

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Frères Mentouri, Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications

N° d'ordre :

N° de série :



Thèse

Présentée Par : **Rachedi Kounouz**

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
en Biotechnologies et Génie-Microbiologique

Sous le Thème de

Effet de l'herbicide sulfonylurée tribenuron méthyle sur la croissance de souches telluriques d'actinobactéries. Caractérisation des isolats résistants et tests de dégradabilité

Soutenue le 20 Septembre 2017

Devant le jury :

Présidente :	Pr. Mihoubi I.	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Directeur de thèse :	Pr. Boulahrouf A.	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Examineurs :	Pr. Branes Z.	Univ. Badji Mokhtar, Annaba
	Pr. Zellagui A.	Univ. Larbi BenMhidi, Oum El Bouaghi
	Pr. Souiki L.	Univ. 08 Mai 1945, Guelma

Année Universitaire : 2016-2017

*To LATHIB... Miss you so much... See you in the other side my
Commander...*

Remerciements

De nombreuses personnes m'ont aidée, à leur manière, à accomplir ce travail. Il serait inconcevable pour moi de ne pas les mentionner sur ces pages de remerciements, dictées par mon cœur.

Je tiens à remercier Madame Souiki Lynda, Professeur à l'université 08 Mai 1945 de Guelma, Monsieur Branes Zidane, Professeur à l'université Badji Mokhtar de Annaba et Monsieur Zellagui Amar, Professeur à l'université Larbi BenMhidi d'Oum El Bouaghi, pour avoir consacré du temps à lire et à examiner mon travail.

Je remercie vivement Madame Mihoubi Ilhem, Professeur à l'université Frères Mentouri, Constantine 1, pour avoir accepté de présider le jury de soutenance.

Un grand merci à mon directeur de thèse Monsieur Boulahrouf Abderrahmane, Professeur à l'université Frères Mentouri, Constantine 1. Vous représentez pour moi une encyclopédie de savoir, vous m'impressionnez toujours quand vous parlez de microbiologie et de chimie. Je vous remercie de m'avoir guidée, écoutée et conseillée tout au long de ces années. Merci surtout d'avoir été patient avec moi.

Un grand merci à mes co-encadreurs en France, Monsieur Duran Robert, Professeur à l'université de Pau et des Pays de l'Adour et Madame Lauga Béatrice, Professeur à l'université de Pau et des Pays de l'Adour. Je vous l'ai dit durant mes stages à l'IBEAS et vous le redis aujourd'hui, je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance, sans même me connaître. Vous m'avez ouvert vos portes et accueillie à bras ouverts, vous m'avez écoutée, conseillée et permis de travailler comme je le souhaitais, tard dans la nuit et pendant les week-end. C'est grâce à ces conditions propices au travail, que j'ai retrouvé la passion de la recherche scientifique, j'en avais presque oublié l'agréable sentiment de bien-être que cela procurait. J'espère que je ne vous ai pas déçu et que j'ai été à la hauteur de votre confiance et de vos espérances. Merci de m'avoir accompagnée tout au long des différentes étapes de la réalisation de l'article, de l'écriture jusqu'à la publication, vous avez toujours été présents par vos conseils, corrections et suggestions. Merci de m'avoir consacré du temps et de m'avoir fait profiter de votre savoir.

Un grand merci va à Madame Karama Solange, Ingénieur à l'EEM. La quasi-totalité du travail accompli à l'EEM a été faite à vos côtés. Vous m'avez été d'une grande aide avec tellement de gentillesse. J'ai rarement rencontré des personnes aussi passionnées par leur travail. Avec vous, j'ai appris la rigueur et l'amour du travail bien fait. Je vous souhaite une très bonne retraite bien méritée ma chère Solange.

Un grand merci à Madame Simon Maryse, Ingénieur à l'EEM. Je vous remercie de m'avoir assistée à l'HPLC et de vous être investie à 100% pendant mes manips. Votre cool-attitude m'était très agréable.

Un grand merci à toutes les personnes présentes à l'IBEAS pendant mes stages, vous m'avez tous accueillie à bras ouverts. Un merci particulier à Anne Fahy. Tu m'as offert ton amitié et

j'en suis honorée. Merci pour les délicieux gâteaux et surtout pour les séances d'escalade. Ce fût un régal.

Un grand merci à mon amie Guermouche Amel, Maitre de Conférences à l'université Essenia d'Oran. Merci de m'avoir soutenue et encouragée, de m'avoir fait découvrir la belle ville de Pau. Merci pour les sorties shopping, les séances footing (que je n'appréciais pas particulièrement ;)), nos interminables discussions et nos continuels éclats de rire. Ce fût un réel plaisir de te connaître et de t'avoir comme amie ma chère Amel.

Un grand merci à mes camarades de promotions et amis Boughachiche Faiza, Zerizer Habiba, Ait Kaki El Hadeff El Okki Amel, Reghiousa Sihem, Kitouni Lamia, Benlounissi Aicha, Mokhtari Abdelhamid et Medjkel Samir, pour leurs perpétuels soutien et encouragements. Vous répondez toujours présents quand j'ai besoin de vous et je vous en remercie.

Habiba, merci pour ta précieuse aide dans la partie phylogénie.

Un grand merci à M. Djaballah Chemsseddine pour m'avoir fourni le lait en poudre, ainsi qu'à Mlle Loucif Karima pour les souches-test, sa disponibilité permanente et sa gentillesse.

Un grand merci à Madame Kharroub Karima, Professeur à l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), et à Madame Riah Nassira, Maitre de Conférence à l'université Frères Mentouri, Constantine 1, de m'avoir aidée à comprendre et concevoir les arbres phylogénétiques.

Une pensée et un grand merci à tous les enseignants que j'ai eu depuis l'âge de 4 ans. J'ai eu de très bons enseignants tout au long de mes cursus scolaire et universitaire et j'en mesure réellement la chance.

Une pensée particulière à mes collègues de l'université Larbi BenMhidi, d'Oum El Bouaghi. J'ai passé sept années de bonheur avec vous. Je vous souhaite une bonne continuation.

Merci à mes étudiantes (et maintenant amies pour certaines) Annab Soumeya, Tir Radja, Ayache Fatima Zohra, Zemmam Rahma, Ammi Ouassila, Gouadjelia Moufida. Travailler avec vous fût un plaisir, merci de vous être tant investies.

Merci à mes précieuses amies de toujours Amel Belhocine, Souheila Benmissi, Oumeila Khebbab, Soumeya Brighet, Bentyar Amina, Bisma Harzallah. Votre amitié compte énormément pour moi.

Merci à ma famille, mon bonheur...

A la plus merveilleuses des mamans, *hbibti* Mama, j'allais écrire « merci », mais je ne suis pas sûre que cela puisse suffire pour t'exprimer ma reconnaissance. Comme je ne connais pas d'autres mots qui puissent remplacer « merci », je vais donc l'employer au pluriel... Des mercis pour tout mama, ton éternel amour, ta tendresse, tes sacrifices, ta générosité, ton temps, tes conseils, ton écoute, ta présence, ta patience, ta sagesse, tes encouragements. Je sais que je peux parfois être désagréable, mais tu m'en excuses toujours, toi seule es capable d'une telle compréhension.

A Papa, *Abi Abi*, je te dédie tous mes succès, en particulier celui-là. J'ai toujours travaillé pour que tu sois fier de moi, j'espère que tu l'es. Merci de m'avoir assuré, depuis toujours, les conditions, de toutes natures qu'elles soient, nécessaires pour mener à bien tous mes projets.

A la prunelle de mes yeux, *Sidi Khouya Lekbir* et *Sidi Khouya Lesghir*. Merci d'être toujours là pour moi, de toujours répondre OUI quand je vous sollicite. Vous savoir à mes côtés (même si vous êtes loin ☺) me procure une grande force et un sentiment apaisant de sécurité... J'di, merci de t'être chargé du paiement des articles. Mizou, merci de régler mes moindres soucis à la vitesse de la lumière ;) Je doute fort qu'il y ait des frères comme vous. J'ai beaucoup de chance de vous avoir.

Aux nouvelles venues de la famille, Ghazy et Kaouthar. Par votre venue, j'ai enfin les sœurs que j'ai tant désirées.

Enfin, je ne peux oublier ma boule de poil et de tendresse, Poupi... Sigmund Freud aurait dit « *Time spent with cats is never wasted* »... C'est tellement vrai !

A tous, j'adresse un éternel merci.

Kounouz

Avant-propos

Le présent travail a fait l'objet des publications et communication internationales suivantes :

- Rachedi K., Zermane F., Tir R., Ayache F. Duran R., Lauga B., Karama S., Simon M. and Boulahrouf A. (2017). Characterization of tribenuron-methyl resistant *Actinobacteria* strains. *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.* Vol. 19, No. 1: 81-87.
- Rachedi K., Zermane F., Tir R., Ayache F. Duran R., Lauga B., Karama S., Simon M. and Boulahrouf A. (2017). Effect of sulfonylurea tribenuron methyl herbicide on soil *Actinobacteria* growth and characterization of resistant strains. *Braz. J. Microbiol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.004>
- Rachedi K., Zermane F., Karama S., Lauga B., Duran R., Boulahrouf A. (2012). Caractérisation phylogénétique de souches *Actinobacteria* résistantes à l'herbicide Granstar. Communication orale à la deuxième édition du congrès international «Microbial Biotechnology for development» (Microbiod 2). Marrakech, 02-04 Octobre 2012.

Table des matières

Titre	Page
Liste des abréviations	i
Liste des figures	ii
Liste des tableaux	iii
Introduction bibliographique	
Introduction	1
1. Actinobactéries	2
1.1. Définition et généralités	2
1.2. Caractérisation taxonomique	3
1.2.1. Approche classique	4
1.2.1.1. Caractères cultureux et morphologiques	4
1.2.1.2. Caractères biochimiques et physiologiques	7
1.2.2. Caractérisation chimiotaxonomique	8
1.2.3. Caractérisation phylogénétique	10
1.3. Classification	10
1.4. Applications	11
1.4.1. Production d'antimicrobiens	13
1.4.2. Production d'enzymes	14
1.4.3. Biodégradation et bioremédiation	14
1.4.4. Autres applications	14
2. Pesticides	16
2.1. Définition	16
2.2. Classification	16
2.3. Herbicides	17
2.4. Herbicides sulfonilurées	18
2.4.1. Structure et mode d'action	18
2.4.2. Tribenuron méthyle	19
2.5. Devenir et persistance dans l'environnement	21
2.6. Toxicité	22

2.7. Dégradations abiotique et microbienne	23
2.8. Bioremédiation	24
Objectifs de l'étude	24
Matériel et méthodes	
1. Isolement des actinobactéries	26
1.1. Échantillons de sol	26
1.2. Herbicide utilisé	26
1.3. Traitement des échantillons de sol et isolement	27
1.4. Conservation des souches isolées	27
2. Résistance à l'herbicide	27
3. Caractérisation des souches résistantes	28
3.1. Inoculum général	28
3.2. Caractères cultureux et morphologiques	28
3.3. Caractères biochimiques et physiologiques	28
3.3.1. Tests biochimiques	28
3.3.2. Production de pigments mélanoides	29
3.3.3. Dégradation de l'amidon	29
3.3.4. Dégradation de la gélatine	29
3.3.5. Dégradation de la caséine	29
3.3.6. Action sur le lait écrémé	30
3.4. Sensibilité aux antibiotiques	30
3.5. Activité antimicrobienne	30
3.5.1. Souches test	30
3.5.2. Activité antibactérienne	31
3.5.3. Activité antifongique	31
3.6. Analyse phylogénétique	32
3.6.1. Extraction de l'ADN	32
3.6.2. Amplification du gène codant l'ARNr 16S	32
3.6.3. Électrophorèse et purification des produits de la PCR	32
3.6.4. Séquençage	33
3.6.5. Reconstruction phylogénétique	34
4. Effet du tribenuron méthyle	34

4.1. Pré-cultures	34
4.2. Lavage de l'inoculum	34
4.3. Croissance sur tribenuron méthyle	34
5. Dégradation du tribenuron méthyle	35
5.1. Tests réalisés	35
5.2. Dosage HPLC-UV	35
6. Analyse statistique	36

Résultats et discussion

1. Isolement	37
2. Résistance à l'herbicide	38
3. Caractérisation des souches sélectionnées	40
3.1. Caractères cultureux et macromorphologiques	40
3.2. Caractères micromorphologiques	44
3.3. Caractères biochimiques et physiologiques	45
3.4. Sensibilité aux antibiotiques	47
3.5. Activité antimicrobienne	49
3.5.1. Activité antibactérienne	49
3.5.2. Activité antifongique	52
3.6. Analyse phylogénétique	55
4. Effet et dégradation du tribenuron méthyle	63

Conclusion générale	72
----------------------------	----

Références bibliographiques	76
------------------------------------	----

Annexes

Résumés

Liste des abréviations

AESA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

ARLA : Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire

ATCC : *American Type Culture Collection*

ALS : acétolactate synthase

BET : bromure d'éthydium

BLAST : *Basic Local Alignment Search Tool*

BPA : Bonnes Pratiques Agricoles

BSA : *Bovin Serum Albumin*

CIP : Collection de l'Institut Pasteur

dNTP : désoxyribonucléotides

DT_{50} : *Disappearance time*

HPLC-UV : *High-Performance Liquid Chromatography - Ultraviolet detection*

INPV : Institut National de la Protection des Végétaux

ISP : *International Streptomyces Project*

LMR : Limites Maximales de Résidus

MEGA : *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

mmHg : millimètre de mercure

S : Unité Svedberg

SL : *Smart Ladder*

TBE : Tris-Borate-EDTA (*ethylene diamine tetra acetic acid*)

TBM : Tribenuron Méthyle

TE : Tris-EDTA

Liste des figures

Numéro et titre	Page
Figure 1. Croissance des actinobactéries filamenteuses	5
Figure 2. Croissance des actinobactéries sur milieu liquide	6
Figure 3. Formes des chaînes sporales chez les actinobactéries	6
Figure 4. Relations phylogénétiques entre les classes du phylum <i>Actinobacteria</i>	11
Figure 5. Relations phylogénétiques entre les 15 ordres de la classe <i>Actinobacteria</i>	12
Figure 6. Structure générale des sulfonylurées	19
Figure 7. Structure chimique du tribenuron méthyle	19
Figure 8. Relation phylogénétique entre les souches d'actinobactéries étudiées	57
Figure 9. Relation phylogénétique au sein du Clade 1	58
Figure 10. Relation phylogénétique au sein du Clade 2	59
Figure 11. Relation phylogénétique au sein du Clade 3	60
Figure 12. Relation phylogénétique au sein du Clade 4	61
Figure 13. Relation phylogénétique au sein du Clade 5	62
Figure 14. Effet du TBM sur la production de la biomasse des deux souches SRK12 et SRK17	63
Figure 15. Dégradation <i>in vitro</i> du TBM par les souches SRK12 et SRK17	65
Figure 16. Cinétique de disparition du TBM sur milieu minimum <i>ISP₉</i>	68
Figure 17. Cinétique d'apparition des produits de dégradation du TBM en test abiotique	69
Figure 18. Cinétique d'apparition des produits de dégradation du TBM sur les milieux testés	70

Liste des tableaux

Numéro et titre	Page
Tableau 1. Types pariétaux et composition chez les actinobactéries	9
Tableau 2. Types phospholipidiques et composition chez les actinobactéries	9
Tableau 3. Propriétés physico-chimiques du tribenuron méthyle	20
Tableau 4. Cycle et composition du milieu de PCR	33
Tableau 5. Protocole de dosage du TBM par HPLC-UV	35
Tableau 6. Caractéristiques des sols et répartition des souches isolées	38
Tableau 7. Répartition des 11 souches résistantes selon le traitement à l'herbicide	39
Tableau 8. Caractéristiques culturales des 11 souches sélectionnées	41
Tableau 9. Caractéristiques morphologiques des souches sélectionnées	45
Tableau 10. Caractéristiques biochimiques et physiologiques des 11 souches	46
Tableau 11. Galerie API 20E des deux souches SRK12 et SRK17	47
Tableau 12. Sensibilité des souches d'actinobactéries aux antibiotiques	48
Tableau 13. Activité antibactérienne des souches vis-à-vis des bactéries-test	50
Tableau 14. Sensibilité des bactéries-test aux antibiotiques	51
Tableau 15. Activité antifongique des actinobactéries vis-à-vis des champignons-test	53
Tableau 16. Numéros d'accession des souches étudiées sur GenBank	55
Tableau 17. Résultat du BLAST des actinobactéries étudiées	56
Tableau 18. Caractéristiques morphologiques des souches-type	58
Tableau 19. Valeurs de pH initiales et finales des cultures bactériennes	66

Introduction

Bibliographique

L'Algérie est riche en terres agricoles où la culture céréalière occupe 47% de la superficie agricole utilisable (Nedjraoui, 2001). Afin de protéger la production céréalière contre les insectes, les champignons et les mauvaises herbes, pouvant endommager sa qualité, divers pesticides sont utilisés. Le Granstar[®] 75 DF (DuPont de Nemours) est l'un des herbicides les plus utilisés en Algérie (Institut National de la Protection des Végétaux (INPV), Constantine, 2010), il est également utilisé, sous différentes dénominations commerciales, en Afrique du Nord, en Europe, Amérique du Sud et Asie (Agence de Réglementation de la Lutte Antiparasitaire (ARLA), Canada, 1995 ; Andersen *et al.*, 2001 ; Lubyty *et al.*, 2007 ; Belkouri *et al.*, 2009). Le Granstar[®] contient une molécule sulfonylurée ; le tribenuron méthyle (TBM), active contre un grand nombre de dicotylédones annuelles (Tanji, 2000) et utilisé à des concentrations moindres mais efficaces (12 g/300 l/ha), comparé aux autres familles d'herbicides. Le TBM agit en arrêtant la division cellulaire des tissus méristématiques des plantes via l'inhibition de l'acétolactate synthase (ALS) (ARLA, Canada, 1995).

Malgré l'utilisation du Granstar[®] en proportions inférieures aux doses phytosanitaires habituelles, son application répétée et directe au sol, en plus de la stabilité des sulfonylurées, pourrait constituer un risque environnemental à long terme (Chèvre, 2007), avec même un risque de contamination des eaux souterraines et des eaux de surface, dû aux phénomènes de lixiviation et lessivage du principe actif TBM (Devlin *et al.*, 1992 ; Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (AESA), 2004). Le compartiment environnemental sol est le premier à être affecté par ce type de pollution, car le fragile équilibre entre les différents processus biologiques s'y déroulant, risque d'être rompu, principalement à cause de variations au niveau du microbiote tellurique. En effet, le moindre changement, tel l'introduction de substances xénobiotiques, peut engendrer des fluctuations importantes de la population microbienne, tant sur sa qualité que sur sa quantité, ce qui affecte de manière significative les différentes réactions qu'elles régissent, au sein de cet écosystème. Par conséquent, puisque les microorganismes reflètent les changements environnementaux, ils peuvent représenter des indicateurs efficaces dans l'évaluation de l'impact des molécules exogènes sur l'environnement (Radivojević *et al.*, 2014).

Des auteurs comme Zain *et al.* (2013) ; Arabet *et al.* (2014) et Radivojević *et al.* (2014) ont étudié et constaté l'effet des herbicides sulfonylurées sur la communauté microbienne tellurique globalement, et sur des groupes microbiens particuliers, comme les champignons. Cependant, l'étude de l'impact de ces substances sur le groupe des actinobactéries du sol reste un terrain peu exploré et cela malgré leur abondance et leur

importance au niveau de cet écosystème (Oskay 2009). Les actinobactéries représentent l'un des groupes microbiens les plus répandus dans le sol (Wang *et al.*, 2012), elles possèdent un potentiel considérable de biotransformation et de biodégradation des pesticides. Des études confirment l'implication de diverses souches de ces bactéries à paroi Gram-positive, dans la dégradation de pesticides avec des structures chimiques très différentes, notamment des organochlorés, des s-triazines, des triazinones, des carbamates, des organophosphates, des organophosphonates, des acétanilides et des sulfonilurées (De Schrijver et De Mot, 1999 ; Rao, 2000). Cette caractéristique particulière est due à la capacité des espèces d'actinobactéries à produire une variété d'enzymes extracellulaires capables de dégrader des polluants chimiques complexes et récalcitrants (Sette *et al.*, 2005).

3. Actinobactéries

3.1. Définition et généralités

Les actinobactéries, anciennement actinomycètes, sont des bactéries filamenteuses, à paroi Gram positive, ayant une teneur élevée en bases nucléotidiques (G+C) qui varie entre 57 et 75% (Heuer *et al.*, 1997 ; Jeffrey, 2008, Anandan *et al.*, 2016) et présentant un aspect cellulaire particulier, qui les distingue des autres bactéries unicellulaires et qui rappelle celui des moisissures. En effet, ces bactéries développent un mycélium végétatif et/ou un mycélium aérien, pouvant porter des spores considérées comme des structures de reproduction et de résistance. Ces mycéliums sont fins et courts, contrairement à ceux des moisissures, de ce fait, les actinobactéries sont facilement différenciables des moisissures, par une simple observation microscopique des cellules ou des colonies (Lechevalier, 2016).

La croissance des espèces d'actinobactéries en présence de l'oxygène est variable, mais la majorité est aérobie stricte. Elles sont chimio-organotrophes, pouvant utiliser des molécules organiques complexes comme sources d'énergie et de carbone, grâce à leur faculté à produire une panoplie d'enzymes capables de dégrader les composés chimiques les plus récalcitrants. Cette propriété leur confère un rôle primordial dans la minéralisation de la matière organique des écosystèmes qui les hébergent (Anandan *et al.*, 2016).

Les actinobactéries forment un large groupe hétérogène renfermant des genres différenciables, principalement, par leur aspect morphologique général. Ainsi, il y a ceux qui présentent un mycélium rudimentaire, presque inexistant, qui se fragmente en bâtonnets, c'est le cas du genre *Mycobacterium*. D'autres se distinguent par un mycélium fugace se

fragmentant facilement en corps coccoïdes ou bâtonnets, comme chez les *Nocardia*. Enfin, il y a le genre *Streptomyces* qui est le plus répandu des actinobactéries, dont les espèces forment un mycélium de base prononcé et persistant, au-dessus duquel peut se former un mycélium aérien, où les hyphes portent à leurs extrémités des structures reproductrices appelées conidies. Les spores sont, dans certains cas, comme chez *Actinoplanes*, produites dans des sacs appelés sporanges, renfermant des sporangiospores (Anandan *et al.*, 2016 ; Lechevalier, 2016).

Les actinobactéries sont ubiquitaires ; elles sont recensées en grand nombre dans le sol, et peuvent coloniser d'autres écosystèmes comme les milieux aquatiques (eaux douces et eaux marines), l'air, les débris végétaux et les produits alimentaires. Elles sont également rencontrées dans des milieux extrêmes, comme les sols polaires, les sols désertiques, les sols contaminés par les hydrocarbures, les pesticides et les métaux lourds, ou encore les milieux d'extrême salinité (Anandan *et al.*, 2016 ; Alvarez *et al.*, 2017).

Si certaines espèces d'actinobactéries sont connues pour leur pathogénicité chez l'Homme, les animaux et certains végétaux (certaines souches de *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Gardnerella*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*), d'autres présentent des aspects bénéfiques considérables, se résumant, en premier lieu, en leur aptitude à synthétiser des composés antimicrobiens à large spectre, contre les infections microbiennes qui peuvent toucher Homme, animaux et plantes. Aussi, comme cité ci-dessus, la variété d'enzymes que peuvent produire certaines souches, est à l'origine de la dégradation de composés chimiques naturels et synthétiques, jouant ainsi un rôle dans la minéralisation de la matière organique et, par la même occasion, dans la décontamination des environnements pollués (Alvarez *et al.*, 2017).

3.2. Caractérisation taxonomique

Pour identifier une souche actinobactérie au taxon de l'espèce, plusieurs approches sont entreprises, où des caractères particuliers décisifs sont mis en avant, notamment, une caractérisation classique où les propriétés culturelles, morphologiques, biochimiques et physiologiques sont déterminées ; une caractérisation chimiotaxonomique basée sur la composition chimique de la paroi cellulaire des actinobactéries ; et enfin une caractérisation phylogénétique établie à travers l'étude des acides nucléiques. Une fois réunis, les résultats de toutes ces analyses, apportent une information descriptive qui aboutit à l'identification des espèces bactériennes (Sivakumar, 2001 ; Li *et al.*, 2016a).

3.2.1. Approche classique

3.2.1.1. Caractères culturels et morphologiques

Les milieux de culture utilisés pour la détermination des caractères morphologiques sont généralement ceux établis par l'*International Streptomyces Project (ISP)* (Shirling et Gottlieb, 1966). Pour les genres rares (non *Streptomyces*), les milieux glucose-asparagine et amidon-caséine sont utilisés (Anandan *et al.*, 2016).

Les actinobactéries se développent plutôt lentement, comparativement aux autres bactéries, leur temps de génération varie de 2 à 3 jours (Kitouni, 2007). Selon les conditions de croissance (physico-chimiques et nutritionnelles) et l'espèce actinobactérie considérée, le développement bactérien peut apparaître dès les trois premiers jours de l'incubation, ou prendre plus de temps, variant d'une à quatre semaines.

Sur milieu solide, les actinobactéries se développent sous forme de colonies souvent pigmentées, d'un aspect conique avec une surface sèche fréquemment recouverte d'une couche poudreuse de spores, qui se développent selon un cycle bien défini (Figure 1), où après leur germination, la croissance végétative conduit à la formation d'un mycélium constitué d'un réseau ramifié d'hyphes qui pénètrent dans le milieu de culture, par extension des pointes d'hyphes (mycélium végétatif). La croissance reproductive subséquente procède souvent avec la formation d'hyphes aériens filamenteux (mycélium aérien) qui finissent par subir une différenciation en chaînes de spores (Grasso *et al.*, 2016). Le mycélium aérien est généralement plus épais que le mycélium végétatif. Il présente suffisamment de différenciations, qui permettent de distinguer des groupes bactériens selon leurs caractéristiques morphologiques, il s'agit de la structure (poudreuse, cotonneuse, ou veloutée); de la formation d'anneaux ou de zones concentriques; et de la pigmentation. Quant au mycélium de substrat (végétatif), sa taille, son épaisseur, sa forme ainsi que sa couleur varient, également, selon la souche d'actinobactérie considérée. La propriété de produire des pigments mélanoides marrons-noirs, est tout aussi déterminante dans la reconnaissance de certaines espèces d'actinobactéries. Tous ces critères sont des plus importants dans la classification des genres, particulièrement celui des *Streptomyces* (Anandan *et al.*, 2016).

Sur milieu liquide, la croissance des actinobactéries apparaît rarement sous forme de trouble (comme chez la plupart des bactéries), dans la majorité des cas, les filaments s'enchevêtrent pour former des pellets. Ceci dit des filaments libres moins ramifiés peuvent traduire le développement de certaines souches (Figure 2) (Pamboukian *et al.*, 2002).

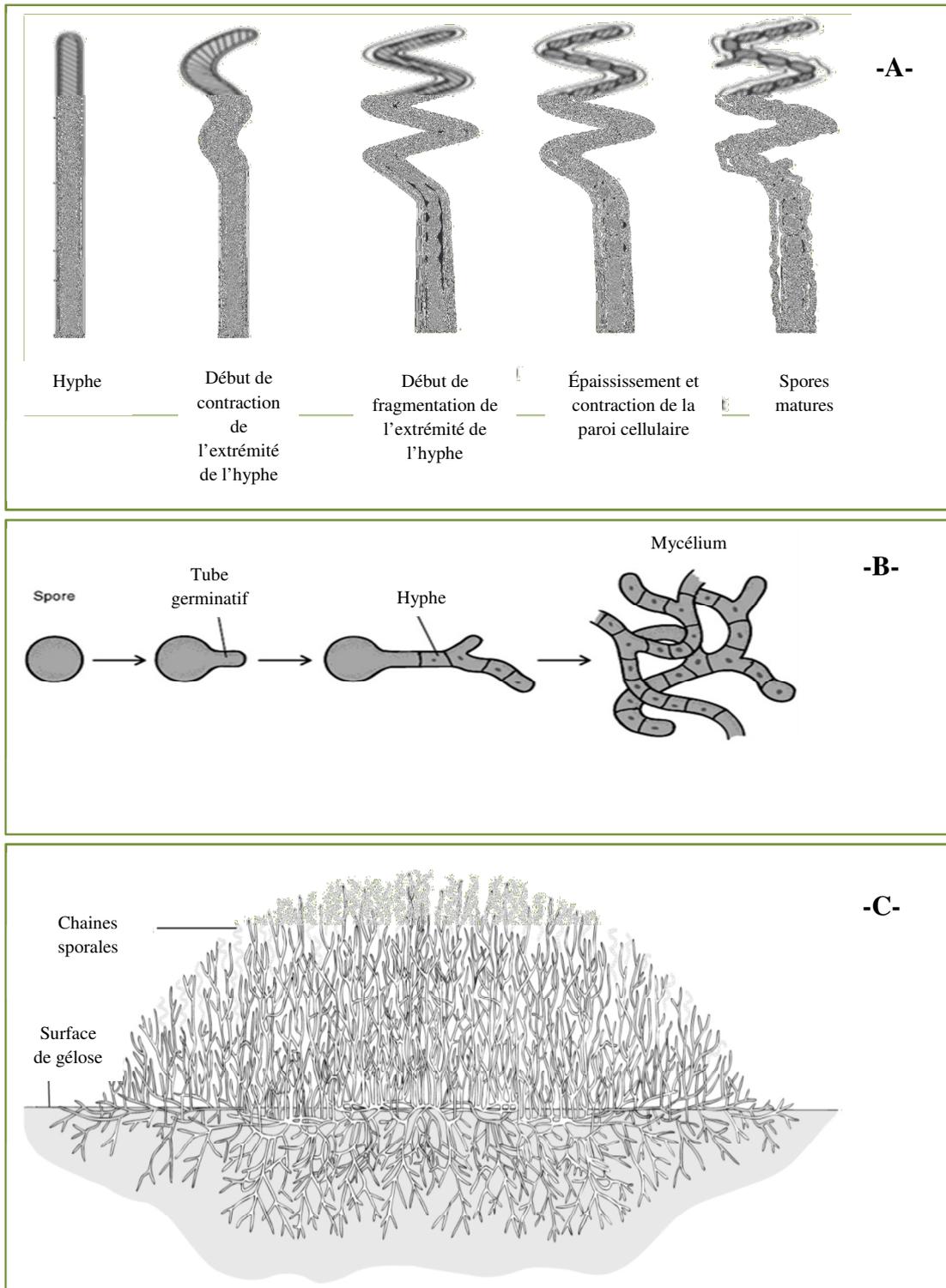


Figure 1. Croissance des actinobactéries filamenteuses. **A.** Formation des spores. **B.** Germination des spores. **C.** Formation des mycéliums aérien et végétatif, sur gélose (Li *et al.*, 2016b).

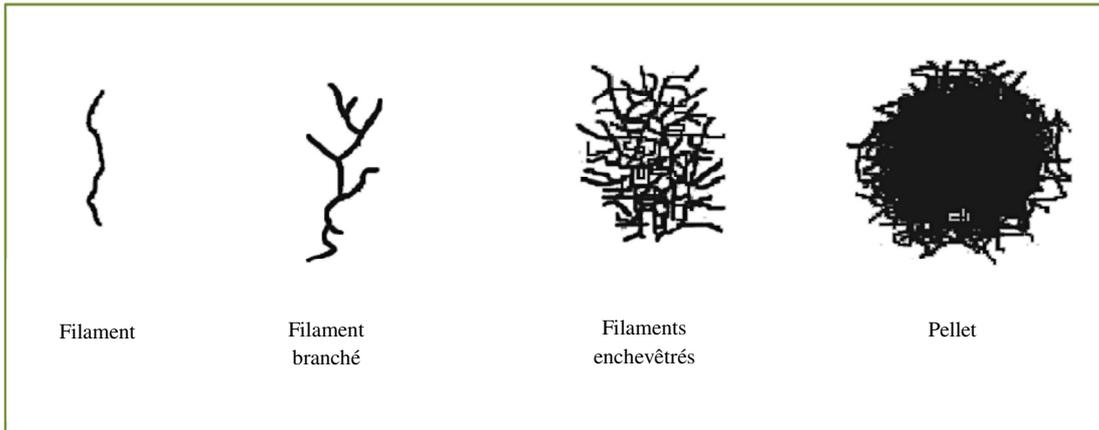


Figure 2. Croissance des actinobactéries sur milieu liquide (Pamboukian *et al.*, 2002).

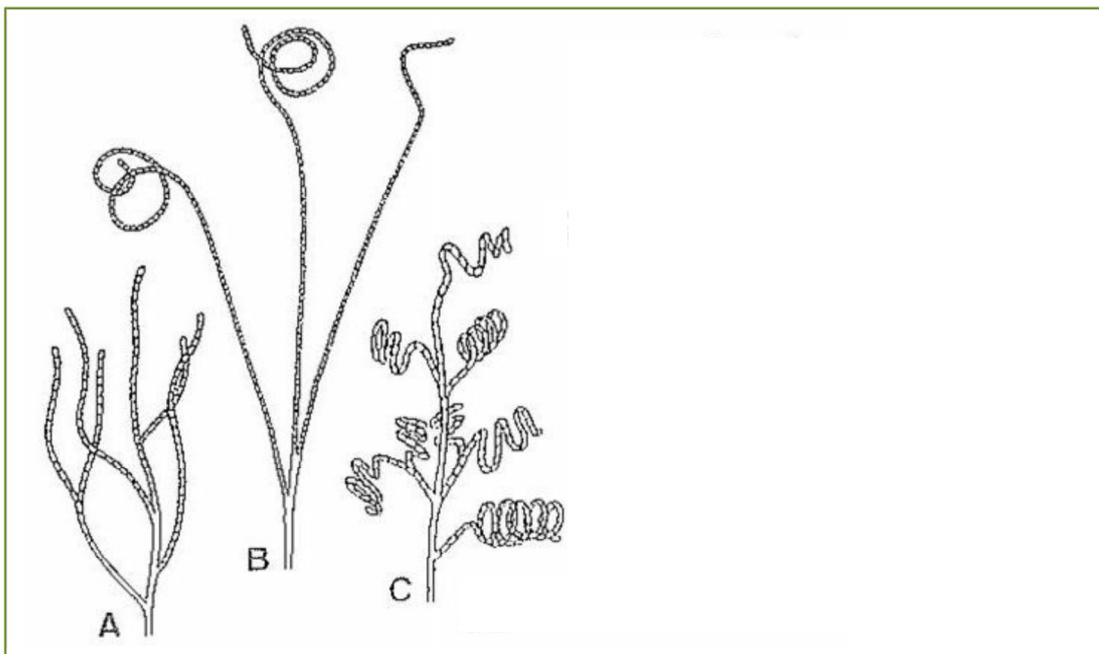


Figure 3. Formes des chaînes sporales chez les actinobactéries. A. Type *Rectiflexible* ; B. Type *Retinaculiaperti* ; C. Type *Spira* (Li *et al.*, 2016b).

L'organisation cellulaire des actinobactéries peut être unicellulaire, c'est le cas de certains genres (*Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Geodermatophilus*), ou pluricellulaire, dans laquelle les cellules s'organisent en filaments formant un mycélium végétatif incrusté dans le milieu de culture, à partir duquel peut apparaître un mycélium en surface, c'est le mycélium aérien. Les spores produites à partir de ce mycélium peuvent être isolées (*Micromonospora*), disposées deux par deux (*Microbispora*), en courtes chainettes (*Actinomadura*) ou en chaînes plus ou moins longues (*Streptomyces*). La forme des spores ainsi que des chaînes sporales est un critère important de caractérisation morphologique, ainsi les spores peuvent être arrondies ou cylindriques, de surface lisse, épineuse ou velue. Chez les espèces de *Streptomyces*, les chaînes sporales se présentent sous quatre dispositions ; droites, en spirales, rectiflexibles ou retinaculiaperti (Figure 3) (Pridham *et al.*, 1958 ; Anandan *et al.*, 2016 ; Li *et al.*, 2016b).

3.2.1.2. Caractères biochimiques et physiologiques

Les propriétés physiologiques et biochimiques des bactéries en général, sont dues à l'activité enzymatique et des protéines qui les régulent, et qui traduisent elles-mêmes l'expression des gènes impliqués. La caractérisation physiologique et biochimique est donc le reflet indirect du génome et sa réalisation est beaucoup plus facile qu'une analyse génomique, d'où l'importance de cette étape dans la systématique bactérienne. Des tests physiologiques et biochimiques classiques sont utilisés pour la caractérisation phénotypique des actinobactéries. Il s'agit de récolter des données sur la croissance à différentes valeurs de température, de pH, de concentrations en sel, et d'oxygène ; sur la croissance en présence de substances antimicrobiennes ; sur l'activité enzymatique, et donc l'utilisation de certains substrats (Li *et al.*, 2016a).

De manière générale, les actinobactéries se développent quasiment sur les majeurs intervalles de température. Ainsi, les mésophiles croissent sur une large plage de 20 à 42°C, les thermotolérantes survivent jusqu'à 50°C, les thermophiles modérées poussent entre 45 et 55°C, alors que les thermophiles strictes se développent entre 37 et 65°C, avec un intervalle optimum de 55 à 60°C. Il est à noter que certaines espèces du genre *Streptomyces* sont psychrophiles. Pour l'isolement de souches mésophiles, thermotolérantes et thermophiles modérées, à partir du sol, les températures d'incubation de 28°C, 37°C et 45°C sont usuellement et respectivement, prises en considération (Anandan *et al.*, 2016).

La majorité des actinobactéries préfère les milieux neutres ou légèrement alcalins. Cependant, des souches acidophiles sont répertoriées avec un optimum variant entre 4,5 et 5,5 (Boughachiche, 2012).

La réponse des actinobactéries à la présence de concentrations élevées de sel, varie selon le genre considéré. La plupart des souches halophiles sont isolées de sols salés, et quelques genres seulement le sont à partir d'environnements marins, tels que *Micromonospora* et *Rhodococcus* (Anandan *et al.*, 2016).

3.2.2. Caractérisation chimiotauxonomique

Les actinobactéries sont morphologiquement assez identiques, pour pouvoir les distinguer, des composés chimiques se trouvent être décisifs et reflètent bien les relations phylogénétiques, du moins à l'échelle du genre. La chimiotauxonomie des actinobactéries concerne la variation et la distribution de marqueurs chimiques spécifiques dans la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique, tels que les sucres, les acides aminés, les acides gras, les lipides polaires, les ménaquinones. Pour certains genres, la recherche de l'acide mycolique est spécialement requise (Wang et Jiang, 2016).

a- Acides aminés : Comme toute paroi bactérienne Gram positif, la paroi des actinobactéries est composée principalement d'une couche de peptidoglycane de 20 à 80 nm d'épaisseur, et de macromolécules représentées par des acides teichoïques, des polysaccharides, des protéines et des lipides. La structure du peptidoglycane est très stable, c'est un polymère composé de deux osamines liées, en alternance, en $\beta(1-4)$, il s'agit du N-acétyl glucosamine et de l'acide N-acétyl muramique. Au groupement carboxyl de ce dernier, est lié un tétra-peptide composé de D ou L-alanine, D-glutamate, L-lysine et acide 2,6-diaminopimélique. C'est cet oligopeptide qui lie, verticalement, les chaînes glucidiques entre elles.

La détection de la présence des isomères de l'acide 2,6-diaminopimélique (LL, méso), ainsi que des acides aminés L-ornithine, L-lysine, et acide L-diaminobutyrique, au niveau de l'oligopeptide, est utilisée pour la description du type de peptidoglycane et apportent, par conséquent, une information pertinente pour la classification des actinobactéries (Wang et Jiang, 2016).

b- Sucres : l'analyse des sucres est requise pour l'identification et la classification des actinobactéries. Cinq profils, basés sur la présence de sucres distinctifs, sont établis ;

profil A: correspond à une composition en arabinose et galactose ; profil B: madurose; profil C: absence de sucres caractéristiques ; profil D: arabinose et xylose ; profil E: rhamnose. La combinaison entre la composition de la paroi, en acides aminés et en sucres permet de décrire huit (8) types de paroi, utiles pour la distinction des actinobactéries (Tableau 1) (Wang et Jiang, 2016).

Tableau 1. Types pariétaux et composition chez les actinobactéries (Wang et Jiang, 2016).

Type pariétal	Constituants majeurs
I	LL-D.A.P, glycine
II	Méso-D.A.P., glycine
III	Méso-D.A.P.
IV	Méso-D.A.P., arabinose, galactose
V	Lysine, Ornithine
VI	Présence variable d'acide aspartique et de galactose
VII	D.A.B., glycine
VIII	Ornithine

D.A.P.: acide 2,6-diaminopimélique ; D.A.B.: acide 2,4-diaminobutyrique

c- Lipides polaires : ils sont représentés par les phospholipides de la membrane cytoplasmique qui comprennent phosphatidylglycérol, diphosphatidylglycérol, phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylserine, phosphatidyliositol, et d'autres phosphatidylglycolipides, en plus de glycolipides. Pour la différenciation des actinobactérie, cinq types phospholipidiques sont décrits et représentés sur le tableau 2 (Wang et Jiang, 2016).

Tableau 2. Types phospholipidiques et composition chez les actinobactéries (Wang et Jiang, 2016).

Type phospholipidique	Phospholipides caractéristiques
P I	Absence de phospholipides azotés
P II	Phosphatidyléthanolamine
P III	phosphatidylcholine
P IV	Phospholipides comportant des glucosamines
P V	Phosphatidylglycérol et phospholipides comportant des glucosamines

d- Ménaquinones : Elles sont localisées au niveau au niveau de la membrane cytoplasmique où elles jouent un rôle important dans la chaîne respiratoire. Elles sont le seul type de quinones respiratoires isopréniques, détecté chez les actinobactéries. Ainsi, la variation du nombre d'unités isopréniques formant la chaîne latérale et du nombre de doubles liaisons, est d'une grande valeur taxonomique. Pour exemple, le genre *Nocardia* se caractérise par du MK-8(H4), le genre *Streptomyces* par du MK-

9(H6) et le genre *Thermoactinomyces* par du MK-6 (Zerizer, 2014 ; Wang et Jiang, 2016).

- e- **Acide mycolique** : c'est un acide gras caractérisé par un poids moléculaire élevé, dont la chaîne est longue de plus de 90 atomes de carbone. Il est représentatif des genres *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordona*, *Myobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Turicella* et *Tsukumurellu* (Wang et Jiang, 2016).
- f- **Acides gras** : du fait de la distribution exclusive de certains acides gras pariétaux chez des groupes bactériens déterminés, leur utilité taxonomique est avérée et les actinobactéries n'en font pas exception. Ainsi, sont analysés des critères comme la variation de la longueur des chaînes carbonées, la présence de liaisons saturée et non saturée, ou encore l'occurrence de groupements méthyl (Wang et Jiang, 2016).

3.2.3. Caractérisation phylogénétique

Le développement de la biologie moléculaire et l'élaboration d'outils bioinformatiques performants a permis d'introduire de nouvelles analyses basées sur la structure de l'ADN, qui viennent renforcer les tests phénotypiques classiques, mis en œuvre pour la classification et l'identification des bactéries. Parmi les techniques les plus pertinentes, le séquençage du gène codant l'ARNr 16S est de loin l'analyse la plus utilisée, du fait de son efficacité à établir des relations phylogénétiques intra et inter-taxons. Le choix de l'ARNr 16S est dû d'abord à sa présence chez toutes les bactéries, à sa stabilité fonctionnelle et à sa composition en régions hautement conservées et d'autres variables. D'autres analyses, tout aussi significatives, consistent en l'hybridation ADN/ADN, ainsi que la détermination du coefficient du (G+C)%, les actinobactéries se distinguant par des taux élevés, allant de 50 à 80% (Chen *et al.*, 2016). Il est, cependant, utile de noter que ce paradigme est relativement rompu, suite à une étude qui a montré la faible teneur en (G+C) d'actinobactéries isolées d'eaux douces (Alvarez *et al.*, 2017).

3.3. Classification

Le Manuel Bergey de Systématique Bactériologique – 2ème édition (2012), se présente en cinq volumes, contenant des noms d'espèces bactériennes, internationalement reconnues, dont l'identification moléculaire est basée sur les séquences des gènes codant l'ARNr 16S, qui est pour le moment, l'analyse la plus significative pour l'identification des actinobactéries (Anandan *et al.*, 2016). Dans le volume 5, le phylum *Actinobacteria* est divisé en six classes;

Actinobacteria, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria*, et *Thermoleophilia* (Figure 4). La classe *Actinobacteria* renferme quinze (15) ordres qui sont *Actinomycetales*, *Actinopolysporales*, *Bifidobacteriales*, *Catenulisporales*, *Corynebacteriales*, *Frankiales*, *Glycomycetales*, *Jiangellales*, *Kineosporiales*, *Micrococcales*, *Micromonosporales*, *Propionibacteriales*, *Pseudonocardiales*, *Streptomyetales*, *Streptosporangiales*. Les espèces n'ayant pas été validées lors de l'élaboration du manuel, sont classées dans un seizième ordre *Incertae sedis* (Figure 5) (Kampfer, 2012).

3.4. Applications

Les actinobactéries figurent parmi les groupes microbiens les plus dominants qui produisent un arsenal de métabolites primaires et secondaires industriellement importants. Un large éventail d'antibiotiques, disponible sur le marché est obtenu à partir de leurs espèces.

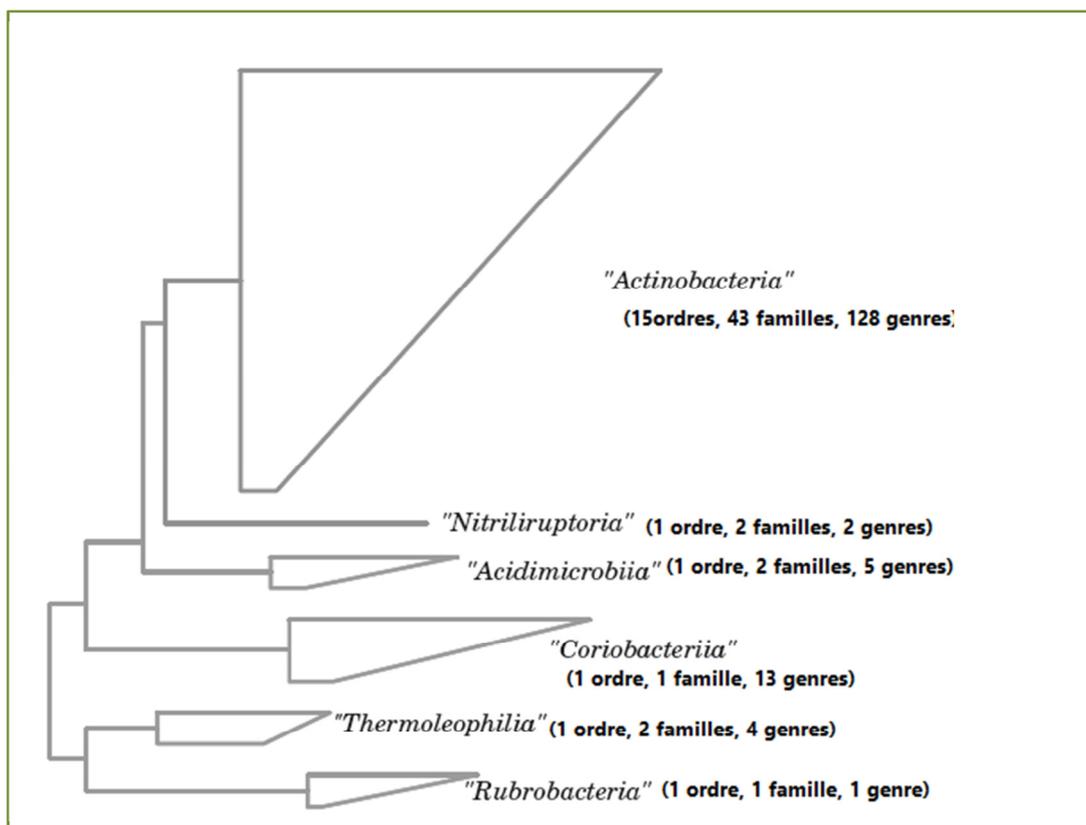


Figure 4. Relations phylogénétiques entre les classes du phylum *Actinobacteria*, selon la comparaison entre les gènes codant pour l'ARNr 16S (Kampfer, 2012).

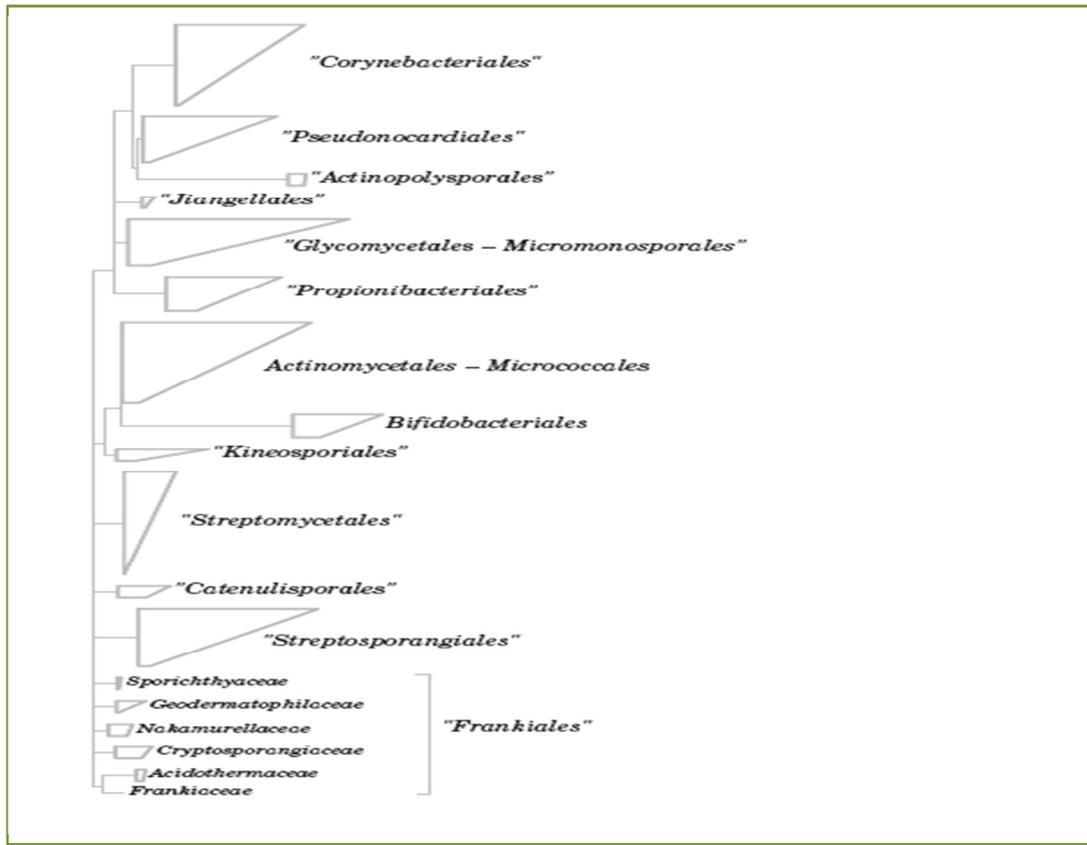


Figure 5. Relations phylogénétiques entre les 15 ordres de la classe *Actinobacteria*, selon la comparaison entre les gènes codant pour l'ARNr 16S (Kampfer, 2012).

C'est aussi le cas de produits tels que des enzymes, des herbicides, des vitamines, des pigments, des larvicides, des phytohormones et des tensioactifs, qui sont d'une grande valeur commerciale (Anandan *et al.*, 2016).

3.4.1. Production d'antimicrobiens

Le premier rôle qui vient à l'esprit quand le groupe des actinobactéries est évoqué, consiste en la production d'une diversité de substances antibactériennes et antifongiques, et pour cause, 80% des molécules antimicrobiennes utilisées, dérivent des actinobactéries, spécialement, des genres *Streptomyces* et *Micromonospora*, qui les synthétisent pour, entre autres, éliminer d'éventuels organismes compétiteurs (Anandan *et al.*, 2016). Elles présentent des structures variées, leur permettant d'être classées dans différentes familles d'antibiotiques, comme les bêta-lactamines, les aminoglycosides, les macrolides, les anthracyclines, les tétracyclines, les glycopeptides, les chloramphénicolés, les nucléosides et les polyènes. Chaque classe possède un mécanisme d'action qui lui est spécifique et agit sur des cibles déterminées, telles que la synthèse de la paroi cellulaire et de la membrane phospholipidique, l'inhibition de l'ARN polymérase et de la synthèse protéique, le blocage de la transcription et de la réplication de l'ADN (Grasso *et al.*, 2016). Des études menées par Zhang *et al.* (2003) et Farris *et al.* (2011) ont même démontré la production de bactériocines (peptides à activité antibactérienne, à grand intérêt dans la bioconservation des aliments), par des souches telluriques de *Streptomyces ipomoeae* et *Streptomyces scopuliridis*, respectivement. Certaines actinobactéries peuvent produire plus d'une substance bioactive (*Streptomyces griseus*), aussi une même molécule à activité antimicrobienne peut être synthétisée par différentes espèces d'actinobactéries, c'est le cas de l'actinomycine par exemple (Anandan *et al.*, 2016).

Cependant, l'inquiétante acquisition de certaines souches bactériennes pathogènes, d'une résistance multiple aux traitements antibiotiques connus à ce jour, constitue un réel problème de santé publique, ce qui incite les chercheurs du monde entier à mettre la main sur de nouvelles molécules dont le mode d'action diffère des substances actuelles, pour contrer ce phénomène de résistance. Cela ne pourra se faire qu'à travers la recherche de nouvelles espèces microbiennes bioactives, et les actinobactéries restent les candidats les plus prometteurs, de par leur métabolisme riche et diversifié.

3.4.2. Production d'enzymes

Une autre propriété des actinobactéries et pas des moindres, consiste en la production d'une large gamme d'enzymes capables de dégrader les complexes chimiques naturels et synthétiques, les plus récalcitrants. Du fait d'une thermostabilité accrue et une activité maintenue sur un large intervalle de pH, ces enzymes présentent souvent un intérêt biotechnologique significatif dans les différentes industries des aliments, du textile, du papier, des fermentations, de l'alimentation animale, ainsi que des détergents. Citons comme exemple ; amylases, cellulases, lipases, protéases, xylanases, pectinases, chitinases et kératinases (Anandan *et al.*, 2016 ; Le Roes-Hill et Prins, 2016).

3.4.3. Biodégradation et bioremédiation

La bioremédiation ou biotechnologie environnementale, est l'utilisation d'organismes vivants pour nettoyer des écosystèmes pollués, en transformant les substances toxiques en composés moins dangereux. Les actinobactéries sont de bons candidats pour l'application en bioremédiation de sols contaminés par divers polluants organiques et inorganiques (Alvarez *et al.*, 2017). La raison à cela réside, notamment, en leur diversité métabolique et la faculté à s'adapter et à résister aux complexes chimiques, par la synthèse d'enzymes hydrolytiques spécifiques. De nombreuses études ont montré l'implication de souches appartenant à divers genres d'actinobactéries, principalement *Streptomyces*, *Nocardioopsis* et *Frankia*, dans la dégradation de contaminants comme les hydrocarbures, les pesticides et les métaux lourds, réduisant ainsi leurs concentrations et par la même occasion le degré de pollution des écosystèmes touchés (Anandan *et al.*, 2016 ; Rehan *et al.*, 2016). Plusieurs stratégies de bioremédiation, impliquant les actinobactéries, sont mises en avant, telles que la bioaugmentation, la biostimulation, l'immobilisation de cellules, la production de biosurfactants, la conception de cultures mixtes définies et l'utilisation de systèmes plantes-microorganismes (Alvarez *et al.*, 2017).

3.4.4. Autres applications

D'autres métabolites secondaires produits par les actinobactéries, sont tout aussi importants, sur les plans biotechnologique, environnemental et économique :

- **les bioherbicides**, avec un effet néfaste sur la croissance des mauvaises herbes, sont synthétisés, là encore, par diverses espèces de *Streptomyces*. Les molécules produites

sont variables de par leurs structures et modes d'action. Ainsi, l'herbicidine et l'herbimycine, produites par *S. saganonensis*, contrôlent le développement des monocotylédones et dicotylédones. L'anisomycine quant à elle, provoque l'arrêt de la synthèse de la chlorophylle. La coformycine carbocyclique et l'hydantocidine de *S. hygrosopicus*, inhibent la synthèse protéique. D'autres souches, comme *Nocardia* sp. présentent une activité antagoniste aux champignons phyto-pathogènes, jouant ainsi le rôle de fongicides (Anandan *et al.*, 2016). Des métabolites à potentiel insecticide ont également été décrits, il s'agit de la spinosyne A et de l'avermectine B (Grasso *et al.*, 2016) ;

- **les probiotiques** sont définis comme des microorganismes dont la présence engendre un effet bénéfique sur l'hôte, par divers moyens, tels que la modification de la communauté microbienne associée, l'amélioration de l'absorption de certains aliments, et par conséquent, la valorisation de leur valeur nutritive, ou encore l'amélioration de la réponse immunitaire face aux maladies (Sanders, 2008). Le potentiel probiotique de certaines actinobactéries marines, réside, principalement, dans leur capacité à dégrader des macromolécules telles l'amidon et les protéines, ainsi qu'à leur faculté à synthétiser des agents antimicrobiens (Anandan *et al.*, 2016) ;
- **les biosurfactants** sont des composés microbiens présentant des fragments hydrophiles et hydrophobes, actifs en surface. Ils sont biodégradables et peuvent être produits à basses températures. Leurs applications touchent plusieurs domaines, notamment, les industries alimentaire, cosmétique, textile et pharmaceutique. Plusieurs biosurfactants et bioémulsifiants sont connus et répertoriés parmi les métabolites synthétisés par les actinobactéries (Anandan *et al.*, 2016) ;
- **les vitamines** : les vitamines thiamine et B₁₂ peuvent être produites par les actinobactéries, par fermentation. L'addition de sels de cobalt, utilisés comme précurseurs, au milieu de culture, semble nécessaire pour la synthèse de la B₁₂ (Anandan *et al.*, 2016) ;
- **les pigments** : les colorants synthétiques présentent des limites, principalement, du fait de la toxicité des composés chimiques utilisés lors de leur production. Les pigments naturels d'origine microbienne sont d'un grand intérêt pour l'industrie du textile, spécialement, ceux des actinobactéries, qui se présentent sous différentes nuances de bleu, violet, rouge, rose, jaune, vert, marron et noir (Anandan *et al.*, 2016) ;

- **la synthèse de nanoparticules** : les nanoparticules intéressent les scientifiques, car elles permettent de combler l'écart entre les matériaux apparents et les structures atomiques ou moléculaires. Leur synthèse chimique est, certes, peu coûteuse, mais utilise des solvants toxiques et engendre des sous-produits dangereux, d'où l'intérêt de s'orienter vers des méthodes de production naturelle, par des microorganismes, notamment les actinobactéries, qui sont d'efficaces productrices de nanoparticules montrant de vastes propriétés biologiques ; antibactériennes, antifongiques, anticancéreuses, antiparasitaires et antioxydantes. Des souches de *Streptomyces* et d'*Arthrobacter* sont étudiées pour développer des méthodes non toxiques, pour la synthèse de nanoparticules métalliques d'or et d'argent (Anandan *et al.*, 2016).

4. Pesticides

4.1. Définition

Les pesticides ou produits phytosanitaires sont définis comme étant des préparations contenant une ou plusieurs substances actives, dont les propriétés chimiques contribuent à protéger les végétaux ou leurs produits, contre les organismes nuisibles, ou à prévenir leur action. Ces formulations comportent généralement, en plus du ou des composés actifs, des additifs ; les adjuvants qui renforcent l'efficacité du pesticide et facilitent son utilisation (El Mrabet et Charlet, 2008 ; Pacanoski, 2015). Le produit final est commercialisé sous différentes formes ; liquide, granulés et poudre (Özkara *et al.*, 2016).

4.2. Classification

La classification des pesticides est complexe du fait de leur diversité en structure chimique, groupements fonctionnels et activité. Cependant, trois systèmes de classification sont pris en considération ; le premier repose sur le type d'organismes à combattre, alors que le second est basé sur la nature chimique de la substance active et le troisième concerne son mode d'action (El Mrabet et Charlet, 2008 ; Özkara *et al.*, 2016).

Ainsi, selon l'espèce nuisible à contrôler, trois grandes familles se distinguent principalement ; il s'agit des herbicides, des fongicides et des insecticides. Le groupe des herbicides est employé pour éliminer les mauvaises herbes d'une culture agricole. Celui des fongicides permet de combattre la prolifération des maladies végétales provoquées par les

champignons. Alors que les insecticides sont destinés à éradiquer les insectes susceptibles de coloniser les plantes (Özkara *et al.*, 2016).

D'autres types de pesticides sont également commercialisés, mais dans une moindre mesure ; les acaricides (contre les acariens) ; les némantocides (contre les vers nématodes) ; les rodenticides (contre les rongeurs) ; les taupicides (contre les taupes) ; les molluscicides (contre les limaces et escargots) ; les corvicides et corvifuges (contre les corbeaux et autres oiseaux ravageurs des cultures) (El Mrabet et Charlet, 2008).

Le deuxième système de classification reposant sur la nature chimique des pesticides, permet de distinguer, principalement, six familles ; les organochlorés, les organophosphatés, les carbamates, les pyrethrynoïdes, les amides, les anilines et les composés hétérocycliques azotés (Özkara *et al.*, 2016). Les trois premières familles se distinguent par des composés hautement toxiques, incriminés dans des affections létales chez l'Homme et les animaux et sont, de ce fait, pour la plupart, prohibés dans les pays développés, comme les États Unis. Cependant, leur emploi est toujours de vigueur dans les pays en voie de développement. Les autres familles renferment généralement des molécules moins toxiques (Özkara *et al.*, 2016).

Selon leur mode d'action, les pesticides sont répartis en composés non systémiques et systémiques. Les premiers ne pénètrent pas les tissus de la plante contrairement aux seconds qui sont transportés dans le système vasculaire de la plante pour apporter l'effet souhaité (Özkara *et al.*, 2016).

Une quatrième classification, également retenue, est basée sur la toxicité des pesticides, où quatre niveaux sont établis ; molécules extrêmement toxiques (classe Ia) ; hautement toxiques (classe Ib) ; modérément toxiques (classe II) ; légèrement toxiques (classe III) et produits peu susceptibles de présenter des risques aigus (classe IV) (Özkara *et al.*, 2016).

4.3. Herbicides

Les herbicides représentent la famille de pesticides la plus utilisée dans le monde, toutes cultures confondues (Cesio *et al.*, 2011). Leur emploi vise à ralentir ou bloquer la croissance des végétaux entrant en concurrence avec la culture à protéger. Selon leur nature chimique, ils peuvent agir à différents niveaux ; sur l'hormone de croissance auxine, en perturbant la régulation de sa production ; sur la photosynthèse ; sur la division cellulaire ; sur la synthèse des lipides, des acides aminés et de la cellulose (Sherwani *et al.*, 2015). L'herbicide réagit

avec le métabolisme biochimique des mauvaises herbes sans interférence négative sur la croissance de la culture agricole à protéger, car cette dernière possède généralement un mécanisme de défense absent chez la plupart des mauvaises herbes concurrentes (El Hadary et Chung, 2013).

Plusieurs familles chimiques constituent les herbicides et chacune d'elles agit sur des sites spécifiques selon des mécanismes bien définis. Ainsi, il y a, par exemple, les Aryloxyphenoxypropionates qui inhibent l'acétyl coenzyme A carboxylase ; les sulfonylurées agissant sur l'acétolactate synthase ; l'acide benzoïque bloquant les microtubules ; les triazines inhibant le transport photosynthétique des électrons, et la liste est encore longue, traduisant une grande diversité chimique des herbicides et par conséquent des modes d'action variables (Cesio *et al.*, 2011 ; Sherwani *et al.*, 2015).

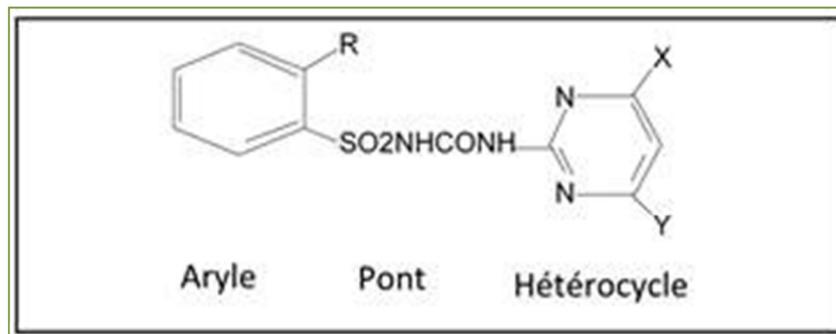
4.4. Herbicides sulfonylurées

4.4.1. Structure et mode d'action

Les herbicides de la famille des sulfonylurées sont utilisés depuis les années 80 et le sont toujours du fait de leur efficacité à de faibles doses (< 0,6 kg/ha), comparés aux autres herbicides (Andersen *et al.*, 2001 ; Chèvre, 2007 ; Sandín-España *et al.*, 2011). Ils présentent les caractéristiques requises pour un bon pesticide, à savoir ; une grande sélectivité et une faible persistance dans l'environnement (Bottaro *et al.*, 2008). Ils présentent un large spectre d'activité pouvant altérer la croissance des dicotylédones, des graminées et des vivaces. Ces molécules agissent sur l'enzyme acétolactate synthase (ALS), responsable de la synthèse des acides aminés branchés ; valine, leucine et isoleucine, qui se retrouve inhibée. Cet arrêt se répercute ainsi sur la croissance des mauvaises herbes, plus précisément au niveau du tissu cellulaire spécialisé dans la croissance ; le méristème (Chèvre, 2007). Il est à préciser qu'à côté des végétaux, l'enzyme ALS est également présente chez les bactéries et les champignons mais elle ne l'est pas chez l'homme et les mammifères, d'où la faible toxicité des sulfonylurées sur ces derniers (Arabet, 2014).

La structure chimique des sulfonylurées renferme trois parties ; le groupement Aryle, le Pont sulfonylurée et l'Hétérocycle (Figure 6), chacun de ces éléments joue un rôle primordial dans l'activité herbicide. Les sulfonylurées sont des molécules non volatiles, avec des pressions de vapeur < 10^{-10} mmHg. Elles se comportent comme des acides faibles, avec des valeurs de pKa variant de 3 à 5. Elles sont solubles dans l'eau et se caractérisent par une faible

adsorption aux particules du sol (Arabet, 2014). Cependant, leur adsorption peut être plus prononcée au niveau de sols acides, rendant ainsi leur biodégradation difficile (Martin, 2000).



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

Figure 6. Structure générale des sulfonilurées (Arabet, 2014).

4.4.2. Tribenuron méthyle

Le tribenuron méthyle est une molécule chimique complexe de la famille des sulfonilurées (C₁₅H₁₇N₅O₆S) (Figure 7). Il est absorbé par les feuilles et les racines et a un mode d'action systémique, présentant un effet herbicide sélectif sur les dicotylédones, par l'inhibition de la synthèse des acides aminés à chaîne aliphatique, suite au blocage de l'enzyme acétolactate synthase (AESA, 2004).

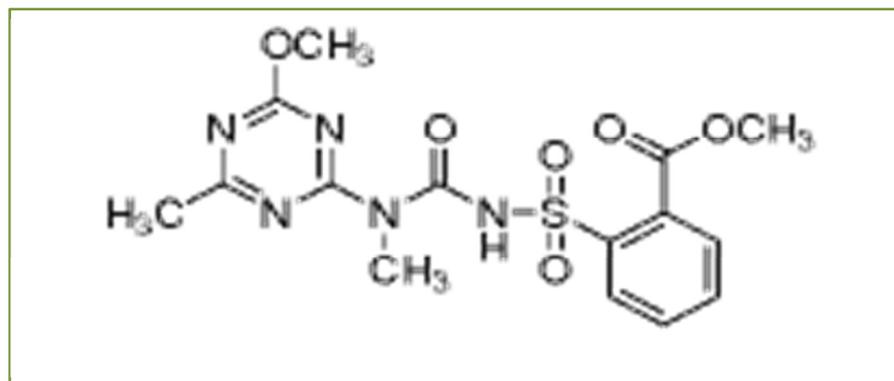


Figure 7. Structure chimique du tribenuron méthyle (Sigma-Aldrich)

Les caractéristiques physico-chimiques d'un herbicide sont importantes à déterminer car elles permettent de comprendre son devenir dans le sol ainsi que son évolution vers les autres compartiments environnementaux. Les principales propriétés significatives sont, entre autres, la structure chimique, la solubilité dans l'eau et les solvants, la pression de vapeur, l'acidité et le temps de demi-vie (Zabaloy *et al.*, 2011). Le tableau 3 résume les propriétés physiques et chimiques du TBM. Ayant un pK_a de 4,7, le TBM se distingue par une bonne solubilité dans l'eau et par conséquent une faible adsorption au sol. Il présenterait un faible potentiel de volatilisation et de bioaccumulation, avec une constante de Henry de $10^{-8} \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ et un coefficient de partage octanol/eau de 0,3 à pH 7. En conditions acides, le TBM présente des temps de demi-vie courts qui ont tendance à augmenter sur des milieux neutres ou alcalins (ARLA, 1995).

Tableau 3. Propriétés physico-chimiques du tribenuron méthyle (ARLA, 1995).

Formule empirique	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$
Masse moléculaire	395,39
État matériel	solide
Couleur	brun clair
Densité apparente	1,5 g/cm ³
Point de fusion	141 °C
pK_a	4,7
Pression de vapeur	$3,9 \times 10^{-10}$ mmHg à 25 °C
Constante de Henry	$10^{-8} \text{ Pa}\cdot\text{m}^3\cdot\text{mol}^{-1}$ à pH 7
Coefficient de partage	
octanol/eau (K_{oe})	0,3 à pH 7
Solubilité à 25 °C	
Solvant	mg/L
acétone	43,8
acétonitrile	54,2
tétrachlorure de carbone	3,12
acétate d'éthyle	17,5
hexane	0,028
méthanol	3,39
eau à pH 4,0	28
eau à pH 5,0	50
eau à pH 6,0	280
Vitesse d'hydrolyse	
pH	demi-vie (jours)
5	< 1
7	3-6
9	32

2.5. Devenir et persistance dans l'environnement

Le surplus de l'emploi d'un pesticide se traduit par la présence, dans l'environnement, de résidus, constitués du composé actif et/ou de ses produits de dégradation (El Mrabet et Charlet, 2008). Ces molécules complexes sont souvent récalcitrantes et persistent dans les sols traités. Elles peuvent se retrouver, par des mécanismes divers, dans plusieurs écosystèmes (Meleiro Porto *et al.*, 2011 ; Langenbach, 2013 ; Özkara *et al.*, 2016). Ainsi, elles sont détectées dans les trois principaux compartiments environnementaux ; sols, eaux et air, plus précisément, au niveau des rivières, des nappes phréatiques, de l'air, des fruits et légumes, des céréales, des produits d'origine animale et même dans les cheveux (El Mrabet et Charlet, 2008 ; Zabaloy *et al.*, 2011 ; Perschbacher *et al.*, 2012). Les mécanismes qui engendrent cette vaste pollution, sont nombreux et se résument, principalement ; aux phénomènes de lixiviation et de lessivage, associés à une faible rétention du pesticide aux particules du sol ; au transfert de l'application des pesticides aux sols et au mode de l'application lui-même, en effet, lors de la pulvérisation, les pertes du pesticide sont estimées entre 10 et 70% vers le sol, et de 30 à 50% vers l'air. L'évaporation de ces substances joue également un rôle dans leur dispersion, et entraîne leur accumulation dans les nuages, ce qui engendre une contamination des eaux de pluie (Devlin *et al.*, 1992 ; El Mrabet et Charlet, 2008).

Les herbicides de manière générale, peuvent contaminer plusieurs sites, et les sulfonyles ne dérogent pas à cette règle, du fait de leur grande mobilité résultant du double effet d'une faible adsorption et d'une bonne solubilité dans l'eau. Ainsi, les molécules mères ou leurs résidus peuvent être détectés sur le sol, les nappes phréatiques et les eaux de surface (AESA, 2004 ; Cesio *et al.*, 2011). Dans un rapport d'une étude visant à déterminer l'étendue de la contamination du lac Léman (Suisse – France), par divers polluants, la présence de substances sulfonyles est jugée préoccupante, où des concentrations de l'ordre de quelques dizaines de ng/l, sont détectées (Chèvre, 2007).

Pour certains pesticides, les métabolites issus de la transformation partielle de la molécule mère sont problématiques sur le plan environnemental, car ils persistent plus longtemps et présentent une toxicité accrue. C'est le cas des herbicides sulfonyles (Bottaro *et al.*, 2008) et du TBM particulièrement, dont la dégradation conduit à l'apparition d'une douzaine de composés, dont le devenir est, pour certains, problématique, car ils ne sont dégradés ni chimiquement ni biologiquement, ce qui engendre une présence durable dans les sols contaminés (Roberts et Hutson, 1998). Cette persistance du TBM et de ses métabolites de

transformation dans l'environnement est variable car dépendant de plusieurs facteurs. Quand les conditions y sont favorables (températures fraîches et pH >7), le TBM peut atteindre les nappes phréatiques à des concentrations dépassant 0,1 µg/L. Sa présence dans l'air est susceptible d'être négligeable à cause de sa faible volatilité (AESAs, 2004).

2.6. Toxicité

Quand les pesticides sont appliqués suivant les bonnes pratiques agricoles (BPA), les limites maximales de résidus (LMR), établies par les autorités chargées de la santé publique, ne sont pas dépassées. Par contre, si les BPA ne sont pas respectées, l'apparition de résidus nocifs est inévitable et entraîne un risque sanitaire non négligeable (El Mrabet et Charlet, 2008 ; Zabaloy *et al.*, 2011).

L'effet toxique des pesticides sur la santé de l'Homme et des animaux est confus et dépend du type du produit phytosanitaire ainsi que de l'ampleur de l'exposition. Cependant, des effets néfastes graves sur la santé, tels que des troubles de la reproduction et du développement du système nerveux, sont constatés chez des populations vivant auprès de rivières contaminées, mais la relation directe avec les pesticides et leur implication, est difficile à établir, principalement, à cause de l'apparition de ces pathologies à long terme. Des cas de toxicité aiguë sont enregistrés chez les agriculteurs et se traduisent par des maux de tête, des éruptions cutanées ou encore des troubles de la vision (El Mrabet et Charlet, 2008 ; Braconi *et al.*, 2011 ; El Hadary et Chung, 2013). Des cas de bioaccumulation de molécules pesticides, chez des organismes de la faune et flore aquatique, de milieux aqueux contaminés, sont enregistrés (Chèvre, 2007 ; El Mrabet et Charlet, 2008 ; Langenbach, 2013). La toxicité des pesticides est également incriminée dans l'extinction d'espèces d'oiseaux (Meleiro Porto *et al.*, 2011). De manière générale, les sulfonilurées sont peu toxiques pour les poissons, invertébrés et algues, mais le sont fortement pour les plantes aquatiques (AESAs, 2004 ; Chèvre, 2007). Le TBM présente un faible risque de toxicité pour les oiseaux, les mammifères, les abeilles ainsi que les vers de terre. Par contre, ce risque se trouve élevé chez les plantes aquatiques et certaines plantes terrestres sensibles, alors que l'activité du microbiote tellurique n'est, globalement, que faiblement affectée (AESAs, 2004). Ceci dit, des études démontrent la présence de souches microbiennes résistantes et d'autres sensibles à la présence de composés sulfonilurées (Arabes *et al.*, 2014 ; Radivojević *et al.*, 2014).

2.7. Dégradations abiotique et microbienne

Les pesticides peuvent être dégradés partiellement ou totalement par voie chimique ou biologique, par photolyse ou encore par volatilisation. Cependant, les deux premières sont les plus dominantes et interviennent souvent de manière concomitante.

Le terme de biodégradation désigne la dissipation partielle ou totale d'un composé chimique, par l'intervention de microorganismes. Les espèces microbiennes du sol dégradent les produits phytosanitaires par deux mécanismes possibles ; le premier par co-métabolisme qui fait intervenir des enzymes non spécifiques et conduit à une dégradation partielle, entraînant l'accumulation de métabolites souvent plus nocifs que la molécule mère ; le second mécanisme se fait par un métabolisme dont les réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques, qui permettent aux microorganismes impliqués, d'utiliser la molécule pesticide, comme source de carbone et d'énergie, ce qui aboutit à la minéralisation du substrat (Devlin *et al.*, 1992 ; Meleiro Porto *et al.*, 2011 ; Zabaloy *et al.*, 2011).

Le co-métabolisme étant non-spécifique, est mis en place dès les premières applications des produits phytosanitaires. En revanche, le métabolisme spécifique apparaît suite à l'application répétée du produit phytosanitaire. L'intensité de ce métabolisme augmente en fonction de la fréquence des traitements phytosanitaires et il est hautement influencé par les caractéristiques physico-chimiques du milieu ainsi que du type de la molécule phytosanitaire. L'adaptation des microorganismes à ces composés et leur faculté à les dégrader, sont dues à la plasticité de leurs génomes, qui sont en constant changement, grâce aux échanges d'informations génétiques, entre les différentes espèces microbiennes, à travers les phénomènes de conjugaison horizontale et recombinaison génétique (Zabaloy *et al.*, 2011).

Le TBM peut être dégradé par plusieurs processus se résumant à une dégradation abiotique par hydrolyse chimique impliquant ses différents groupements fonctionnels ; et une dégradation biotique (microbienne). Les deux mécanismes dépendent de plusieurs paramètres ; pH, température, degré d'humidité du sol, présence de microorganismes dégradants (Andersen *et al.*, 2001). Ainsi, selon la nature et les conditions physico-chimiques du sol, le TBM peut être dégradé ou persister. Selon Devlin *et al.* (1992), le TBM peut subsister moins d'un mois dans les sols acides, par une double dégradation microbienne et chimique, ou persister au-delà de cet intervalle dans les sols alcalins, étant donné que l'hydrolyse acide cesse alors (Martin, 2000). L'intervention d'autres processus tels que la photo-décomposition ou la volatilité est jugée faible et non significative (Devlin *et al.*, 1992).

De manière générale, la dégradation microbienne des molécules sulfonylurées peut se faire selon trois voies principales ; le clivage du pont sulfonylurée, l'oxydation et dé-estérification. La première voie citée semble être le mécanisme prédominant, contrairement à la dé-estérification qui n'est favorisée qu'à des pH alcalins supérieurs à 10 (Arabet, 2014).

2.8. Bioremédiation

La bioremédiation est une technique ayant pour but d'éliminer des composés chimiques, souvent complexes, responsables de la pollution d'un écosystème donné, en employant des microorganismes capables de dégrader les polluants incriminés. Comme la dissipation des pesticides résulte, majoritairement, de l'activité des microorganismes qui les dégradent partiellement ou totalement, ces derniers sont employés pour dépolluer les compartiments environnementaux touchés (Meleiro Porto *et al.*, 2011).

Il existe différentes approches de bioremédiation, pour choisir la plus appropriée à tel composé, pour tel écosystème, les causes de la pollution doivent être établies au préalable. En effet, un pesticide peut persister pour diverses raisons ; il est inaccessible à la population microbienne, à cause de sa forme chimique ou sa présence dans un compartiment hors d'atteinte ; les groupes microbiens dégradants sont peu actifs ou peu nombreux. Pour chaque situation, une solution définie de bioremédiation est proposée pour déclencher la dégradation du polluant. Ainsi, une biostimulation est envisageable soit par l'apport d'agents mouillants ou tensioactifs pour augmenter la disponibilité biologique du composé, soit par l'ajout de substrats carbonés et énergétiques pour stimuler l'activité biologique du microbiote. Une autre technique dite de bioaugmentation consiste à inoculer des souches microbiennes pures ou un consortium microbien se caractérisant par un pouvoir dégradant, au niveau des parcelles polluées (Langenbach, 2013).

Objectifs de la présente étude

Le travail présenté ci-après vise à évaluer l'effet du tribenuron méthyle sur la croissance de souches d'actinobactéries. Dans un premier temps, un isolement est réalisé à partir de différents échantillons de sols, exempts et traités à l'herbicide étudié. La tolérance des isolats vis-à-vis de l'herbicide, tel qu'il est commercialisé en Algérie, sous l'appellation Granstar[®], est testée. Les souches les plus résistantes sont sélectionnées, pour être caractérisées, morphologiquement, biochimiquement, physiologiquement et phylogénétiquement. Leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques ainsi que leur capacité à produire des substances

antimicrobiennes, font également partie du processus de caractérisation et sont donc mises en évidence.

La seconde partie de l'étude, consiste à déterminer l'effet du TBM sur la croissance des deux souches les plus résistantes, et cela sur trois milieux différents, afin d'évaluer leur aptitude à utiliser le TBM, comme seule source de carbone et d'énergie, et en co-métabolisme. Enfin, la dégradabilité chimique et biotique du TBM est étudiée, par l'élaboration d'une cinétique de disparition du TBM et d'apparition d'éventuels produits de dégradation.

Matériel et

Méthodes

Les étapes de ce travail ont été élaborées au niveau de trois laboratoires différents; laboratoire de recherche de Génie Microbiologique et Applications, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri, Constantine 1, Algérie ; au laboratoire de recherche Équipe Environnement et Microbiologie, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France et au laboratoire pédagogique de Microbiologie, Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Larbi Ben Mhidi, Oum El Bouaghi, Algérie.

2. Isolement des actinobactéries

1.1. Échantillons de sol

Trois types de sols sont utilisés pour cette étude ; deux de nature agricole, dont un provient de la région d'Ain Karma, wilaya de Constantine (sol 1), le deuxième est pris de la région d'Ain Babouche, wilaya d'Oum El Bouaghi (sol 2) et le troisième est forestier (sol 3) et provient de la région de Chaabet Ersas, wilaya de Constantine.

Dans le but de neutraliser les mauvaises herbes, le sol 1 est régulièrement traité par divers herbicides dont le Granstar[®]. Les sols 2 et 3 sont exempts de tout traitement phytosanitaire.

Les échantillons de sol sont récoltés à une profondeur de 10 cm, dans des récipients stériles. Une fois au laboratoire, leur pH ainsi que leur teneur en humidité sont mesurés.

1.2. Herbicide utilisé

L'herbicide Granstar[®] 75 DF est fourni sous forme de poudre par Du Pont de Nemours, (acheté en Algérie). Il figure parmi les herbicides les plus utilisés en Algérie (Institut National de la Protection des Végétaux, 2010). Il est également utilisé partout dans le monde sous différentes dénominations commerciales (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 1995; Andersen *et al.*, 2001; Lubyty *et al.*, 2007; Belkouri *et al.*, 2009).

Le principe actif contenu dans le Granstar[®] 75 DF est une molécule sulfonylurée appelée tribenuron méthyl (TBM) (methyl 2-[4-methoxy-6-methyl-1, 3, 5-triazin-2-yl(methyl)carbamoylsulfamoyl]benzoate) (figure 7), à une concentration de 75%. Le TBM utilisé dans la présente étude, est fourni par Sigma-Aldrich (France).

Le Granstar[®] 75 DF est utilisé en culture céréalière et est actif contre un grand nombre de plantes dicotylédones annuelles (Tanji, 2000). Comme tous les herbicides sulfonylurées, le Granstar[®] 75 DF est utilisé à de faibles mais efficaces doses (12 g/300 l/ha). Le TBM agit en

stoppant la division cellulaire des tissus méristématiques des plantes, à travers l'inhibition de l'acétolactate synthase; une enzyme présente chez les végétaux supérieurs, les bactéries et les champignons, mais absente chez l'Homme et les animaux (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire, 1995; Martin, 2000, Arabet *et al.*, 2014).

1.3. Traitement des échantillons de sol et isolement

Au laboratoire, 150 g des sols 2 et 3 sont incubés avec l'herbicide Granstar[®] à 40 mg/l, cette valeur représente la dose d'application recommandée pour les récoltes céréalières. L'incubation se fait dans des béciers couverts et aérés de deux litres, à température ambiante, pendant 21 jours (Pepper and Gerba 2004). Ci-après, ces sols traités sont nommés respectivement, sol 2 traité et sol 3 traité.

En vue d'isoler des souches d'*Actinobacteria*, 10 g du sol 1 sont suspendus dans 90 ml d'eau physiologique (NaCl 9‰). La même opération est également effectuée avec 10 g de chacun des sols 2 et 3, ainsi que des sols traités 2 et 3 prélevés après 21 jours d'incubation. Des dilutions décimales (10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4}) sont préparées avec de l'eau physiologique. 1 ml de chaque dilution est ensemencé sur gélose Bennett (Annexe 1) (Awad *et al.*, 2009), additionnée de 40 mg/l de Granstar[®]. Ce milieu permet la croissance des *Actinobacteria* (Tendler and Burkholder, 1961) et favorise la production des enzymes et des substances bioactives (Ouhdouch *et al.*, 2001). Après incubation à 30°C pendant 7 jours, les colonies d'*Actinobacteria* sont sélectionnées par un examen direct au microscope optique (x10) sur la base de leur caractéristique morphologique principale, à savoir la présence de fins et courts filaments autour des colonies.

1.4. Conservation des souches isolées

Les souches obtenues sont d'abord purifiées sur gélose Bennett, puis conservées sur gélose inclinée amidon-caséine (Annexe 1), après sporulation, à 4°C (Cavalla et Eberlin, 1994) et sur une solution de glycérol 20% (v/v) à -80°C (Hozzein et Goodfellow, 2008).

2. Résistance à l'herbicide

La résistance des isolats à des doses croissantes du Granstar[®] est vérifiée sur gélose Bennett additionnée de l'herbicide à différentes concentrations croissantes, en commençant par celle recommandée dans le traitement des cultures céréalières : 0,004 ; 0,04 ; 0,05 ; 0,075 ;

0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,25 ; 0,3 ; 0,35 ; 0,4 ; 0,45 ; 0,5 ; 0,55 ; 0,6 et 0,65% (v/v). L'incubation se fait à 30°C pendant 7 jours.

3. Caractérisation des souches résistantes

3.1. Inoculum général

La surface d'une culture de 21 jours sur ISP2 (Annexe 1), contenant spores et fragments mycéliens, est raclée puis transférée dans 5 ml d'eau physiologique stérile (NaCl 9‰), pour obtenir une suspension bactérienne dense. Tous les ensemencements (sauf autre précision) sont réalisés à partir de cet inoculum, qui peut être conservé à température ambiante, jusqu'à 4 heures (Shirling et Gottlieb, 1966).

3.2. Caractères cultureux et morphologiques

Une coloration de Gram est effectuée sur les souches sélectionnées, afin de confirmer le type de paroi et l'organisation mycélienne des cellules.

La croissance des isolats, leurs mycéliums végétatif (de substrat) et aérien, ainsi que leur sporulation sont appréciés et décrits, après 21 jours d'incubation à 30°C, sur huit milieux gélosés, recommandés par le projet international sur les *Streptomyces* ; *ISP*₂, *ISP*₃, *ISP*₄, *ISP*₅, *ISP*₆, *ISP*₇ (Shirling et Gottlieb, 1966), amidon-caséine (Mackay, 1977) et glucose-asparagine (Xu *et al.*, 1996) (Annexe 1).

La description microscopique des mycéliums aérien et végétatif ainsi que des spores est réalisée par la technique des lamelles (Williams et Cross, 1971; Holt *et al.*, 1994) qui consiste en l'insertion d'une lamelle stérile dans une gélose ISP2 (Annexe 1), de manière à former un angle de 45° avec la surface du milieu. Une goutte d'inoculum est déposée sur le bas de la lamelle, en contact avec le milieu. Après une incubation de 14 jours à 30°C, la lamelle est délicatement retirée et déposée sur lame pour une observation microscopique à immersion, pour apprécier les structures des mycélia aérien et de substrat non dénaturées.

3.3. Caractères biochimiques et physiologiques

3.3.1. Tests biochimiques

- fermentation du glucose avec ou sans production de gaz, fermentation du lactose et/ou du saccharose, production de sulfure d'hydrogène, sur gélose inclinée TSI ;

- fermentation du mannitol, mise en évidence d'une éventuelle mobilité, sur gélose semi-solide mannitol-mobilité ;
- utilisation du citrate comme seule source de carbone, sur gélose inclinée citrate de Simmons ;
- croissance en présence de l'oxygène, recherchée sur gélose viande-foie ;
- production de décarboxylases (ODC, LDC, ADH), sur bouillon Moller ;
- voies fermentaires du glucose, déterminées sur bouillon Clark et Lubs ;
- réduction des nitrates, recherchée sur bouillon nitraté ;
- recherche de la catalase sur eau oxygénée 10 V.

Les tests nécessitant une incubation sont mis à 30°C pendant 24 h. Il est à noter qu'une galerie biochimique API 20E est réalisée pour les deux souches les plus résistantes, à partir de cultures de 72 h sur bouillon *ISP₁*. L'incubation des galeries se fait à 30°C pendant sept jours (Wink, 2001).

3.3.2. Production de pigments mélanoides : la production de pigments bruns noirs est recherchée sur les milieux *ISP₆* et *ISP₇* (annexe 1), après une incubation de 2 et 4 jours à 30°C. Deux boîtes des deux géloses nonensemencées, servant de témoins négatifs, sont également incubées dans les mêmes conditions (Shirling et Gottlieb, 1966).

3.3.3. Dégradation de l'amidon : une gélose nutritive contenant de l'amidon (1% v/v) estensemencée en surface, puis incubée à 30°C pendant 14 jours. À la lecture, le milieu est inondé d'une solution de lugol, les zones contenant de l'amidon prennent une coloration brune, alors que l'hydrolyse de l'amidon se manifeste par une absence de coloration autour des colonies (Gordon et Smith, 1953).

3.3.4. Dégradation de la gélatine : une gélose nutritive additionnée de 0,4% v/v de gélatine estensemencée en surface. Après 14 jours à 30°C, 10 ml d'une solution de chlorure de mercure à 15% p/v (annexe 1) sont versés sur le milieu. L'apparition de zones claires témoigne de l'hydrolyse de la gélatine (Williams et Cross, 1971).

3.3.5. Dégradation de la caséine : une solution de lait écrémé à 5% v/v ainsi qu'une eau gélosée à 2% p/v, sont préparées, autoclavées séparément, puis mélangées à volume égal. Au bout de 14 jours à 30°C, des zones claires autour des colonies suggèrent l'hydrolyse de la caséine (Gordon et Smith, 1953; Williams et Cross, 1971).

3.3.6. Action sur le lait écrémé : la peptonisation ainsi que la coagulation d'une solution de lait écrémé à 10% préparée dans de l'eau distillée, sont observées régulièrement pendant 14 jours à 30°C (Williams et Cross, 1971).

3.4. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches d'actinobactéries sélectionnées à des antibiotiques de différentes familles chimiques, est réalisée par la technique de l'antibiogramme, par diffusion sur gélose Mueller-Hinton (annexe 1) (Williams *et al.*, 1983). Les antibiotiques testés sont la pénicilline G 10 µg (P), l'amoxicilline+l'acide clavulanique 30 µg (AMC), l'ampicilline 10 µg (AM), la céfalexine 10 µg (CN), la céfuroxime 30 µg (CXM), la streptomycine 10 µg (S), l'amikacine 30 µg (AK), l'érythromycine 15 µg (E), la spiramycine 100 µg (SP), la fosfomycine 50 µg (FOS), le chloramphénicol 30 µg (C), l'imipénème 10 µg (IPM), l'acide nalidixique 30 µg (NA), la lincomycine 10 µg (L) et la tétracycline 30 µg (TE).

La gélose Mueller-Hinton est ensemencée par écouvillonnage par une suspension d'actinobactéries à 0,5 McFarland en eau physiologique (Annexe 1), ce qui équivaut à une concentration cellulaire d'environ 15×10^7 UFC/ml (Cavalla et Eberlin, 1994). Les disques d'antibiotiques sont, par la suite, déposés à la surface de la gélose ainsi ensemencée. Pour permettre la diffusion des substances antibactériennes, les boîtes sont d'abord laissées à température ambiante pendant 30 min, puis incubées à 30°C pendant 24 h. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et notés.

3.5. Activité antimicrobienne

3.5.1. Souches-test

L'activité antimicrobienne des actinobactéries sélectionnées est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar (Tortorano *et al.*, 1979), vis-à-vis de neuf microorganismes, dont certains proviennent de banques de collections (American Type Culture Collection (ATCC) et Collection de l'Institut Pasteur (CIP)), d'autres sont d'origine clinique. Il s'agit de quatre bactéries à paroi Gram (-) (*Escherichia coli* ATCC 29322, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 13 et *Proteus mirabilis* 23), deux bactéries à paroi Gram (+) (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Enterococcus* sp. 43), deux moisissures (*Aspergillus fumigatus* CIP 1082.74 et *Trichophyton rubrum* CIP 2043.92) et une levure (*Candida albicans* CIP 88465). Aussi, différentes géloses sont testées pour la culture des

actinobactéries (Bennett, GBA, *ISP*₂, AF et SC (annexe 1)), afin de déterminer le milieu favorisant le mieux la production de substances antimicrobiennes.

3.5.2. Activité antibactérienne

Les souches d'actinobactéries sélectionnées sont cultivées sur les cinq géloses citées ci-dessus pendant 7 jours à 30°C (Lee et Hwang, 2002). En parallèle, des suspensions des souches bactériennes testées sont préparées à 0,5 McFarland (Annexe 1) en eau physiologique (soit 15×10^7 UFC/ml), à partir de cultures de 24 h sur gélose nutritive (Annexe 1) (Cavalla et Eberlin, 1994). La technique des cylindres d'agar consiste à prélever des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre, portant des colonies d'actinobactéries prises des cultures de 7 jours obtenues avec les différents milieux utilisés, et à les déposer sur gélose Mueller-Hinton (Annexe 1), préalablementensemencée, par écouvillonnage, par les bactéries-test. Les boîtes sont d'abord mises à 4°C durant 4 h pour permettre une pré-diffusion d'éventuelles substances antibactériennes dans le milieu, puis sont incubées à 37°C pendant 18 h. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et notés (Tortorano *et al.*, 1979; Lee et Hwang, 2002; Kitouni, 2007).

3.5.3. Activité antifongique

Des cultures des deux moisissures testées sont préparées sur gélose Sabouraud (Annexe 1) après ensemencement par touches et incubation à 30°C durant 3 jours. Quant à la levure *Candida albicans*, une culture de 24 h à 37°C est aussi préparée sur gélose Sabouraud.

La recherche de substances antifongiques est réalisée par la technique des cylindres d'agar (Tortorano *et al.*, 1979), selon les instructions décrites en section 3.5.2. Cependant, la mise en évidence de l'activité antifongique est accomplie sur gélose Sabouraud (Annexe 1) et les moisissures y sont ensemencées par une touche centrale. La période de pré-diffusion est respectée pendant 4 h à 4°C et l'incubation des moisissures ainsi que de la levure, est assurée à 30°C/5 jours et à 37°C/24 h, respectivement (Sharma et Parihar, 2010).

Remarque : pour déterminer la sensibilité des neuf microorganismes testés (cités en 3.5.1), un antibiogramme est réalisé selon la technique de diffusion sur gélose (Williams *et al.*, 1983), à l'encontre des quinze antibiotiques cités en 3.4.

3.6. Analyse phylogénétique

3.6.1. Extraction de l'ADN

Les souches d'actinobactéries sélectionnées sont ensemencées sur 5ml de bouillon Luria-Bertani (LB) (Annexe 1) et incubées pendant 48h à 30°C sous agitation (150 rpm), puis sont transvasées dans des eppendorffs de 2 ml (sous une hotte microbiologique), où elles subissent une centrifugation à 10000 g pendant 30 secondes. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 0,5ml de Tris-EDTA (TE) à pH 8. Une deuxième centrifugation, puis une troisième sont effectuées à 10000 g pendant 30 secondes, où le surnageant est éliminé. L'extraction de l'ADN est faite selon le protocole du kit *Ultraclean Microbial DNA Isolation* (Mo Bio, France).

3.6.2. Amplification du gène codant l'ARNr 16S

Le milieu réactionnel de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est composé de 1 µl de solution d'ADN ; 0,5 µl d'amorce 8F à 20 µM ; 0,5 µl d'amorce 1387R à 20 µM ; 2 µl de MgCl₂ (*Eurobio*) ; 1 µl de dNTP à 20 mM ; 5 µl de tampon de la taq 10X (*Eurobio*) ; 1µl de BSA 100X; 0,5 µl de Taq polymérase (*Eurobio*) et de 38,5 µl d'eau distillée stérile (Tableau 4). Les amorces bactériennes 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (Lane, 1991) et 1387R (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') (Marchesi *et al.*, 1998) sont utilisées pour l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S, avec un programme d'une initiale étape de dénaturation à 95°C pendant 10 min, suivie de 35 cycles de 45 sec à 95°C, 45 sec à 56°C et 1 min à 72°C, et une étape finale d'élongation à 72°C pendant 10 min, dans un thermo-cycler *AB Applied Biosystems Veriti 96 well* (Bordenave *et al.*, 2004).

3.6.3. Électrophorèse et purification des produits de la PCR

L'électrophorèse (*Embi Tec RunoneTM electrophoresis cell*) est faite sur un gel d'agarose à 1% contenant 35 ml de TBE (1x) + 0,35 g d'agarose + 1 goutte de BET. Après solidification, le gel est inondé de TBE (0.5x), jusqu'à recouvrement total des puits, dont chacun est rempli par 5µl de milieu PCR + 1 µl de bleu de bromophénol (6x). 1µl de *Smart Ladder* (SL) est également déposé, seul sans le colorant dans un puits, pour déterminer la taille des bandes obtenues. Deux autres puits sont réservés, l'un recevant 1 µl d'un témoin positif constitué du milieu PCR + 1 µl d'ADN 16S dilué au 1/100, le second recevant 1 µl d'un témoin négatif (sans ADN), composé du milieu PCR + 1 µl d'eau distillée stérile.

Tableau 4. Cycle et composition du milieu de PCR

Milieu PCR en μ l	
ADN matrice	1,00
eau distillée stérile	38,50
Amorce 8F à 20 μ M	0,50
Amorce 1387R à 20 μ M	0,50
MgCl ₂ Eurobio	2,00
dNTP(20 mM)	1,00
Tampon 10X Eurobio	5,00
BSA 100X	1,00
Taq Eurobio	0,50
Total	50,00

Programme PCR avec 35 cycles

Étape 1 : 10 min à 95°C
 Étape 2 : 45 sec à 95°C
 Étape 3 : 45 sec à 56°C
 Étape 4 : 1 min à 72°C
 Étape 5 : aller à l'étape 2 : 35 fois
 Étape 6 : 10 min à 72°C

Après 37 min de migration des bandes, sous une tension de 100 volts, le gel est observé sur Imager UV (*Pharmacia Biotech. Imager Master® VDS*) et l'obtention des bandes d'ADN 16S est vérifiée par leur position par rapport aux bandes du SL.

Après confirmation de l'amplification de l'ADN 16S, le milieu PCR restant (soit 45 μ l) est transvasé dans des eppendorfs de 1,5 ml, pour être évaporé jusqu'à 15 μ l au *Speed Vac*. Ce volume d'ADN 16S est soumis avec 3 μ l de bleu de bromophénol, à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Après migration, les bandes d'ADN sont retirées sous UV avec des lames stériles, et sont disposées dans des eppendorfs de 1,5 ml préalablement pesés. Le tout est de nouveau pesé. La purification de l'ADN amplifié est alors entamée et est accomplie avec le kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare)*. La pureté de l'ADN est vérifiée sur gel d'agarose à 1%, en y faisant migrer 1 μ l d'ADN + 4 μ l d'eau distillée stérile + 1 μ l de bleu de bromophénol. L'ADN ainsi purifié est conservé à -20°C, en attendant le séquençage.

3.6.4. Séquençage

Le séquençage de l'ADN 16S est fait aux laboratoires de *GATC Biotech AG* (Allemagne), en utilisant la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Les séquences obtenues sont corrigées

avec le logiciel *Sequencher v. 4.1.4 (Gene Codes)* et déposées par la suite dans la base de données *Genbank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) sous leurs numéros d'accessions respectifs (Tableau 16).

3.6.5. Reconstruction phylogénétique

En utilisant l'outil NCBI BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), les séquences ainsi obtenues sont comparées à celles des gènes codant l'ARNr 16S de souches types, disponibles sur la base de données publique *Genbank*. Les séquences sont alignées en utilisant le programme *ClustalW*. La reconstruction phylogénétique est effectuée par l'algorithme *neighbor-joining* (Saitou and Nei 1987), avec des valeurs de *bootstrap* calculées à partir de 1000 répétitions, avec le logiciel *MEGA*, version 6.

4. Effet du tribenuron méthyl (TBM)

Pour établir l'effet du TBM sur la croissance des deux souches les plus résistantes, trois étapes sont entreprises.

4.1. Pré-cultures

Dans un Erlen de 500 ml, 100 ml de milieu *ISP₁* (Annexe 1) additionnés de TBM à 30 mg/l sont ensemencés par 10 ml de solution sporale et incubés à 30°C, sous une agitation de 150 rpm pendant 48h.

4.2. Lavage de l'inoculum

La culture de 48 h est agitée vigoureusement afin de fragmenter les pellets, puis centrifugée stérilement. Le culot est lavé, à deux reprises, à l'eau physiologique stérile à 9‰, pour être, finalement, re-suspendu dans 75 ml d'eau physiologique stérile. L'inoculum, ainsi lavé, est utilisé pour l'ensemencement des cultures décrites ci-dessous (Shirling et Gottlieb, 1966).

4.3. Croissance sur TBM

L'effet du TBM sur la croissance des souches sélectionnées est déterminé sur milieu minérale *ISP₉* (Annexe 1) additionné de 30 mg/l de TBM, utilisé comme seule source de carbone (Shirling et Gottlieb, 1966). Deux autres variantes de ce milieu sont utilisées, afin de voir le comportement des bactéries quand le TBM est présent avec une autre source de carbone, en l'occurrence du glucose (1% p/v), c'est le test de co-métabolisme. Enfin, les

souches sont ensemencées sur *ISP*₉ contenant juste du glucose (1% p/v) dans le but d'évaluer leur croissance optimale. Les trois tests sont menés en triplicata. Après 21 jours d'incubation à 30°C / 150 rpm, les cultures sont centrifugées à 12000 g pendant 10 min sous 4°C, le culot est séché à 105°C puis pesé pour mesurer le poids sec de la biomasse.

5. Dégradation du TBM

5.1. Tests réalisés

Des tests abiotiques et d'autres biotiques sont réalisés afin de mesurer la dégradation chimique du TBM et déterminer le degré d'implication des souches bactériennes dans la disparition du polluant. Ces tests sont ensemencés par des inocula lavés à partir de pré-cultures de 48 h comme décrit précédemment (sections 4.1 et 4.2).

Les tests abiotiques consistent à suivre la disparition de 30 mg/l de TBM sur milieu *ISP*₉, alors que les tests biotiques, impliquant chacune des souches testées, sont menés sur trois milieux ; (*ISP*₉ + TBM) à pH 6,8, (*ISP*₉ + TBM) à pH 7,0 et (*ISP*₉ + TBM + glucose), tous ensemencés par les inocula lavés des souches sélectionnées. Trois répétitions sont faites pour chaque test où la concentration du TBM est suivie et mesurée après 6 h, 24 h et 3, 6, 21 jours d'incubation à 30°C / 150 rpm.

5.2. Dosage HPLC-UV

À chaque temps de prélèvement, les milieux abiotiques ainsi que le surnageant des cultures centrifugées (12000 g / 10 min / 4°C) sont filtrés et passés sous chromatographie liquide à haute performance couplée à la détection en ultra-violet (HPLC-UV), selon le protocole résumé sur le tableau 5 (Bernal *et al.*, 1997). Il est à noter que sous ce même protocole, une courbe étalon spécifique au TBM est établie suite au dosage d'une série de solutions standard de TBM à 10, 20, 30, 40 et 50 mg/l.

Tableau 5. Protocole de dosage du TBM par HPLC-UV (Bernal *et al.*, 1997)

Volume d'injection	10µl	
Phase mobile	Acétonitrile	Eau + H ₃ PO ₄ à 0,1%
RT : 0'	90	10
RT : 4'	80	20
RT : 5'	90	10
Débit	1ml/min	
Longueur d'onde	220 nm	

L'équipement de l'HPLC consiste en une pompe *Spectra Series P200* couplée à un module dégazeur de l'éluant *ERC 3415a*, à un injecteur automatique *Spectra Series AS100*, à un détecteur *Spectra System UV6000 LP* UV-visible (220 nm) et à une colonne C18 (*Phemenex, Gemini NX*; 25 cm x 4.6 mm, 5 µm). La phase mobile est composée d'acétonitrile / eau (contenant 0.1% d'H₃PO₄) à 90:10 (v/v), à un débit de 1 ml/min. Des fractions de 10 µl de chaque échantillon sont injectées. La dégradation du TBM est déterminée selon la surface des pics détectés (Bernal *et al.*, 1997).

6. Analyse statistique

L'effet des souches d'actinobactéries, des souches-test et des milieux utilisés, sur la production de substances antimicrobiennes, est testé par une analyse de la variance à trois facteurs. Aussi, la dégradation du TBM ainsi que son effet sur la croissance bactérienne sont testés par une analyse de la variance à deux facteurs (milieu et souche). Les trois ANOVA sont menées avec un risque *Alpha* de 0,05 en utilisant le logiciel *Statistica*[®], version 10, *StatSoft*, France.

*Résultats et
Discussion*

1. Isolement

Dans cette première étape, des souches d'actinobactéries sont isolées d'échantillons de sols non traités et d'autres traités à l'herbicide Granstar[®]. D'après le tableau 6, les pH des trois échantillons telluriques sont tous proches de la neutralité ; 7,58 ; 7,52 et 7,59 pour les sols 1, 2 et 3 respectivement. La majorité des actinobactéries se développant sur une plage de pH allant de 5 à 9 avec une préférence aux milieux neutres, le pH des sols étudiés est donc propice à la croissance de la plupart des espèces de ce groupe bactérien (Boughachiche, 2012 ; Li *et al.*, 2016a).

Les colonies d'actinobactéries sont détectées sur leur milieu d'isolement (gélose Bennett), au microscope optique (x10), grâce à leur aspect filamenteux particulier. Au total, 42 isolats d'actinobactéries sont prélevés. Les échantillons de sol utilisés ont tous permis d'isoler un certain nombre de souches (Tableau 6), ceci confirme la remarque précédente sur le fait qu'ils soient des milieux permettant la croissance des actinobactéries.

Cependant, la répartition des souches dans les différents échantillons n'est pas la même. En effet, une diminution du nombre des isolats est constatée entre le sol 2 et son équivalent traité ; 16 et 9 respectivement. Par ailleurs, aucun changement quantitatif significatif n'est détecté entre les souches isolées des sols 3 et 3 traité, où 4 et 6 souches sont détectées, respectivement. Il apparaît clairement que pour les trois échantillons de sol étudiés, le traitement par le Granstar[®], ne permet l'isolement que d'un nombre restreint de souches ; 7, 9 et 6 respectivement pour les sols 1, 2 traité et 3 traité. Ceci indique que la présence de cet herbicide réduit la diversité des actinobactéries, en affectant le développement de certaines souches d'entre elles et ne permettant la croissance que des plus résistantes, notamment pour le sol 2. Une constatation similaire est mise en avant par plusieurs études portant sur les substances xénobiotiques de manière générale (Filimon *et al.*, 2012), et les sulfonilurées en particulier où des molécules comme le metsulfuron méthyle, le mésosulfuron méthyle et l'iodosulfuron méthyle, semblent provoquer un déséquilibre dans la population microbienne tellurique (Arabet *et al.*, 2014 ; Radivojević *et al.*, 2014).

Néanmoins, l'isolement à partir du sol 3 non traité, est quelque peu confus, où seulement 4 souches sont obtenues, ce qui représente le plus petit nombre d'isolats détecté sur les cinq échantillons étudiés. Étant donné que l'échantillon considéré est exempt de tout traitement pesticide, ce résultat était peu probable et peut avoir plusieurs interprétations en liaison avec la complexité de l'écosystème du sol forestier. L'une d'entre elles pourrait être

le fait que ce type de sol contient des débris végétaux et animaux, riches en polysaccharides complexes (cellulose et chitine) qui sont principalement dégradés par la population fongique qui se retrouve favorisée nutritionnellement et par conséquent, serait présente majoritairement par rapport aux autres communautés microbiennes dont le nombre est réduit (Couturier *et al.*, 2011).

Tableau 6. Caractéristiques des sols et répartition des souches isolées selon le sol d'origine

Sol	Sol 1	Sol 2	Sol 2 traité*	Sol 3	Sol 3 traité*
Type	Agricole	Agricole		Forestier	
pH	7,58	7,52		7,59	
Nombre d'isolats	07	16	09	04	06

*Le sol 2 traité et le sol 3 traité correspondent, respectivement, aux sols 2 et 3 maintenus durant 21 jours en microcosme avec 40 mg/l de l'herbicide Granstar®

Une autre remarque, également intéressante à soulever, concerne l'effet de la durée du traitement à l'herbicide ; en comparant les résultats du sol 1, longtemps et répétitivement traité, et ceux du sol 2 traité et sol 3 traité, pendant seulement 21 jours, le nombre d'isolats est quasi le même ; 7, 9 et 6 respectivement. Cela indique l'effet toxique du Granstar® sur certaines actinobactéries telluriques, non seulement à long terme mais également sur de courtes durées. Comme l'attestent plusieurs études, le tribenuron méthyle, principe actif du Granstar®, peut, selon les conditions, persister dans le sol une trentaine de jours et même au-delà pour certains composés issus de sa dégradation (Devlin *et al.*, 1992 ; ARLA, 1995 ; Roberts et Hutson, 1998 ; Martin, 2000). Cela expliquerait l'effet inhibiteur contre la flore des actinobactéries après 21 jours de traitement et traduit une toxicité apparaissant dès son application (Chèvre, 2007 ; Bottaro *et al.*, 2008). Les résultats de cet isolement confirment la présence de souches d'actinobactéries sensibles et d'autres résistantes, dans les trois écosystèmes telluriques étudiés.

2. Résistance à l'herbicide

Après purification, les 42 souches isolées sont testées pour leur tolérance à des concentrations croissantes du Granstar® allant de 0,004 à 0,65% (v/v). La totalité des souches a pu croître jusqu'à la concentration de 0,3%. À partir de ce seuil, 31 souches ont présenté une sensibilité à l'herbicide et n'ont pas pu se développer. Le tableau 7 indique la répartition des 11 souches restantes qui ont montré une résistance à des concentrations au-delà de 0,3%. En examinant ce tableau, deux remarques s'imposent ; d'abord la majorité (7) des 11 souches résistantes provient de sols traités à l'herbicide. Aussi, les deux souches

les plus résistantes (à 0,55 et 0,6%) sont isolées du sol 1 et du sol 3 traité, respectivement, tous deux traités à l'herbicide. Ceci conforte l'idée qu'une exposition préalable de la flore microbienne, ou du moins des actinobactéries du sol, au Granstar® facilite leur adaptation, avec même une possibilité de développer un potentiel de transformation de l'herbicide. Cette situation peut engendrer la sélection de souches qui puissent tolérer de fortes concentrations de l'herbicide. Un tel cas est observé par Widehem *et al.* (2002) qui ont isolé du sol traité au diuron, une souche d'*Arthrobacter* sp. capable de transformer complètement l'herbicide en 24h. Des résultats allant dans le même sens, rapportent qu'une souche de *Ochrobactrum* sp. adaptée à la présence du TBM, dégrade celui-ci jusqu'à 55% en 8 jours (Zhao *et al.*, 2015).

Tableau 7. Répartition des 11 souches résistantes selon le traitement à l'herbicide

Concentration de l'herbicide (%)	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6	0,65
Isolats de sols non traités	1	-	-	2	1	-	-	-
Isolats de sols traités	-	1	1	2	1	1	1	-

(-) : absence d'isolats

La durée de l'exposition ne semble pas influencer sur cette résistance, puisque les deux souches proviennent de sols qui ont été traités sur de longues périodes (sol 1) mais aussi sur la courte durée de 21 jours (sol 3 traité). Le fait d'avoir isolé des souches présentant une certaine résistance, à partir de sols non traités, n'est pas à négliger. Le phénomène de la résistance peut avoir une origine génétique, localisée au niveau des plasmides, la transmission du gène de résistance est dès lors facile et rapide, non seulement au sein de l'espèce, pendant la division cellulaire, mais aussi d'une cellule à une autre, même différente (de par l'espèce et le Gram) par conjugaison génétique. Dans ce cas, l'expression du gène se traduit par la synthèse d'enzymes inductibles qui vont catalyser l'herbicide par des voies métaboliques spécifiques (Voltz *et al.*, 2005). La résistance peut également être la conséquence de trois autres éventualités ; le principe actif est dégradé par voie chimique, sans l'intervention des microorganismes ; les bactéries résistantes sont capables de dégrader l'herbicide par co-métabolisme (Zanardini *et al.*, 2002) ; ou encore la modification de l'enzyme cible de l'herbicide (ALS), le rendant ainsi inactif sur la division cellulaire et donc sur le développement bactérien (Arabet *et al.*, 2014).

Les onze souches présentant une forte résistance sont sélectionnées pour la suite de cette étude et les codes suivants leur sont attribués ; SRK3, SRK4, SRK9, SRK11, SRK12, SRK13, SRK14, SRK15, SRK16, SRK17 et SRK18.

3. Caractérisation des souches sélectionnées

Afin de réaliser une caractérisation taxonomique des souches retenues, de multiples tests sont réalisés à l'exception de la souche SRK15 pour laquelle, seulement, l'analyse phylogénétique a été faite. Cette souche a été perdue durant sa conservation et n'a pas été caractérisée morphologiquement et biochimiquement. En effet, la sporulation est un mode de reproduction mais également de résistance chez les actinobactéries, et cette souche était incapable de sporuler.

3.1. Caractères cultureux et macromorphologiques

Les caractères cultureux des souches, leur croissance, la pigmentation des mycéliums végétatif et aérien ainsi que la production de pigments diffusibles, sont décrits à travers huit différents milieux gélosés. Les dix souches sélectionnées se sont toutes développées sur les géloses testées, après 21 jours d'incubation à 30°C, mais à des degrés de croissance différents, ceci indique des exigences nutritionnelles particulières influençant l'optimum de croissance (Tableau 8).

Les isolats présentent quelques discordances d'aspect morphologique qui permettent de les séparer en groupes. En effet, les souches SRK3, SRK12 forment un mycélium de substrat dont la pigmentation varie selon le milieuensemencé, entre le beige, le blanc cassé et des nuances de marron (clair et foncé) et de gris (clair et gris-vert). Cette panoplie de pigmentation est également retrouvée chez les souches SRK13, SRK14, SRK16 et SRK18 avec en plus un mycélium végétatif noirâtre sur gélose amidon-caséine.

Tableau 8. Caractéristiques culturales des souches sélectionnées

Souches	Milieux	Croissance*	Pigmentation du mycelium de substrat*	Pigmentation du mycelium aérien*	Sporulation*	Pigments diffusibles*	Pigments mélanoides*
SRK3	ISP ₂	Modérée	Beige	Beige	-	-	-
	ISP ₃	Bonne	Gris vert	Gris	Faible grise	-	-
	ISP ₄	Bonne	Gris vert	Gris laineux	Bonne grise	-	-
	ISP ₅	Modérée	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige	-	-	-
	ISP ₇	Bonne	Marron	Gris laineux	Bonne grise	-	-
	AC	Bonne	Marron foncé	Gris	Bonne grise	-	-
SRK4	GA	Bonne	Beige	Beige	Faible grise	-	-
	ISP ₂	Faible	Beige	Beige	-	-	-
	ISP ₃	Bonne	Marron	Gris	Bonne grise	-	-
	ISP ₄	Bonne	Marron foncé	Gris laineux	Bonne grise	-	-
	ISP ₅	Modérée	Gris	Gris	Bonne grise	-	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige à blanc	Faible blanchâtre	-	-
	ISP ₇	Bonne	Marron	Gris laineux	Bonne grise	-	-
SRK9	AC	Bonne	Marron foncé	Gris foncé	Bonne grise	-	-
	GA	Modérée	Beige	Beige	Faible grise	-	-
	ISP ₂	Faible	Beige	Beige	-	-	-
	ISP ₃	Faible	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-	-
	ISP ₄	Bonne	Marron foncé	Gris	Bonne grise	-	-
	ISP ₅	Faible	Beige	Beige	Faible grise	-	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige	Faible grise	-	-
AC	ISP ₇	Bonne	Marron foncé	Gris	Bonne grise	-	-
	AC	Bonne	Marron foncé	Gris	Bonne grise	Brique	-
	GA	Bonne	Beige	Beige	Faible grise	-	-

	ISP ₂	Modérée	Beige	Beige	-	-
	ISP ₃	Bonne	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-
	ISP ₄	Bonne	Marron	Gris laineux	Bonne grise	-
SRK11	ISP ₅	Faible	Beige	Beige	Faible grise	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige	-	-
	ISP ₇	Bonne	Marron clair	Gris laineux	Bonne grise	-
	AC	Bonne	Marron foncé	Gris	Bonne grise	-
	GA	Modérée	Beige	Beige	Faible blanchâtre	-
		ISP ₂	Modérée	Beige	Beige	-
	ISP ₃	Bonne	Gris	Gris	Bonne grise	-
	ISP ₄	Bonne	Marron	Gris	Bonne grise	-
SRK12	ISP ₅	Faible	Beige	Gris	Faible grise	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige	Faible blanchâtre	-
	ISP ₇	Bonne	Marron	Gris	Bonne grise	-
	AC	Bonne	Marron foncé	Gris	Bonne grise	Marron rosé
	GA	Modérée	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-
		ISP ₂	Modérée	Beige	Beige	-
	ISP ₃	Bonne	Gris	Gris	Faible grise	-
	ISP ₄	Bonne	Gris vert	Gris laineux	Bonne grise	-
SRK13	ISP ₅	Faible	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige	Faible grise	-
	ISP ₇	Bonne	Marron	Gris laineux	Bonne grise	-
	AC	Bonne	Noir	Gris	Bonne grise	-
	GA	Modérée	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-
		ISP ₂	Modérée	Jaune	Jaune	-
	ISP ₃	Modérée	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-
	ISP ₄	Bonne	Gris vert	Gris	Bonne grise	-
SRK14	ISP ₅	Faible	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige	Faible blanchâtre	-
	ISP ₇	Bonne	Marron	Gris laineux	Bonne grise	-
	AC	Bonne	Noir	Gris	Bonne grise	-
	GA	Modérée	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-
		ISP ₂	Modérée	Jaune	Jaune	-
	ISP ₃	Modérée	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-
	ISP ₄	Bonne	Gris vert	Gris	Bonne grise	-
	ISP ₅	Faible	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige	Faible blanchâtre	-
	ISP ₇	Bonne	Marron	Gris laineux	Bonne grise	-
	AC	Bonne	Noir	Gris	Bonne grise	-
	GA	Modérée	Blanc cassé	Blanc cassé	Faible grise	-

SRK16	ISP ₂	-	-	-	-	-	-
	ISP ₃	Bonne	Gris clair	Gris dair	Faible grise	-	-
	ISP ₄	Bonne	Gris vert	Gris laineux	Bonne grise	-	-
	ISP ₅	Moderée	Blanc cassé	Gris dair	Faible grise	-	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige	Faible blanchâtre	-	-
	ISP ₇	Bonne	Marron	Gris laineux	Bonne grise	-	-
	AC	Bonne	Noir	Gris	Bonne grise	-	-
	GA	Bonne	Marron	Gris	Bonne grise	-	-
SRK17	ISP ₂	Faible	Beige	Beige	-	-	-
	ISP ₃	Bonne	Gris clair	Gris dair	Faible grise	-	-
	ISP ₄	Bonne	Marron	Gris laineux	Bonne grise	-	-
	ISP ₅	Moderée	Gris dair	Gris dair	Faible grise	-	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige	Bonne blanchâtre	-	-
	ISP ₇	Bonne	Marron	Gris laineux	Bonne grise	-	-
	AC	Bonne	Marron foncé	Gris	Bonne grise	Marron brique	-
	GA	Bonne	Marron	Gris	Faible grise	-	-
SRK18	ISP ₂	Bonne	Beige	Beige	-	-	-
	ISP ₃	Moderée	Gris vert	Gris dair	Faible grise	-	-
	ISP ₄	Bonne	Gris vert	Gris laineux	Bonne grise	-	-
	ISP ₅	Moderée	Blanc cassé	Gris dair	Faible grise	-	-
	ISP ₆	Bonne	Beige	Beige	-	-	-
	ISP ₇	Bonne	Marron	Gris laineux	Bonne grise	-	-
	AC	Bonne	Noir	Gris	Bonne grise	-	-
	GA	Moderée	Blanc cassé	Gris dair	Faible grise	-	-

* : Après 21 jours d'incubation à 30°C ; AC : amidon-caséine ; GA : glucose-asparagine ; (-) : absence.

Il est à noter qu'une coloration jaunâtre est constatée chez la souche SRK14 sur gélose *ISP*₂, contrairement aux autres souches citées ci-dessus, dont le mycélium de substrat est beige sur *ISP*₂. Chez les souches SRK4 et SRK17, le mycélium de substrat prend trois pigmentations : beige, gris et marron (clair et foncé). Tandis que chez les souches SRK9 et SRK11, il est beige, blanc cassé et marron (clair et foncé).

Une pigmentation quelque peu variable est observable au niveau des mycéliums aériens des souches étudiées. Elle est soit beige et grise chez les souches SRK4, SRK16, SRK17 et SRK18, soit beige, blanc cassé et grise chez SRK3, SRK9, SRK11, SRK12, SRK13 et SRK14. Sur ce point, la souche SRK14 se distingue également des autres souches par un mycélium aérien jaunâtre sur les géloses *ISP*₂ et glucose-asparagine.

La sporulation des souches est variable selon le milieu ensemencé. Sur la gélose *ISP*₂, aucune des souches étudiées n'y présente des spores. La gélose *ISP*₆ empêche, aussi, la sporulation des souches SRK3, SRK11 et SRK18. Sur les six autres milieux testés, à l'exception de la souche SRK15 qui ne sporule pas, la densité de la sporulation est faible ou bonne, selon la souche et le milieu considérés. À maturité, les masses sporales de toutes les souches sont de couleur grise, ce qui les classe dans la série grise.

Les souches sont similaires, sur leur incapacité à produire des pigments mélanoïdes. Aussi, mises à part les souches SRK9, SRK12 et SRK17 qui synthétisent un pigment diffusible sur gélose amidon-caséine, de couleur brique, marron rosé et marron brique, respectivement, le reste des souches étudiées ne produit aucun pigment diffusible.

3.2. Caractères micromorphologiques

La coloration de Gram confirme l'appartenance des souches sélectionnées aux actinobactéries filamenteuses à paroi Gram positif.

L'aspect microscopique des structures filamenteuses est apprécié à travers la technique des lamelles. Le mycélium aérien de la majorité des souches porte des chaînes sporales qui se présentent sous forme de spirale, sauf celles de l'isolat SRK4 qui sont rectiflexibles. Elles portent plus de 20 spores arrondies chez les souches SRK3, SRK11, SRK14, SRK16 et SRK18 et moins chez les cinq autres isolats (Tableau 9).

Tableau 9. Caractéristiques morphologiques des souches sélectionnées

Souches	Morphologie des chaînes de spores ¹	Longueur des chaînes sporales ¹	Morphologie des spores ¹	Couleur des spores ²	Production de pigments diffusibles ³	Production mélanine sur ISP6	Production mélanine sur ISP7
SRK3	Spirale	> 20	Arrondie	Gris laineux	-	-	-
SRK4	Rectiflexible	< 20	Cylindrique	Gris laineux	-	-	-
SRK9	Spirale	< 20	Arrondie	Gris	Marron brique	-	-
SRK11	Spirale	> 20	Arrondie	Gris laineux	-	-	-
SRK18	Spirale	> 20	Arrondie	Gris laineux	-	-	-
SRK12	Spirale	< 20	Arrondie	Gris clair	Marron rosé	-	-
SRK16	Spirale	> 20	Arrondie	Gris laineux	-	-	-
SRK13	Spirale	< 20	Arrondie	Gris laineux	-	-	-
SRK14	Spirale	> 20	Arrondie	Gris	-	-	-
SRK17	Spirale	< 20	Arrondie	Gris laineux	Marron brique	-	-

¹ sur *ISP*₂; ² sur *ISP*₄; ³ sur Amidon-Caséine; (-): absence; nd: non déterminé

La souche SRK4 se distingue aussi des autres souches, par la présence de spores cylindriques. Le mycélium végétatif de toutes les souches ne présente ni fragmentation ni sporulation.

3.3. Caractères biochimiques et physiologiques

Les tests réalisés révèlent que les souches étudiées se caractérisent par un profil biochimique plus ou moins similaire (Tableau 10). Elles fermentent toutes le glucose sans production de gaz, le lactose et/ou saccharose. Par contre, elles ne fermentent pas le mannitol sauf la souche SRK16. Seules les souches SRK4, SRK11, SRK12 et SRK17 sont capables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone.

Les 10 isolats sont immobiles et non producteurs de sulfure d'hydrogène et de nitrate réductase. Ils sont tous aérobies anaérobies facultatifs et synthétisent la catalase. Les souches SRK4, SRK11, SRK13 et SRK14 empruntent la voie des acides mixtes pour la fermentation du glucose et aucune souche ne fait de fermentation butanediolique.

Les souches sont aptes à hydrolyser l'amidon, la caséine ainsi que la gélatine. Elles produisent des peptones à partir du lait écrémé, traduisant une activité protéolytique.

Tableau 10. Caractéristiques biochimiques et physiologiques des 11 souches

Tests/ Souches	SRK3	SRK4	SRK9	SRK11	SRK12	SRK13	SRK14	SRK16	SRK17	SRK18
Fermentation glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production de gaz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation lac et/ou sac	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentation mannitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Utilisation du citrate	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production d'H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Test RM	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
Test VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	nd	nd	nd	nd	+	nd	-	nd	-	nd
ADH	nd	nd	nd	nd	+	nd	+	nd	+	nd
LDC	nd	nd	nd	nd	+	nd	-	nd	-	nd
Nitrate réductase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Type respiratoire AAF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mélanoïdes sur <i>ISP</i> ₆	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mélanoïdes sur <i>ISP</i> ₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolyse de l'amidon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de la caséine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulation du lait écrémé	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peptonisation du lait écrémé	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(+) : réaction positive ; (-) : réaction négative ; lac : lactose ; sac : saccharose ; RM : rouge de méthyle ; VP : Voges-Proskauer ; ODC : ornithine décarboxylase ; ADH arginine dihydrolase ; LDC : lysine décarboxylase ; AAF : aérobie-anaérobie-facultatif ; nd : non déterminé.

Le profil biochimique des deux souches les plus résistantes à l'herbicide (SRK12 et SRK17) a pu être établi par galerie Api 20E. Le tableau 11 confirme les résultats obtenus avec la galerie biochimique classique des deux souches (Tableau 10) et montre qu'elles fermentent le glucose et aucun autre sucre de la galerie, elles hydrolysent la gélatine, leurs tests VP et indole sont négatifs, elles ne produisent pas d'H₂S, elles utilisent le citrate comme seule source de carbone et elles sont productrices d'uréase, de tryptophane désaminase, de β-galactosidase et d'arginine hydrolase. Par contre, elles présentent des discordances sur la production de la lysine décarboxylase et l'ornithine décarboxylase, où SRK12 se différencie par des résultats positifs contrairement à la souche SRK17.

Tableau 11. Galerie API 20E des deux souches SRK12 et SRK17

Tests / Souches	SRK12	SRK17
ONPG (Ortho NitroPhényl-βD Galactopyranosidase), pour β-galactosidase	+	+
ADH (Arginine dihydrolase)	+	+
LDC (Lysine décarboxylase)	+	-
ODC (Ornithine décarboxylase)	+	-
CIT (Utilisation du citrate)	+	+
H ₂ S (Production de sulfure d'hydrogène)	-	-
URE (Production d'uréase)	+	+
TDA (Production d'une tryptophane-désaminase)	+	+
IND (Production d'indole)	-	-
VP (Production d'acétoïne, par le test de Voges-Proskauer)	-	-
GEL (Production d'une gélatinase)	+	+
GLU (Fermentation-oxydation du glucose)	+	+
MAN (Fermentation-oxydation du mannitol)	-	-
INO (Fermentation-oxydation de l'inositol)	-	-
SOR (Fermentation-oxydation du sorbitol)	-	-
RHA (Fermentation-oxydation du rhamnose)	-	-
SAC (Fermentation-oxydation du saccharose)	-	-
MEL (Fermentation-oxydation du melibiose)	-	-
AMY (Fermentation-oxydation de l'amygdaline)	-	-
ARA (Fermentation-oxydation de l'arabinose)	-	-

(+) : réaction positive ; (-) : réaction négative.

3.4. Sensibilité aux antibiotiques

Les dix actinobactéries étudiées se comportent toutes de la même manière à l'encontre de quinze antibiotiques testés (Tableau 12), ceci peut être une indication sur une possible appartenance des souches au même genre bactérien avec des espèces assez proches, possédant des mécanismes de résistance identiques. La majorité (dix) de ces molécules est inactive sur les souches, il s'agit de la pénicilline, des aminopénicillines (Amoxicilline+Acide Clavulanique et ampicilline), des céphalosporines de 2^{ème} génération (céfuroxime), de l'érythromycine, de la fosfomycine, du chloramphénicol, de l'acide nalidixique, de la lincomycine et de la tétracycline. Cependant quatre antibiotiques exercent une activité inhibitrice sur les souches d'actinobactéries ; céphalosporines de 1^{ère} génération (céfalexine), aminosides (streptomycine et amikacine) et spiramycine. Alors que, pour seul l'imipénème, les souches bactériennes présentent un profil intermédiaire. De manière plus globale, sur les tests réalisés, les souches résistent à la plupart des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines, à un antibiotique sur deux des macrolides, ainsi qu'à l'antibiotique représentant des phénicolés, acides phosphoniques, quinolones de 1^{ère} génération, lincosamides et tétracyclines.

Tableau 12. Sensibilité des souches d'actinobactéries aux antibiotiques (selon les indications du CA-SFM, 2013)

Familles	Antibiotiques	SRK3	SRK4	SRK9	SRK11	SRK12	SRK13	SRK14	SRK16	SRK17	SRK18
Pénicillines	P (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Aminopénicilline	AMC (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Aminopénicilline	AM (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Céphalosporines 1 ^{ère} génération	CN (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Céphalosporines 2 ^{ème} génération	CXM (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Carbapénèmes	IPM (10 µg)	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Aminosides	S (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Aminosides	AK (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Macrolides	E (15 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Macrolides	SP (100 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Acides Phosphoniques	FOS (50 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Phénicolés	C (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Quinolones 1 ^{ère} génération	NA (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Lincosamides	L (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tétracyclines	TE (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

P : Pénicilline G ; AMC : Amoxicilline + Acide Clavulanique ; AM : Ampicilline ; CN : Céfalexine ; CXM : Céfuroxime ; IPM : Imipénème ; S : Streptomycine ; AK : Amikacine ; E : Erythromycine ; SP : Spiramycine ; FOS : Fosfomycine ; C : Chloramphénicol ; NA : Acide Nalidixique ; L : Lincomycine ; TE : Tétracycline ; R : résistante ; I : intermédiaire ; S : sensible.

Zerizer (2014) a démontré un antibiogramme similaire pour des souches pathogènes de *Streptomyces*, également résistantes à la plupart des bêta-lactamines et sensibles aux aminosides. Il faut garder à l'esprit qu'une résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise suite à une mutation génétique ou encore un transfert de plasmides de résistance d'une bactérie à une autre, par le phénomène de conjugaison. Dans le cas des actinobactéries, Hopwood (2007) explique cette résistance par le fait que la plupart des antibiotiques sont synthétisés par ce groupe bactérien, dont les espèces possèdent des mécanismes d'auto-protection contre les substances antibactériennes qu'elles émettent. En effet, elles portent des gènes de résistance, qui lui évitent le suicide, mais aussi des gènes pour le transport des substances bioactives en dehors de la cellule (Grasso *et al.*, 2016). Par contre, cette indication n'est pas valide concernant la sensibilité observée à l'encontre des aminosides, notamment la streptomycine, connue pour être produite par l'espèce *Streptomyces griseus*. Ce profil de sensibilité peut être expliqué par le fait que la production de la majorité des antibiotiques est une spécificité de l'espèce, qui permet à la souche productrice de se protéger contre tout microorganisme venant à son contact, même étant du même genre (De Lima Procópio *et al.*, 2012).

3.5. Activité antimicrobienne

La production de molécules antimicrobiennes est un critère de classification et d'identification chez les actinobactéries, notamment les espèces du genre *Streptomyces* (Williams *et al.*, 1989). Elle est qualitativement et quantitativement rattachée et gouvernée par plusieurs facteurs, particulièrement la composition du milieu de croissance (Gesheva *et al.*, 2005), c'est la raison pour laquelle cinq milieux différents sont testés pour la mettre en évidence.

3.5.1. Activité antibactérienne

Afin de déterminer les souches d'actinobactéries bioactives ainsi que le milieu de culture favorisant la synthèse de substances inhibitrices, l'activité antibactérienne est testée contre quatre bactéries à paroi Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Proteus mirabilis*) et deux bactéries à paroi Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Enterococcus* sp.) et cela sur cinq géloses différentes (Bennett, SC, ISP₂, GBA et AF).

L'analyse de la variance à trois facteurs (ANOVA) confirme la constatation faite en observant le tableau 13, où le pouvoir antibactérien varie significativement ($p < 0,05$) selon la souche productrice, le milieu utilisé et la souche testée. En effet, toutes les souches d'actinobactéries étudiées sont actives contre deux des six bactéries test, sur au moins deux des cinq milieux utilisés, ce qui indique leur capacité à produire des substances antibactériennes. Ce résultat était prévisible, connaissant l'aptitude métabolique des espèces d'actinobactéries à synthétiser une multitude de composés bioactifs qui font d'elles les premières productrices parmi les microorganismes (Berdy, 2005 ; Gebreyohannes, 2013 ; Grasso *et al.*, 2016). Les deux bactéries à paroi Gram+ testées (*S. aureus* et *Enterococcus* sp.) montrent une résistance à l'activité de toutes les actinobactéries, c'est le cas également de deux autres bactéries à paroi Gram- (*E. coli* et *K. pneumoniae*). Seules *Proteus mirabilis* et *Pseudomonas aeruginosa* sont sensibles aux actinobactéries étudiées (Tableau 13). Ce résultat est en discordance avec celui obtenu par Boughachiche (2012) qui a démontré la résistance de bactéries Gram- et la sensibilité des Gram+ vis-à-vis de deux souches de *Streptomyces* isolées de milieux halophiles. Cette divergence dans les résultats témoigne non seulement de la diversité des souches des actinobactéries et par conséquent des substances antibactériennes qu'elles peuvent synthétiser, mais également de la variation des réponses des bactéries cibles, au sein même de l'espèce. La paroi

bactérienne Gram- confère aux cellules une résistance particulière comparativement à celle Gram+. Chez la première, la membrane externe étant hydrophobe, bloque le passage des molécules hydrophiles (comme certains antibiotiques). Chez la paroi Gram+, la présence d'une couche de peptidoglycane ne constitue pas de barrière, de ce fait, elle est plus accessible (Gutmann et Williamson, 1987).

Tableau 13. Activité antibactérienne des souches vis-à-vis des bactéries-test

<i>Proteus mirabilis</i> *					
Souche	Bennett	SC	ISP2	GBA	AF
SRK3	00	00	16	24	00
SRK4	12	00	17	08	00
SRK9	15	00	15	22	00
SRK11	10	00	16	13	10
SRK12	14	00	08	20	00
SRK13	14	00	16	10	12
SRK14	12	00	18	12	23
SRK16	14	00	20	12	10
SRK17	12	00	16	18	08
SRK18	10	13	07	15	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *					
Souche	Bennett	SC	ISP2	GBA	AF
SRK3	00	09	10	17	11
SRK4	13	16	17	12	21
SRK9	15	10	12	20	14
SRK11	12	10	12	14	15
SRK12	11	12	07	16	15
SRK13	10	10	10	15	14
SRK14	00	10	12	09	13
SRK16	10	12	14	25	15
SRK17	09	18	10	24	21
SRK18	11	20	11	24	15

*Diamètre des zones de lyse en mm

Cette évidence ne se reflète pas dans les résultats obtenus, probablement du fait de la production de substances à spectre étroit sur les bactéries à paroi Gram+ et efficaces seulement sur certaines bactéries à paroi Gram-.

Le tableau 14 indique que les six bactéries test se caractérisent par une prédominante et variable résistance aux différentes familles d'antibiotiques testées. Cet antibiogramme permet de faire un parallèle entre leur résistance aux antibiotiques utilisés en clinique et ceux produits par les souches d'actinobactéries étudiées. Ainsi, celles à paroi Gram + (*S. aureus* et *Enterococcus* sp.) sont toutes deux résistantes à certains bêta-lactamines, à

savoir ; aux aminopénicillines (amoxicilline + acide clavulanique et ampicilline) et aux céphalosporines de deuxième génération (céfuroxime). Ayant également présenté une résistance aux dix actinobactéries, la croissance d'*E. coli* et de *K. pneumoniae* est maintenue en présence d'un nombre encore plus élevé d'antibiotiques, notamment, la pénicilline G, l'amoxicilline + l'acide clavulanique, l'ampicilline, le céfuroxime, l'érythromycine, la spiramycine et la lincomycine. Par contre, concernant les deux autres bactéries à paroi Gram- (*P. aeruginosa* et *Pr. mirabilis*), sur lesquelles les souches d'actinobactéries ont un effet inhibiteur, elles sont toutes deux sensibles à quatre antibiotiques ; la streptomycine, l'amikacine, la fosfomycine et l'imipénème. Au vu de ces observations, un parallèle peut être fait et une hypothèse peut être émise quant à la nature des substances antibactériennes produites par les actinobactéries testées, qui peuvent donc avoir produit une association de molécules ayant une structure ou un mode d'action similaires aux antibiotiques suivants ; amoxicilline + acide clavulanique, ampicilline, céfuroxime, streptomycine, amikacine, fosfomycine et imipénème. Bien évidemment, ce rapprochement n'est que probable et de plus amples examens sont à réaliser pour l'identification exacte de la structure des substances antibactériennes produites par chaque souche d'actinobactérie.

Tableau 14. Sensibilité des bactéries-test aux antibiotiques (selon les indications du CA-SFM, 2013)

Familles	Antibiotiques	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Enterococcus</i> sp. 43
Pénicillines	P (10 µg)	R	R	R	R	R	S
Aminopénicilline	AMC (30 µg)	R	R	R	R	R	R
Aminopénicilline	AM (10 µg)	R	R	R	R	R	R
Céphalosporines 2 ^{ème} génération	CXM (30 µg)	R	R	R	R	R	R
Aminosides	S (10 µg)	S	S	S	S	S	R
Aminosides	AK (30 µg)	S	S	S	S	nd	R
Macrolides	E (15 µg)	R	R	R	R	S	R
Macrolides	SP (100 µg)	R	R	R	R	nd	R
Acides Phosphoniques	FOS (50 µg)	S	S	S	R	nd	nd
Phénicolés	C (30 µg)	R	R	S	S	S	S
Carbapénèmes	IPM (10 µg)	S	S	S	S	R	S
Quinolones 1 ^{ère} génération	NA (30 µg)	R	R	S	S	nd	R
Lincosamides	L (10 µg)	R	R	R	R	nd	R
Tétracyclines	TE (30 µg)	R	R	S	S	nd	nd

P : Pénicilline G ; AMC : Amoxicilline + Acide Clavulanique ; AM : Ampicilline ; CXM : Céfuroxime ; S : Streptomycine ; AK : Amikacine ; E : Erythromycine ; SP : Spiramycine ; FOS : Fosfomycine ; C : Chloramphénicol ; IPM : Imipénème ; NA : Acide Nalidixique ; L : Lincomycine ; TE : Tétracycline ; R : résistante ; S : sensible ; nd : non déterminé.

Cette activité s'exprime et diffère selon la composition du milieu utilisé, ainsi, une seule souche actinobactérie est active contre *Proteus mirabilis* sur gélose SC, six sur gélose AF, neuf sur Bennett et toutes sur GBA et *ISP*₂. Un constat tout autre est relevé à propos de *Pseudomonas aeruginosa* où les dix actinobactéries y sont actives sur les géloses SC, AF, GBA et *ISP*₂, et 8 sur gélose Bennett. Ceci traduit un comportement différent des bactéries test vis-à-vis des actinobactéries, même étant du même type de paroi (Gram -) et révèle une plus grande sensibilité de *P. aeruginosa* vis-à-vis des composés bioactifs produits. Là aussi la majorité des isolats (sept) développent leur meilleure activité sur GBA. La composition de ce milieu favorise donc le mieux la production de molécules bioactives par les actinobactéries étudiées. En effet, le glycérol, l'amidon ainsi que le CaCO₃ composant ce milieu, présentent un effet positif sur la biosynthèse de molécules antibactériennes (Banga *et al.*, 2008). C'est aussi la même conclusion obtenue par Boughachiche (2012). Cependant, ce résultat n'est pas corroboré avec celui d'autres études (Ouhdouch *et al.*, 2001 ; Kitouni, 2007 ; Loucif, 2011), qui montrent un meilleur rendement avec le milieu Bennett. Cette incompatibilité de résultats montre qu'un substrat peut déclencher la production d'un antibactérien chez une souche actinobactérie donnée, alors qu'il peut être un facteur limitant chez une autre, certainement, par répression de la transcription de gènes codant la régulation de certaines protéines impliquées dans la stimulation de la synthèse de métabolites secondaires (Sanchez *et al.*, 2010 ; Grasso *et al.*, 2016). Cela confirme bien la complexité du processus de production d'antibactériens qui semble être affecté par l'interaction entre les différents facteurs impliqués ; souches productrices, bactéries cible et milieux de culture.

3.5.2. Activité antifongique

En plus de la production de substances antibactériennes, les dix souches d'actinobactéries sont aussi toutes sécrétrices de composés antifongiques (Tableau 15). Selon une ANOVA réalisée à trois facteurs, cette biosynthèse est influencée significativement ($p < 0,05$) par la souche productrice, le germe cible ainsi que le milieu de croissance. Cette activité antifongique se manifeste, non seulement, contre la levure *Candida albicans*, mais aussi sur les deux moisissures testées *Aspergillus fumigatus* et *Trichophyton rubrum*. Cela témoigne du large spectre d'activité des substances antifongiques produites par les dix isolats. La double activité antibactérienne et antifongique caractérise généralement la majorité des actinobactéries, spécialement celle du genre *Streptomyces* (Liu *et al.*, 2013 ; Hasani *et al.*, 2014). En effet, Zerizer (2014) a observé un taux de 57,14% de souches

actinobactéries, impliquées dans des infections humaines, présentant une double activité, dont une forte proportion est constituée de *Streptomyces*. C'est aussi le cas de Boughachiche (2012) qui a obtenu des résultats similaires sur deux souches de ce genre bactérien, isolées de Sebkh.

Tableau 15. Activité antifongique des actinobactéries vis-à-vis des champignons-test

<i>Candida albicans</i> *					
Souche	Bennett	SC	ISP2	GBA	AF
SRK3	00	00	14	22	21
SRK4	09	15	17	17	23
SRK9	18	32	16	24	24
SRK11	00	15	15	27	20
SRK12	12	13	10	27	23
SRK13	10	10	11	17	20
SRK14	13	21	14	24	21
SRK16	00	24	16	12	23
SRK17	12	26	18	14	27
SRK18	00	26	15	18	22
<i>Aspergillus fumigatus</i> *					
Souche	Bennett	SC	ISP2	GBA	AF
SRK3	20	12	22	13	22
SRK4	20	17	21	18	20
SRK9	15	16	30	21	30
SRK11	15	22	16	12	28
SRK12	18	15	20	22	20
SRK13	18	15	16	17	22
SRK14	19	13	21	15	12
SRK16	22	22	15	22	22
SRK17	18	19	18	18	20
SRK18	24	17	21	20	22
<i>Trichophyton rubrum</i> *					
Souche	Bennett	SC	ISP2	GBA	AF
SRK3	10	14	16	20	19
SRK4	08	10	00	10	00
SRK9	14	24	00	00	00
SRK11	12	16	12	18	17
SRK12	20	20	25	16	16
SRK13	14	14	12	21	00
SRK14	22	22	20	14	17
SRK16	00	08	00	00	12
SRK17	00	12	00	00	00
SRK18	00	14	00	14	14

* Diamètre des zones de lyse en mm

La levure *Candida albicans* est inhibée, par toutes les souches d'actinobactéries sur les milieux AF, GBA et *ISP*₂, par neuf souches sur SC et seulement six sur gélose Bennett. Le

milieu qui fait ressortir le mieux l'activité antilevurienne chez le plus de souches, en l'occurrence quatre, est la gélose GBA. Le milieu Bennett se distingue par le plus faible pouvoir d'induction de ce type d'activité.

Quant aux deux moisissures testées, il ressort que *Trychophyton rubrum* est plus résistant aux substances antifongiques produites par les actinobactéries étudiées, comparativement à *Aspergillus fumigatus*, fortement inhibé. Effectivement, les espèces du genre *Aspergillus* sont souvent détectées sensibles aux molécules antifongiques des actinobactéries, c'est ce qui ressort d'études menées sur le pouvoir antifongique de souches *Streptomyces* sp. (Augustine *et al.*, 2005 ; Boughachiche, 2012 ; Zerizer, 2014). De par leur composition, les cinq géloses testées sont toutes propices à la production de substances contre la croissance des deux moisissures, et cela à partir des dix isolats d'actinobactéries. Cependant, le milieu qui permet une meilleure synthèse quantitative contre *Aspergillus fumigatus* est, pour six isolats, le milieu AF, traduisant l'apparition de grandes zones d'inhibition. Ceci dit, les quatre autres milieux peuvent aussi se distinguer quand il s'agit des autres souches d'actinobactéries. L'effet contre *Trychophyton rubrum* est meilleur sur GBA et SC pour cinq des souches étudiées. Il a été établi clairement que la nature des sources de carbone et d'azote ainsi que des sels minéraux, détermine la structure de la substance bioactive produite ou un ou plusieurs de ses compartiments, par une souche actinobactérie donnée (Gesheva *et al.*, 2005). Ainsi, l'extrait de levure, l'amidon, le glycérol, le potassium (KCl, K₂HPO₄), le fer (FeSO₄), le phosphate (K₂HPO₄), le nitrate de sodium, l'asparagine, composant les milieux AF, GBA et SC, respectivement, sont appropriés à la synthèse des antimicrobiens (Ali *et al.*, 2014 ; Hasani *et al.*, 2014). Boughachiche (2012) est arrivée à des résultats concordant, en partie, ceux exposés ci-dessus, où deux souches de *Streptomyces* sp. présentent de meilleures activités antifongiques sur Bennett, SC et Bennett, AF, respectivement. Il en ressort qu'il est délicat de déterminer « LE » milieu optimal pour la biosynthèse d'antimicrobiens, vu qu'il varie selon la souche considérée. La conclusion faite sur le pouvoir antibactérien peut donc être étendue à l'activité antimicrobienne, de manière plus globale, et consiste à dire que cette dernière est un processus complexe dépendant principalement de la souche productrice ainsi que de la nature et de la concentration des nutriments disponibles aux cellules, et dont l'expression est fonction du microorganisme-cible (Sanchez *et al.*, 2010).

1.1. Analyse phylogénétique

Les électrophorèses conduites sur les produits de la PCR des gènes codant l'ARNr 16S, ainsi que sur les fragments d'ADN purifiés, sur gel d'agarose, montrent l'obtention de bandes d'ADN migrant au même niveau que celle de l'ADN à 1500 paires de bases du *Smart Ladder* (Annexes 2 et 3) et dont la longueur va de 729 à 1156 (Tableau 16). Cela indique la performance des deux amorces utilisées (8F et 1387R) dans l'amplification du fragment de l'ADN codant l'ARNr 16S.

Tableau 16. Numéros d'accèsion des souches étudiées sur GenBank

Souche	Numéro d'accèsion sur GenBank	Longueur fragment ADN 16S (bases)
SRK3	KX639799	1155
SRK4	KX639800	1108
SRK9	KX639803	1156
SRK11	KX639805	1155
SRK12	KR871404	1008
SRK13	KX639806	729
SRK14	KX639807	753
SRK15	KX639808	1109
SRK16	KX639809	1007
SRK17	KR871405	881
SRK18	KX639810	1153

La comparaison des séquences d'ADN des onze isolats avec celles des souches bactériennes de référence, déposées sur la base de données *GenBank*, par l'usage de l'outil NCBI BLAST, a permis d'établir une liste de souches-type, proches des actinobactéries étudiées, avec des degrés de similitude assez élevés atteignant 99,9% (Tableau 17). En analysant ces résultats, il ressort d'abord que les souches données par le BLAST appartiennent toutes au genre *Streptomyces*, ce qui étaye les observations micro-morphologiques qui présentent des caractéristiques rappelant celles du genre *Streptomyces* (Myadoh *et al.*, 2002; Kampfer, 2012) ; à savoir des mycéliums végétatifs non fragmentés et des mycéliums aériens portant des chaînes sporales sous forme de spirales, ou rectiflexibles. L'isolement de souches de *Streptomyces*, était attendu, étant donné l'abondance de ce groupe dans le sol (Oskay, 2009 ; Anandan *et al.*, 2016), mais aussi l'implication de ses espèces dans les processus de dégradation des pesticides, de manière générale (De Schrijver et De Mot, 1999; Rao, 2000), et de résistance aux sulfonilurées, particulièrement (Filimon *et al.*, 2012 ; Arabet *et al.*, 2014). Une deuxième remarque concerne le fait que le BLAST des onze isolats présentent pratiquement le même résultat,

autrement dit les souches-type obtenues sont, pour la majorité, les mêmes pour chacune des actinobactéries blastées. Ce fait traduit un rapprochement phylogénétique entre les onze isolats étudiés.

Tableau 17. Résultat du BLAST des actinobactéries étudiées

Souches étudiées	Souches proches	Numéros d'accension
SRK14 SRK18	<i>Streptomyces thermodiastaticus</i> NBRC 13468 T	AB184426
	<i>Streptomyces spiralis</i> NBRC 14215 T	AB184575
	<i>Streptomyces fungicidicus</i> NBRC 13848 T	AB184529
	<i>Streptomyces viridiviolaceus</i> NBRC 13359 T	AB184350
	<i>Streptomyces rochei</i> NBRC 12908 T	AB184237
	<i>Streptomyces olivaceus</i> NBRC 3119 T	AB184730
	<i>Streptomyces plicatus</i> NBRC 13071 T	AB184291
SRK3 SRK4 SRK9 SRK11 SRK17	<i>Streptomyces rubrocyano-diastaticus</i> subsp. <i>piger</i> NBRC 14692 T	AB184613
	<i>Streptomyces africanus</i> NBRC 101005 T	AB249955
	<i>Streptomyces levis</i> NBRC 15423 T	AB184670
	<i>Streptomyces purpurascens</i> NBRC 12831 T	NR041221
	<i>Streptomyces afghaniensis</i> ISP 5228 T	AJ399483
	<i>Streptomyces minutiscleroticus</i> NBRC 13000 T	AB184249
	<i>Streptomyces azureus</i> NBRC 12744 T	AB184837
	<i>Streptomyces cyaneus</i> ISP 5106 T	AJ399470
SRK12 SRK13 SRK16	<i>Streptomyces stramineus</i> NRRL 12292 T	AY999928
	<i>Streptomyces naganishii</i> NBRC 12892 T	AB184224
	<i>Streptomyces mutabilis</i> NBRC 12800 T	AB184156
	<i>Streptomyces ghanaensis</i> KCTC 9882 T	AY999851
	<i>Streptomyces vinaceusdrappus</i> NBRC 13099 T	AB184311
SRK15	<i>Streptomyces enissocaeilis</i> NRRL B-16365 T	DQ026641
	<i>Streptomyces lavendulocolor</i> NRRL B-3367 T	DQ442516
SRK15	<i>Streptomyces diastaticus</i> subsp. <i>ardesiacus</i> NBRC 15402 T	AB184653

Un arbre phylogénétique réalisé entre les onze souches en utilisant *Nocardiopsis alborubida* DSM 40465^T (X97882) comme out-group (Figure 8) a permis d'établir 5 clades ; ainsi les souches SRK14 et SRK18 constituent le premier clade ; les souches SRK3, SRK4, SRK9 et SRK11 forment le deuxième ; SRK17 compose le troisième, alors que les isolats SRK12, SRK13 et SRK16 représentent le quatrième et SRK15 le clade 5.

La figure 9 représentant la phylogénie du clade 1, montre que les groupes auxquels appartiennent les deux isolats SRK14 et SRK18, sont fortement associés à 89% de bootstrap. Ce rapprochement phylogénétique corrobore leur description morphologique, où peu de discordances sont constatées entre les deux souches, notamment sur la pigmentation des mycéliums aériens et végétatifs qui diffère légèrement, selon le milieu de croissance

considéré (Tableau 8), aussi sur la capacité de la souche SRK14 à emprunter la voie des acides mixtes, contrairement à la SRK18 (Tableau 10).

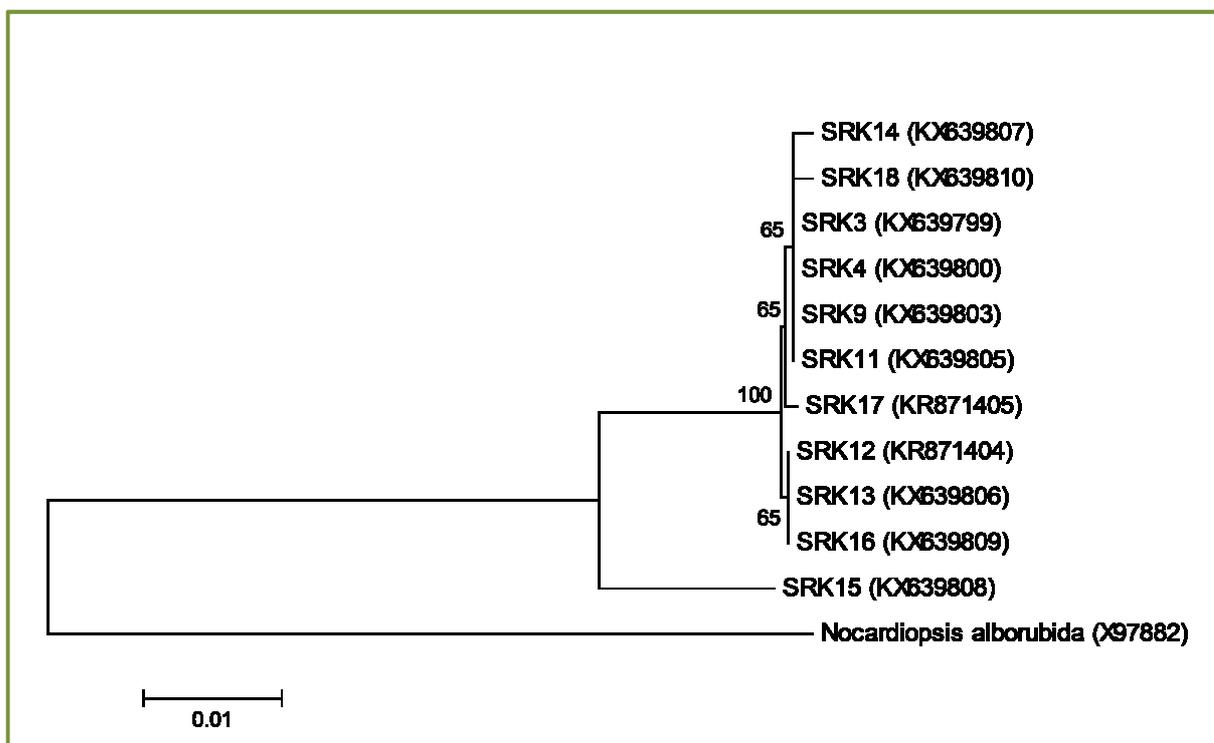


Figure 8. Relation phylogénétique entre les souches d’actinobactéries étudiées (basée sur l’analyse des séquences du gène codant l’ARNr 16S (méthode des distances neighbor-joining, accomplie par le logiciel MEGA 6). *Nocardiosis aborubida* est utilisée comme out-group. Les valeurs de bootstrap (1000 répliques) supérieures à 50% sont considérées. Les numéros d’accès des séquences sur GenBank sont indiqués entre parenthèses. L’échelle 0,01 représente le nombre de substitution par position de nucléotide).

D’après l’arbre phylogénétique de la figure 9, la souche SRK14 est proche de la souche type de *Streptomyces lavendulocolor*, avec un taux de bootstrap élevé de 91%, alors que la souche SRK18 se trouve reliée à *Streptomyces rubrocyandiasticus* sp. *piger* sous un bootstrap de 67%. Chez *S. lavendulocolor*, les chaînes sporales sont retinaculiaperti, et les spores se présentent rougeâtres à maturité (Tableau 18) (Kampfer, 2012; Labeda *et al.*, 2012), tandis que chez la souche SRK14 les premières sont sous forme de spirales et les secondes appartiennent à la série grise (Tableau 9). Ces différences sont conséquentes et la souche SRK14 ne peut donc pas être affiliée à *S. lavendulocolor*.

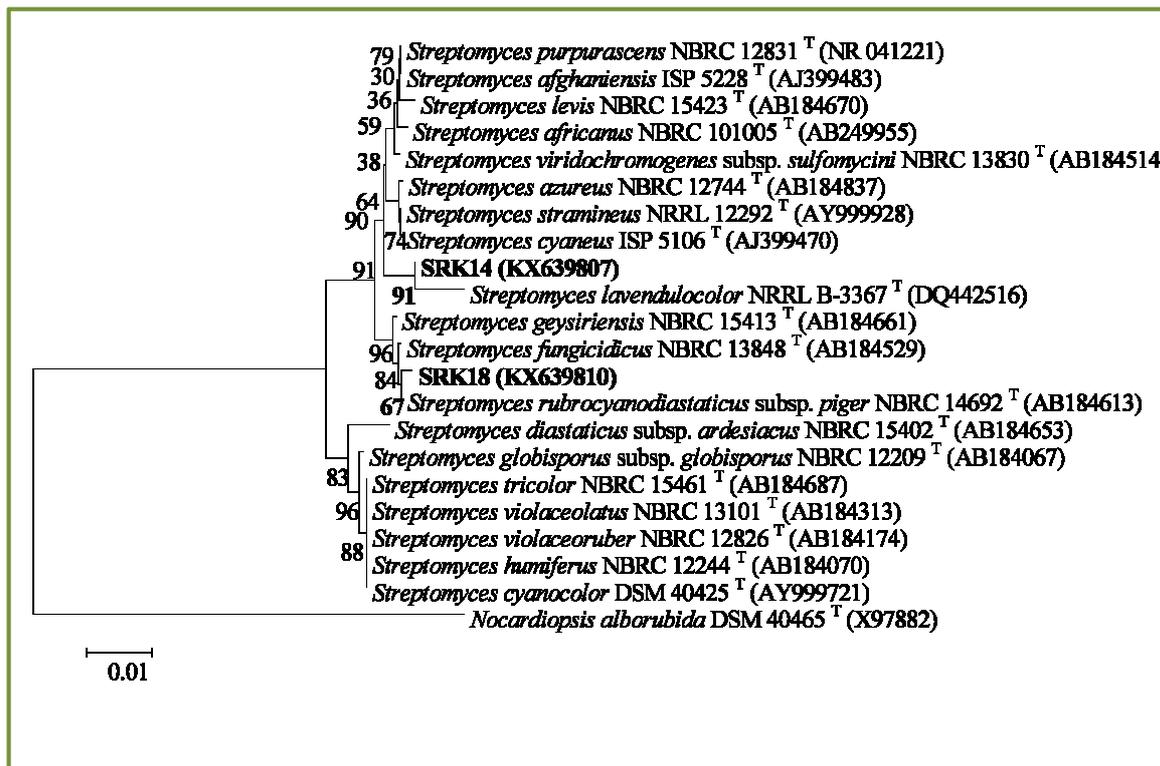


Figure 9. Relation phylogénétique au sein du clade 1

Tableau 18. Caractéristiques morphologiques des souches-type auxquelles sont affiliées les actinobactéries étudiées

Souches	Morphologie des chaînes de spores ¹	Longueur des chaînes sporales ¹	Morphologie des spores ¹	Couleur des spores ²	Production de pigments diffusibles ³	Production de mélanine sur <i>ISP</i> ₆	Production de mélanine sur <i>ISP</i> ₇
<i>S. rubrocyanodiastaticus</i> sp. <i>piger</i> ⁴	nd	nd	Lisse	Gris/marron	nd	nd	nd
<i>S. vinaceusdrappus</i> ⁵	Spirale	> 50	Lisse	Rouge	-	-	-
<i>S. mutabilis</i> ⁶	Retinaculiaperti	3-10	Lisse	Blanc	-	-	-
<i>S. ghanaensis</i> ⁷	Spirale	nd	Velue	Vert	nd	-	-
<i>S. enissocaesilis</i> ⁸	Spirale	nd	Lisse	Gris	-	Peu développée	Peu développée
<i>S. lavendulocolor</i> ⁹	Retinaculiaperti	nd	Lisse	Rouge	nd	nd	nd
<i>S. diastaticus</i> sp. <i>ardesiacus</i> ¹⁰	Spirale, Rectiflexible, Retinaculiaperti	< 20	Lisse	Gris, blanc, rouge	+/-	+/-	+/-
<i>S. africanus</i> ¹¹	Spirale	> 50	Épineuse	Bleu	-	-	-

1 sur *ISP*₂; 2 sur *ISP*₄; 3 sur Amidon-Caséine; (-): absence; +/- : variable; nd: non déterminé.

4 : Tresner *et al.*, 1961 ; 5 : Preobrazhenskaya et Ryabova 1957; 6 : Pridham *et al.*, 1958; 7 : Taddei *et al.*, 2006;

8 : Gause *et al.*, 1983; 9 : Kampfer, 2012; Labeda *et al.*, 2012 ; 10 : Williams *et al.*, 1989 ; 11 : Meyers *et al.* (2004).

Quant à *Streptomyces rubrocyano-diastaticus* sp. *piger* à laquelle la souche SRK18 est rapprochée, elle est moins décrite, et le peu de ses caractéristiques connues portent sur la couleur des spores à maturité qui appartient à la série grise (Tableau 18) (Tresner *et al.*, 1961) et qui correspond à celle de l'isolat SRK18.

Le clade 2 renferme quatre souches ; SRK3, SRK4, SRK9 et SRK11, dont la phylogénie les dispose proches les unes aux autres, ainsi, SRK3, SRK9 et SRK11 sont regroupées sous un taux de bootstrap de 69% (Figure 10). Effectivement, selon le tableau 9, les trois souches présentent pratiquement la même description morphologique ; des chaînes sporales sous forme de spirale, portant des spores arrondies et grises à maturité. Par contre, l'isolat SRK9 est le seul à produire un pigment diffusible marron-brique, sur gélose amidon-caséine, et présente moins de 20 spores par chaîne, alors que ce nombre en est supérieur chez SRK3 et SRK11.

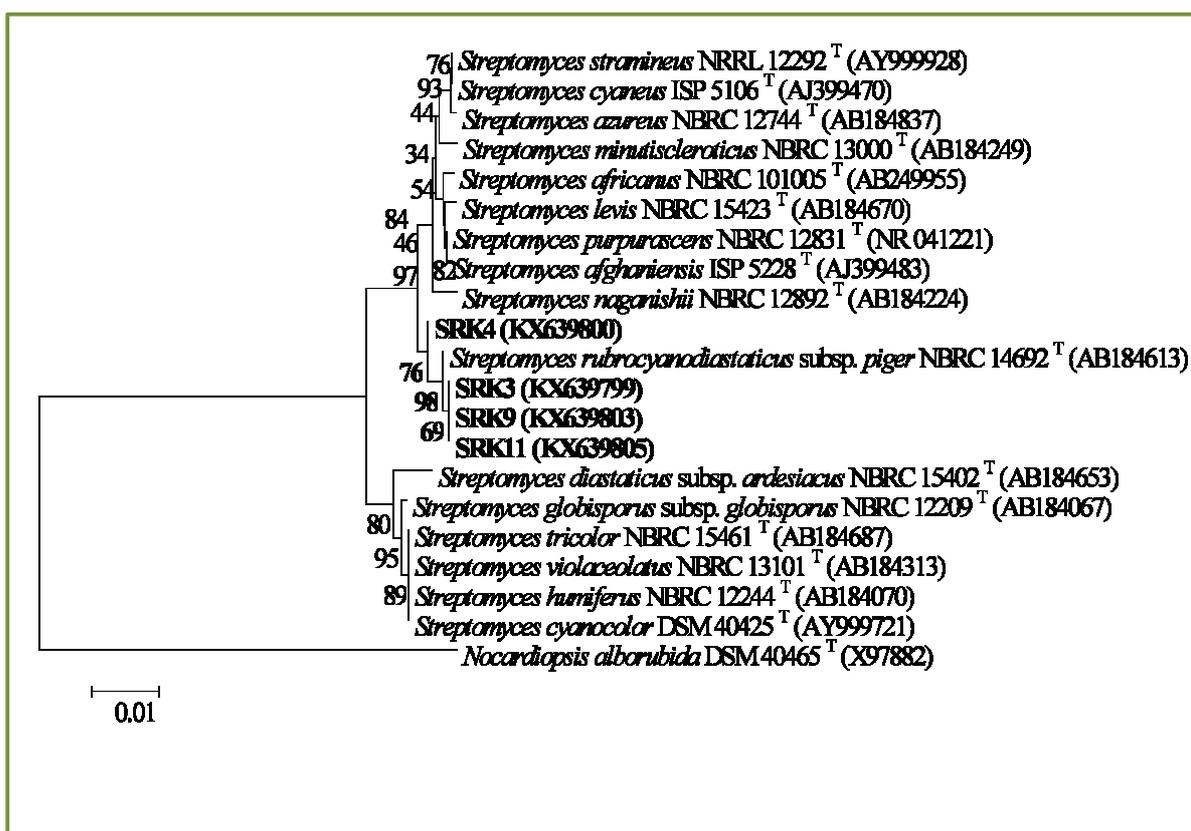


Figure 10. Relation phylogénétique au sein du clade 2

L'arbre phylogénétique montre également que ces trois souches sont affiliées à la souche-type *Streptomyces rubrocyano-diastaticus* sp. *piger*, avec un bootstrap élevé de 98%. Tout le groupe se trouve relié à la souche SRK4 avec un pourcentage de 76%. La caractérisation

morphologique de cette dernière corrobore parfaitement son emplacement sur l'arbre, par rapport aux trois autres souches, car des spores rectiflexibles et cylindriques sont recensées sur son mycélium aérien (Tableau 9). L'affiliation des quatre souches de ce clade à *Streptomyces rubrocyano-diastaticus* sp. *piger* reste fondée uniquement sur leur rapprochement phylogénétique, car, comme indiqué précédemment, peu de propriétés micro-morphologiques y sont connues, et le seul point en commun entre les cinq qui puisse être certain, est l'appartenance de leurs spores à la série grise (Tresner *et al.*, 1961).

La souche SRK17 se situe seule dans un troisième clade où elle se trouve affilié à la souche-type *Streptomyces africanus* avec un support de bootstrap de 76% (Figure 11). Cependant, selon Meyers *et al.* (2004) et Labeda *et al.* (2012), les spores matures de *S. africanus* se présentent sous la couleur bleue, ce qui n'est pas le cas de la souche SRK17 (Tableaux 9 et 18).

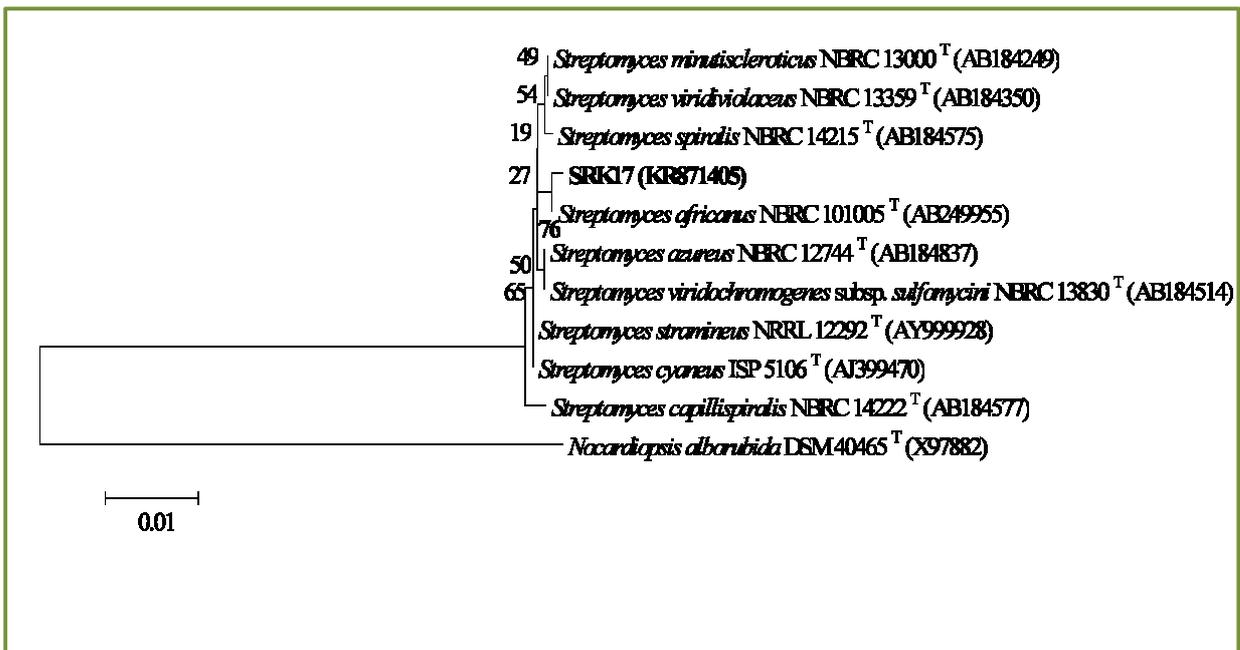


Figure 11. Relation phylogénétique au sein du clade 3

Le quatrième clade renferme les trois souches SRK12, SRK13 et SRK16, dont la phylogénie, représentée sur la figure 12, relie SRK12 et SRK16, à hauteur de 70% de support de bootstrap, à un groupe composé de quatre souches-type du genre *Streptomyces*, il s'agit de *S. vinaceusdrappus*, *S. mutabilis*, *S. ghanaensis* et *S. enissocaesilis*. Sachant que les masses sporales des trois premières souches mentionnées appartiennent respectivement aux séries de couleurs rouge, blanche et verte (Preobrazhenskaya et Ryabova 1957 ;

Pridham *et al.*, 1958 ; Taddei *et al.*, 2006 ; Labeda *et al.*, 2012) (Tableau 18), celles des isolats SRK12 et SRK16 étant de la série grise, ne permettent pas de confirmer cette affiliation. Seule *S. enissocaesilis* est similaire aux deux souches sur ce point, mais son incapacité à produire des pigments diffusibles sur la gélose amidon-caséine (Gause *et al.*, 1983 ; Labeda *et al.*, 2012), la diffère de la souche SRK12, et ses pigments mélanoides peu développés l'éloignent des deux isolats (Tableaux 9 et 18). L'autre souche de ce quatrième clade, la SRK13 est fortement rapprochée à la souche-type *S. lavendulocolor* avec un bootstrap robuste de 90% (Figure 12). Là encore, des points de différence sont constatés sur les chaînes sporales des deux souches, qui se présentent sous forme *retinaculiaperti* chez *S. lavendulocolor*, et spiralée chez la SRK13, ainsi que sur la couleur des masses sporales ; rouges pour la première et grises pour la seconde (Tableaux 9 et 13) (Kampfer, 2012; Labeda *et al.*, 2012).

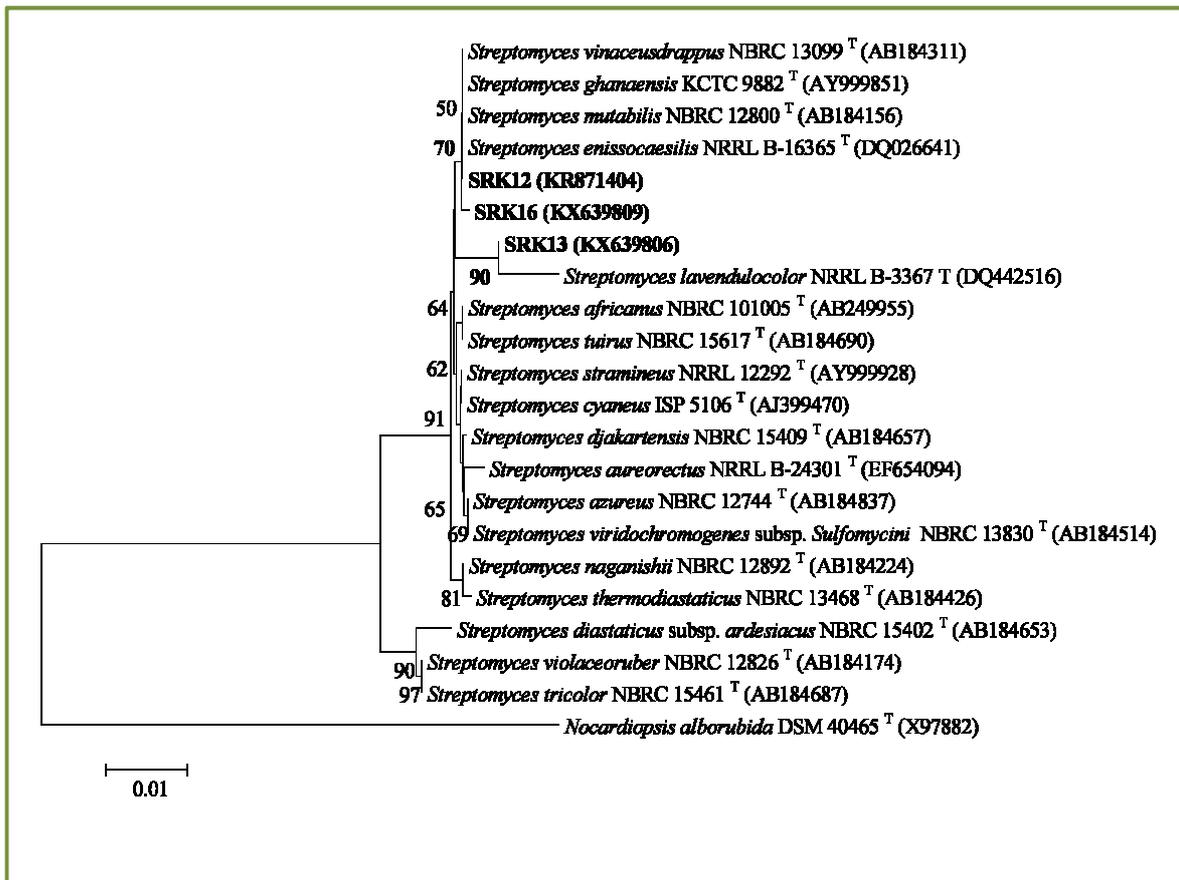


Figure 12. Relation phylogénétique au sein du clade 4

Sur la figure 8, la souche SRK15 est clairement distinguée des dix autres isolats, mais y reste associée avec un 100% de bootstrap. Sa phylogénie la relie à la souche-type *S.*

diastaticus ssp. *ardesiacus*, cette affiliation est robuste à 92% (Figure 13). Selon Williams *et al.* (1989), cette espèce présente des caractères variables, selon les cas, ainsi ses chaînes sporales peuvent être spiralées, rectiflexibles ou retinaculiaperti, portant moins de 20 spores lisses, dont la masse peut être de couleur grise, blanche ou rouge. Les pigments diffusibles y sont rarement produits, et les mélanoides sont constatés chez la moitié des souches (Tableau 18). Malencontreusement, comme signalé précédemment, la souche SRK15 n'a pas pu être revivifiée après sa conservation, par conséquent sa caractérisation taxonomique n'a pas pu être complétée. Cependant, son incapacité à sporuler est avérée, et la diffère significativement de la souche *S. diastaticus* ssp. *ardesiacus*.

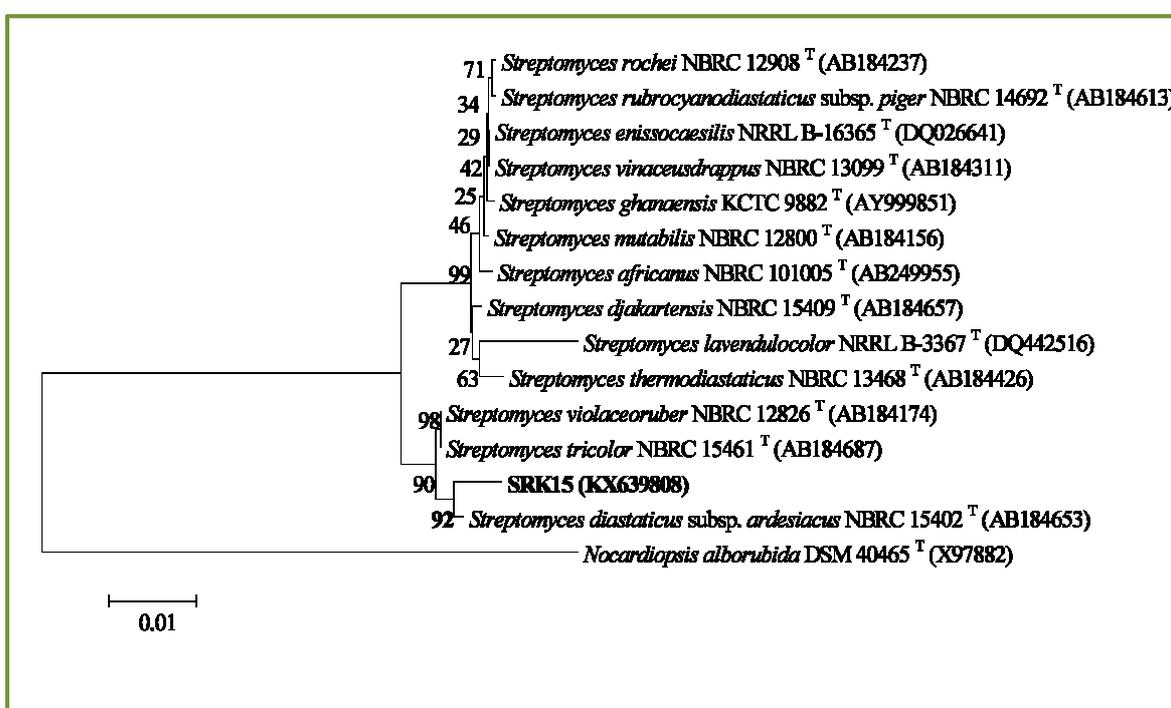


Figure 13. Relation phylogénétique au sein du clade 5

Il ressort de ces interprétations que les onze isolats sont certes assignés au genre *Streptomyces*, mais leur identification au niveau de l'espèce, reste problématique, principalement du fait des divergences constatées entre l'affiliation basée sur l'analyse du gène codant l'ARNr 16S et certaines propriétés morphologiques majeures, telles que l'appartenance des masses sporales matures aux différentes séries de couleur. Ces écarts observés sont dus aux difficultés pour différencier les espèces de *Streptomyces* selon les caractéristiques phénotypiques, comme le souligne Kämpfer (2006), et traduisent des problèmes taxonomiques au niveau de ce genre particulièrement. Ayant pris conscience de

cette complexité, plusieurs chercheurs ont essayé d’y remédier, en réalisant des études colossales, impliquant plusieurs équipes de recherche de différents pays. Leur conclusion a abouti à la nécessité d’entreprendre de nouvelles analyses, plus approfondies, pour revisiter la taxonomie du genre des *Streptomyces* (Kämpfer, 2012 ; Labeda *et al.*, 2012).

2. Dégradation et effet du tribenuron-méthyl

Selon la figure 14, les deux isolats SRK12 et SRK17 montrent une faible croissance non significative ($p > 0.05$) quand le TBM est utilisé comme seule source de carbone. Les deux souches les plus résistantes à l’herbicide sont donc dans l’incapacité d’utiliser le TBM en tant que seule source de carbone, autrement dit, elles ne possèdent pas les enzymes nécessaires pour le dégrader. Wang *et al.* (2012) et Zhang *et al.* (2013) ont également démontré que des souches de *Serratia* sp. et *Pseudomonas* sp. respectivement, sont incapables de croître sur milieu minérale supplémenté de TBM. Néanmoins, l’insignifiant développement bactérien observé chez les deux souches SRK12 et SRK17, sur cette composition de milieu, peut être expliqué par la présence de résidus carbonés, issus des pré-cultures, qui sont restés confinés dans la biomasse filamenteuse formée en pellets en milieu liquide, et cela malgré l’utilisation d’un inoculum lavé.

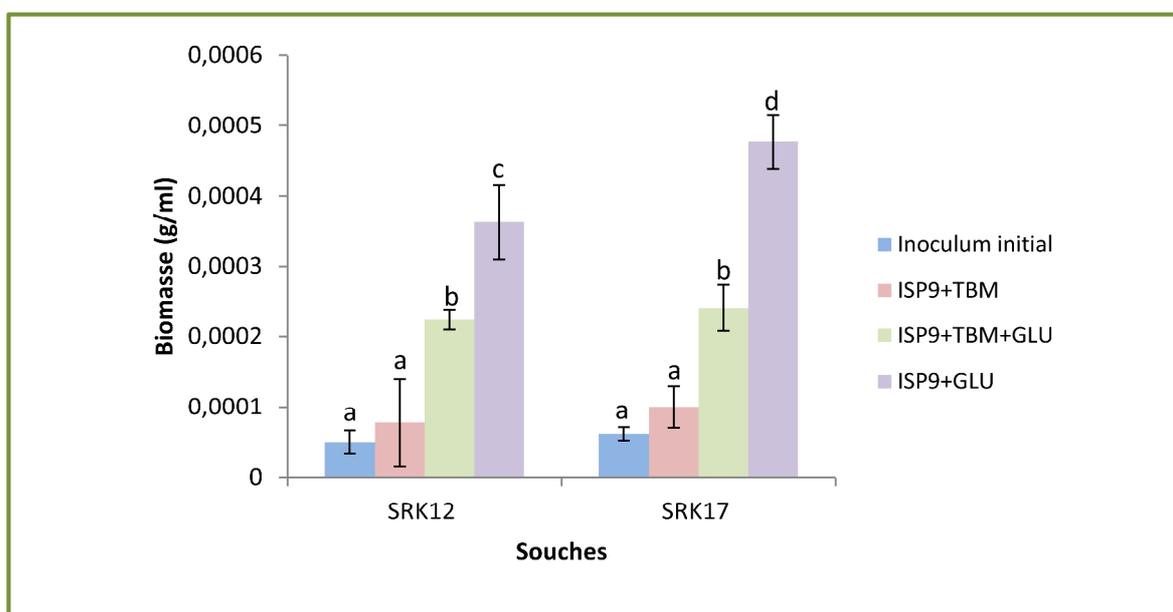


Figure 14. Effet du TBM sur la production de la biomasse des souches SRK12 et SRK17. La biomasse est estimée sur trois différents milieux après 3 semaines d’incubation (30°C/150 rpm). Les barres indiquent les écarts types à partir de 3 répétitions. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les valeurs de biomasse ($p < 0.05$).

D'une autre part, quand le glucose est additionné dans le milieu avec le TBM, les isolats SRK12 et SRK17 présentent tous deux une évidente et significative croissance ($p < 0.05$). Cependant, la biomasse produite avec cette composition de milieu n'atteint pas le niveau maximal obtenu avec le glucose, seul présent comme source de carbone, sans le TBM ($p < 0.05$). Ces différences notables sur la croissance des deux souches sur le glucose, en présence et en l'absence du TBM, amènent à conclure que la présence du TBM, même avec une autre source de carbone, semble incontestablement entraver le développement des deux souches bactériennes. Cette observation n'est pas en accordance avec celle décrite par Wang *et al.* (2012) et Zhang *et al.* (2013) qui n'ont signalé aucun effet évident du TBM sur la croissance de souches de *Serratia* sp. et *Pseudomonas* sp., respectivement, lorsqu'elles sont inoculées sur du glucose avec et sans TBM. Cela insinue l'implication de divers facteurs pouvant contrôler le processus de reproduction des cellules en présence du TBM, notamment la possible transformation de ce dernier à des degrés différents et le type d'espèces considérées.

L'analyse HPLC a été conduite à partir du surnageant filtré de quatre cultures différentes sur ; bouillon *ISP*₉ additionné de 30 mg/l de tribenuron-méthyle, pour le test abiotique ; et trois autres variantes de ce milieu, pour les tests biotiques ; il s'agit de la même composition de milieu (*ISP*₉ + TBM) à deux pH différents (6,8 et 7,0) ainsi que de l'*ISP*₉ supplémenté de TBM (30 mg/l) et de glucose (1% p/v), tous les trois inoculés par les deux souches SRK12 et SRK17 séparément.

La courbe étalon du TBM montre un comportement linéaire et suit une réaction du premier ordre. Les chromatogrammes obtenus lors de l'établissement de la courbe étalon du TBM, montrent l'apparition d'un pic à un temps de rétention de 3,3 minutes, dont l'aire augmente avec l'accroissement de la concentration du polluant (Annexe 4). Ce temps de rétention indique donc le moment auquel le TBM est séparé et dosé par la chromatographie, par conséquent, il est pris comme référence pour repérer les pics correspondant au TBM lors des dosages effectués à partir des différents tests.

La figure 15 montre que, pour l'essai abiotique, à pH 6,8, le TBM est fortement dégradé (91,58%), après 21 jours d'incubation à 30°C. La présence de chacune des souches SRK12 et SRK17, sur le même milieu dans les mêmes conditions, n'a pas augmenté le taux de dégradation (90,01 et 88,72%, respectivement) et comme signalé ci-dessus, les deux isolats ont montré une insignifiante croissance sur TBM comme seule source de carbone (Figure

14). Il apparaît clairement que le TBM est chimiquement dégradé. Plusieurs auteurs parlent d'un mécanisme de dissipation primaire du TBM dans le sol et les solutions aqueuses et le spécifient comme étant une hydrolyse acide, influencée par la variation de la valeur du pH (Roberts et Hutson, 1998; Martin, 2000; Andersen *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2012). Plus précisément, la dégradation se produit plus rapidement et de manière prononcée à pH acide qu'à pH neutre ou alcalin (Devlin *et al.*, 1992). Wang *et al.* (2012) mentionnent que sur un milieu contenant des sels minéraux et 50 mg/l de TBM, à pH 7,3, le TBM n'est pas du tout dégradé. La même observation est notée par Zanardini *et al.* (2002) pour deux composés sulfonyles; le chlorsulfuron et le metsulfuron méthyle, à pH 7,0 et 7,2. Dans la présente étude, le pH de départ du test abiotique, est de 6,8 ; une valeur considérée par Martin (2000) comme le point critique pour la dégradation des herbicides sulfonyles. Ce taux d'acidité a permis un taux de dégradation considérable du TBM atteignant 91,58%.

Cette constatation est étayée par le résultat obtenu sur (*ISP*₉ + TBM) à pH 7,0 qui démontre qu'une légère hausse du pH vers la neutralité altère significativement la dégradation du TBM ($p < 0,05$) vers des pourcentages moins élevés ; 75,73 et 76,63% en présence de chacune des deux souches SRK12 et SRK17, respectivement.

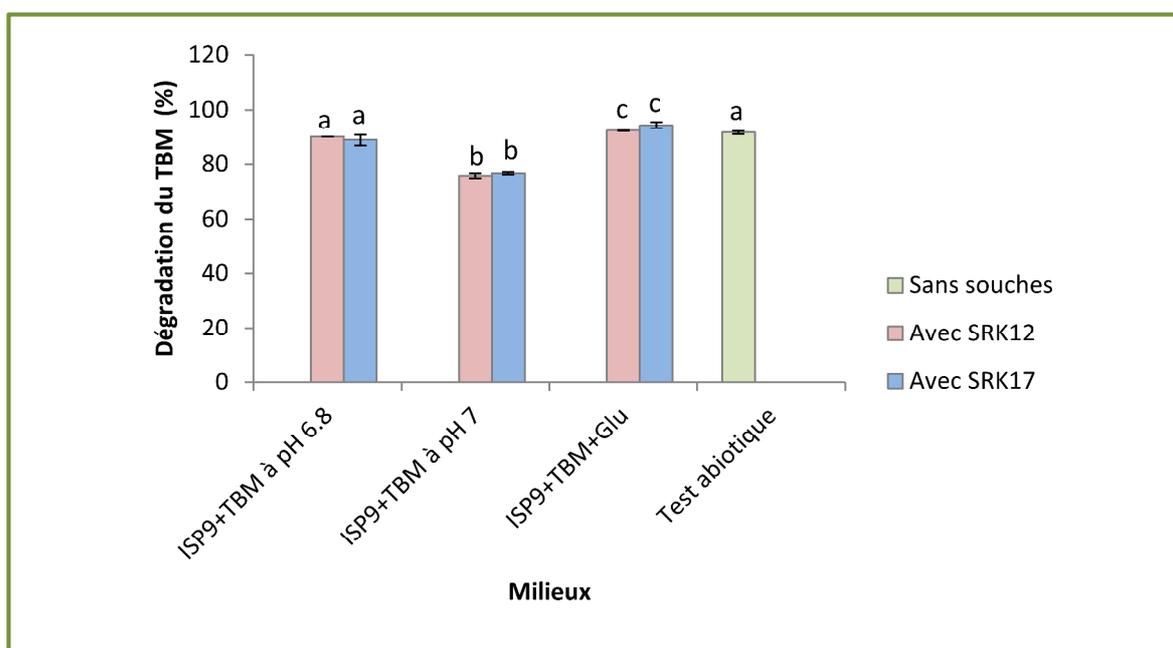


Figure 15. Dégradation du TBM (30 mg/L) par les souches SRK12 et SRK17, après 21 jours d'incubation (30°C / 150 rpm). Les barres indiquent les écarts types à partir de 3 répétitions. Les différentes lettres indiquent une différence significative entre les taux de biodégradation ($p < 0,05$).

Autre point intéressant à soulever concerne le milieu (*ISP*₉ + TBM + glucose), sur lequel les deux souches améliorent de manière significative la dégradation du TBM ($p < 0,05$) vers 92,27 et 94,32% respectivement avec SRK12 et SRK17. De plus, la croissance des deux souches testées est évidente sur cette formulation de milieu, mais elle n'est pas aussi optimale que sur (*ISP*₉ + glucose) sans TBM (Figure 14).

Les valeurs initiales de pH des quatre milieux testés sont de 6,8 pour le test abiotique, et les bouillons (*ISP*₉+TBM) et (*ISP*₉+TBM+glu) et de 7,0 pour (*ISP*₉+TBM) (Tableau 19).

Tableau 19. Valeurs de pH initiales et finales des cultures bactériennes

Souches/ Milieux	<i>ISP</i> ₉ +TBM		<i>ISP</i> ₉ +TBM		<i>ISP</i> ₉ +TBM+GLU		Test abiotique	
	pH ₀	pH _f	pH ₀	pH _f	pH ₀	pH _f	pH ₀	pH _f
SRK12	6,8	6,72±0,017	7,0	6,78±0	6,8	4,38±0,231	6,8	6,73±0,015
SRK17	6,8	6,72±0,017	7,0	6,79±0,015	6,8	4,23±0,148		

pH₀ : pH initial ; pH_f : pH final

Le choix de la valeur de 6,8 s'est fait pour une double raison ; d'abord, c'est le pH du bouillon *ISP*₉ selon Shirling et Gottlieb (1966), et puis comme mentionné ci-dessus, c'est le point critique pour la dégradation des molécules sulfonyles (Martin, 2000). Le fait d'avoir légèrement augmenté le pH du test biotique (*ISP*₉+TBM) de 0,2 pour le porter à une valeur neutre de 7,0, a pour but de vérifier ce seuil critique et l'a finalement confirmé, car cela a significativement influencé de manière négative la dégradation du TBM (Figure 15). En effet, le pH final du milieu a, un tant soit peu, diminué après trois semaines d'incubation, pour atteindre les valeurs de 6,78 et 6,79 avec les souches SRK12 et SRK17, respectivement. Quant aux pH des deux milieux abiotique et (*ISP*₉+TBM), leurs valeurs ont diminué de 6,8 vers 6,73 et 6,72, respectivement. Globalement, à pH final de 6,78-6,79, le TBM est déjà majoritairement dégradé à hauteur de 76,18% en moyenne. En diminuant à des pH de 6,72-6,73, le taux de dissipation du TBM augmente fortement et significativement vers une moyenne de 89,36%. Par ailleurs, à des valeurs plus acides de 4,38 et 4,23 ; obtenues avec une composition de milieu similaire additionnée de glucose, la disparition du TBM est encore améliorée de 2,26 et 5,56% respectivement avec les souches SRK12 et SRK17.

Cette situation peut être expliquée par un processus de co-métabolisme bactérien, dans lequel une dégradation partielle du TBM s'est produite. En effet, le clivage du pont sulfonyles est la plus commune et principale réaction chimique initiale pour la

dégradation des sulfonilurées, en particulier sous des conditions acides (Devlin *et al.*, 1992; Roberts and Hutson, 1998; Martin, 2000; Andersen *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2013). C'est le cas des deux cultures bactériennes, où le pH final atteint 4,38 et 4,23 respectivement avec SRK12 et SRK17 (Tableau 19). Ces valeurs acides sont obtenues suite à l'accumulation d'acides organiques issus de la fermentation du glucose, comme le note Zanardini *et al.* (2002). Les conditions acides qui activent la transformation du TBM sont donc directement liées à l'activité bactérienne sur la catalyse du glucose. Cette hypothèse rejoint celle de Wang *et al.* (2012), qui suggère que la dégradation du TBM peut être déclenchée par un processus co-métabolique impliquant une hydrolyse acide du TBM survenue en conséquence d'une activité bactérienne sur le glucose, et propose une extrapolation à l'écosystème du sol, où les micro-niches, formées par des microorganismes et des particules du sol, abaissent le pH par l'activité microbienne, et permettent l'hydrolyse acide du TBM.

La figure 16a montre la cinétique de dégradation du TBM sur bouillon (*ISP*₉+TBM) à pH 6,8 ; sans bactérie et ensemencé avec les souches SRK12 et SRK17. Les trois courbes suivent la même tendance où la concentration du TBM diminue de 30 mg/l à 20,10 ; 19,71 et 25,10 mg/l, respectivement, après seulement trois jours d'incubation à 30°C. Au bout de six jours, la quantité de TBM décroît à un peu plus de la moitié, en abiotique et en présence de la souche SRK12 (42,85% et 41,72% respectivement), et à 50,54% avec la souche SRK17, pour finalement atteindre des valeurs infimes, à l'issue des 21 jours d'incubation, de l'ordre de 2,60 ; 3,09 et 3,66 mg/l, respectivement. Selon Martin (2000) et un rapport de l'AESA (2004), en moyenne, la durée de demi-vie (DT_{50}) du tribenuron méthyl est de 10 jours, c'est-à-dire que 50% du polluant sont dégradés au bout de 10 jours après son application. Dans le cas présent, la durée de demi-vie du TBM paraît plus courte et varie aux alentours de 4 à 6 jours. Cette rapidité de dissipation de la molécule sulfonilurée est certainement due au pH du milieu qui a atteint des valeurs légèrement acides, inférieures au point critique de 6,8 (Tableau 19). Par contre, sur le même milieu et à pH final proche de ce seuil (6,78-6,79), la dégradation est entravée (Figure 16c) et seulement un tiers du TBM est dégradé après 6 jours d'incubation où des concentrations de 22,21 et 19,34 mg/L de TBM sont enregistrées avec les souches SRK12 et SRK17, respectivement. Dans ce cas, la DT_{50} du TBM change et augmente au-delà de 6 jours. Après les 21 jours d'incubation un peu plus des deux tiers de la quantité initiale de TBM, sont dégradés (7,51 et 7,23 mg/L respectivement). Il apparaît que la durée de demi-vie du

TBM ne peut être définie de manière exacte, car, il est clair qu'elle est fortement liée au pH du milieu.

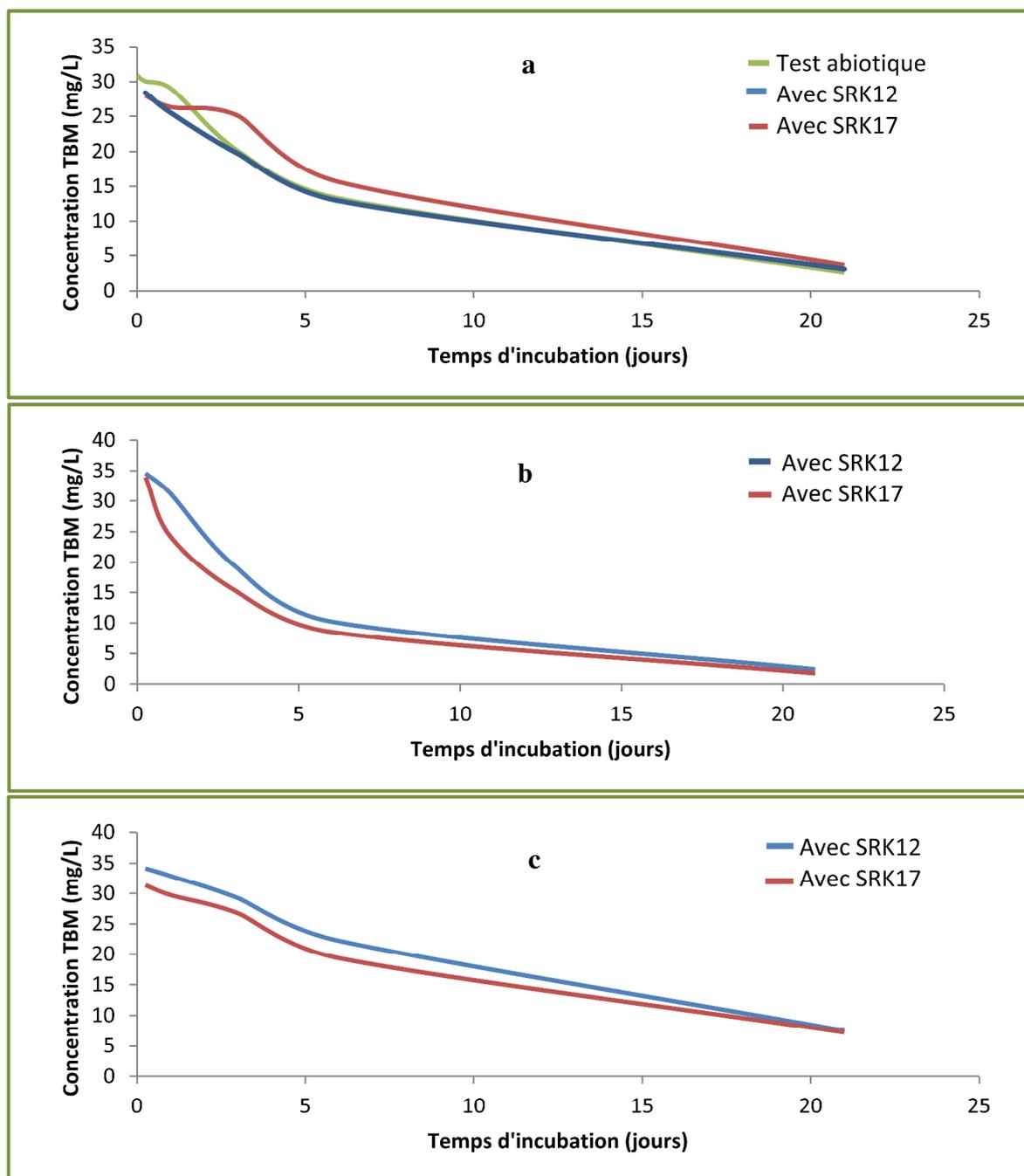


Figure 16. Cinétique de disparition du TBM sur milieu minimum *ISP*₉. **a** : *ISP*₉+TBM à pH 6,8 ; **b** : *ISP*₉+TBM+Glu ; **C** : *ISP*₉+TBM à pH 7,0.

En milieu glucosé (Figure 16b), une différence dans la cinétique de dégradation est constatée entre les deux isolats étudiés, où la durée de demi-vie du TBM est écourtée de 6 à 3 jours avec la souche SRK17, et persiste à environ 4 jours avec SRK12, malgré qu'au bout de 21 jours d'incubation, les taux de dissipation du TBM sont améliorés chez les deux

souches et sont relativement similaires (2,39 et 1,75 mg/L respectivement avec SRK12 et SRK17). Cette situation peut être expliquée par des variations au niveau de l'évolution des valeurs de pH au cours de la fermentation, dues à une métabolisation plus prononcée du glucose, dès le troisième jour d'incubation, avec la souche SRK17, comparativement à la SRK12. Ce qui implique une acidification rapide du milieu permettant donc la dissipation de la moitié du TBM à seulement 3 jours, en présence de la souche SRK17. Ce résultat corrobore les conclusions de plusieurs études et démontre qu'effectivement, le TBM est dégradé, selon les conditions du milieu, notamment le pH, par une hydrolyse acide, mais peut aussi l'être par l'intervention indirecte de microorganismes, en l'occurrence d'actinobactéries (Devlin *et al.*, 1992 ; Roberts et Hutson, 1998 ; Martin, 2000 ; Zanardini *et al.*, 2002 ; AESA, 2004).

Les chromatogrammes de l'HPLC obtenus à partir du test abiotique, montrent qu'au fur et à mesure que le TBM se dissipe, deux nouveaux composés apparaissent simultanément, avec des temps de rétention de 2,1 minutes pour le premier produit (P1) et 2,5 minutes pour le second (P2) (Figure 17). La relation entre les deux molécules et le TBM est inversement proportionnelle, c'est-à-dire que plus la concentration du TBM diminue, plus celles des deux produits augmentent. Cela indique que ces derniers sont le résultat de la dégradation du TBM, et que contrairement à la molécule mère, ils ne sont pas dégradés chimiquement dans des conditions d'acidité.

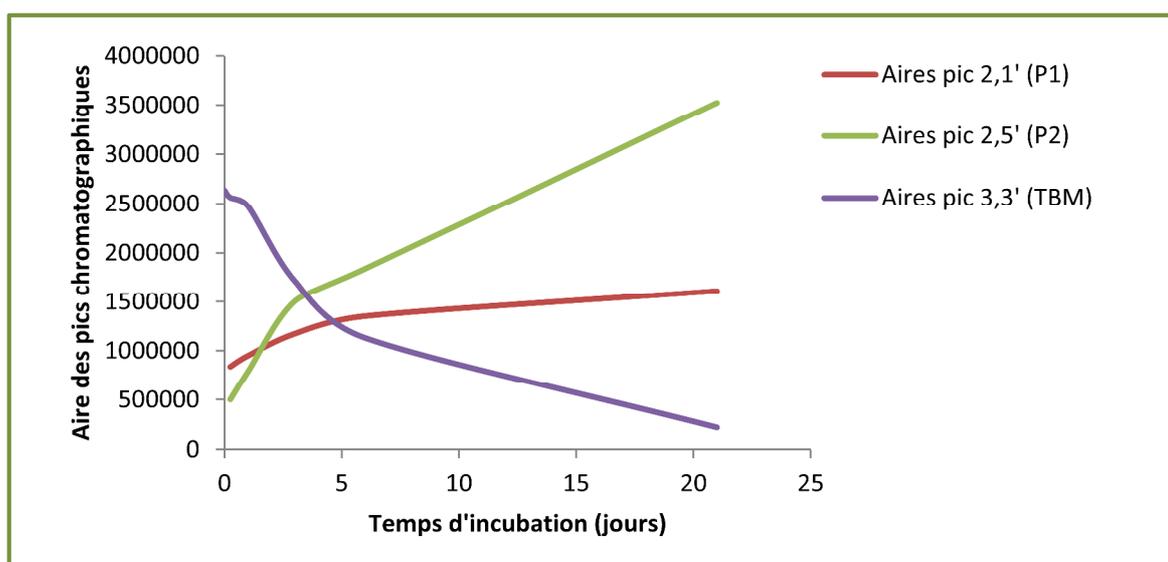


Figure 17. Cinétique d'apparition des produits de dégradation du TBM en test abiotique.

Des résultats similaires sont obtenus en cultures bactériennes avec les deux souches étudiées, sur les trois milieux testés (Figure 18). Cependant, tout comme la quantité de TBM, les aires des pics correspondant aux deux produits de dégradation, varient selon le milieu considéré, traduisant ainsi des concentrations variables de ces composés.

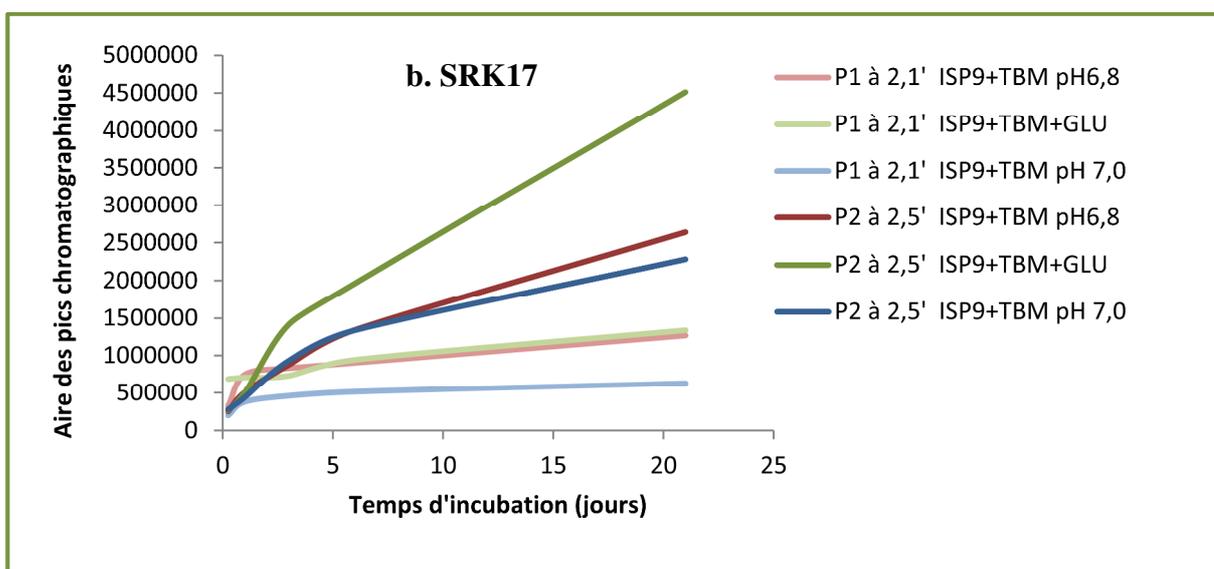
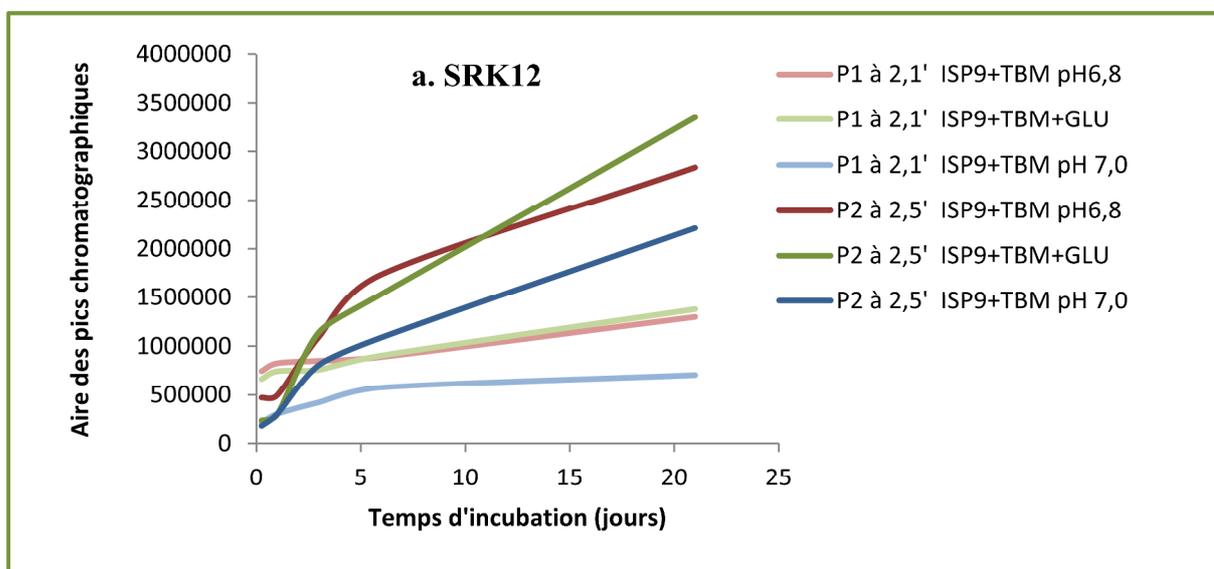


Figure 18. Cinétique d'apparition des produits de dégradation du TBM sur les milieux testés. **a** : avec SRK12 ; **b** : avec SRK17.

Ces observations ne font qu'affirmer celles déjà notées pour le TBM (Figure 16). Ainsi, en comparant les trois milieux testés, il apparaît que celui qui permet l'obtention de plus de produits P1 et P2 est le milieu glucosé, contrairement au bouillon *ISP*₉+TBM à pH 7 où les plus faibles concentrations en P1 et P2 sont enregistrées. Ceci est évident vu que c'est sur

cette composition de milieu que le TBM est le moins dégradé et c'est en présence du glucose, que sa dissipation est améliorée.

Un autre constat est fait en observant la figure 18 (a et b) et porte sur la différence de concentrations entre les deux produits de dégradation du TBM. En effet, dans tous les cas, le composé P2 apparaît en quantités supérieures à celles de P1. Ceci peut certes être dû à une différence de concentrations entre les deux molécules, mais peut aussi être expliqué par une faible absorbance du produit P1 à la longueur d'onde utilisée lors du dosage en HPLC et fixée à 220 nm pour détecter le TBM (Bernal *et al.*, 1997). Dans ce cas, cette valeur peut ne pas correspondre à l'absorbance optimale du composé P1, qui n'absorbe que faiblement la lumière, entraînant ainsi de petits pics qui ne traduisent pas les quantités réelles existantes (Clark, 2007).

Même si le TBM est fortement dégradé, les produits P1 et P2 ne permettent pas non plus le développement des souches qui se trouvent incapables de les utiliser comme source de carbone, puisqu'elles n'ont manifestement montré aucune croissance significative sur (*ISP₉*+TBM) (Figure 14). De plus, ces composés (ou l'un des deux) se présentent comme des facteurs entravant la croissance des deux souches, étant donné que, sur (*ISP₉*+TBM+glucose), le développement bactérien n'a pas atteint le niveau maximal, enregistré sur le même milieu sans TBM. Il est connu que les sous-produits issus de la transformation partielle des pesticides peuvent avoir une toxicité plus prononcée et persister plus longtemps dans le milieu, comparativement à la molécule mère. C'est ce qui semble être le cas du TBM et de ses métabolites de dégradation (Bottaro *et al.*, 2008).

Selon plusieurs auteurs, il est très probable que ces produits soient du sulfonamide et de la triazine amine, car ce sont les métabolites obtenus lors de la première réaction de dégradation du TBM par rupture du pont sulfonylurée, en conditions acides (Devlin *et al.*, 1992 ; Roberts et Hutson, 1998 ; Bottaro *et al.*, 2008). Ces molécules sont considérées comme stables et très persistantes dans les sols, et leur accumulation à de fortes concentrations peut conduire à l'inhibition des actinobactéries les plus résistantes (Devlin *et al.*, 1992 ; ARLA, 1995 ; AESA, 2004).

Conclusion

Générale

Le but de ce travail consiste principalement à établir l'impact d'un herbicide, très employé en Algérie, de la famille chimique des sulfonylurées ; le tribenuron méthyl (TBM), sur la croissance d'un groupe bactérien fortement abondant dans le sol ; les actinobactéries, où elles jouent un rôle primordial dans le maintien de l'équilibre entre les différents processus biologiques s'y déroulant. Chaque étape de l'étude a permis d'apporter une information particulière, contribuant ainsi à la détermination de cet effet.

La première constatation faite concerne le traitement du sol par l'herbicide Granstar[®], qui vraisemblablement affecte la population des actinobactéries, du moins celle du sol agricole 2. En effet, le nombre des souches actinobactéries isolées à partir du sol 2 traité, a diminué de manière évidente, comparativement à l'échantillon non traité. Cette observation mène à conclure que ce groupe bactérien est constitué de souches sensibles et d'autres résistantes à l'herbicide. Les premières n'ayant pas pu survivre au traitement. Cependant, l'isolement à partir du sol forestier 3, est quelque peu mitigé, car si le nombre des isolats est certes faible, il n'apparaît pas une différence de quantité bactérienne entre l'échantillon exempt et celui traité à l'herbicide. En raison de la nature forestière du sol 3, l'une des interprétations possibles à cette situation serait la prédominance de la population fongique sur les autres membres du microbiote tellurique, notamment les actinobactéries. Quant au sol 1, subissant régulièrement des traitements phytosanitaires répétés, il renferme également de faibles taux d'actinobactéries, ce qui indique la perte de souches sensibles, lors de l'ajout répété de pesticides.

Les quarante-deux isolats obtenus manifestent tous une tolérance à de fortes concentrations de l'herbicide Granstar[®], atteignant un maximum de 0,3%. À partir de ce seuil, seulement onze d'entre eux sont capables de résister à des pourcentages variés de l'herbicide, avec un maximum de 0,6% enregistré avec seule la souche SRK12. Il est à noter que les deux souches les plus résistantes SRK12 et SRK17, tolérant, respectivement 0,6 et 0,55% de l'herbicide, sont issues de sols traités (sol forestier 3 et sol agricole 1, respectivement), ce qui conforte l'idée que le traitement herbicide sélectionne des souches fortement résistantes.

Les onze souches sélectionnées, codées SRK3, SRK4, SRK9, SRK11, SRK12, SRK13, SRK14, SRK15, SRK16, SRK17 et SRK18, présentent des aspects morphologiques rappelant ceux du genre *Streptomyces*, à savoir ; présence des deux types de mycélium, végétatif et aérien. Le premier n'étant ni fragmenté ni sporulé et le second portant à ses

extrémités des chaînes sporales sous forme spiralée pour la majorité des souches sauf pour SRK4 dont les spores sont disposées en chaînes rectiflexibles. À maturité, les masses sporales de dix isolats, sont de couleur grise, ce qui les classe dans la série grise. La onzième souche SRK15 n'étant pas capable de sporuler, se distingue du groupe.

L'analyse phylogénétique basée sur les séquences des gènes codant l'ARNr 16S, confirme l'appartenance des souches étudiées au genre *Streptomyces*, et les affine à différentes souches-types, avec de robustes taux de bootstrap. Ainsi, les isolats SRK3, SRK4, SRK9, SRK11 et SRK18 sont apparentés à *Streptomyces rubrocyano-diastaticus* sp. Piger, avec des taux de bootstrap élevés variant de 69 à 98%. Alors que SRK13 et SRK14 sont étroitement liées à *Streptomyces lavendulocolor* et SRK17 à *Streptomyces africanus*, avec de fortes valeurs de bootstrap de 92; 89 et 76% respectivement. Les souches SRK12 et SRK16 sont associées à quatre souches-types de *Streptomyces* (*S. vinaceusdrappus*, *S. mutabilis*, *S. ghanaensis* et *S. enissocaesilis*) avec 70% de bootstrap. La souche SRK15 est apparentée à *Streptomyces diastaticus* sp. *Ardesiacus* avec un niveau de bootstrap élevé de 92%. Ceci dit, d'importantes différences morphologiques sont notées entre les isolats et les souches de référence auxquelles ils sont affiliés. Ce fait confirme le lien délicat et étroit qui existe entre les différentes espèces répertoriées du genre *Streptomyces*, et qui empêche de les distinguer les unes des autres, même en étudiant et en comparant leurs séquences d'ADN codant l'ARNr 16S. La réalisation de nouvelles analyses, plus approfondies et plus pertinentes, telles que l'hybridation ADN/ADN, pour revisiter la taxonomie au sein du genre *Streptomyces*, s'impose donc comme une nécessité.

Lors de la seconde étape de l'étude, l'effet de la molécule du tribenuron méthyle (TBM) sur la croissance des deux souches les plus résistantes SRK12 et SRK17, est examiné. Il apparaît clairement, que les deux isolats sont incapables de croître sur un milieu minimum contenant juste du TBM comme seule source de carbone. Autrement dit, les deux ne possèdent pas le bagage enzymatique nécessaire pour le dégrader. Par contre, les deux souches se développent quand le TBM est présent avec un autre substrat, en l'occurrence le glucose. Dans ce cas, la croissance bactérienne semble incontestablement entravée, comparativement à la croissance optimale obtenue sur glucose comme unique source de carbone et d'énergie. L'impact négatif du TBM sur la croissance des deux souches est donc avéré.

Les tests de dégradabilité du TBM indiquent qu'il est fortement dégradé chimiquement, sans l'intervention des bactéries, à hauteur de 91,58% et cela à pH 6,8, après 21 jours à 30°C. Selon maintes études, le mécanisme incriminé serait une hydrolyse acide du polluant. La présence des deux souches SRK12 et SRK17, dans les mêmes conditions, ne change rien à cette situation et semble ne pas avoir d'impact sur ce taux de dégradation. L'effet du pH sur cette dégradation est démontré, en effet, une légère augmentation du pH vers la neutralité, altère significativement ($p < 0,05$) la dissipation du TBM, en présence des deux souches SRK12 et SRK17, vers des pourcentages moins élevés de 75,73 et 76,63%, respectivement. La dégradation abiotique du TBM dépend donc du pH du milieu et varie significativement avec de légères fluctuations de ce paramètre.

Un autre point intéressant à soulever, concerne l'implication des deux souches dans l'amélioration du taux de dégradation du TBM, en présence du glucose. Ce qui suggère l'intervention d'un processus de co-métabolisme bactérien dans la disparition du TBM. Plus précisément, l'acidité du milieu est augmentée par l'accumulation d'acides organiques issus de la fermentation du glucose, ce qui se répercute positivement sur l'augmentation de la dégradation du TBM.

La durée de demi-vie du TBM ne peut être définie, car elle varie selon le pH, la composition du milieu et l'espèce bactérienne. Ainsi à des valeurs légèrement acides, inférieures au point critique de 6,8, elle tourne aux alentours de six jours. Quand le pH augmente au-delà de ce seuil, ce paramètre de demi-vie devient plus long. Par contre, il est écourté à seulement trois jours, en milieu glucosé avec la souche SRK17 à pH 4,23, témoignant d'une activité plus prononcée sur le glucose, comparativement à celle de la souche SRK12.

Dans tous les cas testés, deux composés apparaissent lors du dosage par HPLC, aux temps de rétention de 2,1 et 2,5 minutes. Tout indique qu'il s'agisse des produits de dégradation du TBM, puisque la concentration de ce dernier et celle des deux molécules sont inversement proportionnelles. Manifestement, les deux souches étudiées sont aussi incapables d'utiliser ces composés comme source de carbone, puisqu'elles n'ont montré aucune croissance significative sur milieu minimum additionnée de TBM.

Contrairement au TBM, l'acidité semble n'avoir aucun effet sur la dégradation des deux métabolites, dont la présence persiste dans les différents milieux étudiés et gêne significativement la croissance des souches d'actinobactéries étudiées. Il est probable que ces

produits soient du sulfonamide et de la triazine amine, issus de la dégradation acide du TBM par clivage de son pont sulfonylurée.

En perspectives, il serait judicieux d'extrapoler ces résultats à l'échelle des écosystèmes telluriques contaminés par le TBM se caractérisant particulièrement par des pH alcalins. Dans ce cas, la technique de bioremédiation proposée serait d'alimenter le sol en substrats carbonés pour booster l'activité bactérienne et abaisser le pH au niveau de micro-niches, ce qui déclencherait la première réaction de l'hydrolyse acide du TBM.

L'effet nocif des composés de dégradation sur le développement des actinobactéries, est avéré et nécessite une meilleure compréhension, qui doit passer par l'identification de ces produits et la détermination de leur devenir, éventuellement par l'intervention d'un consortium microbien tellurique plus élargi, où chaque groupe a certainement une fonction et un rôle primordial à engager, pour venir à bout de la minéralisation complète du TBM.

Références

Bibliographiques

- AESA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments)** (2004) Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance tribenuron, Rapport Scientifique, 15: 1-52.
- Ali A. M., El Gammal A. A. and Rifaat H. M.** (2014) Influence of nutrition and culturing conditions on antimicrobial metabolite production by *Streptomyces mesioensis* isolated from Egyptian soil. *Int. J. ChemTech Res.* **6**(4): 2552-2557.
- Alvarez A., Saez J. M., Davila Costa J. S., Colin V. L., Soledad Fuentes M., Cuozzo S. A., Benimeli C. S., Polti M. A. and Amoroso M. J.** (2017) Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. *Chemosphere* **166**: 41-62.
- Anandan R., Dharumadurai D. and Manogaran G. P.** (2016) An Introduction to Actinobacteria, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), *InTech*, DOI: 10.5772/62329. Available from: <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/an-introduction-to-actinobacteria>
- Andersen S. M., Hertz P. B., Holst T., Bossi R. and Jacobsen C. S.** (2001) Mineralisation studies of ¹⁴C-labelled metsulfuron methyl, tribenuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl in one Danish soil and groundwater sediment profile. *Chemosphere* **45**: 775-782.
- Arabet D.** (2014) Effet d'un herbicide de la famille des sulfonyleurées sur la communauté bactérienne d'un sol agricole, étude de cas : le Chevalier[®] OnePass. Thèse de Doctorat en Biotechnologie Microbienne, Génome et Environnement. Université Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algérie. 79 p.
- Arabet D., Tempel S., Fons M., Denis Y., Jourlin-Castelli C., Armitano J., Redelberger D., Iobbi-Nivol C., Boulahrouf A. and Méjean V.** (2014) Effects of a sulfonyleurea herbicide on the soil bacterial community. *Environ. Sci. Pollut. R.* **21**(8): 5619-27.
- ARLA (Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire)** (1995) Tribenuron methyl. Document des décisions E95-04, Canada.
- Augustine S. K., Bhavsar S. P. and Kapadnis B. P.** (2005) A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23. *J. Biosci.* **30**(2): 201-211.

- Awad M., Elshahed K. and Elnakkadi A.** (2009) Isolation, Screening and identification of newly isolated soil *Streptomyces* (*Streptomyces* sp. NRC-35) for β -lactamase inhibitor production. *World Appl. Sci. J.* **7**(5): 637-646.
- Banga J., Praveen V., Singh V., Tripathi C.K.M. and Bihari V.** (2008) Studies on medium optimization for the production of antifungal and antibacterial antibiotics from a bioactive soil actinomycete. *Medicinal Chemistry Research* **17**: 425-436.
- Belkouri A., Es-sgaouri A., Aouadj R. and Dahchour A.** (2009) Action de certains pesticides sur la croissance du champignon *Ectomycorhi-Zien Pisolithus Tinc-Torius*. *Biomatec. Echo.* **3**(6): 26-30.
- Berdy J.** (2005) Bioactive microbial metabolites: a personal view. *J. Antibiot.* **58**(1):1-26.
- Bernal J. L., Jiménez J. J., Herguedas A., Atienza J.** (1997) Determination of chlorsulfuron and tribenuron methyl residues in agricultural soils. *J. Chromatogr. A* **778**: 119-125.
- Bordenave S., Fourçans A., Blanchard S., Goñi M. S., Caumette P. and Duran R.** (2004) Structure and functional analyses of bacterial communities changes in microbial mats following petroleum exposure. *Ophelia* **58**(3): 195-203.
- Bottaro M., Frascarolo P., Gosetti F., Mazzucco, E., Gianotti, V. Polati, S., Pollici, E., Piacentini, L., Pavese, G., Gennaro, M. C.** (2008) Hydrolytic and photoinduced degradation of tribenuron methyl studied by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **19**:1221-1229.
- Boughachiche F.** (2012) Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkhia. Thèse de Doctorat en Sciences en Biotechnologies microbiennes. Université Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algérie. 163 p.
- Braconi D., Bernardini G., Millucci L., Jacomelli G., Micheli V. and Santucci A.** (2011) *Saccharomyces Cerevisiae* as a Tool to Evaluate the Effects of Herbicides on Eukaryotic Life, Herbicides and Environment, Dr Andreas Kortekamp (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/13237. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides->

[and-environment/saccharomyces-cerevisiae-as-a-tool-to-evaluate-the-effects-of-herbicides-on-eukaryotic-life.](#)

Cavalla M. et Eberlin T. (1994) Isolement des streptomycètes du sol. *L'Opéron* **19**: 13-17.

Cesio V., Niell S., Pareja L., Fernandez G., Geis Asteggiante L., Bocking B., García C., Fernandez-alba A. R. and Heinzen H. (2011) Critical Revision and Development Perspectives of Herbicide Residues Analysis in Agro Ecosystems, Herbicides and Environment, Dr Andreas Kortekamp (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/13615. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/critical-revision-and-development-perspectives-of-herbicide-residues-analysis-in-agro-ecosystems>.

Chen X., Jiang Y., Li Q., Han L. and Jiang C. (2016) Molecular Phylogenetic Identification of Actinobacteria, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/62029. Available from: <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/molecular-phylogenetic-identification-of-actinobacteria>

Chèvre N. (2007) Estimation de l'écotoxicité des substances retrouvées dans le Léman. Rapport de la Commission Internationale pour la Protection des Eaux du Léman Contre la Pollution, pp 173-186.

Clark J. (2007) High Performance Liquid Chromatography – HPLC. <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html#top>

Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie CA-SFM (2013) Recommandations 2013. Document PDF, pp. 63. www.sfm-microbiologie.org

Couturier M., Haon M., Coutinho P. M., Lesage-Meessen L., Berrin J.-G., Henrissat B. (2011). *Podospora anserina* hemicellulases potentiate *Trichoderma reesei* secretome for the saccharification of lignocellulosic biomass. *Appl. Environm. Microbiol.* **77**(1) : 237-246. DOI: 10.1128/AEM.01761-10. <http://prodinra.inra.fr/record/38420>.

De Lima Procópio R. E., Da Silva I. R., Martins M. K., De Azevedo J. L., De Araújo J. M. (2012) Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis.* **16**(5): 466-471.

De Schrijver A., De Mot R. (1999) Degradation of pesticides by actinomycetes. *Crit. Rev. Microbiol.* **25**: 85-119.

- Devlin D. L., Peterson D. E., Regehr D. L.** (1992) Residual herbicides, degradation and recropping intervals. Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service. Kansas State University, pp 1-13.
- El-Hadary M. H. and Chung G.** (2013) Herbicides - A Double Edged Sword, Herbicides - Current Research and Case Studies in Use, Dr. Andrew Price (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/55957. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-current-research-and-case-studies-in-use/herbicides-a-double-edged-sword>.
- El Mrabet K. et Charlet P.** (2008) Les pesticides. Rapport du Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE), Paris, France. 15p.
- Farris M. H., Duffy C., Findlay R. H. and Olson J. B.** (2011) *Streptomyces scopuliridis* sp. nov., a bacteriocin producing soil streptomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 2112-2116.
- Filimon M. N., Popescu R., Borozan A. B., Bordean D. M., Dumitrescu G., Voia S. O.** (2012) Influence of xenobiotic substances on actinomycete communities in soil. *Anim. Sci. Biotech.* **45**(2): 221-224.
- Gause G. F., Preobrazhenskaya T. P., Sveshnikova M. A., Terekhova L. P., Maximova T. S.** (1983) A guide for the determination of actinomycetes. Genera *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, and *Chainia*. Nauka, Moscow, URSS.
- Gebreyohannes G., Moges F., Sahile S. and Raja N.** (2013) Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **3**(6): 426-435.
- Gesheva V., Ivanova V. and Gesheva R.** (2005) Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microb. Res.* **160**: 243-248.
- Gordon R. E. and Smith M. M.** (1953) Rapidly growing acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacteriol.* **66**: 41-48.
- Grasso L. L., Martino D. C. and Alduina R.** (2016) Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61525. Available from: <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and->

biotechnological-applications/production-of-antibacterial-compounds-from-actinomycetes.

- Gutmann L. et Williamson R.** (1987) Paroi bactérienne et bêta-lactamines. *Médecine/Sciences* **3**: 75-81.
- Hasani A., Kariminik A. and Issazadeh K.** (2014) Streptomyces: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. *Int. j. Adv. Biol. Biom. Res.* **2**(1): 63-75.
- Heuer H., Krsek M., Baker P., Smalla K. and Wellington E. M. H.** (1997) Analysis of Actinomycete Communities by Specific Amplification of Genes Encoding 16S rRNA and Gel-Electrophoretic Separation in Denaturing Gradients. *App. Environm. Microbiol.* **63**(8): 3233-3241.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J. et Williams S.T.** (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. Williams & Wilkins, USA, pp: 611-703.
- Hopwood D.A.** (2007) How do antibiotic-producing bacteria ensure their self-resistance before antibiotic biosynthesis incapacitates them ? *Mol. Microbiol.* **63**(4): 937-940.
- Hozzein W.N. and Goodfellow M.** (2008) *Nocardiosis arabia* sp. nov., a halotolerant actinomycete isolated from a sand-dune soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2520-2524.
- INPV (Institut National de la Protection des Végétaux)** (2010) Statistiques locales sur les pesticides utilisés en Algérie. Constantine, Algérie.
- Jeffrey L. S. H.** (2008) Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak. *Afric. J. biotech.* **7**(20): 3697-3702.
- Kampfer P.** (2006) The family *Streptomycetaceae*, part I: Taxonomy. *The prokaryotes*. Springer: 538-604.
- Kampfer P.** (2012) Order XIV. *Streptomycetales* ord. nov. In: Goodfellow M., Kampfer P., Busse H. J., Trujillo M. E., Susuki K. I., Ludwig W., Whitman W. B., Parte A. C. (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Second edition. Vol. 5. The *Actinobacteria*, part A. Springer, pp 1446-1804.
- Kitouni M.** (2007) Isolement de bactéries *Actinomycetales* productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et

caractérisation préliminaires des substances élaborées. Thèse de Doctorat d'État en Microbiologie Appliquée. Université Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algérie, 170 p.

Labeda D. P., Goodfellow M., Brown R., Ward A. C., Lanoot B., Vannanneyt M., Swings J., Kim S. B., Liu Z., Chun J., Tamura T., Oguchi A., Kikuchi T., Kikuchi H., Nishii T., Tsuji K., Yamaguchi Y., Tase A., Takahashi M., Sakane T., Suzuki K. I., Hatano K. (2012) Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *A. Van Leeuw.* **101**: 73-104.

Lane D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) *Nucleic Acids Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-147. John Wiley & Sons, Chichester.

Langenbach T. (2013) Persistence and Bioaccumulation of Persistent Organic Pollutants (POPs), *Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches*, Dr. Yogesh Patil (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/56418. Available from: <http://www.intechopen.com/books/applied-bioremediation-active-and-passive-approaches/persistence-and-bioaccumulation-of-persistent-organic-pollutants-pops>.

Lechevalier H. A. (2016) *Actinomycètes*. *Encyclopædia Universalis* (en ligne), consulté le 4 décembre 2016. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/actinomycetes/>.

Lee J. Y. and Hwang B. K. (2002) Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* **48**: 407-417.

Le Roes-Hill M. and Prins A. (2016) Biotechnological Potential of Oxidative Enzymes from Actinobacteria, *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61321. Available from: <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/biotechnological-potential-of-oxidative-enzymes-from-actinobacteria>

Li Q., Chen X., Jiang Y. and Jiang C. (2016a) Cultural, Physiological, and Biochemical Identification of Actinobacteria, *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61462. Available from: <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/cultural-physiological-and-biochemical-identification-of-actinobacteria>

- Li Q., Chen X., Jiang Y. and Jiang C.** (2016b) Morphological Identification of Actinobacteria, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61461. Available from: <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/morphological-identification-of-actinobacteria>
- Liu G., Chater K. F., Chandra G., Niu G. and Tan H.** (2013) Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**(1): 112-143.
- Loucif K.** (2011) Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de Magister en Microbiologie Appliquée et Biotechnologie Microbienne. Université Frères Mentouri, Constantine, Algérie, 102 p.
- Lubyté J. D., Antanaitis S. and Antanaitis A.** (2007) Decomposition of chlopiralid, tribenuron-methyl and pendimethalin in different organic substrates. *Ekologija* **53**(4): 77-83.
- Mackay S. J.** (1977) Improved enumeration of *Streptomyces spp.* on starch-casein salt medium. *Appl. Env. Microbiol.* **33**(2): 227-230.
- Marchesi J. R., Sato T., Weightman A. J., Martin T. A., Fry J. C., Hiom S. J. and Wade W. G.** (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 795-799.
- Martin H.** (2000) Classes de modes d'action des herbicides. Ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires Rurales, Ontario, Canada.
- Meleiro Porto A. L., Zelayarán Melgar G., Consiglio Kasemodel M. and Nitschke M.** (2011) Biodegradation of Pesticides, Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management, Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/17686. Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-pesticides-use-and-management/biodegradation-of-pesticides>.
- Meyers P. R., Goodwin C. M., Bennett J. A., Aken B. L., Price C. E., Van Rooyen J. M.** (2004) *Streptomyces africanus* sp. nov., a novel streptomycete with blue aerial mycelium. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* **54**: 1531-1535.

- Myadoh S., Tsuchizaki N., Ishikawa J., Hotta K.** (2002) Digital Atlas of Actinomycetes. www.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas. The Society of Actinomycetes, Tokyo, Japan.
- Nedjraoui D.** (2001) Profil Fourrager de l'Algérie. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). <http://www.fao.org/AG/AGP/agpc/doc/counprof/Algeria/Algerie.htm>.
- Ouhdouch Y., Barakate M. and Finance C.** (2001) Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* **37**: 69-74.
- Oskay M.** (2009) Comparison of *Streptomyces* diversity between agricultural and non-agricultural soils by using various culture media. *Sci. Res. Essays.* **4**(10): 997-1005.
- Özkara A., Akyil D. and Konuk M.** (2016) Pesticides, Environmental Pollution, and Health, Environmental Health Risk - Hazardous Factors to Living Species, Dr. Marcelo Larramendy (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/63094. Available from: <http://www.intechopen.com/books/environmental-health-risk-hazardous-factors-to-living-species/pesticides-environmental-pollution-and-health>.
- Pacanoski Z.** (2015) Herbicides and Adjuvants, Herbicides, Physiology of Action, and Safety, Dr. Andrew Price (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/60842. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-physiology-of-action-and-safety/herbicides-and-adjuvants>.
- Pamboukian C. R. D., Guimarães L. M., Facciotti M. C. R.** (2002) Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Braz. J. Microbiol.* **33**: 17-21.
- Pepper I. L. and Gerba C. P.** (2004) Environmental microbiology. A Laboratory Manual. Second Edition. Elsevier Academic Press, London, UK, pp. 37-49.
- Perschbacher P. W., Edziye R. and Ludwig G. M.** (2012) Row Crop Herbicide Drift Effects on Water Bodies and Aquaculture, Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds, Dr. Mohammed Nagib Hasaneen (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/31274. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-of-weeds/row-crop-herbicide-drift-effects-on-water-bodies-and-aquaculture>.

- Preobrazhenskaya T. P. and Ryabova I. D.** (1957) *In: Gauze G. F., Preobrazhenskaya T. P., Kudrina E. S., Blinov N. O., Ryabova I. D., Sveshnikova M. A. (editors): Problems of classification of actinomycetes-antagonists. Government Publishing House of Medical Literature, Medgiz, Moscow, USSR, pp. 1-398.*
- Pridham T. G., Hasseltine C. W., Benedict R. G.** (1958) A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups: placement of strains in morphological sections. *Appl. Microbiol.* **6**: 52-79.
- Radivojević L., Jovičić D., Šantrić L., Gašić S., Umiljendić Gajić J.** (2014) Effects of metsulfuron-methyl on soil microbial activity. *Archives for Technical Sciences* **11**(1): 77-82.
- Rao V. S.** (2000) Degradation of sulfonylurea herbicides. *Principles of Weed Science*, Second Edition, pp. 269-270.
- Rehan M., Swanson E. and Tisa L. S.** (2016) *Frankia* as a Biodegrading Agent, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61825. Available from: <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/frankia-as-a-biodegrading-agent>.
- Roberts T. R., Hutson D. H.** (1998) Metabolic pathways of agrochemicals herbicides and plant growth regulators, part one. *The Royal Society of Chemistry*, pp 570-575.
- Saitou N. and Nei M.** (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- Sanchez S., Chavez A., Forero A., Garcia-Huante Y., Romero A., Sanchez M., Rocha D., Sanchez B., Avalos M., Guzman-Trampe S., Rodriguez-Sanoja R., Langley E. and Ruiz B.** (2010) Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiot.* **63**: 442-459.
- Sanders M. E.** (2008) Probiotics: Definition, Sources, Selection and Uses. *Clin. Infect. Dis.* **46**(2): 58-61.
- Sandín-España P., Loureiro I., Escorial C., Chueca C. and Santín-Montanya I.** (2011) The Bioassay Technique in the Study of the Herbicide Effects, Herbicides, Theory and

- Applications, Prof. Marcelo Larramendy (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/13571. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-theory-and-applications/the-bioassay-technique-in-the-study-of-the-herbicide-effects>.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.
- Sette L. D., De Oliveira V. M., Manfio G. P.** (2005) Isolation and characterization of alachlor-degrading actinomycetes from soil. *A. Van Leeuw.* **87**: 81-89.
- Sharma H. and Parihar L.** (2010) Antifungal activity of extracts obtained from actinomycetes. *J. Yeast and Fungal Res.* **1**(10): 197-200.
- Sherwani S. I., Arif I. A. and Khan H. A.** (2015) Modes of Action of Different Classes of Herbicides, Herbicides, Physiology of Action, and Safety, Dr. Andrew Price (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61779. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-physiology-of-action-and-safety/modes-of-action-of-different-classes-of-herbicides>.
- Shirling E. B. and Gottlieb D.** (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**(3): 313-340.
- Sivakumar K.** (2001) Actinomycetes. Centre of Advanced Study in Marine Biology Annamalai University. pp. 197-204.
- Taddei A., Rodriguez M. J., Marquez-Vilchez E., Castelli C.** (2006) Isolation and identification of *Streptomyces* spp. From Venezuelan soils: Morphological and biochemical studies. I. *Microbiol. Res.* **16**(1): 222-231.
- Tanji A.** (2000) Désherbage du blé et de l'orge. *Transfert de Technologie en Agriculture* **74**: 3-4.
- Tendler M. D. and Burkholder P. R.** (1961) Studies on the thermophilic actinomycetes. I. Methods of cultivation. *Appl. Microbiol.* **9**: 394-399.
- Tortorano A. M., Cabrini E. et Viviani M. A.** (1979) Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes CMI en gélose et méthode des disques. *Bull. Soc. Myc. Med.* **8**: 69-74.

- Tresner H. D., Davies M. C. and Backus E. J.** (1961) Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J. Bacteriol.* **81**:70-80.
- Voltz M. (Coordinateur), Alix A., Barriuso Benito E., Bedos C., Bonicelli B., Caquet T., Dubus I., Gascuel C., Gril J.-J.** (2005) Devenir et transfert des pesticides dans l'environnement et impacts biologiques. In: *Pesticides, agriculture et environnement. Réduire l'utilisation des pesticides et en limiter les impacts environnementaux.* p. 219 INRA, Paris. <http://prodinra.inra.fr/record/12401>.
- Wang N. X., Tang Q., Ai G. M., Wang Y. N., Wang B. J., Zhao Z. P. and Liu S. J.** (2012) Biodegradation of tribenuron methyl that is mediated by microbial acidohydrolysis at cell-soil interface. *Chemosphere* **86**(11): 1098-1105.
- Wang Y. and Jiang Y.** (2016) Chemotaxonomy of Actinobacteria, Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, Dr. Dharumadurai Dhanasekaran (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/61482. Available from: <http://www.intechopen.com/books/actinobacteria-basics-and-biotechnological-applications/chemotaxonomy-of-actinobacteria>.
- Widehem P., Aït-Aïssa S., Tixier C., Sancelme M., Veschambre H., Truffaut N.** (2002) Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2. *Chemosphere* **46**:527-534.
- Williams S.T. and Cross T.** (1971) Actinomycetes. In : Methods in microbiology. Academic Press, London, pp. 295-334.
- Williams S. T., Goodfellow M. and Alderson G.** (1989) Genus *Streptomyces*, dans : Williams S.T., Sharpe M.E. et Holt J.H. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (volume 4). Williams & Wilkins, USA, pp. 2452-2492.
- Williams S. T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E. M. H., Sneath P. H. A. and Sackin M. J.** (1983) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
- Wink J.** (2001) The *Actinomycetales* : An Order in the Class of *Actinobacteria* Important to the Pharmaceutical Industry. Electronic Manual, Frankfurt Höchst.
- Xu L. H., Li Q. R. and Jiang C. L.** (1996) Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 244-248.

- Zabaloy M. C., Zanini G. P., Bianchinotti V., Gomez M. A. and Garland J. L.** (2011) Herbicides in the Soil Environment: Linkage between Bioavailability and Microbial Ecology, *Herbicides, Theory and Applications*, Prof. Marcelo Larramendy (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/12880. Available from: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-theory-and-applications/herbicides-in-the-soil-environment-linkage-between-bioavailability-and-microbial-ecology>.
- Zain N. M. M., Mohamad R. B., Sijam K., Morshed M. M. and Awang Y.** (2013) Effect of selected herbicides *in vitro* and in soil on growth and development of soil fungi from oil palm plantation. *Int. J. Agric. Biol.* **15**: 820–826.
- Zanardini E., Arnoldi A., Boschin G., D'Agostina A., Negri M., Sorlini C.** (2002) Degradation pathways of chlorsulfuron and metsulfuron methyl by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Ann. Microbiol.* **52**: 25-37.
- Zerizer H.** (2014) Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. Thèse de Doctorat en Sciences en Biochimie et Microbiologie appliquées. Université Frères Mentouri Constantine 1, Constantine, Algérie. 217p.
- Zhang J. J., Chen Y. F., Fang T. and Zhou N. Y.** (2013) Co-metabolic degradation of tribenuron methyl, a sulfonylurea herbicide, by *Pseudomonas* sp. strain NyZ42. *Int. Biodeter. Biodegr.* **76**: 36-40.
- Zhang X., Clark C. A. and Pettis G. S.** (2003) Inter-strain Inhibition in the Sweet Potato Pathogen *Streptomyces ipomoeae*: Purification and Characterization of a Highly Specific Bacteriocin and Cloning of Its Structural Gene. *App. Environm. Microbiol.* **69** (4): 2201–2208.
- Zhao W., Xu L., Li D., Li X., Wang C., Zheng M., Pan C. and Qiu L.** (2015) Biodegradation of thifensulfuron-methyl by *Ochrobactrum* sp. in liquid medium and soil. *Biotechnol. Lett.* **37**:1385-1392.

Annexes

Annexe 1. Milieux de culture et solutions

Milieu Bennett		Solution d'oligo-éléments ²	1 ml
		Agar	20 g
Extrait de levure	2 g	Eau distillée	1 l
Extrait de viande	1 g	pH 7,0 -7,4	
Peptone	2 g		
Glucose	10 g	Milieu ISP5	
Agar	20 g	Glycérol	10 g
Eau distillée	1 l	L-asparagine	1 g
pH 7,3		K ₂ HPO ₄	1 g
Milieu amidon-caséine		Solution d'oligo-éléments ²	1 ml
		Agar	20 g
Amidon soluble	10 g	Eau distillée	1 l
Caséine	1 g	pH 7,0 -7,4	
K ₂ HPO ₄	0,5 g		
Agar	20 g	Milieu ISP6	
Eau distillée	1 l	Peptone	15 g
pH 7,0 - 7,5		Protéose peptone	5 g
Milieu ISP1		Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
		Thiosulfate de sodium	0,08 g
Tryptone	5 g	Extrait de levure	1 g
Extrait de levure	3 g	K ₂ HPO ₄	1 g
Eau distillée	1 l	Agar	20 g
pH 7,0 - 7,2		Eau distillée	1 l
		pH 7,0 -7,2	
Milieu ISP2		Milieu ISP7	
		Glycérol	15 g
Extrait de levure	4 g	L-asparagine	1 g
Extrait de malt	10 g	K ₂ HPO ₄	0,5 g
Glucose	4 g	NaCl	0,5 g
Agar	20 g	FeSO ₄ 7.H ₂ O	0,01 g
Eau distillée	1 l	Agar	20 g
pH 7,3		Eau distillée	1 l
		pH 7,2 -7,4	
Milieu ISP3		Milieu ISP9	
		KH ₂ PO ₄	2,38 g
Solution d'avoine ¹	1 l	K ₂ HPO ₄	5,65 g
Solution d'oligo- éléments ²	1 ml	MgSO ₄ 7.H ₂ O	1 g
Agar	20 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
pH 7,2		Solution d'oligo-éléments ³	1 ml
		Eau distillée	1 l
Milieu ISP4		pH 6,8 -7,0	
Amidon soluble	10 g		
NaCl	1 g		
CaCO ₃	2 g		
K ₂ HPO ₄	1 g		
MgSO ₄ 7.H ₂ O	1 g		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g		

Milieu glucose- asparagine

Glucose	10 g
L-asparagine	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 l
pH 6,8	

Gélose nutritive

Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	5 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 l
pH 7,0	

Milieu Mueller-Hinton

Extrait de viande	2 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 l
pH 7,0	

Gélose Sabouraud

Peptone	10 g
Glucose	40 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 l
pH 7,0	

Gélose SC

Glycerol	30 g
Saccharose	30 g
NaNO ₃	2 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
KCl	0,5 g
L-asparagine	0,5 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,01 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 l
pH 7,0	

Gélose GBA

Amidon	20 g
--------	------

Glycerol	20 g
Peptone	10 g
Extrait de viande	5 g
CaCO ₃	3 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 l
pH 7,0	

Gélose AF

Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	2 g
NaCl	2,5 g
CaCO ₃	1 g
Agar	20 g
Eau distillée	1 l
pH 7,0	

Bouillon Luria – Bertani (Lysogeny Broth) (LB)

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	10 g
Eau distillée	1 l

1 Solution d'avoine

Grains d'avoine	20 g
Eau distillée	1 l
Faire bouillir pendant 20 min	
Filtrer sur gaze et réajuster le volume à 1 l	

2 Solution d'oligo-éléments

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g
Eau distillée	0,1 l

3 Solution d'oligo-éléments

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,11 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,79 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,15 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,64 g
Eau distillée	0,1 l

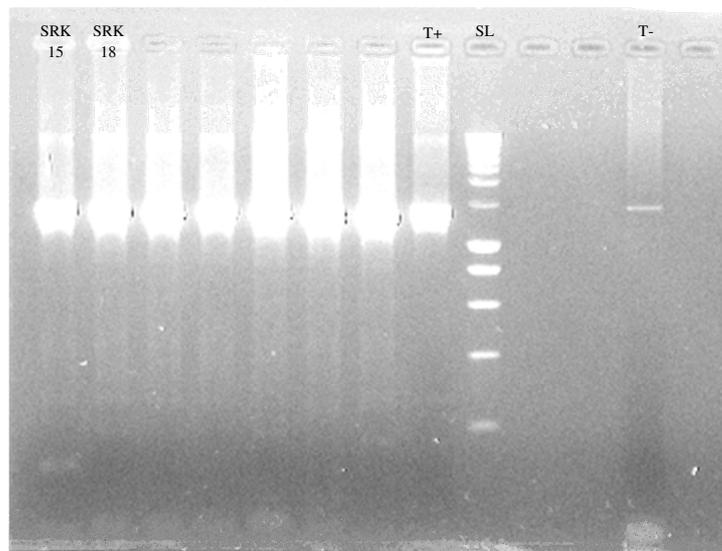
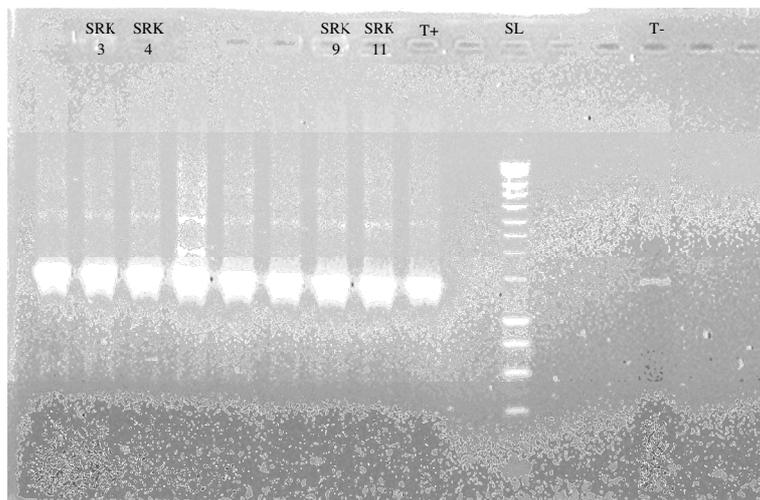
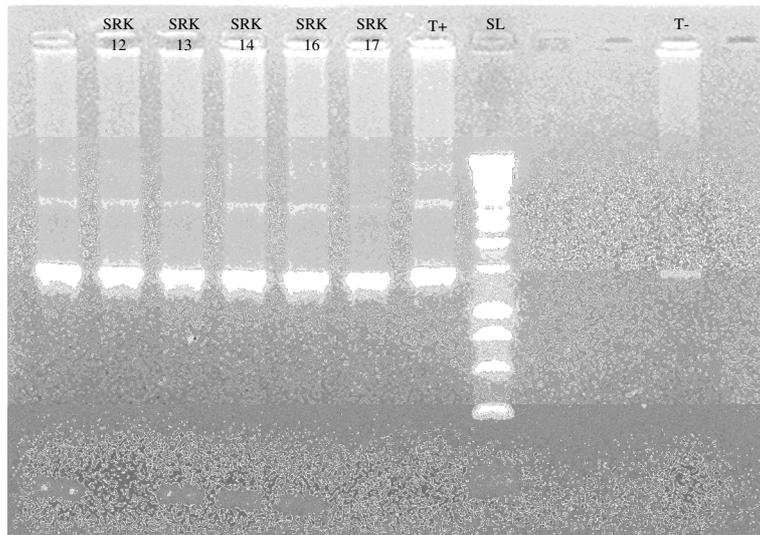
Standard McFarland 0,5

BaCl ₂ .2H ₂ O (1%)	0,6 ml
H ₂ SO ₄ (1%)	99,4 ml

À conserver à température ambiante et à l'obscurité jusqu'à 6 mois.

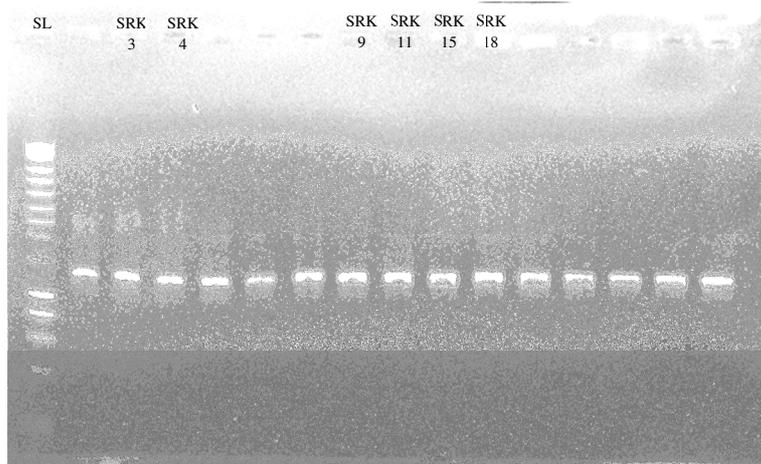
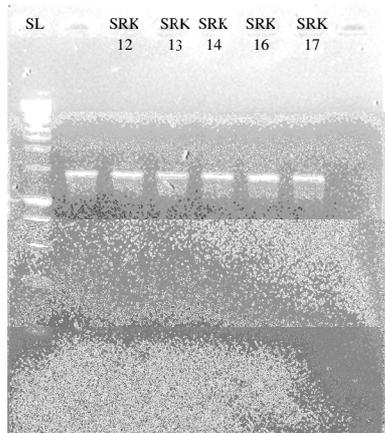
Solution de chlorure de mercure

HgCl ₂	15 g
HCl concentré	20 ml
Eau distillée	100 ml

Annexe 2. Résultats de l'électrophorèse des produits de la PCR sur gel d'agarose.

T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif ; SL : smart ladder

Annexe 3. Résultats de l'électrophorèse des fragments d'ADNr 16S purifiés sur gel d'agarose

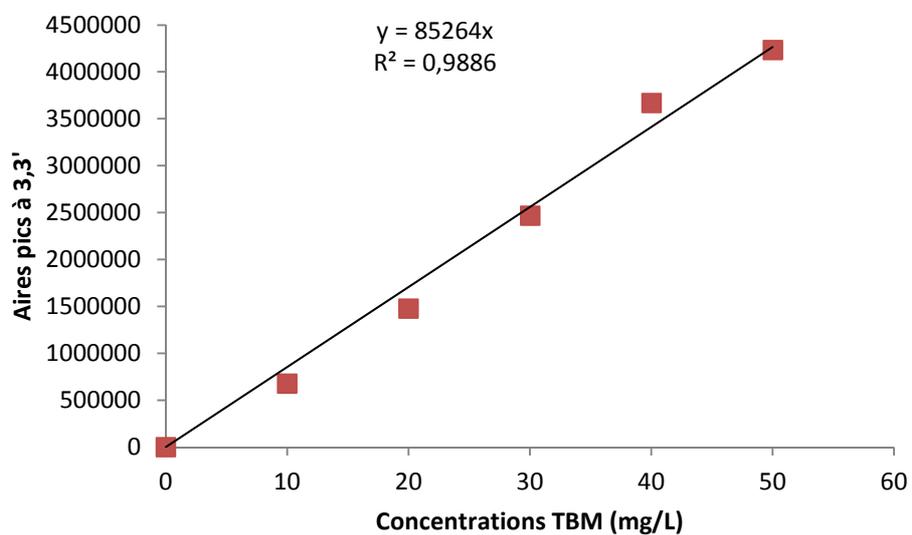


SL : smart ladder

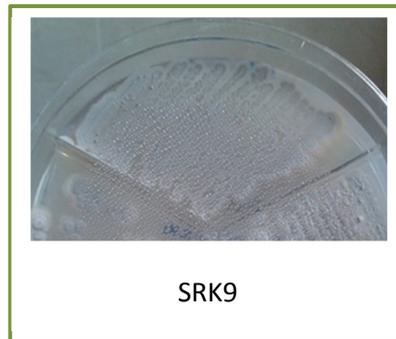
Annexe 4. Courbe étalon du TBM

Moyennes des aires des pics du
TBM à RT=3,3'

Concentrations TBM (mg/L)	Aires pic à 3,3'
0	0
10	679093,667
20	1475959,67
30	2467976
40	3670998,5
50	4235286,5



Annexe 5. Photographies des dix souches d'actinobactéries étudiées sur gélose amidon-caséine



Résumés

Résumé

Granstar[®] 75 DF est l'un des herbicides sulfonylurée les plus utilisés sur les cultures céréalières. Il contient 75% de tribenuron-méthyle (TBM). L'évaluation des changements sur le microbiote du sol, en particulier sur les groupes bactériens les plus abondants, est une approche utile pour déterminer l'impact de l'herbicide Granstar[®]. Dans ce cadre, le groupe des actinobactéries est choisi. En utilisant un milieu sélectif, quarante-deux (42) souches sont isolées à partir de sols non traités et traités par le Granstar[®]. Le nombre d'isolats obtenu du sol agricole traité est inférieur à celui isolé du sol non traité correspondant, ce qui suggère un effet négatif de l'herbicide sur cette communauté de bactéries. Parmi les isolats, onze (11) souches résistantes, tolèrent des doses élevées du Granstar[®] allant de 0,3 à 0,6% (v/v). La caractérisation morphologique des souches indique leur appartenance au genre *Streptomyces*. L'analyse phylogénétique, basée sur le séquençage des gènes de l'ARNr 16S, confirme cela et regroupe cinq souches (SRK3, SRK4, SRK9, SRK11 et SRK18) à *Streptomyces rubrocyano-diastaticus* sp. *Piger*, avec des taux de bootstrap élevés variant de 69 à 98%. Alors que SRK13 et SRK14 sont étroitement liées à *Streptomyces lavendulocolor* et SRK17 à *Streptomyces africanus*, avec de fortes valeurs de bootstrap de 92; 89 et 76% respectivement. Les souches SRK12 et SRK16 sont associées à quatre souches-types de *Streptomyces* (*S. vinaceusdrappus*, *S. mutabilis*, *S. ghanaensis* et *S. enissocaesilis*) avec 70% de bootstrap. La souche SRK15 est apparentée à *Streptomyces diastaticus* sp. *Ardesiacus* avec un niveau de bootstrap élevé de 92%. Les deux souches les plus résistantes SRK12 et SRK17 ne se développent pas sur le TBM comme seule source de carbone, elles sont donc incapables de le dégrader dans ces conditions. Cependant, en présence du glucose, les deux tolèrent sa présence, mais leur croissance est affectée, comparée à celle sur le glucose, utilisé seul. À pH final de 6,78-6,79, le TBM est déjà majoritairement et chimiquement dégradé à hauteur de 76,18% en moyenne. En diminuant le pH à 6,72-6,73, le taux de dissipation du TBM augmente fortement et significativement vers une moyenne de 89.36%. Par ailleurs, à des valeurs plus acides de 4,38 et 4,23 ; obtenues avec une composition de milieu similaire additionnée de glucose, la disparition du TBM est encore améliorée de 2,26 et 5.56% respectivement avec les souches SRK12 et SRK17. Par conséquent, plus le pH diminue, plus le TBM est dégradé par hydrolyse acide. Dans tous les tests menés, au fur et à mesure que le TBM disparaît, deux composés apparaissent dans le milieu et ne semblent pas être affectés par l'acidité. Sur la base de ces observations, il est suggéré que l'hydrolyse acide de l'herbicide peut être la conséquence d'un processus co-métabolique, due à l'activité bactérienne sur un autre substrat carboné facilement métabolisable. Un tel processus serait intéressant à considérer dans la bioremédiation de sols alcalins pollués par le TBM. Les produits de la transformation du TBM ne sont dégradés ni chimiquement, ni par les souches étudiées et présentent un effet négatif sur la croissance de celles-ci. Ce constat suscite plus d'investigations sur ces composés, notamment leur identification et la détermination de leur devenir dans le sol.

Mots-clés : *Streptomyces*, Tribenuron méthyle, Résistance, Hydrolyse acide, Co-métabolisme, ARNr 16S.

ملخص

Granstar® 75 د ف هو واحد من مبيدات الأعشاب سولفونيلوريا الأكثر استخداما على محاصيل الحبوب. يحتوي على 75٪ من tribenuron-الميثيل (TBM). تقييم التغييرات على جراثيم التربة، وخاصة على المجموعات البكتيرية الأكثر وفرة، سيكون نهجا مفيدا لتحديد تأثير Granstar®. لهذا الغرض، قمنا بتحليل مجموعة الاكتينوبكتيريا المعروفة لوفرتها و مقاومتها للمواد الكيميائية. باستخدام اوساط انتقائية خاصة بالاكتينوبكتيريا ، تم عزل (42) سلالة من ترب دون علاج واخرى معالجة بمبيد Granstar®. كان عدد السلالات المعزولة من التربة الزراعية المعالجة 2 أقل من التي عزلت من التربة 2 غير المعالجة، مما يشير إلى الأثر السلبي لمبيد الأعشاب Granstar® على هذا النوع البكتيري. من بين العزلات، أحد عشر (11) سلالات مقاومة، تحمل جرعات عالية من Granstar® تتراوح بين 0.3 و 0.6٪، تم اختيارها. وأشار التوصيف المورفولوجي للسلالات انتمائهم إلى جنس *Streptomyces*. التحليل الفيلوجيني، استنادا إلى التسلسل الجيني لل S16 ARNr ، مكن من تجميع خمس سلالات (*Streptomyces* SRK3، SRK4، SRK9، SRK11 و SRK18) إلى سلالة *Streptomyces rubrocyano-diastaticus* sp. *piger* ، مع معدلات عالية التمهيد متفاوتة 69-98٪. في حين SRK13 و SRK14 ترتبط ارتباطا وثيقا بـ *S. lavendulocolor* و SRK17 بـ *S. africanus*، مع قيم تمهيد عالية من 92، 89 و 76٪ على التوالي. ارتبطت السلالتين SRK12 و SRK16 إلى أربعة سلالات من النوع *Streptomyces* (*S. vinaceusdrappus*، *S. mutabilis*، *S. ghanaensis* و *S. enissocaesilis*) مع نسبة 70٪ من التمهيد. وترتبط سلالة SRK15 بـ *sp. ardesiacus* و *S. diastaticus* مع مستوى عال من التمهيد 92٪. كانت السلالتين الأكثر مقاومة SRK12 و SRK17 غير قادرة على النمو فوق TBM كمصدر وحيد للكربون، لذلك هما غير قادرتين على تحليله في ظل هذه الظروف. في وجود الجلوكوز، كلتاها، قاومت TBM و لكن تأثر نموها بالمقارنة مع الجلوكوز كمصدر وحيد للكربون. في درجة حموضة نهائية 6.78-6.79، وصل تحليل الـ TBM كيميائيا إلى 76.18٪. في خفض درجة الحموضة إلى 6.72-6.73، لوحظت زيادة في معدل التبيد بقوة وبشكل كبير إلى معدل 89.36٪. وعلاوة على ذلك، في قيم أكثر حموضة 4.38 و 4.23 تم الحصول عليها مع وسط مماثل فيه الجلوكوز، تم تحسين اختفاء TBM بنسبة 2.26 و 5.56٪ مع السلالتين SRK12 و SRK17 على التوالي. ولذلك، فإن انخفاض الرقم الهيدروجيني، يسمح بتدهور الـ TBM من خلال التحلل الحمضي. في جميع الاختبارات التي أجريت، لما كان الـ TBM يختفي، كان يظهر مركبين في الوسط لا يبدو يتأثران بالحموضة. وبناء على هذه الملاحظات، يقترح أن تحلل هذا مبيد الأعشاب قد يكون نتيجة لعملية التمثيل الغذائي المشترك، ويرجع ذلك إلى النشاط البكتيري على مواد اخرى سهلة التحليل. ومن شأن هذه العملية أن تستعمل في المعالجة البيولوجية للترب القلوية الملوثة بالـ TBM. منتجات التحول الاوول لـ TBM لا تهدم لا كيميائيا و لا عن طريق السلالات المدروسة ولها تأثير سلبي على نمو هذه البكتيريا. هذا الاكتشاف يثير مزيدا من التحقيق في هذه المركبات، بما في ذلك تحديد بنيتها الكيميائية وتحديد مصيرها في التربة.

كلمات مفتاحية: *Streptomyces*، tribenuron الميثيل، مقاومة، تحليل حمضي، الأيض المشترك، جينات S16 ARNr.

Abstract

Granstar[®] 75 DF is one of the most used sulfonylurea herbicide on cereal crops; it contains 75 % of tribenuron-methyl (TBM). Assessing the changes on soil microbiota, particularly on the most abundant bacterial groups, will be a useful approach to determine the impact of Granstar[®] herbicide. For this purpose, *Actinobacteria* were analysed. They are known for their abundance and aptitude to resist to xenobiotic substances. Using a selective medium for *Actinobacteria*, forty two (42) strains were isolated from both untreated and Granstar[®] treated soils. The number of isolates recovered from the treated agricultural soil 2 was fewer than that isolated from the corresponding untreated soil, suggesting a negative effect of Granstar[®] herbicide on *Actinobacteria* community. Among the isolates, eleven (11) resistant strains, tolerating high doses of Granstar[®] ranging from 0.3 to 0.6% (v/v), were selected. Morphological characterization of strains indicated their affiliation to *Streptomyces* genus. The phylogenetic analysis, based on 16S rRNA genes sequencing, clustered five strains (SRK3, SRK4, SRK9, SRK11 and SRK18) to *Streptomyces rubrocyano-diastaticus* sp. *piger* type strain, with high bootstrap rates varying from 69 to 98%. While SRK13 and SRK14 were closely related to *Streptomyces lavendulocolor* and SRK17 to *Streptomyces africanus*, with high bootstrap values of 92; 89 and 76% respectively. SRK12 and SRK16 strains were associated to four *Streptomyces* type strains (*S. vinaceusdrappus*, *S. mutabilis*, *S. ghanaensis* and *S. enissocaesilis*) with a percentage of 70% of bootstrap. Strain SRK15 was related to *Streptomyces diastaticus* sp. *ardesiacus* with high bootstrap level of 92%. The two most resistant strains SRK12 and SRK17 did not grow on TBM as the sole carbon source, so they were incapable of degrading it under these conditions. However, in the presence of glucose, both tolerated its presence, but their growth was affected, compared to that on glucose, used alone. At the final pH of 6.78-6.79, the TBM was already predominantly and chemically degraded to an average rate of 76.18%. By decreasing the pH to 6.72-6.73, the TBM dissipation increased significantly to an average of 89.36%. Furthermore, at lower acid values of 4.38 and 4.23; obtained with a similar medium composition supplemented with glucose, the disappearance of the TBM was further improved by 2.26 and 5.56% respectively with the strains SRK12 and SRK17. Therefore, as the pH decreased, the TBM was more degraded probably by acid hydrolysis. In all the tests carried out, as the TBM disappeared, two compounds appeared in the medium and seemed to do not be affected by the acidity. On the basis of these observations, it was suggested that the acid hydrolysis of the herbicide may be the result of a co-metabolic process, due to the bacterial activity on another easily metabolizable substrate. Such a process would be interesting to consider in the bioremediation of alkaline soils polluted by TBM. The products of the TBM transformation were not degraded chemically nor by the studied strains and had a negative effect on the growth of these strains. This observation led to the need of more investigations on these compounds, in particular their identification and the determination of their fate in the soil.

Keywords: *Streptomyces*, Tribenuron methyl, Resistance, Acido-hydrolysis, Co-metabolism, 16S rRNA genes.

RACHEDI Kounouz
Thèse de Doctorat en Sciences
Biotechnologies et Génie-microbiologique

Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Effet de l'herbicide sulfonylurée tribenuron-méthyle sur la croissance de souches telluriques d'actinobactéries. Caractérisation des isolats résistants et tests de dégradabilité.

Résumé

Le Granstar[®] 75 DF est l'un des herbicides sulfonylurée les plus utilisés sur les cultures céréalières. Il contient 75% de tribenuron-méthyle (TBM). L'évaluation des changements sur le microbiote du sol, en particulier sur les groupes bactériens les plus abondants, est une approche utile pour déterminer l'impact de l'herbicide Granstar[®]. Dans ce cadre, le groupe des actinobactéries est choisi. En utilisant un milieu sélectif, quarante-deux (42) souches sont isolées à partir de sols non traités et traités par le Granstar[®]. Le nombre d'isolats obtenu du sol agricole traité 2 est inférieur à celui isolé du sol non traité correspondant, ce qui suggère un effet négatif de l'herbicide sur cette communauté de bactéries. Parmi les isolats, onze (11) souches résistantes, tolèrent des doses élevées du Granstar[®] allant de 0,3 à 0,6% (v/v). La caractérisation morphologique des souches indique leur appartenance au genre *Streptomyces*. L'analyse phylogénétique, basée sur le séquençage des gènes de l'ARNr 16S, confirme cela et regroupe cinq souches (SRK3, SRK4, SRK9, SRK11 et SRK18) à *Streptomyces rubrocyano-diastaticus* sp. Piger, avec des taux de bootstrap élevés variant de 69 à 98%. Alors que SRK13 et SRK14 sont étroitement liées à *Streptomyces lavendulocolor* et SRK17 à *Streptomyces africanus*, avec de fortes valeurs de bootstrap de 92; 89 et 76% respectivement. Les souches SRK12 et SRK16 sont associées à quatre souches-types de *Streptomyces* (*S. vinaceusdrappus*, *S. mutabilis*, *S. ghanaensis* et *S. enissocaesilis*) avec 70% de bootstrap. La souche SRK15 est apparentée à *Streptomyces diastaticus* sp. *Ardesiacus* avec un niveau de bootstrap élevé de 92%. Les deux souches les plus résistantes SRK12 et SRK17 ne se développent pas sur le TBM comme seule source de carbone, elles sont donc incapables de le dégrader dans ces conditions. Cependant, en présence du glucose, les deux tolèrent sa présence, mais leur croissance est affectée, comparée à celle sur le glucose, utilisé seul. À pH final de 6,78-6,79, le TBM est déjà majoritairement et chimiquement dégradé à hauteur de 76,18% en moyenne. En diminuant le pH à 6,72-6,73, le taux de dissipation du TBM augmente fortement et significativement vers une moyenne de 89.36%. Par ailleurs, à des valeurs plus acides de 4,38 et 4,23 ; obtenues avec une composition de milieu similaire additionnée de glucose, la disparition du TBM est encore améliorée de 2,26 et 5.56% respectivement avec les souches SRK12 et SRK17. Par conséquent, plus le pH diminue, plus le TBM est dégradé par hydrolyse acide. Dans tous les tests menés, au fur et à mesure que le TBM disparaît, deux composés apparaissent dans le milieu et ne semblent pas être affectés par l'acidité. Sur la base de ces observations, il est suggéré que l'hydrolyse acide de l'herbicide peut être la conséquence d'un processus co-métabolique, due à l'activité bactérienne sur un autre substrat carboné facilement métabolisable. Un tel processus serait intéressant à considérer dans la bioremédiation de sols alcalins pollués par le TBM. Les produits de la transformation du TBM ne sont dégradés ni chimiquement, ni par les souches étudiées et présentent un effet négatif sur la croissance de celles-ci. Ce constat suscite plus d'investigations sur ces composés, notamment leur identification et la détermination de leur devenir dans le sol.

Mots-clés : *Streptomyces*, Tribenuron méthyle, Résistance, Hydrolyse acide, Co-métabolisme, ARNr 16S.