvoir revivre l'expérience très bientôt.

Un grand merci à mes collègues de thèse au CNRS Marseille : Malika, Rachid, Abbas, Léa et Gabriel. Félicitations pour ceux qui ont soutenus et bonne continuation pour le reste.

Je souhaite également remercier Aurélia, Vanessa et Delphine pour avoir été toujours présentes pour régler mes petits soucis administratifs mais aussi pour leur gentillesse et leurs encouragements.

Je remercie tous ceux et celles que j'ai connus au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Marseille. Je souhaite pouvoir travailler avec vous de nouveau.

Je voudrais remercier M. Rouabah Ahmed de m'avoir aidé pour l'obtention de mon échantillon de sol. Merci pour votre gentillesse et pour toutes les explications que vous m'avez fournies.

Durant ces années de thèse, j'avais la chance de faire partie de deux équipes à la fois. J'aimerais alors remercier mon équipe en Algérie au Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications, Fateh, Khaled, Sara et les autres. Je vous souhaite bonne chance pour la fin de vos thèses. Merci aussi à Soumeya et Imène, mes deux fidèles amies qui ont partagé avec moi tous les moments de fatigue, de faiblesse et parfois de déprime. Merci infiniment mes deux *puces*. Je souhaite que cette amitié dure pour toujours. Merci aussi à Mohamed de m'avoir supporté ces quelques années de thèse et de m'avoir écouté surtout quand je perdais les pédales !

Je souhaite également remercier Mme. Rached-Mosbah Oualida, directeur du laboratoire Biologie et Environnement, pour son soutien et ses conseils précieux (sans vous je n'aurais jamais pu faire mon échantillonnage correctement). Merci aussi à Dallel pour son aide, sa disponibilité et sa bonne humeur.

Le plus grand merci va à ma mère. Ma chère « *Mamita* ». Sans toi rien ne pourrait être possible. Merci pour ton soutien, tes encouragements, ton dévouement, ta compréhension, ton amour et tous les efforts que tu fais pour que mes ambitions se réalisent. J'espère pouvoir toujours être à la hauteur de ta confiance en moi.

Merci à mes frères et sœurs

Merci à ma famille

Liste des abréviations

ACCase : Acétyl CoA Carboxylase

ADN : Acide Désoxyribonucléotidique

ADNr16S : ADN ribosomal 16S

AHAS: Acétohydroxy acide Synthase

ALS: Acétolactate Synthase

ARNr16S: Acide Ribonucléotidique ribosomal 16S

DDT: Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane

DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

dXTP: Désoxyribonucléotides

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

EPSPS: 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase

FAD: Flavine Adénine Dinucléotide

GC: *Gaz Chromatography*

HCB: Hexa-Chloro-Benzène

HCH: gamma-Hexa-Chloro-Hexane

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*

HRM: *High Resolution Melting DNA*

ICP: *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*

IGS: *Intergenic Spacer*

ISMS: Iodosulfuron méthyle sodium

LB: Luria Bertani

MSM: Mésosulfuron methyl

NGS: *Next Generation Sequencing*

PGPR: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*

pH: Potentiel Hydrogène

ppb: Partie par 10⁹

ppt: Partie par 10¹²

ThDP : Thiamine Diphosphate

t50 : Temps de demi-vie

RISA : *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*

Table des matières

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction	1
1 Les pesticides au XXe siècle.....	1
1.1 Classification des pesticides	2
1.2 Une agriculture sans pesticides est-elle possible ?.....	4
2 Problématique environnementale des pesticides	4
2.1 Contamination des eaux par les pesticides	6
2.2 Contamination des sédiments par les pesticides	7
Note : Les POP et la santé humaine et animale	8
3 Les herbicides	10
3.1 Classification des herbicides	11
3.2 Les sulfonylurées.....	12
3.2.1 Structure chimique et activité herbicide des sulfonylurées	13
3.2.2 Propriétés physicochimiques des sulfonylurées	13
3.2.3 Mode d'action des sulfonylurées.....	13
3.2.4 Cas du Chevalier® OnePass.....	14
4 Devenir des sulfonylurées dans le sol.....	15
4.1 Adsorption/Désorption	16
4.2 Mobilité	16
4.3 Persistance	17
4.4 Dégradation	18
4.5 Dégradation microbienne	18
5 Raisons du choix du sujet et objectifs de la recherche	21
5.1 Le sol écosystème complexe et support de biodiversité.....	21
5.2 Les microorganismes du sol et leur rôle écosystémique	22
Objectif du travail de thèse.....	25

RESULTATS

Introduction	27
1 Détection de l'herbicide dans l'échantillon de sol traité	27
2 Évaluation de la biodiversité des deux sols	28
3 Analyse de la fraction cultivable des communautés bactériennes	28
3.1 Analyse de l'empreinte génétique des clones isolés.....	29
3.2 Séquençage de l'ARNr16S et construction de l'arbre phylogénétique	30
3.3 Étude de la résistance/dégradation de l'herbicide par les souches isolées	31
3.4 Analyse de la co-existence souches résistantes/souches sensibles.....	31

DISCUSSION GÉNÉRALE

Introduction	34
1 Persistance des molécules actives dans le sol	34
2 Effets du Chevalier® OnePass sur la biodiversité bactérienne du sol.....	35
3 Confirmation des résultats HRM.....	36
4 Identification des souches bactériennes et analyse phylogénétique.....	36

5 Dégradation de l'herbicide Chevalier® OnePass	38
6 Coexistence des souches résistantes et des souches sensibles	39
7 Minéralisation du Chevalier® OnePass par la souche <i>S. maltophilia</i>	40
Conclusion et perspectives.....	40

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Produits Chimiques	43
2 Collection des échantillons de sol	43
3 Milieux de culture et conservation des souches bactériennes.....	43
4 Conditions de culture	44
4.1 Isolement des souches bactériennes et culture en aérobiose	44
4.1.1 Conditions d'enrichissement	44
4.1.2 Conditions d'isolement	44
4.2 Isolement des souches bactériennes et culture en micro-aérobiose.....	45
4.2.1 Conditions d'enrichissement	45
4.2.2 Conditions d'isolement	45
4.3 Culture sur LB modifié.....	45
4.4 Culture en surcouche	45
5 Technique d'analyse chimique	46
Spectrométrie par torche à plasma ou Inductively Coupled Plasma Optical Emission	
Spetrometry (ICP-OES)	46
5.1 Aperçu sur la technique	46
5.2 Conditions de l'expérience	47
6 Techniques d'analyse moléculaire	47
6.1 Amplification d'ADN par PCR	47
6.2 Ribosomal Intergenic Spacer (RISA)	48
6.3 Extraction, Purification et Séquençage de l'ADN.....	48
6.4 High Resolution Melting DNA (HRM).....	49
6.4.1 Principe de la technique	49
6.4.2 Conditions de l'expérience	49
6.5 Construction de l'arbre phylogénétique	50
6.6 Numéros d'accession des séquences d'ADNr16S.....	50

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	59
----------------------------------	----

ANNEXE

Article: Effects of a sulfonylurea herbicide on the soil bacterial community

*« Lorsque le dernier arbre aura été abattu, le dernier fleuve pollué,
le dernier poisson capturé, vous vous rendrez compte que l'argent
ne se mange pas. »*

Chef Seattle, 1854

Introduction Bibliographique

L'utilisation des pesticides en agriculture est certainement très ancienne. L'emploi du soufre et de l'arsenic, signalé par Homère et Pline l'Ancien, en témoigne (Druwe and Vaillancourt, 2010). Néanmoins, ce n'est qu'au cours des XIX^e et XX^e siècles que les propriétés biocides de nombreux produits ont été mises en évidence. L'utilisation et la production des pesticides pour la protection des cultures est passée alors de ses débuts « alchimiques » à une véritable technologie suffisamment robuste pour assurer l'alimentation d'une population mondiale prévue pour atteindre 9 milliards de personnes en 2050 (Lamberth *et al.*, 2013).

Cependant, l'introduction massive de ces molécules dans l'environnement, notamment dans les pays développés, a induit de graves conséquences. En effet, comme toute molécule chimique les pesticides peuvent se disperser dans les différents compartiments de l'environnement et devenir, dans certaines conditions, des polluants du sol, de l'air, de l'eau ou des aliments (Köhler and Triebkorn, 2013). Une problématique de pollution potentielle a été, alors, soulevée et prend de plus en plus d'ampleur particulièrement concernant la santé humaine. La dernière étude réalisée par l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a démontré que l'exposition à des pesticides conduit à "des augmentations de risques significatives pour plusieurs pathologies" telles que la maladie de parkinson et la leucémie (Collotta *et al.*, 2013; Ntzani *et al.*, 2013).

Les pesticides s'avèrent alors une arme à double tranchant. D'une part, ce sont désormais des moyens efficaces et indispensables pour la protection des cultures et d'autre part, des polluants potentiels de l'environnement et des poisons qui peuvent arriver jusqu'à nos assiettes (Figure 1). Pour toutes ces raisons, les pesticides ont fait l'objet de nombreuses études durant ces dernières années non seulement pour protéger la santé humaine (voir la note sur les POP) mais aussi pour mieux comprendre leur comportement et surtout leur devenir dans l'environnement.

1 Les pesticides au XX^e siècle

L'agence de protection de l'environnement des États-Unis (USEPA) définit un pesticide comme étant n'importe quelle substance prévue pour empêcher, détruire, repousser ou atténuer n'importe quel parasite animal, végétal ou microorganisme.

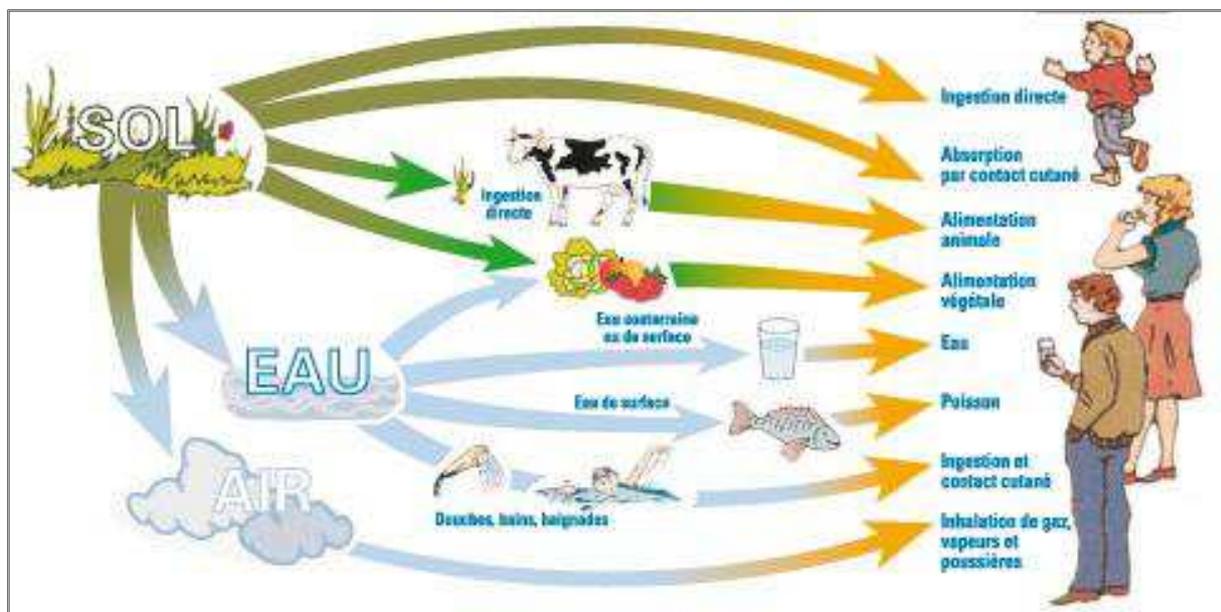


Figure 1 : Passage des pesticides de l'environnement vers l'homme et les animaux (Organisation des Nation Unies pour l'alimentation et l'agriculture FAO, 2013)

Sous le nom de pesticides, sont également inclus les régulateurs de croissance des plantes, les défoliants (pour faire tomber les feuilles), les dessiccants (pour absorber l'humidité), les agents qui réduisent le nombre de fruits ou évitent leur chute précoce ainsi que les substances appliquées avant ou après récolte pour conserver les produits pendant leur stockage et leur transport.

L'industrie des pesticides a fait un saut immense durant la deuxième moitié du XX^e siècle. Cela peut être attribué à plusieurs raisons :

- la croissance exponentielle de la population mondiale,
- la recherche de rendements élevés,
- la protection de la qualité des produits alimentaires,
- une main d'œuvre plus réduite.

De nouvelles molécules ont été alors découvertes et d'autres ont été synthétisées grâce aux immenses progrès qu'a connus la chimie organique de synthèse. L'arsenal chimique de l'agriculture s'enrichissait alors, de jour en jour (Figure 2) (Calvet *et al.*, 2005).

Actuellement, le marché des pesticides compte près de 100 familles chimiques: (organophosphorés, organochlorés, carbamates, pyréthriinoïdes, triazines....) et plus de 10 000 formulations commerciales composées de la matière active et d'adjuvants et qui se présentent sous différentes formes (liquides, solides : granulés, poudres....) ce qui permet, par conséquent, de couvrir un très large spectre d'usage.

En 2011, le marché mondial des pesticides s'élevait à 44 milliards de dollars (33 milliards d'euros), en progression de 13,6 % par rapport à 2010. 31,7 % de ce chiffre d'affaires est réalisé en Europe. Viennent ensuite l'Asie, l'Amérique latine, l'Amérique du Nord et l'Afrique (Figure 3). En matière d'utilisation les États-Unis constituent le premier consommateur mondial de pesticides. Suivent l'Inde, la France et l'Allemagne. Rapporté à l'hectare cultivé, le Japon arrive en tête (12kg/ha) devant l'Europe (3kg/ha), les États-Unis (2,5kg/ha) et l'Inde (0,5kg/ha).

1.1 Classification des pesticides

Les pesticides peuvent être classés selon leur cible, leur structure ou leur mode d'emploi (Kearney and Kaufman, 1988). Face à la grande profusion des pesticides et selon les spécialités commerciales, les producteurs et les utilisateurs des pesticides les classent selon leur cible, les principales classes sont :

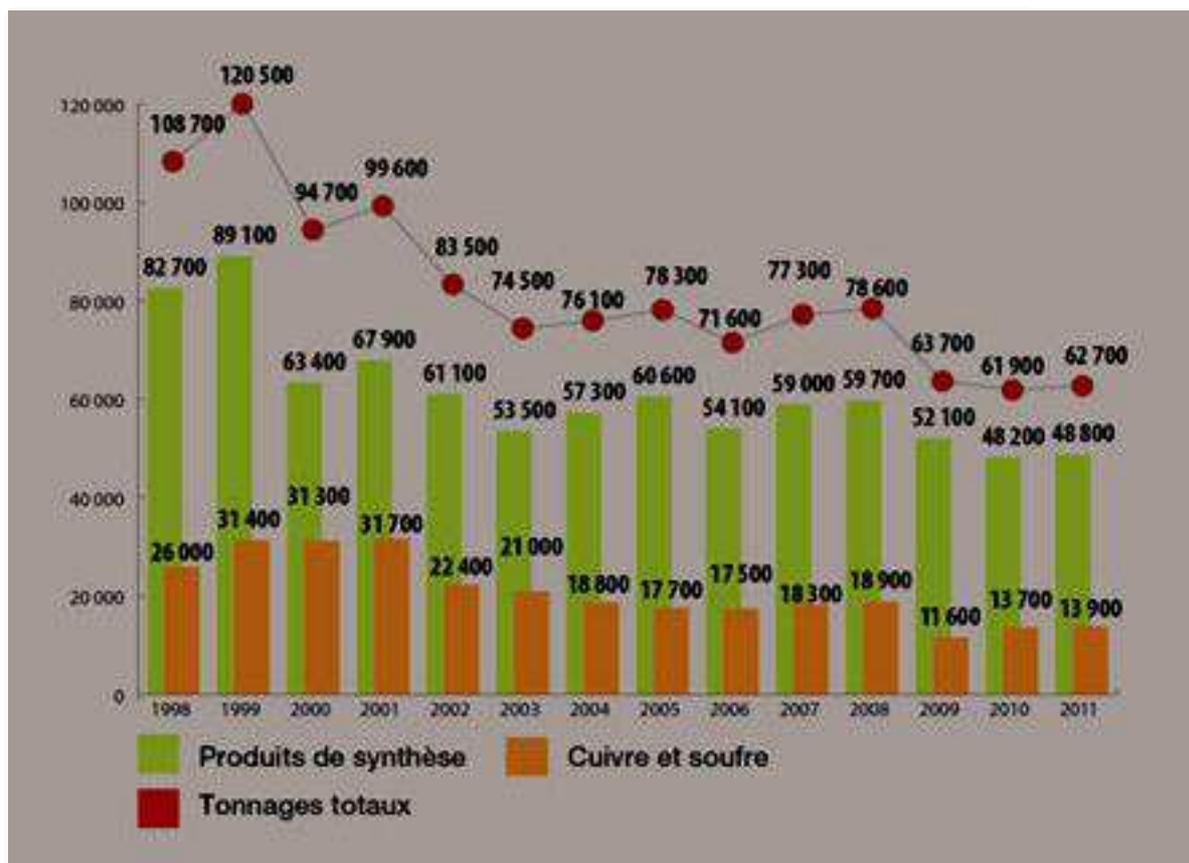


Figure 2 : Tonnage des pesticides vendus entre 1998 et 2011 (Données de l'organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture FAO, FAOSTAT, 2013)

a) **Les insecticides :**

Ce sont principalement des matières organiques de synthèse. L'utilisation de certaines substances minérales ou molécules organiques d'origine naturelle existe toujours mais d'une façon très marginale, c'est le cas de la roténone et des dérivés de la nicotine à titre d'exemple. Des molécules insecticides très efficaces ont été développées durant la deuxième moitié du XX^e siècle. Il s'agit notamment des substances appartenant à la famille des organophosphorés (malathion, diméthoate), des carbamates (aldicarbe, carbofurane) et des pyréthriinoïdes.

b) **Les fongicides :**

Ces molécules ciblent les différents types de champignons afin de protéger les cultures, les stocks des récoltes ou même les semences. Le mildiou de la pomme de terre ou de la vigne, la rouille ou le charbon sont des maladies cryptogamiques contrôlées grâce à des

fongicides tels que les carbamates (carbendazime, mancozèbe), les triazoles (bromuconazole, triconazole), les dérivés du benzène (chlorothalonil, quintozène) ou les dicarboximides (folpel, iprodione). Il est intéressant de signaler que le soufre et le cuivre demeurent d'excellents fongicides utilisés jusqu'à nos jours (Calvet *et al.*, 2005).

c) Les herbicides :

Ils sont utilisés pour lutter contre les adventices des cultures ou « mauvaises herbes ». Ces dernières rentrent en compétition avec les plantes sur la lumière, l'eau, l'espace et les ressources nutritives. Lorsqu'elles sont mêlées aux récoltes, les mauvaises herbes peuvent également être toxiques pour le bétail (renoncules, colchiques et ciguë dans les fourrages secs), donner du goût au lait (achillée, millefeuille) voire rendre l'ensilage dangereux. Après la deuxième guerre mondiale, les herbicides ont connu un très grand développement. La deuxième moitié du XX^e siècle a ainsi connu l'utilisation de nombreuses nouvelles molécules qui étaient trouvées et proposées à l'agriculture. Entre 1950 et 2000 sont apparues les triazines, les urées substituées, les carbamates, les toluidines, les aminophosphonates et les **sulfonylurées**. Ces derniers seront, par la suite, abordés avec plus de détails.

Le tableau 1 donne une idée sur les modalités d'utilisation de chaque type de pesticides cités ci-dessus ainsi que des exemples de certaines substances actives.

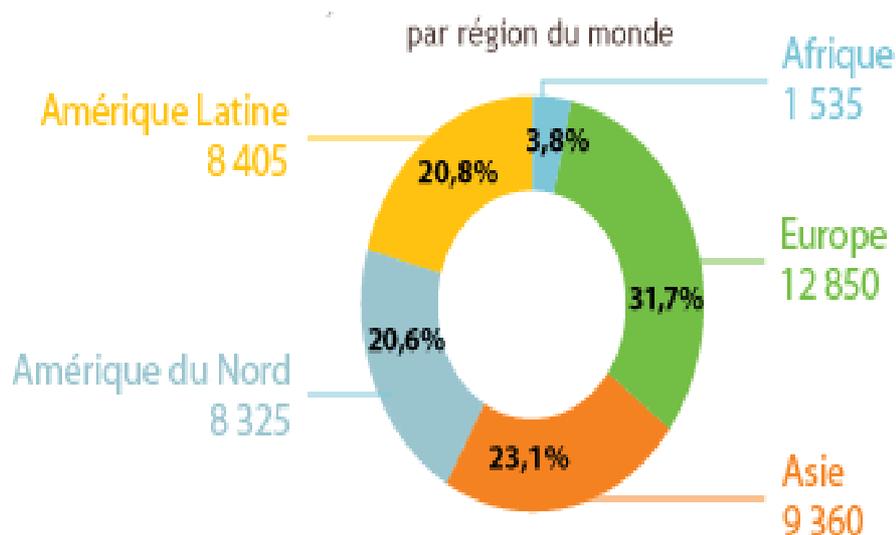


Figure 3 : Marché mondial des pesticides par région du monde (Données de L'Union des Industries de la Protection des Plantes UIPP, 2012)

Tableau 1 : Modalités d'utilisation des pesticides (Calvet *et al.* 2005)

Insecticides	
Modalités d'utilisation	Exemples de substances actives
Traitement des parties aériennes des végétaux	Deltaméthrine, parathion, pyrimicarbe
Traitement des semences	Carbofurane, fipronyl
Traitement des sols	Chlorméphas, diazinon
Traitement des locaux de stockage	Dichlorvos, perméthrine
Traitement des bâtiments d'élevage	Cyperméthrine, trichlorfon
Fongicides	
Modalités d'utilisation	Exemples de substances actives
Traitement des parties aériennes des végétaux	Mancozèbe, bénomyl, éthyrimol, tébuconazol, cuivre, soufre
Traitement des semences et des plants	Captane, iprodione
Traitement des denrées entreposées	Diphénylamine, thiabendazol
Traitement des sols	Carbendazime, métalaxyl, manèbe
Traitement des locaux et du matériel	Ammonium quaternaire
Herbicides	
Modalités d'utilisation	Exemples de substances actives
Désherbage des cultures	Simazine, trifluraline, isoproturon, chlorprophame
Défanage	Diquat
Débroussaillage	2,4-D, piclorame, triclopyr
Désherbage des zones non-cultivées	Glyphosate, aminotriazole, diuron
Destruction des mauvaises herbes aquatiques et semi-aquatiques	Chlorthiamide, dichlobényl

Le développement de l'industrie des pesticides a permis ainsi un très grand progrès de l'agriculture et d'assurer une production alimentaire de qualité. L'augmentation des rendements des terres agricoles a aussi permis de limiter la déforestation. Les experts estiment qu'en 50 ans, l'utilisation des pesticides a permis de préserver 50 % de la surface de la forêt actuelle et d'éradiquer un grand nombre de maladies parasitaires très meurtrières ou d'en limiter la propagation (Gagnon, 2013).

1.2 Une agriculture sans pesticide est-elle possible ?

Comme expliqué ci-dessus, les agriculteurs ont recours aux pesticides pour contrôler les mauvaises herbes et lutter contre les maladies et les insectes ravageurs qui menacent les

rendements agricoles. Le progrès qu'a connu l'industrie des pesticides a eu donc un énorme impact économique. En effet, la production des principales cultures dans le monde a plus que triplé depuis 1960. Tout de même, les cultures vivrières doivent résister à 30 000 espèces de mauvaises herbes, 3 000 espèces de nématodes (vers) et 10 000 espèces d'insectes herbivores, en plus d'un nombre incalculable de maladies. Par conséquent, entre 20 et 40% de la production alimentaire est perdue chaque année à cause des ravageurs malgré l'efficacité et la quantité des antiparasitaires utilisés. Il est alors presque utopique de nos jours d'imaginer une agriculture sans pesticides. Les chiffres prévoient une chute de 40% des rendements agricoles mondiaux dans le cas où l'utilisation des pesticides serait arrêtée. De telles diminutions de la production alimentaire ne peuvent être que dévastatrices pour une population mondiale en croissance continue sachant qu'en dépit de tous les progrès déjà signalés, plus de 850 millions de personnes souffrent de malnutrition dans le monde et plus de 6 millions perdent la vie chaque année (données du Programme Alimentaire Mondial WFP, 2013).

Cependant, sur le plan écologique les pesticides sont tout de même des produits chimiques qui se dispersent dans l'environnement, peuvent transiter d'un compartiment à un autre et devenir ainsi des sources de pollution générale ou ponctuelle (Calvet *et al.*, 2005).

1 Problématique environnementale des pesticides

La première fois où le danger des pesticides sur l'environnement a été soulevé était en 1962 par Rachel Carson. Dans son ouvrage intitulé « *Silent Spring* », elle met en évidence le côté sombre des pesticides, jusqu'alors, considérés comme des molécules divines.

En effet, elle décrit treize molécules actives impliquées dans la mortalité d'oiseaux pêcheurs. Elle les nomma « *Dirty Dozen* » (tableau 2) (Carson, 1962).

Depuis, d'autres cas de mortalité de poissons, de bétails et d'animaux domestiques ont été signalés. Plusieurs études ont montré que les pesticides utilisés terminent généralement dans les cours d'eau environnants ce qui influence négativement la faune et la flore locale (Vecchia *et al.*, 2009). Des recherches récentes estiment que parmi les 2,5 millions de tonnes des pesticides épanchés chaque année dans le monde, uniquement 0,3% atteignent leur cible. 99,7% des pesticides se dispersent dans l'environnement et contaminent ainsi les différentes espèces animales et végétales induisant de graves conséquences.

Il existe plusieurs mécanismes de transport qui permettent aux pesticides de quitter la parcelle et de se retrouver dans l'environnement. Le phénomène de volatilisation des

particules permet aux pesticides de se retrouver dans l'air sous forme gazeuse (Gish *et al.*, 2011). Leur persistance dans l'atmosphère dépend de leur photodégradabilité. Ainsi, certains peuvent voyager dans l'air, s'accumuler, se condenser et retourner dans l'eau ou sur le sol sous forme de précipitations ou de fine particules solides.

D'autre part, les molécules de pesticides qui finissent sur le sol seront soumises à des phénomènes de rétention, d'adsorption, d'infiltration, de diffusion qui sont contrôlés par les propriétés du pesticide et du milieu. Elles peuvent également être transportées par la solution du sol et être entraînées dans les eaux souterraines par des processus d'infiltration et de percolation (Mirsal, 2004). La Figure 4 résume les phénomènes auxquels les pesticides sont soumis une fois dans l'environnement et qui gèrent, par la suite, leur devenir (Barriuso and Houot, 1996).

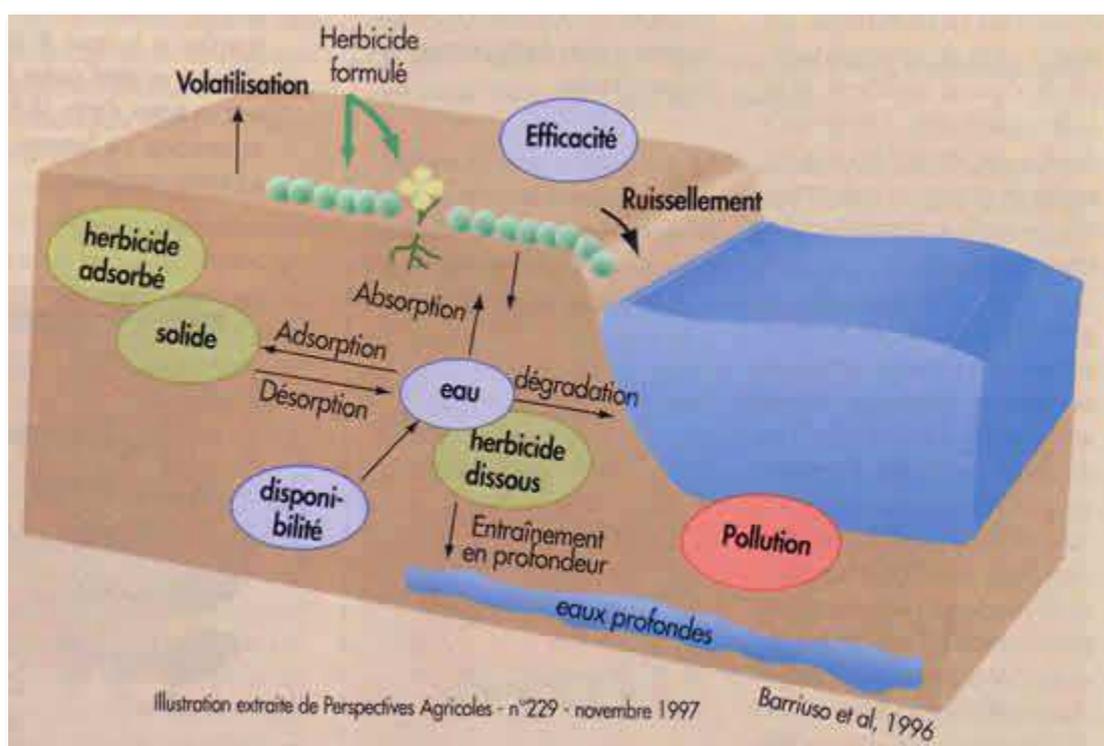


Figure 4 : Écodynamique et transfert des pesticides dans l'environnement (Barriuso and Houot, 1996)

L'immense variété de la structure et de la composition des pesticides utilisés rend le danger de ces molécules plus intense et la prédiction de leur devenir, particulièrement dans un milieu complexe comme le sol, très difficile.

Parmi les principales familles de pesticides incriminées dans des cas de contamination de l'environnement, on peut citer :

-Les organochlorés : ce sont des hydrocarbures chlorés, comme le Dichloro-Diéthyl-Trichloroéthane (DDT) synthétisé dès les années 1940. Ces molécules sont très stables chimiquement. Le DDT a été utilisé partout dans le monde dans la lutte contre les insectes, jusqu'à ce que l'on découvre qu'il était peu dégradable et pouvait se concentrer dans les organismes en bout de chaîne alimentaire, par bioaccumulation, avec des risques certains pour la santé humaine. Son utilisation est aujourd'hui interdite dans de nombreux pays tempérés, mais nous en trouvons encore beaucoup dans les milieux aquatiques. En outre, il continue à être employé dans certains pays tropicaux.

-Les organophosphorés : ce sont des composés de synthèse qui se dégradent assez rapidement dans l'environnement mais qui ont des effets neurotoxiques sur les vertébrés.

-Les pyréthrinoïdes : ce sont des insecticides de synthèse très toxiques pour les organismes aquatiques. Une pollution accidentelle des eaux par ces composés peut être dramatique.

Tableau 2 : Les pesticides écologiquement dangereux selon l'ouvrage « *Silent Spring* » (Rachel Carson 1962)

« Dirty Dozen » Rachel Carson, 1962	Catégorie de pesticide
Aldrine	Insecticide
Aminotriazole	Herbicide
Camphechlor	Insecticide-acaricide
Chlordane	Insecticide
DDT	Insecticide-acaricide
Dieldrine	Insecticide
Dinitro-herbicide	Herbicide
Endrine	Insecticide
HCB	Fongicide
HCH	Insecticide
Mirex	Insecticide
Telodrin	Insecticide
Toxaphen	Insecticide

*DDT : Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane

*HCB : Hexa-Chloro-Benzène

*HCH : gamma-Hexa-Chloro-Hexane

2.1. Contamination des eaux par les pesticides

Depuis les années 1990 et jusqu'à nos jours, la pollution des eaux par les pesticides a fait l'objet d'un très grand nombre de publications scientifiques décrivant l'état phytosanitaire et la qualité des eaux provenant de milieux très divers (eau douce, eau de mer, eau d'océan, eau de surface, eau souterraine ou d'irrigation) ainsi que l'accumulation des résidus de pesticides dans les organismes vivants aquatiques (poissons et invertébrés) (Bunzel *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2007; Köck-Schulmeyer *et al.*, 2013; De Liguoro *et al.*, 2013; Di Lorenzo

et al., 2013; Masiá *et al.*, 2013). La contamination des eaux par les pesticides est la plus étudiée par rapport à celle des autres compartiments (sol et atmosphère).

En Europe, ce n'est qu'au début des années 1980 que la qualité des eaux, (souterraine et de surface) et sa préservation des différents contaminants ont commencé à attirer l'attention des responsables. Ainsi, le Conseil des Comités Européens a approuvé la directive 91/414/EEC et 98/8/EC en 1991 et 1998 respectivement. Ces deux directives ont pour objectif de déterminer la réglementation et les lois qui gèrent l'utilisation et la commercialisation des pesticides au sein de l'Union Européenne (Köck-Schulmeyer *et al.*, 2013). D'autres directives (2000/60/EC en 2000 et 2006/118/EC en 2006) sont ensuite apparues pour déterminer les doses maximales des résidus de pesticides dans les eaux souterraines et de surface. Les lois européennes ont ainsi interdit l'utilisation de plusieurs substances (telles que les composés organochlorés) en raison de leur toxicité élevée et leur persistance dans l'environnement. Malgré leur interdiction, des traces de ces molécules sont retrouvées jusqu'à présent particulièrement dans les eaux souterraines ce qui confirme la difficulté de leur dégradation.

En 2004, L'Institut Français de l'Environnement (IFEN) avançait que 80% des eaux de surface et 57% des eaux souterraines analysées présentent des concentrations en pesticides supérieures au seuil de potabilité et induisent la perturbation du milieu aquatique. La majorité des molécules détectées appartiennent à des familles d'herbicides.

L'étude de Loos *et al.* (2010) est considérée comme étant la plus récente et exhaustive en Europe. Celle-ci montre que les produits de dégradation de l'herbicide triazine (en particulier l'atrazine, desethylterbutylazine, simazine, et la terbutylazine) sont les contaminants majeurs de l'eau souterraine en Europe malgré leur interdiction depuis 2004. Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Köck Schulmeyer *et al.* (2013), dans laquelle les résidus indiqués ci-dessus ont été détectés dans la moitié des échantillons étudiés (233 échantillons d'eau souterraine provenant de différentes régions d'Espagne).

Il est important de signaler que les réglementations gérant l'utilisation et la commercialisation des pesticides deviennent de plus en plus rigoureuses dans les pays développés alors que, l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) estime que 500 000 tonnes de pesticides obsolètes ont été pulvérisés en Afrique, en Asie et en Amérique latine pendant ces dernières années (Köhler and Triebkorn, 2013).

2.2 Contamination des sédiments par les pesticides :

Les sédiments constituent un élément privilégié pour rechercher l'état de la pollution d'un système aquatique. En effet, la plupart des polluants chimiques sont adsorbés sur les matières en suspension et ont tendance à sédimenter. Leur analyse permet de situer les apports de polluants et de déterminer leur dispersion dans le milieu environnant. L'étude de l'accumulation des organochlorés au niveau des sédiments a connu beaucoup d'intérêt de par le monde. La norme est fixée entre 1 et 15ng/g (Peris *et al.*, 2005).

Masiá *et al.* (2013) ont étudié l'accumulation de cinq pesticides différents dans les eaux d'une rivière en Espagne, entre 2010 et 2011. Ils ont montré que parmi les cinq pesticides étudiés, les organophosphorés et les triazines sont les plus détectés. La concentration des produits de dégradation de ces deux molécules dans les sédiments est beaucoup plus importante que les molécules d'origine. Des résidus d'atrazine étaient également trouvés dans les sédiments malgré leur interdiction en Europe depuis 2004. Ceci indique, non seulement sa persistance dans l'environnement mais aussi son utilisation illégale.

Note : Les POP et la santé humaine et animale

***Effets des pesticides sur la santé humaine et animale :**

La subsistance et la toxicité des pesticides dans l'environnement varient selon leur nature chimique. Certains sont soumis à différents types de dégradation (chimique ou biologique). Certains produits de dégradation sont plus toxiques que les molécules d'origine elles mêmes. Des pesticides, comme les organochlorés persistent dans l'environnement pendant plusieurs années et finissent dans la chaîne alimentaire. C'est ce que l'on appelle des **Polluants Organiques Persistants**.

Le danger des Polluants Organiques Persistants (POP) réside dans :

- leur rémanence dans l'environnement
- leur accumulation dans les graisses et via la chaîne alimentaire notamment chez les sur-prédateurs comme l'homme.
- leur persistance dans les milieux marins et aquatiques
- leur implication directe dans l'apparition de certaines maladies telles que le cancer, l'altération du système immunitaire et les problèmes de reproduction.

En mai 2001, la convention de Stockholm a recensé, via le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE), 12 familles de pesticides POP. Ces derniers ont été retirés du marché et interdits aux États Unies et dans certains pays de l'Union Européenne.

Des résidus de ces pesticides POP sont actuellement encore retrouvés dans les cours d'eau. De plus, ils ont été remplacés par d'autres pesticides comme les organophosphorés, qui sont utilisés à moindre doses mais qui sont plus toxiques et finissent par se retrouver dans nos aliments (fruits, légumes et céréales traités).

Les POP s'accumulent dans les tissus adipeux, le cerveau, le sang, le lait maternel, le foie, le placenta, le sperme et le sang du cordon ombilical. En Europe, On estime que chaque adulte héberge près de 500 produits industriels différents qui se sont accumulés au fil des ans dans les tissus adipeux. Car, contrairement au dogme connu chez les toxicologues, la contamination par les produits chimiques tels que les pesticides, n'est pas seulement liée à la dose d'exposition mais surtout à sa fréquence. On parle de contamination *chronique*.

Une étude aux États-Unis réalisée en 1998 a trouvé que plus de 600 000 enfants absorbent chaque jour une dose de pesticides supérieure à la dose journalière permise. De même, l'état hollandais a recensé, en 2000, plus de 2% des enfants qui reçoivent une dose journalière de pesticides suffisante pour déclencher des symptômes d'empoisonnement par la consommation des fruits et des légumes.

Les agriculteurs restent la catégorie la plus exposée à la contamination par les pesticides. Ils peuvent être contaminés lors des différentes étapes de leur utilisation. La contamination par voie cutanée reste la principale voie d'exposition (80% des cas).

Selon une étude de L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2012, les cas de cancer ont augmenté de 63% en 20 ans. La majorité des cas est liée à des raisons environnementales, particulièrement l'utilisation des pesticides (Lichtenstein *et al.*, 2000). Selon l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), il existe un lien direct entre l'apparition de la maladie de Parkinson et l'utilisation de pesticides, en particulier les insecticides et les herbicides, chez les personnes qui y sont exposées professionnellement. D'autres études épidémiologiques révèlent le lien entre la mort fœtale et l'apparition de malformations congénitales après une exposition professionnelle maternelle aux pesticides. Des cas de leucémies et de tumeurs cérébrales ont été signalés dans les méta- analyses récentes (Ferrer, 2003; Ntzani *et al.*, 2013).

L'homme n'est pas le seul à subir les dangers des pesticides. De nombreux animaux qui contribuent à l'équilibre de l'écosystème risquent de disparaître. A titre d'exemple, l'orque serait dorénavant le prédateur le plus pollué d'arctique, devant l'ours blanc. En effet, les graisses de ces animaux qui se situent au bout de la chaîne alimentaire, cumulent des quantités inquiétantes de pesticides qui transitent par les oiseaux migrateurs et les eaux de surface. N'oublions pas la polémique à propos de la disparition massive des abeilles dans différentes régions du monde. Des pesticides sont incriminés dans ce phénomène. En effet, une étude de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, 2012) a démontré que l'insecticide *Cruiser* dont les substances actives sont : le thiaméthoxam, le fludioxonil et le métalaxyl-M, est responsable d'une désorientation mortelle des abeilles et ceci même à une dose sublétales. Cette étude a conduit à l'interdiction de ce pesticide et son retrait du marché français.

2 Les herbicides:

Les herbicides sont des substances ayant la capacité d'éliminer les adventices (ou mauvaises herbes). Leur emploi ne se limite pas au domaine agricole, ils sont utilisés aussi bien pour la protection des cultures que pour le confort (jardinage, entretien des villes, des voies ferrées...). Ce large spectre d'usage donne à ces molécules un caractère ubiquitaire (Calvet *et al.*, 2005).

Comme tous les pesticides, les herbicides ont connu un très grand développement depuis le XIX^e siècle (Figure 5). A partir des années 1950, le marché des herbicides a reçu un grand nombre de nouvelles molécules (toluidines, aminosulphonates, triazines...). Les molécules synthétiques ont remplacé les substances naturelles telles que le soufre depuis les années 1990. La composition chimique des herbicides de synthèse est souvent très complexe ce qui rend difficile la compréhension de leur danger sur l'environnement et la prévision de leur devenir. Actuellement, les herbicides occupent la deuxième position après les fongicides, en matière de consommation dans le monde (données de l'Union des Industries de la Protection des Plantes UIPP, 2012) bien que les statistiques indiquent que les taux de consommation soient en baisse de 1,7% par rapport aux années précédentes.

Parmi l'arsenal des molécules actives à effet herbicide existant actuellement sur le marché, certaines exercent un désherbage total d'autres un désherbage sélectif. Celles à effet total éliminent toute la végétation qui leur est exposée tandis que les molécules sélectives n'éliminent en général qu'une ou deux espèces définies de mauvaises herbes sans pour autant affecter grandement les cultures. Ce dernier type d'herbicides est le plus utilisé en agriculture. La sélectivité des herbicides est liée à la nature des plantes cibles mais aussi à la structure chimique de la molécule active. Ainsi, les herbicides ont été regroupés en familles rassemblant les molécules ayant approximativement la même structure chimique et par conséquent, le même mode d'action. Le mode d'action d'un herbicide regroupe tous les phénomènes intervenant dans la destruction de la plante cible. Ces phénomènes commencent par la pénétration de la molécule active dans le végétal, son déplacement jusqu'à l'atteinte de sa cible biochimique, son interaction avec sa cible jusqu'à la mort ou l'arrêt de la croissance du végétal passant, bien évidemment, par la métabolisation que pourrait subir l'herbicide au sein de la plante (Gauvrit, 1996).

HERBICIDES	
Avant 1900	Sulfate de cuivre ● Sulfate de fer
1900 - 1920	Acide sulfurique ●
1920 - 1940	Colorants nitrés ▼ ●
1940 - 1950	Phytohormones... ●
1950 - 1960	Triazines, Urées substituées ▼ ● Carbamates
1960 - 1970	Dipyridyles, Toluidines... ●
1970 - 1980	Amino-phosphonates ● Propionates...
1980 - 1990	Sulfonyl urées... ●
1990 - 2000	▼ ▼ ▼ ▼ ▼

Figure 5 : Évolution chronologique de l'utilisation des herbicides (Données de l'Union des Industries de la Protection des Plantes UIPP)

3.1 Classification des herbicides :

Il existe plusieurs classifications des herbicides et toutes sont valables. Elles se basent sur leur structure, leur cible, leur formulation... Le but du travail effectué détermine le type de classification choisi. Dans le contexte de notre recherche, nous avons choisi la classification selon le mode d'action comme résumé dans le tableau 3 (Calvet *et al.*, 2005).

Tableau 3 : Classification des herbicides selon leur mode d'action (Calvet *et al.* 2005)

Herbicides		
Mode d'action		Famille chimique
Herbicides affectant la photosynthèse proprement dite	Herbicides agissant par blocage de la protéine D1 du photosystème II	amides benzothiadiazones carbammates pyridazinones hydroxybenzonnitriles 1,3, 5-triazines urées substituée
	Inhibiteurs de photosynthèse par détournement d'électrons à la sortie du photosystème I	bipyridiniums (ammonium quaternaires)
Herbicides inhibiteurs de la synthèse des lipides	Inhibition de l'enzyme ACCase	acides arylphénoxy-propioniques cyclohexanediones oximes
	Inhibition des élongases (enzymes conduisant aux acides gras de plus de 18C, précurseurs des cires et de la subérine)	acides organiques halogénés benzofuranes
	Inhibition des élongases et des enzymes conduisant aux gibbérellines	acétamides chloroacétanilides oxyacétamides thiocarbammates
Herbicides inhibiteurs de la synthèse des acides aminés	Inhibition de l'enzyme conduisant à la synthèse de la glutamine	aminophosphonates acides phosphiniques
	Inhibition de l'enzyme conduisant à la synthèse des acides aminés aromatiques	organophosphorés glycines
	Inhibition de l'enzyme conduisant à la synthèse des acides aminés ramifiés	imidazolines sulfonylurées triazolopyrimidines
Herbicides perturbant la régulation de l'auxine AIA ⁺	Herbicides auxiniques	acides phénoxyalcanoïques acides benzoïques acides pyrimidiques acides quinoléine-carboxyliques
Herbicides inhibiteurs de la division cellulaire à la métaphase	Herbicides bloquant les MTOC et désorganisant les fuseaux achromatiques	carbammates
Herbicides perturbant la croissance	Inhibiteurs de transport auxinique et inversion du géotropisme	acides phtaliques
	Inhibiteurs de la synthèse de la cellulose de la paroi pecto-cellulosique	acides quinoléines carboxyliques benzammides benzonnitriles

a) Les herbicides inhibant la photosynthèse :

Ils agissent par le blocage de la protéine D1 du photosystème II ou par le détournement des électrons à la sortie du photosystème I (Barbosa *et al.*, 2012). C'est le mode par lequel les carbamates, les ammoniums quaternaires et les urées substituées agissent.

b) Les herbicides inhibant la synthèse des lipides :

Les plus connus sont les inhibiteurs de l'acétyl CoA carboxylase (ACCase). Ces herbicides agissent uniquement contre les graminées. Les plantes cibles ont tendance à devenir résistantes à ce groupe. D'autres inhibiteurs de synthèse des lipides existent, leur action cible les enzymes impliquées dans l'élongation des chaînes des acides gras (Yang *et al.*, 2010). Parmi ce type d'herbicides on peut citer : les thiocarbamates, les acétamides et les benzofuranes.

c) Les herbicides perturbant la régulation de l'auxine :

Le site d'action de ce type d'herbicides n'est pas précisément élucidé. Ils agissent sur les dicotylédones. La résistance à ces herbicides ne pose pas de problème à l'heure actuelle. Nous pouvons citer à titre d'exemple les acides phénoxy-alcanoïques et les acides pyrimidiques.

d) Les herbicides inhibant la division cellulaire à la métaphase :

Ces herbicides agissent en bloquant la synthèse de la tubuline ou de l'acide folique ce qui arrête la formation des fuseaux achromatiques. Ceci est le mode d'action des carbamates.

e) Les herbicides perturbant la croissance :

Ils inhibent la synthèse de la cellulose, des pigments, ou des microtubules pendant la mitose et bloquent ainsi la division cellulaire. C'est le cas des dinitroanilines et des pyridines.

f) Les herbicides inhibant la synthèse des acides aminés :**•Inhibiteurs des acides aminés aromatiques**

Ils bloquent la 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS), enzyme qui participe à la biosynthèse des acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane et tyrosine) (Wakabayashi and Böger, 2002). Elle existe uniquement chez les plantes et les microorganismes. Les organophosphorés en font partie et le glyphosate est l'herbicide le mieux connu dans ce groupe.

•Inhibiteurs des acides aminés à chaînes ramifiées

Ce sont les inhibiteurs de l'Acétolactate Synthase (ALS) aussi connue sous le nom d'Acétohydroxyacide Synthase (AHAS). Les sulfonylurées appartiennent à cette famille d'herbicides.

3.2 Les Sulfonylurées :

Au milieu de tous les problèmes environnementaux causés par les pesticides, et les herbicides en particulier, sont apparus les Sulfonylurées. Des molécules à très faible dose d'utilisation et très peu toxiques pour l'homme et les mammifères. Avec eux, une nouvelle ère dans l'histoire des produits phytosanitaires a commencé.

Les propriétés herbicides des sulfonylurées ont été développées à la fin des années 1970 (Lee *et al.*, 2013a). Le premier herbicide sulfonylurée commercialisé était le chlorsulfuron en 1981. Depuis, les sulfonylurées sont quasiment dans tous les programmes de désherbage des cultures sur toute la planète (blé, colza, maïs, riz, pomme de terre...). Aujourd'hui, plus de 50 produits différents sont disponibles sur le marché (Lee *et al.*, 2013b). Les sulfonylurées ont connu un très grand succès non seulement grâce à leur efficacité sur un très large spectre de mauvaises herbes (des dicotylédones aux vivaces sans oublier les graminées) mais surtout à leur dose d'utilisation qui ne dépasse pas 10 à 40g/ha (contrairement à ce qui était connu avant : 500 à 2000g/ha) et leur faible toxicité sur l'homme et les mammifères (Berger *et al.*, 1998; Brown, 1990; Hang *et al.*, 2012; McCourt and Duggleby, 2006; Sarmah and Sabadie, 2002).

3.2.1 Structure chimique et activité herbicide des sulfonylurées :

La structure chimique générale des sulfonylurées est représentée dans la Figure 6. Ils sont constitués de trois parties distinctes : le groupement Aryle, le Pont et l'Hétérocycle. Chacune de ces trois parties joue un rôle indispensable quant à l'activité herbicide de la molécule. Ainsi, le niveau de l'activité herbicide de la molécule sulfonylurée varie selon sa composition. Brown (1990) a rapporté que l'activité herbicide est de haut niveau lorsque le cycle aromatique est *ortho* substitué. Quant à l'hétérocycle, qui est un dérivé de la triazine le maximum d'activité herbicide est obtenu quand il est substitué par des groupements alkyl ou alkoxy (Brown, 1990; Martins and Mermoud, 1999). Par contre, les sulfonylurées à pont non

substitué sont plus actifs. Le tableau 4 donne un aperçu sur le niveau d'activité de certains sulfonylurées selon leurs constituants.

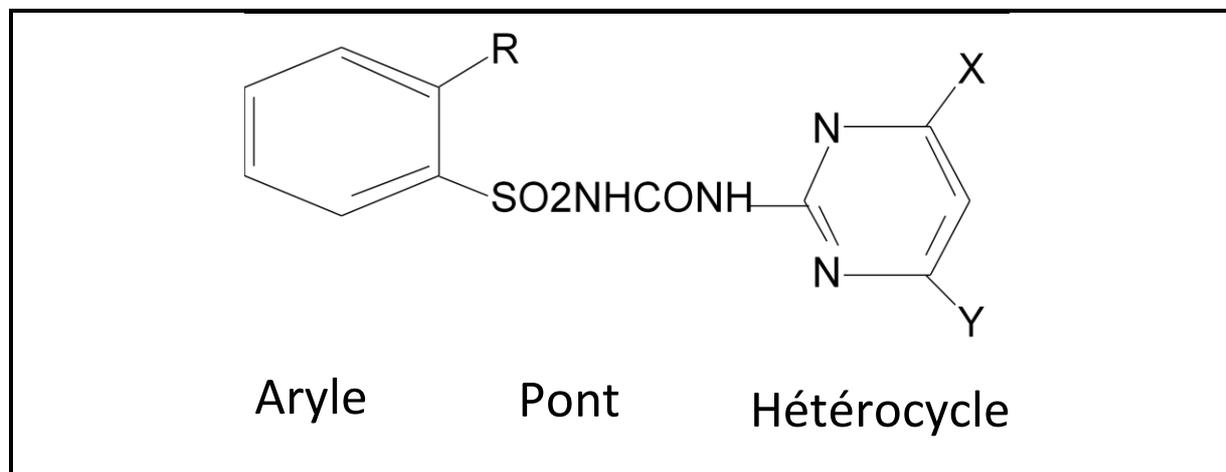
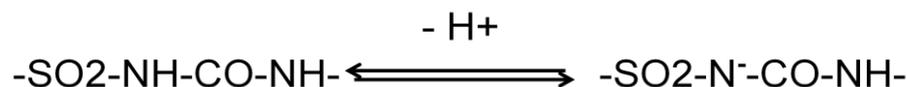


Figure 6 : Structure générale des sulfonylurées

Groupements R activants la fonction herbicide: CO₂CH₃; NO₂; F; Cl; Br; SO₂CH₃; SCH₃; SO₂N(CH₃)₂; CF₃; CH₂OCH₃; OCF₃. Groupements non activant: COOH; OH; X=CH₃; Y=OCH₃

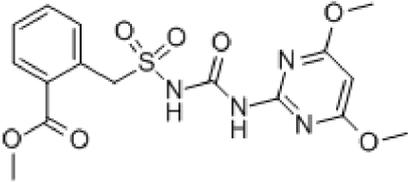
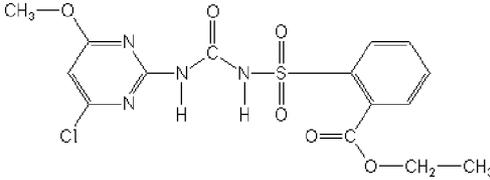
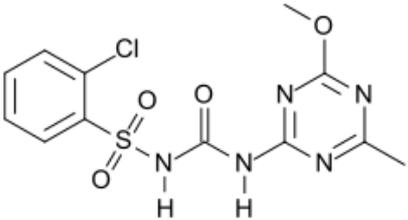
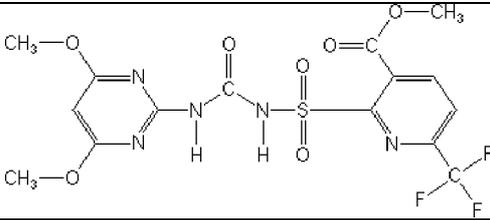
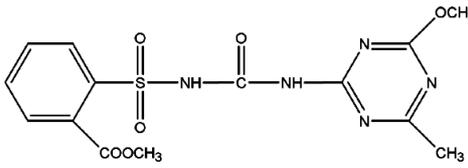
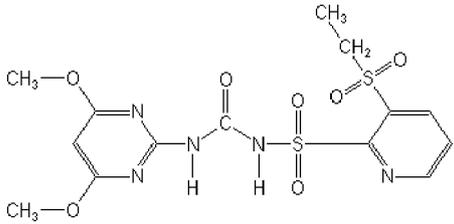
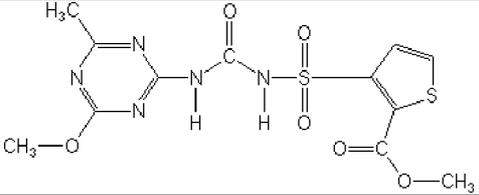
3.2.2 Propriétés physicochimiques des sulfonylurées :

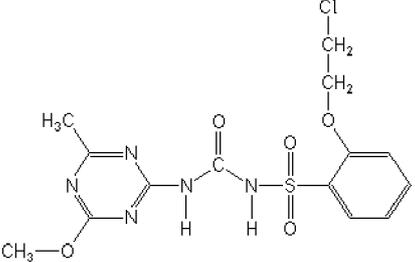
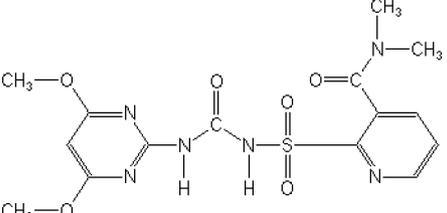
Les sulfonylurées ont une très faible volatilité et ne sont pas photodégradables (Sondhia *et al.*, 2013). Ils ont tous un proton acide adjacent au groupement sulfonyle et se comportent ainsi comme des acides faibles avec des valeurs de pKa allant de 3 à 5 ce qui rend leur solubilité dans l'eau (pH 7) dix fois plus importante que dans les solvants acides (pH 5) (Beyer *et al.*, 1988).



Le tableau 5 donne les constantes physiques de quelques sulfonylurées commercialisées. Ces caractères jouent un rôle très important dans le devenir des sulfonylurées dans l'environnement.

Tableau 5 : Propriétés physicochimiques de quelques

Herbicide	Structure chimique	Propriétés physicochimiques
Bensulfuron-méthyle		PM: 310,4 PF: 185-188°C pKa: 5,2 SE mg/l: 2,9 (pH 5), 12 (pH 6), 120 (pH 7), 1200 (pH 8)
Chlorimuron-éthyle		PM: 414,83 PF: 186(±1)°C pKa: 3,3 SE mg/l: 270 (pH 4,6), 1750 (pH5,4), 9500 (pH 6,1)
Chlorsulfuron		PM: 357,78 PF: 174-178°C pKa: 3,8 SE (mg/l): 60 (pH 5), 7000(pH 7)
Flupyrsulfuron-méthyle		PM: 487,4 PF: 165-170°C pKa: 4,9 SE (mg/l): 62 (pH5), 603 (pH 6)
Metsulfuron-méthyle		PM: 381,37 PF: 163-166°C pKa: 3,3 SE (mg/l): 270 (pH 4,6), 1750 (pH5, 4), 9500 (pH 6,1)
Rimsulfuron		PM: 431,45 PF: 176-178 pKa: 4,0 SE (mg/l): 135 (pH 5), 7300 (pH 7), 5560 (pH 9)
Thifensulfuron-méthyle		PM: 364,4 PF: 203-205°C pKa: 5,3 SE (mg/l): 10 (pH 5), 70 (pH 7)

Triasulfuron		PM: 401,83 PF: 186°C pKa: 4,0 SE (mg/l): 5 (pH 2,5), 40 (pH 5), 1500 (pH 7), 10 000 (pH 8)
Nicosulfuron		PM: 410,4 PF: 141-144°C PKa: 4,3 SE (mg/l): 400 (pH 5), 12000 (pH 7), 39200 (pH 9)

PM: poids moléculaire (g/mol); PF: point de fusion (°C); pKa: constante d'acidité, SE: solubilité dans l'eau (mg/l).

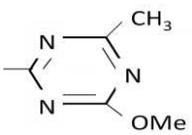
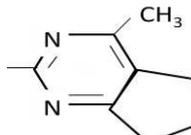
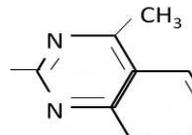
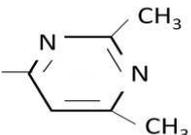
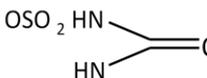
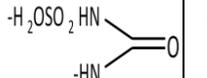
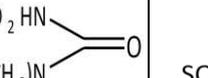
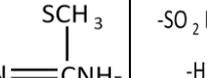
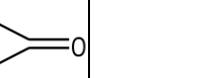
3.2.3 Modes d'action des sulfonylurées :

L'activité herbicide des sulfonylurées est basée sur l'inhibition de l'Acétolactate Synthase (ALS). C'est une enzyme FAD-dépendante de la famille des thiamine-diphosphates (ThDP). Elle catalyse les premières étapes de la synthèse des acides aminés à chaîne aliphatique (valine, leucine et isoleucine) chez les plantes supérieures, les bactéries et les champignons (Choi *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2013a; McCourt and Duggleby, 2006).

L'ALS est absente chez les mammifères y compris l'homme ce qui explique la faible toxicité des sulfonylurées sur ces organismes (Hang *et al.*, 2012; Lu *et al.*, 2011; Umbarger and Brown, 1958).

Après absorption, l'herbicide migre dans les plantes sensibles et bloque l'ALS et par conséquent la division cellulaire ce qui induit l'arrêt de la croissance de la plante (Beyer *et al.*, 1988). Ceci se traduit par l'apparition de jaunissements (chlorose) ou de rougissements (anthocyanose) chez les plantes adventices quelques jours après le traitement suivis par la disparition totale des mauvaises herbes. Les plantes résistantes échappent à l'effet des sulfonylurées à travers un métabolisme différentiel qui entraîne une désactivation rapide de l'effet herbicide permettant la sélectivité des sulfonylurées. Les mécanismes moléculaires de désactivation de l'ALS par les sulfonylurées ne sont toujours pas bien élucidés (McCourt and Duggleby, 2006).

Tableau 4 : Niveaux d'activité des sulfonilurées selon leurs constituants

Selon le radical						
R	CO ₂ CH ₃	NO ₂	SO ₂ CH ₃	Cl	CO ₂ H	OH
Niveau d'activité (g/ha)	1-2	4-8	8-16	8-16	>400	>2000
Selon l'hétérocycle						
Hétérocycle						
Niveau d'activité (g/ha)	1-2	16-31	62-125	1000		
Selon le pont						
Le pont						
Niveau d'activité (g/ha)	1-2	8-16	16-31	16-31	31-62	

Niveau d'activité : Taux nécessaire appliqué pour contrôler plus de 70% des mauvaises herbes.

3.2.4 Cas du Chevalier® OnePass

Chevalier® OnePass est un herbicide largement utilisé en particulier pour la protection des céréales contre différentes mauvaises herbes, aussi bien les graminées que les dicotylédones. Il est composé de deux molécules actives : l'iodosulfuron-méthyle sodium (ISMS) et le mésosulfuron-méthyle (MSM). Ces deux molécules appartiennent à la famille des sulfonilurées.

a) L'iodosulfuron-méthyle sodium :

L'iodosulfuron-méthyle sodium (ISMS), [sodium ([5-iodo-2-(methoxycarbonyl)phenyl] sulfonyl) carbamoyl] (4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl) azanide] (Figure 7a), est la variante de l'iodosulfuron-méthyle actuellement commercialisée sur le marché. C'est une molécule appartenant à la famille des sulfonilurées.

Elle a un effet herbicide et peut être absorbée aussi bien par le feuillage que par les racines des mauvaises herbes. Comme tous les sulfonilurées, elle agit en inhibant la synthèse de l'ALS. Principalement utilisée pour la protection des céréales, elle est appliquée en post-émergence c'est-à-dire après l'apparition des plantules.

b) Le mésosulfuron-méthyle :

Le mésosulfuron-méthyle (MSM) [methyl 2-[(4,6-diméthoxyypyrimidin-2-ylcarbamoyle)sulfamoyl]- α (methanesulfonamido)-ptoluate] (Figure 7b), connu sur le marché sous le nom de Mesomaxx est la seule variante du mésosulfuron commercialisée. Cette molécule appartient à la famille des sulfonilurées et doit sa fonction herbicide à l'inhibition de l'ALS. Le mésosulfuron-méthyle est plus actif sur les feuilles que sur les racines. Il est appliqué en post-émergence.

Chevalier® OnePass contient une troisième molécule appelée mefenpyr-diéthyle qui agit comme phytoprotecteur. Il atténue l'effet des molécules actives sur les céréales et améliore la dégradation de l'herbicide ce qui lui confère une très grande sélectivité (Bayer CropScience, Algérie).

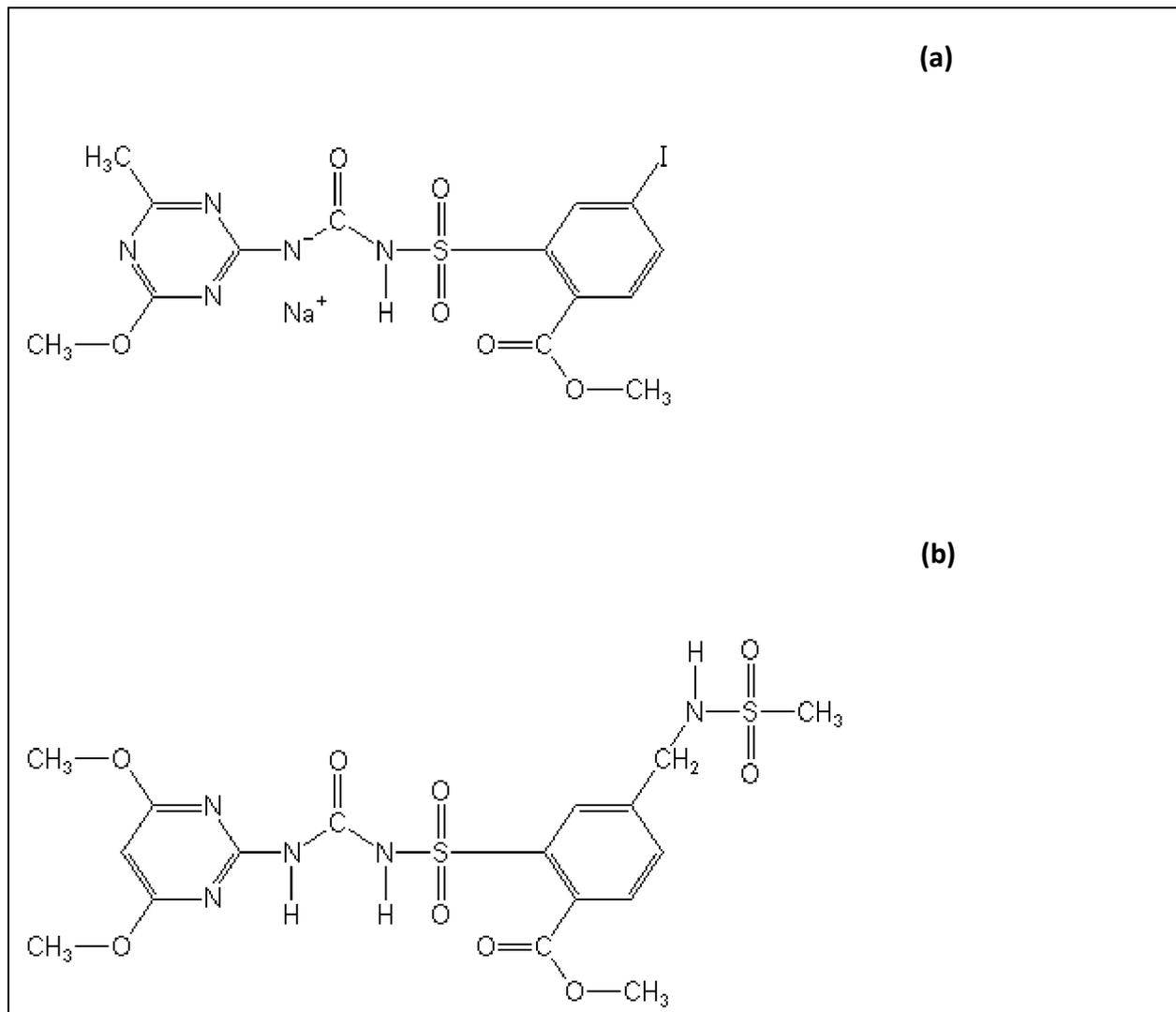


Figure 7 : Structure chimique de (a) l'iodosulfuron-méthyle sodium et (b) le mésosulfuron-méthyle, Les deux molécules actives de l'herbicide Chevalier® OnePass

3 Devenir des sulfonyles dans le sol :

La compréhension du devenir et du comportement des sulfonyles dans le sol est d'une importance primordiale pour le système agricole et la protection de l'environnement (Sarmah and Sabadie, 2002). Cependant, deux problèmes s'opposent à cette mission et constituent de véritables défis pour les chimistes et les biologistes. Il s'agit de :

- leur faible dose d'utilisation, et
- leur haute mobilité dans le sol à cause de leur nature anionique, particulièrement dans les sols alcalins ce qui est le cas de la majorité des terres agricoles.

Il est important de noter que le principe de « dose minimale, efficacité maximale », apporté avec la mise des sulfonyles sur le marché, a certainement été un très grand succès économique mais un véritable problème environnemental, contrairement à ce qui était attendu. En effet, il soulève deux difficultés. D'une part, la grande activité de ses produits permet d'en utiliser peu mais ne met pas à l'abri la possibilité d'avoir des effets nocifs sur des cibles non visées malgré leur grande spécificité. D'autre part, les faibles doses utilisées rendent la détection de traces de ces molécules actives dans le sol très difficile nécessitant l'emploi de techniques très sophistiquées (Calvet *et al.*, 2005; Sarmah and Sabadie, 2002). Ainsi, les techniques d'analyse employées doivent avoir une sensibilité de l'ordre de ppb et ppt (partie par 10^9 et partie par 10^{12} respectivement) pour pouvoir détecter les molécules de sulfonyles dans l'environnement et même les aliments (Degelmann *et al.*, 2006).

Pour répondre à ce besoin, des techniques telles que l'*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Analysis* (ELISA), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), *Mass Spectrometry* (MS) et *Gaz Chromatography* (GC) ont été employées (Sarmah and Sabadie, 2002).

4.1 Adsorption/Désorption :

Le premier phénomène qui influence le devenir de tous les herbicides dans le sol est le processus d'adsorption/désorption. C'est un phénomène primordial dans tous les modes de transfert des polluants organiques. L'adsorption est définie comme étant la fixation par réaction physico-chimique de composés en solution à la surface de particules solides, la désorption est le phénomène inverse. Ce processus est toujours exothermique. Il peut être

irréversible (chimisorption impliquant des liaisons de forte énergie) ou réversible (physisorption impliquant des liaisons de faible énergie) et peut être influencé par plusieurs facteurs (température, pH du sol, distribution de la taille des particules, composition du sol).

Dans le cas des sulfonilurées, les études ont rapporté que dans la majorité des sols agricoles (pH>6) des molécules telles que le monosulfuron, cinosulfuron, bensulfuron-méthyle, le triasulfuron et le flupyrsulfuron-méthyle se trouvent sous forme ionique et présentent par conséquent une faible adsorption aux constituants du sol (Morrice *et al.*, 2000; Nègre *et al.*, 2005; Pusino *et al.*, 2003; Rouchaud *et al.*, 1999; Si *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2009). Ces études ont confirmé aussi que le niveau d'adsorption augmente avec la teneur en matière organique du sol.

4.2 Mobilité :

La mobilité dans le sol est définie comme étant l'ensemble des flux de masse des fractions dissoutes intervenant au niveau microscopique par diffusion, et au niveau macroscopique par convection et dispersion. Elle dépend des caractères du sol : sa texture, sa porosité, sa densité, son taux d'humidité, des courants d'eau dans les couches du sol et de la stabilité des agrégats. Elle est fonction aussi des caractéristiques de la molécule active et de ses capacités d'adsorption. Ainsi, une molécule à faible niveau d'adsorption présente une forte mobilité dans le sol et vice versa. Ces phénomènes déterminent la capacité des polluants à se retrouver dans les milieux aquatiques et donc leur devenir dans l'environnement.

Les études ont montré que les sulfonilurées présentent une très haute mobilité dans les sols (Hemmamda *et al.*, 1994; Sondhia, 2009) ce qui correspond à leur faible adsorption et leur haute solubilité dans l'eau (Martins and Mermoud, 1999). Ceci entraîne un lessivage potentiel en temps de pluie et en cas d'irrigation. Cependant, à cause de leur instabilité dans l'eau les sulfonilurées sont très rarement retrouvés dans les eaux souterraines comme dans le cas du flupyrsulfuron-méthyle décrit par Rouchaud *et al.* (1999). Il faut par contre prendre en considération le cas où leurs produits de dégradation présentent une plus forte stabilité et donc une forte persistance dans le sol ce qui augmente le risque de contamination des nappes phréatiques. Ce cas a été vérifié avec le rimsulfuron qui est très rapidement dégradé dans le sol mais dont l'un des deux métabolites présente une forte persistance et donc un risque potentiel de contamination des eaux souterraines (Martins and Mermoud, 1999). De même, des concentrations dépassant 0,2mg/l de résidus de bensulfuron-méthyle ont été enregistrées dans des eaux souterraines en Italie (Wei *et al.*, 1998).

4.3 Persistance :

La persistance des herbicides, comme celle de toute molécule active, peut être indiquée par leur temps de demi-vie (t_{50}). Cette valeur détermine le temps que met une substance pour perdre la moitié de son activité. Pour les sulfonyles, la persistance dans le sol est strictement reliée aux variations de la température et du pH. Ces deux facteurs déterminent le type de dégradation qui peut avoir lieu (biotique ou abiotique) et par conséquent la durée de vie de la molécule active. Des écarts immenses ont été enregistrés selon la variation du pH et de la température dans les conditions de laboratoire. Ainsi, le temps de demi-vie du cinosulfuron à 30°C a varié de 3 à 43 jours pour des pH de 4 et 6 respectivement alors qu'il atteint une année dans un pH qui varie entre 7 et 9. L'augmentation de la température à des valeurs entre 40 et 45°C rend les temps de demi-vie beaucoup plus longs (Nègre *et al.*, 2005). De même, le chlorsulfuron possède un temps de demi-vie qui varie entre 17 et 25 jours à pH 5 alors qu'il passe à 70 jours dans des conditions de pH plus haut (Rouchaud *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2012). La dégradation chimique des sulfonyles est plus importante dans les sols acides que dans les sols à $\text{pH} > 7$ (Beyer *et al.*, 1988; Brown, 1990). Ainsi, sous certaines conditions (sols alcalins, hors de la période de pluie) les sulfonyles peuvent persister assez longtemps et par conséquent porter atteinte aux plantes non visées (Beyer *et al.*, 1988). Les conditions physicochimiques ne sont pas les seules à influencer la persistance des sulfonyles, la dose d'utilisation y joue un rôle très important. L'étude de la persistance du sulfosulfuron a révélé qu'à des doses de 25-50g/ha, l'herbicide n'est plus détecté au niveau des couches superficielles du sol après 150 jours alors qu'il dépasse 200 jours à une dose de 100g/ha (Sondhia and Singhai, 2008).

4.4 Dégradation :

D'une façon générale, tout polluant organique connaît une série de transformation au cours de sa migration dans le sol. Ces transformations peuvent conduire à la formation de sous-produits de nature et de structure variable (molécules plus petites que les molécules parentes ou de structure différente). Elles peuvent aussi être issues de phénomènes biotiques ou abiotiques tels que l'oxydation, la réduction, l'hydrolyse et la photolyse.

Les sulfonyles, quant à eux, semblent subir deux principaux types de dégradation dans le sol. Il s'agit de la dégradation microbienne (biodégradation) et de l'hydrolyse chimique (Beyer *et al.*, 1988). La distinction entre les deux processus est très difficile vu qu'ils

interviennent de manière parallèle. Ainsi, un sous-produit de dégradation peut avoir comme origine un processus à la fois biotique et abiotique.

Cependant, un grand nombre d'études récentes a montré que la voie principale de détoxification du sol des sulfonyles est la dégradation microbienne (Sarmah and Sabadie, 2002).

4.5 Dégradation microbienne

La dégradation des sulfonyles est plus rapide et plus efficace dans les sols non stériles que dans les sols stériles (Lu *et al.*, 2011) montrant l'importance de l'activité microbienne. Il a été ainsi enregistré que le temps de demi-vie de certains sulfonyles varie entre 38,5 et 40 jours dans des sols non stérilisés et 495 et 680 jours dans des sols stérilisés.

Zanardini *et al.* (2002) et Boschini *et al.* (2003) ont rapporté des pourcentages de dégradation de l'ordre de 79 et 61% du chlorsulfuron et du metsulfuron-méthyle respectivement par le champignon *Aspergillus niger* dans les conditions de laboratoire. Des résultats similaires ont été obtenus dans une étude sur la dégradation du pyrazosulfuron-éthyle connu pour sa haute persistance dans le sol. Cet herbicide peut être dégradé par *A. niger* et *Penicillium chrysogenum* (Sondhia *et al.*, 2013). D'autres champignons ont été décrits comme capables de la dégradation du nicosulfuron, du chlorimuron-éthyle et du bensulfuron-méthyle (Peng *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013).

Concernant les bactéries, des espèces de plusieurs genres ont été décrites comme étant capables de dégrader et d'utiliser comme seule source de carbone et d'énergie, différentes molécules de sulfonyles. En effet, Li-feng *et al.* (2007) et Ma *et al.* (2009) ont pu isoler des souches de *Pseudomonas* (*Pseudomonas* sp. SW4 et *Pseudomonas* sp. LW3 respectivement) qui dégradent 85% d'ethametsulfuron-méthyle (100mg/l) en seulement 6 jours et 61,3% de chlorimuron-éthyle en 30 jours dans des conditions de laboratoire. Les souches du genre *Pseudomonas* sont décrites dans la littérature pour leur capacité à vivre dans des conditions de stress et à résister à différents polluants (Madigan and Martinko, 2006).

Methylopila sp. S113 est capable de dégrader plus de 97% de metsulfuron-méthyle (50mg/l) après 72h d'incubation (Huang *et al.*, 2007). Zhu *et al.* (2005) ont décrit une souche de *Brevibacterium* capable de dégrader le bensulfuron-méthyle alors que *Bacillus megaterium* dégrade 44% de la même molécule en 42 jours à une concentration de 50mg/l. La souche *Serratia marcescens* N80 isolée d'eau polluée, dégrade 93,6% du nicosulfuron (10mg/l) en seulement 96h. Elle est capable de l'utiliser comme seule source d'azote (Zhang *et al.*, 2012).

Enfin, d'autres souches appartenant aux genres *Rhodopseudomonas*, *Acinetobacter*, *Ancylobacter* et *Phyllobacterium* peuvent dégrader d'autres molécules de sulfonyles (Lu *et al.*, 2011; Sondhia *et al.*, 2013; Valle *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2011; Zanardini *et al.*, 2002).

Un grand nombre d'études a décrit les voies de dégradation impliquées par les microorganismes, notamment les bactéries, dans la dégradation des sulfonyles. Trois voies de dégradation ont été proposées :

- le clivage du pont sulfonyle
- l'oxydation
- la dé-estérification

Il semble que le clivage du pont sulfonyle soit le mécanisme le plus utilisé par les microorganismes. Ce mécanisme a été décrit par Yu *et al.* (2005) dans la dégradation du metsulfuron-méthyle chez une souche fongique nommée MD. De même, Véga *et al.* (2000) ont rapporté que le clivage du pont sulfonyle constitue la voie majeure de dégradation du triflurosulfuron-méthyle dans des sols non-stériles.

Le mécanisme d'oxydation des sulfonyles a été étudié par O'Keefe *et al.* (1987) ainsi que par Omer *et al.* (1990). Les cytochromes P450 monooxygénases, P450SU1 et P450SU2, impliqués dans cette réaction, ont été identifiés chez *Streptomyces griseolus* (O'Keefe and Harder, 1991).

Concernant la dé-estérification, elle a été décrite chez la souche *Ancylobacter* sp. XJ-421-1 pour la dégradation du triasulfuron-méthyle, metsulfuron-méthyle et du bensulfuron-méthyle à des niveaux variables d'efficacité (Lu *et al.*, 2011). Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette voie de dégradation ne sont pas encore bien élucidés (Hang *et al.*, 2012). Mais il semble qu'à des pH>10 la dé-estérification serait le plus court chemin pour la dégradation des sulfonyles (Choudhury and Dureja, 1998). Cependant, il est très rare d'atteindre cette valeur de pH dans le sol.

En parallèle à ces études, d'autres révèlent un effet néfaste des sulfonyles sur certaines bactéries. À titre d'exemple, Chen *et al.* (2009) ont parlé de toxicité aigüe observée chez *Pseudomonas putida* lorsqu'elle est cultivée en présence du bensulfuron-méthyle.

4 Raisons du choix du sujet et objectifs de la recherche

Depuis la nuit des temps, la richesse et la prospérité des grandes civilisations de par le monde était principalement fondée sur la fertilité de leurs sols. Une fois la santé du sol négligée ces civilisations ont disparues.

Le monde moderne risque de subir la même catastrophe (Scholes and Scholes, 2013). En essayant de maîtriser l'agriculture, l'homme a empêché la nature de faire son travail ce qui a conduit, à long terme, à la détérioration de l'état des sols. L'utilisation des pesticides en est l'une des raisons majeures.

Malgré l'état critique dans lequel se trouve la majorité des sols de par le monde, cet écosystème est très rarement sujet des études scientifiques. Ceci a pour raison sa complexité ainsi que la nature des techniques qui doivent être employées et qui sont, le plus souvent, très coûteuses.

5.1 Le sol, écosystème complexe et support de biodiversité :

Le sol est un milieu hétérogène complexe. Il est constitué de l'association d'éléments minéraux provenant de la roche mère et de la matière organique de la surface (humus). Il contient plus de 80% de la biomasse vivante du globe entre algues, protozoaires, champignons, bactéries, nématodes, lombrics, acariens et certains insectes. La plupart de ces organismes joue un rôle dans la décomposition de la matière organique qui provient des plantes et participe ainsi à la fertilisation du sol et aux transferts d'énergie.

D'un point de vue fonctionnel, le sol peut être divisé en cinq domaines différents (Monard, 2008) :

- a) **La détritosphère** : Elle est constituée de la litière et du sol adjacent. C'est une zone très riche en microorganismes décomposeurs (bactéries et champignons).
- b) **La drilosphère** : C'est la zone du sol caractérisée par une grande activité lombricienne (vers de terre).
- c) **L'agrégatosphère** : C'est la partie du sol formée d'agrégats, ce sont des particules regroupées pour former des unités de taille supérieure. Cette partie est très importante pour les cycles de carbone et d'azote. C'est également l'habitat principal des microorganismes du sol. Ces derniers constituent 90% de la biomasse totale du sol (de Ruiten *et al.*, 2002).

d) **La porosphère** : Elle est constituée des arrangements entre le vide et la matière du sol. Les pores formés peuvent être remplis d'eau, de l'air ou former des habitats pour certains organismes vivants tels les protozoaires.

e) **La rhizosphère** : C'est la zone d'influence directe des racines dans le sol. Les racines occupent de 1 à 5% du volume de la surface du sol. Ceci varie selon la végétation présente (Killham, 1994). Elles constituent l'abri de nombreux organismes vivants du sol car elles sont la source de nutriments qu'elles soient mortes (matière organique décomposée) ou vivantes (sécrétions organiques). Selon Selosse *et al.* (2004), les racines sont l'endroit propice pour la formation de différentes symbioses telles que celles observées avec les champignons mycorrhiziens, avec les bactéries *Rhizobium* (impliquées dans le cycle de l'azote) ou encore avec les Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) responsables de la phytoprotection (Badri *et al.*, 2009; Berendsen *et al.*, 2012).

Le sol est donc composé de particules minérales, de matière organique, d'eau, d'air, et d'organismes formant la pédosphère dont l'épaisseur peut varier de quelques décimètres à quelques mètres. Il constitue l'interface à travers laquelle toutes les molécules chimiques, utilisées en agriculture ou dans d'autres domaines, transitent. Il joue ainsi un rôle primordial dans le devenir des polluants dans l'environnement (Figure 8). Lors du traitement des cultures par les pesticides, ces derniers vont transiter vers le sol directement (application directe) ou indirectement (pluie, lessivage) et vont ainsi subir un nombre de processus physiques, chimiques et biologiques qui vont conditionner leur devenir. Ainsi, certains vont être dégradés d'une manière biotique (microorganismes du sol) ou abiotique (hydrolyse, photolyse). D'autres vont persister dans la matière du sol (rétention) ou être lessivés pour rejoindre les eaux de surface ou souterraines. Plus la rétention du pesticide est forte moins le risque de pollution est important (Mamy, 2004). Dans le cas inverse, l'intervention des microorganismes du sol pour détoxifier le milieu devient d'une haute importance. On parle de biodégradation des polluants.

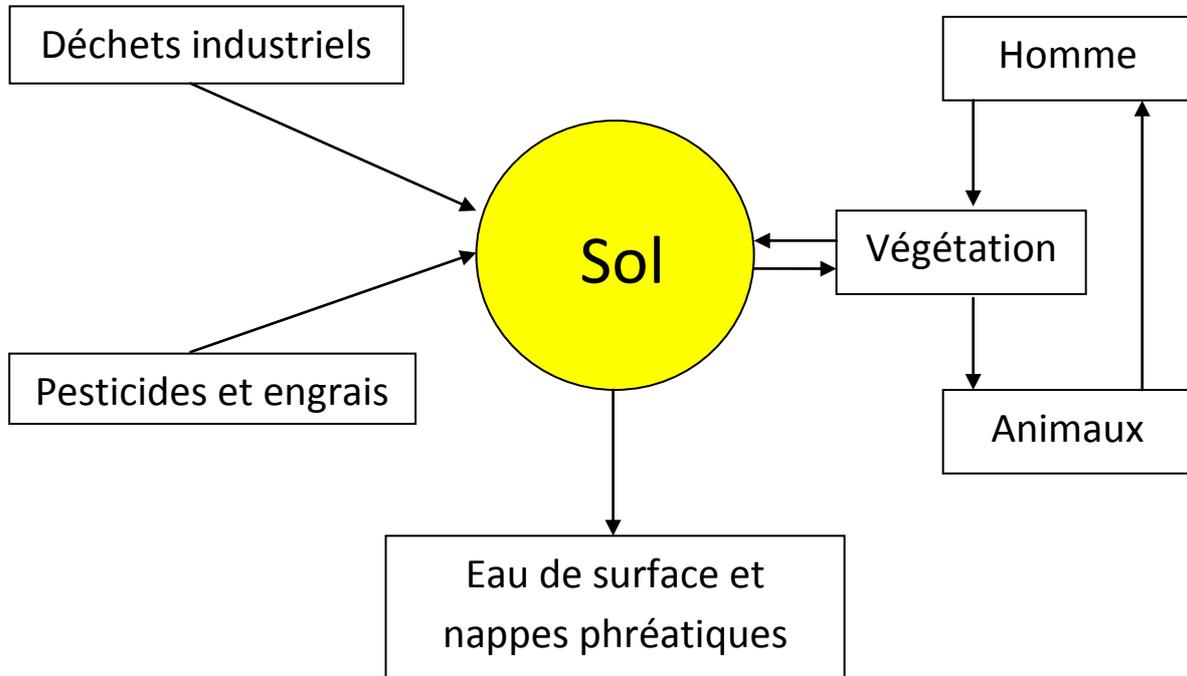


Figure 8 : Importance du sol dans le trafic des substances chimiques (notamment les pesticides) dans l'environnement (Bliefert and Perraud, 2001)

5.2 Les microorganismes du sol et leur rôle écosystémique :

Le sol renferme une masse très importante de microorganismes dotée d'une immense diversité. Il est estimé qu'un gramme de sol contient plus de 10^9 cellules microbiennes et plus de 10^4 espèces différentes (Curtis *et al.*, 2002, Gans *et al.*, 2005, Griffiths and Philippot, 2013).

Ces microorganismes qui se situent à la base de la chaîne alimentaire jouent le rôle clé dans la majorité des processus fonctionnels du sol (les cycles biogéochimiques, la santé et la productivité des cultures, la régulation climatique....) (Griffiths and Philippot, 2013). Cependant, on estime que 80 à 99% de ces microorganismes, particulièrement les bactéries, demeurent mal connus (Borneman *et al.*, 1996) et le nombre d'espèces manipulées est en général très faible par rapport à la diversité rencontrée dans les sols. Jusqu'à présent, uniquement 10% de la microflore tellurique est connue.

Beaucoup de recherches récentes ont montré l'importance cruciale de l'étude des communautés microbiennes telluriques et leurs réponses aux différentes perturbations qui touchent le sol notamment celles apportées par les différentes activités humaines (agriculture intensive, épandage d'engrais, traitement par des pesticides....) (Creamer *et al.*, 2010) .

Il a été démontré que la microflore du sol lui donne la capacité de résister aux différents stress et perturbations auxquels il est soumis et donc lui confère plus de stabilité (Monard, 2008). Elle permet l'autorégulation de l'écosystème et l'augmentation de sa résilience. Ainsi, les microorganismes du sol peuvent être considérés comme de très bons bio-indicateurs de sa qualité. Un sol qui n'est pas soumis à une exploitation humaine (labours, fertilisation, traitements par des pesticides....) est en fait microbiologiquement et génétiquement plus riche qu'un sol exploité (García-Orenes *et al.*, 2013; Scholes and Scholes, 2013).

L'utilisation des pesticides, notamment les pesticides de synthèse, est l'une des causes qui peut altérer l'équilibre de la microflore du sol et par conséquent celui de tout l'écosystème. À titre d'exemple, l'étude de Puglisi (2012) a recensé une baisse de plus de 35% de l'activité microbienne dans des sols traités aux herbicides (80 herbicides étaient étudiés). Cependant, des études sur l'influence des produits xénobiotiques sur les microorganismes ont montré que la réponse de la microflore tellurique à ce type de stress peut être très positive. En effet, certains microorganismes sont capables de dégrader les pesticides xénobiotiques et de les utiliser comme source nutritive (Puglisi, 2012). Ces microorganismes

contribuent ainsi à la détoxification du sol et la protection des plantes et des populations microbiennes dépourvues de cette capacité, nous parlons donc de « bioremédiation ».

Chez les bactéries, la capacité à dégrader les molécules xénobiotiques peut être liée à plusieurs phénomènes (Top and Springael, 2003) :

- l'activation d'enzyme (s) spécifique (s) qui était (aient) absente (s) ou synthétisée (s) à faible niveau avant l'exposition aux polluants.
- l'acquisition de la capacité de biodégradation via un transfert horizontal de gènes (Bellanger *et al.*, 2013). En effet, les gènes codant pour les protéines de dégradation de xénobiotiques sont souvent portés par des plasmides ou des éléments de transposition et des séquences d'insertion (Gstalter *et al.*, 2003; Heuer and Smalla, 2012; Top and Springael, 2003).
- l'acquisition de nouvelles capacités métaboliques suite à des réarrangements de gènes, à une mutation ou à des recombinaisons homologues. Ces phénomènes sont très fréquents chez les bactéries vu leur temps de génération relativement court et leur grande plasticité génomique.

Ainsi, plus les bactéries capables de dégrader la molécule xénobiotique sont exposées au polluants plus elles deviennent résistantes et plus elles dominent la population microbienne du milieu. D'autre part, comme dans le cas des antibiotiques, les bactéries qui développent une résistance vis-à-vis d'un polluant donné peuvent résister à d'autres molécules qui font partie de la même famille ou qui présentent une structure semblable (Singh *et al.*, 2005).

Étant donné que parmi les différentes catégories de pesticides, les herbicides sont les produits les plus utilisés dans les différents domaines concernés (agriculture, désherbage des lieux publics et des voies ferrées, jardinage....) beaucoup d'études récentes se sont intéressées à l'effet de ces produits sur la microflore tellurique et la capacité de ces derniers à les dégrader. Une grande partie de ces études avait comme sujet la famille des sulfonilurées dont l'utilisation connaît une très large abondance de nos jours (Berger *et al.*, 1998; Li-feng *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2012; Villemur, 2013; Zanardini *et al.*, 2002). D'autre part, et comme déjà indiqué, l'ALS qui représente la cible principale des sulfonilurées, existe également chez les bactéries. Elle a été caractérisée chez différentes souches telles que *Escherichia coli* (Barak *et al.*, 1988), *Salmonella thyphimurium* (Schloss *et al.*, 1985), *Mycobacterium avium* (Zohar *et al.*, 2003) et *Mycobacterium tuberculosis* (Choi *et al.*, 2005). Elle catalyse les premières étapes de synthèse des acides aminés aliphatiques. Ceci implique que les bactéries telluriques

exposées aux sulfonylurées (passage ou persistance des herbicides dans le sol) sont aussi soumises à leur effet toxique et donc à la désactivation de l'ALS et à l'arrêt de la division cellulaire. Pourtant, il a été rapporté que la biodégradation par les bactéries constitue la voie principale d'élimination des sulfonylurées dans le sol (Sarmah and Sabadie, 2002).

Objectifs du travail de thèse

L'herbicide Chevalier® OnePass est largement utilisé en Algérie pour la protection des céréales. Les deux molécules actives de cet herbicide sont des sulfonylurées. Il a été introduit en 2002 par Bayer CropScience (Algérie) et depuis, il est l'herbicide le plus vendu sur le marché. Aucune information sur la biodégradation des deux molécules actives séparées l'une de l'autre, ni de leur mélange dans le Chevalier® OnePass a été rapportée.

L'effet de cet herbicide sur le sol et la microflore tellurique n'est jusqu'à présent pas élucidé. D'autre part, la biodiversité des sols algériens n'a fait l'objet que de peu d'études scientifiques.

Dans ce travail, nous avons visé trois principaux objectifs :

- 1- étudier la biodiversité bactérienne d'un sol agricole algérien qui n'a jamais été traité au Chevalier® OnePass et évaluer par la suite, les changements apportés sur la communauté bactérienne après traitement.
- 2- isoler du sol traité les souches bactériennes résistantes au Chevalier® OnePass et déterminer leur capacité à le dégrader.
- 3- évaluer la capacité des souches bactériennes résistantes à protéger les souches sensibles.

Résultats

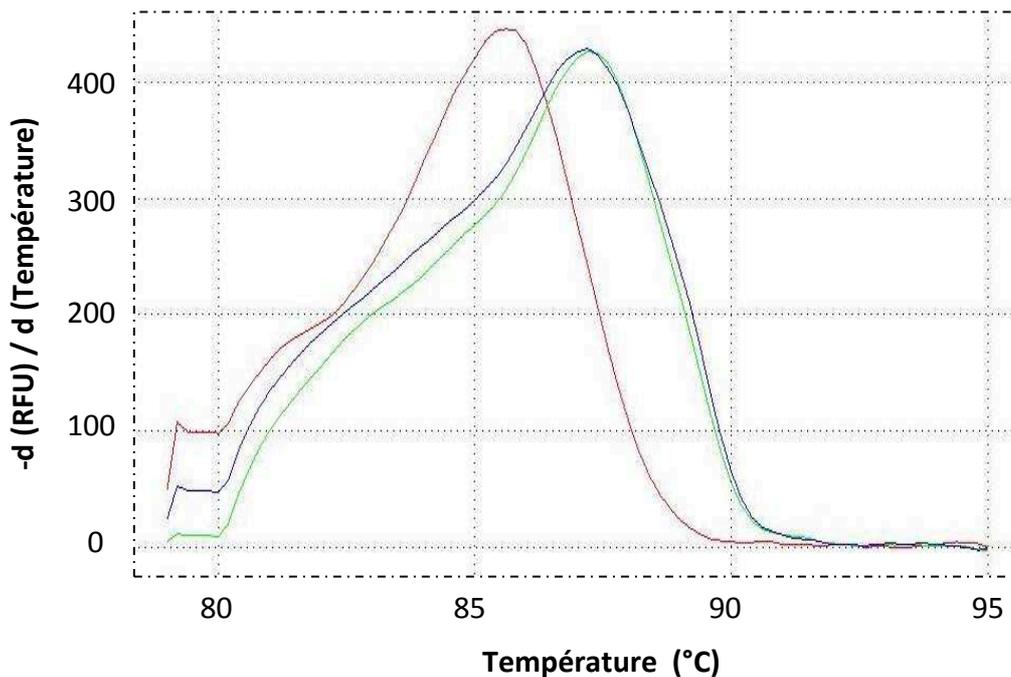


Figure 9 : Comparaison des communautés bactériennes du sol non traité et du sol traité à l’herbicide Chevalier® OnePass en utilisant la technique HRM

RFU : Relative Fluorescence Units

Les métagénomes bactériens ont été extraits des deux échantillons de sol. Un fragment conservé du gène codant l’ARNr16S a été ensuite amplifié puis soumis à l’effet de l’augmentation progressive de la température grâce à un appareillage HRM.

La courbe de fusion de l’ADN extrait du sol non traité est représentée en Vert, celle en Bleu représente le profil obtenu de l’ADN du sol traité à l’herbicide. Un fragment d’ADNr16S bactérien a été extrait d’un échantillon d’eau de mer pour servir comme contrôle, sa courbe de fusion est représentée en Rouge.

Généralités

L'herbicides Chevalier® OnePass est largement utilisé en Algérie notamment dans les cultures céréalières. Il contient deux molécules actives appartenant à la famille des sulfonilurées. Il s'agit de l'iodosulfuron-méthyle sodium (ISMS) et du mésosulfuron-méthyle (MSM). L'impact de ces deux molécules sur la communauté bactérienne du sol n'est jusqu'à présent pas élucidé. D'autre part, aucune information sur la biodégradation de l'ISMS ni du MSM n'a été rapportée.

Dans ce travail, deux échantillons de sol agricole ont été collectés. Le premier échantillonnage a été effectué avant traitement à l'herbicide Chevalier® OnePass, le deuxième un mois après traitement afin de donner suffisamment de temps à la communauté bactérienne pour s'adapter à la présence de l'herbicide et pouvoir éventuellement l'utiliser voire le dégrader.

1 Détection de l'herbicide dans l'échantillon de sol traité

Sachant que le temps de demi-vie des sulfonilurées dans le sol varie de quelques jours à quelques mois (Kamrin, 1997), nous avons voulu confirmer que l'herbicide est toujours présent dans le deuxième échantillon collecté un mois après traitement. Cette expérience nous permet, d'une part d'évaluer le niveau de persistance des molécules actives, et d'autre part, de s'assurer que les bactéries du sol sont toujours sous l'effet de l'herbicide.

Pour cela nous avons utilisé une technique de spectrométrie de masse par torche à plasma ou ICP. Cette technique permet de détecter de faibles quantités de métaux dans un échantillon ou d'en déterminer la nature. En effet, les deux molécules actives de l'herbicide Chevalier® OnePass contiennent du soufre. L'utilisation d'un appareillage ICP permet la détection de cet élément dans les deux échantillons de sol. Ainsi, trois mesures de la concentration du soufre dans chacun des échantillons ont été réalisées et la moyenne est ensuite établie.

Dans l'échantillon de sol non traité, la concentration du soufre était de $787,8 \pm 18,7$ ng/ml alors qu'une valeur de 1561 ± 17 ng/ml a été enregistrée pour l'échantillon de sol traité à l'herbicide. Nous avons ainsi pu démontrer qu'une partie importante de l'herbicide est toujours présente dans le sol et que la persistance des molécules actives dépasse un mois après traitement.

2 Évaluation de la biodiversité bactérienne des deux sols

Dans un deuxième temps, nous avons décidé d'établir une comparaison entre la biodiversité bactérienne du sol avant et après traitement à l'herbicide Chevalier® OnePass. Ceci nous permet d'obtenir une idée générale sur l'effet de la présence de l'herbicide sur la communauté bactérienne.

Pour cela, les métagénomés bactériens des deux échantillons de sol ont été extraits et un fragment hautement conservé de 500pb du gène codant l'ARNr16S a été amplifié par PCR. Les amplicons ont été ensuite soumis à une technique de *High Resolution Melting DNA* ou HRM. Dans cette expérience, la réponse de l'ADN à une montée standard de température permet d'obtenir une signature lumineuse spécifique de la séquence ce qui se traduit par une courbe de fusion caractéristique. Comme contrôle nous avons amplifié le même fragment d'ADNr16S à partir d'un métagénome bactérien extrait d'un échantillon d'eau de mer. Les communautés bactériennes du sol et de la mer étant différentes, la courbe de fusion de l'ADN contrôle devrait présenter un profil distinct de ceux des échantillons de sol.

L'analyse des courbes de fusion HRM de l'ADN des deux échantillons de sol a montré des profils quasiment superposables ce qui implique que les deux communautés bactériennes du sol, avant et après traitement à l'herbicide, sont similaires. Les profils de l'ADN total tellurique sont complètement différents de celui du métagénome aquatique (Figure 9). Les quelques différences observées entre les deux courbes de fusion de l'ADN bactérien tellurique peuvent indiquer un changement limité de la biodiversité bactérienne dans le sol traité à l'herbicide. Ce résultat est en accord avec des études précédentes portant sur l'effet d'autres molécules de sulfonyles sur les communautés bactériennes du sol (Lin *et al.*, 2012; Valle *et al.*, 2006).

3 Analyse de la fraction cultivable des communautés bactériennes

Nous avons donc voulu confirmer ce résultat sur la fraction cultivable de la communauté bactérienne des deux sols. Selon les résultats de l'HRM, la fraction cultivable des bactéries avant et après traitement devrait être similaire. L'apparence de quelques souches résistantes à l'herbicide est attendue.

Pour valider cette hypothèse, des souches bactériennes ont été isolées de l'échantillon de sol traité et de l'échantillon non traité. Ainsi, deux cents cinquante-neuf clones

macroscopiquement distincts ont été isolés aussi bien dans des conditions de cultures aérobies que micro-aérobies. La distribution des clones isolés selon le type de culture est indiquée dans le tableau 6.

Tableau 6 : Distribution et nombres des clones isolés des deux échantillons de sol (avant et après traitement à l'herbicide Chevalier® OnePass)

échantillon	Culture aérobie	Culture Micro-aérobie	Total
Sol Non traité « N »	77	66	143
Sol Traité « T »	64	52	116
Total	141	118	259

Afin d'établir un tri des clones isolés, nous avons d'abord effectué une expérience de détermination de l'empreinte génétique. En effet, cette méthode réalise une identification primaire des clones isolés ce qui nous permet de garder uniquement les clones phylogénétiquement distincts. Pour cela, nous avons utilisé la méthode *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* ou RISA.

3.1 Analyse de l'empreinte génétique des clones isolés

La technique *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* ou RISA est basée sur l'amplification de l'espace intergénique non codant IGS qui existe entre l'ARNr16S et 23S. Cette région est connue pour être hautement conservée et caractéristique de chaque souche bactérienne. L'analyse des profils électrophorétiques correspondants à cette région permet une identification au niveau du sérovars (Jensen *et al.*, 1993). Ainsi, cette technique facilite non seulement l'établissement d'un lien phylogénétique entre les clones isolés, et donc de les regrouper selon leur empreinte génétique, mais aussi la visualisation des redondances des

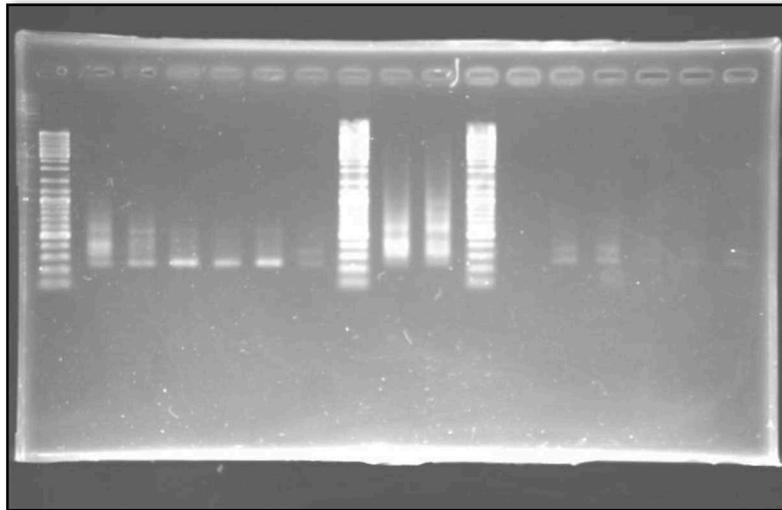
souches bactériennes existant à la fois dans le sol non traité et dans le sol traité. Ainsi, nous pouvons déterminer d'une manière globale d'éventuelles souches résistantes à l'herbicide.

Tout d'abord nous avons ainsi ciblé la zone IGS des deux métagénomés extraits des échantillons de sol. Les espaces intergéniques ont été amplifiés en utilisant un programme et des amorces spécifiques. Comme attendu, les profils électrophorétiques sont très proches (Figure 10a) ce qui confirme les résultats déjà obtenus par la technique HRM.

Ensuite, les IGS de tous les clones isolés ont été amplifiés. Les profils électrophorétiques ont été ensuite analysés (Figure 10b et 10c). Parmi les 259 clones isolés et cultivés en aérobiose, treize empreintes génétiques différentes sont observées pour les clones isolés du sol non traité alors que seize profils différents sont observés chez les clones isolés du sol traité à l'herbicide. Selon l'analyse des profils RISA, deux groupes de souches existent aussi bien dans le sol traité que non traité à l'herbicide. Concernant les clones isolés en micro-aérobiose, neuf empreintes génétiques différentes sont observées dans l'échantillon de sol non traité et uniquement sept dans le sol traité à l'herbicide. Sur ce groupe de clones bactériens, trois sont communs aux deux échantillons.

En se basant sur ces résultats, nous pouvons donc établir un lien entre les clones isolés et s'attendre à trouver des souches résistantes à l'herbicide qui pourraient être capables de le dégrader. Cependant, ces résultats ne peuvent être exhaustifs, ils doivent être confirmés par d'autres analyses.

(a)



(b)



(c)

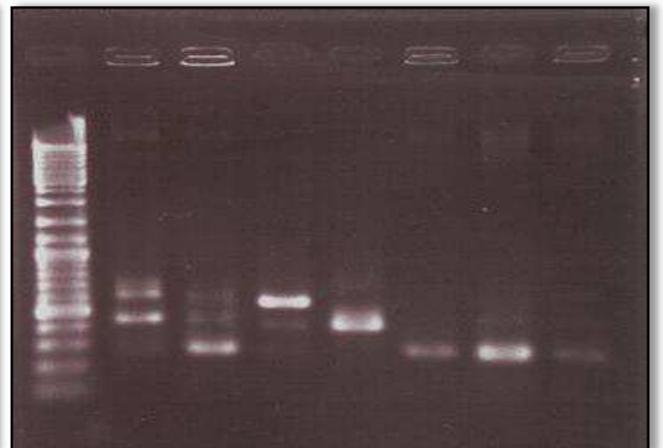


Figure 10 : Gels présentant les profils de migration électrophorétique des fragments de l'ADN intergénique 16S-23S

- (a) Au centre sont montrés les fragments d'ADN intergénique issus des métagénomés des deux échantillons de sol entourés de part et d'autre des profils de migration de l'ADN intergénique de certaines souches isolées (**N** indique les souches du sol non traité, **T** les souches du sol traité, **M** indique le marqueur)
- (b) Profils de migration de l'ADN intergénique 16S-23S de quelques souches isolées de l'échantillon de sol non traité à l'herbicide Chevalier® OnePass en aérobiose
- (c) Profils de migration de l'ADN intergénique 16S-23S de quelques souches isolées de l'échantillon de sol traité à l'herbicide Chevalier® OnePass en aérobiose

3.2 Séquençage de l'ARNr 16S et construction de l'arbre phylogénétique

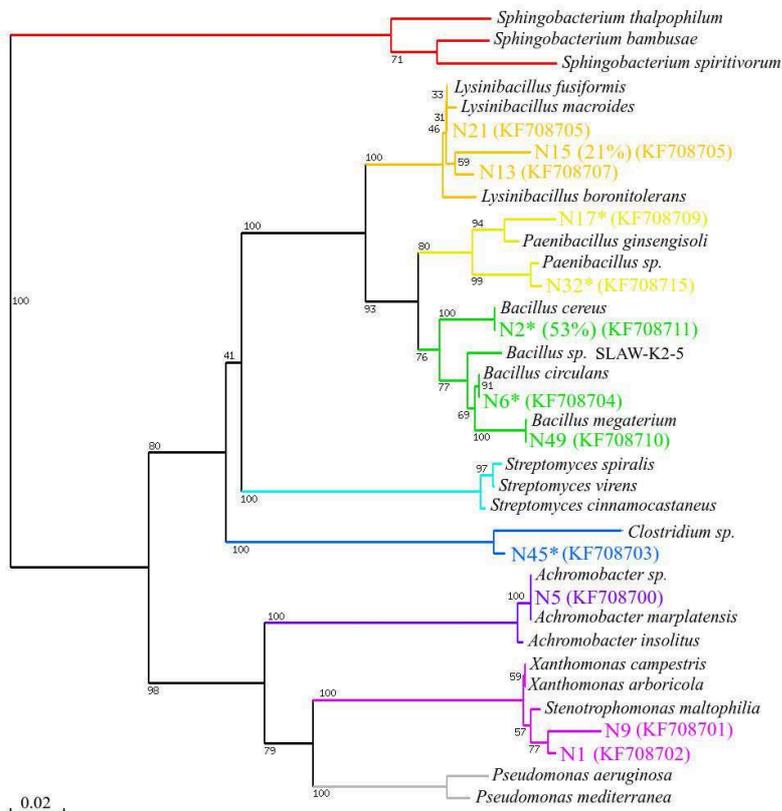
Dans le but de confirmer les liens phylogénétiques entre les clones isolés et de les attribuer à des espèces bactériennes connues, nous avons amplifié un fragment hautement conservé du gène codant l'ARNr16S.

Pour cela, l'ADN chromosomique de tous les clones isolés a été extrait et soumis à une réaction de PCR selon un programme spécifique et en utilisant des amorces encadrant 500pb du gène cible. Les produits PCR ont été ensuite séquencés et les 259 séquences comparées à celles connues et répertoriées dans les banques de données. Enfin, un arbre phylogénétique établissant les liens entre les différentes séquences a été construit (Figure 11).

L'arbre phylogénétique montre clairement que la biodiversité de la communauté bactérienne est globalement similaire dans les deux échantillons de sol (avant et après traitement à l'herbicide). Au total, neuf groupes bactériens distincts sont observés de part et d'autre dans les deux types de cultures à des proportions différentes. Ce résultat confirme ceux précédemment obtenus par les approches HRM et RISA.

De plus, l'étude de l'arbre phylogénétique montre clairement la disparition de certains groupes bactériens après traitement à l'herbicide. Il s'agit des groupes affiliés aux genres *Lysinibacillus*, isolé en aérobiose, et *Clostridium* isolé en micro-aérobiose. Alors que d'autres persistent après traitement, c'est le cas des groupes reliés à *Bacillus megaterium*, *Achromobacter marplatensis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Peanibacillus gensengisoli*, *Bacillus cereus* et *Bacillus circulans*. D'autres groupes n'existant pas dans l'échantillon de sol non traité à l'herbicide sont apparus après traitement. Il s'agit des groupes affiliés aux genres *Sphingobacterium*, *Streptomyces* et *Pseudomonas*. Les groupes bactériens identifiés dans l'échantillon de sol traité à l'herbicide pourraient être résistants à l'effet des molécules sulfonylurées et probablement capables de les utiliser voire les dégrader.

Untreated Soil



Treated Soil

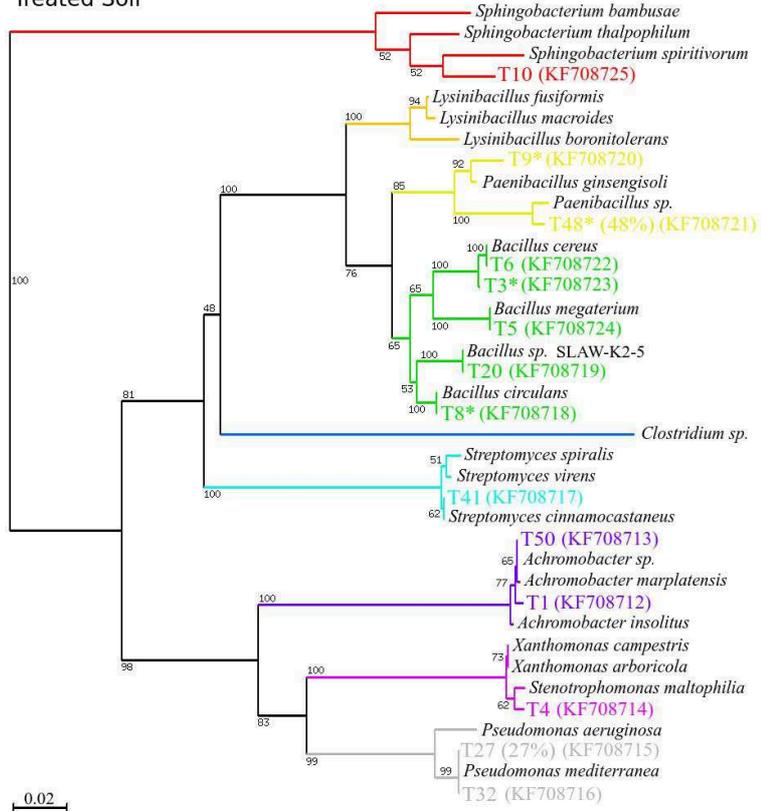


Figure 11 : Arbre phylogénétique construit sur la base de la comparaison des séquences de 500pb du gène ADNr16S des clones isolés à celles répertoriées dans les banques de données. La lettre **N** indique les clones isolés du sol non traité à l'herbicide Chevalier® OnePass. La lettre **T** indique ceux isolés du sol traité au Chevalier® OnePass. Les lettres sont suivies du numéro du clone. Les séquences d'ADNr16S sont accessibles sur la banque de donnée *GenBank* grâce aux numéros d'accèsion représentés entre parenthèses après les noms des clones. L'**astérisque** indique les clones isolés en micro-aérobiose. L'échelle correspond à **0.02** position de substitution par nucléotide. Les pourcentages de similarité entre les séquences sont représentés sur les branches de l'arbre.

3.3 Étude de la résistance/dégradation de l'herbicide par les souches isolées

L'analyse des résultats précédents laisse supposer que les souches qui disparaissent après traitement du sol au Chevalier® OnePass sont des souches hautement sensibles aux molécules actives de l'herbicide alors que les souches qui persistent après traitement ainsi que celles nouvellement observées sont des souches résistantes.

Les souches résistantes seraient capables de dégrader l'herbicide et donc de détoxifier le milieu et par conséquent, permettre aux souches sensibles de croître.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons préparé un milieu que nous avons appelé « LB modifié » dans lequel l'herbicide peut être utilisé comme principale source de carbone. Tout d'abord, nous avons testé la capacité des souches isolées avant traitement à l'herbicide à croître sur le milieu LB modifié. Ainsi, une souche représentative de chaque groupe (aérobie ou micro-aérobie) a été testée. Parmi elles, seules les souches reliées à l'espèce *S. maltophilia* sont capables de pousser sur le milieu LB modifié. De façon surprenante, parmi les dix souches isolées après traitement à l'herbicide Chevalier® OnePass et capables de se développer en aérobiose, nous avons observé que quatre sont incapables de pousser en présence de l'herbicide bien qu'isolées du sol traité, il s'agit des souches affiliées aux genres *Achromobacter*, *Streptomyces* et *Bacillus*. De la même façon, aucune souche isolée en micro-aérobiose ne croît en milieu LB modifié.

Au total, nous identifions huit souches résistantes. La capacité de ces souches à permettre la croissance des souches sensibles a été donc testée.

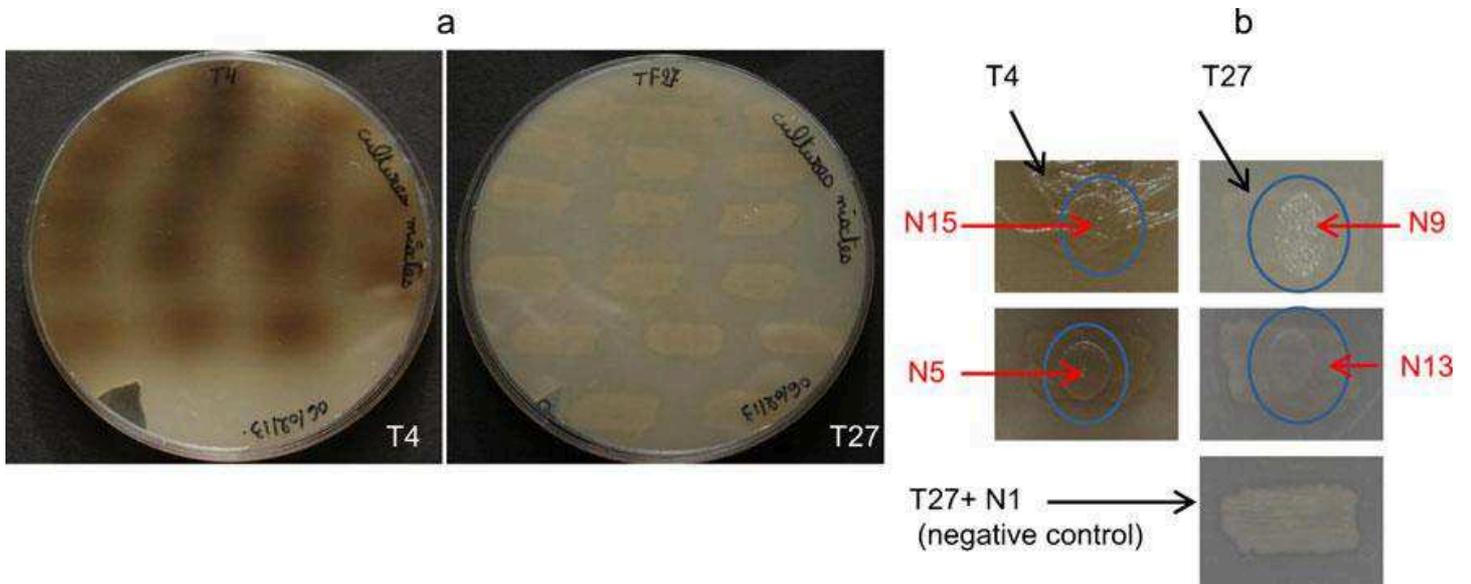


Figure 12 : Culture en surcouche : souches résistantes/ souches sensibles

T indique les souches résistantes isolées du sol traité à l'herbicide Chevalier® OnePass en aérobiose.

N indique les souches sensibles isolées du sol non traité à l'herbicide Chevalier® OnePass en aérobiose.

(a) Culture des souches résistantes sous forme de patches sur milieu LB modifié-agar. La souche T4 reliée à *Stenotrophomonas maltophilia* produit un précipité noir qui se condense au fond de la boîte de Petri.

(b) Culture des souches sensibles sous forme de spots sur les patches des souches résistantes (culture en surcouche).

3.4 Analyse de la co-existence souches résistantes/souches sensibles

Pour déterminer la capacité des souches résistantes à permettre la croissance des souches sensibles à l'herbicide Chevalier® OnePass, nous avons réalisé des cultures en surcouche. En effet, les souches résistantes ont été cultivées sur milieu LB modifié. Après croissance, une fine couche du même milieu a été rajoutée par-dessus les clones puis les souches sensibles ont été cultivées dessus (Figure 12). D'une manière surprenante, uniquement la souche reliée à l'espèce *S. maltophilia* (T4) permet à toutes les souches sensibles de pousser sur le milieu LB modifié. Les autres souches résistantes ont des réponses variables selon la souche sensible avec laquelle elles sont cultivées (tableau 7).

Tableau 7 : Résultats des cultures en surcouche : souches résistantes/ souches sensibles

R.S \ S.S	T4	T20	T10	T32	T27	T6
N13	+	-	-	+	+	+
N15	+	-	+	+	-	+
N21	+	-	-	-	-	-
N49	+	+	-	-	-	-
N5	+	-	-	-	-	-
T1	+	+	+	+	+	+
T5	+	-	+	-	+	-
T41	+	+	+	+	+	+
T50	+	+	+	-	+	-

(SS): Souches Sensibles

(RS): Souches Résistantes

(+) indique que la souche résistante permet la croissance de la souche sensible

(-) indique que la souche résistante ne permet pas la croissance de la souche sensible

T: Souches isolées du sol traité à l'herbicide

N: Souches isolées du sol non traité à l'herbicide

Les chiffres indiquent le numéro du clone.

De plus, la souche résistante reliée à *S. maltophilia* produit un précipité noir qui se condense au fond de la boîte de Pétri (Figure 12a). Cette observation n'est pas faite avec le reste des souches résistantes. La souche reliée à *S. maltophilia* pourrait être capable de dégrader entièrement les composants de l'herbicide.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cultivé les souches résistantes dans le bouillon LB modifié (Figure 13). Les cultures ont été incubées jusqu'à l'obtention du précipité noir chez la souche *S. maltophilia*. Les bouillons ont été ensuite filtrés pour éliminer les cellules bactériennes puis une des souches sensibles isolées après traitement du sol à l'herbicide a été cultivée dans le filtrat. La souche sensible choisie est reliée au genre *Achromobacter*. Si les souches résistantes dégradent l'herbicide alors la souche sensible serait capable de pousser dans le filtrat.

Les résultats montrent que la souche sensible reliée au genre *Achromobacter* est capable de pousser sur tous les filtrats des souches résistantes sauf sur celui de la souche reliée à *S. maltophilia*.



Figure 13: Culture des souches résistantes dans le bouillon LB modifié.

La souche T4 reliée à *Stenotrophomonas maltophilia*, représentée au centre, produit le précipité noir même en milieu liquide.

Discussion Générale

Nous avons vu dans l'introduction de ce manuscrit que l'herbicide Chevalier® OnePass contient deux molécules actives appartenant à la famille des **sulfonylurées**, il s'agit de l'iodosulfuron-méthyle sodium (ISMS) et du mésosulfuron-méthyle (MSM). Aucune information sur l'effet de ces molécules sur les communautés bactériennes telluriques n'a été rapportée dans la littérature. La principale voie de dégradation des molécules sulfonylurées est la biodégradation microbienne. La capacité des bactéries du sol à dégrader l'ISMS et/ou le MSM n'a jusqu'à présent pas été étudiée.

Dans ce travail nous nous sommes donc intéressés à l'effet des deux molécules actives de l'herbicide Chevalier® OnePass sur la communauté bactérienne d'un sol agricole ainsi qu'à la possibilité de trouver des souches résistantes capables de le dégrader.

Nous avons choisi un sol agricole qui n'a jamais été traité à un herbicide appartenant à la famille des sulfonylurées. Nous avons effectué deux échantillonnages, le premier avant traitement à l'herbicide (échantillon non traité) et le second un mois après traitement (échantillon traité). Le temps de demi-vie des sulfonylurées variant de quelques jours à quelques mois, nous avons choisi de prendre le deuxième échantillon à un mois de la pulvérisation de l'herbicide pour donner suffisamment de temps à la communauté bactérienne pour s'adapter à la présence du Chevalier® OnePass et pour pouvoir ainsi développer des résistances vis-à-vis des molécules actives voire acquérir la capacité de les dégrader. Ce temps nous permet également d'évaluer la persistance de l'ISMS et du MSM qui n'est jusqu'à présent pas évaluée par une étude scientifique.

1 Persistance des molécules actives dans le sol

Pour confirmer la présence de l'herbicide dans l'échantillon de sol traité, nous nous sommes servis d'une caractéristique des molécules actives du Chevalier® OnePass. En effet, l'iodosulfuron-méthyle sodium et le mésosulfuron-méthyle sont des molécules soufrées. La détection et la mesure de la concentration du soufre dans les deux échantillons de sol réalisées par ICP nous permet de confirmer que l'herbicide est toujours présent dans l'échantillon traité. Les résultats obtenus montrent que la concentration du soufre dans l'échantillon traité à l'herbicide a plus que doublé par rapport à la valeur trouvée dans le sol non traité. Ce résultat indique clairement qu'une quantité significative de l'herbicide est toujours présente dans le

sol traité. Cela signifie que la communauté bactérienne est toujours sous l'effet des molécules actives. La persistance de ces dernières dans le sol dépasse alors 30 jours.

2 Effet du Chevalier® OnePass sur la biodiversité bactérienne du sol

Afin d'avoir une idée sur le changement que pourrait subir la communauté bactérienne en présence de l'herbicide Chevalier® OnePass, nous avons réalisé une expérience d'HRM. Cette technique permet à la fois de quantifier la population bactérienne et donne un profil qualitatif de sa composition globale. Ainsi, nous avons extrait les métagénomés bactériens à partir des deux échantillons de sol et un fragment hautement conservé du gène codant l'ARNr16S a été amplifié et testé par HRM. L'analyse minutieuse des courbes de fusion permet de visualiser des profils métagénomiques presque superposables. Quelques différences sont observées sur la courbe de l'ADN total extrait du sol traité à l'herbicide.

Ces résultats indiquent que la structure de la communauté bactérienne est similaire en présence et en absence de l'herbicide. Les variations observées sur le profil de l'ADN extrait de l'échantillon traité nous laissent attendre l'apparition de nouvelles espèces bactériennes qui n'existaient pas avant le traitement du sol au Chevalier® OnePass.

Cette analyse est conforme avec les résultats d'études précédentes. Valle *et al.* (2006) ont étudié l'effet de l'azumsulfuron, une molécule appartenant à la famille des sulfonylurées et qui est utilisée pour ces propriétés herbicides, sur la communauté bactérienne du sol. Pour évaluer les changements apparus après traitement à cette molécule ils ont utilisé l'analyse des profils *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* ou DGGE. Les profils DGGE du sol avant et après traitement étaient proches avec quelques bandes supplémentaires sur l'échantillon traité. L'étude de ces bandes a révélé de nouvelles espèces qui n'étaient pas présentes en absence de l'azumsulfuron. De même, l'étude de l'effet du bensulfuron-méthyle sur la structure bactérienne du sol a été abordée par Lin *et al.* (2012). Les résultats des profils DGGE montrent que la communauté bactérienne retrouve sa structure initiale cinq semaines après traitement à l'herbicide avec l'apparition de quelques nouvelles espèces.

Ainsi, en accord avec ce qui est connu dans la littérature et en s'appuyant sur les résultats HRM, l'équilibre initial de la communauté bactérienne est retrouvé un mois après traitement (le moment du deuxième échantillonnage). Il est intéressant de noter que le retour à la structure bactérienne initiale est réalisé malgré la présence des molécules actives de l'herbicide, comme prouvé par les résultats ICP. Cela montre que les bactéries ont pu

développer une résistance aux composants toxiques de l'herbicide ce qui leur a permis de persister dans le sol même avant qu'il ne soit complètement détoxifié.

3 Confirmation des résultats HRM

Nous avons donc décidé d'étudier la fraction cultivable de la communauté bactérienne du sol. A partir des deux échantillons, nous avons pu isoler 259 clones bactériens macroscopiquement distincts, entre aérobies et micro-aérobies.

Tout d'abord, une étude de l'empreinte génétique de tous les clones isolés ainsi que des métagénomés précédemment extraits des deux types de sol a été réalisée. Pour cela nous avons amplifié l'espace intergénique bactérien 16S-23S par la technique RISA. Les profils obtenus à partir des deux métagénomés confirment les résultats HRM. En effet, le gel de migration électrophorétique permet de visualiser quasiment les mêmes bandes sur les deux échantillons (Figure 10a).

Quant aux profils des clones isolés, le polymorphisme des bandes obtenues nous a permis de voir qu'il y a des groupes de souches communs entre les deux sols alors que d'autres appartenant aux clones isolés du sol traité à l'herbicide sont particuliers. Ceci se traduirait par l'apparition de nouvelles espèces bactériennes qui n'ont pas été déjà observées dans le sol non traité. Les résultats de la RISA sont alors conformes avec ceux obtenus par HRM.

4 Identification des souches bactériennes et analyse phylogénétique

Nous avons alors procéder à l'identification des souches bactériennes et à l'établissement d'un lien phylogénétique entre elles. Le fragment de 500pb de l'ADNr16S a été extrait de chacun des clones isolés et ensuite séquencé. La comparaison des séquences obtenues à celles présentes dans les banques de données nous a permis de construire un arbre phylogénétique (Figure 11).

L'arbre phylogénétique montre clairement que la biodiversité bactérienne des deux échantillons est similaire. Cependant, le pourcentage d'abondance des groupes bactériens diffère. Ainsi, des groupes bactériens tels que ceux appartenant aux genres *Bacillus*, *Achromobacter* et *Stenotrophomonas* persistent dans le sol après traitement à l'herbicide Chevalier® OnePass. Ces bactéries possèderaient alors une grande résistance aux composants toxiques de l'herbicide. D'autres tels que les groupe liés aux genres *Clostridium* et

Lysinibacillus disparaissent après traitement. Les souches appartenant au genre *Lysinibacillus* étaient pourtant dominantes dans le sol non traité (21% des souches isolées en aérobiose). Ces bactéries qui disparaissent en présence du Chevalier® OnePass sont donc hautement sensibles. En effet, comme expliqué dans l'introduction, les bactéries possèdent l'enzyme cible des deux molécules actives de l'herbicide. Il s'agit de l'ALS intervenant dans la synthèse des acides aminés à chaîne aliphatique. Il est clair que cette enzyme est largement affectée chez les bactéries sensibles ce qui explique leur disparition. Alors que les bactéries résistantes à l'herbicide Chevalier® OnePass posséderaient un mécanisme moléculaire permettant de protéger l'enzyme cible. Une autre possibilité serait que ces bactéries résistantes sont capables de dégrader les molécules toxiques de l'herbicide (ISMS et MSM) mettant leur enzyme ALS à l'abri de leur effet néfaste ce qui explique leur persistance dans le sol traité.

L'analyse phylogénétique nous a aussi permis d'identifier de nouvelles espèces qui n'existaient pas en absence de l'herbicide. Il s'agit des groupes liés aux genres *Sphingobacterium*, *Streptomyces* et *Pseudomonas*. Les espèces appartenant à ces genres bactériens sont connues pour leur grande résistance à différents toxiques. Des espèces du genre *Pseudomonas* sont déjà connues dans la littérature pour leur capacité à supporter différents types de stress (Manickam *et al.*, 2008) et certaines sont décrites comme capables de dégrader des molécules de sulfonilurées ce qui explique leur dominance dans le sol traité à l'herbicide Chevalier® OnePass. En effet, Li-feng *et al.* (2007) ont isolé une souche capable de minéraliser l'ethametsulfuron-méthyle. Cette souche a été identifiée comme *Pseudomonas sp.* SW4. La souche *Pseudomonas linyingensis sp.* a été isolée d'un champ de blé longtemps traité aux herbicides de la famille des sulfonilurées ce qui prouve la grande capacité de résistance de cette souche (He *et al.*, 2012).

L'apparition de nouvelles souches ne signifie pas forcément qu'elles étaient absentes avant traitement. Ces souches pourraient être présentes dans le sol non traité mais seulement sous-représentées ou dominées par d'autres souches plus adaptées aux conditions du milieu. La présence de l'herbicide a permis l'élimination des souches dominantes avant traitement ce qui a donc donné l'occasion à d'autres souches d'apparaître. Le Chevalier® OnePass change donc les proportions d'abondance de la communauté bactérienne du sol étudié.

Les résultats obtenus par l'analyse phylogénétique permettent, d'une part, de confirmer ce qui a été déjà obtenu par HRM et montre ainsi l'efficacité de cette technique très peu utilisée dans ce domaine de recherche et d'autre part confirment l'existence de souches résistantes au Chevalier® OnePass et donc susceptibles de dégrader l'ISMS et le MSM ou du moins l'une

des deux molécules. Selon ce qui est connu dans la littérature, les souches *Pseudomonas* sont les candidats les plus probables.

5 Dégradation de l'herbicide Chevalier® OnePass

Nous avons donc procédé à l'étude des souches résistantes isolées en présence de l'herbicide. La culture des souches isolées du sol non traité (en aérobies ou en micro-aérobies) sur le milieu contenant l'herbicide a révélé qu'aucune des souches n'est capable de pousser. Ceci confirme la haute sensibilité de ces souches et explique leur disparition dans le sol traité. Cependant, Le groupe de souches reliées à *Stenotrophomonas maltophilia* a montré une capacité de pousser en présence de l'herbicide malgré qu'elles aient été isolées d'un sol qui n'a jamais vu les deux molécules toxiques. Ce résultat explique la raison pour laquelle ce groupe bactérien persiste après traitement.

Selon la littérature, certaines espèces du genre *Stenotrophomonas* sont souvent rencontrées en milieu hospitalier comme agents infectieux opportunistes. Ainsi, L'espèce *S. maltophilia* a été déjà décrite pour être résistante à différents antibiotiques. Cependant, aucune information sur sa capacité de résistance aux molécules sulfonyles n'a été rapportée (Ryan *et al.*, 2009).

Paradoxalement, les souches reliées aux genres *Achromobacter* et *Bacillus* sont aussi incapables de pousser sur le milieu contenant le Chevalier® OnePass malgré leur persistance dans l'échantillon de sol après traitement. D'une manière surprenante, les souches appartenant à ces genres bactériens dans le sol traité sont également incapables de pousser en présence de l'herbicide. Ceci signifie que la présence des bactéries dans le sol traité au Chevalier® OnePass n'implique pas forcément qu'elles sont résistantes ou qu'elles possèdent la capacité de dégrader l'herbicide.

Dans les écosystèmes complexes comme le sol, le comportement des consortia microbiens est très imprévisible. La pression de sélection exercée par les molécules toxiques de l'herbicide laisse supposer que les bactéries qui seront capables de développer des mécanismes de résistance et/ou de dégradation soient les seules qui persistent dans le sol, alors que le reste disparaît. L'expérience montre clairement que cette règle n'est pas exhaustive. Il est clair que certaines bactéries persistent quand même sans pour autant développer une résistance. Une seule possibilité pourrait expliquer ce phénomène : Les bactéries résistantes détoxifient le milieu, les autres en profitent.

6 Coexistence des souches résistantes et des souches sensibles

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cultivé les souches sensibles, isolées des deux types de sol, en surcouche avec les souches résistantes isolées du sol traité au Chevalier® OnePass, en présence de l'herbicide. Les résultats étaient surprenants. En effet, le comportement des souches résistantes varie selon la souche sensible avec laquelle elles sont cultivées. La souche reliée à *S. maltophilia* (T4 sur le tableau 7) est la seule capable de faire pousser toutes les souches sensibles (tableau 7). De plus, différemment à toutes les souches résistantes, *S. maltophilia* produit un précipité noir qui se condense au fur et à mesure que le milieu est consommé (Figure 12).

Ces résultats suggèrent que les voies de dégradation de l'ISMS et du MSM ne sont pas les mêmes chez toutes les souches résistantes. Comme expliqué dans l'introduction, la littérature décrit différents mécanismes moléculaires de dégradation bactérienne des sulfonyles (clivage du pont, oxydation ou dé-estérification). Ces mécanismes peuvent exister individuellement ou coexister chez une même souche bactérienne comme ce qui a été décrit chez la souche *Pseudomonas sp.* SW4 qui couple deux mécanismes à la fois pour dégrader l'ethametsulfuron-méthyle (Li-feng *et al.*, 2007). Ainsi, le résultat de la dégradation pourrait arriver à la minéralisation de la molécule sulfonyle ou à la production de sous-produits dont l'effet sur les souches sensibles est inconnu ce qui explique les résultats variables obtenus dans cette expérience. Alors que, l'apparition du précipité noir chez la souche *S. maltophilia* ainsi que sa capacité à faire pousser toutes les souches sensibles pourrait indiquer que la dégradation de l'herbicide par cette souche est complète (minéralisation). Contrairement à ce qui était attendu, les souches *Pseudomonas* (T27 et T32) ne montrent pas un comportement particulier.

Si la dégradation de l'herbicide est complète le milieu est détoxifié et les souches sensibles ne trouvent pas de difficultés à pousser. Dans le cas contraire, les réponses des souches sensibles varient selon la nature des produits de dégradation.

7 Minéralisation du Chevalier® OnePass par la souche reliée à *Stenotrophomonas maltophilia*

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons cultivé les souches résistantes en présence du Chevalier® OnePass. Le bouillon de culture a été ensuite filtré pour éliminer les bactéries, le filtrat est utilisé pour cultiver une des souches sensibles.

Contrairement à ce qui était attendu, les résultats montrent que la souche sensible pousse sur tous les filtrats sauf celui de la souche T4 reliée à *S. maltophilia*. Ceci pourrait confirmer que les sous-produits issus de la dégradation du Chevalier® OnePass par les souches résistantes n'ont pas un effet toxique, du moins sur la souche sensible testée. Alors que chez la souche T4 reliée à *S. maltophilia*, l'explication pourrait être que la minéralisation complète de l'herbicide rend les ressources nutritives insuffisantes pour la croissance de la souche sensible.

La souche reliée à *S. maltophilia* possède ainsi des capacités remarquables pour la dégradation de l'ISMS et du MSM.

Conclusion et perspectives

A l'issue de ce travail, nous avons pu montrer que l'herbicide Chevalier® OnePass n'affecte pas profondément la structure globale de la communauté bactérienne du sol. Cependant, sa présence induit un changement dans les proportions d'abondance des souches bactériennes.

Nous avons également montré que la réponse de la communauté bactérienne tellurique à la présence des deux molécules toxiques de l'herbicide (ISMS et MSM) est très rapide (30 jours). Une étude de la structure bactérienne après 45 ou 60 jours pourrait apporter plus de précision aux résultats obtenus.

L'utilisation de la technique HRM dans ce travail a été d'une très grande importance. Nous avons pu montrer que cette technique peut remplacer les techniques les plus performantes (DGGE, NGS, RISA). L'HRM permet d'obtenir les mêmes résultats et avec la même efficacité en un temps très court et à moindre coût. De plus, l'analyse des résultats HRM est très facile par rapport aux autres techniques. Il serait très intéressant d'introduire l'HRM dans ce type de recherche. L'établissement d'une banque de données des profils de fusion de

l'ADN des espèces bactériennes connues permettrait l'identification des souches inconnues par cette approche.

Ce travail montre également que le sol traité à l'herbicide Chevalier® OnePass contient aussi bien des souches résistantes à l'herbicide que des souches sensibles. Le comportement des souches résistantes n'est pas aussi simple que prévu. Nous avons étudié pour la première fois la biodégradation de l'iodosulfuron-méthyle sodium et du mésosulfuron-méthyle et nous avons pu montrer que plusieurs mécanismes de résistance et de dégradation de ces deux molécules pourraient exister. Parmi les souches étudiées, seule la souche *S. maltophilia* serait capable de les minéraliser.

Il serait très intéressant de pouvoir définir les sous-produits de dégradation de l'ISMS et du MSM. Une analyse par la technique HPLC serait recommandée.

Enfin, notre travail construit une bonne base pour commencer à déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la biodégradation de l'iodosulfuron-méthyle sodium et du mésosulfuron-méthyle ainsi que ceux employés par les souches résistantes pour protéger leur enzyme ALS. La souche *S. maltophilia* serait un très bon modèle pour élucider les voies de minéralisation de ces deux molécules jusqu'à présent inconnues.

Matériel et Méthodes

1 Produits chimiques

L'herbicide Chevalier® OnePass a été fourni par la firme Bayer CropScience, Constantine, Algérie. Sa composition ainsi que la dose d'utilisation sont décrites dans le tableau 8. L'herbicide Chevalier® OnePass se présente sous forme de micro-granulés dispersibles dans l'eau (Bayer CropScience, Algérie). Il est appliqué principalement pour la protection des céréales, en particulier pour le blé, à une dose de 0,33kg/ha.

Tableau 8: Propriétés de l'herbicide Chevalier® OnePass selon Bayer CropScience Algérie

L'herbicide Chevalier® OnePass	
Substances actives	Iodosulfuron-méthyle Mésosulfuron-méthyle
Formulation	Granulés dispersibles
Famille chimique	Sulfonylurées
Mode d'action	Inhibition de l'ALS
Efficacité	Dicotylédones et graminées
Dose	0,33kg/ha
Conditionnement	2kg

2 Collection des échantillons de sol

Les échantillons de sol ont été collectés dans un champ de blé (parcelle Réguada, Guettar el Aïch, Constantine, Algérie). Le champ est cultivé depuis plus d'une dizaine d'années en alternance blé dur/ blé tendre. D'autres herbicides n'appartenant pas à la famille des sulfonylurées avaient été utilisés pour lutter contre les mauvaises herbes. Le Chevalier® OnePass est appliqué pour la première fois.

Le premier échantillon de sol a été collecté en Mars 2012 avant traitement à l'herbicide Chevalier® OnePass. Le second en Mai 2012, un mois après traitement à l'herbicide. La collecte a été réalisée en utilisant des outils stériles et à partir de 10 endroits différents afin d'obtenir un échantillon moyen représentatif de la parcelle.

Les sols ont été prélevés dans l'horizon superficiel (0-20cm) pour cibler la communauté bactérienne de la rhizosphère. Les échantillons ont été ensuite stockés dans des boîtes stériles et transportés au laboratoire où les racines et les cailloux ont été enlevés et les sols tamisés à 2mm.

3 Milieux de culture et conservation des souches bactériennes

Les souches bactériennes décrites dans cette étude ont été toutes isolées et cultivées à 30°C en aérobiose ou en micro-aérobiose sur milieu LB.

Le milieu riche LB (Luria Bertani) contient : extrait de levure 5g/L, tryptone 10g/L et NaCl 5g/L (Miller, 1972). Le milieu solide correspondant contient 15g d'agar par litre de milieu. Dans le milieu LB modifié, l'extrait de levure est remplacé par 5g de l'herbicide Chevalier® OnePass par litre de milieu. Le milieu solide correspondant contient 15g d'agar par litre.

Le milieu LB modifié est synthétisé afin de tester la capacité des souches bactériennes isolées à dégrader l'herbicide Chevalier® OnePass. Ce milieu modifié a été utilisé également pour les cultures en surcouches. La dose est choisie en fonction de celle appliquée sur le champ. L'herbicide est rajouté dans le milieu avant stérilisation étant donné que la température de fusion des molécules actives (ISMS et MSM) est supérieure à 150°C.

Les souches bactériennes sont conservées dans leur milieu de culture additionné de glycérol 20% final, puis congelées à -80°C. La conservation à court terme est réalisée en milieu solide ou liquide à 4°C.

4 Conditions de culture

4.1 Isolement des souches bactériennes et culture en aérobiose :

4.1.1 Conditions d'enrichissement :

Dans des Erlenmeyers de 50ml, un gramme de chaque échantillon de sol (traité et non-traité à l'herbicide) a été dissout et homogénéisé dans 10ml de LB ensuite incubés à 30°C sous agitation pendant 6h. Le temps d'incubation relativement court a été choisi pour réduire la dominance de certains groupes bactériens connus pour leur abondance dans le sol.

4.1.2 Conditions d'isolement :

A partir des deux enrichissements, des dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} ont été réalisées. 100µl de chaque dilution ont été ensuite étalés sur des boîtes de Pétri contenant du LB agar. Pour chaque dilution, trois répliques ont été réalisées ensuite incubées à 30°C pendant 24h. Après incubation, des clones séparés et distincts ont été observés à partir de la dilution 10^{-3} . Selon leur aspect macroscopique (couleur, forme, taille, viscosité...), les différents clones bactériens ont été distingués. Chaque clone différent a été ensuite cultivé séparément sur du LB agar dans les mêmes conditions décrites ci-dessus.

4.2. Isolement des souches bactériennes et culture en micro-aérobiose :

4.2.1 Conditions d'enrichissement :

Dans des tubes de 10ml, un gramme de chaque échantillon de sol (traité et non-traité à l'herbicide) a été dissout dans 10ml de LB, ensuite incubé à 30°C sans agitation pendant 6h. Le temps d'incubation a été choisi pour la même raison évoquée ci-dessus.

4.2.2 Conditions d'isolement :

A partir des deux enrichissements, des dilutions de 10^{-1} à 10^{-6} ont été réalisées. 100µl de chaque dilution ont été étalés sur des boîtes de Pétri contenant du LB agar. Pour chaque dilution, trois répliques ont été réalisées ensuite placées dans des jars d'anaérobiose contenant des gaz-pack (Anaerocult® A, Merck, Germany) qui permettent de générer l'anaérobiose (Figure 14). Les cultures ont été ensuite incubées à 30°C pendant 48h. Après incubation, des clones séparés et distincts ont été observés à partir de la dilution 10^{-3} . Les clones ont été distingués sur la base de leur aspect macroscopique (couleur, forme, taille, viscosité...). Chaque clone différent a été ensuite cultivé séparément sur du LB agar dans les mêmes conditions d'anaérobiose déjà décrites.

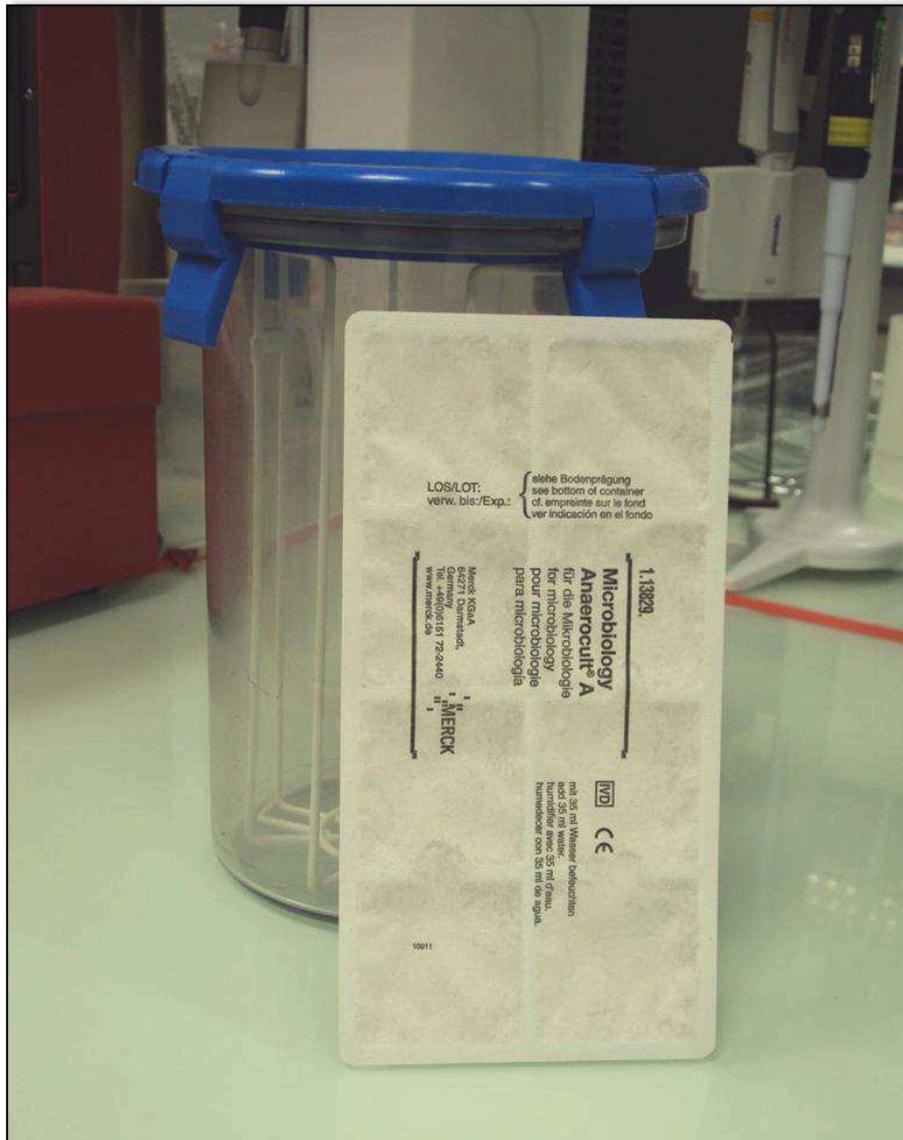


Figure 14: Jarre d’anaérobiose et Gaz-Pack (Anaerocult® A, Merck, Germany) utilisés pour la culture des souches bactériennes en micro-aérobiose

4.3 Culture sur LB modifié :

Afin de déterminer la capacité des souches bactériennes isolées à dégrader l'herbicide Chevalier® OnePass. Chaque clone isolé en aérobiose ou en micro-aérobiose a été cultivé sur le milieu LB modifié agar.

Pour les cultures aérobies, les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24h. En ce qui concerne les cultures micro-aérobies, les boîtes ont été placées dans des jars d'anaérobiose contenant un gaz-pack ensuite incubées à 30°C pendant 48h. Comme contrôle, les mêmes clones ont été cultivés sur le milieu LB ordinaire dans les mêmes conditions.

4.4 Culture en surcouches :

Chaque souche capable de pousser sur le milieu LB modifié a été nommée « souche résistante ». Les souches isolées à partir du sol non traité ainsi que celles isolées du sol traité mais incapables de pousser en présence de l'herbicide ont été nommées « souches sensibles ». Afin de déterminer la capacité des souches résistantes à détoxifier le milieu et permettre la croissance des souches sensibles, toute souche résistante isolée en aérobiose ou en micro-aérobiose a été cultivée sous forme de patchs sur du LB modifié agar puis incubée à 30°C pendant 24h (pour les cultures aérobies) ou 48h (pour les cultures micro-aérobies).

En parallèle, Les souches sensibles isolées à partir du sol non traité ont été cultivées dans du LB liquide puis incubées *over-night* à 30°C. Les conditions de culture en aérobiose ou en micro-aérobiose étaient comme décrites ci-dessus.

Après incubation, une fine couche du milieu LB modifié agar a été rajoutée sur les patchs des souches résistantes. Ensuite, 3µl de chaque souche sensible a été rajoutés sous forme de spots sur les patchs des souches résistantes (Figure 12). Ainsi, chaque souche sensible a été cultivée sur toutes les souches résistantes. Les cultures en surcouches ont été ensuite incubées à 30°C pendant 24h pour les souches aérobies et 48h, dans des jars d'anaérobiose contenant un gaz-pack, pour les souches micro-aérobies.

5 Techniques d'analyse chimique

Spectrométrie par torche à plasma ou Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES):

5.1 Aperçu sur la technique:

Cette technique est apparue dans les années 1975, mais était réellement diffusée dans les laboratoires d'analyse à partir de 1985. C'est une technique de spectrométrie qui permet l'analyse multi-élémentaire simultanée ou séquentielle. Elle est ainsi utilisée pour l'analyse de grandes séries d'échantillons dans lesquelles on recherche 6 à 30 éléments chimiques différents.

L'échantillon doit être présenté à l'appareil sous forme liquide. Le solvant principal est l'eau acidifiée mais il peut aussi être remplacé par un solvant organique à condition d'être peu volatil. La mise en solution pour les échantillons solides est également nécessaire bien que l'on puisse injecter dans le plasma des émulsions. La solution est transformée en aérosol fin et envoyée en continu dans l'atomiseur. Le mécanisme utilisé n'est plus l'Absorption, mais l'Émission : l'excitation des atomes est réalisée à l'aide d'un plasma d'Argon maintenu par un champ magnétique inductif à haute fréquence, dont la température avoisine les 9000°C d'où la dénomination anglo-saxonne : *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (ICP-OES).

Le principe consiste à mesurer l'intensité lumineuse des radiations d'émission caractéristiques produites par les éléments recherchés. Le calcul des résultats sera issu d'une courbe de calibrage effectuée avec des solutions étalons synthétiques reconstituant au mieux le milieu échantillon.

5.2 Conditions de l'expérience :

Cette expérience a été effectuée dans le but de mesurer le taux de soufre dans les deux échantillons de sol. Elle a été réalisée en utilisant l'appareil ThermoFisher ICAP 6000 ICP-OES.

De chaque échantillon de sol (traité et non-traité) un gramme a été dissout dans 10ml d'eau stérile, 100µl ont été ensuite prélevés. Les mélanges ont été par la suite incubés avec de l'acide nitrique 32,5% (Suprapur, Merck) pendant 12h à 100°C (Neumann *et al.*, 2009). Le volume a été ensuite ajusté à 1ml en ajoutant de l'eau pure. Trois répliques ont été réalisées pour chaque échantillon avant de les passer dans l'appareil. La moyenne de la concentration du soufre dans les deux échantillons de sol a été ensuite calculée. Comme contrôle a été utilisé la *Multielement standard solution XVI* (Merck).

6 Techniques d'analyse moléculaire

6.1 Amplification d'ADN par PCR :

De façon générale pour une réaction de 50µL, un mélange contenant l'ADN matrice (10 à 20ng d'ADN chromosomique), un couple d'amorces oligonucléotidiques (100 à 200ng de chaque amorce), les quatre dXTP (100µM), le tampon Go-Taq Polymérase (Promega) et une unité d'ADN polymérase Go-Taq (Promega) est soumis à une succession de cycles :

a- Pour l'amplification de l'espace intergénique IGS 16S-23S :

Afin d'amplifier l'espace intergénique IGS 16S-23S, 30 cycles de PCR ont été réalisées selon la succession suivante :

1. Dénaturation initiale : 1'30'' à 94°C ;
2. Dénaturation : 30'' à 94°C ;
3. Hybridation : 30'' à 45°C ;
4. Élongation : 1' par Kilobase à 72°C ;
5. Élongation finale : 3' à 72°C.

b- Pour L'amplification de l'ADNr16S :

L'amplification de l'ADNr16S a été sur 30 cycles selon la succession suivante :

1. Dénaturation initiale : 1'30'' à 94°C ;
2. Dénaturation : 30'' à 94°C ;
3. Hybridation : 30'' à 60°C ;
4. Élongation : 45'' par Kilobase à 72°C ;
5. Élongation finale : 3' à 72°C.

6.2 Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (RISA) :

Le principe de cette technique consiste à étudier l'espace situé entre les gènes codant l'ARNr16S et 23S appelé espace intergénique bactérien IGS. Cette zone est non codante et donc soumise à moins de pression de sélection. Elle est donc susceptible de présenter plus de variation que l'ADN codant.

Les espaces intergéniques ont été amplifiés selon la succession des cycles décrite ci-dessus grâce aux amorces G1 et L1 (Sigma Aldrich) dont les séquences sont présentées dans le tableau 9. Cinq microlitres des produits d'amplification mélangés à 2 μ L de tampon de charge ont été ensuite séparés par migration sur gel d'agarose 1,5% pendant 1h. Puis l'ADN présent sur les gels a été révélé dans du bromure d'éthidium (BET) et ensuite photographié grâce à un trans-illuminateur à UV (Jensen *et al.*, 1993). Les profils RISA ont été enfin analysés.

Tableau 9: Séquences des amorces utilisées dans ce travail

Amorces	Séquences
FD1	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
S6	5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG-3'
G1	5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3'
L1	5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3'

6.3 Extraction, Purification et Séquençage de l'ADN:

Pour l'amplification de l'espace intergénique 16S-23S ainsi que celle du gène ADNr16S L'ADN chromosomique bactérien a été extrait en utilisant le kit *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen). L'ADN total bactérien (métagénome) a été extrait des deux échantillons de sol en utilisant le kit *Power Soil DNA extraction Kit* (MO-BIO Laboratories, CA, USA) suivant les recommandations du fournisseur. Les produits PCR ont été purifiés en utilisant le kit *GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit* (Sigma-Aldrich) selon les instructions du fournisseur. Le séquençage du gène ADNr16S des souches bactériennes a été réalisé par la firme Beckman Coulter Genomics.

6.4 High Resolution Melting DNA (HRM):

6.4.1 Principe de la technique:

High Resolution Melting DNA ou HRM est une technique d'analyse quantitative de l'ADN amplifié. Elle est le résultat du couplage d'une étape de PCR quantitative (qPCR) et d'un système d'analyse spécifique de haute sensibilité. Elle est apparue en 2008 mais n'a été que récemment utilisée en science appliquée. Son principe repose sur l'intégration d'un fluorochrome intercalant à de l'ADN amplifié par PCR. L'augmentation programmée et progressive de la température entraîne une dénaturation de certains fragments du brin d'ADN (domaines de fusion). Cette dénaturation provoque l'élimination du fluorochrome et induit donc une baisse de fluorescence, puis son extinction totale lorsque la dénaturation est complète. Pour une montée en température standard, une séquence d'ADN donnée correspond à une signature lumineuse spécifique représentée par une courbe de fusion. L'HRM est dotée d'un système qui permet l'analyse rapide des données ainsi que la distinction entre les différentes séquences d'ADN selon leur composition, leur longueur ou leur contenu en Guanine+Cytosine. Cette technique permet donc d'obtenir une information à la fois quantitative et qualitative.

Le fluorochrome peut être du Syber Green ou de l'Eva Green. Dans ce travail le fluorochrome utilisé est l'Eva Green.

6.4.2 Conditions de l'expérience :

Les cycles de l'HRM ont été réalisés en utilisant le système CFX96 *Real-Time System* (Bio-Rad). Le volume final de la réaction de PCR était de 30 μ L contenant le 1 \times *SoFast EvaGreen Supermix* (Bio-Rad), 500nM des amorces FD1 et S6 (Sigma Aldrich) dont les séquences sont présentées dans le tableau 9 et 4 μ L de l'ADN testé (fragment de l'ADNr16S purifié et dilué 100 fois). Ce mélange a été soumis à une étape d'amplification par qPCR selon le programme : dénaturation initiale : 2' à 95°C ; dénaturation : 10'' à 95°C ; hybridation : 20'' à 60°C ; élongation : 10'' à 72°C. Ce programme est répété pendant 40 cycles suivi de la réalisation de la courbe de fusion HRM selon le programme : dénaturation : 1' à 95°C ; hybridation : 1' à 60°C. Après cette étape la température est augmentée de 0,2°C toutes les 10''. Entre les valeurs 79 et 95°C la fluorescence est mesurée à la fin de chaque augmentation de la température. Enfin, les résultats sont analysés en utilisant le système *Bio-Rad PrecisionMelt Analysis Software* 1.1 (Bio-Rad).

6.5 Construction de l'arbre phylogénétique :

Tout d'abord, toutes les séquences procaryotiques connues du gène ADNr16S ont été téléchargées à partir du système *Ribosomal Database Project* (Cole *et al.*, 2009). Les séquences correspondant aux souches non-cultivables ainsi que celles appartenant à des archaebactéries ont été éliminées. Le genre correspondant à chaque séquence d'ADNr16S a été identifié grâce au programme NCBI Blast. L'analyse phylogénétique a été ensuite réalisée en utilisant le serveur Phylogeny.fr (Dereeper *et al.*, 2008). Elle est basée sur l'alignement multiple des séquences de l'ADNr16S en utilisant le logiciel spécifique Muscle version 3.7 (Edgar, 2004). Les régions non similaires ont été ensuite éliminées via le logiciel GBlocks version 0.91b (Talavera and Castresana, 2007). L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant la méthode BIONJ (Gascuel, 1997).

6.6 Numéros d'accèsion des séquences de l'ADNr16S :

Les séquences d'ADNr16S identifiées dans ce travail ont été déposées dans la banque de données *GenBank Database*.

Les numéros d'accèsion sont disponibles dans l'article Arabet *et al.*, 2014. Les séquences indiquées par un « N » représentent celles des souches isolées du sol non traité à l'herbicide alors que les séquences indiquées par un « T » correspondent à celles des souches isolées du

sol traité à l'herbicide Chevalier® OnePass. La lettre est suivie du nombre du clone et du numéro d'accession entre parenthèse. L'astérisque indique les souches isolées en micro-aérobiose. Uniquement une souche représentative de chaque groupe phylogénétique a été présentée sur l'arbre.

Références Bibliographiques

- Badri, D.V., Weir, T.L., van der Lelie, D., and Vivanco, J.M.** (2009). Rhizosphere chemical dialogues: plant-microbe interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 642–650.
- Barak, Z., Calvo, J.M., and Schloss, J.V.** (1988). Acetolactate synthase isozyme III from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **166**, 455–458.
- Barbosa, L.C.A., Maltha, C.R.A., Lage, M.R., Barcelos, R.C., Donà, A., Carneiro, J.W.M., and Forlani, G.** (2012). Synthesis of Rubrolide Analogues as New Inhibitors of the Photosynthetic Electron Transport Chain. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10555–10563.
- Barruio, E., and Houot, S.** (1996). Rapid mineralization of the s-triazine ring of atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biol. Biochem.* **28**, 1341–1348.
- Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., and Guédon, G.** (2013). Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* In print.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J., and Bakker, P.A.H.M.** (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* **17**, 478–486.
- Berger, B.M., Janowitz, K., Menne, H.J., and Hoppe, H.H.** (1998). Comparative study on microbial and chemical transformation of eleven sulfonylurea herbicides in soil. *Z. Für Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* **105**, 611–623.
- Beyer, E.M., Duffy, M.F., Hay, J.V., and Schlueter, D.D.** (1988). Sulfonylurea. In *Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action*, P.C. Kearney, and D.D. Kaufman, eds. (New York), pp. 117–183.
- Borneman, J., Skroch, P.W., O’Sullivan, K.M., Palus, J.A., Rumjanek, N.G., Jansen, J.L., Nienhuis, J., and Triplett, E.W.** (1996). Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1935–1943.
- Boschin, G., D’Agostina, A., Arnoldi, A., Marotta, E., Zanardini, E., Negri, M., Valle, A., and Sorlini, C.** (2003). Biodegradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by *Aspergillus niger* in laboratory conditions. *J. Environ. Sci. Health B* **38**, 737–746.
- Briefert C. and Perraud R.** (2001). *Chimie de l’environnement Air-Eau-Sol-Déchets*. Paris, Bruxelles.
- Brown, H.M.** (1990). Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pestic. Sci.* **29**, 263–281.
- Bunzel, K., Liess, M., and Kattwinkel, M.** (2013). Landscape parameters driving aquatic pesticide exposure and effects. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* **186C**, 90–97.
- Calvet, R., E. Barriuso, C. Bedos, P. Benoit, M.P. Charney, and Y. Coquet** (2005). *Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales*. France Agricole Editions.
- Carson R.** (1962). *Silent Spring*. The Riverside Press ; Cambridge, Mass., U.S.A.

- Chen, H.L., Yao, J., Wang, F., Bramanti, E., Maskow, T., and Zaray, G.** (2009). Acute toxic effects of three pesticides on *Pseudomonas putida* monitored by microcalorimeter. *J. Environ. Sci. Health Part B.* **44**, 157–163.
- Choi, K.J., Yu, Y.G., Hahn, H.G., Choi, J.D., and Yoon, M.Y.** (2005). Characterization of acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* and the identification of its new inhibitor from the screening of a chemical library. *FEBS Lett.* **579**, 4903–4910.
- Choudhury, P.P., and Dureja, P.** (1998). Simultaneous determination of chlorimuron-ethyl and its major metabolites in soil and water by reversed phase liquid Chromatography. *Biomed. Chromatogr.* **12**, 94–96.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., et al.** (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* **37**, D141–145.
- Collotta, M., Bertazzi, P.A., and Bollati, V.** (2013). Epigenetics and pesticides. *Toxicology.* **307**, 35–41.
- Creamer, R., Brennan, F, Fenton, O, Healy, MG, Lalor, S.T.J, Lanigan, G.J, Regan, J.T, and Griffiths, B.S.** (2010). Implication of the proposed soil Framework Directive on agricultural system in Atlantic Europe. *Soil Use Manage.* **26**, 198–211.
- Curtis, T.P., Sloan, W.T., and Scannell, J.W.** (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10494–10499.
- De Ruiter, P. C., B. Griffiths, and J. C. Moore.** (2002). Biodiversity and stability in soil ecosystems: patterns, processes and the effects of disturbance. In *Biodiversity and Ecosystem Functioning, Synthesis and Perspectives*, (New York, : In: S. N. M. Loreau, P. Inchausti), pp. 102–113.
- Degelmann, P., Egger, S., Jüriling, H., Müller, J., Niessner, R., and Knopp, D.** (2006). Determination of Sulfonylurea Herbicides in Water and Food Samples Using Sol–Gel Glass-Based Immunoaffinity Extraction and Liquid Chromatography–Ultraviolet/Diode Array Detection or Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2003–2011.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., et al.** (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* **36**, W465–W469.
- Druwe, I.L., and Vaillancourt, R.R.** (2010). Influence of arsenate and arsenite on signal transduction pathways: an update. *Arch. Toxicol.* **84**, 585–596.
- Edgar, R.C.** (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics.* **5**, 113.
- Ferrer, A.** (2003). Pesticide poisoning. *An. Sist. Sanit. Navar.* **26 Suppl 1**, 155–171.
- Gagnon, C.** (2013). Les pesticides et l’agriculture. Rapport du *Partenaire agricole S.E.C.* Quebec, Canada.

- Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J.** (2005). Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science* **309**, 1387–1390.
- García-Orenes, F., Morugán-Coronado, A., Zornoza, R., and Scow, K.** (2013). Changes in Soil Microbial Community Structure Influenced by Agricultural Management Practices in a Mediterranean Agro-Ecosystem. *PLoS ONE*. **8**, e80522.
- Gascuel, O.** (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* **14**, 685–695.
- Gauvrit, C.** (1996). Efficacité et sélectivité des herbicides. Editions Quae. Paris.
- Gish, J., Prueger, J., Daughtry, C., Kustas, W., McKee, L., Russ, A., and Hatfield, J.** (2011). Comparison of field-scale herbicide runoff and volatilization losses: an eight-year field investigation. *J Env. Qual.* **40(5)**, 1432–42.
- Griffiths, B.S., and Philippot, L.** (2013). Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**, 112–129.
- Gstalter, M.E., Faelen, M., Mine, N., Top, E.M., Mergeay, M., and Couturier, M.** (2003). Replication functions of new broad host range plasmids isolated from polluted soils. *Res. Microbiol.* **154**, 499–509.
- Hang, B.-J., Hong, Q., Xie, X.-T., Huang, X., Wang, C.-H., He, J., and Li, S.-P.** (2012). SulE, a sulfonyleurea herbicide de-esterification esterase from *Hansschlegelia zihuaiae* S113. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 1962–1968.
- He, W.H., Wang, Y.N., Du, X., Zhou, Y., Jia, B., Bian, J., Liu, S.J., and Chen, G.C.** (2012). *Pseudomonas linyingensis* sp. nov.: a novel bacterium isolated from wheat soil subjected to long-term herbicides application. *Curr. Microbiol.* **65**, 595–600.
- Hemmamda, S., Calmon, M., and Calmon, J.P.** (1994). Kinetics and hydrolysis mechanism of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl. *Pestic. Sci.* **40**, 71–76.
- Heuer, H., and Smalla, K.** (2012). Plasmids foster diversification and adaptation of bacterial populations in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 1083–1104.
- Huang X., He J., Sun J.Q., Pan J.J., Sun X.F., and Li S.P.** (2007). Isolation and characterization of a metsulfuron-methyl degrading bacterium *Methylopila* sp. S113. *Int Biodeter Biodegr.* **60**, 152–158.
- Jensen, M.A., Webster, J.A., and Straus, N.** (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 945–952.
- Kamrin, M.A.** (1997). Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate. CRC Press.
- Kearney, P., and Kaufman, D.** (1988). Herbicides Chemistry: Degradation and Mode of Action. CRC Press. New York, USA.
- Killham Ken** (1994). Soil ecology. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

- Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Postigo, C., Garrido, T., Fraile, J., López de Alda, M., and Barceló, D.** (2013). Four-year advanced monitoring program of polar pesticides in groundwater of Catalonia (NE-Spain). *Sci. Total Environ.* **470-471C**, 1087–1098.
- Köhler, H.-R., and Triebkorn, R.** (2013). Wildlife Ecotoxicology of Pesticides: Can We Track Effects to the Population Level and Beyond. *Science.* **341**, 759–765.
- Lamberth, C., Jeanmart, S., Luksch, T., and Plant, A.** (2013). Current Challenges and Trends in the Discovery of Agrochemicals. *Science.* **341**, 742–746.
- Lee, S.-C., Kim, J., La, I.-J., Kim, S.-K., and Yoon, M.-Y.** (2013a). Characterization of recombinant FAD-independent catabolic acetolactate synthase from *Enterococcus faecalis* V583. *Enzyme Microb. Technol.* **52**, 54–59.
- Lee, Y.-T., Cui, C.-J., Chow, E.W.L., Pue, N., Lonhienne, T., Wang, J.-G., Fraser, J.A., and Guddat, L.W.** (2013b). Sulfonylureas have antifungal activity and are potent inhibitors of *Candida albicans* acetohydroxyacid synthase. *J. Med. Chem.* **56**, 210–219.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., and Hemminki, K.** (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.* **343**, 78–85.
- Li-feng Gu, Jian-dong, J., Xiao-hui, L., Ali, S.W., and Shun-peng, L.** (2007). Biodegradation of ethametsulfuron-methyl by *Pseudomonas* sp. SW4 isolated from contaminated soil. *Curr. Microbiol.* **55**, 420–426.
- De Liguoro, M., Bona, M.D., Gallina, G., Capolongo, F., Gallochio, F., Binato, G., and Di Leva, V.** (2013). A monitoring of chemical contaminants in waters used for field irrigation and livestock watering in the Veneto region (Italy), using bioassays as a screening tool. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **21(5)**. 3546-57.
- Lin, X.-Y., Yang, Y.-Y., Zhao, Y.-H., and Fu, Q.-L.** (2012). Biodegradation of bensulfuron-methyl and its effect on bacterial community in paddy soils. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* **21**, 1281–1290.
- Loos R, Locoro G, Comero S, Cantini S, Schwesig D, and Weres F et al.** (2010). Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res.* **44**, 4115–26.
- Di Lorenzo, T., Di Marzio, W.D., Sáenz, M.E., Baratti, M., Dedonno, A.A., Iannucci, A., Cannicci, S., Messina, G., and Galassi, D.M.P.** (2013). Sensitivity of hypogean and epigeal freshwater copepods to agricultural pollutants. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* In print.
- Lu, P., Jin, L., Liang, B., Zhang, J., Li, S., Feng, Z., and Huang, X.** (2011). Study of biochemical pathway and enzyme involved in metsulfuron-methyl degradation by *Ancylobacter* sp. XJ-412-1 isolated from soil. *Curr. Microbiol.* **62**, 1718–1725.
- Ma, J.-P., Wang, Z., Lu, P., Wang, H., Waseem Ali, S., Li, S.-P., and Huang, X.** (2009). Biodegradation of the sulfonylurea herbicide chlorimuron-ethyl by the strain *Pseudomonas* sp. LW3. *FEMS Microbiol. Lett.* **296**, 203–209.

- Madigan, M.T., and Martinko, J.M.** (2006). Brock Biology of Microorganisms. Pearson Prentice Hall.
- Mamy, L.** (2004). Comparaison des impacts environnementaux des herbicides à large spectre et des herbicides sélectifs: caractérisation de leur devenir dans le sol et modélisation. Thèse de Doctorat, Paris-Grignon.
- Manickam, N., Ghosh, A., Jain, R.K., and Mayilraj, S.** (2008). Description of a novel indole-oxidizing bacterium *Pseudomonas indoloxydans* sp. nov., isolated from a pesticide-contaminated site. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**, 101–107.
- Martins, J.M.F., and Mermoud, A.** (1999). Transport of rimsulfuron and its metabolites in soil columns. *Chemosphere.* **38**, 601–616.
- Masiá, A., Campo, J., Vázquez-Roig, P., Blasco, C., and Picó, Y.** (2013). Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin (Spain). *J. Hazard. Mater.* **263 Pt 1**, 95–104.
- McCourt, J.A., and Duggleby, R.G.** (2006). Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain. *Amino Acids.* **31**, 173–210.
- Miller, J.H.** (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Mirsal, I. A.** (2004) - Soil pollution. Origin, monitoring and remediation, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Monard, C.** (2008). Biodégradation des herbicides en sol tempéré contrôlé de la communauté bactérienne dégradante par la bioturbation du sol. Thèse de Doctorat, Université de Rennes.
- Morrice, P., Barbato, F., Giordano, A., Seccia, S., and Ungaro, F.** (2000). Adsorption and Desorption of Imazosulfuron by Soil. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6132–6137.
- Nègre, M., Baiocchi, C., and Gennari, M.** (2005). Cinosulfuron: chemical and biological degradability, adsorption and dissipation in flooded paddy field sediment. *Pest Manag. Sci.* **61**, 675–681.
- Neumann, M., Mittelstädt, G., Seduk, F., Iobbi-Nivol, C., and Leimkühler, S.** (2009). MocA is a specific cytidyltransferase involved in molybdopterine cytosine dinucleotide biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **284**, 21891–21898.
- Ntzani, E., Chondrogiorgi M., Nritsos G., Evangelou E., and Tzoulaki I.** (2013). Literature review on epidemiological studies linking exposure to pesticides and health effects. *EFSA Support. Publ.*
- O’Keefe, D.P., and Harder, P.A.** (1991). Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in the *Actinomycetes*. *Mol. Microbiol.* **5**, 2099–2105.
- O’Keefe DP, Romesser JA, and Leto KJ** (1987). Plant and bacterial cytochromes P450: involvement in herbicide metabolism. *Recent Adv Phytochem.* **21**, 151–173.

- Omer, C.A., Lenstra, R., Litle, P.J., Dean, C., Tepperman, J.M., Leto, K.J., Romesser, J.A., and O'Keefe, D.P.** (1990). Genes for two herbicide-inducible cytochromes P-450 from *Streptomyces griseolus*. *J. Bacteriol.* **172**, 3335.
- Peng, X., Huang, J., Liu, C., Xiang, Z., Zhou, J., and Zhong, G.** (2012). Biodegradation of bensulphuron-methyl by a novel *Penicillium pinophilum* strain, BP-H-02. *J. Hazard. Mater.* **213–214**, 216–221.
- Peris, E., Requena, S., de la Guardia, M., Pastor, A., and Carrasco, J.M.** (2005). Organochlorinated pesticides in sediments from the Lake Albufera of Valencia (Spain). *Chemosphere.* **60**, 1542–1549.
- Puglisi Edoardo** (2012). Response of microbial organisms (aquatic and terrestrial) to pesticides. *FAO Sci. Publ.*
- Pusino, A., Fiori, M.G., Braschi, I., and Gessa, C.** (2003). Adsorption and Desorption of Triasulfuron by Soil. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5350–5354.
- Rouchaud, J., Neus, O., Cools, K., and Bulcke, R.** (1999). Flupyr-sulfuron Soil Dissipation and Mobility in Winter Wheat Crops. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3872–3878.
- Ryan, R.P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M.B., Berg, G., van der Lelie, D., and Dow, J.M.** (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 514–525.
- Sarmah, A.K., and Sabadie, J.** (2002). Hydrolysis of sulfonylurea herbicides in soils and aqueous solutions: a review. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6253–6265.
- Schloss, J.V., Van Dyk, D.E., Vasta, J.F., and Kutny, R.M.** (1985). Purification and properties of *Salmonella typhimurium* acetolactate synthase isozyme II from *Escherichia coli* HB101/pDU9. *Biochemistry (Mosc.)*. **24**, 4952–4959.
- Scholes, M.C., and Scholes, R.J.** (2013). Dust Unto Dust. *Science.* **342**, 565–566.
- Selosse MA, Baudoin E, and Vandenkoornhuysse P.** (2004). Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C R Biol.* **327(7)**, 639–48.
- Sharma, S., Banerjee, K., and Choudhury, P.P.** (2012). Degradation of chlorimuron-ethyl by *Aspergillus niger* isolated from agricultural soil. *FEMS Microbiol. Lett.* **337**, 18–24.
- Si, Y., Zhou, J., Wang, X., and Zhou, D.** (2003). Adsorption of bensulfuron-methyl in soils. *Huan Jing Ke Xue.* **24**, 122–125.
- Singh BK, Walker A, and Wright DJ** (2005). Cross-enhancement of accelerated biodegradation of organophosphorus compounds in soils: Dependence on structural similarity of compounds. *Soil Biol. Biochem.* **37**, 1675–1682.
- Sondhia, S.** (2009). Leaching behaviour of metsulfuron in two texturally different soils. *Environ. Monit. Assess.* **154**, 111–115.
- Sondhia, S., and Singhai, B.** (2008). Persistence of sulfosulfuron under wheat cropping system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **80**, 423–427.

- Sondhia, S., Waseem, U., and Varma, R.K.** (2013). Fungal degradation of an acetolactate synthase (ALS) inhibitor pyrazosulfuron-ethyl in soil. *Chemosphere*. In print.
- Song, J., Gu, J., Zhai, Y., Wu, W., Wang, H., Ruan, Z., Shi, Y., and Yan, Y.** (2013). Biodegradation of nicosulfuron by a *Talaromyces flavus* LZM1. *Bioresour. Technol.* **140**, 243–248.
- Talavera, G., and Castresana, J.** (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* **56**, 564–577.
- Tang, Z., Zhang, W., and Chen, Y.** (2009). Adsorption and desorption characteristics of monosulfuron in Chinese soils. *J. Hazard. Mater.* **166**, 1351–1356.
- Top, E.M., and Springael, D.** (2003). The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 262–269.
- Umbarger, H.E., and Brown, B.** (1958). Isoleucine and valine metabolism in *Escherichia coli*. VIII. The formation of acetolactate. *J. Biol. Chem.* **233**, 1156–1160.
- Valle, A., Boschini, G., Negri, M., Abbruscato, P., Sorlini, C., D'Agostina, A., and Zanardini, E.** (2006). The microbial degradation of azimsulfuron and its effect on the soil bacterial community. *J. Appl. Microbiol.* **101**, 443–452.
- Vecchia, A.V., Gilliom, R.J., Sullivan, D.J., Lorenz, D.L., and Martin, J.D.** (2009). Trends in Concentrations and Use of Agricultural Herbicides for Corn Belt Rivers, 1996–2006. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 9096–9102.
- Vega, D., Cambon, J.-P., and Bastide, J.** (2000). Triflurosulfuron-methyl Dissipation in Water and Soil. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3733–3737.
- Villemur, R.** (2013). The pentachlorophenol-dehalogenating *Desulfitobacterium hafniense* strain PCP-1. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **368**, 20120319.
- Wakabayashi, K., and Böger, P.** (2002). Target sites for herbicides: entering the 21st century. *Pest Manag. Sci.* **58**, 1149–1154.
- Wei, L., Yu, X., Sun, Y., Feng, J., and Wang, L.** (1998). The effects of three sulfurylurea herbicides and their degradation products on the green algae *Chlorella pyrenoidosa*. *Chemosphere.* **37** (4), 747–741.
- Xu, J., Li, X., Xu, Y., Qiu, L., and Pan, C.** (2009). Biodegradation of pyrazosulfuron-ethyl by three strains of bacteria isolated from contaminated soils. *Chemosphere.* **74**, 682–687.
- Yang, X., Guschina, I.A., Hurst, S., Wood, S., Langford, M., Hawkes, T., and Harwood, J.L.** (2010). The action of herbicides on fatty acid biosynthesis and elongation in barley and cucumber. *Pest Manag. Sci.* **66**, 794–800.
- Yin, L.B., Liu, Y., Zhang, D.Y., and Zhang, S.B.** (2011). Isolation and characterization of *Rhodospseudomonas* sp. S9-1 capable of degrading Pyrazosulfuron-ethyl. *Adv. Mater. Res.* **356-360**, 1152–1163.

Yu, Y.L., Wang, X., Luo, Y.M., Yang, J.F., Yu, J.Q., and Fan, D.F. (2005). Fungal degradation of metsulfuron-methyl in pure cultures and soil. *Chemosphere*. **60**, 460–466.

Zanardini, E., Negri, M., Boschin, G., D'Agostina, A., Valle, A., Arnoldi, A., and Sorlini, C. (2002). Biodegradation of chlorsulfuron and metsulfuron-methyl by *Aspergillus niger*. *ScientificWorldJournal*. **2**, 1501–1506.

Zhang, H., Mu, W., Hou, Z., Wu, X., Zhao, W., Zhang, X., Pan, H., and Zhang, S. (2012). Biodegradation of nicosulfuron by the bacterium *Serratia marcescens* N80. *J. Environ. Sci. Health Part B*. **47**, 153–160.

Zhu YW, Zhao YH, Lin XY, and Yong L (2005). Isolation, characterization and phylogenetic analysis of an aerobic bacterium capable of degrading bensulphuronmethyl,. *World J Microbiol Biotechnol*. **21**, 1195–2000.

Zohar, Y., Einav, M., Chipman, D.M., and Barak, Z. (2003). Acetohydroxyacid synthase from *Mycobacterium avium* and its inhibition by sulfonyleureas and imidazolinones. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*. **1649**, 97–105.

Résumé « en anglais » de la thèse de doctorat troisième cycle « LMD »

Titre de la thèse : Effets d'un herbicide de la famille des sulfonylurées sur la communauté bactérienne d'un sol agricole, étude de cas : Chevalier® OnePass

Abstract:

Sulfonylurea herbicides are widely used on a wide range of crops to control weeds. Chevalier® OnePass herbicide is a sulfonylurea herbicide intensively used on cereal crops in Algeria. No information is yet available about the biodegradation of this herbicide or about its effect on the bacterial community of the soil.

In this study, we collected an untreated soil sample, and another sample was collected 1 month after treatment with the herbicide. Using a high resolution melting DNA technique, we have shown that treatment with Chevalier® OnePass herbicide only slightly changed the composition of the whole bacterial community.

Two hundred fifty-nine macroscopically different clones were isolated from the untreated and treated soil under both aerobic and microaerobic conditions. The strains were identified by sequencing a conserved fragment of the 16S rRNA gene. The phylogenetic trees constructed using the sequencing results confirmed that the bacterial populations were similar in the two soil samples.

Species belonging to the *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Paenibacillus* genera were the most abundant species found. Surprisingly, we found that among ten strains isolated from the treated soil, only six were resistant to the herbicide.

Furthermore, bacterial overlay experiments showed that only one resistant strain (related to *Stenotrophomonas maltophilia*) allowed all the sensitive strains tested to grow in the presence of the herbicide. The other resistant strains allowed only certain sensitive strains to grow.

On the basis of these results, we propose that there must be several biodegradation pathways for this sulfonylurea herbicide.

Keywords : Sulfonylurea , herbicide , Chevalier® OnePass, Soil bacterial community .

عنوان المذكرة

Effets d'un herbicide de la famille des Sulfonylurées sur la communauté bactérienne d'un sol agricole, étude de cas : le Chevalier® OnePass

تتميز جزئيات السلفونيل يوريا بقدرتها الكبيرة على القضاء على الأعشاب الضارة و لهذا السبب تستعمل هذه الجزئيات في كل برامج مكافحة الأعشاب الضارة في العالم , في الجزائر يعتبر شوفالي واحد من أكثر مبيدات الاعشاب الضارة إستعمالا خاصة لحماية الحبوب (قمح ذرة) يحتوي هذا المبيد على جزئيتين فعاليتين

تتلخص وظيفتها في إيقاف عمل أنزيم ال.ل.س لدى الأعشاب الضارة هذا الإنزيم ضروري لحياة النبتة إذ أنه في تركيب الأحماض الأمينية الأليفاتية يلعب إنزيم نفس الدور لدى الكائنات الحية الدقيقة بما فيها البكتيريا مما يجعلها عرضة لمفعول المبيد

حتى في وقتنا الحالي لا توجد أي دراسة علمية حول تأثير مبيد الاعشاب الشوفالي على البكتيريا الأهلة للتربة ولا على إمكانية استعمال الجزئيتين الفعاليتين لهذا المبيد كمصدر غذائي من طرف هذه الكائنات الدقيقة.

هدفه البحث يتلخص في دراسة إستجابة البكتيريا الموجودة في التربة الشوفالي و كذا تحديد إمكانيتها على إستخدامها كمصدر غذائي.

لهذا الغرض تم أخذ عينتين من تربة زراعية, الأولى أخذت قبل معالجة التربة بمبيد الاعشاب الشوفالي أما العينة الثانية فتم اخذها بعد المعالجة .

أولا, تم تحديد كمية الجزئيتين في التربة بعد المعالجة بالمبيد بعدها تم مقارنة التركيبية البكتيرية لكلتا العينتين (قبل و بعد المعالجة بالمبيد) سمحت لنا بتحديد البصمة المميزة لكل مجموعة بكتيرية قابلة للنمو بالطرق المتبعة في المختبر. من اجل تحديد النوع الذي تنتمي إليه كل سلالة من البكتيريا التي تم استخلاصها من التربة قمنا بتحديد تركيبة جزئية الحمض النووي المشكلة لجين مما يمكننا من تحديد العلاقات الفيزيولوجية التي ترتبط بين البكتيريا المدروسة

تمكنا من خلال هذه الدراسة من إثبات أن مدة بقاء الجزئيتين الفعاليتين للمبي الشوفالي تفوق الشهر, كما أن التركيبية البكتيرية للعينتين متشابهة لحد كبير. تمكنا من تحديد نوع البكتيريا المستخلصة من التربة و تحديد العلاقة الفيزيولوجية التي تربطها ببعضها

من جهة أخرى تمكنا من إيجاد مجموعة من البكتيريا قادرة على مقاومة وجود المبيد في التربة و حماية ال.ل.س. الخاصة بها.

من بين هذه البكتيريا يوجد نوع واحد قادر على إستعمال الجزئيتين الفعاليتين كمصدر غذائي و تفكيكها لعناصر معدنية.

الشوفالي لا يؤثر بطريقة كبيرة التركيبية البكتيرية للتربة بحيث لا يتغير كثيرا من طبيعتها. هذه النتائج دليل على أن المبيد الأعشاب

يمكن إستعمال بكتيريا كوسيلة بيولوجية لتفنية التربة من بقايا هذا المبيد و بالتالي حماية المحاصيل الزراعية من تأثيره.

من أجل حماية أنزيم ال.ل.س مما هذا العمل هو الاول من نوعه الذي يصف أنواع من البكتيريا قادرة على مقاومة تأثير الجزئيتين الفعاليتين يجعله قاعدة متينة من احل دراسات أخرى من شأنها تحديد الميكانيزمات المستخدمة من طرق هذه البكتيريا في تفكيك الجزئيات الفعالة لمبيد و كذا طريقة لحماية أنزيم المجهولة لحد الآن.

كلمات مفتاحية: سلفونيل يوريا, مبيدات الأعشاب, شوفالي, بكتيريا التربة

Résumé

Les sulfonylurées sont des molécules connues pour leur grande activité herbicide. Ils apparaissent dans tous les programmes de désherbage du monde. En Algérie, l'herbicide **Chevalier® OnePass** est largement utilisé notamment dans les cultures céréalières. Il contient deux molécules sulfonylurées : l'iodosulfuron-méthyle sodium (ISMS) et le mésosulfuron-méthyle (MSM). Ces deux molécules désactivent l'enzyme ALS impliquée dans la synthèse des acides aminés aliphatiques chez les plantes. Cette enzyme existe également chez les bactéries. Aucune information sur l'effet de ces molécules sur la communauté bactérienne du sol n'est disponible. La biodégradation de l'ISMS et du MSM n'a fait l'objet d'aucune étude scientifique. L'objectif de ce travail était d'étudier la réponse de la communauté bactérienne à la présence du **Chevalier® OnePass** ainsi que la biodégradation de ses deux molécules actives. Pour cela, deux échantillons d'un sol agricole ont été collectés avant et après traitement à l'herbicide.

Nous avons commencé par la détection des molécules actives (ISMS et MSM) dans le sol traité à travers une technique d'ICP. Une technique d'HRM a été réalisée pour comparer la diversité des communautés bactériennes des deux sols. La fraction bactérienne cultivable a été isolée et l'étude de l'empreinte génétique effectuée par technique RISA. Le séquençage d'un fragment conservé du gène ADNr16S a été entrepris ce qui a permis l'identification des différentes souches bactérienne isolées. Un arbre phylogénétique a été alors construit. Enfin, des expériences de cultures simple et en surcouche en présence de l'herbicide ont été réalisées.

A travers l'ensemble de ces expériences nous avons démontré que les molécules actives de l'herbicide persistent dans le sol plus de 30 jours. La technique HRM montre que les communautés bactériennes du sol traité et non traité sont similaires. Nous avons identifié les souches bactériennes constituant les deux populations et construit un arbre phylogénétique qui établie les liens entre elles. L'étude de la fraction bactérienne cultivable révèle des souches résistantes à l'herbicide et des souches capables de le dégrader. Nous avons prouvé à travers les cultures en surcouche que les souches résistantes ont des comportements variés vis-à-vis des souches sensibles. Ceci suggère l'existence de différentes voies de dégradation des molécules sulfonylurées ISMS et MSM. La souche *Stenotrophomonas maltophilia* semble être capable de minéraliser l'herbicide. Nous avons prouvé dans ce travail que l'herbicide **Chevalier® OnePass** n'affecte pas profondément la structure de la communauté bactérienne mais change les niveaux d'abondance des espèces qui la constituent. Nous avons confirmé également que l'HRM est une technique très efficace qui peut remplacer d'autres techniques telles que les NGSM et la DGGE. Nos expériences montrent que les bactéries possèdent différentes voies de dégradation de l'ISMS et du MSM. Il serait très intéressant de pouvoir identifier ces voies et déterminer les mécanismes moléculaires impliqués. Pour ceci, nous proposons une étude approfondie de la souche *S. maltophilia*. Notre travail est le premier qui décrit cette souche comme capable de dégrader des molécules de sulfonylurées. *S. maltophilia* pourrait faire un excellent modèle pour l'étude des mécanismes de dégradation des ISMS et du MSM qui sont jusqu'à présent pas élucidés et de déterminer les mécanismes moléculaires permettant la protection de l'enzyme cible ALS chez les souches résistantes.

Mots clés : Sulfonylurées, Herbicides, Chevalier ® OnePass, Communauté bactérienne tellurique.