

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Ecole Nationale Polytechnique d'Alger



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'Environnement

**Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention
du diplôme d'ingénieur d'état en Génie de
l'Environnement**

Intitulé du thème :

**Isolement et identification de souches microbiennes
capables de dégrader la cyperméthrine.**

Présenté et soutenu publiquement le 01/10/2022 par :

M^{lle} Yousra LASMI

Composition de Jury :

Président : M. Nabil MAMERI

Professeur (ENP)

Promoteur : Mme Rym SALAH

Maître de Conférences A (ENP)

Examineur : Mme Sadjia AROUA

Maître de Conférences B (ENP)

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Polytechnique d'Alger



المدرسة الوطنية المتعددة التقنيات
Ecole Nationale Polytechnique

Département de Génie de l'Environnement
Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention
du diplôme d'ingénieur d'état en Génie de
l'Environnement

Intitulé du thème:

Isolement et identification de souches microbiennes
capables de dégrader la cyperméthrine.

Présenté et soutenu publiquement le 01/10/2022 par :

M^{lle} Yousra LASMI

Composition de Jury :

Président : M. Nabil MAMERI

Professeur (ENP)

Promoteur : Mme Rym SALAH

Maître de Conférences A (ENP)

Examineur : Mme Sadjia AROUA

Maître de Conférences B (ENP)

ملخص

السايرمثرين مبيد حشري ينتمي إلى عائلة البيريثرويد من النوع الثاني. نظرا لطبيعتها العضوية و كونها سامة للكائنات غير المستهدفة ، تعد المعالجة البيولوجية طريقة واعدة للقضاء عليها. كجزء من هذا العمل ، تم إجراء عزل واختيار السلالات الميكروبية القادرة على تفكيك السايرمثرين من الحمأة المنشطة. بما أن السايرمثرين تتكون من الكربون والنيتروجين ، فقد تم إجراء اختبارين لعزل البكتيريا التي تستخدمها كمصدر وحيد للكربون وتلك التي تستخدمه كمصدر وحيد للنيتروجين. تجرى الاختبارات في درجة حرارة الغرفة مع التحريك اللطيف. في النهاية تم الحصول على 19 عزلة نقية منها 2 عزلة تستخدمها كمصدر وحيد للنيتروجين و 8 عزلة تستخدمها كمصدر وحيد للكربون. من بين البكتيريا المكتشفة سلالة *Micrococcus* sp. التي تستخدمها كمصدر وحيد للكربون و سلالة *Rhodococcus* sp. التي تستخدمها كمصدر وحيد للنيتروجين.

الكلمات المفتاحية: اختيار السلالات الميكروبية، البكتيريا، تحلل حيوي ، سايرمثرين ، مبيدات .

Abstract: Cypermethrin is a pesticide belonging to the type II pyrethroid family. Due to its toxicity on non-target organisms, and its organic nature, bioremediation is a promising method to eliminate it. This aim of this work is isolation and selection of microbial strains, capable of degrading cypermethrin, from activated sludge. As cypermethrin consists of carbon and nitrogen, two trials were carried out to isolate bacteria using it as the sole carbon source and those using it as the sole nitrogen source. The trials were carried out at room temperature under gentle stirring. 19 purified isolates were obtained, including 2 using the pesticide as the sole nitrogen source and 8 using it as the sole carbon source. Among the bacteria found were: a *Rhodococcus* sp. strain using it as the sole nitrogen source and strains belonging to the genus *Micrococcus* using it as the sole carbon source.

Keywords: bacteria, biodegradation, cypermethrin, pesticide, selection.

Résumé : La cyperméthrine est un pesticide appartenant à la famille des pyréthrinoides de type II. La toxicité de ce pesticide envers les organismes non-ciblés, et sa nature organique, font que la bioremédiation soit une méthode prometteuse pour l'éliminer. Dans le cadre de ce travail, un isolement et une sélection de souches microbiennes capables de dégrader la cyperméthrine ont été entrepris à partir de boues activées. La cyperméthrine étant constituée de carbone et d'azote, deux essais ont été réalisés afin d'isoler les bactéries l'utilisant comme seule source de carbone et celles l'utilisant comme seule source d'azote. Les essais ont été réalisés à température ambiante sous faible agitation. 19 isolats purifiés ont été obtenus, dont 2 utilisant le pesticide comme unique source d'azote et 8 l'utilisant comme unique source de carbone. Parmi les bactéries retrouvées : une souche *Rhodococcus* sp. l'utilisant comme unique source d'azote et des souches appartenant au genre *Micrococcus* l'utilisant comme unique source de carbone.

Mots clés : bactéries, biodégradation, cyperméthrine, pesticide, sélection.

Remerciements :

A l'issu de ce travail, je tiens à remercier tous ceux qui de près ou de loin ont contribué par leur aide et conseils à la réalisation de ce projet de fin d'études.

Je remercie particulièrement ma promotrice Mme SALAH Rym de m'avoir guidée et conseillée pendant la réalisation de ce projet de fin d'études.

J'exprime également mes vifs remerciements aux membres du jury, M. Nabil MAMERI et Mme Sadjia AROUA qui étaient aussi mes enseignants durant mon cursus, d'avoir accepté de participer à l'évaluation de mon travail, pour l'attention qu'ils ont bien voulue m'accorder et leurs éventuels remarques.

Sans oublier, le personnel du laboratoire de contrôle de qualité de l'institut Pasteur (Dély Ibrahim).

J'adresse mes vifs remerciements à ma mère et mon père de m'avoir encouragée, soutenue tout au long de mes études, particulièrement ces derniers mois.

Je remercie également mon frère pour ses encouragements et conseils, mon oncle pour son aide et toute ma famille qui m'ont soutenue dans les moments difficiles.

Je souhaiterai aussi dire merci à mes amies et leur souhaite tout le bonheur du monde.

Enfin, j'exprime ma profonde gratitude aux enseignants que j'ai eu le plaisir d'avoir tout au long de mes études ainsi qu'au personnel du département du génie de l'environnement.

Sommaire :

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale.....	12
Recherche bibliographique.....	15
1 Généralités sur les pesticides :	17
1.1 Définition :	17
1.2 Classification des pesticides :	17
1.3 Mode d'action des pesticides :	21
1.3.1 Mode d'action des herbicides :	21
1.3.2 Mode d'action des insecticides :	22
1.3.3 Mode d'action des fongicides :	22
1.4 Intérêt des pesticides :	22
1.5 Propriétés et devenir des pesticides :	23
1.5.1 Transformation /Dégradation des pesticides :	27
1.5.1.1 La dégradation microbienne :	29
1.6 Effets des pesticides :	32
1.6.1 Effets des pesticides sur la santé :	32
1.6.1.1 Toxicité des pesticides :	33
1.6.1.1.1 Toxicité aigüe :	33
1.6.1.1.1.1 Effets de la toxicité aigüe :	34
1.6.1.1.2 La toxicité chronique :	35
1.6.1.1.2.1 Effets de la toxicité chronique :	35
2 Généralités sur les pyréthri-noïdes:	39
2.1 Définition :	39
2.2 Historique:	39
2.3 Propriétés des pyréthri-noïdes :	41
2.4 Mode d'action des pyréthri-noïdes:	42
2.5 Biodégradation des pyréthri-noïdes :	45
3 La cyperméthrine :	51
3.1 Propriétés physico-chimiques :	51
3.2 Toxicité de la cyperméthrine :	53
3.2.1 Effets sur les organismes aquatiques :	54

3.2.2	Effets sur les organismes terrestres :	54
3.2.3	Effets sur les humains :	55
3.3	Biodégradation de la cyperméthrine :	56
3.3.1	Métabolites et voies de biodégradation de la cyperméthrine :	56
3.3.1.1	Biodégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Bacillus</i> sp. SG2 :	56
3.3.1.2	Biodégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> SG4 : 58	
3.3.1.3	Biodégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Bacillus subtilis</i> 1D :	59
3.3.1.4	Biodégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Bacillus</i> sp. ISTDS2 :	60
3.3.1.5	Voie de biodégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Micrococcus</i> sp. CPN 1 : 61	
3.3.1.6	Biodégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Rhodobacter sphaeroides</i> : 63	
3.3.1.7	Amélioration de la dégradation de la cyperméthrine par une co-culture de <i>Bacillus cereus</i> ZH-3 et de <i>Streptomyces aureus</i> HP-S-01:	63
4	Matériel et méthodes :	66
4.1	Matériel biologique :	66
4.2	Matériel non biologique :	66
4.3	Méthodes :	66
4.3.1	Test de solubilité :	66
4.3.2	Préparation et entretien des boues activées :	67
4.3.3	Acclimatation des boues :	68
4.3.4	Sélection des souches microbiennes :	69
4.3.4.1	Sélection des souches microbiennes utilisant la cyperméthrine comme unique source de carbone :	70
4.3.4.2	Sélection des souches microbiennes utilisant la cyperméthrine comme unique source d'azote :	71
4.3.5	Isolement et identification des micro-organismes :	71
4.3.5.1	Isolement des micro-organismes :	71
4.3.5.2	Identification des micro-organismes :	72
4.3.5.2.1	Etude macroscopique :	72
4.3.5.2.2	Coloration différentielle type Gram:	72
4.3.5.2.3	Etat frais :	74
4.3.5.2.4	Test des enzymes respiratoires :	74
4.3.5.2.4.1	Test de la catalase :	74

4.3.5.2.4.2	Test de l'oxydase :	75
4.3.5.2.5	Tests biochimiques (galeries miniaturisées) :	75
4.3.5.2.5.5	Galerie API Coryne :	76
4.3.5.2.5.6	Galerie API Staph :	77
5	Résultats et discussion :	79
5.1	Isolement des souches bactériennes sur milieu sélectif :	79
5.1	Description morphologique des souches bactériennes :	80
5.2	Identification des souches bactériennes :	87
5.2.1	Coloration de Gram :	87
5.2.2	Etat frais :	90
5.2.3	Recherche des enzymes respiratoires :	90
5.2.3.1	Test de la catalase :	90
5.2.3.2	Test de l'oxydase :	91
5.2.4	Galleries API:	92
5.2.4.1	Galerie API Coryne :	92
5.2.4.2	Galerie API Staph :	94
5.3	Interprétation et discussion des résultats :	98
	Conclusion Et Perspectives	103
	Références bibliographiques	105

Liste des tableaux :

Tableau 1: Classification des pesticides selon l'organisme ciblé	19
Tableau 2: Propriétés affectant le devenir dans l'environnement de certains pesticides.	26
Tableau 3: Persistance de certains pesticides dans le sol	27
Tableau 4: Paramètres affectant la biodégradabilité d'un composé organique	29
Tableau 5: les différents types de toxicité	33
Tableau 6: Symptômes liés à une exposition aiguë aux pesticides	34
Tableau 7: Maladies chroniques liées à l'exposition aux pesticides.....	35
Tableau 8: Exemples de symptômes provoqués par certains pesticides	36
Tableau 9: Quelques propriétés des pyréthrinoïdes	42
Tableau 10: Propriétés physico-chimiques de la cyperméthrine cis:trans/40:60.	52
Tableau 11: La cyperméthrine et ses sous-ensembles d'isomères	52
Tableau 12: Composition du milieu minéral.....	68
Tableau 13: Variation de la concentration du glucose et de la cyperméthrine pendant la période de sélection.....	70
Tableau 14: Variation de la concentration du NH_4NO_3 et de la cyperméthrine durant la période de sélection.....	71
Tableau 15: Description morphologique des colonies bactériennes purifiées.	81
Tableau 16: Résultats de la coloration de Gram.	87
Tableau 17: Résultats de l'état frais.....	90
Tableau 18: Résultats du test de la catalase.	91
Tableau 19: Résultats du test de l'oxydase.....	91
Tableau 20: Résultats des tests réalisés sur la souche S4 avec la galerie API Coryne.	93
Tableau 21:Résultat de l'identification par la galerie API Coryne.....	94
Tableau 22:Résultats des tests réalisés sur les souches S13, S16O, S16N et S16M avec la galerie API Staph.	96
Tableau 23: Résultat de l'identification par la galerie API Staph.	97
Tableau 24:Orientation bactérienne des isolats non-identifiés.....	97

Liste des figures :

Figure 1 : Quelques exemples des différentes classifications des pesticides.....	18
Figure 2:Structure générale des organophosphorés, R1 et R2 sont des radicaux alkyles, R3 est un F, CN ou S-alkyle	20
Figure 3: Structure générale des carbamates, R est un alcool (OH), oxine (C=NOH), ou un phénol, R' est un hydrogène (H) ou un groupement méthyle (CH ₃), R'' est un méthyle	20
Figure 4: Structure générale des pyréthrinoïdes, R et R' sont des radicaux carbonés ou halogénés	20
Figure 5 : Structure générale des triazines, R, R' et R'' couvre une large gamme de substituants (chaines carbonés, cl, S, etc)	21
Figure 6: Structure générale des phénylurées (A), des sulfonyleurées (B) et des benzoyleurées (C), X est un composé halogéné, R et R' sont des groupements méthyles, chaines carbonées, etc	21
Figure 7: Devenir et mouvements des pesticides dans l'environnement	24
Figure 8: Processus de transformation des pesticides et leur devenir après dégradation	28
Figure 9: Biodégradation des composés organiques	31
Figure 10: Composition chimique des pyréthrines naturelles.....	39
Figure 11: Représentation chimique des pyréthrinoïdes	41
Figure 12: Mécanisme d'action des pyréthrinoïdes	44
Figure 13: Les différentes transformations possibles entre le PBA, le PBA _{lc} et le PBA _{ld}	46
Figure 14: Schéma général proposé pour la biodégradation d'un pyréthrinoïde de type I	47
Figure 15: Schéma général proposé pour la biodégradation d'un pyréthrinoïde de type II	48
Figure 16: Structure de la cyperméthrine	51
Figure 17: Effets de la cyperméthrine sur diverses espèces de poissons	54
Figure 18: Effets de la cyperméthrine sur les rats	55
Figure 19:Voie de dégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Bacillus</i> sp. SG2	57
Figure 20: Voie de dégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> SG4	58
Figure 21: Voie de biodégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Bacillus subtilis</i> 1D . .	59
Figure 22: Voie de biodégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Bacillus</i> sp. ISTDS2 .	60
Figure 23: Voie de dégradation de la cyperméthrine par la souche <i>Micrococcus</i> sp. strain CPN	62
Figure 24: La cyperméthrine (CAS N°52315-07-8).	67
Figure 25: Entretien des boues activées.	67
Figure 26: Acclimatation des boues activées au pesticide.	69
Figure 27 : sélection des souches microbiennes utilisant la cyperméthrine comme unique source de carbone ou comme unique source d'azote.	70
Figure 28: Préparation d'un frottis bactérien	73
Figure 29: Etapes de la coloration de Gram	74
Figure 30: Présentation de la galerie API Coryne.....	76
Figure 31: Présentation de la galerie API Staph.	77
Figure 32: Observation de quelques colonies bactériennes sur les milieux sélectifs.....	80
Figure 33: Coloration de Gram (grossissement x400)	89

Figure 34: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Coryne par l'isolat S4.....	92
Figure 35: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Staph par l'isolat S13.	94
Figure 36: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Staph par l'isolat S16O.	95
Figure 37: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Staph par l'isolat S16M.....	95
Figure 38: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Staph par l'isolat S16N.	96

Liste des abréviations :

Alphyt : l'Algérienne des Phytosanitaires

ARN : acide ribonucléique.

CL₅₀ : Concentration létale médiane.

DDT : Dichloro-diphényle-trichloro-éthane.

DL₅₀ : Dose létale médiane.

DT₅₀ : Demi-vie.

EPA : Agence de protection de l'environnement.

GC : chromatographie en phase gazeuse.

ID : identification.

K_{oc} : coefficient de partage carbone organique/eau.

K_{ow} : coefficient de partage octanol/eau.

K_h : Constante de Henry.

M : masse moléculaire.

MC : milieu de culture minéral.

MS : spectrométrie de masse.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

OP : Organophosphoré.

PBA : acide 3-phénoxybenzoïque

PBA_{lc} : alcool 3-phénoxybenzyle

PBA_{ld} : 3-phénoxybenzaldéhyde

PCB : Polychlorobiphényle.

S : souche bactérienne.

SC : source de carbone.

SN : source d'azote.

SO : solvant.

UPBM : Union des professeurs de Physiologie Biochimie Microbiologie.

VGSC : canaux sodiques voltage dépendants.

Introduction générale

L'idée d'utiliser des pesticides remonte à l'antiquité où des civilisations humaines les utilisaient pour cultiver et protéger leurs ressources alimentaires. Comme exemple concret, il y a leur façon d'associer la culture des végétaux nutritifs à celle des végétaux venimeux qui, par leur toxicité, tenaient le rôle de bouclier contre les insectes. Avant l'apparition des pesticides synthétiques dans les années 1940s, d'autres substances ont été utilisées, notamment comme le mercure et l'arsenic, comme outils précieux pour les processus de culture des aliments consommés quotidiennement. Au cours des premières décennies du XXe siècle, les efforts déployés se sont concentrés sur deux domaines principaux que sont l'utilisation d'extraits de plantes, notamment le pyrèthre et le tabac, et l'utilisation de certains produits chimiques inorganiques, contenant principalement de l'arsenic, du soufre ou du cuivre. A partir des années 1940s, les chimistes ont commencé à développer des insecticides organochlorés et organophosphorés ainsi que de nouveaux herbicides et fongicides. Le premier pesticide moderne découvert est le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) qui a valu le prix Nobel de médecine à Paul Muller. Cependant, le succès du DDT fut de courte durée suite à la publication du livre « printemps silencieux » de la biologiste et écologiste Rachel Carson qui dénonça les effets des pesticides et particulièrement du DDT sur les oiseaux, les animaux et les humains ce qui entraîna l'interdiction du DDT aux États-Unis, puis dans de nombreux pays. Par la suite, d'autres classes de pesticides firent leur apparition et remplacèrent les insecticides organophosphorés et organochlorés en raison de leur toxicité et contamination de l'environnement ; il s'agit notamment des pyréthrinoïdes synthétiques qui sont plus stables que les pyréthrines naturelles mais également considérés comme moins nuisibles pour les organismes non-ciblés[1–3].

Les pesticides possèdent un large spectre d'utilisation dans divers domaines de la vie quotidienne et sont largement utilisés dans l'agriculture malgré les efforts déployés pour essayer de réduire au maximum leur utilisation en employant d'autres méthodes pour cultiver les végétaux. En effet, l'application des pesticides a conduit à une diminution drastique des insectes nuisibles, des maladies et des mauvaises herbes ce qui a entraîné une augmentation des rendements agricoles récoltables et la marge économique tout en offrant une production d'aliments de qualité plus que souhaitables et ceci parallèlement à l'accroissement démographique [1]. Mais malgré leur intérêt, il est impossible de faire abstraction de leurs effets néfastes. En effet, ces produits sont également toxiques pour les organismes non-ciblés et contaminent les différents compartiments environnementaux (eau, sol, air).

La cyperméthrine est un insecticide appartenant aux pyréthrinoïdes synthétiques de type II. Cette famille de pesticides de moindre toxicité, apparue durant la deuxième guerre mondiale, a détrôné les autres familles existantes comme les organochlorés et les organophosphorés. La cyperméthrine est largement utilisée depuis les années 1980 pour lutter contre les insectes. Cependant, elle est très toxique pour les poissons et les invertébrés aquatiques et a été classée comme cancérogène possible pour l'homme. De ce fait, son élimination complète des zones contaminées est primordiale, ce qui peut être fait à l'aide de micro-organismes par bioremédiation. A ce jour, la bioremédiation est considérée comme une méthode sûre, moins coûteuse et plus respectueuse de l'environnement en comparaison avec d'autres méthodes d'élimination des polluants [4, 5].

Dans la perspective d'entreprendre des essais de bioremédiation pour éliminer la cyperméthrine, le présent travail a pour objectif d'isoler, à partir de boues activées riches en micro-organismes, et d'identifier des souches microbiennes aptes à dégrader la cyperméthrine.

Ce travail est divisé en deux parties : une partie théorique et une partie pratique.

La partie théorique est une synthèse bibliographique dans laquelle sont abordés les points suivants :

- Généralités sur les pesticides : classification, dégradation, biodégradation, etc.
- Généralités sur les pyréthrinoïdes.
- Généralités sur la cyperméthrine.

La partie expérimentale traite les points suivants :

- Matériel et méthodes.
- Résultats et discussions.
- Conclusion.

Recherche bibliographique

Chapitre 1 :

Généralités sur les pesticides

1 Généralités sur les pesticides :

1.1 Définition :

Le mot pesticide se compose du suffixe commun « cide » (du latin *caedo, caedere*, qui signifie tuer) et du mot *pestis*, qui désigne un animal nuisible ou un fléau. Les pesticides désignent tous les produits chimiques ou biologiques destinés à détruire des éléments vivants considérés comme nuisibles (micro-organismes, animaux ou végétaux) ou destinés à s'opposer à leur développement, incluant les espèces non désirées de plantes ou d'animaux responsables de dommages durant ou interférant avec la production, le traitement, l'entreposage ou la commercialisation des aliments, des denrées agricoles, du bois, qu'il s'agisse de vecteurs de maladies humaines ou animales, ou d'organismes nuisibles aux matériaux et habitats. Le terme « pesticide » désigne tout aussi bien la substance active, que la préparation commerciale composée d'une ou plusieurs substances actives [6, 7] .

Un pesticide est généralement composé de plusieurs molécules comprenant [7]:

- La matière active produisant l'effet toxique recherché ;
- Un diluant incorporé au produit et destiné à en abaisser la concentration en substance active. Dans le cas d'une préparation liquide, il s'agira d'un solvant ;
- Des adjuvants (mouillant, colorant, répulsif, émétique, conservateur, etc.) dont le but est de modifier les qualités du produit pour en faciliter l'utilisation.

1.2 Classification des pesticides :

Les pesticides peuvent être classés selon :

- Le mode d'utilisation [8] :
 - les produits phytosanitaires sont destinés à protéger les végétaux, généralement les cultures contre tous les organismes nuisibles, mais aussi à détruire les végétaux indésirables ou à freiner une croissance indésirable des végétaux. Ils sont majoritairement utilisés en agriculture.
 - Les biocides sont destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, ou encore à en prévenir l'action. Ils sont utilisés dans de nombreux secteurs d'activités : traitements antiparasitaires ou anti-vectoriels vétérinaires ou humains, traitement des charpentes de bâtiment.
- L'organisme cible : Il existe trois familles principales (herbicides, fongicides et insecticides) et d'autres familles moins fréquentes (rodenticides, raticides, molluscicides, nématocides, etc.).
- Leurs natures chimiques : Il s'agit, principalement, des organochlorés, des organophosphorés, carbamates, pyrèthrinoïdes, etc. (figure 1) [9].

Selon leur toxicité, l'OMS les a classés en: extrêmement dangereux, très dangereux, modérément dangereux, peu dangereux et pesticides peu susceptibles de présenter un danger aigu [9, 10].

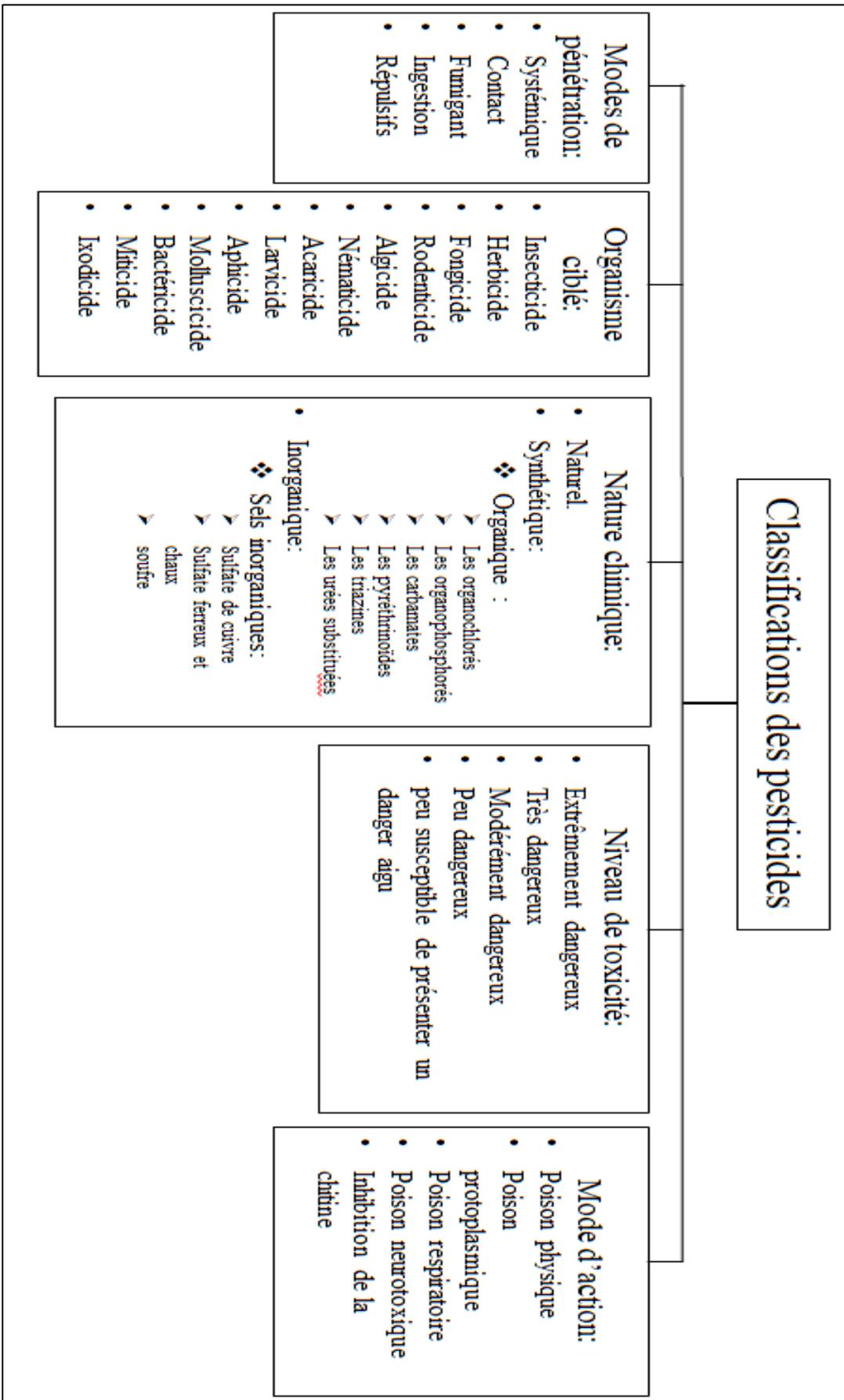


Figure 1 : Quelques exemples des différentes classifications des pesticides [1, 4].

Cependant, la classification selon la composition chimique et la nature des composants actifs demeure la manière la plus courante pour classer les pesticides. En effet, certains pesticides ne sont pas faciles à classer par les méthodes citées précédemment car ils peuvent être utilisés contre deux ou plusieurs groupes d'organismes nuisibles ou dans des formulations qui peuvent avoir deux ou plusieurs modes de pénétration ou d'action [10, 11].

Selon l'organisme visé les pesticides sont classés comme suit (tableau 1) :

Tableau 1: Classification des pesticides selon l'organisme ciblé [1, 12]

Classe du pesticide	Organisme nuisible ciblé
Acaricide	Acariens
Algicide	Algues
Avicide	Oiseaux
Bactéricide	Bactéries
Fongicide	Champignons
Herbicide	Mauvaises herbes et plantes indésirables
Insecticide	Insectes et autres arthropodes
Larvicide	Larves
Molluscicide	Mollusques
Nématocide	Nématodes
Ovicide	Œufs d'insectes et d'acariens
Piscicide	Poissons
Rodenticide	Rongeurs
Termicide	Termites
Virucide	Virus

Selon leur nature chimique, les pesticides peuvent être divisés en deux groupes chimiques : les composés inorganiques et les composés organiques (figure 1). Les plus utilisés aujourd'hui sont des composés organiques. Certains des pesticides organiques sont extraits des plantes, mais la majorité sont des composés synthétiques. Les principaux groupes chimiques des catégories les plus classiques de pesticides sont indiqués ci-dessous :

- **Les organochlorés:** les organochlorés ne possèdent pas de structures communes, cependant, ils sont tous caractérisés par un ou plusieurs atomes de chlore entourant un ou plusieurs cycles hydrocarbonés. L'inconvénient de ces composés est leur persistance dans l'environnement pendant de longues périodes et leur capacité à s'accumuler dans les organismes vivants [1, 13].
- **Les organophosphorés :** Les organophosphorés (OP) sont caractérisés par un atome de phosphore central et de nombreuses chaînes latérales. Ils sont intégrés par des esters d'acides phosphoriques, phosphoniques ou apparentés. Les OPs sont employés comme insecticides mais également comme herbicides et fongicides. L'avantage de leur utilisation est qu'ils sont beaucoup moins persistants dans l'environnement que les organochlorés. Parmi les exemples les plus courants de ce groupe figurent le diazinon, le dichlorvos et le malathion [11, 13]. La forme générale d'un composé de ce groupe est la suivante (figure 2):

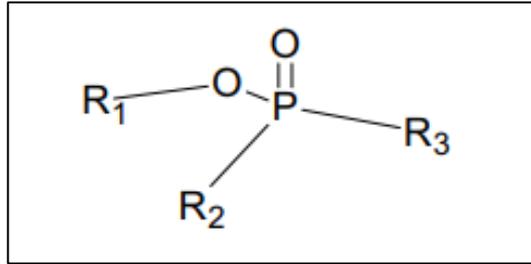


Figure 2: Structure générale des organophosphorés, R₁ et R₂ sont des radicaux alkyles, R₃ est un F, CN ou S-alkyle [14].

- **Les carbamates:** Structuellement, les carbamates sont similaires aux OPs, toutefois, ils diffèrent par leur origine. Les OPs sont des dérivés de l'acide phosphorique, tandis que les carbamates sont dérivés de l'acide carbamique. Le composé le plus largement utilisé est l'insecticide carabaryl [1, 13]. Leur structure générale est de la forme suivante (figure 3) :

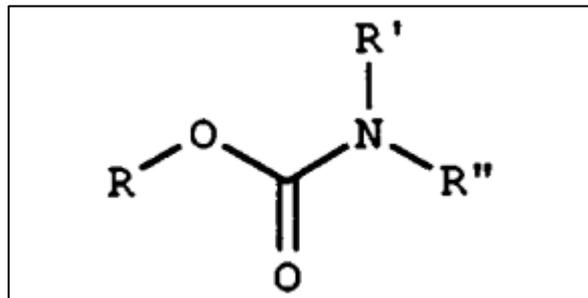


Figure 3: Structure générale des carbamates, R est un alcool (OH), oxine (C=NOH), ou un phénol, R' est un hydrogène (H) ou un groupement méthyle (CH₃), R'' est un méthyle [13].

- **Les pyréthrinoïdes:** Les pyréthrinoïdes sont des composés synthétiques apparentés aux pyréthrines provenant du chrysanthème [1]. La structure générale des pyréthrinoïdes est la suivante:

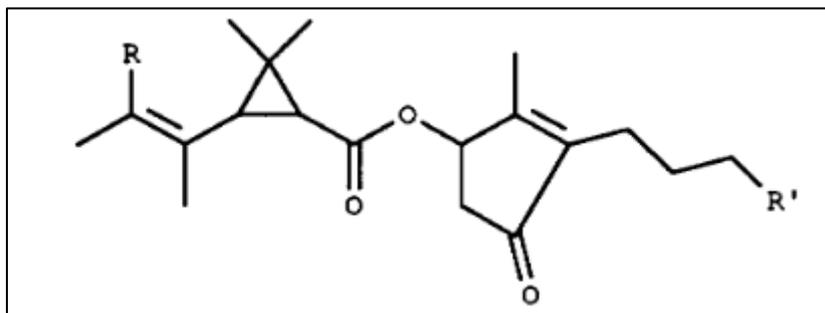


Figure 4: Structure générale des pyréthrinoïdes, R et R' sont des radicaux carbonés ou halogénés [13].

- **Les triazines:** les triazines consistent en un certain nombre de 1,3,5-triazines substituées, qui sont des herbicides classiques. Ils sont constitués d'un cycle contenant 3 atomes d'azote

et 3 atomes de carbone comme le montre la figure 5. Les atomes d'azote peuvent être adjacent ou s'alterner avec les atomes de carbone autour du cycle [11, 13].

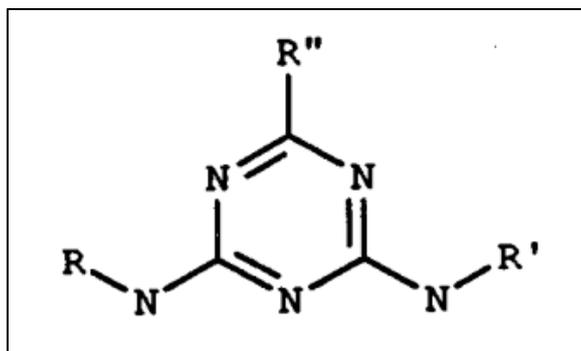


Figure 5 : Structure générale des triazines, R, R' et R'' couvrent une large gamme de substituants (chaines carbonées, Cl, S, etc) [13].

- **Les urées substituées:** comprennent un grand nombre de groupes comme les phénylurées, les sulfonylurées ou les benzoylurées, qui sont principalement des herbicides ; et certains dérivés de l'urée ont une activité insecticide. Leur activité dépend des substituants ainsi que de leur arrangement dans la molécule [11, 13].

La structure générale des molécules d'urées substituées est la suivante (figure 6):

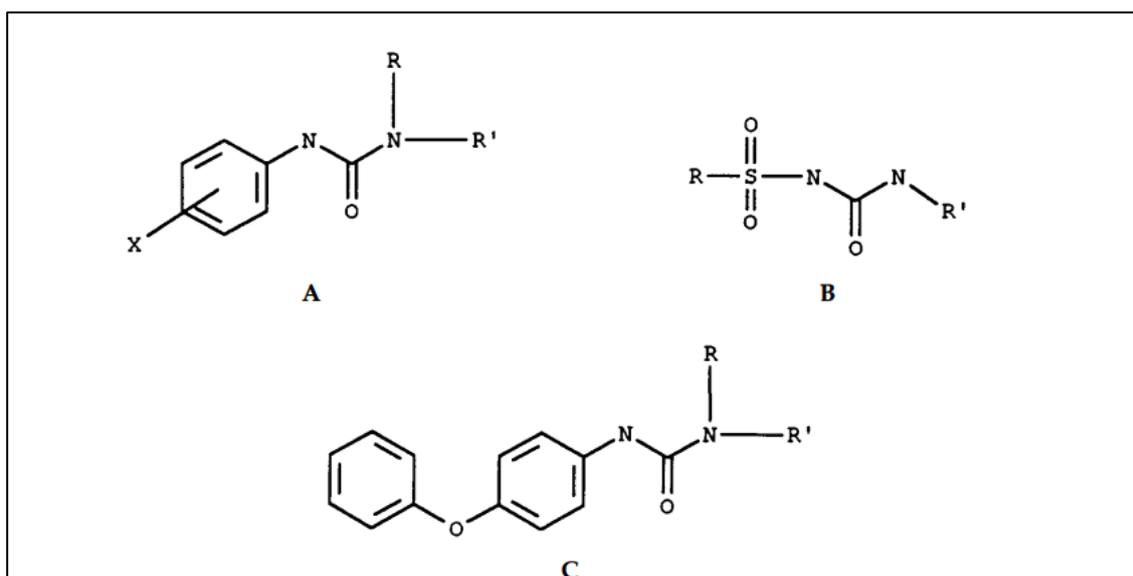


Figure 6: Structure générale des phénylurées (A), des sulfonylurées (B) et des benzoylurées (C), X est un composé halogéné, R et R' sont des groupements méthyles, chaines carbonées, etc [13].

1.3 Mode d'action des pesticides :

1.3.1 Mode d'action des herbicides :

Les herbicides possèdent différents modes d'action sur les plantes:

- perturbation de la régulation d'une phytohormone « l'auxine », qui est un régulateur de croissance.
- perturbation de la photosynthèse.
- inhibition de la division cellulaire.
- inhibition de la synthèse de la cellulose.
- inhibition de la synthèse des acides aminés [14].

1.3.2 Mode d'action des insecticides :

Les insecticides agissent sur les insectes de différentes manières afin de les éliminer ou d'empêcher leur reproduction comme suit:

- En ciblant le système nerveux central et/ou périphérique.
- En agissant sur la respiration cellulaire.
- En tant que régulateurs de croissance des insectes par la perturbation de la mue ou l'inhibition de la production de la chitine qui est un élément constitutif majeur de l'exosquelette des insectes [14–16].

1.3.3 Mode d'action des fongicides :

Afin de préserver les plantes des différentes maladies provoquées par des champignons, les fongicides agissent sur ces derniers de différentes façons qui sont résumées comme suit :

- Action sur le système respiratoire.
- Action sur les biosynthèses (chitine, mélanine, stérols, acides nucléiques, acides aminés et glucides).
- Action sur les microtubules : ils interfèrent avec la formation et le fonctionnement des microtubules entraînent un arrêt de l'élongation des hyphes et induisent d'importantes déformations [14, 15].

1.4 Intérêt des pesticides :

L'utilisation judicieuse des pesticides entraîne un large éventail de résultats positifs selon l'utilisation ; certains sont évidents comparés à d'autres qui se produisent à moyen ou long terme, ou qui sont subtils. Ainsi, on retrouve les avantages primaires qui sont connus comme étant les conséquences des effets directs des pesticides, tels que la protection des personnes, la santé des animaux et des cultures et la protection des zones de loisirs, et les avantages secondaires découlent des avantages primaires et sont les conséquences moins immédiates, moins évidentes intuitivement ou à plus long terme [17, 18].

Les trois principaux effets immédiats des pesticides sont:

- 1) La lutte contre les parasites agricoles (mauvaises herbes) et les vecteurs de maladies végétales ;
- 2) Le contrôle des vecteurs de maladies humaines et animales et des organismes nuisibles ;
- 3) La prévention ou le contrôle des organismes qui nuisent aux autres activités et structures humaines [17].

De ces effets, plusieurs avantages en découlent, en effet, la lutte contre les parasites agricoles permet d'augmenter les rendements, et de même les bénéfices. De plus, elle permet l'obtention de produits de meilleure qualité, de garantir la disponibilité des aliments et d'acquiescer une sécurité alimentaire avec l'accroissement de la population humaine, et c'est ce

qui permettra d'améliorer la nutrition et ainsi améliorer la qualité de vie et la longévité [17, 18].

Le contrôle d'un large éventail de vecteurs de maladies humaines et animales réduit le nombre de personnes infectées et de décès, et permet la prévention de la propagation internationale des maladies car selon l'OMS, tuer les vecteurs est la méthode la plus efficace pour les combattre et, sans l'accès à des méthodes de lutte chimique, la vie serait menacée pour une grande partie de l'humanité [18].

Certains organismes ont un impact négatif sur les activités humaines, les infrastructures, les matériaux, etc. Ceux-ci peuvent être préservés grâce à l'emploi de pesticides. Ainsi, ils sont utilisés dans de nombreux secteurs spécifiques de l'activité humaine. Ils permettent par exemple de lutter contre les organismes indésirables et prévenir la corrosion accélérée des constructions métalliques [18].

1.5 Propriétés et devenir des pesticides :

Dès que les pesticides sont introduits dans l'environnement suite aux différentes utilisations, ils peuvent être présents partout dans le sol, l'eau, l'air et les tissus des organismes vivants [19].

Le mouvement et le devenir des pesticides dans l'environnement dépendent non seulement des propriétés des pesticides (propriétés physico-chimiques, biologiques, etc.) mais également des caractéristiques des différents compartiments environnementaux dans lesquels ils se trouvent (l'eau, le sol et l'atmosphère) comme les particularités du sol et des eaux souterraines, les conditions météorologiques, la population biologique et les méthodes d'application des pesticides [19, 20].

Une fois appliqué, la dissipation d'un pesticide dans les différents compartiments environnementaux se fait via de nombreux processus ; certains processus affecteront sa persistance, tandis que d'autres influenceront ses déplacements. Son devenir dans le sol sera principalement affecté par des phénomènes de rétention et de transformation (ou de dégradation). D'autres processus interviennent également, comme la volatilisation, le ruissellement, la lixiviation, l'absorption par les plantes, etc. Ces mécanismes sont représentés dans la figure (7) [19, 21].

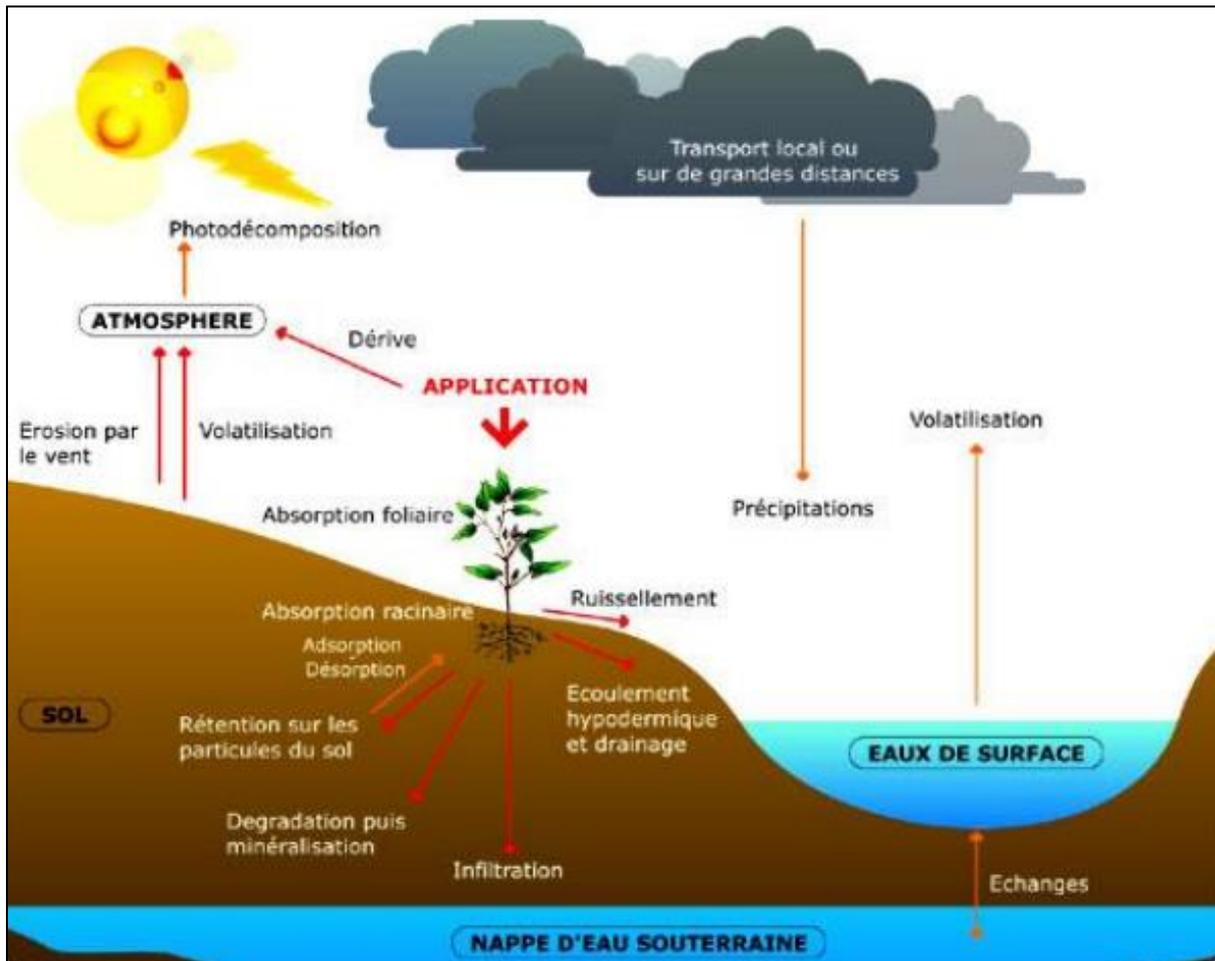


Figure 7: Devenir et mouvements des pesticides dans l'environnement [22].

Le comportement et le devenir d'un pesticide dans l'environnement (sol, eaux de surfaces et eaux souterraines) sont généralement régis par divers processus environnementaux qui peuvent être classés en trois types :

- Les processus de transport : qui éloignent le pesticide de son point d'introduction. Le transport des pesticides se fait dans l'air, l'eau, le sol et les organismes (bioaccumulation).
- Les processus de transfert : ces processus régissent le mouvement du pesticide entre les différents compartiments environnementaux ainsi que la manière avec laquelle un pesticide est distribué entre les solides et les liquides (le sol et l'eau du sol par exemple), les solides et les gaz (comme entre le sol et l'air qu'il contient) ; les pesticides sont transférés d'un compartiment à un autre via cinq principaux processus :
 - L'adsorption/désorption:

L'adsorption et la désorption d'un pesticide dans le sol sont des mécanismes majeurs régissant le devenir des pesticides dans le sol. Ils sont le résultat de l'interaction entre le pesticide et les molécules du sol. Ce processus dépend de plusieurs facteurs :

- Les caractéristiques du sol: structure, humidité, teneur en matière organique, pH, distribution des particules du sol, température. La sorption d'un pesticide est meilleure dans un sol sec, car dans les sols humides l'eau est en concurrence avec les pesticides pour les sites de fixation. De plus, les sols riches en argile et en matières organiques ont un fort potentiel de sorption des pesticides.
 - La nature du pesticide: la structure moléculaire, la charge électrique et la solubilité.
- La volatilisation: permet au pesticide de passer en phase gazeuse, ce qui provoque son éloignement de son point d'introduction. Elle est influencée par les propriétés physico-chimiques du produit chimique, la méthode d'application, les propriétés du sol, la concentration du produit chimique et les conditions météorologiques.
 - Le ruissellement : c'est le transfert des pesticides présents sur la surface du sol (premiers centimètres du sol) par l'eau sous forme dissoute ou particulaire. Plusieurs facteurs affectent la présence des pesticides sur la surface du sol comme la manière d'appliquer le pesticide, le type de sol, les propriétés physico-chimiques et le type de formulation du pesticide, ainsi que la demi-vie du pesticide dans le sol, etc.
 - La lixiviation : c'est le mouvement des pesticides dans l'eau à travers le sol. Elle se produit dans toutes les directions : vers le haut, vers le bas ou latéralement. Les facteurs qui influencent le lessivage des pesticides comprennent les caractéristiques du sol et celles du pesticide, ainsi que leur interaction avec l'eau de pluie ou d'irrigation.
 - L'absorption : c'est l'assimilation d'un pesticide par les plantes, les animaux ou les micro-organismes. Une fois absorbés, la plupart des pesticides se décomposent, les résidus quant-à-eux peuvent être décomposés ou rester à l'intérieur de l'organisme vivant qui les a assimilés et seront, dans ce cas, libérés dans l'environnement, après sa mort.
- Les processus de transformation : ce sont des processus chimiques et biologiques qui modifient la structure du pesticide ou le dégradent complètement [19, 21, 23–25].

Les propriétés des pesticides comme : la solubilité dans l'eau, la tendance du pesticide à s'adsorber sur le sol, ainsi que la persistance dans l'environnement influencent énormément leur devenir [19].

Le tableau 2 donne des exemples de propriétés de pesticides nécessaires à la prédiction de leur devenir dans l'environnement :

Tableau 2: Propriétés affectant le devenir dans l'environnement de certains pesticides [25].

Pesticide	Demi-vie DT ₅₀ (jours)	Coefficient de sorption K _{oc}	Mobilité	Solubilité dans l'eau (mg/L)	Indice de pression de vapeur (mmHg×10 ⁷)	Constante d'Henry K _h ×10 ⁹
Malathion	1	1800	Extrêmement faible	130	80	1000
1,3-dichloro-propène	10	32	Modérée	2250	290×10 ⁹	77×10 ⁹
Dicamba	14	2	Très élevée	400000	0	0
Benomyl	67	1900	Faible	2	0,001	0,78
Diuron	90	480	Modérée	42	0.69	21
Bensulida	120	1000	Modérée	5,6	8	3058
Prometon	500	150	Très élevée	720	77,3	130

Un pesticide possédant une solubilité élevée dans l'eau est plus facilement emporté avec l'eau de pluie sous forme de ruissellement ou par infiltration dans le sol (lixiviation) où il atteint les eaux souterraines et risque de les contaminer. La lixiviation et le ruissellement sont davantage probables si le pesticide a une faible tendance à s'adsorber sur le sol et une plus longue persistance [13, 19].

La tendance d'un pesticide à s'adsorber sur les molécules d'un sol se mesure par le coefficient de partage carbone organique/eau K_{oc}. Pour des valeurs de K_{oc} inférieur à 500, le pesticide risque d'être emporté par lixiviation [19].

La persistance d'un pesticide se mesure en termes de demi-vie qui représente le temps nécessaire à la dégradation dans le sol de la moitié de sa quantité initiale. Ainsi, plus la demi-vie d'un pesticide est longue plus il est persistant et par conséquent il risque d'être déplacé par les eaux de pluie avant de se dégrader. Selon leur persistance, les pesticides peuvent être divisés en trois catégories: les pesticides non persistants avec une demi-vie dans le sol inférieure à 30 jours, les pesticides modérément persistants avec une demi-vie se situant entre 30 et 100 jours, et les pesticides persistants dont la demi-vie dans le sol est supérieure à 100 jours (tableau 3) [19, 26].

Tableau 3: Persistence de certains pesticides dans le sol [27].

Faible persistance (demi-vie < 30 jours)	Persistence modérée (demi-vie 30-100 jours)		Persistence élevée (demi- vie > 100 jours)
Aldicarb	Aldrin	Glyphosate	Bromacil
Captan	Atrazine	Heptachlor	Chlordane
Dalapon	Carbaryl	Linuron	Lindane
Dicamba	Carbofuran	Parathion	Paraquat
Malathion	Diazinon	Phorate	Picloram
Methyl-parathion	Endrin	Simazine	Trifluralin
Oxamyl	Fonofos	Terbacil	

D'autres caractéristiques doivent être prises en compte comme la volatilité. Les pesticides les plus volatiles s'évaporent facilement et s'ils ne se dégradent pas, ils risquent de se déplacer sur de longues distances. La capacité d'un pesticide à se volatiliser d'un sol humide est mesurée par la constante de la loi d'Henry K_h qui caractérise la tendance d'un pesticide à se déplacer entre l'air et l'eau du sol. Pour des valeurs élevées de K_h , la volatilisation du pesticide d'un sol humide est plus probable [13, 25, 26].

1.5.1 Transformation /Dégradation des pesticides :

La dégradation ou la transformation est un processus qui permet l'élimination de l'excès des pesticides dans l'environnement par leur décomposition en produits chimiques généralement inoffensifs et non toxiques [19, 28].

La dégradation des pesticides se produit par différents processus biotiques et abiotiques (figure 8) :

- Dégradation photochimique.
- Dégradation chimique.
- Dégradation microbienne [19, 29].

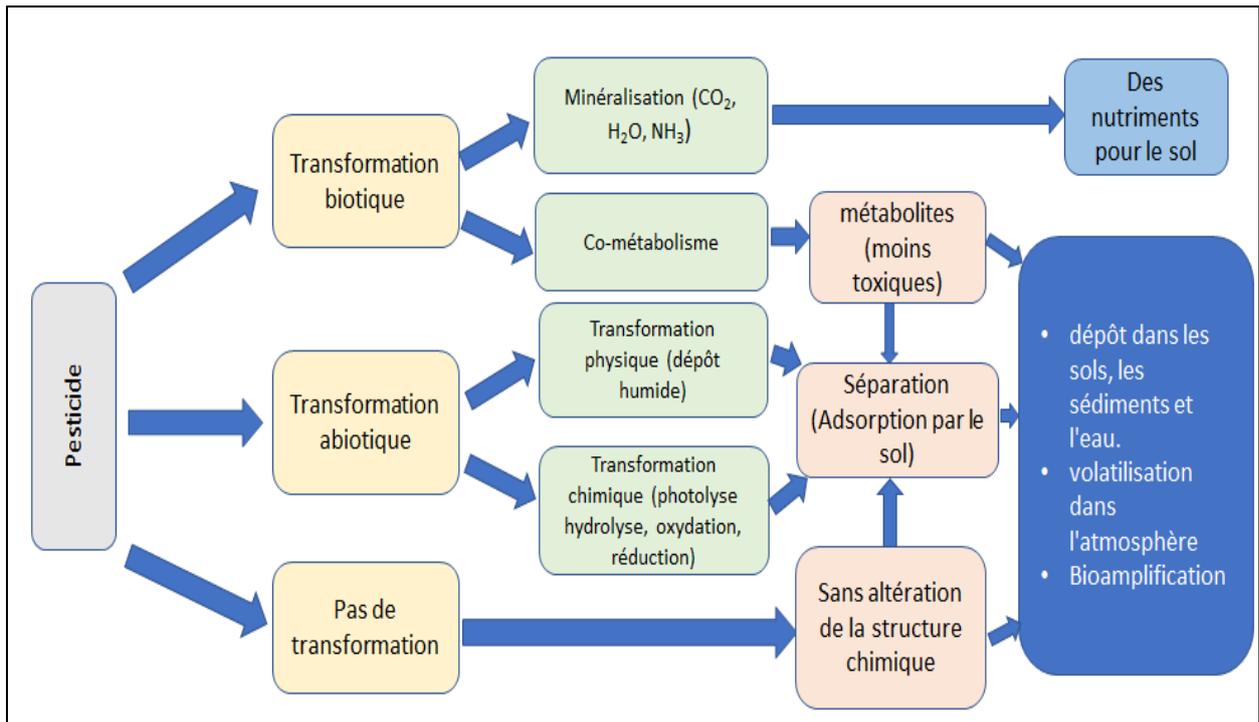


Figure 8: Processus de transformation des pesticides et leur devenir après dégradation [28].

Ainsi, le processus de dégradation biotique fait intervenir des micro-organismes ou des plantes. La dégradation abiotique, par exemple, chimique et photochimique, est réalisée par des agents environnementaux, tels que les rayonnements électromagnétiques, la présence d'agents formant des radicaux, la température et le pH [28].

L'inconvénient des traitements biologiques est les produits de dégradation des composés organiques. En effet, il est probable qu'ils soient à leur tour dangereux [30].

Le tableau 4 représente les éléments physiques, chimiques et structuraux qui déterminent généralement la capacité d'un composé organique à être dégradé [19] :

Tableau 4: Paramètres affectant la biodégradabilité d'un composé organique [19].

Propriétés	Dégradabilité	
	Plus facile	Moins facile
Solubilité dans l'eau	Soluble dans l'eau	Insoluble dans l'eau
Taille de la molécule	Relativement petite	Relativement grande
Groupe fonctionnel de substitution	Quelques groupes fonctionnels	Plusieurs groupes fonctionnels
Composé plus oxydé	Dans un environnement réducteur	Dans un environnement oxydant
Composé plus réduit	Dans un environnement oxydant	Dans un environnement réducteur
Origine	Biologique	Synthétique
Aliphatique	Composé aliphatique contenant jusqu'à 10 atomes de carbone Chaines linéaires Composés aromatiques avec un ou deux noyaux	Haut poids moléculaire Chaines ramifiées Polyaromatiques Hydrocarbures
Substitution sur le cycle aromatique	-OH, -COOH, -CHO, -CO, -OCH ₃ , -CH ₃	-F, -Cl, -NO ₂ , -CF ₃ , -SO ₃ H, -NH ₂
Substitution sur les molécules organiques	Alcools, aldéhydes, acides, esters, amides, acides aminés	Alcanes, alcènes, éthers, cétones, acides dicarboxylique, nitriles, amines, chloroalcanes.
Position de substitution	p-Position o- ou p- phénols di-substitués	m- ou o-Position m- phénols di-substitués

1.5.1.1 La dégradation microbienne :

La dégradation microbienne ou biodégradation est le résultat du métabolisme microbien des pesticides, et est souvent la principale source de dégradation des pesticides dans les sols. Ces transformations biologiques, qui font intervenir des enzymes comme catalyseurs, entraînent souvent des modifications considérables de la structure et des propriétés toxicologiques des polluants. Elles se déroulent surtout dans la couche arable du sol qui abrite une grande diversité de micro-organismes présents en de très grands nombres [19, 31].

Le taux de biodégradation des pesticides dans le sol dépend de plusieurs facteurs tels que:

- les conditions du sol : c'est conditions sont: la température, l'aération, le pH, la teneur en matière organique, l'humidité, ainsi que la présence d'autres sources d'azote et de carbone. L'activité des micro-organismes est accrue dans les sols chauds et humides au pH neutre. Ces paramètres peuvent entièrement modifier la communauté microbienne.

- la fréquence d'applications des pesticides: l'alternance entre différentes classes, groupes ou formulations de pesticides peut minimiser les problèmes potentiels de dégradation microbienne ainsi que la résistance des parasites [19, 26, 28].

La majorité des micro-organismes utilisent les pesticides comme sources de nutriments ou d'énergie. Ainsi, ils dégradent les polluants en vue d'obtenir des nutriments ou de l'énergie lors de la rupture des liaisons chimiques. Divers micro-organismes qui ont la capacité de dégrader les composés toxiques et les utilisent comme seule source de carbone, d'autres les utilisent comme source d'azote [4, 32–35].

Le mécanisme précis d'adaptation aux pesticides est méconnu. Les micro-organismes peuvent acquérir du matériel génétique induisant les mécanismes biochimiques nécessaires au traitement d'un substrat potentiel. Plusieurs mécanismes sont mis en jeu par les micro-organismes afin de garantir la dégradation du substrat selon les enzymes mises en jeu et les conditions du milieu [19, 36].

Des consortiums de micro-organismes sont souvent responsables du phénomène de dégradation. Un pesticide présent dans le sol doit se déplacer vers ces colonies microbiennes et traverser leurs membranes cellulaires pour être métabolisé. Certains micro-organismes produisent des enzymes qui sont exportées hors de la cellule pour prédigérer les pesticides mal transportés. Une fois à l'intérieur d'un organisme, un pesticide peut être métabolisé via les systèmes enzymatiques internes [19].

Selon le polluant organique spécifique, sa dégradation biologique peut être très rapide ou lente et ce en fonction de la capacité des micro-organismes à produire les enzymes nécessaires à la dégradation des composants actifs des pesticides et des conditions environnementales idéales pour que les réactions se produisent [4, 19].

Parmi les enzymes responsables de la biodégradation, on retrouve les :

- Oxidoréductases : c'est un vaste groupe d'enzymes qui catalysent le transfert d'électrons d'une molécule à une autre.

Exemples :

- Monooxygénases : ces enzymes permettent l'incorporation d'un atome d'oxygène au substrat et l'utilisation du substrat comme agent réducteur. Elles sont utiles pour les réactions de désulfuration, déshalogénéation, dénitrification, ammonification et hydroxylation du substrat.
- Dioxygénases : elles permettent l'introduction de deux atomes d'oxygène dans le substrat entraînant un clivage intra-diol et un clivage extra-diol avec formation d'un produit aliphatique.
- Laccases : elles permettent l'oxydation, la décarboxylation et la déméthylation du substrat.
- Phosphotriesterases : cette enzyme est fréquemment utilisée pour dégrader les phosphotriesters.
- Lyase : c'est une enzyme qui catalyse la rupture de certaines liaisons sans oxydation ni hydrolyse.

- Hydrolases : c'est une classe d'enzyme qui catalyse les réactions d'hydrolyse. Exemples :
 - Lipases : elles sont responsables de l'hydrolyse des triacylglycérols en glycérols et en acides gras libres.
 - Cellulases : elles sont responsables de l'hydrolyse le substrat en glucides simples.
 - Protéases : ces enzymes hydrolysent les liaisons peptidiques en milieu aqueux [37–39].

Les hydrolases et les oxygénases sont les deux classes d'enzymes les plus importantes, responsables de la catalyse de la réaction de biotransformation des pesticides [40].

La dégradation des composés organiques peut être divisée en trois groupes comme suit, (figure (9)) :

- La biodégradation commence immédiatement et les composés sont facilement utilisés comme sources d'énergie et de croissance (dégradation immédiate) ;
- La biodégradation commence lentement et nécessite une période d'acclimatation avant qu'une dégradation plus rapide ne se produise ;
- Les composés sont persistants et la biodégradation est lente ou ne se produit pas [19].

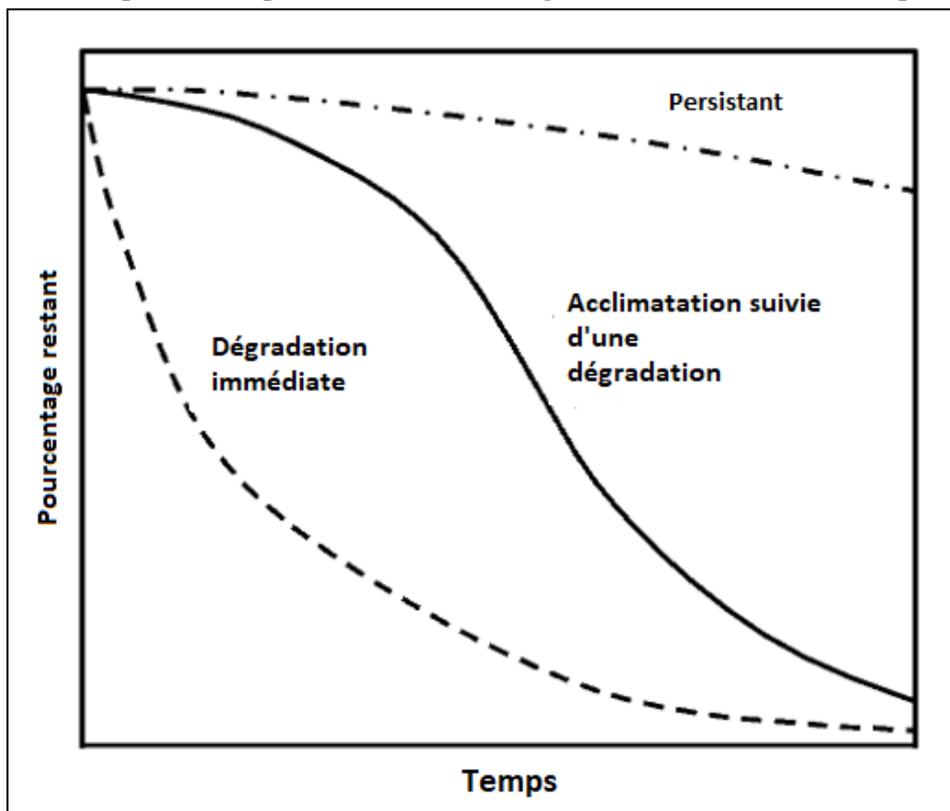


Figure 9: Biodégradation des composés organiques [19].

En plus de la biodégradation, 4 autres mécanismes peuvent être impliqués dans la transformation microbienne des pesticides :

- Le co-métabolisme: le pesticide est transformé par des réactions métaboliques mais ne sert pas de source d'énergie ou de nutriment pour les micro-organismes.

- La polymérisation ou conjugaison: les molécules de pesticide sont liées à d'autres pesticides ou à des composés naturels.
- L'accumulation: le pesticide est adsorbé ou accumulé par la biomasse microbienne.
- Les effets secondaires de l'activité microbienne: le pesticide est transformé par des modifications du pH, des conditions d'oxydoréduction, des produits réactifs, etc. induits par les micro-organismes[36].

Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués lors de la transformation microbienne des pesticides et selon les conditions environnementales divers produits peuvent dériver du même composé [36].

La biodégradation implique un micro-organisme où résulte de l'effet de consortiums de micro-organismes [36].

Parmi les micro-organismes capables de dégrader les pesticides, on retrouve : les champignons, les bactéries, les cyanobactéries, les actinobactéries; les bactéries et les champignons étant les principaux micro-organismes du sol capables de dégrader les pesticides [4, 41].

Les espèces bactériennes qui dégradent les pesticides appartiennent principalement aux genres *Flavobacterium*, *Arthobacter*, *Azotobacter*, *Raoultella*, *Burkholderia* et *Pseudomonas* [41].

1.6 Effets des pesticides :

Suite à l'épandage des pesticides par voie aérienne, une partie seulement atteint réellement la cible visée (mauvaise herbe, insecte, ravageur, champignons, etc.), la quantité restante (30 à 99,7%) peut ainsi contaminer les différents compartiments environnementaux (eau, air et sol) et atteindre par la même occasion les animaux et les plantes non ciblés en étant absorbée par eux, stockée dans les graisses animales ou les tissus végétaux et rejetée en partie (sueur, urines, selles, évapotranspiration) [42].

1.6.1 Effets des pesticides sur la santé :

Les pesticides peuvent pénétrer dans l'organisme de différentes manières : par ingestion (involontaire ou non), par inhalation ou par voie cutanée. Les personnes directement exposés aux pesticides sont celles qui manipulent les produits, au moment de la préparation, de l'application, du nettoyage des appareils ou du vidage des cuves. Ce sont principalement des agriculteurs et des professionnels utilisant ces produits, ainsi que des particuliers pour un usage domestique. Ces personnes sont généralement sujettes à des intoxications aiguës. Cependant, l'ensemble de la population est également concernés par ces effets lors de l'exposition aux résidus découlant de l'utilisation de pesticides, au travers de l'alimentation et de l'environnement [16, 42].

1.6.1.1 Toxicité des pesticides :

La toxicité d'un pesticide est son aptitude à provoquer des dommages ou effets indésirables à un système vivant, qu'il s'agisse du corps humain ou de certaines parties du corps comme les poumons ou le système respiratoire [43, 44].

Ces effets indésirables peuvent aller de symptômes légers comme des maux de tête à des symptômes graves comme le coma, les convulsions ou la mort [43].

La majorité des effets toxiques sont réversibles et ne causent pas de dommages permanents à l'organisme à condition qu'ils fassent l'objet d'un traitement médical rapide. Par contre, certains pesticides engendrent des dommages irrémédiables [43].

La toxicité d'un pesticide dépend de plusieurs facteurs :

- La dose : qui représente la quantité de pesticide à laquelle la surface ou l'être vivant est exposé.
- Le temps : c'est la fréquence d'exposition [44].

En plus de ces derniers, d'autres facteurs rentrent en jeu comme la nature de la substance toxique, l'organisme, la formulation (exemple : poudre ou liquide), le mode et les conditions d'application, les voies de pénétration, la période et le niveau d'exposition, la nature des adjuvants introduits dans la préparation commerciale [12, 45–47].

La quantité de substance mise en jeu, la fréquence d'exposition et le temps nécessaire à l'apparition des symptômes toxiques amènent à deux types de toxicité : la toxicité aiguë et la toxicité chronique (Tableau 5) [43, 44].

Tableau 5: les différents types de toxicité [43].

Type de toxicité	Nombre d'expositions	Le temps requis pour développer des symptômes
Toxicité aiguë	En général une seule	Immédiat (quelques minutes à quelques heures)
Toxicité chronique	Plus d'une exposition	Une semaine à des années

1.6.1.1.1 Toxicité aiguë :

La toxicité aiguë représente le degré de toxicité d'un pesticide pour la faune ou la flore après une seule exposition de courte durée et à des quantités relativement élevées du pesticide [43, 44].

Un pesticide possédant une toxicité aiguë élevée entraîne la mort même si la quantité absorbée est infime. La toxicité aiguë peut être mesurée en terme de toxicité orale aiguë, toxicité cutanée aiguë et de toxicité par inhalation aiguë [43, 44].

Cette toxicité est évaluée par l'indice DL_{50} qui signifie la dose entraînant une létalité aiguë pour 50 % des animaux auxquels le produit chimique a été administré dans des conditions de laboratoire contrôlées [43].

Le pesticide présente une toxicité aiguë de plus en plus élevée pour des valeurs de DL_{50} qui sont faibles. La DL_{50} est exprimée par des milligrammes/kilogrammes (quantité de substance chimique par le poids corporel de l'animal). Cet indice concerne généralement l'administration orale (DL_{50} orale) et cutanée (DL_{50} cutanée) du produit [43, 48].

La toxicité par inhalation aiguë est mesurée quant à elle par la concentration létale CL_{50} . Les valeurs de la CL_{50} sont mesurées en milligrammes par litre (mg/L). Comme pour la DL_{50} , la toxicité aiguë par inhalation est d'autant plus élevée que la valeur de la CL_{50} est faible [43].

1.6.1.1.1 Effets de la toxicité aiguë :

Chaque année, il y a environ 3 millions de cas d'empoisonnements aigus aux pesticides qui sont signalés. 2 millions de ces cas sont des tentatives de suicide et le reste sont des cas d'empoisonnements professionnels. Les effets d'une intoxication aiguë apparaissent généralement peu de temps après le contact ou l'exposition au pesticide. Parmi les symptômes qui sont relatifs à une intoxication aiguë chez l'homme, on retrouve : la fatigue, les maux de tête, les douleurs corporelles, les éruptions cutanées, une mauvaise concentration, une sensation de faiblesse, des vertiges, des nausées, des vomissements, une transpiration excessive, des troubles de la vision, des tremblements, des crises de panique, des crampes, etc., et dans les cas graves, le coma et la mort [12, 49, 50].

Le tableau qui suit résume les différents symptômes allant des plus légers au plus sévères (tableau 6):

Tableau 6: Symptômes liés à une exposition aiguë aux pesticides [51].

Intoxication légère	Intoxication modérée	Intoxication sévère
<ul style="list-style-type: none"> • Irritation du nez, de la gorge, des yeux ou de la peau. • Maux de tête • Vertiges • Perte d'appétit • Soif • Nausées • Diarrhée • Transpiration • Faiblesse ou fatigue • Agitation • Nervosité • Changement d'humeur • Insomnie 	<p>Un ou plusieurs des symptômes légers, plus un ou plusieurs des éléments suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vomissements • Salivation excessive • Toux • Sensation de constriction dans la gorge et la poitrine • Crampes abdominales • Vision floue • Accélération du rythme cardiaque • Respiration excessive • Grande faiblesse • Incoordination musculaire • Tremblements • Confusion mentale 	<p>Un ou plusieurs des symptômes légers, plus un ou plusieurs des symptômes suivants:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Incapacité à respirer • Excès de glaires ou de mucus dans les voies respiratoires • Brûlures chimiques sur la peau • Pupilles petites ou en pointe • Augmentation du rythme respiratoire • Perte de réflexes • Spasmes musculaires incontrôlables • Perte de connaissance • Mort

1.6.1.1.2 La toxicité chronique :

La toxicité chronique fait référence aux effets néfastes qui sont le résultat de l'absorption de quantités infimes de pesticide de manière répétée durant plusieurs jours, mois ou même plusieurs années. Le produit toxique peut même s'accumuler dans l'organisme. La toxicité chronique peut même survenir suite à des intoxications aiguës répétées [43, 48].

La toxicité chronique se révèle graduellement et de manière beaucoup plus complexe et subtile, ce qui explique le manque de données sur cette dernière en comparaison avec la toxicité aiguë. Les symptômes de la toxicité chronique apparaissent alors que l'organisme n'est plus en contact avec le pesticide contrairement à la toxicité aiguë dont les effets sont immédiats [43, 48].

Ainsi, il n'existe pas de mesure standard pour les études de toxicité chronique. L'étude de la toxicité chronique d'un produit chimique dépend de l'effet indésirable étudié [43, 44].

1.6.1.1.2.1 Effets de la toxicité chronique :

Les symptômes d'une intoxication chronique ne se manifestent pas immédiatement. Les travailleurs agricoles sont les plus exposés mais la population générale l'est également en raison de la contamination des aliments, de l'eau ou de la dispersion des pesticides en provenance des champs, ainsi que leur accumulation à travers la chaîne trophique. De plus en plus d'études établissent un lien entre l'apparition de maladies chroniques affectant les systèmes nerveux, reproductif, rénal, cardiovasculaire et respiratoire et l'exposition aux pesticides [49, 50, 52].

Le tableau (Tableau 7) qui suit liste les différentes maladies chroniques qui sont liées à une exposition prolongée aux pesticides en se basant sur plusieurs études :

Tableau 7: Maladies chroniques liées à l'exposition aux pesticides[49].

Maladie		Pesticide
Cancer	Cancer du cerveau chez les adultes	Chlorpyrifos
	Cancer de la prostate	Pesticides organochlorés : DDT, lindane. Simazine (famille des triazines)
	Leucémie lymphocytaire	Pesticides organophosphorés
Maladie neuro-dégénérative	La maladie de Parkinson	insecticides organochlorés : lindane, DDT.
	La maladie d'Alzheimer	Pesticides organochlorés et organophosphorés
Maladies cardio-vasculaires		Pesticides organophosphorés
Diabète	Diabète type 2	Pesticides organochlorés PCB (Polychlorobiphényles)
Maladies respiratoires	Asthme	Pesticides organophosphorés: DDT, parathion, coumaphos, Pesticide organochloré : heptachlore Carbamate

Parmi les cancers qui peuvent être liés à une exposition à des pesticides il y a les tumeurs cérébrales, les hémopathies malignes, le cancer du poumon, le cancer du sein, le cancer des ovaires et le cancer de la prostate [53].

Les pesticides peuvent également endommager le système nerveux humain. Plusieurs études ont montré qu'une exposition à certains pesticides pourrait augmenter le risque de développer la maladie de Parkinson et d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. De plus, certaines indications suggèrent que les pesticides pourraient provoquer des perturbations des fonctions cognitives et psychomotrices et la dépression. Les pesticides provoquent également l'affaiblissement du système immunitaire et des effets sur le système reproducteur qui peuvent engendrer une fausse couche, une mortinaissance, une naissance prématurée ou un faible poids à la naissance [50, 52, 54].

Le tableau (Tableau 8) qui suit donne quelques exemples d'insecticides et les symptômes qu'ils peuvent engendrer [48]:

Tableau 8: Exemples de symptômes provoqués par certains pesticides [48].

Classe	Nature des effets toxiques	Symptômes	
		Intoxication aiguë	Intoxication chronique
Organochlorés Dicofol Diénochloré Endosulfan Lindane Méthoxychloré Etc.	Atteinte du système nerveux central (interférence avec la transmission des impulsions nerveuses). Une partie importante de la dose absorbée peut être accumulée dans les tissus adipeux	LÉGERS : Etourdissement, nausées, vomissements, céphalées, désorientation, perturbations de l'équilibre. MODÉRÉS À SÉVÈRES : Hyperexcitabilité, anxiété, faiblesses musculaires, incoordination, tremblements, convulsions, coma, arrêt respiratoire.	Des altérations de l'activité électrique du cerveau et des altérations cellulaires au niveau du foie et des reins sont possibles. Certains de ces produits ont induit des cancers chez l'animal.
Organophosphorés Chlorpyrifos Diazinon Malathion Méthamidophos Parathion Etc.	Inhibition irréversible des cholinestérases. Une toxicité additive importante est possible avec les organophosphorés.	LÉGERS : Céphalées, étourdissements, transpiration, larmoiements, salivation, vision trouble, serremments de poitrine, fasciculations des muscles (paupières, lèvres et langue).	L'exposition répétée aux organophosphorés (OPs) peut avoir un effet cumulatif. L'exposition chronique aux OPs a parfois été associée à des atteintes du système nerveux central

<p>Carbamates Aldicarbe Carbaryl Propoxur Etc</p>	<p>Une neuropathie retardée a été observée avec certains organophosphorés.</p> <p>Avec les insecticides de type carbamates, l'inhibition des cholinestérases est plus facilement réversible et les effets sont généralement moins importants.</p>	<p>MODÉRÉS : Douleurs abdominales, nausées, vomissements, diarrhée, hypersécrétions bronchiques, bradycardie ou tachycardie, fasciculations musculaires, tremblements, faiblesse et fatigue.</p> <p>SÉVÈRES : Myosis intense, transpiration, incontinence, confusion, œdème pulmonaire, respiration difficile, cyanose, défaillance cardiorespiratoire, convulsions, perte de conscience et coma.</p>	<p>ou à des effets sur les fonctions neurophysiologiques périphériques.</p> <p>La possibilité de problèmes hépatiques, rénaux, immunologiques, cardiovasculaires, endocriniens, respiratoires, hématologiques, oculaires, gastro-intestinaux et des modifications du comportement ont aussi été soulevées dans le cas des organophosphorés. L'apparition de certaines formes de cancer a aussi été associée à l'utilisation des OPs.</p> <p>Des effets chroniques n'ont que rarement été rapportés pour les carbamates.</p>
---	---	---	---

Chapitre 2 : Généralités sur les pyréthrinoïdes

2 Généralités sur les pyréthrinoïdes:

2.1 Définition :

Les pyréthrinoïdes sont des insecticides synthétiques dont la structure est dérivée des pyréthrines naturelles. Ils ont été formulés dans le but d'accroître leur activité et leur persistance [55, 56].

Les pyréthrines sont des composés naturels extraits à partir des fleurs du pyrèthre ou du chrysanthème. Ce sont des substances actives qui possèdent des propriétés insecticides. Les six constituants insecticides (figure 10) de l'extrait de pyrèthre sont des substances dérivées de l'acide chrysanthémique (pyréthrine I, cinérine I, jasmoline I) ou de l'acide pyréthrique (pyréthrine II, cinérine II et jasmoline II) [55–58].

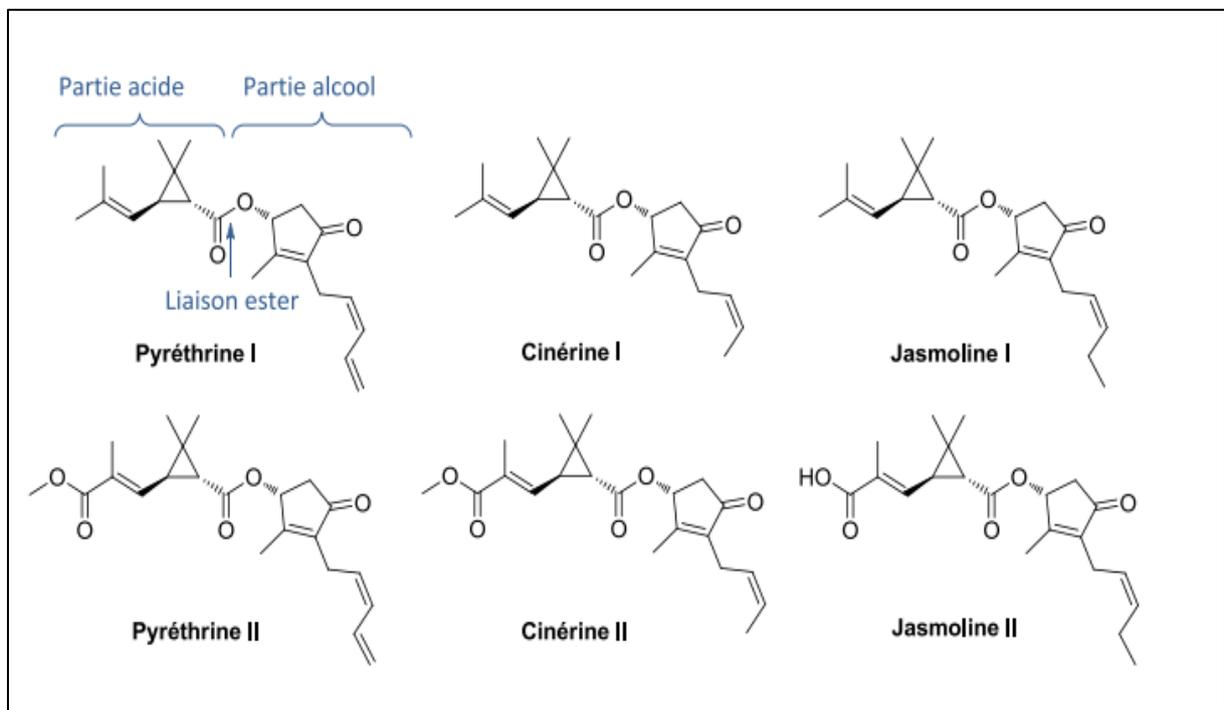


Figure 10: Composition chimique des pyréthrines naturelles [58].

Les pyréthrinoïdes comme les pyréthrines naturelles sont des ester constitués d'une partie acide reliée à une partie alcool [58, 59].

2.2 Historique:

L'utilisation du pyrèthre remonte à l'antiquité. A cette époque, les chinois avaient recours à la poudre de fleurs séchées, les pyrèthres, à des fins domestiques; sa très faible photostabilité limitait son efficacité d'où l'incapacité à l'employer pour la protection des cultures [56, 57, 60].

Au début du 20^{ème} siècle, le pyrèthre naturel a attiré l'attention des chercheurs du fait de sa faible toxicité et son action rapide malgré l'exploit réalisé dans le développement des insecticides organochlorés et organophosphorés. Durant la deuxième guerre mondiale, le

premier pyréthriinoïde synthétique commercial fut l'alléthrine. Cette dernière tout comme les pyréthrines, se dégradait rapidement à la lumière du soleil. Elle fut obtenue par le remplacement de la chaîne latérale pentadiényle de la pyréthrine I par une fraction plus simple possédant les mêmes propriétés stériques et électroniques (Figure 11). L'étape suivante a consisté au remplacement du centre d'insaturation alcényle de la partie alcool des pyréthrines et de l'alléthrine par un substituant aromatique qui a conduit à l'apparition d'autres analogues chimiques. Le second pyréthriinoïde synthétique commercial fut la resméthrine, synthétisée en 1966 par la substitution du cycle cyclopenténolone des alcools des pyréthrines et de l'alléthrine par un fragment hétérocyclique insaturé qui possédait une plus grande stabilité à la lumière, une meilleure activité en tant qu'insecticide, de plus, elle était moins toxique pour les mammifères que la pyréthrine I [56, 60].

En 1972, une série de trois composés a été produite : la perméthrine, la cyperméthrine et la deltaméthrine. La perméthrine fut la première à présenter des propriétés propices à une utilisation en milieu agricole, elle contient à la fois des modifications dans la partie alcool et la partie acide, avec l'introduction d'atomes de chlores pour remplacer les groupements méthyle ; ceci lui a permis d'acquérir une photostabilité accrue sans perte d'activité insecticide. L'activité insecticide fut augmentée par l'introduction de groupement cyano dans la partie alcool et de nouveaux composés ont vu le jour comme la deltaméthrine et la cyperméthrine [56, 60].

Les composés dépourvus du substituant α -cyano sont appelés pyréthriinoïdes de type I (Figure 11), tandis que les composés comportant un groupe α -cyano sont appelés pyréthriinoïdes de type II (Figure 11) :

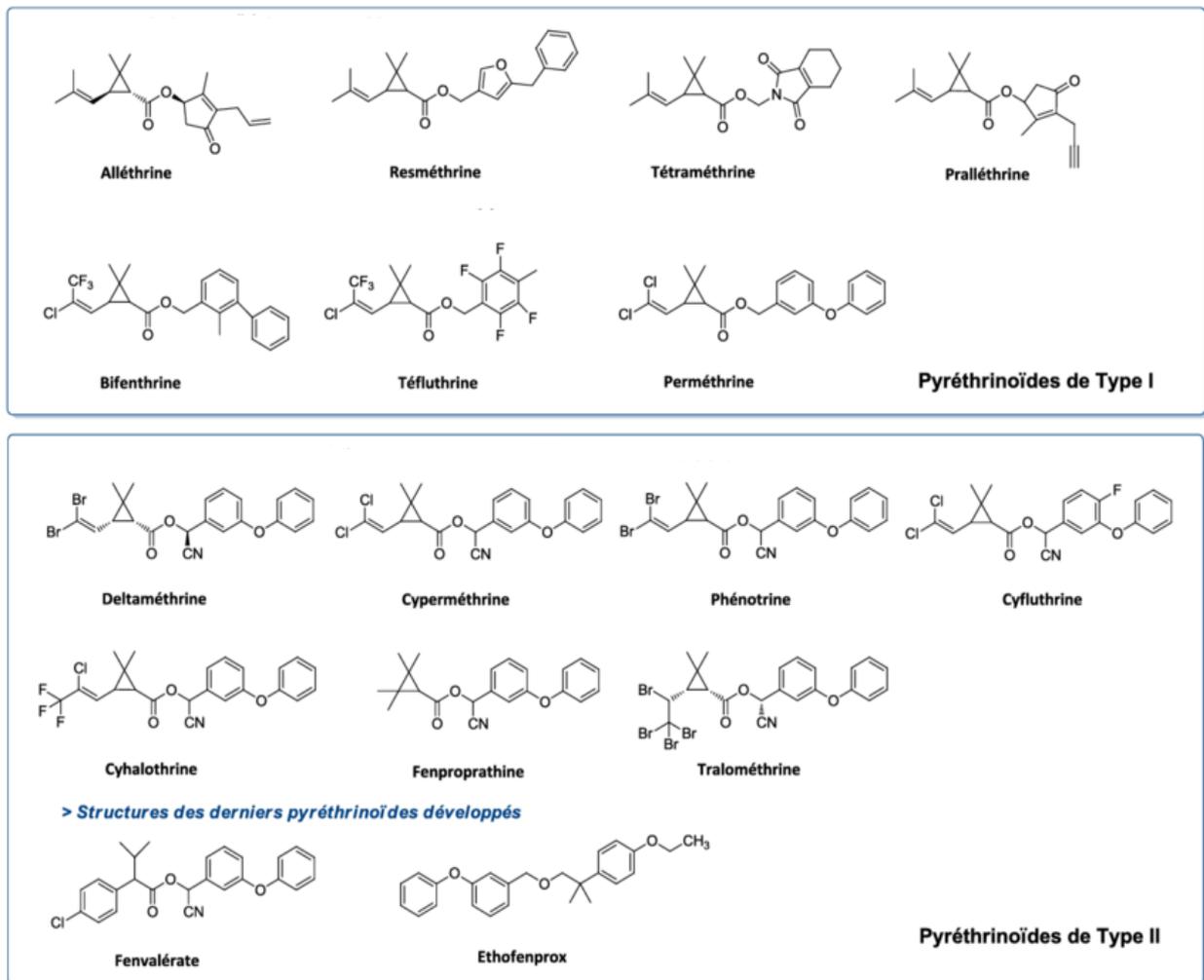


Figure 11: Représentation chimique des pyréthriinoïdes [58].

D'autres changements ont permis de synthétiser de nouveaux composés comme le fenvalérate par le remplacement de la fraction acide 2,2-diméthylcyclopropanecarboxylique des pyréthrines. Une autre modification était plus radical qui consistait à substituer la liaison ester centrale par des structures qui conservaient la configuration globale de la molécule (par exemple l'étofenprox)[56].

2.3 Propriétés des pyréthriinoïdes :

Les pyréthriinoïdes sont des molécules qui existent sous forme pure sous différentes formes allant du liquide au solide ; à température ambiante les pyréthriinoïdes sont généralement retrouvés sous forme d'une substance cireuse. La majorité d'entre eux se trouve sous forme de mélange d'isomères : de 4 à 8 isomères, c'est le cas de la cyperméthrine. La masse moléculaire (M) des pyréthriinoïdes est nettement supérieure à 300 g/mol (tableau 9) [58, 61, 62].

Tableau 9: Quelques propriétés des pyréthriinoïdes [61].

Pyréthriinoïde	Type	Formule moléculaire	M (g.mol ⁻¹)	Log K _{ow}	Solubilité dans l'eau 20°C (µg.L ⁻¹)	DT ₅₀ (en jours)
Alléthrine	I	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	302,4	4,96	0,1	-
Bifenthrine	I	C ₂₃ H ₂₂ O ₂ ClF ₃	422,9	6,6	1	26
Imiprothrine	I	C ₁₇ H ₂₂ N ₂ O ₄	318,4	2,43	93,500	-
Kadéthrine	I	C ₂₃ H ₂₄ O ₄ S	396,5	6,29	14	-
Perméthrine	I	C ₂₁ H ₂₀ O ₃ Cl ₂	391,3	6,1	200	13
Phénothrine	I	C ₂₃ H ₂₆ O ₃	350,5	6,01	9,7	-
Pralléthrine	I	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	300,4	4,49	8,030	-
Resméthrine	I	C ₂₂ H ₂₆ O ₃	338,5	5,43	10	30
Tétraméthrine	I	C ₁₉ H ₂₅ NO ₄	331,4	4,6	1,830	3
Transfluthrine	I	C ₁₅ H ₁₂ Cl ₂ F ₄ O ₂	371,2	5,46	57	7
Cyfluthrine	II	C ₂₂ H ₁₈ NO ₃ Cl ₂ F	434,3	6	6,6	33
Cyhalothrine	II	C ₂₃ H ₁₉ NO ₃ ClF ₃	449,9	6,9	4	57
Cyperméthrine	II	C ₂₂ H ₁₉ NO ₃ Cl ₂	416,3	5,3	9	60
Deltaméthrine	II	C ₂₂ H ₁₉ NO ₃ Br ₂	505,2	4,6	0,2	13
Fenvalérate	II	C ₂₅ H ₂₂ NO ₃ Cl	419,9	5,01	1	40
Fluméthrine	II	C ₂₈ H ₂₂ Cl ₂ FNO ₃	510,4	-	-	-
Fluvalinate	II	C ₂₆ H ₂₂ N ₂ O ₃ ClF ₃	502,9	3,85	2	7
Tralométhrine	II	C ₂₂ H ₁₉ NO ₃ Br ₄	665	5	80	3

Ces molécules possèdent une très faible solubilité dans l'eau, ainsi, beaucoup sont insolubles en milieu aqueux, avec un logarithme du coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) entre 4 et 7. Cependant, ils sont très solubles dans les lipides. Leurs pressions de vapeur, indicateur de leur volatilité, est très faible. De plus, certains pyréthriinoïdes possèdent une plus grande stabilité à la lumière grâce à la présence d'une variété de substituants halogénés et non halogénés présents dans la partie acide. Néanmoins, la demi-vie de ces composés (DT₅₀) est faible, la dégradation de 50% de ces molécules se fait en une durée inférieure à 60 jours (tableau 9) [59, 61, 62].

2.4 Mode d'action des pyréthriinoïdes:

Les pyréthriinoïdes comme la majorité des insecticides de synthèse ciblent les composants du système nerveux des insectes et des mammifères [63–65].

L'activité des pyréthriinoïdes consiste en la perturbation de la membrane nerveuse de l'insecte en maintenant l'ouverture ou en retardant la fermeture et la désactivation des canaux sodiques voltage dépendants (VGSC) [64].

Dans les conditions normales, les VGSC sont fermées. Elles s'ouvrent en présence de stimulation extracellulaire pour permettre le passage des ions Na⁺ ce qui génère un potentiel

d'action (ou influx nerveux) qui diminue lors de la fermeture des VGSC. Ce mécanisme entraîne des réponses physiologiques comme les contractions musculaires. La présence des pyréthrinoïdes, qui se lient au VGSC, empêche l'inactivation de ce dernier d'où un passage continu des ions sodiums du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire avec augmentation de leur nombre ce qui engendre la dépolarisation de la membrane au-delà de la normale et un potentiel d'action persistant [63, 64].

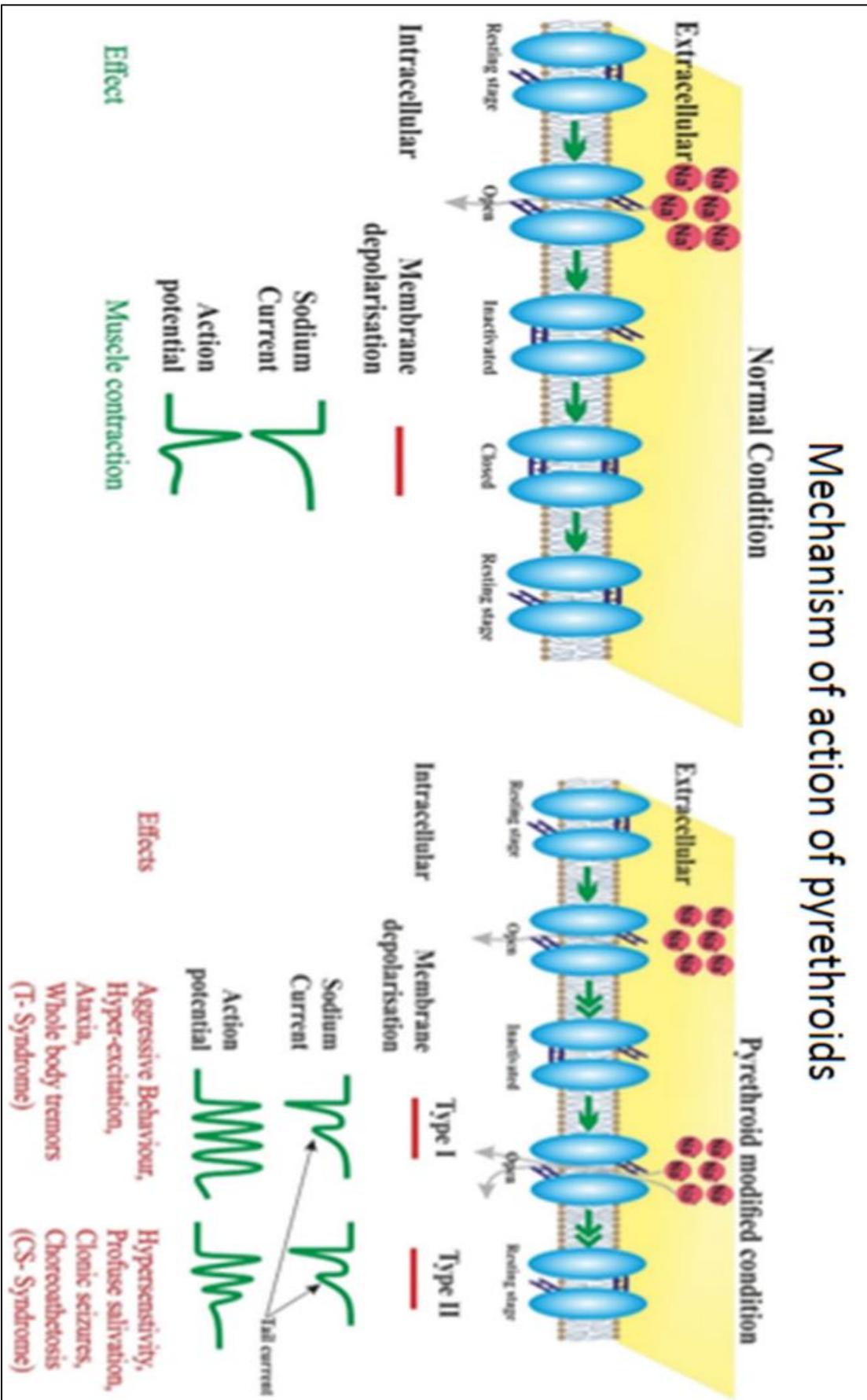


Figure 12: Mécanisme d'action des pyréthrinoïdes [64].

Les pyréthriinoïdes de type II agissent également sur d'autres canaux ioniques voltage-dépendants (ions chlorure et ions calcium) et affectent ainsi plus gravement le système nerveux. [64, 66].

Les pyréthriinoïdes de type I provoquent des tremblements et une hyperexcitabilité, tandis que ceux du type II provoquent une hyperexcitabilité, une salivation, des convulsions et une choréoathétose [61].

Les pyréthriinoïdes sont moins toxiques pour les mammifères que les insectes pour lesquelles ils le sont 2250 fois davantage. Ceci est dû au fait que les insectes ont une température corporelle moins élevée et des canaux sodiques plus sensibles. De plus, chez les mammifères, la métabolisation des pyréthriinoïdes se déroule rapidement et leur absorption par la peau est faible [2, 61].

2.5 Biodégradation des pyréthriinoïdes :

Plusieurs sources de micro-organismes comme les sols contaminés, les eaux usées, les boues d'épuration et les boues activées sont un moyen idéal pour l'obtention et l'isolement de micro-organismes aptes à dégrader les insecticides. De plus, les pyréthriinoïdes étant toxiques pour la faune marine, plusieurs souches obtenues de milieux marins se sont avérées efficaces pour leur dégradation [67–69].

Parmi les isolats capables de dégrader les pyréthriinoïdes: les bactéries (dont les actinomycètes), les champignons et les algues les transforment par co-métabolisme ou directement. Comme exemple de bactéries capables de biodégrader les pyréthriinoïdes, il y a les bactéries appartenant aux genres *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sphingomonas* et *Klebsiella*. Alors que les principaux champignons identifiés capables de biodégrader les pyréthriinoïdes appartiennent aux genres : *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Microsphaeropsis*, *Streptomyces* et *Westerdykella* [68, 70, 71].

L'utilisation d'une source de carbone autre que l'insecticide pyréthriinoïdes facilite l'adaptation des cellules microbiennes aux molécules du pesticide, elle permet d'améliorer leur croissance et leur biodégradation. Néanmoins, la plupart des souches pouvant dégradées les pyréthriinoïdes les utilisent comme seule source de carbone. Et puisque les pyréthriinoïdes possèdent une structure similaire, les souches les dégradant possèdent un large spectre de dégradation [68].

La biodégradation se fait principalement par l'hydrolyse de la liaison ester centrale des pyréthriinoïdes, qui conduit à la formation d'un acide carboxylique et d'un alcool. Les produits intermédiaires de la biodégradation des pyréthriinoïdes sont généralement le PBA (acide 3-phénoxybenzoïque), PBAlc (alcool 3-phénoxybenzyle) et PBAlc (3-phénoxybenzaldéhyde) [68]. Ces métabolites peuvent se convertir entre-eux pendant la biodégradation comme le montre la figure 13 :

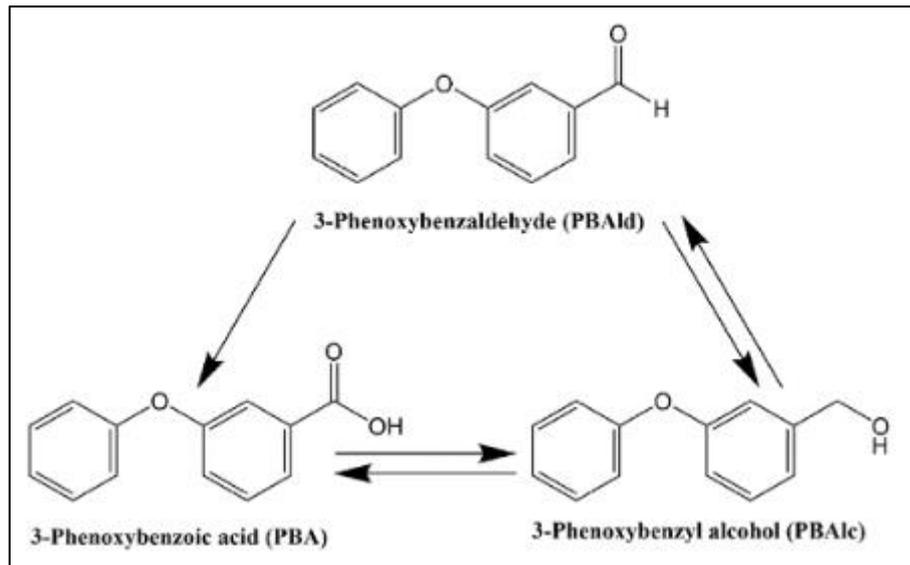


Figure 13: Les différentes transformations possibles entre le PBA, le PBAc et le PBAlc [68].

Les métabolites et les voies de biodégradation des pyréthriinoïdes par les micro-organismes sont différents et cela même pour un même pyréthriinoïde. Ces différences peuvent résulter des propriétés biochimiques et périodes d'incubation des micro-organismes mais également de la disposition des pyréthriinoïdes dans l'espace (stéréo-isomérisation). De plus, la capacité à détecter les métabolites dépend de leur stabilité et de la fréquence de prélèvement des échantillons pour l'analyse [71, 72].

Le schéma typique de la biodégradation des pyréthriinoïdes de type I est leur transformation en acide cyclopropanoïque et en PBAc, puis en PBAlc pour donner l'acide 1,2-benzènedicarboxylique ou l'ester butylique décyclique de l'acide 1,2-benzènedicarboxylique comme le montre la figure 14. Néanmoins, la biodégradation des pyréthriinoïdes de type I n'entraîne pas toujours la formation du PBA et du 3-phénoxybenzaldéhyde comme dans le cas de la dégradation de la bifenthrine par la souche *Candida pelliculosa* ZS-02 qui dégrade ce pyréthriinoïde sans formation de ces métabolites [68, 73].

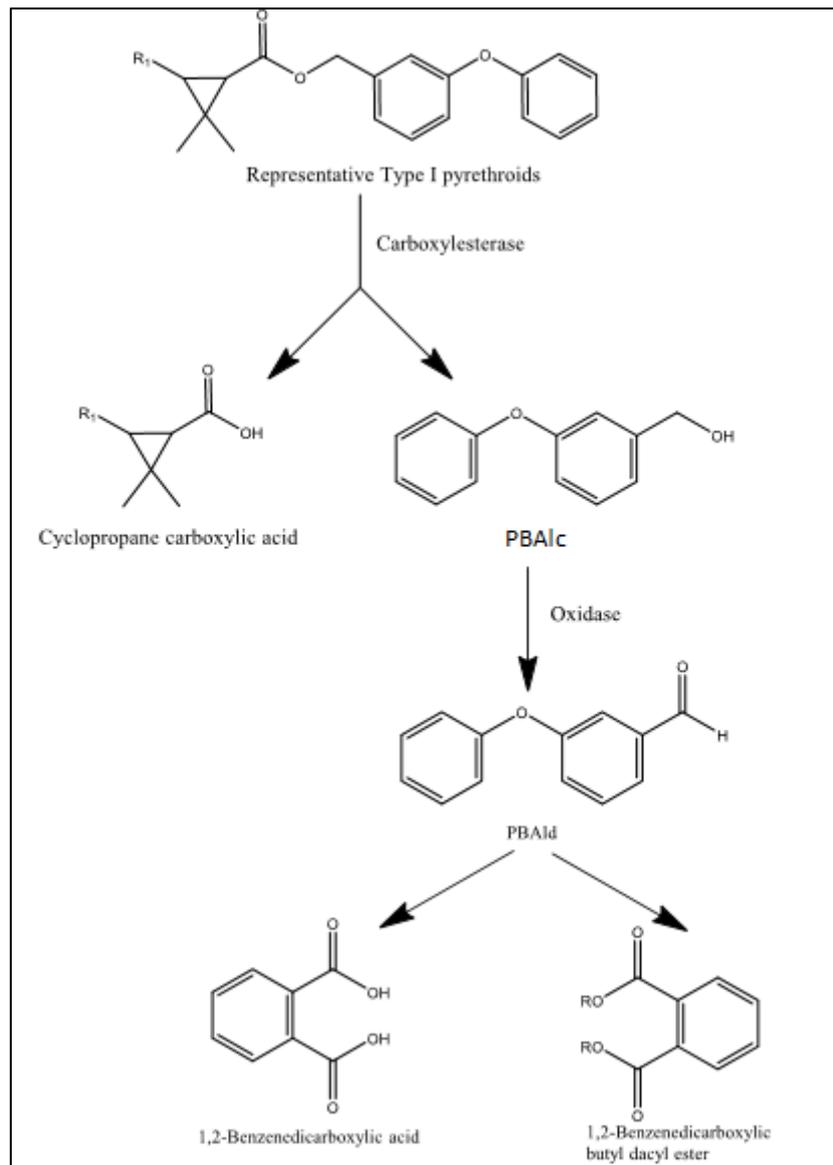


Figure 14: Schéma général proposé pour la biodégradation d'un pyréthriinoïde de type I [68].

Les pyréthriinoïdes de type II contiennent un groupement α -cyano qui est absent chez les pyréthriinoïdes de type I, de ce fait, leur mécanisme de biodégradation est légèrement différent de celui du type I et plusieurs voies de biodégradation sont possibles (figure 15). L'hydrolyse de la liaison ester centrale conduit à la formation du composé 2-hydroxy-2-(3-phénoxyphényl) acétonitrile qui sera à son tour transformé en PBAld ou en 3-phénoxybenzamide, ces deux derniers sont transformés en PBA, qui après transformation peut générer divers produits. Ces différences observées sont régies par la diversité des structures chimiques des pyréthriinoïdes mais les principaux mécanismes de dégradation sont semblables [68].

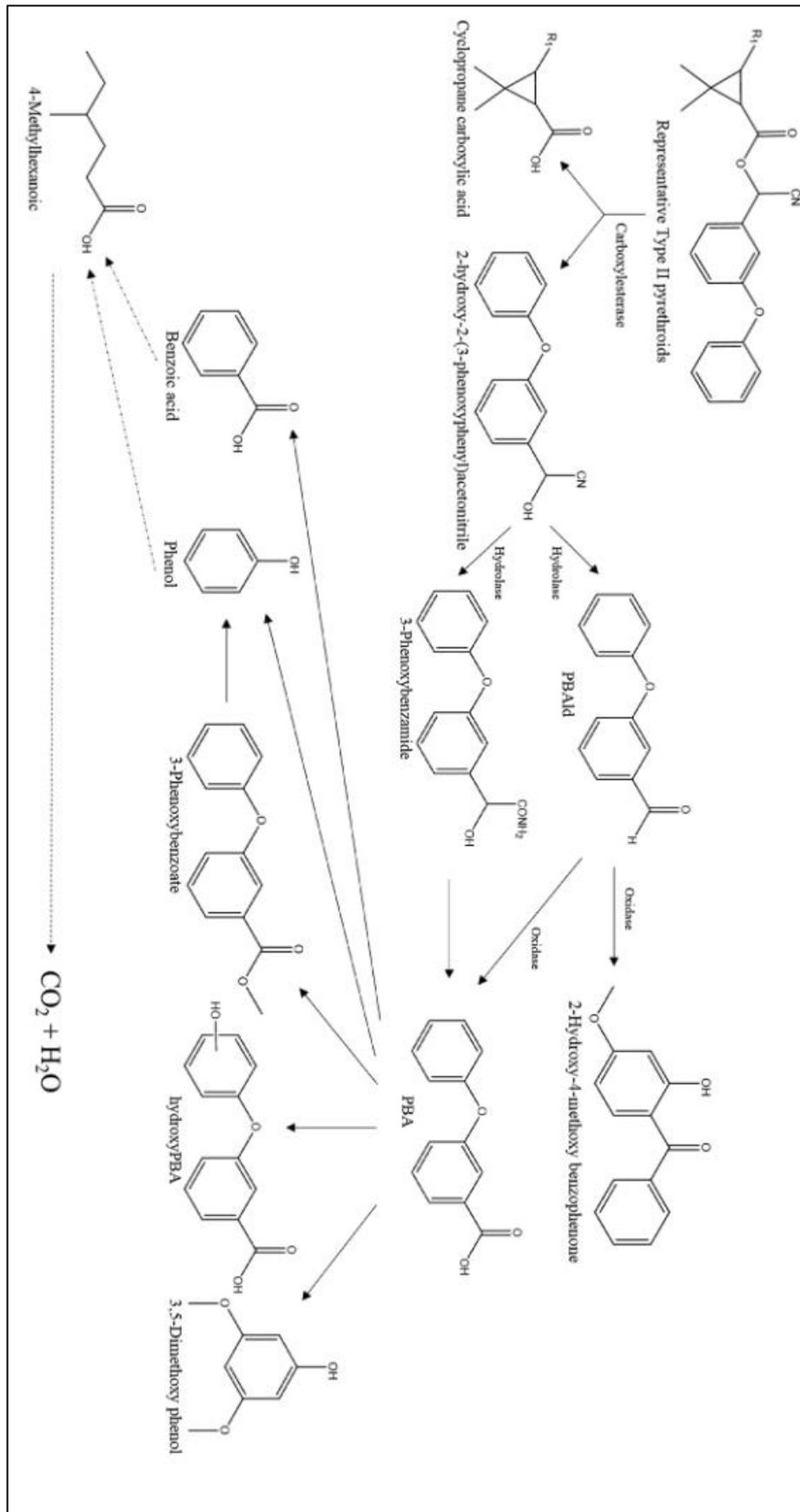


Figure 15: Schéma général proposé pour la biodégradation d'un pyréthrinoïde de type II [68].

L'hydrolyse de la liaison ester des pyréthriinoïdes lors de la dégradation microbienne peut se faire grâce à différentes enzymes comme la carboxylestérase, la monooxygénase et l'aminopeptidase. Cependant, la principale enzyme est la carboxylestérase (EC 3.1.1.1) qui permet de produire un carboxylate et un alcool. La réaction d'hydrolyse par la carboxylestérase permet d'éliminer l'activité insecticide des pyréthriinoïdes réduisant considérablement leur toxicité. Cette famille d'enzyme (les carboxylestérases) permet l'hydrolyse d'un grand nombre de pesticides contenant des esters autres que les pyréthriinoïdes comme les carbamates et les organophosphates. Les pyréthriinoïdes possèdent un à trois centres chiraux, d'où l'existence de plusieurs stéréoisomères. Généralement, les isomères cis sont hydrolysés moins rapidement que les isomères trans [68, 71, 72, 74, 75].

Chapitre 3 :

La cyperméthrine

3 La cyperméthrine :

La cyperméthrine est un insecticide qui fait partie de la famille des pyréthrinoïdes synthétiques. Elle fut synthétisée en 1974 et commercialisée en 1977. Elle est utilisée en agriculture pour lutter contre divers parasites du coton, des fruits et des légumes. Elle est également efficace contre un large éventail de parasites dans la santé publique et l'élevage et permet de lutter contre les cafards, les puces, etc. Elle agit par contact et par ingestion [13, 76, 77].

La molécule comporte trois centres chiraux, deux dans le cycle cyclopropane et un sur le carbone alpha cyano (Figure 16) ce qui donne lieu à 8 stéréo-isomères, 4 paires d'énantiomères. Ces isomères sont généralement regroupés en quatre isomères cis (2 paires d'énantiomères cis) et quatre trans (2 paires d'énantiomères trans) ; le groupe cis étant l'insecticide le plus puissant. Par convention, les 4 isomères où le groupe dichlorovinyle est trans par rapport au groupe phénoxybenzyle sont appelés isomères trans, et les 4 autres isomères sont appelés isomères cis [76, 78].

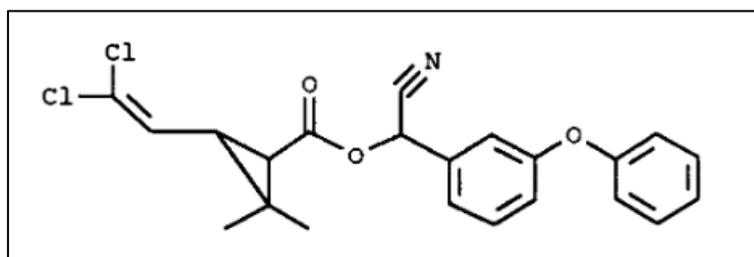


Figure 16: Structure de la cyperméthrine [13].

3.1 Propriétés physico-chimiques :

Les propriétés de la cyperméthrine sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 10) :

Tableau 10: Propriétés physico-chimiques de la cyperméthrine cis:trans/40:60. [78–80]

ISO	Cyperméthrine, Cyperméthrine cis:trans/40:60	
IUPAC	(RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate (RS)- α -cyano-3 phénoxybenzyl-(1RS)-cis, trans-3-(2,2-dichlorovinyl)- 2,2-dimethylcyclopropane carboxylate	
Numéro CAS	52315-07-8	
Formule moléculaire	C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	
Poids moléculaire	416,3	
Couleur / Aspect physique	Liquide visqueux jaune-brun	
Densité	1,3	
Température de fusion (°C)	41,2	
Température de dégradation (° C)	220	
Solubilité dans l'eau (mg/L)	0,009 à 20°C	
Solubilité dans les solvants organiques à 20°C (mg/L) :	Ethyl acétate	2500000
	Acétone	450000
	Méthanol	450000
	Hexane	142000
Coefficient de partage (octanol-eau) K _{ow}	3,55 x 10 ⁵ et le log K _{ow} =5,55	
Pression de vapeur à 20° C (mPa)	6,78 x 10 ⁻³	

La cyperméthrine est commercialisée en plusieurs mélanges d'isomères possédant différents ratios cis/trans. Il s'agit principalement de: l'alpha-cyperméthrine, la bêta-cyperméthrine, la théta-cyperméthrine et la zêta-cyperméthrine (Tableau 11) :

Tableau 11: La cyperméthrine et ses sous-ensembles d'isomères [78].

Substance chimique	N° CAS	Nomenclature chimique	Formes physiques
Cyperméthrine : Mélanges des 4 paires diastéréoisomériques d'énantiomères de la molécule : C ₂₂ H ₁₉ Cl ₂ NO ₃	52315-07-8	(RS)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate	Liquide visqueux jaune-brun
Alpha-cyperméthrine : Mélange racémique (mélange équimolaire de deux énantiomères)	67375-30-80	Mélange racémique de : (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate	Poudre blanche

		(R)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1S,3S)-3-(2,2-dichlorovinyl)- 2,2- dimethylcyclopropanecarboxylate	
Beta-cyperméthrine : Mélange au ratio approximatif 2:3 de deux paires d'énantiomères	65731-84-2	Mélange au ratio approximatif 2:3 des deux paires d'énantiomères : (R)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1S,3S)-3-(2,2-dichlorovinyl)- 2,2- dimethylcyclopropanecarboxylate (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3R)-3-(2,2-dichlorovinyl)- 2,2- dimethylcyclopropanecarboxylate (R)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1S,3R)-3-(2,2-dichlorovinyl)- 2,2- dimethylcyclopropanecarboxylate (S)- α -cyano-3-phenoxybenzyl (1R,3S)-3-(2,2-dichlorovinyl)- 2,2- dimethylcyclopropanecarboxylate	Poudre blanche
Théta-cyperméthrine : Mélange racémique (mélange équimolaire de deux énantiomères)	71697-59-1	(S)- α -cyano-3 phénoxybenzyl- (1R)- trans-3-(2,2-dichlorovinyl)- 2,2-dimethylcyclopropane carboxylate (R)- α -cyano-3 phénoxybenzyl- (1S)-trans-3-(2,2-dichlorovinyl)- 2,2-dimethylcyclopropane carboxylate	/

3.2 Toxicité de la cyperméthrine :

L'insecticide cyperméthrine est largement utilisé pour prévenir et combattre les parasites et les maladies des cultures. En plus de l'espèce ciblée, elle tue également d'autres insectes et animaux non ciblés. La cyperméthrine a des effets négatifs sur le système nerveux central et provoque des réactions allergiques de la peau et une irritation des yeux, entraîne une toxicité

endocrinienne, favorise l'apparition de tumeurs et a un effet immuno-toxique chez les espèces non ciblées [81–84].

3.2.1 Effets sur les organismes aquatiques :

La cyperméthrine a montré des effets toxiques sur divers organismes aquatiques comme les poissons, les daphnies, les moules, etc. [82].

Les poissons sont particulièrement affectés par la cyperméthrine. La figure suivante (figure 17) représente certains effets de la cyperméthrine observés sur divers espèces de poissons [82] :

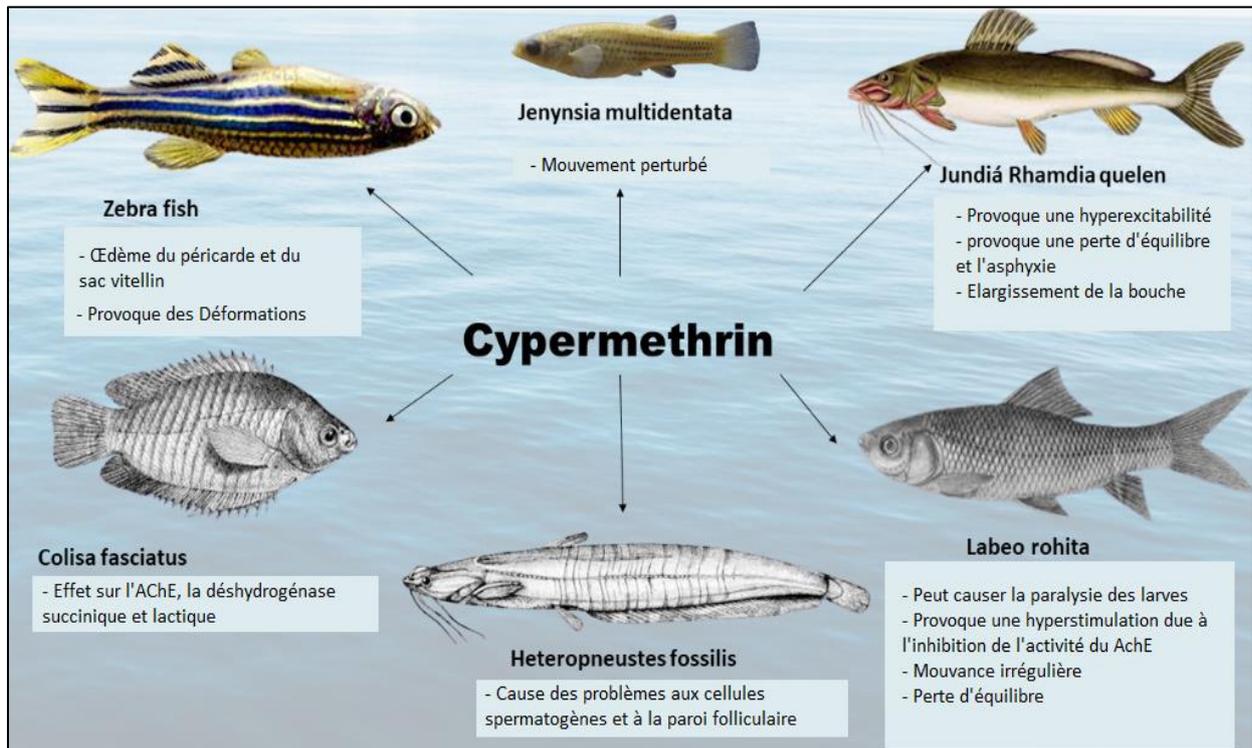


Figure 17: Effets de la cyperméthrine sur diverses espèces de poissons [82].

3.2.2 Effets sur les organismes terrestres :

La cyperméthrine est très peu absorbée par les animaux grâce à leur pelage. Son absorption dans le sang est faible et elle est rapidement métabolisée dans le foie en métabolites non toxiques qui sont excrétés par l'urine, le métabolisme est accéléré par l'enzyme spécifique glucuronidase. Certains animaux ne possédant pas cette enzyme comme les chordés ne parviennent pas à métaboliser la cyperméthrine, par conséquent, elle présente une plus grande toxicité pour ces derniers. Une exposition directe ou par voie orale à la cyperméthrine induit des effets toxiques comme chez les humains [51].

Plusieurs effets de la cyperméthrine ont été observés sur les rats (figure 19). Elle a notamment, un effet néfaste sur leurs systèmes reproducteurs. La DL_{50} orale chez le rat est de 250 mg/kg [81, 82].

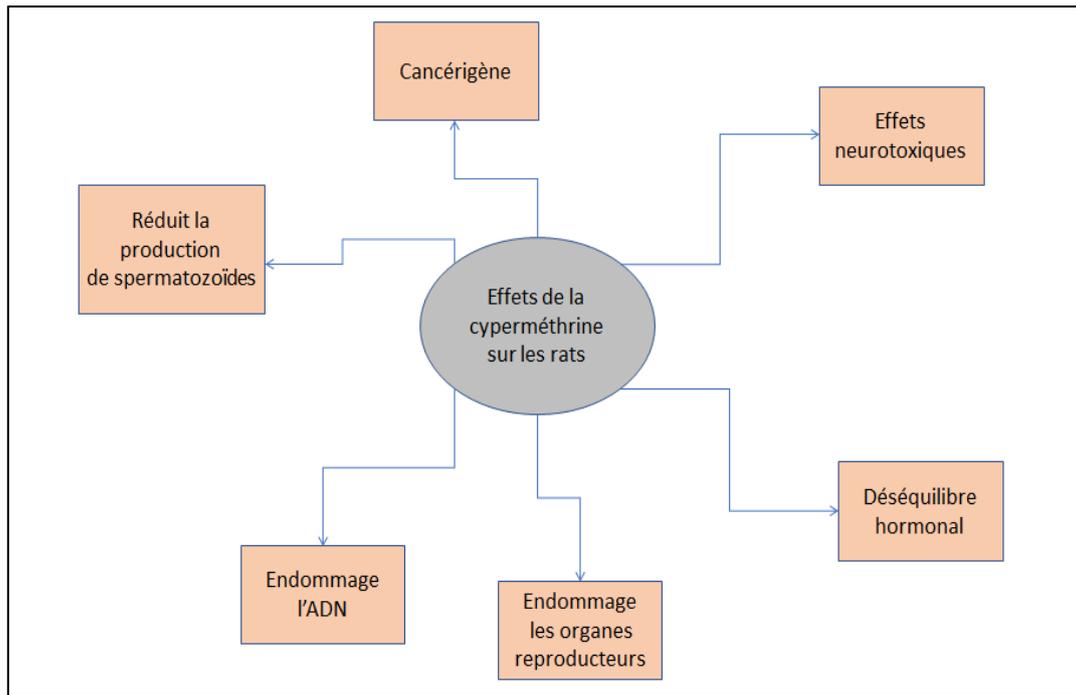


Figure 18: Effets de la cyperméthrine sur les rats [82].

Une étude a montré que l'administration de la cyperméthrine provoque des symptômes de toxicité légère à modérée et des changements de comportement à des degrés variables chez les rats mâles et femelles [85].

3.2.3 Effets sur les humains :

Suite à l'utilisation croissante de la cyperméthrine et son exposition aux humains dans la vie quotidienne, la cyperméthrine est à l'origine de plusieurs effets qui se manifestent par un impact physiologique, une neurotoxicité, une toxicité pour la reproduction, etc. [51].

L'exposition cutanée à la cyperméthrine entraîne divers symptômes plus au moins graves. Il s'agit de l'irritation, des démangeaisons au niveau de la peau et des yeux, des engourdissements, des picotements, une sensation de brûlure, une perte de contrôle de la vessie, des troubles de la coordination, des convulsions et, parfois, la mort [51].

Dans les cas extrêmes, l'inhalation prolongée de fortes doses peut entraîner une paralysie respiratoire et la mort [51].

La cyperméthrine a été classée comme cancérigène potentiel par l'EPA et elle est également impliquée dans la maladie de Parkinson [86].

En raison de sa toxicité, l'élimination de la cyperméthrine est devenue une priorité. Les deux principales voies de dégradation de la cyperméthrine sont la biodégradation et la photodégradation. Cependant, de nombreuses études ont prouvé que la cyperméthrine est un pyrèthroïde relativement stable à la lumière [86].

3.3 Biodégradation de la cyperméthrine :

Contrairement à d'autres techniques de remédiation, la bioremédiation est une stratégie écologique, moins onéreuse et efficace dans la décontamination de l'environnement [72, 86].

Dans cette perspective, plusieurs études ont été réalisées afin d'isoler et d'identifier les organismes qui en sont capables, et d'évaluer l'efficacité de la dégradation, d'identifier les métabolites et d'effectuer un suivi, du composé initial (la cyperméthrine) jusqu'aux produits finaux dans le but de s'assurer que ces produits ne présentent pas une toxicité bien plus élevée que le composé initial.

Ainsi, les métabolites de la biodégradation de la cyperméthrine, par diverses souches, ont été identifiés et plusieurs voies de biodégradation ont été proposées par de nombreux auteurs. Quelques exemples sont détaillés dans ce qui suit :

3.3.1 Métabolites et voies de biodégradation de la cyperméthrine :

Plusieurs études ont porté sur la biodégradation de la cyperméthrine par diverses souches bactériennes. Nous citerons :

3.3.1.1 Biodégradation de la cyperméthrine par la souche *Bacillus* sp. SG2 :

Dans un premier temps, Bhatt a proposé en 2016 un schéma de biodégradation de la cyperméthrine par la souche *Bacillus* sp. SG2 qui a été isolée à partir de sols contaminés par des pesticides d'une rizière d'Udham Singh Nagar, Uttarakhand, en Inde. Cette souche a utilisé la cyperméthrine comme seule source de carbone et l'a dégradée dans une large gamme de température (28-38 °C). L'analyse et l'identification des produits de la biodégradation ont permis d'aboutir au mécanisme de biodégradation qui suit:

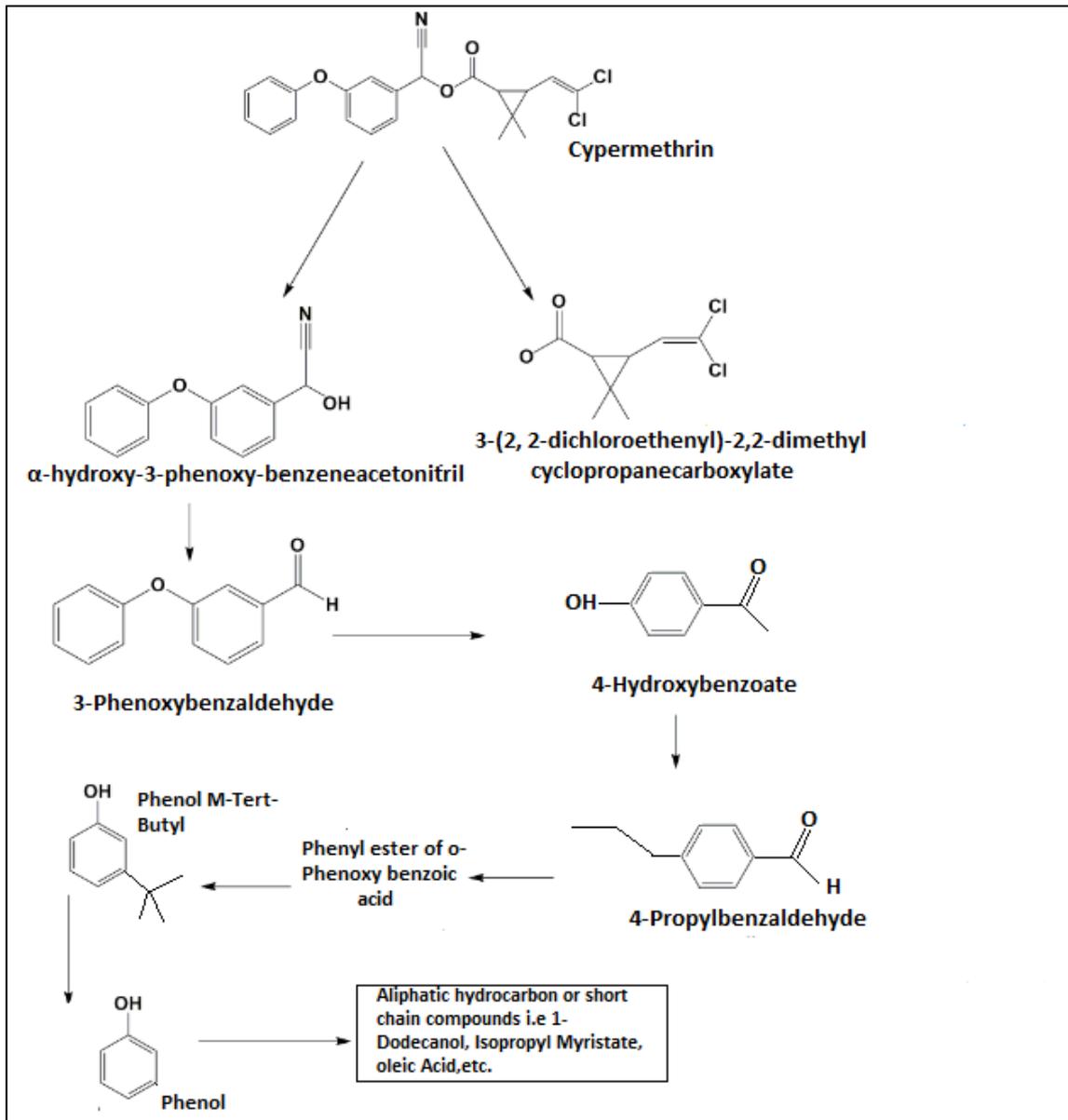


Figure 19: Voie de dégradation de la cyperméthrine par la souche *Bacillus* sp. SG2 [87].

La cyperméthrine est métabolisée en deux métabolites :

- 3-(2, 2-dichloroéthényl)-2,2-diméthyl cyclopropanecarboxylate.
- α -hydroxy-3-phénoxy-benzène acétonitrile qui en raison de son instabilité se transforme spontanément en 3-phénoxybenzaldéhyde. Ce dernier est transformé en 4-propylbenzaldéhyde qui se transforme à nouveau en 4-hydroxybenzoate qui est métabolisé à son tour pour former l'ester phénylique de l'acide o-phénoxy benzoïque. Par la suite, l'ester phénylique de l'acide o-phénoxy benzoïque est transformé en M-tertbutylphénol qui peut ensuite être converti en 2-tert-pentylphénol.

Il est possible que le 2-tert-pentylphénol et le phénol se transforment en composés aliphatiques de faible poids moléculaire tels que le 1-dodécanol, le myristate d'isopropyle et

l'acide oléique, ce qui peut conduire à une minéralisation complète de la cyperméthrine par la suite [87] .

3.3.1.2 Biodégradation de la cyperméthrine par la souche *Bacillus thuringiensis* SG4 :

En 2020, Bhatt a proposé un autre schéma de biodégradation, cette fois-ci par la souche *B. thuringiensis* SG4 qui utilise la cyperméthrine comme source de carbone et d'azote. Elle fut isolée à partir d'échantillons de sols contaminés par la cyperméthrine prélevés de champs agricoles à Pantnagar, Uttarakhand en Inde. La dégradation de la cyperméthrine par la souche SG4 s'est révélée efficace et avec des métabolites produits non toxiques. La voie de dégradation proposée de la cyperméthrine par la souche SG4 selon les métabolites détectés est la suivante :

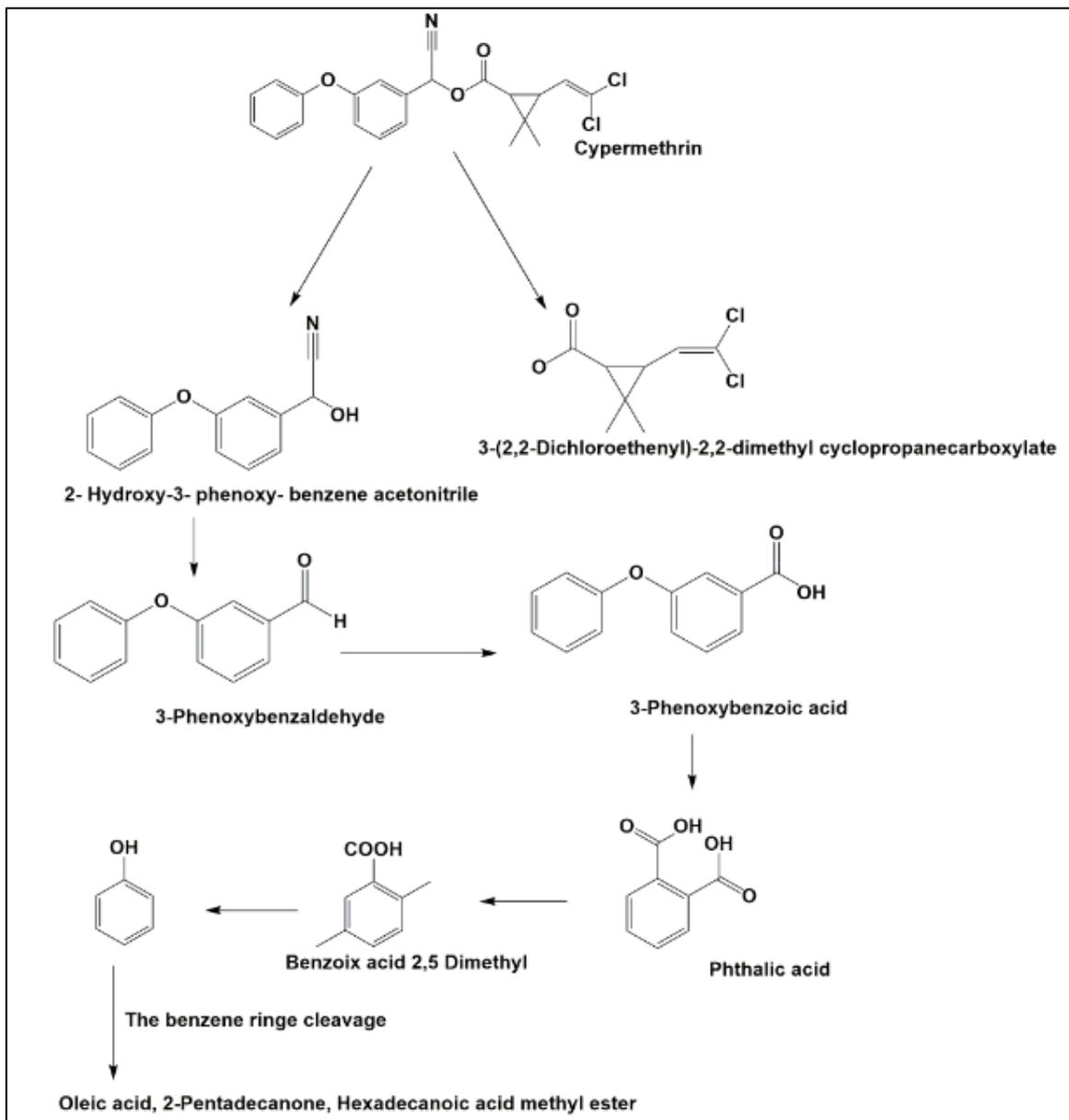


Figure 20: Voie de dégradation de la cyperméthrine par la souche *Bacillus thuringiensis* SG4 [88].

Dans un premier temps, la cyperméthrine a été dégradée en :

- 3-(2,2-dichloroéthényl)-2,2-diméthyl cyclopropanecarboxylate.
- 2-hydroxy-2(3-phénoxyphényl) acétonitrile.

Par la suite, le 2-hydroxy-2(3-phénoxyphényl) acétonitrile a été converti en 3-phénoxybenzaldéhyde. Des études antérieures ont rapporté que cette étape est catalysée par l'oxynitrilase. Le 3-phénoxybenzaldéhyde peut être converti en acide 3-phénoxybenzoïque en utilisant l'enzyme aldéhyde déshydrogénase. L'acide 3-phénoxybenzoïque peut être converti en acide phtalique, qui peut ensuite être converti en acide benzoïque 2,5-diméthyle en utilisant une enzyme de la famille des transférases. Cet acide benzoïque 2,5-diméthyle est ensuite converti en phénol [88].

3.3.1.3 Biodégradation de la cyperméthrine par la souche *Bacillus subtilis* 1D :

Lors d'une étude réalisée en 2018 par Saurabh Gangola et son équipe, la souche 1D de *Bacillus subtilis* récupérée à partir d'un sol contaminé par les pesticides d'un champ agricole s'est avérée capable de biodégrader la cyperméthrine en l'utilisant comme seule source de carbone et cela sans produire de produits finaux toxiques. L'identification des produits intermédiaires et finaux signalés après 15 jours d'incubation par GC-MS leur a permis de proposer la voie de dégradation qui suit :

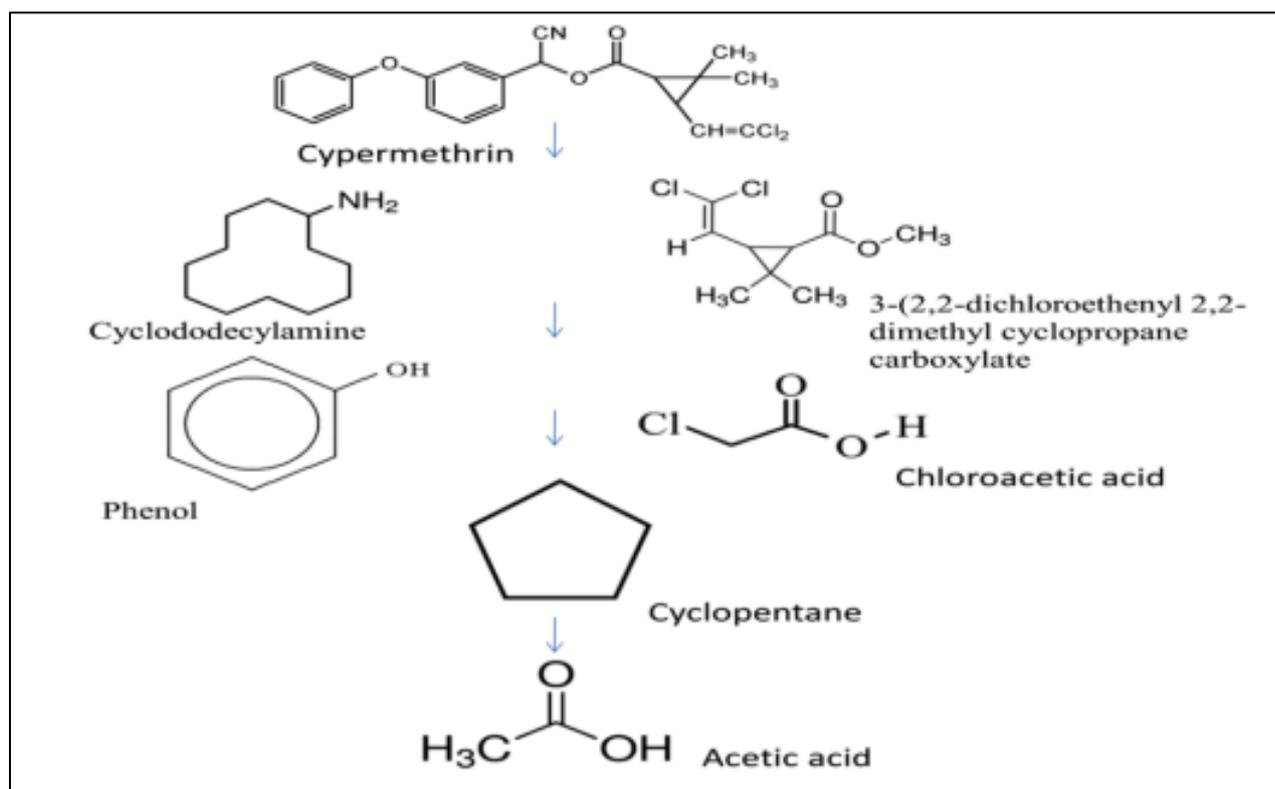


Figure 21: Voie de biodégradation de la cyperméthrine par la souche *Bacillus subtilis* 1D [89].

L'hydrolyse de la liaison ester de la cyperméthrine a produit 2 composés :

- 3-(2,2-dichloro éthényl)-2,2-diméthyl-cyclopropanecarboxylate
- Cyclododécylamine.

A cause de son instabilité, la cyclododécylamine s'oxyde pour former du phénol qui réagit avec l'eau pour former du cyclopentane. Comme le cyclododécylamine, le cyclopentane est instable ; il se transforme en composé aliphatique comme l'acide acétique et l'acide décanoïque. Quant au 3-(2,2-dichloro éthényl)-2,2-diméthyl-cyclopropanecarboxylate, il s'hydrolyse et forme l'acide chloroacétique [89].

3.3.1.4 Biodégradation de la cyperméthrine par la souche *Bacillus sp.* ISTDS2 :

La souche *Bacillus sp.* ISTDS2, utilisée dans le cadre d'une étude sur la biodégradation de la cyperméthrine menée par Sundaram et son équipe (2013), a été isolée à partir du site d'extraction de marbre d'Alwar, Rajasthan, en Inde. Cette souche utilisait la cyperméthrine (50 mg/L) comme seule source de carbone durant la culture dans un erlenmeyer contenant un milieu de culture minéral et la cyperméthrine comme seule source de carbone et où le pH était ajusté à 7, la température maintenue à 30°C et avec aération du milieu. Ces cellules bactériennes furent par la suite inoculées dans un microcosme de sol non traité par des pesticides dans lequel fut ajouté la cyperméthrine. Le suivi, l'extraction et l'analyse des produits de biodégradation par GC-MS a permis aux chercheurs de proposer la voie de biodégradation qui suit (Figure 22):

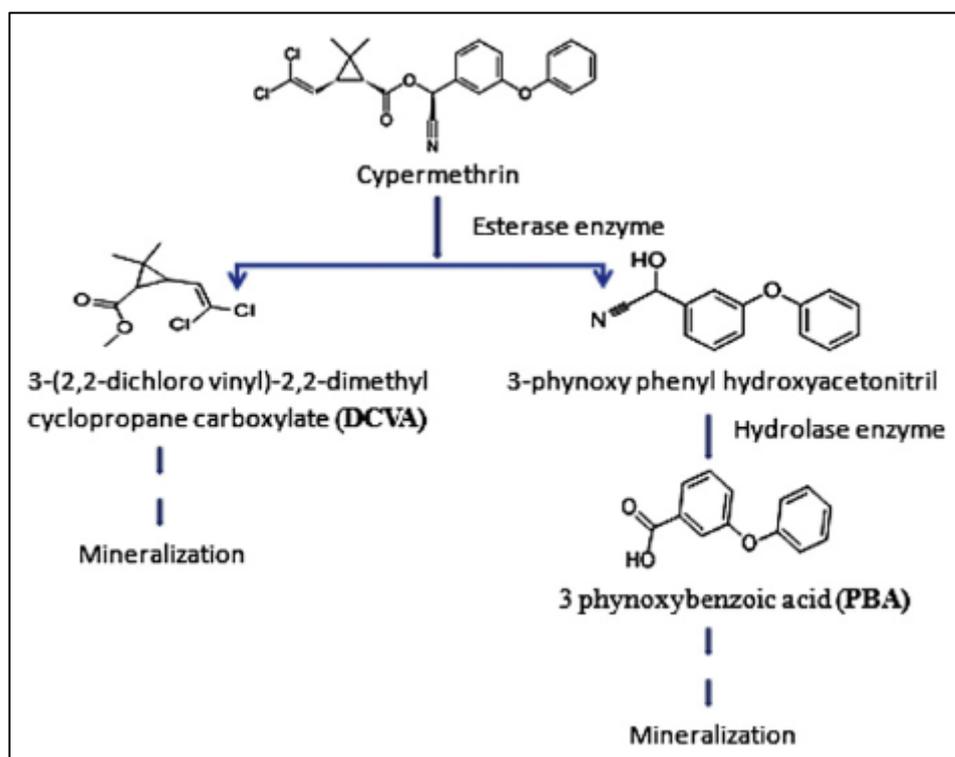


Figure 22: Voie de biodégradation de la cyperméthrine par la souche *Bacillus sp.* ISTDS2 [90].

L'hydrolyse de la cyperméthrine par l'action de l'hydrolase a permis la formation du 2-hydroxy-2(3-phénoxyphényl) acétonitrile et du 3-(2, 2dichloroéthényl)-2, 2-

diméthylcyclopropanecarboxylate. Le 2-hydroxy-2(3-phénoxyphényl) acétonitrile est composé de la cyanhydrine qui, à cause de son instabilité en présence d'eau, engendre la transformation du 2-hydroxy-2(3-phénoxyphényl) acétonitrile en PBA ; le cyanure d'hydrogène (HCN) est ainsi éliminé. Le PBA et le 3-(2, 2dichloroéthényl)-2, 2-diméthylcyclopropanecarboxylate sont ensuite minéralisés [90].

3.3.1.5 Voie de biodégradation de la cyperméthrine par la souche *Micrococcus* sp. CPN

1:

Suite à l'isolation et l'identification des métabolites obtenus lors de la biodégradation de la cyperméthrine par la souche *Micrococcus* sp. CPN 1 isolée à partir d'un sol contaminé par les pesticides, Tallur et son équipe ont proposé en 2008 le schéma de biodégradation qui suit (Figure 23) :

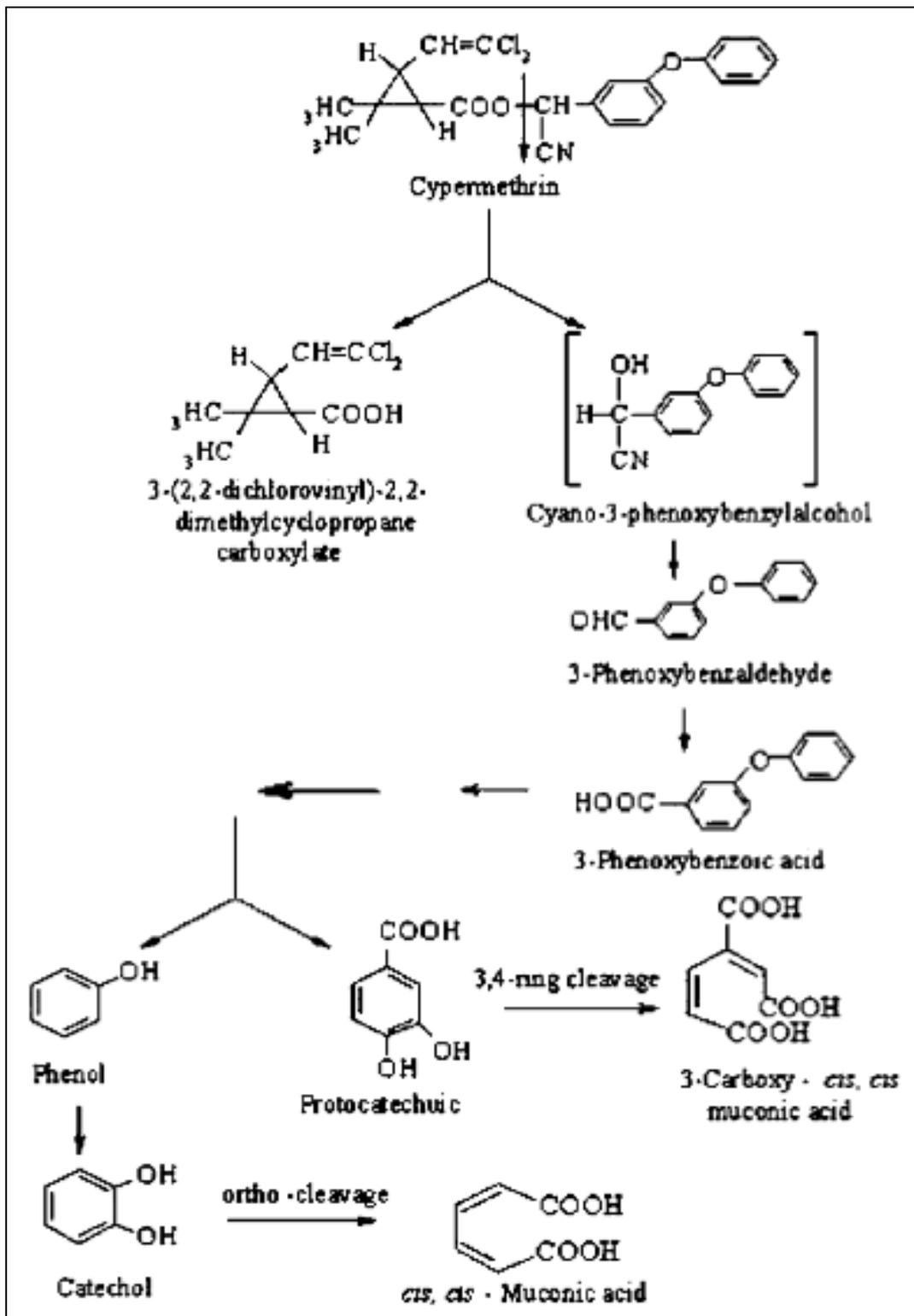


Figure 23: Voie de dégradation de la cyperméthrine par la souche *Micrococcus sp.* strain CPN [81].

L'hydrolyse de la liaison ester de la cyperméthrine a conduit à la formation du 3-phénoxybenzoate qui par clivage de l'éther diphénylique a donné du protocatéchuate et du phénol [81].

3.3.1.6 Biodégradation de la cyperméthrine par la souche *Rhodobacter sphaeroides* :

Les bactéries du genre *Rhodobacter* sont très polyvalentes, elles permettent la dégradation de nombreux composés organiques, la fixation l'azote, la production de l'hydrogène, etc.

Lors d'une étude menée par Yin et son équipe en 2013, visant à identifier des souches microbiennes capable d'utiliser la cyperméthrine d'un sol contaminé, la bactérie *Rhodobacter sphaeroides* fut isolée à partir d'un échantillon de boue activée prélevée d'un bassin de traitement des eaux usées d'une usine de pesticides située à Changsha (Hunan, Chine).

L'extraction et l'identification des métabolites durant la biodégradation ont montré la présence de 4 produits que sont :

- le cyclopropaneméthanol,
- l'acide 5-méthoxy-2-nitrobenzoïque.
- le 3,5-diméthoxybenzamide.
- l'acide 5-aminoisophtalique.

Dans ce cas, le PBA n'a pas été détecté lors de l'analyse des métabolites et cela après 7 jours d'incubation [91].

3.3.1.7 Amélioration de la dégradation de la cyperméthrine par une co-culture de *Bacillus cereus* ZH-3 et de *Streptomyces aureus* HP-S-01:

Le premier consortium microbien mixte décrit comme capable de métaboliser la cyperméthrine consiste en une co-culture de *Bacillus cereus* ZH-3 et de *Streptomyces aureus* HP-S-01. Cet essai de biodégradation a considérablement amélioré l'épuisement de la cyperméthrine en comparaison avec une culture pure. En effet, dans une culture pure la demi-vie de la cyperméthrine est relativement longue ($t_{1/2} = 32,6 - 43,0$ h) par rapport à sa demi-vie dans la co-culture qui est de 13,0 h. Les conditions optimales de dégradation ont été déterminées comme étant une température de 28,2 °C et un pH de 7,5 grâce auxquels la culture mixte a complètement métabolisé la cyperméthrine (50 mg.L⁻¹) en 72 h

Concernant les produits de dégradation, le consortium bactérien a transformé la cyperméthrine en :

- α -hydroxy-3-phénoxy-benzèneacétonitrile.
- 3-phénoxybenzaldéhyde.
- 4-phénoxyphényl-2,2-diméthylpropiophénone.

Les chercheurs ont conclu que la co-culture a hydrolysé la liaison ester pour former l' α -hydroxy-3-phénoxy-benzèneacétonitrile entraînant la perte de l'activité insecticide de la cyperméthrine. Ce composé étant instable dans l'environnement, il s'est rapidement transformé spontanément en 3-phénoxybenzaldéhyde, qui se transforma rapidement par oxydation en 4-phénoxyphényl-2,2-diméthyl-propiophénone [92].

Partie expérimentale

Matériel et méthodes

4 Matériel et méthodes :

4.1 Matériel biologique :

Les boues activées utilisées dans le cadre de ce travail sont issues du bassin d'aération de la STEP de BARAKI qui possède une capacité épuratoire de 900 000 Eq.Hab. pour un débit moyen théorique de 147 000 m³/j. Cette station reçoit en moyenne 63 400 m³/jour (année 2013) et produit 12 200 tonnes de boues à 23,9 % de siccité. Les performances de traitement permettent de garantir une conformité du rejet supérieur à 99% et un rendement d'élimination de la pollution supérieur à 95%.

Les boues activées sont riches en micro-organismes hétérotrophes capables de dégrader la matière organique des eaux résiduaires ; élimination de la pollution carbonée, azotée et même du phosphore.

4.2 Matériel non biologique :

La cyperméthrine (CAS N°52315-07-8) a été fournie par l'une des unités de production de la société Alphyt (l'Algérienne des Phytosanitaires) à BARAKI. Alphyt est une filiale du groupe ASMIDAL possédant quatre unités de production et quatre unités de commercialisation, elle est spécialisée dans la production de produits phytosanitaires et d'hygiène publique comme les bactéricides, les désinfectants, les insecticides et les rodenticides.

4.3 Méthodes :

4.3.1 Test de solubilité :

La cyperméthrine (CAS N°52315-07-8) utilisée dans la présente étude, a un aspect jaune-brun très visqueux (figure 24) et vu son insolubilité dans l'eau, un test de solubilité dans des solvants organiques (méthanol, éthanol, acétate d'éthyle) a été réalisé dans le but de déterminer le plus petit volume de solvant nécessaire pour solubiliser une certaine quantité de cyperméthrine afin de pouvoir la mélanger au milieu de culture.

Les résultats ont montré qu'un petit volume d'acétate d'éthyle a permis de dissoudre complètement la cyperméthrine. Par contre, les résultats n'ont pas été aussi probants avec l'éthanol et le méthanol puisque même avec de grands volumes de ces deux solvants, le pesticide s'est très peu dissout. Le solvant utilisé donc pour la suite de la présente étude était l'acétate d'éthyle.



Figure 24: La cyperméthrine (CAS N°52315-07-8).

4.3.2 Préparation et entretien des boues activées :

La préparation des boues activées récupérées de la STEP se faisait comme suit : elles ont été, tout d'abord, rincées trois fois à l'eau du robinet, puis une fois à l'eau distillée pour retirer les résidus (ou substrats) déjà présents. Par la suite, dans un erlenmeyer d'1 L, 600 ml du milieu de culture ont été rajoutés à 400 ml de boues activées.

Afin de préserver les micro-organismes des boues activées avant de passer aux étapes d'acclimatation et de sélection, il était nécessaire de réaliser l'entretien des boues activées (Figure 25). Ceci correspondait à l'incubation des micro-organismes des boues activées dans un milieu de culture approprié contenant des éléments nutritifs (carbone, azote et phosphore).



Figure 25: Entretien des boues activées.

La composition du milieu de culture servant à l'entretien des boues était la suivante :

- Concentration du glucose (source de carbone): 2 g/L
- Concentration du nitrate d'ammonium NH_4NO_3 (source d'azote) : 1,33 g/L
- Concentration du KH_2PO_4 : 1 g/L

L'aération était assurée par une faible agitation du milieu, grâce un agitateur de la marque Bibby. Le pH du milieu était mesuré approximativement par du papier pH. Il était de l'ordre de 4,4. La température d'incubation était la température ambiante. Elle variait entre 13°C et 17°C.

4.3.3 Acclimatation des boues :

Cette étape est primordiale afin de permettre aux micro-organismes d'acquérir la capacité à dégrader la cyperméthrine en induisant la synthèse de nouvelles enzymes adaptées à cette fonction.

Le milieu de culture nécessaire à cette étape était un milieu minéral auquel a été rajouté par la suite une source de carbone et une source d'azote selon le besoin. La composition du milieu minéral pour 1L d'eau distillée est indiquée dans le tableau suivant (tableau 12) :

Tableau 12: Composition du milieu minéral.

Composé	Quantité en g/L
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	2,1076
KH_2PO_4	0,4018
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
CaCl_2	0,021
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0174
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0502
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,008
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0021
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0048

Parallèlement, dans 2 erlenmeyers, l'acclimatation est réalisée, à l'identique. Chaque erlenmeyer contient :

- 200 ml de boues activées.
- 250 ml du milieu minéral.
- 10 mg de cyperméthrine dissoute dans un volume approprié de solvant.

- 0,75g de glucose.
- 0,75g de nitrate d'ammonium.

Le pH du milieu, mesuré à l'aide d'un pH-mètre, était neutre (7,56). Les milieux étaient alimentés en oxygène par faible agitation et les erlenmeyers étaient recouverts avec du papier aluminium afin d'éviter la photodégradation de la cyperméthrine (Figure 26).



Figure 26: Acclimatation des boues activées au pesticide.

Le renouvellement du milieu était réalisé tous les 3-4 jours, cette opération a été répétée quatre fois. L'incubation se faisait à température ambiante. Celle-ci variait entre 12 et 19°C.

4.3.4 Sélection des souches microbiennes :

L'étape de sélection est indispensable afin d'isoler les micro-organismes qui utilisent la cyperméthrine comme unique source de carbone et/ou unique source d'azote. Durant cette étape, deux types de sélections étaient réalisées en parallèle. Chaque sélection était réalisée dans l'un des erlenmeyers préparés lors de l'acclimatation des boues activées. Deux essais étaient réalisés en parallèle :

- Un essai permettant la sélection des micro-organismes, présents dans les boues activées, capables d'utiliser la cyperméthrine autant que source de carbone.
- Un essai permettant la sélection des micro-organismes, présents dans les boues activées, capables d'utiliser la cyperméthrine autant que source d'azote.

Ces sélections permettent aux micro-organismes présents dans les boues de s'adapter à la dégradation de concentrations de plus en plus élevées de cyperméthrine en diminuant de manière graduelle la source de carbone/azote et en augmentant graduellement la concentration en cyperméthrine.

4.3.4.1 Sélection des souches microbiennes utilisant la cyperméthrine comme unique source de carbone :

Dans cet essai, dans l'un des erlenmeyers préparés lors de l'acclimatation des boues activées, la composition du milieu de culture était modifiée comme suit :

- 250 ml du milieu minéral (Tableau 12).
- 0,75g de nitrate d'ammonium, soit une concentration de 3 g.L^{-1}
- La concentration du glucose est réduite graduellement de 3 g.L^{-1} jusqu'à la valeur de zéro et la concentration du pesticide (dissout dans l'acétate d'éthyle) est parallèlement augmentée de sa valeur initiale jusqu'à 2 g.L^{-1} comme résumé dans le tableau 13.

Tableau 13: Variation de la concentration du glucose et de la cyperméthrine pendant la période de sélection.

Nombre de jours	0	3	6	9	13	16	19
Glucose (g.L^{-1})	3	2,4	1,8	1,2	0,6	0	0
Cyperméthrine (g.L^{-1})	0,3	0,7	1,0	1,4	1,7	2	2

L'alimentation en oxygène se fait par faible agitation. La température d'incubation durant cette période variait entre 15 et 22°C (Figure 27).



Figure 27 : sélection des souches microbiennes utilisant la cyperméthrine comme unique source de carbone ou comme unique source d'azote.

4.3.4.2 Sélection des souches microbiennes utilisant la cyperméthrine comme unique source d'azote :

Dans cet essai, la composition du milieu de culture, du second erlenmeyer préparé lors de l'acclimatation des boues activées, était modifiée comme suit :

- 250 ml du milieu minéral (Tableau 12).
- 0,75g de glucose, soit une concentration de 3 g.L⁻¹.
- La concentration du NH₄NO₃ est réduite graduellement de 3 g.L⁻¹ jusqu'à la valeur de zéro et la concentration du pesticide (dissout dans l'acétate d'éthyle) est augmentée parallèlement de sa valeur initiale jusqu'à 2 g.L⁻¹ comme résumé dans le tableau 14.

Tableau 14: Variation de la concentration du NH₄NO₃ et de la cyperméthrine durant la période de sélection.

Nombre de jours	0	3	6	9	13	16	19
NH ₄ NO ₃ (g.L ⁻¹)	3	2,4	1,8	1,2	0,6	0	0
Cyperméthrine (g.L ⁻¹)	0,3	0,7	1,0	1,4	1,7	2	2

L'alimentation en oxygène se fait par faible agitation. La température d'incubation durant cette période variait entre 15 et 22°C (Figure 27).

4.3.5 Isolement et identification des micro-organismes :

4.3.5.1 Isolement des micro-organismes :

A la fin de la période de sélection, un prélèvement de chaque essai (source de carbone et source d'azote) est étalé sur le milieu solide sélectif correspondant, *ie* le même milieu liquide auquel est ajouté 2% (p/v) d'agar afin de solidifier le milieu.

Ainsi, chaque milieu est composé de :

- Pour l'essai concernant l'étude de l'utilisation de la cyperméthrine en tant que source de carbone par les micro-organismes :
 - Milieu minéral (Tableau 12).
 - Source d'azote (NH₄NO₃) à 3 g.L⁻¹.
 - Cyperméthrine (dissoute dans l'acétate d'éthyle) comme unique source de carbone à une concentration de 2 g.L⁻¹.
 - Agar à 2% (p/v).
- Pour l'essai concernant l'étude de l'utilisation de la cyperméthrine en tant que source d'azote par les micro-organismes :
 - Milieu minéral (Tableau 12).
 - Glucose à 3 g.L⁻¹.

- Cyperméthrine (dissoute dans l'acétate d'éthyle) comme unique source d'azote à une concentration de 2g.L^{-1} .
- Agar à 2% (p/v)

Pour tester l'effet du solvant sélectionné (l'acétate d'éthyle) qui pourrait également être utilisé par les micro-organismes comme source de carbone, en utilisant un milieu solide constitué de :

- Milieu minéral (Tableau 12).
- Source d'azote (NH_4NO_3) à 3g.L^{-1} .
- Acétate d'éthyle à une concentration de $12,7\text{g.L}^{-1}$.
- Agar à 2% (p/v).

Les milieux de culture étaient versés dans des boîtes de Pétri (3 boîtes pour chaque essai). 1 ml de la culture de sélection est étalé sur la boîte de Pétri correspondante et toutes les boîtes sont incubées à 37°C .

4.3.5.2 Identification des micro-organismes :

Dans le cadre de cette étude, l'identification des micro-organismes sélectionnés a commencé par l'étude macroscopique des colonies, suivie d'une étude microscopique (état frais et coloration de Gram) de tests enzymatiques d'orientation rapide (test de la catalase et test de l'oxydase). A partir de toutes ces informations réunies, une orientation dichotomique a permis de déterminer un genre ou un groupe de genre auxquels le micro-organisme est susceptible d'appartenir. Cette information est cruciale, afin de passer à l'identification par les tests biochimiques et de choisir la galerie API (*Analytical Profile Index*) la plus adaptée.

4.3.5.2.1 Etude macroscopique :

L'observation des différentes colonies cultivées sur les milieux sélectifs était réalisée après 4 jours et 7 jours d'incubation.

Dans un premier temps, les colonies étaient différenciées selon leur taille, leur forme, l'élévation, l'aspect de la surface, l'opacité, la consistance, la couleur/pigmentation, etc.

Ainsi, les différentes colonies observées dans chacun des milieux sélectifs étaient repiquées, une-par-une, sur gélose nutritive afin de les isoler et de permettre une meilleure croissance des micro-organismes.

Le repiquage est réalisé autant de fois que nécessaire dans le but d'obtenir des colonies microbiennes pures, bien distinctes et éloignées les unes des autres.

4.3.5.2.2 Coloration différentielle type Gram:

Avant de passer à d'autres tests permettant l'identification des micro-organismes sélectionnés, il est nécessaire, dans un premier temps, de réaliser une coloration de Gram qui permet de distinguer les bactéries et de les classer, en fonction de la nature biochimique de la paroi cellulaire, en bactéries à Gram positif et bactéries à Gram négatif. Cette coloration permet d'observer sous microscope photonique ordinaire les bactéries isolées et de déterminer

ainsi la forme et l'arrangement (mode d'assemblage) des cellules bactériennes. Cette observation permet par la même occasion de s'assurer de la pureté des bactéries isolées. Toutes ces informations récoltées permettront de choisir les tests appropriés à appliquer ainsi que la galerie biochimique à utiliser pour l'identification des souches bactériennes obtenues [93].

Les étapes de la coloration de Gram sont :

1. Préparer un frottis bactérien et le fixer à la flamme du bec Bunsen (figure 28).
2. Inonder délicatement les frottis avec du cristal violet (ou violet de gentiane) et laisser reposer pendant 1 minute puis rincer à l'eau du robinet.
3. Inonder doucement les frottis avec le mordant (lugol) et laisser reposer pendant 1 minute puis rincer délicatement à l'eau du robinet.
4. Décolorer avec de l'alcool pendant 30 secondes puis rincer à l'eau.
5. Recolorer à la fuchsine pendant 60 sec puis rincer à l'eau et laisser sécher (figure 29)[93].

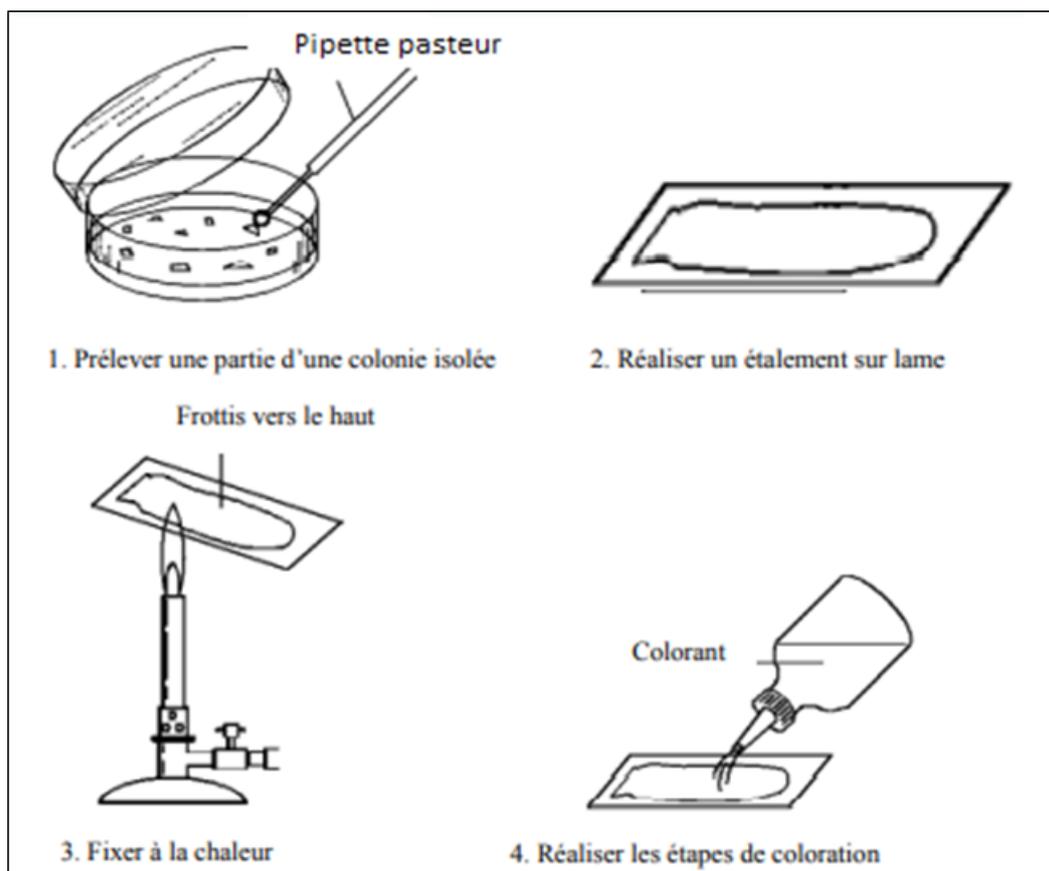


Figure 28: Préparation d'un frottis bactérien [94].

Réactif	Gram positive	Gram négative
Aucun (frottis bactérien)		
Violet de gentiane (1 minute)		
Lugol (1 minute)		
Alcool (30 secondes)		
Fushine (1 minute)		

Figure 29: Etapes de la coloration de Gram [95].

Dans un premier temps, les cellules Gram-positives et Gram-négatives sont colorées par le colorant primaire (violet de gentiane). En second lieu, le lugol (mordant) est ajouté au frottis ; le lugol est un mordant qui se combine avec le cristal violet et forme un complexe insoluble dans les cellules Gram-positives. Lors de la décoloration avec l'alcool, les cellules Gram-positives conservent le complexe de cristal violet, et ces cellules apparaîtront donc violettes sous microscope. En revanche, le complexe colorant est éliminé des cellules Gram-négatives, ce qui les rend incolore. Pour cela la fuchisine est utilisée comme contre-coloration, colorant les cellules Gram-négatives en rose ou en rouge [95].

L'observation se fait en ajoutant de l'huile à immersion et au plus fort grossissement (grossissement : objectif x 100) en lumière blanche (lumière maximale).

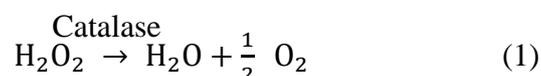
4.3.5.2.3 Etat frais :

L'examen à l'état frais permet d'observer des bactéries vivantes et de déterminer leur mobilité (péritriche, polaire ou immobile) en plus de leur morphologie et de leur arrangement. Pour cela, une goutte d'eau physiologique stérilisée (à 9 g.L⁻¹ de NaCl) est déposée sur une lame propre et stérile. A l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie microbienne est prélevée et placée sur la goutte qui est recouverte ensuite par une lamelle. L'observation se fait au microscope optique, en utilisant l'objectif x 40, avec diaphragme fermé (lumière minimale) pour permettre un meilleur contraste.

4.3.5.2.4 Test des enzymes respiratoires :

4.3.5.2.4.1 Test de la catalase :

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives (la majorité des bactéries anaérobies strictes ne possède pas cette enzyme). Elle décompose le peroxyde d'hydrogène (produit toxique formé lors du métabolisme respiratoire en aérobiose qui peut endommager les enzymes, les acides nucléiques, et d'autres molécules essentielles de la cellule bactérienne) comme suit [95]:



Pour réaliser ce test, la colonie à étudier est prélevée et plongée dans une goutte de peroxyde d'hydrogène. La bactérie est dite catalase positive dans le cas où il y a un dégagement gazeux. Elle est dite catalase négative dans le cas contraire [95].

4.3.5.2.4.2 Test de l'oxydase :

Le test de l'oxydase permet de détecter la présence de la cytochrome oxydase, une enzyme de la chaîne de transport des électrons [95].

Ce test est fondamental pour l'identification bactérienne. Il concerne les bactéries à Gram négatif, il permet principalement de différencier les membres des genres *Neisseria* et *Pseudomonas*, qui sont positifs à l'oxydase, des Enterobacteriaceae, qui sont négatifs à l'oxydase [93].

A l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie pure est prélevée et déposée sur un disque oxydase qui est placé sur une lame propre et stérile. Le disque oxydase contient de l'oxalate de diméthyl paraphénylène diamine. L'apparition rapide d'une coloration violette foncée indique que la bactérie est oxydase positive, dans le cas contraire, il n'y a pas de coloration ou le virage est très léger, et les bactéries sont dites oxydase négative [96].

4.3.5.2.5 Tests biochimiques (galeries miniaturisées) :

Le choix des galeries API à utiliser pour l'identification se fait en fonction des caractères morphologiques et culturels des souches microbiennes sélectionnées ainsi que les résultats obtenus lors des tests des enzymes respiratoires (tests de la catalase et de l'oxydase).

4.3.5.2.5.1 Préparation des galeries :

- Les fonds et couvercles des boîtes d'incubation sont réunis, et de l'eau distillée est répartis en quantité suffisante dans les alvéoles afin de créer une atmosphère humide.
- La galerie est déposée dans la boîte d'incubation, en travaillant en environnement stérile.

4.3.5.2.5.2 Préparation de l'inoculum :

- Ouvrir une ampoule contenant le milieu de culture *API suspension medium*.
- Des colonies pures sont prélevées du milieu gélosé à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Réaliser une suspension bactérienne d'une turbidité d'environ 0,5 sur l'échelle de Mc Farland.

Après inoculation des galeries, celles-ci sont incubées à 37°C pendant 24H. Selon la galerie sélectionnée, certains tests nécessitent l'addition de réactifs particuliers.

4.3.5.2.5.3 Détermination du profil numérique :

Les puits sont délimités en triplets. Pour chacun des triplets : si le premier test est positif, le puits prendra la valeur 1 sinon 0. Si le second test est positif, le puits prendra la valeur 2, sinon, il prendra la valeur 0. Enfin, pour le 3^{ème} test, s'il est positif, la valeur 4 lui sera attribuée sinon c'est la valeur 0 qui lui sera attribuée. La somme des valeurs attribuées aux

puits de chaque triplet est calculée. L'ensemble des valeurs obtenues permet d'obtenir le profil numérique servant à l'identification.

4.3.5.2.5.4 Identification des souches microbiennes :

L'identification des souches microbiennes est réalisée à l'aide du :

- Tableau d'identification fourni avec la notice de la galerie API sélectionnée,
- Logiciel APIWEB.
- Logiciel d'identification en ligne de l'UPBM disponible sur le site : <http://lab.upbm.org/>

4.3.5.2.5.5 Galerie API Coryne :

La galerie API Coryne (Figure 30) permet l'identification des corynéformes en 24 heures. Cette galerie est constituée de 20 puits contenant des substrats déshydratés, qui une fois inoculés avec la suspension bactérienne, permettent de mettre en évidence l'activité enzymatique ou la fermentation des de certains glucides [97].

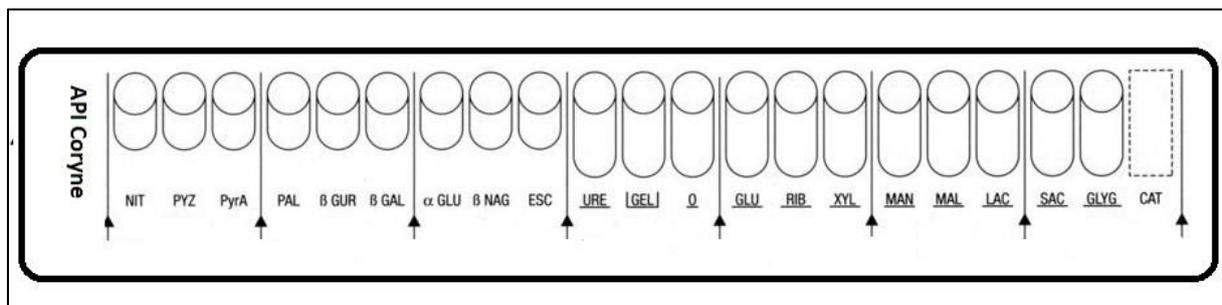


Figure 30: Présentation de la galerie API Coryne.

4.3.5.2.5.5.1 Inoculation de la galerie :

Les puits de la galerie API Coryne sont remplis avec la suspension bactérienne comme suit :

- Remplir les tubules des tests URE, O, GLU, RIB, XYL, MAN, MAL, LAC, SAC et GLYG et remplir leurs cupules avec l'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose.
- Remplir les tube et cupule du test GEL avec le milieu de culture ensemencé ; l'huile de paraffine ne sera pas utilisée car ce test requière de l'oxygène.
- Remplir uniquement les tubules des tests restants.

La galerie est incubée à 37°C pendant 24H [97].

4.3.5.2.5.5.2 Lecture de la galerie API Coryne:

Après incubation, les résultats de certains tests sont lus directement, d'autres, nécessitent l'addition de réactifs comme suit :

- Addition d'une goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 au test NIT.
- Addition d'une goutte du réactif PYZ au test PYZ.

- Addition d'une goutte des réactifs ZYM A et ZYM B aux tests : de PYR A jusqu'à β NAG.

Attendre 10 minutes avant la lecture des résultats [97].

4.3.5.2.5.6 Galerie API Staph :

La galerie API Staph permet d'identifier 23 espèces de cocci à Gram positif. Ce système se compose de 19 micro-ampoules qui contiennent des substrats déshydratés et/ou des milieux nutritifs (Figure 31). Ces tests sont importants dans la différenciation des *Staphylococcus*, des *Kocuria* et des *Micrococcus* [95].

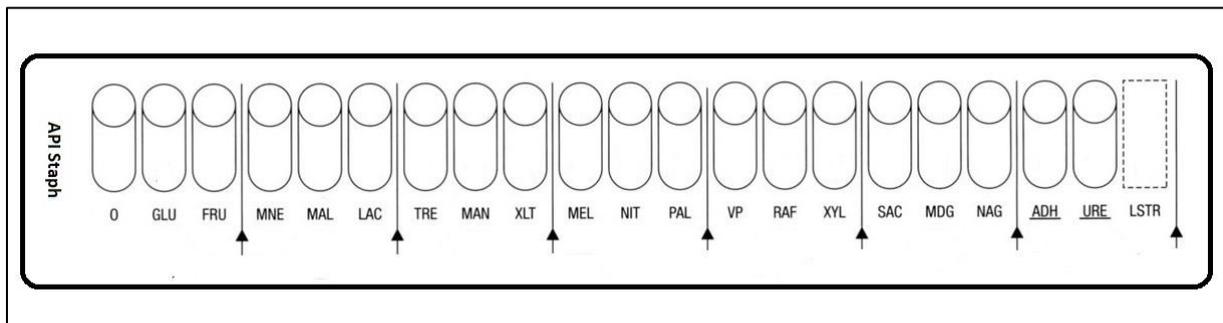


Figure 31: Présentation de la galerie API Staph.

4.3.5.2.5.6.1 Inoculation de la galerie :

Les puits de la galerie API Staph sont remplis avec la suspension bactérienne comme suit :

- Remplir les tubules des tests ADH et URE et remplir leurs cupules avec l'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose.
- Remplir uniquement les tubules des tests restants.

La galerie est incubée à 37°C pendant 24H [98].

4.3.5.2.5.6.2 Lecture de la galerie API Staph:

Les résultats de certains tests sont lus directement, d'autres, nécessitent l'addition de réactifs comme suit :

- Addition d'une goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 au test NIT.
- Addition d'une goutte des réactifs ZYM A et ZYM B au test PAL.
- Addition d'une goutte des réactifs VP 1 et VP 2 au test VP.

Après l'ajout des réactifs, attendre 10 minutes avant d'observer les virages de couleurs et de lire les résultats [95].

Résultats et discussion

5 Résultats et discussion :

5.1 Isolement des souches bactériennes sur milieu sélectif :

Après repiquages des souches bactériennes, isolées à partir des trois milieux sélectifs préparés (source d'azote, source de carbone et source de solvant) et incubation à 37°C pendant 7 jours (Figure 32), l'étude macroscopique des colonies obtenues a permis de différencier selon leur aspect (taille, couleur, etc.), 32 souches microbiennes. Toutes les souches ont été repiquées sur gélose nutritive et incubées à 37°C.

Plusieurs repiquages ont été réalisés par la suite dans le but de s'assurer de leur pureté (par observation minutieuse des colonies formées après ré-isolement et coloration différentielle de Gram). 19 souches microbiennes pures ont été ainsi sélectionnées pour la suite de la présente étude.

Remarque : pour des raisons pratiques, les cultures présentant des ressemblances morphologiques entre milieu SC et milieu SO n'ont pas été maintenues.

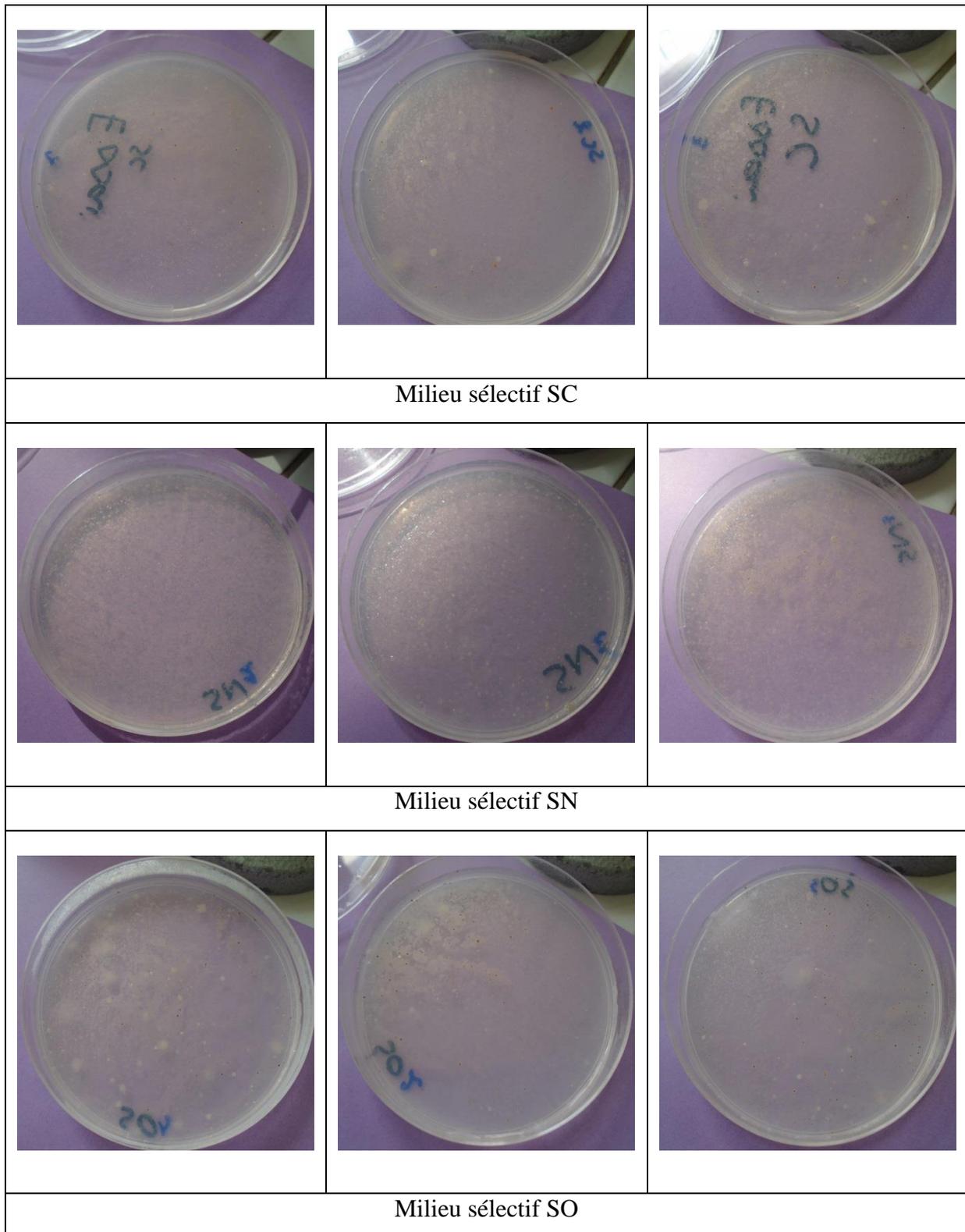
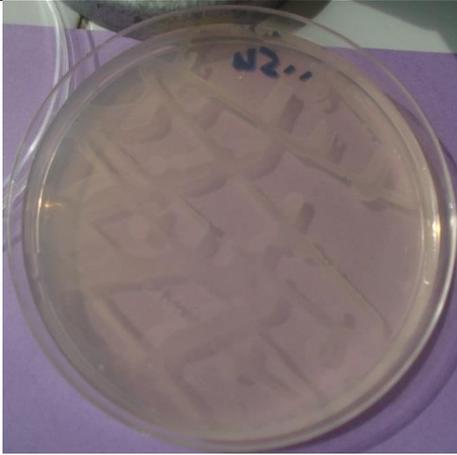
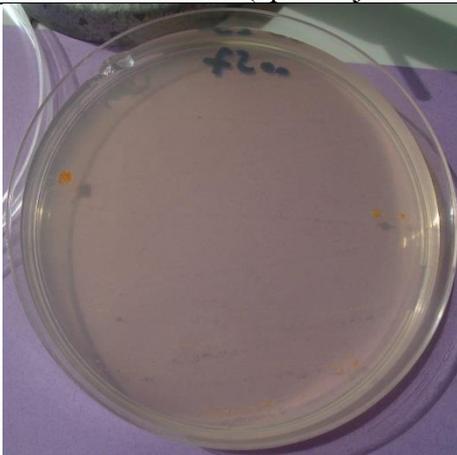


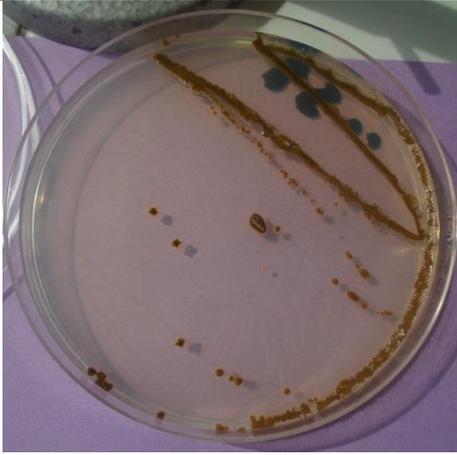
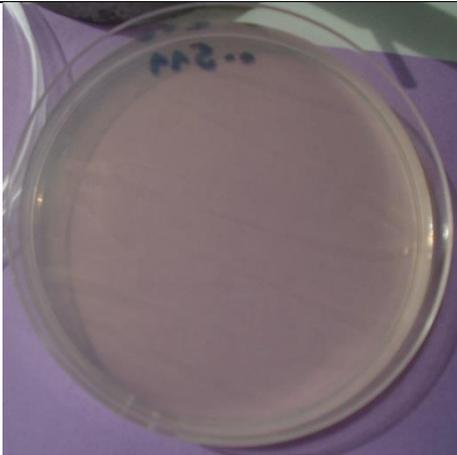
Figure 32: Observation de quelques colonies bactériennes sur les milieux sélectifs.

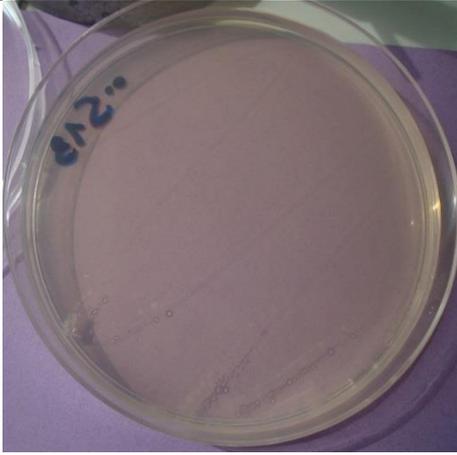
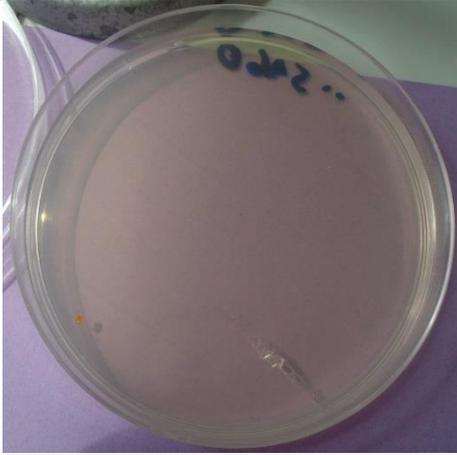
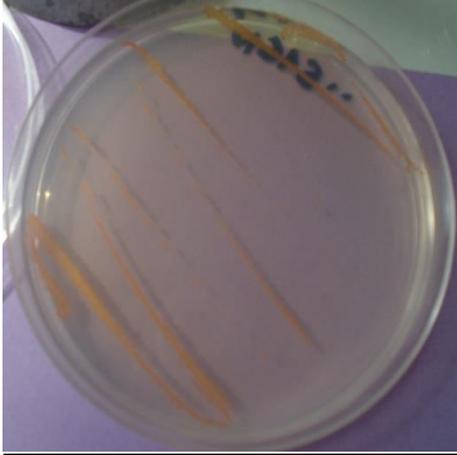
5.1 Description morphologique des souches bactériennes :

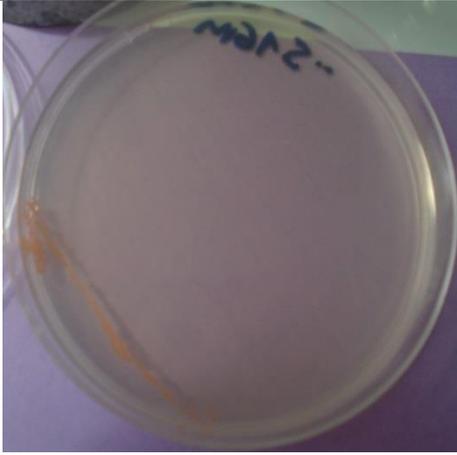
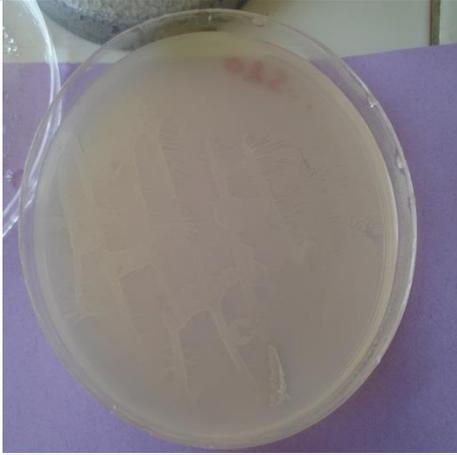
Les 19 souches bactériennes purifiées et sélectionnées comme indiqué précédemment sont décrites comme suit :

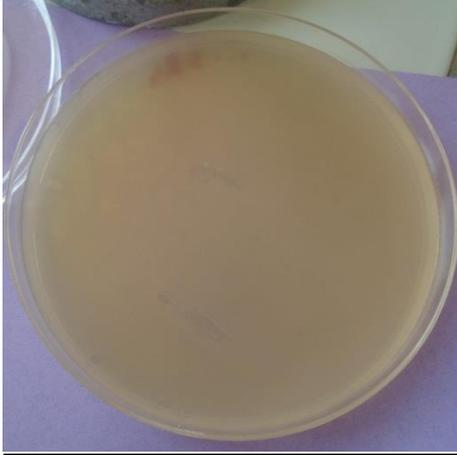
Tableau 15: Description morphologique des colonies bactériennes purifiées.

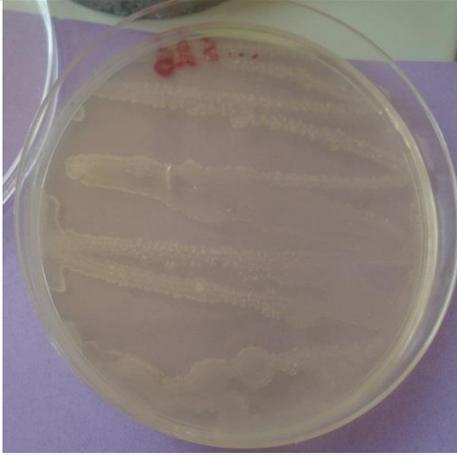
Milieu sélectif	Souche		Description de la souche
SN			Bord : lobé Forme : irrégulière Élévation : élevée Aspect de la surface : lisse Opacité : opaque
	S2 (après 3 jours d'incubation)		
			Opacité : transparente Couleur : blanche Aspect : lisse Bord : régulier Consistance : crémeuse
S4 (après 3 jours d'incubation)			
SC			Couleur : orange Forme : circulaire Bord : régulier Opacité : opaque Taille : petite
	S7 (après 3 jours d'incubation)		

		<p>Forme : circulaire Bord : régulier Couleur marron Elévation : bombée Consistance : crémeuse Odeur forte</p>
S8 (après 7 jours d'incubation)		
		<p>Forme : circulaire Bord : régulier Couleur : blanche Opacité : transparente</p>
S11 (après 3 jours d'incubation)		
		<p>Taille : moyenne Forme : circulaire Bord : régulier Consistance : sèche (très adhérente) Elévation : convexe Couleur : orange foncé</p>
S12 (17 jours d'incubation)		

		<p>Couleur : blanche claire Forme : circulaire Taille : moyenne Elévation : plate Consistance : crémeuse Bord: régulier</p>
S13 (après 3 jours d'incubation)		
		<p>Couleur : orange Taille : petite Forme : circulaire Opacité : opaque Très adhérente à la gélose</p>
S16O (après 3 jours d'incubation)		
		<p>Forme: circulaire Bord: régulier Taille: petite Elévation : convexe Opacité : opaque Couleur orange qui devient noire au 7^{ème} jour d'incubation.</p>
S16N (après 3 jours d'incubation)		

		<p>Forme : circulaire Bord : régulier Elévation : convexe Couleur orange qui devient noire après quelques jours d'incubation</p>
S16M (après 3 jours d'incubation)		
SO		<p>Couleur : blanche Forme : rhizoïde Bord : filamenteux Opacité : translucide</p>
S20 (17 jours d'incubation)		
		<p>Taille : petites Forme : circulaire Bord : régulier Couleur : marron claire</p>
S21 (après 17 jours d'incubation)		

		<p>Couleur : orange claire Forme : circulaire Bord : régulier Elévation : convexe</p>
<p>S22 (après 17 jours d'incubation)</p>		
		<p>Forme circulaire Couleur : orange très foncé qui vire au marron Aspect : lisse Elévation : Convexe Taille : moyenne Présence d'une pigmentation orange autour de certaines colonies</p>
<p>S23 (après 21 jours d'incubation)</p>		
		<p>Colonies envahissantes Consistance : muqueuse Opacité : translucide Couleur : non-pigmentée</p>
<p>S24 (après 17 jours d'incubation)</p>		

		<p>Forme : irrégulière Bord : lobé Consistance : sèche Couleur : blanche Taille grande Elévation : ombiliquée</p>
<p>S25 (après 17 jours d'incubation)</p>		
		<p>Colonie circulaire avec un centre blanc et rond et un contour transparent</p>
<p>S28 (après 17 jours d'incubation)</p>		
		<p>Forme : circulaire Elévation : bombée Couleur : blanche Bord : régulier Aspect : muqueux Opacité : opaque</p>
<p>S33(1) (après 8 jours d'incubation)</p>		

		<p>Colonie envahissante Opacité : translucide Consistance : muqueuse Couleur : non pigmentée</p>
S33 (3) (après 8 jours d'incubation)		

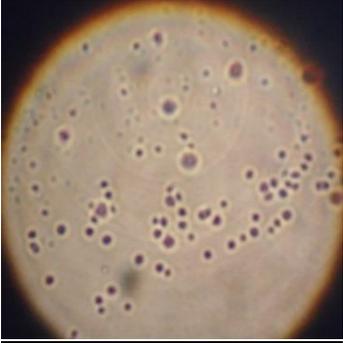
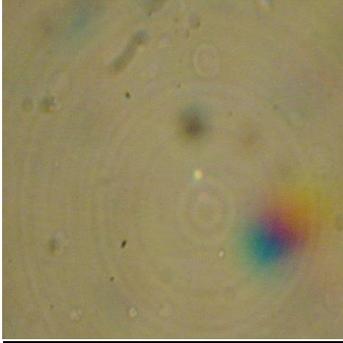
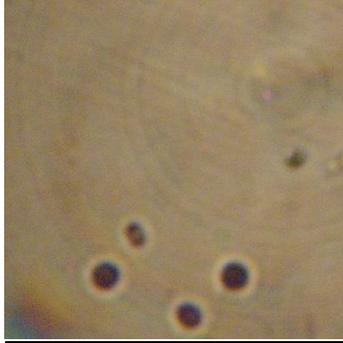
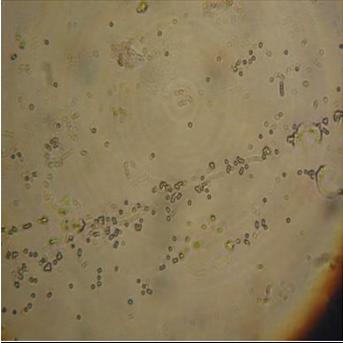
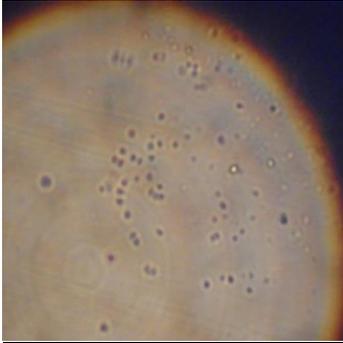
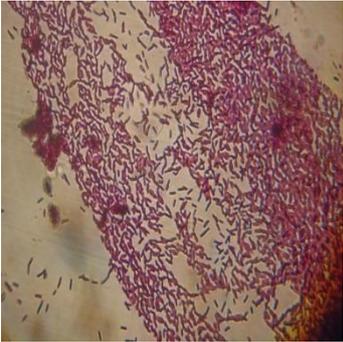
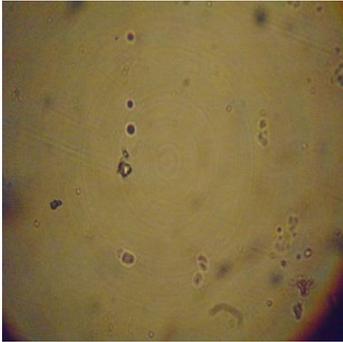
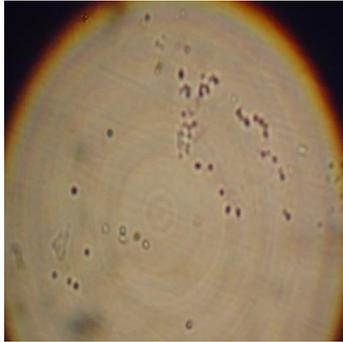
5.2 Identification des souches bactériennes :

5.2.1 Coloration de Gram :

Une coloration de Gram a été réalisée sur tous les isolats obtenus (figure 33), permettant ainsi de mettre en évidence la structure de leur paroi bactérienne, de déterminer leur morphologie en plus de leur mode de groupement. Les résultats de cette coloration sont résumés dans le tableau qui suit :

Tableau 16: Résultats de la coloration de Gram.

Souche	Coloration de Gram	Morphologie	Mode de groupement
S2	Gram (-)	Cocci	Isolées (monocoques)
S4	Gram (+)	Bacilles	Isolées
S7	Gram (-)	Petits bacilles	Isolées
S8	Gram (-)	Cocci	Chainettes
S11	Gram (-)	Cocci	Isolées (monocoques)
S12	Gram (-)	Cocci	Isolées (monocoques)
S13	Gram (+)	Cocci	Isolées (monocoques), Présences de quelques diplocoques.
S16O	Gram (+)	Cocci	Isolées (monocoques),chainettes.
S16N	Gram (+)	Cocci	Isolés
S16M	Gram (+)	Cocci	En amas
S17	Gram (-)	Cocci	Monocoques, diplocoques, et quelques chainettes.
S20	Gram (-)	Cocci	Monocoques
S21	Gram (-)	Cocci	Monocoques
S22	Gram (-)	Cocci	Monocoques
S23	Gram (-)	Cocci	Monocoques
S24	Gram (-)	Cocci	Monocoques
S25	Gram (-)	Cocci	Monocoques
S28	Gram (-)	Coccobacilles	Isolées
S33(1)	Gram (-)	Bacilles	Isolées, diplobacilles, chainettes.
S33 (3)	Gram (-)	Coccobacilles	Isolés, présence de diplobacilles

		
S2	S4	S7
		
S8	S11	S12
		
S13	S16O	S16N

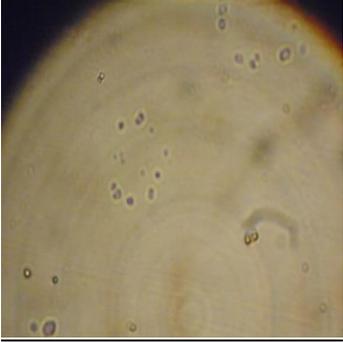
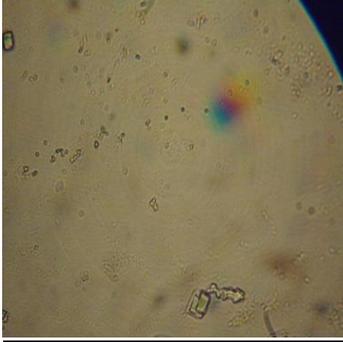
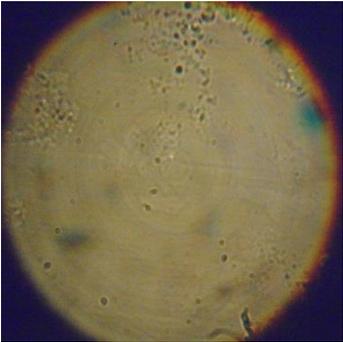
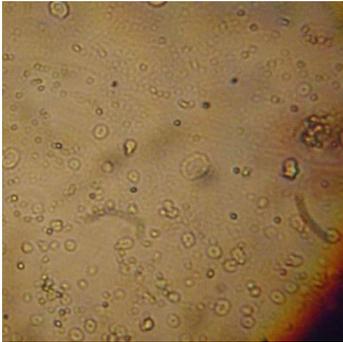
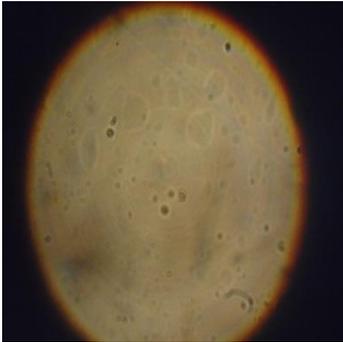
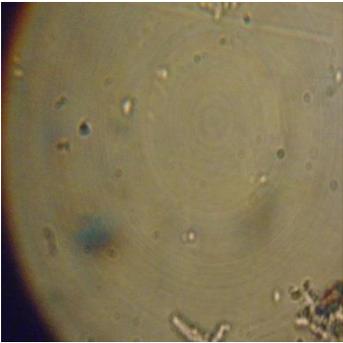
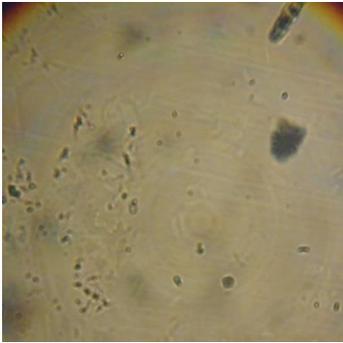
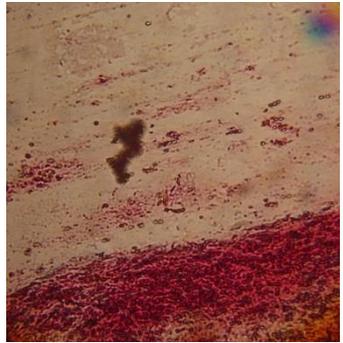
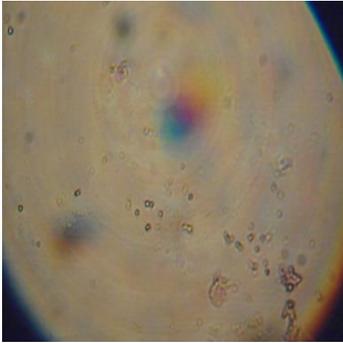
		
S16M	S20	S21
		
S22	S23	S24
		
S25	S28	S33(1)
		
S33(3)		

Figure 33: Coloration de Gram (grossissement x400)

5.2.2 Etat frais :

L'observation microscopique des isolats à l'état frais permet non seulement de déterminer leur forme et de confirmer ainsi les résultats obtenus lors de la coloration de Gram mais également d'apprécier leur mobilité étant donné que ce test est réalisé sur des bactéries vivantes. Les résultats de l'état frais sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 17: Résultats de l'état frais.

Souche	Forme	Mobilité
S2	Cocci	Immobilés
S4	Bacilles	Immobilés
S7	Bacilles	Immobilés
S8	Cocci	Immobilés
S11	Cocci	Immobilés
S12	Cocci	Immobilés
S13	Cocci	Immobilés
S14	Coccobacilles	Immobilés
S16O	Cocci	Immobilés
S16M	Cocci	Immobilés
S16N	Cocci	Immobilés
S20	Cocci	Immobilés
S21	Cocci	Immobilés
S22	Cocci	Immobilés
S23	Cocci	Immobilés
S24	Cocci	Immobilés
S25	Cocci	Immobilés
S28	Coccobacilles	Immobilés
S33(1)	Bacilles	Immobilés
S33 (3)	Coccobacilles	Mobilés polaires

Les résultats montrent que toutes les souches isolées sont immobilés, mise-à-part la souche S33(3) qui s'est avérée mobile, indiquant la présence d'une flagellation qui peut être monotriche, lophotriche ou amphitriche.

5.2.3 Recherche des enzymes respiratoires :

5.2.3.1 Test de la catalase :

Le test de la catalase a été réalisé sur les souches S13, S16O, S16N et S16M. Ces souches microbiennes sont des cocci à Gram positif. Le test de la catalase permet d'orienter la recherche vers soit les *Staphylococcus* et les *Micrococcus* qui sont catalase-positifs, soit les *Streptococcus* qui sont catalase-négatifs. Les résultats sont résumés dans le tableau qui suit :

Tableau 18: Résultats du test de la catalase.

Souche	Observation	Test de la catalase
S13	Formation de bulles (dégagement gazeux)	Catalase +
S16O	Formation de bulles (dégagement gazeux)	Catalase +
S16N	Formation de bulles (dégagement gazeux)	Catalase +
S16M	Formation de bulles (dégagement gazeux)	Catalase +

Les isolats S13, S16O, S16N et S16M sont catalase positive. Ces résultats permettent d'orienter la recherche vers les genres *Micrococcus* et/ou *Staphylococcus*.

5.2.3.2 Test de l'oxydase :

Le test de l'oxydase est réalisé sur les différentes souches microbiennes. L'apparition d'une coloration violette foncée indique que la bactérie est oxydase positive et dans le cas contraire, la bactérie est dite oxydase négative. Les résultats de ce test sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 19: Résultats du test de l'oxydase.

Milieu d'isolement	Souche	Test de l'oxydase
SN	S2	Oxydase +
	S4	Oxydase -
SC	S7	Oxydase +
	S8	Oxydase -
	S11	Oxydase -
	S12	Oxydase -
	S13	Oxydase +
	S16O	Oxydase -
	S16N	Oxydase -
	S16M	Oxydase -
SO	S20	Oxydase -
	S21	Oxydase -
	S22	Oxydase -
	S23	Oxydase -
	S24	Oxydase +
	S25	Oxydase +
	S28	Oxydase +
	S33(1)	Oxydase +
	S33 (3)	Oxydase +

5.2.4 Galerie API:

Le choix de la galerie API appropriée pour l'identification des isolats se fait sur la base des résultats obtenus à partir des études macroscopiques, microscopiques et de la recherche des enzymes respiratoires ; ceci permet d'orienter la recherche vers certains genres bactériens.

La souche S4 correspond à une bactérie sous forme de bacille, à Gram positif, isolé, immobile et aérobic. Elle est oxydase négative et catalase positive. Ces données nous orientent vers une identification de la souche par la galerie API Coryne. Cette dernière permettant d'identifier les bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* (bacille, non sporulé, immobile, catalase positive et généralement oxydase négative) ou apparenté [99].

Les souches S13, S16O, S16N et S16M sont des cocci aérobies, à Gram positif immobiles et arrangées en amas, en chainettes ou isolées ce qui oriente la recherche vers les genres : *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, etc. De plus, ces bactéries sont catalase positive ce qui permet de distinguer biochimiquement les *Staphylococci* qui sont catalase positive des *Streptococci* qui sont catalase négative. Par conséquent, l'identification est réalisée avec la galerie API Staph [93].

5.2.4.1 Galerie API Coryne :

La galerie API Coryne est ensemencée comme indiqué précédemment dans la partie matériel et méthodes avec une suspension bactérienne à 0,5 Mc Farland (figure 34). Après 24h d'incubation à une température de 37°C, les résultats sont lus et interprétés suivant le tableau de lecture disponible sur la fiche technique de la galerie Api Coryne.

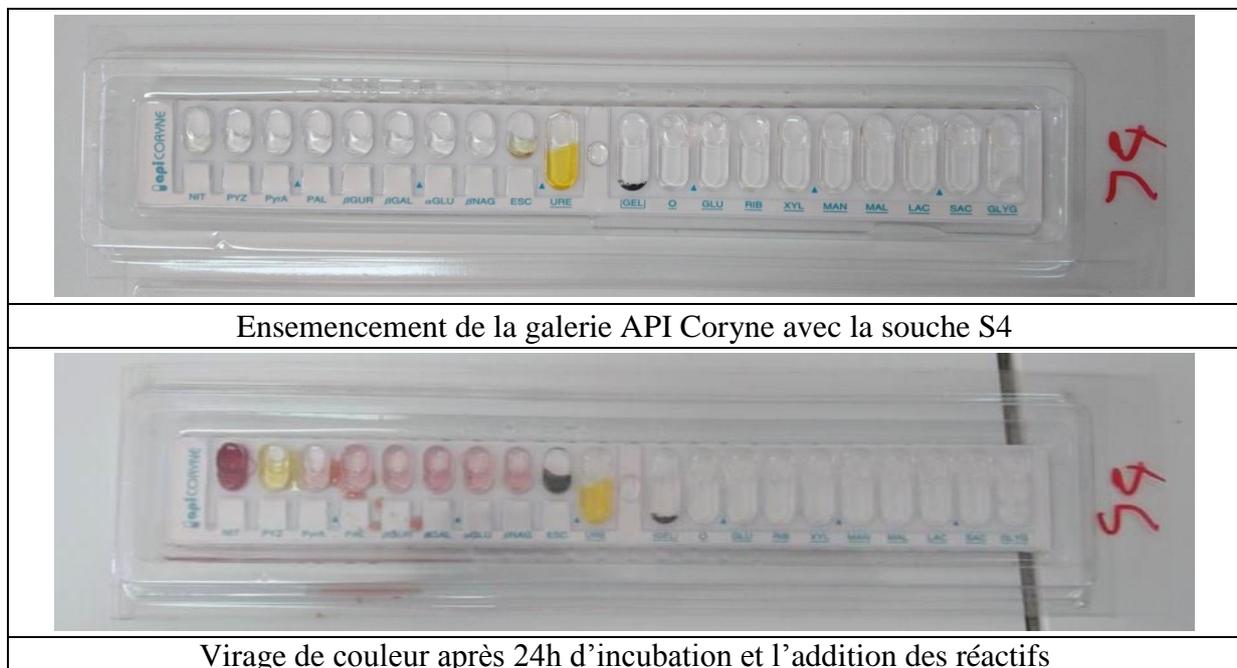


Figure 34: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Coryne par l'isolat S4.

Les résultats des tests réalisés par la galerie API Coryne pour l'identification de la souche S4 sont résumés dans le tableau qui suit :

Tableau 20: Résultats des tests réalisés sur la souche S4 avec la galerie API Coryne.

Tests	Substrat	Résultats	Score
NIT	Nitrate de potassium	+	1
PYZ	Pyrazine carboxamide	-	
PYRA	Acide pyroglutamique- β -naphtylamide	-	
PAL	2-naphtyl-phosphate	+	5
β -GUR	Acide naphtol-ASBI-glucuronique	-	
β -GAL	2-naphtyl- β D-galactopyranoside	+	
α -GLU	2-naphtyl- α D-glucopyranoside	+	5
β -NAG	1-naphtyl-N-acétyl- β D-glucosaminide	-	
ESC	Esculine Citrate de fer	+	
<u>URE</u>	Urée	-	0
<u>GEL</u>	Gélatine	-	
<u>0</u>	Témoin négatif	-	
<u>GLU</u>	D-glucose	-	0
<u>RIB</u>	D-ribose	-	
<u>XYL</u>	D-xylose	-	
<u>MAN</u>	D-mannitol	-	0
<u>MAL</u>	D-maltose	-	
<u>LAC</u>	D-lactose	-	
<u>SAC</u>	D-saccharose	-	4
<u>GLYG</u>	Glycogène	-	
Catalase	H ₂ O ₂ (3%)	+	
Profil numérique: 1550004			

Remarque : pour les tests allant de 0 (témoin négatif) à GLYC, aucun virage de couleur n'a été observé (rouge ou orange pour un test négatif et jaune pour un test positif) après les 24h d'incubation. Le milieu est resté transparent et à défaut de pouvoir refaire le test, ces résultats sont considérés négatif en se référant au témoin négatif 0 qui pour lui aussi aucun virage de couleur n'a été observé.

L'identification par la galerie API Coryne indique que ce micro-organisme réduit les nitrates (NIT +), ne fermente pas les glucides (le glucose, le ribose, le xylose, le maltose, le lactose, le saccharose, le glycogène et le mannitol). De plus, elle montre la présence des enzymes phosphatase alcaline (PAL +), α -glucosidase (α -GLU +) et β -galactosidase (β -GAL).

Les résultats de l'identification avec le logiciel API WEB sont indiqués dans le tableau 21 :

Tableau 21:Résultat de l'identification par la galerie API Coryne.

Taxon significatif (s)	% ID	T	Test (s) à l'encontre
<i>Rhodococcus sp.</i>	67,5	0,61	β -GAL 1%
<i>Leifsonia aquatica</i>	23,0	0,54	PYZ 99% β -NAG 80%
<i>Brevibacterium sp.</i>	5,9	0,55	NIT 25% β -GAL 20% ESC 20%

L'identification de cet organisme à l'aide du profil numérique obtenu indique qu'il appartient probablement au genre *Rhodococcus sp.* avec un %ID de 67,5%. Le résultat indique que le test β -GAL est à 1% positif pour le genre *Rhodococcus sp.*, selon la base de données disponibles.

Le résultat obtenu en introduisant le profil numérique au niveau de l'identifieur « api » de l'UPBM (Union des professeurs de Physiologie Biochimie Microbiologie) indique que la souche appartient au genre *Rhodococcus sp.* avec une probabilité de 78,7%.

5.2.4.2 Galerie API Staph :

La galerie API Staph a étéensemencée comme indiqué précédemment dans la partie matériel et méthodes avec une suspension bactérienne à 0,5 Mc Farland (figure 35, 36, 37 et 38). Après 24h d'incubation à une température de 37°C, les résultats ont été lus et interprétés suivant le tableau de lecture disponible sur la fiche technique de la galerie Api Staph.

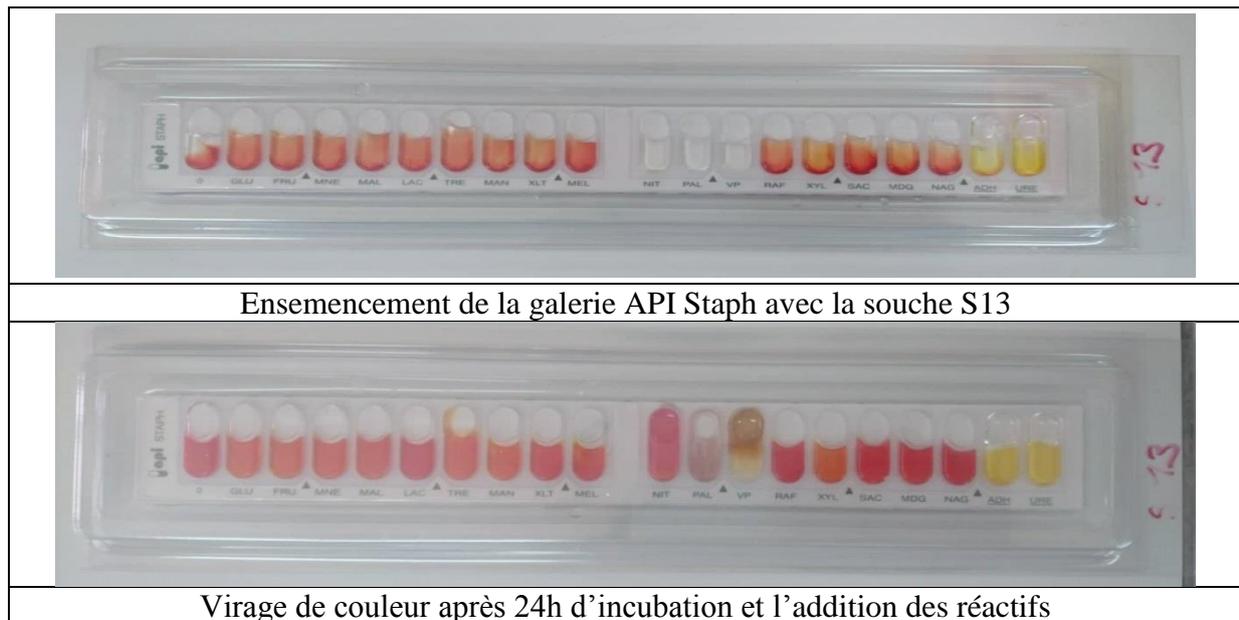


Figure 35: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Staph par l'isolat S13.



Ensemencement de la galerie API Staph avec la souche S160

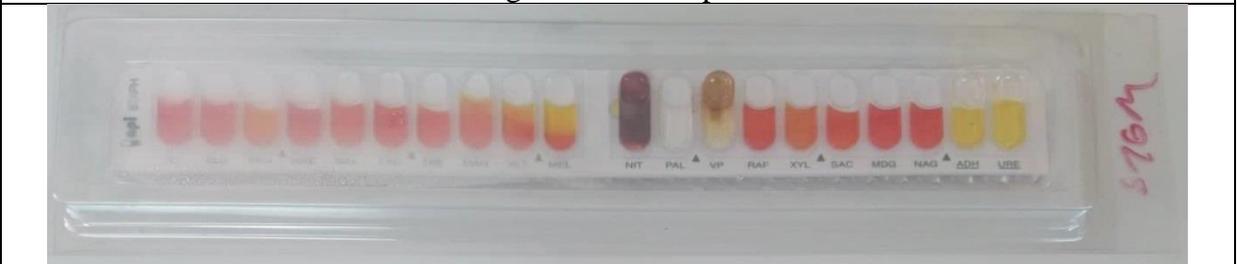


Virage de couleur après 24h d'incubation et addition des réactifs

Figure 36: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Staph par l'isolat S160.



Ensemencement de la galerie API Staph avec la souche S16M

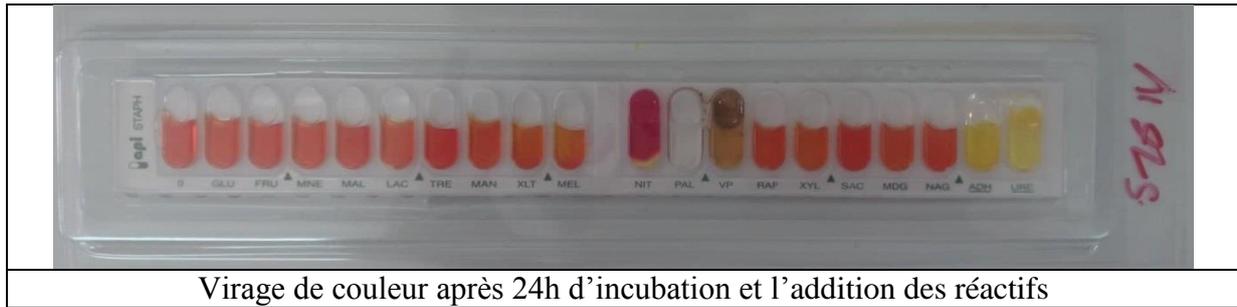


Virage de couleur après 24h d'incubation et l'addition des réactifs

Figure 37: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Staph par l'isolat S16M.



Ensemencement de la galerie API Staph avec la souche S16N



Virage de couleur après 24h d’incubation et l’addition des réactifs

Figure 38: Résultats de la fermentation des différents substrats présents dans la galerie API Staph par l’isolat S16N.

Les résultats des tests réalisés par la galerie API Staph pour l’identification des souches S13, S16N, S16O et S16M sont résumés dans le tableau qui suit :

Tableau 22: Résultats des tests réalisés sur les souches S13, S16O, S16N et S16M avec la galerie API Staph.

Tests	Substrats	Souche S13	Souche S16O	Souche S16M	Souche S16N
0	Aucun (témoin négatif)	-	-	-	-
GLU	D-glucose	-	-	-	-
FRU	D-fructose	-	-	-	-
MNE	D-mannose	-	-	-	-
MAL	D-maltose	-	-	-	-
LAC	D-lactose	-	-	-	-
TRE	D-tréhalose	-	-	-	-
MAN	D-mannitol	-	-	-	-
XLT	D-xylitol	-	-	-	-
MEL	D-mélibiose	-	-	-	-
NIT	Nitrate de potassium	+	+	+	+
PAL	β -naphtyl-phosphate	+	+	+	+
VP	Sodium pyruvate	-	-	-	-
RAF	D-raffinose	-	-	-	-
XYL	D-xylose	-	-	-	-
SAC	D-saccharose	-	-	-	-
MDG	Méthyl- α D-glucopyranoside	-	-	-	-
NAG	N-acétyl glucosamine	-	-	-	-
<u>ADH</u>	L-arginine	-	-	-	-
<u>URE</u>	urée	-	-	-	-
Profile numérique		0006000	0006000	0006000	0006000

Les résultats obtenus suite à l'identification de ces souches par la galerie API Staph indiquent que ces micro-organismes réduisent les nitrates en nitrites (Test NIT +) et synthétisent l'enzyme phosphatase alcaline (Test PAL +) qui est une enzyme responsable de l'hydrolyse des mono-esters de phosphate à des valeurs de pH basiques [100]. En aérobiose, ces souches ne transforment pas les glucides (D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-maltose, D-lactose, D-tréhalose, D-mannitol, xylitol, D-mélibiose, D-raffinose, D-xylose, D-saccharose, méthyl- α D-glucospyranoside, N-acétylglucosamine) en acide. Le profil numérique obtenu était le même pour les quatre souches. Les résultats de l'identification sont indiqués dans le tableau 23 :

Tableau 23: Résultat de l'identification par la galerie API Staph.

Taxon significatif	% ID	Tests à l'encontre
<i>Micrococcus</i> sp.	98,9	NIT 8% PAL 15%

Le profil numérique obtenu a été soumis à l'identifieur « api » de l'UPBM. Le résultat indique que ces souches appartiennent au genre *Micrococcus* avec un %ID de 98,9 %.

Aussi, afin de confirmer l'appartenance de la souche au genre *Micrococcus*, il est recommandé de réaliser un test de résistance à la lysostaphine (LSTR) qui constitue le 21^{ème} test de la galerie API Staph. Le tableau d'identification disponible sur la fiche technique de la galerie API Staph (disponible sur: <https://microbiologiemedicale.fr/wp-content/uploads/2019/02/API-STAPH.pdf>) indique que le test LSTR est à 95% positif pour le genre *Micrococcus*.

N.B : pour les souches bactériennes restantes, vu les circonstances et l'impossibilité de réaliser l'identification par le biais des tests biochimiques en utilisant les galeries API, nous proposons ci-joint une orientation vers certains genres en se basant sur les résultats obtenus précédemment et en se référant au manuel de bactériologie systématique de Bergey :

Tableau 24:Orientation bactérienne des isolats non-identifiés.

Milieu sélectif	Souche à identifiée	Orientation
SN	S2	<i>Neisseria</i>
SC	S7	<i>Sphingobium</i>
	S8	<i>Acinetobacter</i>
	S11	<i>Acinetobacter</i>
	S12	<i>Acinetobacter</i>
SO	S20	<i>Acinetobacter</i>
	S21	<i>Acinetobacter</i>
	S22	<i>Acinetobacter</i>
	S23	<i>Acinetobacter</i>
	S24	<i>Moraxella</i>
	S25	<i>Neisseria</i>
	S28	<i>Moraxella</i>
	S33(1)	<i>Pseudomonas ou Aeromonas</i>
S33 (3)	<i>Pseudomonas ou Aeromonas</i>	

- La bactérie S2 est sous forme de coque, Gram négatif, aérobie et oxydase positive ce qui suggère qu'elle appartient au genre *Neisseria*.
- La souche S7 est présente sous forme de bacille gram négatif, aérobie et immobile. Le test de l'oxydase est positif, et dans ce cas il permet de distinguer entre la famille des Enterobacteriaceae (oxydase négative) des non-Enterobacteriaceae (oxydase positive) [93]. Cette bactérie est suspectée d'appartenir au genre *Sphingobium*. Les bactéries appartenant au genre *Sphingobium* sont des bacilles, aérobies strictes, mobile ou immobile et d'oxydase variable. Les colonies de ce genre sont petites, pigmentées ou non, brillantes ou non, lisses, circulaires, opaques et convexes avec des bords réguliers. La couleur de la colonie varie de jaune pâle ou foncé et brillant à orange ou blanc [101].
- L'isolat S25 est sous forme de cocci, immobile à Gram négatif et aérobie. Le test à l'oxydase est positif. Les colonies sont sèches, irrégulières, très adhérentes et plissées ce qui suggèrent qu'elles appartiennent au genre des *Neisseria*. Les *Neisseria* sont des bactéries sous forme de cocci se présentant libres mais souvent en paires, à Gram négatif et oxydase positive. Quant à la morphologie des colonies, elle varie selon les espèces et va de petites colonies lisses, transparentes et butyreuses à des colonies plissées, sèches et adhérentes [102].
- Les souches S8, S11, S12, S20, S21, S22, S23 pourraient appartenir au genre *Acinetobacter*. Les *Acinetobacter* sont sous forme de bacilles qui deviennent sphériques lors de la phase stationnaire de croissance. Elles sont oxydase négative. Cependant, les colonies des bactéries appartenant à ce genre sont généralement non-pigmentées [102].

5.3 Interprétation et discussion des résultats :

La présente étude a permis d'isoler des souches bactériennes utilisant la cyperméthrine comme substrat de croissance. Certaines l'utilisant comme unique source d'azote (*Rhodococcus* sp. et probablement *Neisseria*) et d'autres l'utilisant comme unique source de carbone (*Micrococcus* sp., et probablement les bactéries *Sphingobium* et *Acinetobacter*) et cela après une durée d'acclimatation des souches à la cyperméthrine s'étalant sur 19 jours en augmentant progressivement la concentration de la cyperméthrine jusqu'à 2 g.L⁻¹ et en diminuant progressivement la concentration du glucose ou de la source d'azote jusqu'à atteindre une concentration nulle pour pouvoir sélectionner les souches désirées.

D'après la littérature, de nombreuses études ont été menées dans le but d'isoler des bactéries qui métabolisent la cyperméthrine afin d'éventuellement les exploiter dans la bioremédiation des sols et des eaux contaminés par cette dernière. Certaines de ces bactéries appartiennent aux mêmes genres d'isolats retrouvés à l'issue de ce travail comme les genres *Rhodococcus* et *Micrococcus* [81, 103].

Les espèces du genre *Rhodococcus* sont en très grande partie isolées de l'environnement : des sols et des roches propres ou pollués, des eaux de surfaces et souterraines, des sédiments marins, des animaux et des plantes. Elles se trouvent également dans les environnements où sont présents des hydrocarbures. Ce genre de bactérie dégrade un large éventail de composés xénobiotiques (généralement très stables et toxiques) de diverses structures: composés

aliphatiques et aromatiques, composés halogénés et oxygénés, nitriles, et notamment des pesticides comme la cyperméthrine [104, 105].

Dans une étude rapportée par Akbar et son équipe [103], plusieurs souches dégradant la cyperméthrine et capables de l'utiliser comme seule source de carbone furent isolées à partir d'un sol traité durant 10 ans avec des pesticides pyréthrinoïdes dont la cyperméthrine parmi elles un isolat appartenant au genre *Rhodococcus* (*Rhodococcus* sp. JCM5). Durant cette étude, cette souche a démontré une très grande capacité de biodégradation de la cyperméthrine en comparaison aux autres isolats. En effet, le pourcentage d'élimination était de 84,8% de la cyperméthrine en 8 jours dans un milieu minéral. La dégradation de la cyperméthrine était complète au bout de 10 jours avec un taux de dégradation de $9,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{jours}^{-1}$ et cela dans un milieu minéral contenant la cyperméthrine comme unique source de carbone. Ce micro-organisme s'est avéré aussi capable de métaboliser des pesticides de structures différentes à une concentration de 100 mg.L^{-1} : il s'agissait du carbofuran dégradé à 32%, du chlorpyrifos dégradé à 47,3%, ainsi que d'autres pesticides pyréthrinoïdes dont la bifenthrine, la deltaméthrine et la λ -cyhalothrine avec différents pourcentages d'élimination et des métabolites comme le 3-PBA et le catéchol avec des taux de dégradation élevés.

En réalisant des essais de biodégradation dans un sol microbiologiquement actif, Akbar et son équipe ont observé un taux d'élimination de la cyperméthrine (200 mg.kg^{-1} de sol) de 96 et 100% au bout de 35 et 42 jours, respectivement, dans un sol inoculé par *Rhodococcus* sp. JCM5. La constante de vitesse était de $0,0807 \text{ Jours}^{-1}$ suivant une cinétique d'ordre 1 avec un temps de demi-vie de 8,6 jours. Le taux moyen de dégradation de la cyperméthrine était de $4,6 \text{ mg.kg}^{-1}$. Ces résultats démontrent l'efficacité de la souche isolée à métaboliser la cyperméthrine [103].

Cette polyvalence dans la dégradation de substrats de structures différentes et notamment les pesticides, en plus de leur capacité à se développer et à s'adapter à des conditions environnementales extrêmes (milieu limité en oxygène et en nutriments, environnement hautement pollué) fait des *Rhodococcus* des agents prometteurs dans la dégradation naturelle des contaminants récalcitrants et la bioremédiation des écosystèmes pollués [104].

Les *Micrococcus* sont généralement retrouvés sur la peau des mammifères. Les *Micrococcus* sont également retrouvées dans l'environnement qui est considéré comme source secondaire de ces bactéries où elles s'y trouvent en petites population de micrococci. Ainsi, elles sont présentes dans le sol, la poussière, l'air, les plantes, l'eau douce et l'eau de mer [106].

Des bactéries isolées de l'environnement (sol et boues activées) appartenant au genre *Micrococcus* ont montré leur capacité à assimiler et à détoxifier par la même occasion des pesticides de la famille des pyréthrinoïdes, mais également de la famille des carbamates, ainsi que d'autres polluants inorganiques.

Lors d'une étude réalisée par Tallur *et al.*, une souche bactérienne capable de dégrader la cyperméthrine fut isolée à partir d'un sol contaminé par des pesticides et a été identifiée

comme appartenant au genre *Micrococcus*. Cette bactérie a permis la détoxification et la minéralisation complète de la cyperméthrine. Ce même organisme s'est également révélé capable d'utiliser la deltaméthrine, le fenvalérate et la perméthrine comme substrat de croissance. Une seconde étude a été réalisée par le même auteur afin d'évaluer l'efficacité de biodégradation de la cyperméthrine par cette souche bactérienne qui cette fois-ci était immobilisée dans différentes matrices: l'alginate de sodium (SA), l'agar, le polyacrylamide et la mousse de polyuréthane (PUF). De meilleurs résultats de biodégradation ont été obtenus à partir des cellules immobilisées de cette souche microbienne dans diverses matrices en comparaison avec les cellules en suspension libre et cela même à des concentrations élevées de cyperméthrine (20 mM). Cette méthode peut être utilisée pour dépolluer l'eau contaminée par la cyperméthrine [81, 107].

Une autre souche de *Micrococcus* isolée à partir de la terre d'un jardin dans une étude menée par Doddamani *et al.*, s'est révélée capable de dégrader un autre pesticide : le carbaryl de la famille des carbamates en l'utilisant comme seule source de carbone. Cette souche fut également capable d'assimiler d'autres composés aromatiques issus de la dégradation du carbaryl [108].

Dans la présente étude, des bactéries sélectionnées comme étant en mesure de dégrader la cyperméthrine mais dont l'identification par le biais des tests biochimiques miniaturisés (galerie API) n'a malheureusement pas pu se faire, sont soupçonnées d'appartenir aux genres *Sphingobium*, *Acinetobacter* et *Neisseria*.

De même que pour les bactéries du genre *Sphingobium*, les *Acinetobacter* se trouvent naturellement dans le sol, l'eau et les eaux usées. Les *Sphingobium* sont également retrouvées dans les décharges d'hydrocarbures, les sédiments des rivières, la rhizosphère des plantes, etc. [101, 102].

Des espèces de *Sphingobium* sont impliquées dans la biodégradation de polluants récalcitrants comme le lindane, le naphthalène, le toluène, l'anthracène, etc.[109].

Dans une étude portant sur la biodégradation des pyréthrinoïdes, une souche *Sphingobium* sp. JZ-2 s'est montrée capable de dégrader divers composés aromatiques et notamment des pyréthrinoïdes plus au moins efficacement. Cet isolat a pu dégrader la cyperméthrine et la perméthrine à environ 80% à partir d'une concentration initiale de 50 mg.L⁻¹ et cela après 5 jours d'incubation. Il a démontré son efficacité pour métaboliser la fenpropathrine (éliminée à 100%). Cependant, l'élimination d'autres pyréthrinoïdes (le fenvalérate, la deltaméthrine, la cyhalothrine et surtout de la bifenthrine) s'est déroulée plus lentement et cela dans les mêmes conditions d'incubation. *Sphingobium* sp. JZ-2 s'est révélée compétente pour métaboliser certains composés aromatiques comme le 3-phénoxybenzaldéhyde, le 3-phénoxybenzoate, le phénol, le catéchol et le protocatéchuate [110].

Dans une autre étude, une souche de *Sphingobium* (*Sphingobium* sp. JQL4-5) a pu dégrader la cyperméthrine (présente à une concentration initiale de 100 mg.L⁻¹) à 36,5% en 48h d'incubation. Néanmoins, ce taux d'élimination demeure faible, en comparaison aux résultats obtenus lors de la dégradation d'autres pyréthrinoïdes où cette souche dégradait plus

de 90% de la fenpropathrine, de la bêta-cyperméthrine et du fenvalérate dans les mêmes conditions [111].

Une souche d'*Acinetobacter* (*Acinetobacter calcoaceticus* MCm5) isolée d'un sol agricole s'est révélée très efficace pour décomposer la cyperméthrine ; 84,7% de la cyperméthrine (100 mg.L⁻¹) fut éliminée après 10 jours d'incubation. La biodégradation de la cyperméthrine (200 mg.kg⁻¹) dans un sol stérilisé et inoculé avec *Acinetobacter calcoaceticus* MCm5 fut plus élevée en comparaison avec les résultats de biodégradation obtenus avec la communauté indigène du sol (non stérilisé et sans apport d'inoculum) avec un temps de demi-vie de 17,07 jours, une constante de vitesse de 0,0068 jours⁻¹ et un taux d'élimination de 4,27 mg.kg⁻¹.jours⁻¹ [5].

D'autres bactéries ont démontré qu'elles étaient en mesure de décomposer la cyperméthrine comme: *Pseudomonas*, *Serratia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Corynebacterium*, *Catellibacterium*, *Achromobacter* [72, 86, 87, 112].

Dans la limite des recherches effectuées dans la littérature, aucune souche appartenant au genre *Neisseria* n'est impliquée dans la biodégradation de la cyperméthrine. Les *Neisseria* sont généralement présentes chez les humains au niveau des muqueuses. Chez les animaux, elles sont retrouvées dans les muqueuses de l'oropharynx qui est leur principal habitat [102].

Dans cette étude, les micro-organismes sélectionnés utilisèrent la cyperméthrine comme unique substrat de croissance (comme unique source de carbone ou comme unique source d'azote) et cela même pour des concentrations élevées de cyperméthrine dans le milieu. En effet, la concentration de la cyperméthrine dans le milieu de culture durant la période de sélection fut augmentée progressivement d'une concentration de 0,2 à 2 g.L⁻¹. Dans une étude portant sur la dégradation de la cyperméthrine par la souche *Catellibacterium* sp., la biodégradation de la cyperméthrine s'est trouvée limitée par l'augmentation de la concentration initiale de la cyperméthrine, avec des taux de dégradation inférieurs à 70 %, après 7 jours d'incubation pour des concentrations initiales de 500 et 600 mg.L⁻¹, respectivement. A de faibles concentrations (50-200 mg.L⁻¹), la cyperméthrine a été éliminée avec des pourcentages atteignant 90% pour des concentrations inférieurs à 100 mg.L⁻¹ [112]. Néanmoins, les souches sélectionnées dans le cadre de ce travail sont parvenues à tolérer des concentrations relativement élevée de cyperméthrine.

Parmi les métabolites les plus couramment identifiés lors de la dégradation microbienne de la cyperméthrine nous pouvons citer: l'acide 3-phénoxybenzoïque, le 3-phénoxybenzaldéhyde, le catéchol, le phénol, etc. L'identification des produits intermédiaires et finaux ainsi que leur suivi tout au long du processus de décomposition par un ou par plusieurs micro-organismes (consortium) est primordial. En effet, l'accumulation de certains métabolites comme le 3-phénoxybenzaldehyde, si celui-ci n'est pas rapidement métabolisé par le micro-organisme en question, risque d'anéantir la culture à cause de ses propriétés antimicrobiennes et d'ainsi limiter la biodégradation de la cyperméthrine [81, 87, 92, 112]. De plus, l'utilisation d'un consortium de bactéries (cultures mixtes) dans des essais de biodégradation permet d'améliorer fortement son efficacité comme dans le cas de l'utilisation d'une co-culture composée de *Bacillus cereus* ZH-3 et *Streptomyces aureus* HP-S-01

permettant l'élimination de la cyperméthrine et cela dans une large gamme de température et de pH. L'addition de sources de carbone supplémentaires à cette co-culture a permis de stimuler la croissance d'une part et d'améliorer le taux d'élimination d'autre part en comparaison avec la co-culture utilisant la cyperméthrine comme unique source de carbone [92].

Conclusion Et Perspectives

Aujourd'hui, le danger que représente les pesticides sur la santé et l'environnement est incontestable. Plusieurs solutions ont été proposées afin de les remplacer ou du moins en réduire l'utilisation dans le domaine de l'agriculture. Malheureusement, malgré les efforts déployés, leur utilisation est toujours d'actualité à l'échelle mondiale pour satisfaire les besoins croissants des populations et garantir une sécurité alimentaire. Afin de palier à ces problèmes, la recherche d'une technique permettant d'éliminer les pesticides tout en préservant l'écosystème se trouve être la meilleure solution. Pour les pesticides de nature organique, la bioremédiation est un choix des plus judicieux de par son coût mais également son respect de la nature. Afin de garantir sa mise en place et son efficacité, l'identification de germes capables de décomposer ces polluants est primordiale.

Dans ce présent travail, un isolement et une sélection de souches microbiennes capables de biodégrader la cyperméthrine ont été réalisées. Au final, 19 isolats ont été purifiés. Deux souches microbiennes (parmi elles *Rhodococcus* sp.) l'utilisèrent comme unique source d'azote et huit souches (parmi elles *Micrococcus* sp.) l'utilisèrent comme unique source de carbone.

Etant donné que ces souches sont en mesure de métaboliser la cyperméthrine, elles peuvent être utilisées dans le cadre de la bioremédiation des sols et des eaux contaminés par ce polluant. Dans cette perspective, des études complémentaires sont nécessaires avant d'entamer des essais de bioremédiation. Elles sont résumées en ce qui suit :

- Identification génomique des bactéries par le biais du séquençage de l'ARN 16S.
- Détermination des conditions optimales de dégradation pour chacune des souches sélectionnées, ainsi que le taux de dégradation dans ces conditions.
- Etude de l'influence de la concentration de la cyperméthrine sur la biodégradation du pesticide.
- Evaluation de l'efficacité de la biodégradation de la cyperméthrine pour chacune des souches isolées séparément. Ensuite, l'évaluer en présence d'une culture mixte constituée d'un consortium des souches sélectionnées dans un milieu liquide ou dans un sol contaminé par la cyperméthrine.
- Identification des produits intermédiaires et finaux formés lors de la biodégradation du pesticide et proposer une voie de biodégradation pour chacune des souches.
- Extraction et identification des enzymes responsables de la dégradation de la cyperméthrine.
- Evaluation de la capacité de ces isolats à dégrader d'autres pesticides pyréthrinoïdes.
- Addition de sources nutritionnels (source de carbone) en plus de la cyperméthrine et évaluer leur influence sur la biodégradation.
- Immobilisation des souches obtenues dans des matrices et évaluer son influence sur les performances de biodégradation de la cyperméthrine dans une eau ou un sol contaminé.

Références bibliographiques

1. Abubakar Y, Tijjani H, Egbuna C, Adetunji CO, Kala S, Kryeziu TL, Ifemeje JC, Patrick-Iwuanyanwu KC (2020) Pesticides, History, and Classification. In: Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control. Elsevier, pp 29–42
2. Ensley S (2007) Pyrethrins and pyrethroids. In: Veterinary Toxicology. Elsevier, pp 494–498
3. Matthews GA (2018) A history of pesticides. CABI, Boston, MA
4. Randika JLPC, Bandara PKGSS, Soysa HSM, Ruwandepika HAD, Gunatilake SK (2022) Bioremediation of pesticide-contaminated soil: a review on indispensable role of soil bacteria. *J Agric Sciences* 17:19. <https://doi.org/10.4038/jas.v17i1.9609>
5. Akbar S, Sultan S, Kertesz M (2015) Determination of Cypermethrin Degradation Potential of Soil Bacteria Along with Plant Growth-Promoting Characteristics. *Curr Microbiol* 70:75–84. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0684-7>
6. Bencheikh RS (2010) Contre l'intoxication aux pesticides : fermeté et mobilisation. *Toxicologie Maroc*
7. Even I, Berta JL, Volatier JL (2002) Evaluation de l'exposition théorique des nourrissons et des enfants en bas âge aux résidus de pesticides apportés par les aliments courants et infantiles. L'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA)
8. Amblard G, Bonnavaud H, Buche C, Cercueil D, Charvet L, Chrétien Y, Davaine J-B, Degueurce D, Dupupet J-L, Eggenschwiller C, Gouzy A, Lefebvre A, Maestri B, Martin-Laurent F, Migieu X, Millot I, Monteiro S, Morizet T, Moyse S, Nivoix P, Paput M-C, Paris A, Petit M-S, Petitjean S, Pierson F, Saut C, Simeon Y, Subirana A, Tillier C (2009) Pesticides au quotidien. auto-saisine
9. Akashe MM, Pawade UV, Nikam AV (2018) Classification of pesticides: A review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy* 9:144–150. <https://doi.org/10.7897/2277-4343.094131>
10. Kaur R, Mavi GK, Raghav S, Khan I (2019) Pesticides Classification and its Impact on Environment. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8:1889–1897. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2019.803.224>
11. Picó Y, Blasco C, Font G (2004) Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: An overview. *Mass Spectrometry Reviews* 23:45–85. <https://doi.org/10.1002/mas.10071>
12. Yadav IC, Devi NL (2017) Pesticides classification and its impact on human and environment. *Environmental science and engineering* 6:140–158
13. Kamrin MA (1997) Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate. CRC press
14. Errami M (2012) Devenir atmosphérique de bupirimate et transfert de ses métabolites (les diazines) dans l'atmosphère, sa dissipation dans les fruits de tomate et sa dégradation électrochimique. These de doctorat, Reims

15. Socorro J (2015) Étude de la réactivité hétérogène de pesticides adsorbés sur des particules modèles atmosphériques: cinétiques et produits de dégradation. PhD Thesis, Aix-Marseille
16. BATSCH D (2011) L'impact des pesticides sur la santé humaine. Université Henri Poincare - Nancy 1
17. Cooper J, Dobson H (2007) The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection* 26:1337–1348. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2007.03.022>
18. Maksymiv I (2015) Pesticides: Benefits and Hazards. *jpnu* 2:70–76. <https://doi.org/10.15330/jpnu.2.1.70-76>
19. Gavrilesco M (2005) Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Eng Life Sci* 5:497–526. <https://doi.org/10.1002/elsc.200520098>
20. Calvet R (2005) Les pesticides dans le sol: conséquences agronomiques et environnementales. Éd. "France agricole," Paris
21. Queyrel W (2014) Modélisation du devenir des pesticides dans les sols à partir d'un modèle agronomique : évaluation sur le long terme. Phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI
22. Atmo AuvergneRhône-Alpes (2017) Pesticides dans l'air – Bibliographie sur la modélisation
23. Kan AT, Fu Gongmin, Tomson MB (1994) Adsorption/Desorption Hysteresis in Organic Pollutant and Soil/Sediment Interaction. *Environ Sci Technol* 28:859–867. <https://doi.org/10.1021/es00054a017>
24. Racke KD, Skidmore MW, Hamilton DJ, Unsworth JB, Miyamoto J, Cohen SZ (1997) Pesticides Report 38. Pesticide fate in tropical soils (Technical Report). *Pure Appl Chem* 69:1349–1372. <https://doi.org/10.1351/pac199769061349>
25. Tiryaki O, Temur C (2010) The fate of pesticide in the environment. *Journal of Biological and Environmental Sciences* 4:29–38
26. Kerle EA, Jenkins JJ, Vogue PA (1994) Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection. Oregon State University
27. Singh B, Das D (2010) Soil pollution and its control. In: *Fundamentals of Soil Science*, 2nd ed. Indian Society of Soil Science, pp 669–691
28. Al-Mamun A (2017) Pesticide Degradations, Residues and Environmental Concerns. In: Khan MS, Rahman MS (eds) *Pesticide Residue in Foods*. Springer International Publishing, Cham, pp 87–102
29. Haque R, Freed VH (1974) Behavior of pesticides in the environment: "Environmental Chemodynamics." In: Gunther FA (ed) *Residue Reviews*. Springer New York, New York, NY, pp 89–116

30. Aksu Z (2005) Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry* 40:997–1026. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.04.008>
31. Bellouèche O (2020) Etude toxicologique de deux pesticides récemment utilisés à Bordj Bou Arreridj. Mémoire de Master, Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A.
32. Cycoń M, Wójcik M, Piotrowska-Seget Z (2009) Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. *Chemosphere* 76:494–501. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.023>
33. Iwaki H, Abe K, Hasegawa Y (2007) Isolation and characterization of a new 2,4-dinitrophenol-degrading bacterium *Burkholderia* sp. strain KU-46 and its degradation pathway. *FEMS Microbiology Letters* 274:112–117. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00816.x>
34. Sethunathan N, Yoshida T (1973) A *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion. *Can J Microbiol* 19:873–875. <https://doi.org/10.1139/m73-138>
35. Wang L, Zhang L, Chen H, Tian Q, Zhu G (2005) Isolation of a triazophos-degrading strain *Klebsiella* sp. E6 effectively utilizing triazophos as sole nitrogen source. *FEMS Microbiology Letters* 253:259–265. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.044>
36. Bollag J-M, Liu S-Y (1990) Biological Transformation Processes of Pesticides. In: Cheng HH (ed) SSSA Book Series. Soil Science Society of America, Madison, WI, USA, pp 169–211
37. Karigar CS, Rao SS (2011) Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research* 2011:1–11. <https://doi.org/10.4061/2011/805187>
38. Athiappan M, Dinesh Kumar S, Umamaheswari S, Rajaprabu M (2022) Rhizosphere engineering through pesticides-degrading beneficial bacteria. In: *Rhizosphere Engineering*. Elsevier, pp 239–257
39. Sharma PS, Wojnarowicz A, Kutner W, D'Souza F (2016) Molecularly Imprinted Polymers as Synthetic Catalysts. In: *Molecularly Imprinted Catalysts*. Elsevier, pp 183–210
40. Kuhad RC, Johri AK, Singh A, Ward OP (2004) Bioremediation of Pesticide-Contaminated Soils. In: Singh A, Ward OP (eds) *Applied Bioremediation and Phytoremediation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 35–54
41. Uqab B, Mudasir S, Nazir R (2016) Review on Bioremediation of Pesticides. *J Bioremed Biodeg*. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000343>
42. Ricoux C (2009) Evaluation de l'exposition aérienne aux pesticides de la population générale. Etude en air extérieur dans quatre sites de l'Hérault en 2006

43. Nesheim ON, Fishel FM, Mossler M (2019) Toxicity of Pesticides. EDIS 2005:. <https://doi.org/10.32473/edis-pi008-2005>
44. Pesticide Management division, NIPHM Pesticide classification on use, chemical nature, formulation toxicity and action, etc. <https://niphm.gov.in/Recruitments/ASO-PMD.pdf>. Accessed 9 Apr 2022
45. Beaudoin S, Cambron-Goulet É, Huy Hao Dao (2019) Mémoire - Examiner les impacts des pesticides sur la santé publique et l'environnement, ainsi que les pratiques de remplacement innovantes disponibles et à venir dans les secteurs de l'agriculture et de l'alimentation. directions régionales de santé publique de Chaudière-Appalaches, des Laurentides et de la Montérégie.
46. Kim K-H, Kabir E, Jahan SA (2017) Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment* 575:525–535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
47. Mesnage R, Antoniou MN (2018) Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. *Front Public Health* 5:361. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00361>
48. SAMUEL O, SAINT-LAURENT L (2001) Guide de prévention pour les utilisateurs de pesticides en agriculture maraîchère,. l'Institut de Recherche en Santé et en Sécurité du Travail du Québec IRSST
49. Kaur H, Garg H (2014) Pesticides: Environmental Impacts and Management Strategies. In: Soloneski S (ed) *Pesticides - Toxic Aspects*. InTech
50. Pan-Germany (2012) *Pesticides and health hazards Facts and figures*
51. Yadav B (2018) Cypermethrin Toxicity: A Review. *Journal of Forensic Sciences & Criminal Investigation*:. <https://doi.org/10.19080/JFSCI.2018.09.555767>
52. Blair A, Ritz B, Wesseling C, Beane Freeman L (2015) Pesticides and human health. *Occup Environ Med* 72:81–82. <https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102454>
53. Pesticides et santé. Etude écologique du lien entre territoires et mortalité en Poitou-Charentes entre 2003 et 2007. In: ORS Nouvelle Aquitaine. <https://www.ors-na.org/publications/pesticides-et-sante-etude-ecologique-du-lien-entre-territoires-et-mortalite-en-poitou-charentes-entre-2003-et-2007/>. Accessed 1 May 2022
54. Mc A, Ja H, F K (2004) Health effects of chronic pesticide exposure: cancer and neurotoxicity. *Annual review of public health* 25:. <https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.25.101802.123020>
55. Hénault-Ethier L Health and environmental impacts of pyrethroid insecticides: What we know, what we don't know and what we should do about it. Executive summary and littérature review. Équiterre. Montréal,Canada,2015. 68pp.
56. Soderlund DM, Clark JM, Sheets LP, Mullin LS, Piccirillo VJ, Sargent D, Stevens JT, Weiner ML (2002) Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for

- cumulative risk assessment. *Toxicology* 171:3–59. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00569-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00569-8)
57. Richou-Bac L, Venant A (1985) A new family of insecticides: the synthetic pyrethrinoïdes. <https://doi.org/10.4267/2042/65058>
 58. WILLEMIN M-E (2014) Modélisation de la toxicocinétique des isomères cis et trans de la perméthrine et de ses métabolites chez le rat et de leur métabolisme sur hépatocytes humains. Université de Technologie Compiègne
 59. Pfeil R (2014) Pesticide Residues: Pyrethroids. In: *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier, pp 31–34
 60. Housset P, Dickmann R (2009) A promise fulfilled—pyrethroid development and the benefits for agriculture and human health. In: *Pyrethroid Scientific Forum 2009*. p 135
 61. Aznar-Alemaný Ò, Eljarrat E (2020) Introduction to Pyrethroid Insecticides: Chemical Structures, Properties, Mode of Action and Use. In: Eljarrat E (ed) *Pyrethroid Insecticides*. Springer International Publishing, Cham, pp 1–16
 62. Ratelle M (2015) Étude de la cinétique des pesticides pyréthrinoïdes en conditions contrôlées et en milieu de travail dans un objectif de biosurveillance
 63. Field LM, Emyr Davies TG, O'Reilly AO, Williamson MS, Wallace BA (2017) Voltage-gated sodium channels as targets for pyrethroid insecticides. *Eur Biophys J* 46:675–679. <https://doi.org/10.1007/s00249-016-1195-1>
 64. Ravula AR, Yenugu S (2021) Pyrethroid based pesticides – chemical and biological aspects. *Critical Reviews in Toxicology* 51:117–140. <https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1879007>
 65. Williams MK (2009) Urban residential pyrethroid insecticide use during pregnancy and effects on infant neurodevelopment. Columbia University
 66. Fiche info sur les pyréthrinoïdes. In: Oekotoxzentrum. <https://www.centrecotox.ch/>. Accessed 3 May 2022
 67. Chen S, Chang C, Deng Y, An S, Dong YH, Zhou J, Hu M, Zhong G, Zhang L-H (2014) Fenprothrin Biodegradation Pathway in *Bacillus* sp. DG-02 and Its Potential for Bioremediation of Pyrethroid-Contaminated Soils. *J Agric Food Chem* 62:2147–2157. <https://doi.org/10.1021/jf404908j>
 68. Zhan H, Huang Y, Lin Z, Bhatt P, Chen S (2020) New insights into the microbial degradation and catalytic mechanism of synthetic pyrethroids. *Environmental Research* 182:109138. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109138>
 69. Chen S, Hu M, Liu J, Zhong G, Yang L, Rizwan-ul-Haq M, Han H (2011) Biodegradation of beta-cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Ochrobactrum lupini* DG-S-01. *Journal of Hazardous Materials* 187:433–440. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.049>

70. Galadima M, Singh S, Pawar A, Khasnabis S, Dhanjal DS, Anil AG, Rai P, Ramamurthy PC, Singh J (2021) Toxicity, microbial degradation and analytical detection of pyrethroids: A review. *Environmental Advances* 5:100105. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2021.100105>
71. Cycoń M, Piotrowska-Seget Z (2016) Pyrethroid-Degrading Microorganisms and Their Potential for the Bioremediation of Contaminated Soils: A Review. *Front Microbiol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01463>
72. Chen S, Zhan H (2019) Biodegradation of Synthetic Pyrethroid Insecticides. In: Arora PK (ed) *Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds*. Springer Singapore, Singapore, pp 229–244
73. Chen S, Luo J, Hu M, Geng P, Zhang Y (2012) Microbial Detoxification of Bifenthrin by a Novel Yeast and Its Potential for Contaminated Soils Treatment. *PLoS ONE* 7:e30862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030862>
74. Alvarenga N, Birolli WG, Porto ALM (2015) Biodegradation of Organophosphate and Pyrethroid Pesticides by Microorganisms. In: Lichtfouse E, Schwarzbauer J, Robert D (eds) *Pollutants in Buildings, Water and Living Organisms*. Springer International Publishing, Cham, pp 85–121
75. Gajendiran A, Abraham J (2018) An overview of pyrethroid insecticides. *Front Biol* 13:79–90. <https://doi.org/10.1007/s11515-018-1489-z>
76. Organization WHO(1989) Cypermethrin. World Health Organization
77. INERIS (2016) Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Cyperméthrine, DRC-18-157877-10983A
78. (2013) Regulation (EU) n°528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, Evaluation of active substances, Cypermethrin cis:trans/40:60 Product-type 8 (Wood Preservative). Belgique
79. (2016) Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Cyperméthrine. INERIS
80. Lewis KA, Tzilivakis J, Warner DJ, Green A (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 22:1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
81. Tallur PN, Megadi VB, Ninnekar HZ (2008) Biodegradation of Cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN 1. *Biodegradation* 19:77–82. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9116-8>
82. Kaur R, Singh J (2021) Toxicity, Monitoring, and Biodegradation of Cypermethrin Insecticide: A Review. *NEPT* 20:. <https://doi.org/10.46488/NEPT.2021.v20i05.016>
83. Jin Y, Wang L, Ruan M, Liu J, Yang Y, Zhou C, Xu B, Fu Z (2011) Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. *Chemosphere* 84:124–130. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.034>

84. Jin Y, Zheng S, Fu Z (2011) Embryonic exposure to cypermethrin induces apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & Shellfish Immunology* 30:1049–1054. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.02.001>
85. Grewal K, Sandhu G, Kaur R, Brar R, Sandhu, G (2010) Toxic impacts of cypermethrin on behavior and histology of certain tissues of albino rats. *Toxicol Int* 17:94. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.72679>
86. Tyagi H, Prashar P (2015) Isolation and identification of cypermethrin degrading *Serratia nematodiphila* from cauliflower rhizosphere. *Int J PharmTech Res* 7:64–71
87. Pankaj, Sharma A, Gangola S, Khati P, Kumar G, Srivastava A (2016) Novel pathway of cypermethrin biodegradation in a *Bacillus* sp. strain SG2 isolated from cypermethrin-contaminated agriculture field. *3 Biotech* 6:45. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0372-3>
88. Bhatt P, Huang Y, Zhang W, Sharma A, Chen S (2020) Enhanced Cypermethrin Degradation Kinetics and Metabolic Pathway in *Bacillus thuringiensis* Strain SG4. *Microorganisms* 8:223. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020223>
89. Gangola S, Sharma A, Bhatt P, Khati P, Chaudhary P (2018) Presence of esterase and laccase in *Bacillus subtilis* facilitates biodegradation and detoxification of cypermethrin. *Sci Rep* 8:12755. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31082-5>
90. Sundaram S, Das MT, Thakur IS (2013) Biodegradation of cypermethrin by *Bacillus* sp. in soil microcosm and in-vitro toxicity evaluation on human cell line. *International Biodeterioration & Biodegradation* 77:39–44. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.11.008>
91. Yin LB, Zhao LZ, Liu Y, Zhang DY, Zhang SB, Xiao K (2013) Isolation and characterization of cypermethrin degrading bacteria screened from contaminated soil. *Biodegradation of hazardous and special products*
92. Chen S, Luo J, Hu M, Lai K, Geng P, Huang H (2012) Enhancement of cypermethrin degradation by a coculture of *Bacillus cereus* ZH-3 and *Streptomyces aureus* HP-S-01. *Bioresource Technology* 110:97–104. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.106>
93. Cappuccino JG, Sherman N (2014) *Microbiology: a laboratory manual*, 10th ed. Pearson, Boston
94. Aminetou Bent Mohamed, Aicha mint Sidi Baba Manuel de travaux pratiques. Université de Noukchott faculté des sciences et techniques département de biologie
95. Brown AE, Smith H Benson's microbiological applications: laboratory manual in general microbiology, 13th ed. (short version). McGraw-Hill Higher Education, New York
96. HAICHOOR N Travaux pratiques de microbiologie générale. Université Ferhat ABBAS Sétif 1
97. BioMérieux SA Système d'identification des bactéries corynéformes. Fiche technique galerie API Coryne.

98. BioMérieux SA Système d'identification des staphylocoques, microcoques et apparentés. Fiche technique galerie API Staph
99. Bernard KA, Funke G (2015) *Corynebacterium*. In: Whitman WB, Rainey F, Kämpfer P, Trujillo M, Chun J, DeVos P, Hedlund B, Dedysh S (eds) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1st ed. Wiley, pp 1–70
100. Sharma U, Pal D, Prasad R (2014) Alkaline Phosphatase: An Overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 29:269–278. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>
101. Singhvi N, Urvashi F, Gundawar K, Gupta V, Korpole S, Lal R (2021) *Sphingobium*. In: Trujillo ME, Dedysh S, DeVos P, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey FA, Whitman WB (eds) *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1st ed. Wiley, pp 1–29
102. Whitman WB, Bergey's Manual Trust (2015) *Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria*
103. Akbar S, Sultan S, Kertesz M (2015) Bacterial community analysis of cypermethrin enrichment cultures and bioremediation of cypermethrin contaminated soils: Cypermethrin biodegradation. *J Basic Microbiol* 55:819–829. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400805>
104. Kuyukina MS, Ivshina IB (2010) Application of *Rhodococcus* in Bioremediation of Contaminated Environments. In: Alvarez HM (ed) *Biology of Rhodococcus*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 231–262
105. Martínková L, Uhnáková B, Pátek M, Nešvera J, Křen V (2009) Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environment International* 35:162–177. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.018>
106. Kocur M, Kloos WE, Schleifer K-H (2006) The Genus *Micrococcus*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp 961–971
107. Tallur PN, Mulla SI, Megadi VB, Talwar MP, Ninnekar HZ (2015) Biodegradation of cypermethrin by immobilized cells of *Micrococcus* sp. strain CPN 1. *Braz J Microbiol* 46:667–672. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320130557>
108. Doddamani HP, Ninnekar HZ (2001) Biodegradation of Carbaryl by a *Micrococcus* Species. *Current Microbiology* 43:69–73. <https://doi.org/10.1007/s002840010262>
109. Glaeser SP, Kämpfer P (2014) The Family Sphingomonadaceae. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds) *The Prokaryotes*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 641–707
110. Guo P, Wang B, Hang B, Li L, Ali SW, He J, Li S (2009) Pyrethroid-degrading *Sphingobium* sp. JZ-2 and the purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63:1107–1112. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.09.008>

111. Yuanfan H, Jin Z, Qing H, Qian W, Jiandong J, Shunpeng L (2010) Characterization of a fenprothrin-degrading strain and construction of a genetically engineered microorganism for simultaneous degradation of methyl parathion and fenprothrin. *Journal of Environmental Management* 91:2295–2300. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.06.010>
112. Zhao H, Geng Y, Chen L, Tao K, Hou T (2013) Biodegradation of cypermethrin by a novel *Catellibacterium* sp. strain CC-5 isolated from contaminated soil. *Can J Microbiol* 59:311–317. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0580>