

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et la Recherche Scientifique
Université de -BLIDA 1-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie et d'Agroécologie



Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention de Diplôme de Master 2 en Biotechnologie
Option : Biotechnologie Microbienne

Recherche de gènes de biodégradation des xénobiotiques chez les bactéries pour des fins de bioremédiation et détection de polymorphisme

Réalisé par :

MERAHBA Chaïma

Devant le jury composé de :

Présidente :	Mme AMMAD F.	MCA	Université BLIDA -1-
Examinatrice :	Mme BENOUSAID N.	MCB	Université BLIDA -1-
Promoteur :	Mr BENCHABENE M.	Professeur	Université BLIDA -1-
Co-promotrice :	Mme MEKHALDI D.	MAB	Université BLIDA -1-

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

En premier lieu, je voudrais remercier **ALLAH**, le tout puissant qui m'a donné la santé et la patience d'entamer et de terminer ce mémoire.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu avoir le jour, sans l'aide de mon promoteur **Mr BENCHABENE M.**, je le remercie pour la qualité de son encadrement, sa patience et sa rigueur durant la préparation de ce mémoire.

Je remercie également ma Co-promotrice **Mme MEKHALDI D.**, pour sa disponibilité et son encouragement qui remonte le morale, sa patience infinie, et surtout pour ses conseils et ses remarques précieuses.

Mes remerciements sont aussi adressés aux membres de jury,

Mme AMMAD F. pour l'honneur qu'elle m'a fait pour présider de jury.

Mme BENOUSAID N. pour avoir acceptée d'examiner ce modeste travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements pour l'ensembles des enseignants de l'option Biotechnologie Microbienne pour leurs efforts tout au long des années d'études.

A la fin je remercie tous les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail,

Aux âmes de mes grands-parents, **Mani, Mima et Baba-sidou**

Les regards de fiertés qui étaient dans vos yeux... m'ont toujours poussé à être meilleur.

Aux personnes les plus chères à mon cœur, mes deux parents **Mama et Papa, Abi et Omi**. Ma fierté et mon honneur d'avoir vous comme parents, à vous que je dédie ce travail, et grâce à vos sacrifices et vos soutiens et encouragements que j'ai pu terminer ce mémoire.

À mes sœurs **Khaoula, Noussaiba, Malika, Meriem, Romaisa et Ikram**.

À mes frères **Younes, Mohamed et Farès**.

À la plus adorable nièce au monde **Israa**.

À mes amies **khalida, Mira, Sarah, Meriem el Batoul**

Ainsi à **Nour el-Houda et Amine**

À mes collègues **Safia, Nihed, Riadh et Djoumana**.

À ma famille de grands jusqu'aux petits...

Merci à vous

 *Chaïma* 

Résumé

Recherche de gènes de biodégradation des xénobiotiques chez les bactéries pour des fins de bioremédiation et détection de polymorphisme

Les activités anthropiques abusif entraînent l'accumulation de larges gammes de composés chimiques synthétiques (xénobiotiques) dans l'environnement. L'accumulation de ces composés dans le sol et les eaux peuvent perturber les différents écosystèmes. De plus, ces composés sont pour la plupart cancérigènes, posant des risques pour la santé humaine et animale et persistent pendant une longue durée. Leur élimination ne peut se faire que moyennant des frais considérables. Le procédé de bioremédiation au moyen de microorganismes spécifiques est une technique durable et rentable économiquement, permettant l'élimination des polluants xénobiotiques. Certaines bactéries possèdent des gènes servant à générer la capacité de dégrader ces substances xénobiotiques, d'où la possibilité d'éliminer les polluants environnementaux selon un processus biologique.

Dans ce mémoire de fin d'étude, nous avons réalisé un travail documentaire, en consultant les nouveautés des publications scientifiques dans le domaine de la bioremédiation, particulièrement exercées par des agents bactériens. Nous avons sélectionné par la suite l'étude *in silico* des six gènes de catabolisme de l'atrazine (*atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, *atzF*) chez *Pseudomonas* sp. ADP. La partie expérimentale a été réalisé intégralement en ligne, sur la plateforme NCBI et les banques de données protéiques (PDB et UniProt).

Nous avons obtenu comme résultats que les gènes *atz* se situent au niveau du plasmide conjugatif pADP-1, ils génèrent le catabolisme complet de l'atrazine en deux principales voies ; voies haute (*atzABC*) et voie basse (*atzDEF*) afin de l'utiliser comme source d'azote. Ces gènes présentent une plasticité génétique importante, ils sont trouvés disséminés dans l'environnement, et partagent des pourcentages de similarités importantes avec des bactéries phylogénétiquement éloignées. Malgré ces résultats, Les gènes *atz* ne présentent pas un polymorphisme important.

Le transfert Horizontal des gènes (HGT) et la transposition médiée par les éléments transposables présents dans le plasmide pADP-1, constituent les principaux mécanismes de transfert et variation des gènes *atz*.

Mots clé : Xénobiotiques, bioremédiation, *Pseudomonas*, génomique, gènes *atz*.

Abstract

Research for xenobiotic biodegradation genes in bacteria for bioremediation purposes and polymorphism detection

Abusive human activities lead to the accumulation of wide ranges of synthetic chemical compounds (xenobiotics) in the environment. The accumulation of these compounds in soil and water can disrupt the various ecosystems. Moreover, these compounds are mostly carcinogenic, posing risks to human and animal health and persisting for a long time. Their elimination can only be done by paying considerable costs. The bioremediation process using specific microorganisms is a sustainable and inexpensive technique allowing the elimination of xenobiotic pollutants. Some bacteria have genes to produce the ability to degrade these xenobiotic substances, hence the possibility of eliminating environmental pollutants through a biological process.

In this thesis, we carried out a documentary work, consulting the novelties of scientific publications in the field of bioremediation, particularly exerted by bacterial agents. Then, we selected the *in-silico* study of the six Atrazine catabolism genes (*atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, *atzF*) in *Pseudomonas* sp. ADP. The experimental part was carried out entirely online, on the NCBI platform and the protein databases (PDB and UniProt).

We obtained as results that the *atz* genes are located in the conjugative plasmid pADP-1, they generate the complete catabolism of atrazine in two main ways; upper pathways (*atzABC*) and lower pathways (*atzDEF*) in order to use it as a source of nitrogen. These genes exhibit significant genetic plasticity, are found scattered in the environment, and share significant percentage similarities with phylogenetically distant bacteria. Despite these results, *atz* genes do not exhibit significant polymorphism.

Horizontal gene transfer (HGT) and transposition mediated by the transposable elements present in the pADP-1 plasmid constitute the main mechanisms of *atz* gene transfer and variation.

Keywords: Xenobiotics, bioremediation, *Pseudomonas*, genomics, *atz* genes.

ملخص

البحث عن جينات التحليل الحيوي للمواد الدخيلة لدى البكتيريا لأغراض المعالجة الحيوية واكتشاف تعدد الأشكال

تؤدي الأنشطة البشرية المفرطة إلى تراكم كميات كبيرة من المركبات الكيميائية الاصطناعية الغريبة عن البيئة (مواد دخيلة) ، يمكن أن يؤدي تراكم هذه المركبات في التربة والمياه إلى تعطيل النظم البيئية المختلفة. علاوة على ذلك، فإن هذه المركبات في الغالب تكون مسرطنة، وتشكل مخاطر على صحة الإنسان والحيوان وتستمر في الطبيعة لفترة طويلة. لا يمكن التخلص منها إلا بتكاليف كبيرة. إن عملية المعالجة الحيوية باستخدام كائنات دقيقة محددة هي تقنية مستدامة وغير مكلفة تسمح بالتخلص من الملوثات. بعض البكتيريا لديها جينات لتوليد القدرة على تحليل هذه المواد الغريبة، ومن ثم إمكانية القضاء على الملوثات البيئية من خلال عملية بيولوجية.

في مذكرة نهاية الدراسة هذه، قمنا بعمل بحث وثائقي، مستعينين بأحدث المنشورات العلمية في مجال المعالجة الحيوية، وخاصة التي تمارسها العوامل البكتيرية. ثم اخترنا دراسة *in silico* للجينات الستة المسؤولة عن التحليل الكامل لمركب الأترازين (*atzA, atzB, atzC, atzD, atzE, atzF*) لدى *Pseudomonas sp. ADP* , تم تنفيذ الجزء التجريبي بالكامل عبر الإنترنت ، على منصة NCBI وقواعد بيانات البروتين (PDB , UniProt).

حصلنا على نتائج تشير إلى أن جينات *atz* موجودة في البلازميد pADP-1 ، مسؤولة عن التحليل الكامل لمركب الأترازين عبر مرحلتين أساسيتين؛ المرحلة العلوية (*atzABC*) والمرحلة السفلية (*atzDEF*)، من أجل استخدامها كمصدر للنيتروجين. تظهر هذه الجينات ليونة جينية كبيرة، وتوجد منتشرة في البيئة، وتشارك بنسبة كبيرة في التشابه مع البكتيريا البعيدة وراثيا. على الرغم من هذه النتائج، لا تظهر جينات *atz* تعدد أشكال مهم.

يشكل نقل الجينات الأفقي (HGT) والتبديل بوساطة العناصر القابلة للتحويل الموجودة في البلازميد pADP-1 الآليات الرئيسية لنقل الجينات *atz* وتباينها.

الكلمات المفتاحية: مواد دخيلة، المعالجة الحيوية، علم الجينوم، *Pseudomonas*، جينات *atz*.

Liste des abréviations

POP : Polluants Organiques Persistants

BPA : Bisphénol A

PPCP : Produit Pharmaceutiques et de Soins Personnel

HGT : Transfert Horizontal de Gènes

Kb : Kilo base

Pb : paire de base

ICE : Élément Intégratif et Conjugatif

MGE : Élément Génétiquement Mobile

UV : Ultra-Violet

IS : Séquence d'Insertion

Tn : Transposon

ARN : Acide Ribo-Nucléique

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ORF : Rotatif Open Fram

Ori : Origine de Réplication

NCBI : Centre National de l'Information Biotechnologique

PDB : Banque des Données Protéiques

UniProt : Ressource universelle des Protéines

US: *United States*

3D: Tridimensionnel

NJ: *Neighbor Joining*

Liste des figures

- Figure 1 : Voie de transport des composés xénobiotiques dans l'environnement	9
- Figure 2 : Structure et nature chimique de certains composés xénobiotiques.....	10
- Figure 3 : Diagramme schématique des deux types de bioremédiation.....	13
- Figure 4 : principe de la Bioventilation.....	14
- Figure 5 : principe du Biobarbotage.....	15
- Figure 6 : Les différentes étapes de la phytoremédiation.....	15
- Figure 7 : Approches intégrées des technologies avancées dans la biodégradation des composés xénobiotiques.....	18
- Figure 8 : Mécanisme de conjugaison.....	23
- Figure 9 : Mécanisme de transduction.....	24
- Figure 10 : Structure d'une cassette de gènes.....	30
- Figure 11 : Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences du gène de l'ADNr 16S.....	33
- Figure 12 : Carte physique circulaire du plasmide catabolique pADP-1 de <i>Pseudomonas</i> sp. ADP.....	36
- Figure 13 : Voies de catabolisme de l'atrazine.....	37
- Figure 14 : Régulation de la voie basse (<i>atzDEF</i>) par <i>atzR</i>	37
- Figure 15 : Recherche de la séquence protéique du gène <i>atzA</i>	42
- Figure 16 : Recherche de la structure de la protéine <i>atzA</i> sur PDB.....	43
- Figure 17 : Recherche de la structure de la protéine <i>atzB</i> sur UniProt.....	43
- Figure 18 : types de BLAST.....	44
- Figure 19 : Recherche de la similarité des séquences protéiques sur BLAST.....	45
- Figure 20 : Format FASTA des gènes <i>atz</i> de la voie haute chez <i>Pseudomonas</i> sp. ADP.....	48

- **Figure 21** : Format FASTA des gènes *atz* de la voie basse chez *Pseudomonas* sp. ADP..49
- **Figure 22** : parties codantes pour les protéines des gènes *atz*
 - (A) atrazine chlorohydrolase du gène *atzA*.....50
 - (B) hydroxyatrazine hydrolase du gène *atzB*.....50
 - (C) N-isopropyle-ammelide isopropylamino hydrolase du gène *atzC*51
 - (D) amidohydrolase d'acide cyanurique du gène *atzD*.....51
 - (E) biuret hydrolase du gène *atzE*.....51
 - (F) allophanate hydrolase du gène *atzF*.....52
- **Figure 23** : Structure 3D des protéines codés par les gènes *atz* prise à partir de PDB et UniProt.....53
- **Figure 24** : Arbres Phylogénétiques des Protéines codées par les gènes *atz*
 - (A) atrazine chlorohydrolase (*atzA*).....56
 - (B) hydroxyatrazine hydrolase (*atzB*).....56
 - (C) N-isopropyle-ammelide isopropylamino hydrolase (*atzC*).....57
 - (D) amidohydrolase d'acide cyanurique (*atzD*).....58
 - (E) biuret hydrolase (*atzE*).....58
 - (F) allophanate hydrolase (*atzF*).....59
- **Figure 25** : Carte physique circulaire du plasmide catabolique pADP-1 de la population originale (ADP-O) et la nouvellement évoluée (ADP-E)61

Liste des tableaux

- **Tableau 1** : Classification des substances xénobiotiques.....6
- **Tableau 2** : sources des xénobiotiques.....6
- **Tableau 3** : Les différents types de mutations chez les bactéries.....26
- **Tableau 4** : Les mutations ponctuelles au niveau moléculaire.....26
- **Tableau 5** : Classification des *Pseudomonaceae* selon Palleroni et Doudoroff.....32
- **Tableau 6** : Taxonomie de *Pseudomonas* sp. ADP.....34
- **Tableau 7** : Espèces de *Pseudomonas* sp. appartenant aux groupes fluorescent et non fluorescent.....35

Table des matières

Partie 1 : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : xénobiotiques et Bioremédiation

Introduction.....	1
1. Xénobiotiques.....	5
1.1.Généralités.....	5
1.2.Sources et classification.....	5
1.3.Effets des xénobiotiques sur l'environnement et la santé.....	7
1.3.1. Toxicité.....	7
1.3.2. Cancérogénicité.....	7
1.3.3. Bioaccumulation.....	8
1.4.Elimination des xénobiotiques.....	9
1.4.1. Technique conventionnelles et leurs limites.....	10
1.4.1.1.Les procédés physiques.....	10
1.4.1.2.Les procédés physico-chimiques.....	10
1.4.1.3.Les procédés biologiques.....	11
2. La bioremédiation	11
2.1.Généralités.....	11
2.2.Les Microorganismes de bioremediation.....	11
2.3.Types de bioremédiation.....	12
2.3.1. Bioremédiation <i>in situ</i>	13
2.3.1.1.La bio-ventilation (<i>bioventing</i>).....	13
2.3.1.2.Le bio-barbotage (<i>biosparging</i>).....	14
2.3.1.3.La phytoremédiation.....	15
2.3.2. Bioremédiation <i>ex situ</i>	16
2.3.2.1.Le landfarming.....	16
2.3.2.2.Le compostage.....	16
2.3.2.3.Biopile (ou biotertre).....	16
2.3.2.4.Bioréacteur à lisier (à boue).....	16
2.4.Méthodes d'apport des microorganismes.....	16
2.4.1. La biostimulation.....	16
2.4.2. La bioaugmentation.....	17
2.4.3. L'immobilisation.....	17

2.5.La bioremédiation par voie Biotechnologique.....	17
--	----

Chapitre II : Génomique Bactérienne

3. Génomique des bactéries impliquées dans la bioremédiation.....	20
3.1.Généralités sur le génome bactérien.....	20
3.1.1. Chromosome.....	20
3.1.2. Plasmide et mégaplasmide.....	21
3.1.3. Chromide.....	21
3.2.Sources de variation génétiques chez les bactéries.....	21
3.2.1. Transfert horizontal des gènes.....	21
3.2.1.1.Historique.....	21
3.2.1.2.Mécanismes de HGT.....	22
a) La conjugaison.....	22
b) La transduction.....	23
c) La transformation.....	25
3.2.2. La mutation.....	25
3.2.2.1.Les différents types de mutation.....	25
3.2.2.2.Origines des mutations.....	27
a) Mutations spontanées.....	27
b) Mutations induites.....	27
3.2.3. Les éléments transposables et les séquences d'insertion.....	28
3.2.3.1.Eléments génétiques transposables.....	28
a) Propriétés des éléments génétiques transposables.....	28
b) Types d'éléments génétiques transposables.....	28
- Les séquences d'insertion (IS).....	28
- Les transposons (Tn).....	29
3.2.3.2.Les intégrons et les cassettes.....	29
a) Les intégrons.....	29
- Types d'intégrons.....	30
b) Les cassettes de gènes.....	30
3.3.La plasticité génétique des bactéries dans la biodégradation des xénobiotiques.....	30
3.4. <i>Pseudomonas</i> sp. ADP.....	31
3.4.1. Historique du genre <i>Pseudomonas</i>	31
3.4.2. Taxonomie.....	34
3.4.3. Principales caractéristiques bactériologiques et écologiques.....	34

3.5.Plasmide pADP-1 de <i>Pseudomonas</i> sp. ADP.....	35
3.6.Voies cataboliques de l’atrazine.....	36

Partie 2 : Partie Expérimentale

Chapitre I : Analyse *in silico*

1. Matériels et méthodes.....	40
1.1.Centre National de l’information Biotechnologique (NCBI).....	40
1.2.Banque des données protéiques (PDB).....	40
1.3.Universal Protein Resource (UniProt).....	40
1.4.Séquences protéiques.....	41
1.5.Prédiction des structures 3D des protéines.....	42
1.6.Recherche de similarité.....	43
1.7.Etude phylogénétiques	45
2. Résultats et discussions.....	48
2.1.Format FASTA et Représentation Graphique.....	48
2.2.Prédiction de Structure.....	52
2.3.Résultats BLAST.....	54
2.4.Arbres Phylogénétiques.....	55
Conclusion.....	63
Références Bibliographiques.....	65
Annexes	

Introduction

L'environnement est tout ce qui nous entoure naturellement et affecte notre vie quotidienne sur Terre. Un environnement sain est essentiel à l'existence de la vie sur cette planète. Cependant, à l'ère de l'industrialisation et de l'urbanisation avancées, diverses activités anthropiques sont largement responsables de l'introduction de polluants toxiques et dangereux tels que les xénobiotiques environnementaux (Rodriguez *et al.*, 2020).

Les xénobiotiques environnementaux représentent les différents composants structuraux qui sont rares ou inconnus dans la nature. Ces composés sont synthétisés artificiellement avec intervention humaine (Maurya et Malik, 2016), et sont des produits chimiques exogènes que l'organisme ne reconnaissent pas tels que les pesticides, les médicaments, les cosmétiques et certains additifs alimentaires. Le xénobiotique altère indirectement ou directement la durabilité vis-à-vis du biote naturel et influence la stabilité des écosystèmes (Datta *et al.*, 2020).

Il existe de différentes techniques de traitement (physiques, chimiques, biologiques) pour l'élimination des composés xénobiotiques de l'environnement. Leurs avantages et inconvénients se différencient d'une technique à une autre. En revanche, la « bioremédiation », est une stratégie de nettoyage puissante pour la dégradation des xénobiotiques provenant d'environnements contaminés sans produire de substances nocives (Perelo, 2010). La bioremédiation implique les capacités métaboliques des microorganismes dans l'élimination des polluants et donc, est la plus appropriée et la plus prometteuse des technologies de nos jours (Mishra *et al.*, 2021).

Les populations microbiennes présentent des possibilités d'assainissement des environnements contaminés en raison de leur diversité génétique et leur fonctionnalité (Dangi *et al.*, 2018). Par conséquent, l'étude de ces populations avec leurs différentes interactions nécessitent des approches techniques avancées. Le développement d'outils moléculaires avancés (bio-informatique et approches omiques) fournit une meilleure compréhension des structures métaboliques et génétiques microbiennes et les fonctions pour améliorer la bioremédiation (Puckett *et al.*, 2020).

Dans ce travail, nous avons réalisé une recherche des gènes de biodégradation des xénobiotiques chez les bactéries, et plus précisément les gènes *atz* de catabolisme d'atrazine chez *Pseudomonas* sp. ADP. Notre étude a été réalisée *in silico* en utilisant les différentes banques et bases de données (NCBI, PDB, UniProt). L'objectif de cette recherche est de connaître l'origine des gènes *atz* d'après les pourcentages de similarité et les dendrogrammes

Introduction

réalisés obtenus par Blastp dans la plateforme NCBI, en plus de l'étude de la stabilité de ces gènes, leur localisation et dissémination vers d'autre organismes.

Partie I : Synthèse Bibliographique

Chapitre I : Xénobiotiques et Bioremédiation

1. Les xénobiotiques

1.1. Généralités

À l'origine, le terme xénobiotique est dérivé du grec « *xenos* » qui signifie étranger ou exotique, et « *bios* » qui signifie la vie (Embrandiri *et al.*, 2016). Toute substance chimique étrangère de la nature, qui est inhabituellement présente dans un organisme ou qui se trouve de manière inattendue dans l'environnement à une concentration supérieure aux limites autorisées peut être qualifiée de xénobiotique ou de polluant (Blessy *et al.*, 2017). Ce sont largement utilisés dans les colorants, les médicaments, les pesticides, les explosifs et autres produits chimiques industriels (Arora et Pankaj Kumar, 2020).

Environ un million de produits sont fabriqués chaque année dans le monde, dont 100 000 sont des composés chimiques. Parmi ceux-ci, 15 000 sont des substances xénobiotiques potentielles (Kucherenko *et al.*, 2021). Leur accumulation dans l'environnement et dans les organismes en fait une grande menace pour le fonctionnement d'écosystèmes entiers (Dobrzanski *et al.*, 2017 ; Kumar *et al.*, 2017). Le principal problème réside dans leurs structures physicochimiques, telles que leur petite taille moléculaire, leur ionisabilité, leur solubilité dans l'eau, leur lipophilie, leur polarité et leur volatilité, qui les rendent difficiles à identifier, quantifier et éliminer (Oliveira *et al.*, 2020). Selon Dubey *et al.* (2014), ces composés n'ont pas seulement une faible dégradabilité, mais certains peuvent subir une décomposition partielle, ce qui peut entraîner la production de substances ayant un potentiel toxique plus élevé que le composé d'origine.

1.2. Sources et classification

Selon Oliveira *et al.* (2020), Les progrès technologiques du 20^{ème} siècle ont conduit à la mise au point de nombreux composés utilisés pour améliorer la vie. Les polluants environnementaux, les hydrocarbures, les additifs alimentaires, les mélanges d'huiles, les pesticides, les polymères synthétiques, les substances cancérigènes, les médicaments et les antioxydants sont les principaux groupes de xénobiotiques (Qadir *et al.*, 2017). Ils sont présents dans presque tous les milieux, y compris l'air, le sol, l'eau, les plantes, les animaux et les humains (Kumar et Chopra, 2020).

D'après Bénis *et al.* (2017), les polluants peuvent être rejetés directement dans l'environnement ou via des sources indirectes, telles que les rejets des hôpitaux. De plus, les xénobiotiques peuvent être libérés au cours d'un processus ou en tant que produit final. Ils

peuvent affecter l'environnement délibérément ou accidentellement, à partir de sources mobiles (véhicules) ou fixes (industries).

La classification des substances et des sources xénobiotiques est illustrée dans les Tableaux 1 et 2.

Tableau 1. Classification des substances xénobiotiques (Bénis *et al.*, 2017).

Caractéristiques	Classification	Exemple
Nature	Naturel	Bactériotoxines, zootoxines, phytotoxines, sérotonine
	Synthétique	Substances synthétiques, pesticides
Usages	Actif	Pesticides, colorants, peintures
	Passif	Additifs, molécules porteuses
État physique	Gazeux	Benzène, forme aérosol
	Sous forme de poussière	Poudre d'amiante
	Liquide	Produits chimiques dissous dans l'eau
Effets physiopathologiques	Tissus/organes	Toxines rénales
	Mécanisme biochimique	Toxines productrices de méthémoglobine

Tableau 2. Sources des xénobiotiques (Bénis *et al.*, 2017).

Sources directes	Industries pharmaceutiques (phénols), effluents pétroliers (hydrocarbures), plastiques, peintures, colorants, pesticides, insecticides, effluents papetiers et pâtes.
Sources indirectes	Rejets hospitaliers, résidus de pesticides ou d'herbicides.
Produits et procédés	Produit de réaction de tout procédé– échelle domestique ou industrielle.
Causes volontaires et accidentelles	Produits chimiques utilisés dans les industries du papier et de la pâte à papier ; rejetés dans l'environnement suite à des accidents
Mobiles et fixes	Voitures et industries.
Réglémentés et non réglémentés	Grandes industries et automobiles, activité des ménages.

1.3.Effets des xénobiotiques sur l'environnement et la santé

Une fois que les xénobiotiques sont libérés dans l'environnement, ils peuvent se bioaccumuler dans la chaîne alimentaire en raison de leur forte affinité pour les substances organiques et produire des effets nocifs toxiques sur les écosystèmes naturels, les humains et les animaux (Maurya, 2016). Par conséquent, ils peuvent provoquer des effets chroniques graves tels que des infections des voies respiratoires, des dommages au système immunitaire, une bronchite pulmonaire, un dysfonctionnement du système nerveux, une perturbation du système endocrinien, des troubles du comportement et du développement, des effets cancérigènes et mutagènes (Mishra *et al.*, 2019 ; Bertotto *et al.*, 2020). Ainsi, la contamination xénobiotique représente une menace anthropique persistante et soulève de sérieuses préoccupations environnementales.

1.3.1. Toxicité

Les xénobiotiques ont une toxicité élevée sur les êtres vivants y compris des petits eucaryotes jusqu'à l'homme (Datta *et al.*, 2020). Les colorants alimentaires par exemples se lient à l'albumine sérique humaine, ce qui soulève des problèmes de toxicité, cela a été observé dans des additifs tels que le jaune soleil, l'azorubine, la tartrazine et le bleu patenté (Pan *et al.*, 2011 ; Tellier *et al.*, 2012 ; Datta *et al.*, 2013 ; Kus et Eroglu, 2015). Les agents de conservation des aliments sont également connus pour être associés à l'apparition d'allergies et d'asthme (Vojdani et Vojdani, 2015).

Les polluants organiques persistants (POP) se distinguent par leur forte persistance et leurs caractéristiques de bioaccumulation (Qing Li *et al.*, 2006). Ils sont composés généralement des divers produits chimiques, notamment des pesticides (comme le DDT) (Loganathan et Masunaga, 2015). Les POPs sont également des perturbateurs endocriniens potentiels (EDC) et ils sont associés à l'altération des fonctions neurocomportementales et immunitaires, à la réduction du nombre de spermatozoïdes chez l'homme et au diabète (Damstra *et al.*, 2002).

1.3.2. Cancérogénicité

Plusieurs xénobiotiques comme les pesticides, les hydrocarbures et les polymères sont des agents cancérigènes potentiels (Datta *et al.*, 2020). De nombreux POPs sont reconnus comme des agents cancérigènes suspectés chez l'homme (Damstra *et al.*, 2002). Ils ont également pour effet d'allonger le cycle menstruel et augmentent le risque de cancer du sein (Buck *et al.*, 2002 ; Cooper *et al.*, 2005).

Le Bisphénol A (BPA) est un perturbateur endocrinien présent dans les plastiques alimentaires (bombonnes d'eau, boîtes de conserves, canettes, biberons, etc.) ou non alimentaires (DVD, verres de lunettes, prises et interrupteurs électriques, papiers thermiques, résines, etc.) (CLB, 2019). L'exposition des adultes et des enfants au BPA est estimée d'être largement inférieure à la dose journalière acceptable fixée (DJA) de 0,05 mg/kg/j (EFSA, 2008). On estime en effet à 0,000030 mg/kg/j de BPA l'ingestion moyenne des adultes due aux boissons en bouteille de polycarbonate, aliments en conserves et chauffés au four à micro-ondes dans leur emballage. Celle des nourrissons par la consommation de lait maternel ou maternisé se situe entre 0,000020 et 0,00033 mg/kg/jour ; quant à la migration à partir des biberons, la dose ingérée se trouve entre 0.000017 et 0.00012 mg/kg/jour (AFSSA, 2010). Keri *et al.* (2007), Indique qu'il est vraisemblable que les substances comme le bisphénol A, possèdent un potentiel xénoœstrogène, ils puissent induire une augmentation du risque de certains cancers immuno-dépendants (seins, prostate) en cas d'exposition durant la période néonatale.

1.3.3. Bioaccumulation

Selon Datta *et al.* (2020), de nombreux pesticides comme le glyphosate, l'acéphate, étant solubles dans l'eau, ont tendance à s'accumuler dans le sol et les systèmes d'eau d'où ils peuvent entrer dans la chaîne alimentaire (Figure 1). Le département américain d'agriculture a confirmé la présence de glyphosate et d'acide aminométhylphosphonique dans 90,3 % et 95,7 % des échantillons de soja à des concentrations de 1,9 % et 2,5 % (Osteen et Fernandez-Cornejo, 2013). On estime qu'environ 95% des pesticides appliqués ont un impact sur les organismes non-cibles et ont le potentiel de se disperser dans l'environnement (Simeonov *et al.*, 2014).

Arpin-Pont (2015) a étudié les produits pharmaceutiques et de soin personnel (PPCP), qui représentent les médicaments à usage humain et vétérinaire ainsi que les substances chimiques contenues dans les soins cosmétiques et d'hygiène. Ils sont classés comme des micropolluants organiques d'origine naturelle et/ou synthétique, ils sont caractérisés par une structure carbonée, ainsi que par leur présence à des concentrations faibles dans le milieu. Après utilisation par l'homme, ces molécules sont métabolisées à différents degrés et excrétées sous forme inchangée ou sous forme de métabolites, parfois actifs. Une fois rejetés dans les réseaux d'eaux usées, les PPCP arrivent dans les stations d'épuration puis dans les milieux aquatiques récepteurs, où ils sont transformés par des réactions de biodégradation, des réactions chimiques ou physiques telles que la photodégradation. Ces molécules, bien que présentes en faibles concentrations dans l'environnement aquatique, sont susceptibles d'exercer un effet néfaste sur les organismes présents dans le milieu (Arpin-Pont, 2015).

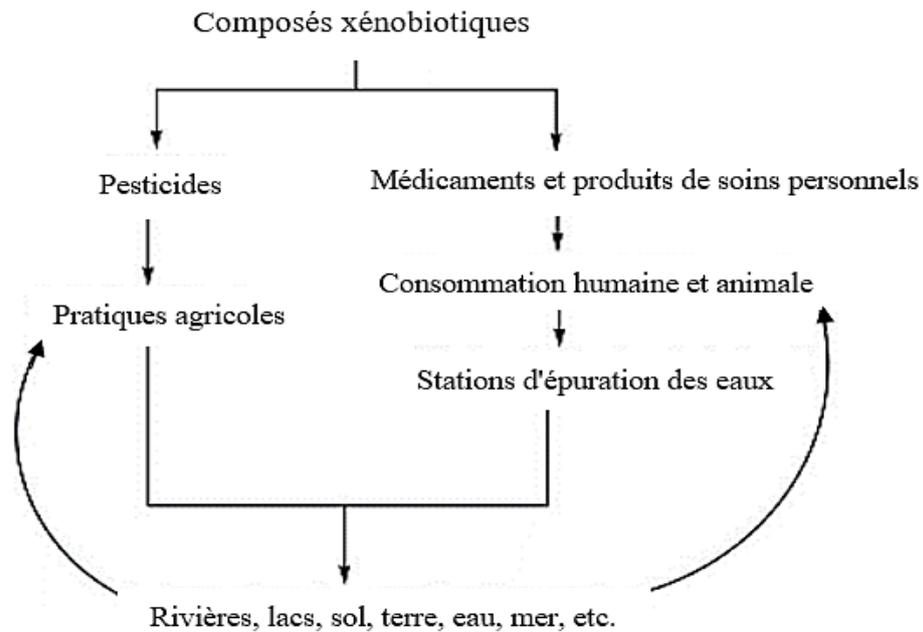


Figure 1. Voie de transport des composés xénobiotiques dans l'environnement (Mohan et Singh, 2002).

1.4.Élimination des xénobiotiques

Les xénobiotiques sont difficiles à dégrader en raison de leurs structures complexes (Figure 2) (Noman *et al.*, 2019). Leur dégradation partielle peut entraîner des menaces encore plus graves. Pour minimiser leur concentration dans l'environnement, il est crucial de savoir leurs origines (Tableau 1) (Mathew *et al.*, 2017).

Diverses méthodes de traitement physiques et chimiques ont été utilisées pour décomposer et détoxifier ces composés xénobiotiques. En fonction de leur principe d'élimination des composés, ces techniques peuvent être classées en trois principales familles : les procédés physiques, les procédés physico-chimiques et les procédés biologiques (Dalhatou, 2014).

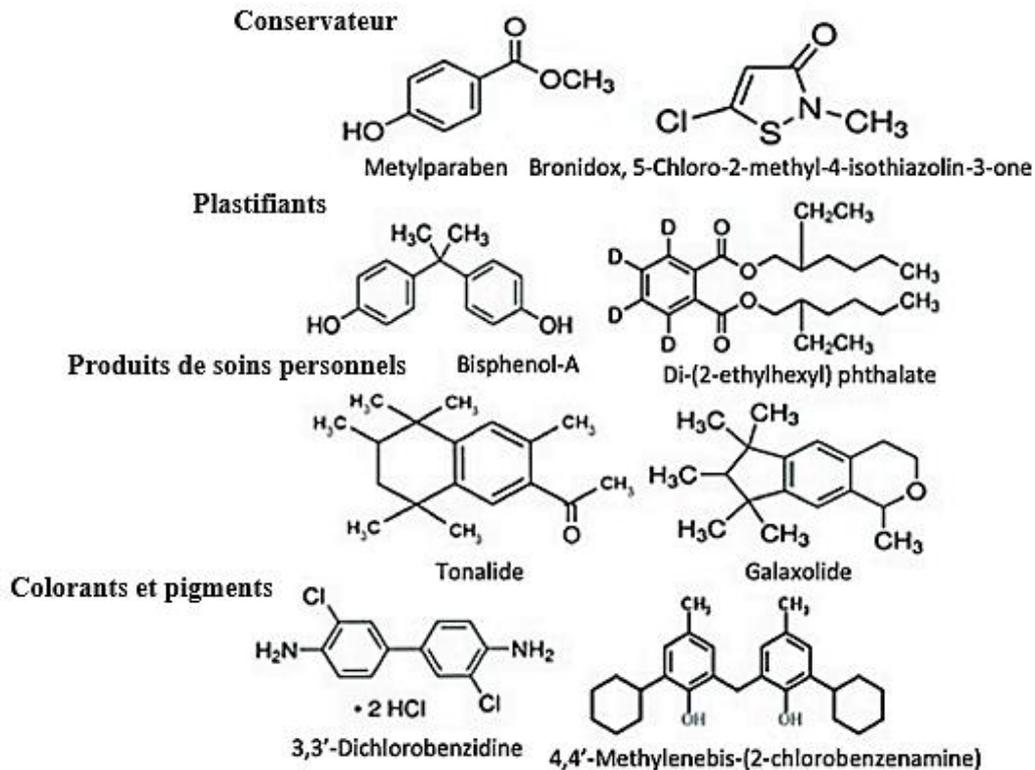


Figure 2. Structure et nature chimique de certains composés xénobiotiques (Noman *et al.*, 2019).

1.4.1. Techniques conventionnelles et leurs limites

1.4.1.1. Les procédés physiques

Dans le domaine de traitement des eaux ou d'élimination des polluants, plusieurs procédés physiques sont largement employés. Ces procédés sont basés sur la séparation d'un ou plusieurs composés de l'effluent et sont le plus souvent utilisés en tant que pré ou post-traitement. Il est à noter que dans cette séparation, le polluant passe d'une phase à une autre phase. Ces procédés incluent : l'adsorption, la filtration sur membrane et le stripping (Namasivayam et Kavitha, 2004 ; Chang et Kim, 2005 ; Huang et Shang, 2006).

1.4.1.2. Les procédés physico-chimiques

Il existe plusieurs procédés chimiques qui sont appliqués dans le traitement des eaux usées et d'élimination des polluants. Ces procédés peuvent à priori être classés en deux catégories :

- Les procédés basés sur des réactions physicochimiques telles que la coagulation, la précipitation et la complexation (Dhankhar et Hooda, 2011).
- Les procédés basés sur des réactions chimiques notamment la chloration, l'ozonation et l'incinération (Knox, 2000).

La plupart de ces procédés de traitement ne permettent pas une élimination totale des polluants, soit ils les concentrent, soit ils les transferts vers un autre état physique ce qui ne résous pas le problème (Dalhatou, 2014). De plus, les interventions si lourdes et onéreuses conduisent en général à un sol stérile. C'est notamment le cas de traitement chimique par lavage qui élimine aussi les microorganismes telluriques (Abdelly, 2006).

1.4.1.3. Les procédés biologiques

Toutes les méthodes précédentes ne sont pas très utiles en raison de leur coût élevé et leur faible efficacité. En revanche, la méthode de réparation biologique « bioremédiation » est une stratégie de nettoyage largement acceptée pour éliminer les contaminants des environnements pollués sans produire de produits nocifs (Perelo, 2010). La bioremédiation est aujourd'hui la technique la plus appropriée et la plus prometteuse pour tirer parti de la capacité métabolique des micro-organismes à éliminer les contaminants (Azubuike *et al.*, 2016).

2. La bioremédiation

2.1. Généralités

En 1930, Tausz et Donath ont présenté l'idée d'utiliser des micro-organismes pour nettoyer les sols contaminés par des dérivés pétroliers, donnant naissance aux processus de biodégradation (Dzionic *et al.*, 2016). Aujourd'hui, la bioremédiation est une technologie verte remarquable couramment utilisée, qui facilite l'élimination et la dégradation des contaminants toxiques en substances chimiques non toxiques ou moins dangereux dans des conditions contrôlées. Il s'agit principalement d'une opération naturelle lente, menée par les microbes et/ou des plantes (phytoremédiation) (Tak *et al.*, 2022). Les méthodes conventionnelles de remédiation peuvent présenter des risques de manipulation de contaminants et de polluants. La méthode de bioremédiation est plus efficace, moins nocive et rentable pour éliminer les matériaux contaminés de l'environnement (Azubuike *et al.*, 2016 ; Bhatt *et al.*, 2020).

2.2. Les microorganismes de bioremédiation

L'application de micro-organismes pour éliminer les xénobiotiques du sol, de l'eau ou des sédiments par transformation complète ou minéralisation en produits finaux inoffensifs comme le CO₂ et le H₂O est un concept de base de la stratégie de bioremédiation (Singh *et al.*, 2016).

Selon Mishra *et al.* (2021), la dégradation des composés xénobiotiques assistés par les microbes est considérée comme l'approche la plus efficace et la plus bénéfique. Les micro-

organismes ont un potentiel catabolique remarquable, avec des gènes, des enzymes et des voies de dégradation impliquée dans le processus de biodégradation. Différents microorganismes dont des bactéries (*Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Cellulosimicrobium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Methanospirillum*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Sphingobium*, *Flavobacterium* et *Rhodococcus*), des champignons (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Fusarium*) et des levures (*Pichia*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Aureobasidium*, et *Exophiala*) ont été signalés comme étant impliqués dans la biodégradation efficace des composés xénobiotiques des environnements sol/eau contaminés, en raison de leur potentiel de bioremédiation exceptionnel (Mishra *et al.*, 2021).

Les micro-organismes sont omniprésents dans la nature et diverses communautés microbiennes se développent dans des environnements naturels (le sol, l'eau, l'intestin humain, etc.) où ils sont constamment soumis à des contraintes extrêmes (Delegan *et al.*, 2019 ; Arora, 2020 ; Shekhar *et al.*, 2020). Ils utilisent potentiellement des contaminants xénobiotiques comme sources de carbone ou d'azote pour maintenir leur croissance et leurs activités métaboliques. Diverses populations microbiennes survivent dans des environnements contaminés difficiles, présentant un potentiel de biodégradation important pour dégrader et transformer les polluants (Mishra *et al.*, 2021). L'étude de cette population fournit une connaissance significative des caractéristiques microbiennes spécifiques qui améliorent les taux de dégradation. Cependant, la mise en œuvre efficace de stratégies de remédiation microbienne nécessite des approches techniques avancées, qui fournissent une compréhension approfondie des aspects dynamiques de l'activité et de la survie microbiennes dans des conditions de stress (Mao *et al.*, 2019).

2.3. Types de bioremédiation

Selon la technique utilisée, deux types de bioremédiation peuvent être constatés (Gaspar, 2012) (Figure 3) :

- La bioremédiation *in situ* qui traite la substance polluée sur le site.
- La bioremédiation *ex situ* qui consiste à retirer la matière polluée pour la traiter ailleurs, grâce au pompage pour l'eau ou excavation pour le sol.

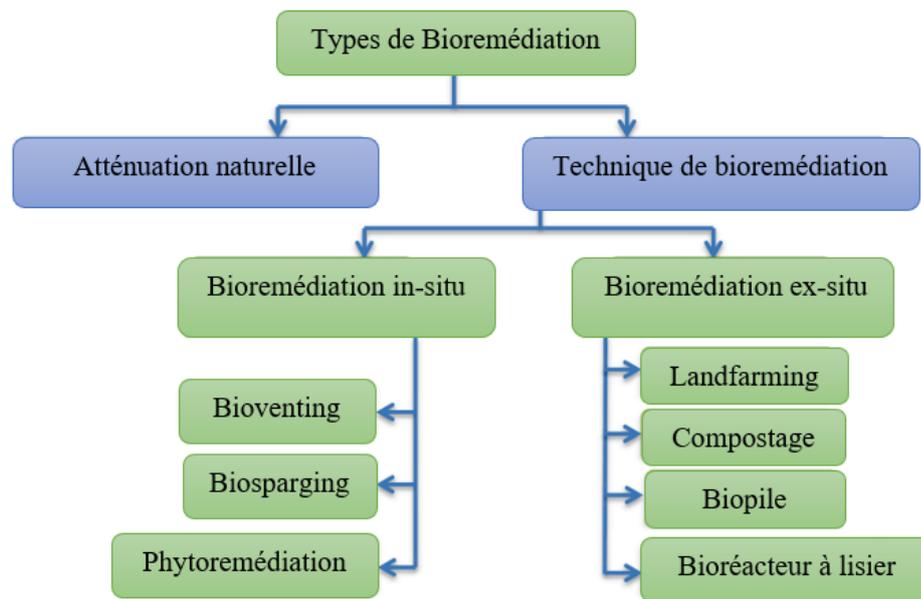


Figure 3. Diagramme schématisant des deux types de bioremédiation (Noor *et al.*, 2022).

2.3.1. Bioremédiation *in situ*

La bioremédiation *in situ* implique différents systèmes, tels que la bio-ventilation (*bioventing*), le bio-barbotage (*biosparging*) et la phytoremédiation (Noor *et al.*, 2022).

2.3.1.1. La bio-ventilation (*bioventing*)

La bio-ventilation est une technologie d'assainissement *in situ* qui utilise des micro-organismes pour biodégrader les constituants organiques d'un système d'eau. Elle améliore l'activité des bactéries et archées indigènes et stimule la biodégradation naturelle *in situ* des dérivés d'hydrocarbures en induisant un flux d'air ou d'oxygène dans la zone non saturée et, si nécessaire, en ajoutant des nutriments (Figure 4). Pendant la bioventilation, l'oxygène peut être fourni par injection directe d'air dans la contamination résiduelle du sol. Elle aide principalement à la dégradation des résidus de carburant adsorbés et à la dégradation des composés organiques volatils (COV) lorsque les vapeurs se déplacent lentement à travers un sol biologiquement actif (James et Speight, 2020).

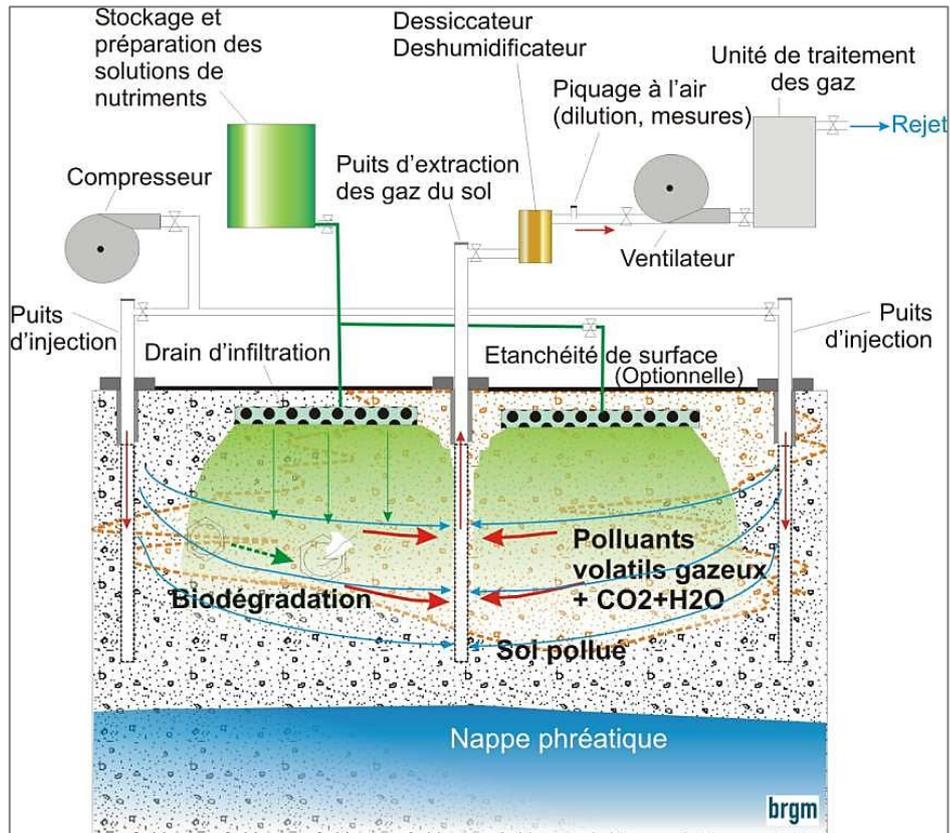


Figure 4. Principe de la bioventilation (Colombano *et al.*, 2010).

2.3.1.2. Le bio-barbotage (*biosparging*)

Le bio-barbotage est une technique dans laquelle de l'air est injecté sous la nappe phréatique et par cette injection, l'eau est enrichie en oxygène et la dégradation biologique est stimulée (Figure 5). Ce processus est similaire à la bioventilation, tandis que cette dernière élimine les polluants principalement par volatilisation, le bio-barbotage favorise la biodégradation des constituants plutôt que la volatilisation. En pratique, lorsque les constituants volatils sont présents, le bio-barbotage est souvent associé à la bioventilation et peut également être utilisé avec d'autres technologies de réparation (James et Speight, 2020).

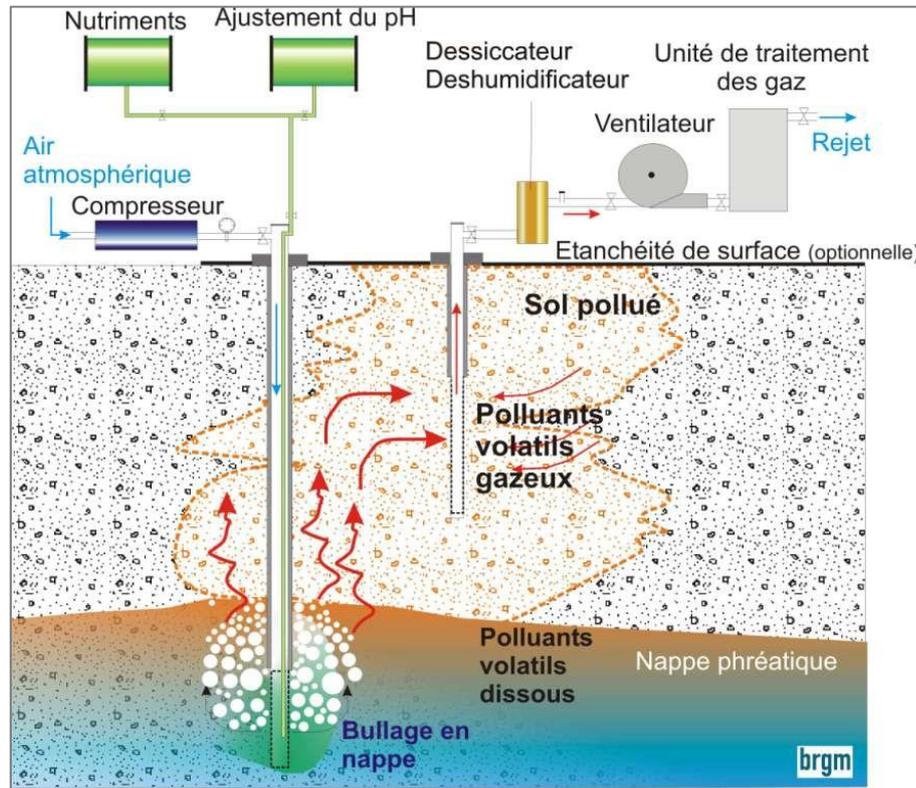


Figure 5. Principe du biobarbotage (Colombano *et al.*, 2010).

2.3.1.3. La phytoremédiation

C'est le processus où on utilise différents types de plantes et leurs micro-organismes associés pour stabiliser, éliminer ou détruire les contaminants dans une zone polluée (Noor *et al.*, 2022) (Figure 6).

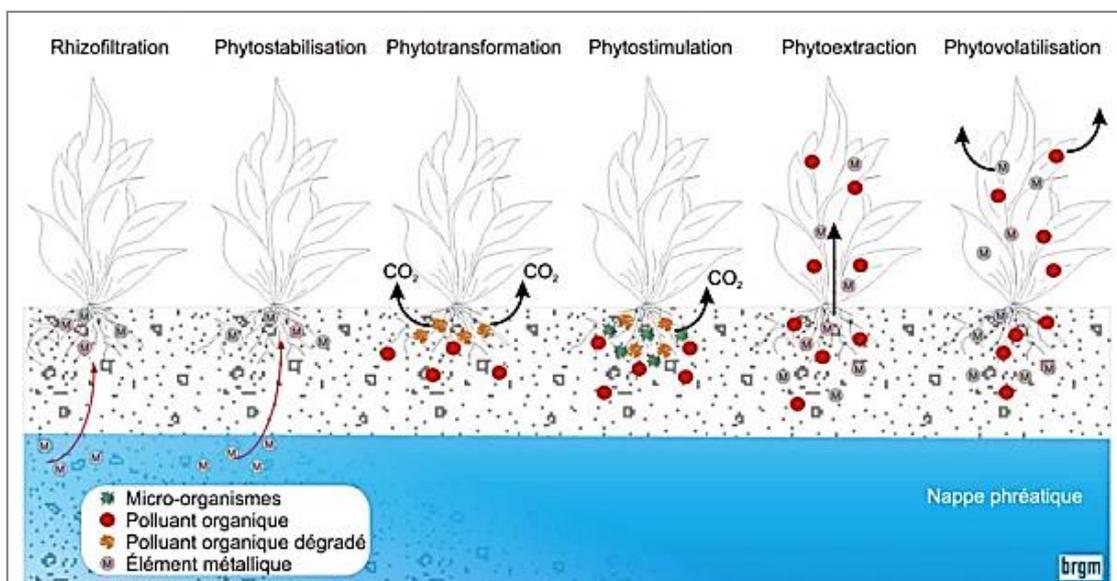


Figure 6. Les différentes étapes de la phytoremédiation (Colombano *et al.*, 2010).

2.3.2. Bioremédiation *ex situ*

C'est une technique qui traite les contaminants loin de l'endroit où ils ont été trouvés. Les contaminants sont extraits ou pompés du site d'origine et traités dans des environnements contrôlés. Elle fait appel à différents systèmes tels que le landfarming, le compostage, les biopiles et le bioréacteur à boue (Noor *et al.*, 2022).

2.3.2.1. Le landfarming

C'est un processus de traitement des déchets *ex situ* qui est effectué dans la zone supérieure du sol ou dans des cellules de biotraitement (Noor *et al.*, 2022). Il consiste à étaler sur une faible épaisseur des sols pollués sur un support imperméable et à favoriser *via* des techniques agricoles classiques leurs biodégradation aérobie (Colombano *et al.*, 2010).

2.3.2.2. Le compostage

Il fournit au sol contaminé des matières organiques non dangereuses, telles que des déchets agricoles ou du fumier. Une riche population microbienne peut se développer dans l'existence de telles substances organiques (Bramley-Alves, 2014).

2.3.2.3. Biopile (ou biotertre)

Ce système est similaire au landfarming, puisqu'il est également érigé au-dessus du sol. Il utilise l'air pour stimuler les communautés de microorganismes aérobies qui améliorent la biodégradation des composés pétroliers (Brown, 2017).

2.3.2.4. Bioréacteur à lisier (à boue) :

Le sol est excavé, prétraité et introduit dans un bioréacteur qui va prendre en charge les processus normaux des microorganismes en simulant et en maintenant leur environnement naturel pour produire des conditions de développement optimales. Il contrôle les paramètres du bioprocédé (température, pH, taux d'agitation et d'aération, concentrations du substrat et de l'inoculum) (Polyak, 2018).

2.4. Méthodes d'apport des micro-organismes

2.4.1. La biostimulation

Cette approche implique la modification de l'environnement pour stimuler les bactéries capables de biodégrader les polluants. Cela peut être fait en ajoutant diverses formes de nutriments limitants et d'accepteurs d'électrons, tels que le phosphore, l'azote, l'oxygène ou le carbone (sous forme de mélasse), optimisant les conditions telles que l'aération et le contrôle

du pH et de la température. Il est estimé que la biostimulation peut être considérée comme une technique d'assainissement appropriée pour l'élimination de pétrole et ses dérivés dans le sol (Adams, 2014).

2.4.2. La bioaugmentation

Elle implique l'ajout de souches ou de consortiums de micro-organismes à capacité de dégradation externe. La logique de base est que les capacités métaboliques des microorganismes endogènes seront renforcées par l'ajout de microbes externes (Parashant *et al.*, 2019).

2.4.3. L'immobilisation

L'immobilisation est l'encapsulation ou le piégeage d'une cellule microbienne ou d'une enzyme d'intérêt dans un matériau inerte et insoluble tel que des polymères naturels ou synthétiques, l'alcool polyvinylique, les zéolites, qui sont utilisés pour la dégradation des composés aromatiques/xénobiotiques (Brena *et al.*, 2013).

2.5. La bioremédiation par voie Biotechnologique

Les technologies de traitement de l'eau, du sol et de l'air impliquant des microorganismes sont souvent considérées comme les plus économiques même si, historiquement, la maîtrise et les connaissances sur les agents impliqués étaient très limitées (Timothy, 2013).

Le développement d'outils moléculaires, biotechnologiques, bio-informatiques et de biologie systémique relatifs aux problèmes de bioremédiation a mis en lumière les mécanismes impliqués dans la bioremédiation à l'échelle génétique (Mishra *et al.*, 2021) (Figure 7). L'application de techniques moléculaires modernes comme la métagénomique, la transcriptomique et la protéomique, fournissent des informations pertinentes sur les niveaux d'expression des gènes et des protéines chez des communautés microbiennes entières dans des environnements contaminés, essayant à démêler le mécanisme de dégradation microbienne et l'exécution réussie de la bioremédiation (Rodriguez *et al.*, 2020).

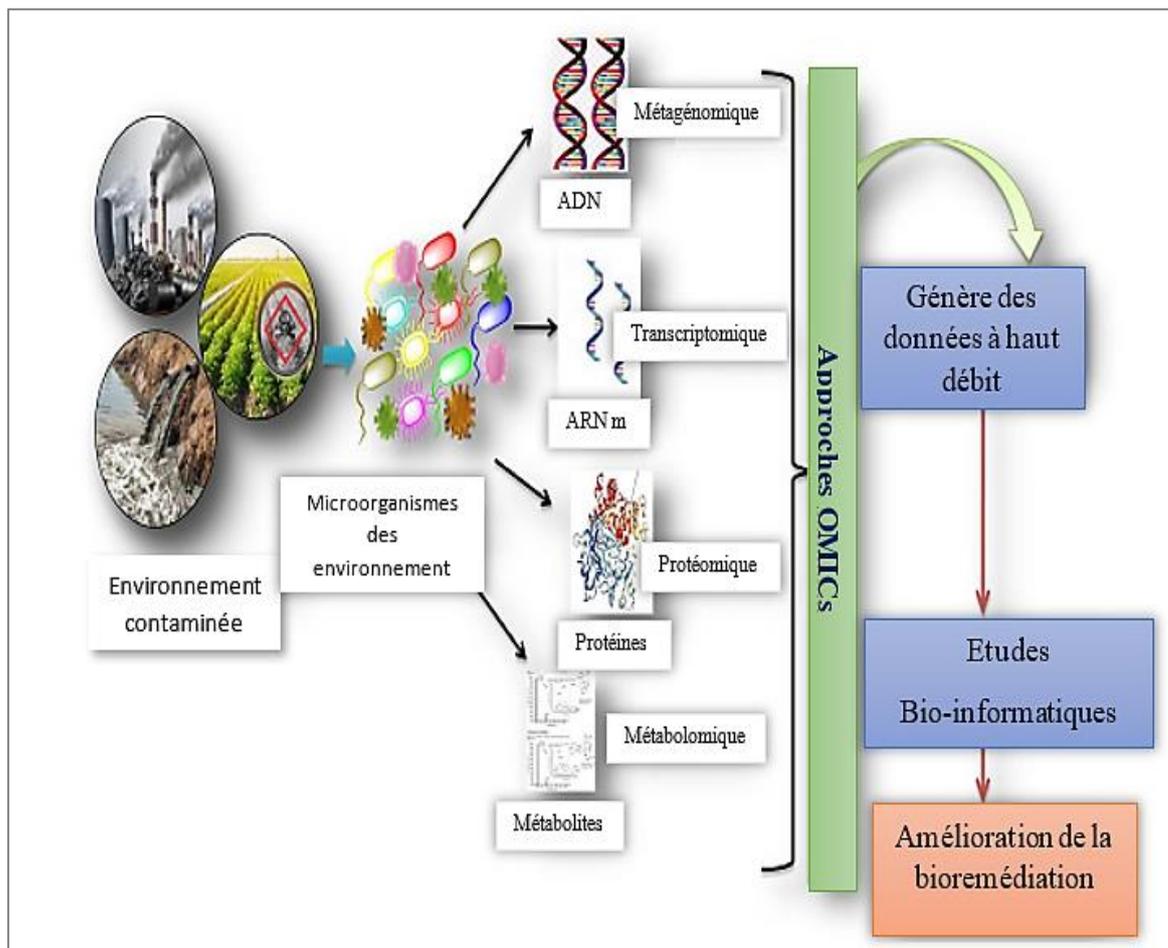


Figure 7. Approches intégrées des technologies avancées dans la biodégradation des composés xénobiotiques (Mishra *et al.*, 2021)

Chapitre II : Génomique Bactérienne

3. Génomique des bactéries impliquées dans la bioremédiation

Depuis le séquençage complet des deux génomes bactériens, ceux de *Haemophilus influenzae* et de *Mycoplasma genitalium* par le groupe de Craig Venter (TIGR) en 1995, le nombre de séquences de génomes des procaryotes ne cesse d'augmenter. Cette abondance de données a révolutionné nos connaissances sur l'organisation et le contenu génétique des génomes bactériens (Azali, 2010).

La génomique bactérienne, permettant l'étude des génomes bactériens (leur structure, leur évolution, la fonction des gènes codés et leur régulation), est principalement basée sur l'isolement et la culture d'une bactérie donnée. L'obtention d'une culture pure est une étape essentielle pour relier le phénotype particulier d'une souche bactérienne à son contenu en gènes (Diene, 2014). Néanmoins, la très grande majorité des bactéries (plus de 99%) sont non cultivables. Ainsi, afin d'étudier une communauté bactérienne dans son ensemble, il est possible de séquencer l'ADN de toutes les bactéries présentes dans un milieu donné (sol, eau, tube digestif de l'homme et des animaux, échantillons cliniques...). Cette approche, nommée « métagénomique », permet d'explorer la diversité microbienne, d'accéder à leurs génomes, d'identifier les séquences codant pour les protéines et même de reconstruire les voies biochimiques, fournissant des informations sur les propriétés et fonctions de ces organismes (Ferrer *et al.*, 2005).

3.1. Généralité sur le génome bactérien

L'ADN bactérien est structuré selon le modèle de Watson et Crick par deux chaînes polynucléotidiques complémentaires et antiparallèles, faites par les liaisons A-T et G-C et des liaisons d'hydrogènes entre les bases (Ait bouhouch, 2019). Le génome bactérien correspond au matériel génétique contenu sous forme des molécules d'ADN chromosomique et extrachromosomique présent dans une cellule bactérienne (chromosome, chromide, mégaplasmide et plasmide) (Dame *et al.*, 2019).

3.1.2. Chromosome

Le chromosome bactérien est le support génétique des bactéries mesurant de 1 à 1.5 mm de longueur. Il contient entre 1 000 000 et 4 500 000 paires de bases et entre 800 et 4300 gènes. Il est constitué d'un filament unique d'ADN en double hélice (bicaténaire), surenroulé grâce aux topoisomérases (Ait bouhouch, 2019). La plupart des bactéries connues possèdent un chromosome circulaire, mais des chromosomes linéaires ont toutefois été identifiés dans différents genres bactériens notamment : *Streptomyces* et *Borrelia* (Ferdows, 1996). Comme

décrit par Harrison *et al.*, (2010), le chromosome fait référence au réplicon primaire. Il est le plus grand réplicon du génome et contient la majorité des gènes centraux/essentiels étant un élément obligatoire et indispensable à la cellule bactérienne.

3.1.2. Plasmides et mégaplasmides

Les bactéries contiennent souvent un ou plusieurs plasmides, qui sont des molécules d'ADN extrachromosomique. Ces plasmides peuvent conférer certains avantages aux bactéries, comme la résistance à des antibiotiques ou des métaux, ou pour la production d'antibiotiques, de pigments, ou peut fournir des capacités cataboliques inhabituelles comme des facteurs de virulence (toxines). Ils peuvent également induire des tumeurs végétales, et d'autres réponses symbiotiques et pathogènes chez les plantes et les animaux (Dale et park, 2010). La majorité des gènes de ces plasmides ont été acquis par transfert horizontal de gènes (HGT), et leurs signatures génomiques, telles que la teneur en GC et la composition en dinucléotides, diffèrent considérablement du chromosome (Harrison *et al.*, 2010).

La distinction entre plasmide et mégaplasmide est actuellement basée uniquement sur la taille, les tailles de plasmide moyenne et médiane sont respectivement d'environ 46,2 kb et 78,9 kb. En revanche, les tailles moyennes des mégaplasmides sont environ 10 fois plus grandes, à ~558 kb et ~772 kb, respectivement (George et Turlough, 2017).

3.1.3. Chromide

Le terme « chromide » lui-même est une combinaison de chromosome et de plasmide (Harrison *et al.*, 2010). Les systèmes de réplication des chromides sont similaires à ceux des plasmides et des mégaplasmides, mais peuvent avoir des contrôles régulateurs supplémentaires qui intègrent leur réplication dans le cycle cellulaire (Ramachandran *et al.*, 2017). Cependant, contrairement aux plasmides et aux mégaplasmides, les chromides portent au moins un gène essentiel à la viabilité cellulaire (c'est-à-dire un gène central dont la perte entraînerait la mort cellulaire) et ont généralement des signatures génomiques qui ressemblent davantage à celles du chromosome (Harrison *et al.*, 2010).

3.2. Sources de variation génétique chez les bactéries

3.2.1. Transfert horizontal des gènes

3.2.1.1. Historique

En 1928, les premiers phénomènes de transferts de gènes horizontaux ont été découverts par Frederick Griffith qui démontra expérimentalement qu'en co-injectant à des souris deux souches de pneumocoques (*Streptococcus pneumoniae*), des pneumocoques non virulents avaient acquis la virulence de l'autre souche de pneumocoques (initialement

virulents). Le phénomène de transformation fut ensuite clairement identifié en 1944 par Oswald Avery Jr., comme responsable de ce transfert de gènes, en suivant ensuite l'identification des transferts médiés par les virus (transduction), d'éléments transposables (transformation) et les plasmides (conjugaison) (Bonot *et al.*, 2010).

Dans leurs travaux en 1964, Watanabe *et al.* ont identifié clairement et pour la première fois les mécanismes de transduction et de conjugaison comme étant impliqués dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Bonot *et al.*, 2010).

3.2.1.2.Mécanismes de HGT

Le transfert horizontal de gènes (HGT), également connu sous le nom de transfert latéral de gènes (LGT), est un processus dans lequel un organisme transfère du matériel génétique à un autre organisme qui n'est pas de sa progéniture. C'est un phénomène dynamique et persistant qui peut avoir des effets immédiats ou différés chez l'hôte receveur (Husnik et McCutcheon, 2018). Bien que le HGT soit plus fréquent chez les bactéries à bactéries (principalement dans les groupes d'*Archaea* et de bactéries), il se produit également entre d'autres organismes, tels que les bactéries qui servent généralement de donneurs et d'organismes comme les champignons, les plantes et les animaux qui agissent comme receveurs (Rancurel *et al.*, 2017).

Le HGT est longtemps reconnu comme un processus critique dans l'évolution des procaryotes. Les événements HGT jouent des rôles majeurs dans l'acquisition de la virulence, la résistance, la persistance, la tolérance et surtout la dégradation des xénobiotiques, en réponse aux facteurs de stress environnementaux. Plus important encore, les événements HGT ont conduit au transfert de gènes fonctionnels avec des caractéristiques adaptatives significatives qui ont été signalées chez certains taxons (Wickell et Li, 2020). Il existe trois principaux mécanismes de HGT chez les bactéries : la conjugaison, la transformation et la transduction.

a) La conjugaison

La conjugaison implique le transfert d'ADN entre deux cellules par l'intermédiaire d'un contact cellulaire initié par des pili conjugatifs. Différents éléments peuvent être transférés par la conjugaison, tels que les plasmides et les éléments de type ICEs (éléments intégratives et conjugatives). Dans le cas des plasmides, le transfert conjugatif peut être résumé comme tel : un pilus établi par la bactérie donneuse rentre en contact avec la bactérie receveuse (Figure 8) (Bonot *et al.*, 2010).

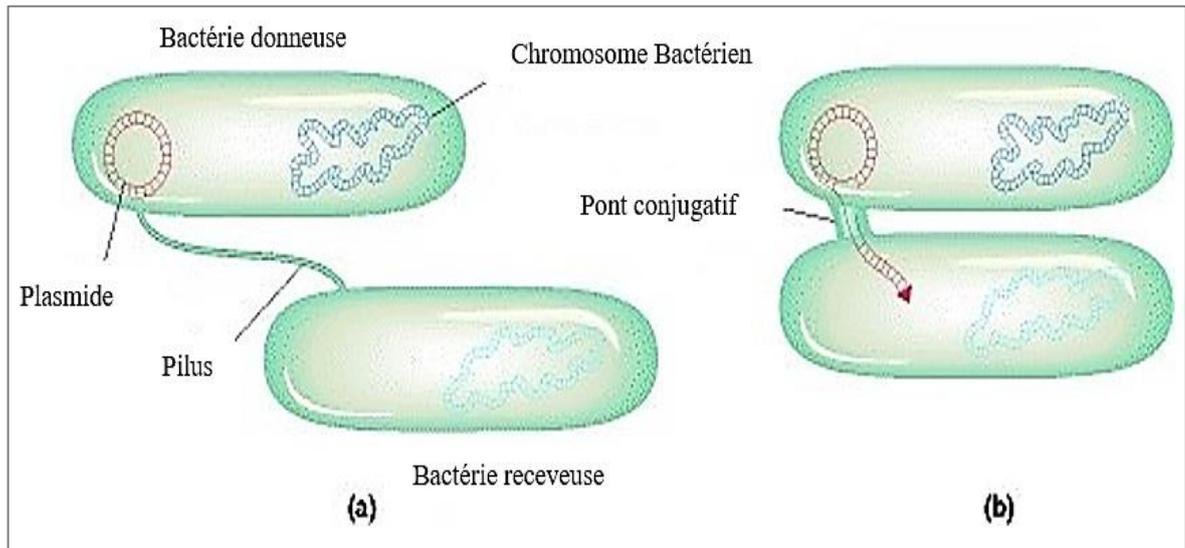


Figure 8 : mécanisme de conjugaison (Bioutils, 2007).

Les enzymes impliquées dans la dégradation de différents polluants sont souvent codées par des plasmides, et donc tous les gènes nécessaires à la voie de dégradation peuvent être transférés ensemble en un seul événement HGT. Des éléments génétiquement mobiles (MGE) tels que des transposons ou des séquences d'insertion peuvent également être trouvés sur les plasmides. Ces MGE sont capables de déplacer des gènes dans le chromosome et contribuent ainsi à créer de nouvelles voies cataboliques. Lorsqu'ils sont combinés à des plasmides conjugatifs, ils constituent un vecteur très efficace pour propager de nouveaux gènes. Les séquences *IS1071* et *IS6100* sont les insertions les plus fréquentes associées à la dégradation des micropolluants organiques (OMP) (Bahl *et al.*, 2009).

b) La transduction

Il s'agit d'un transfert d'ADN bactérien partiel, par l'intermédiaire de bactériophages dont le rôle est passif (vecteur) (Figure 9). Il est dans ce cas, virulent où il se multiplie dans la bactérie. Lors de la phase d'encapsidation, il incorpore de l'ADN bactérien fragmenté. Les bactériophages sont des virus qui se servent de bactéries pour se reproduire dont ils existent sous la forme virulente ou tempérée-:

- Les phages virulents se multiplient dans la bactérie (ou mieux sont répliqués par la bactérie) et la lysent à la fin du cycle, libérant les nouvelles particules virales (virions). Ce cycle est appelé cycle lytique (Brown *et al.*, 2001).

- Les phages tempérés peuvent, après infection, établir une association stable avec la bactérie infectée en s'intégrant dans le chromosome bactérien. Le bactériophage est alors appelé prophage et la bactérie qui en est porteuse, une bactérie lysogène. Dans ce cas les bactériophages n'induisent pas la réplication (les facteurs lytiques sont inexprimés), leur ADN viral est répliqué en même temps que le chromosome bactérien et il est transmis aux cellules filles de façon héréditaire. Ce cycle est appelé cycle lysogénique (Doolittle, 1999).

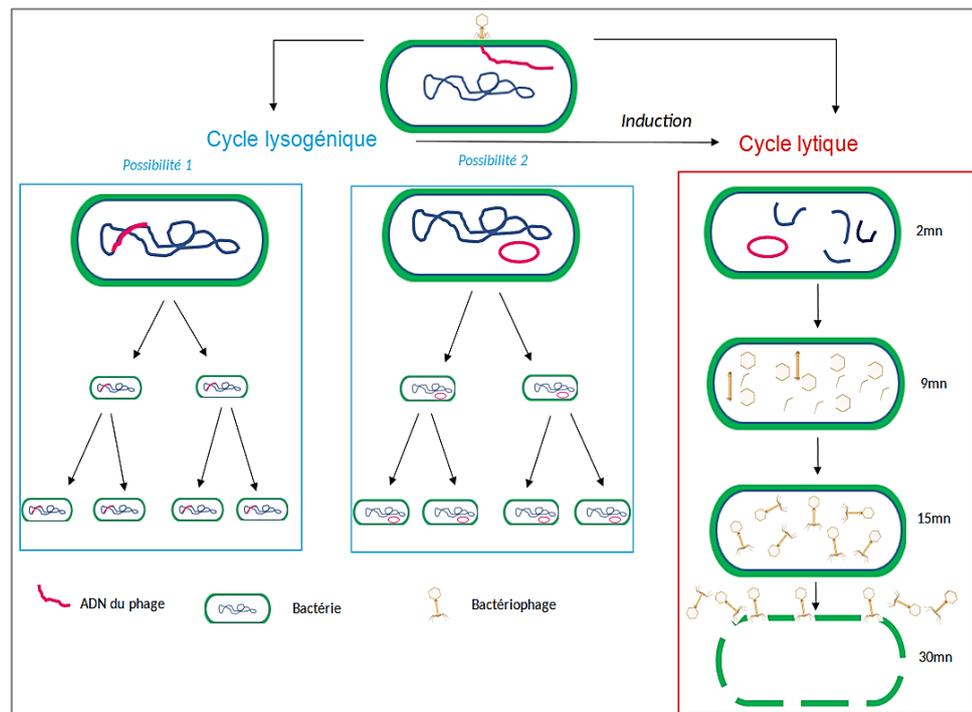


Figure 9. Mécanisme de transduction (Gontier, 2018).

La transduction est souvent considérée comme le moyen le plus efficace pour le HGT entre les différents biomes : elle ne nécessite pas de contact physique entre les bactéries, contrairement à la conjugaison. En outre, la transduction se produit dans un large éventail de bactéries à des fréquences plus élevées que ce que l'on pensait auparavant (Muniesa *et al.*, 2011).

Tout type d'ADN bactérien peut être emballé à l'intérieur de la capsid d'un bactériophage, y compris les fragments chromosomiques et les MGE tels que les plasmides et les transposons. Ils peuvent aussi mobiliser des gènes de virulence comme le fait le phage CTX Φ de *Vibrio cholerae* et des éléments d'insertion qui sont incorporés dans le génome receveur par réplication indépendante (Muniesa *et al.*, 2011). La transduction généralisée est réalisée par des phages tempérés tels que P1 d'*Escherichia coli* ou P22 de *Salmonella*

typhimurium mais aussi par des bactériophages virulents tels que le phage T4 d'*E. coli* (Muniesa *et al.*, 2011). La taille des fragments d'ADN qui peuvent être emballés dans une particule de bactériophage est limitée par la taille de la capside, d'une taille maximale entre 50 kb et 100 kb (Muniesa *et al.*, 2013).

c) La transformation

Les cellules bactériennes naturellement compétentes peuvent acquérir de nouvelles fonctions en absorbant de l'ADN extracellulaire (ADN exogène). Ce type d'ADN est libéré dans l'environnement par deux mécanismes principaux : la lyse des cellules bactériennes et la sécrétion active.

- La lyse cellulaire peut résulter d'une infection par un bactériophage, d'autolysines ou d'une sécrétion réactive (Wang *et al.*, 2020).
- La sécrétion active d'ADN est généralement réalisée par l'appareil de sécrétion de type IV bien que l'administration d'ex-ADN médiée par des vésicules ait également été démontrée dans certains micro-organismes tels que *Streptococcus pneumoniae* (Wang *et al.*, 2020).

En dehors de son rôle dans le HGT, l'ex-ADN a une fonction structurale dans les agrégats microbiens tels que les biofilms et les boues granulaires aérobies de petite taille. Cela a été prouvé par l'ajout des ADNases exogènes et l'observation du détachement des bactéries et la perturbation des biofilms et des petits granules aérobies (Wang *et al.*, 2020). Ainsi que, l'ADN polymérisé est suivi d'une recombinaison génétique légitime avec acquisition de nouveaux caractères génétiques stables, donc transmissibles à la descendance dénommée recombinants ou transformants (Boc et Makarenkov, 2003).

3.2.2. La mutation

Une mutation est définie comme toute altération de la séquence d'ADN transmissible verticalement à la descendance (Changey, 2013).

3.2.2.1. Les différents types de mutations

Les types de mutations pouvant affecter l'ADN bactérien sont illustrés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Les différents types de mutations chez les bactéries (Changey, 2013).

Types de mutation	Définition
Substitution	Signifie un remplacement d'une ou des plusieurs paires de nucléotides par un autre.
Addition	Se fait par l'ajout d'une ou plusieurs paires de nucléotides.
Délétion	Se fait par la perte d'une ou plusieurs paires de nucléotides.
Transversion	C'est une mutation ponctuelle impliquant des remplacements d'une base purique par une base pyrimidique où l'inverse.

Les mutations ponctuelles se regroupent en plusieurs catégories qui diffèrent par les conséquences sur les protéines codées par le gène muté (Tableau 4).

Tableau 4. Les mutations ponctuelles au niveau moléculaire (Changey, 2013).

Type de mutation	Résultats et exemple
<i>Au niveau de l'ADN</i> Transition	Purine remplacé par une purine différente ou pyrimidine remplacé par une pyrimidine différente : A.T → G.C G.C → A.T C.G → T.A T.A → C.G
Transversion	Purine remplacé par une pyrimidine ou pyrimidine remplacé par purine : A.T → C.G A.T → T.A G.C → T.A G.C → C.G T.A → G.C T.A → A.T C.G → A.T C.G → G.C
Indel	Insertion ou délétion d'une ou plusieurs paires de bases d'ADN (les bases insérées ou délétées sont soulignées) : AAGACTCCT → AAGA <u>Q</u> CTCCT AAGACTCCT → AA <u>A</u> CTCCT
<i>Au niveau protéique</i> Mutation synonyme	Le codon spécifie le même acide aminé AGG → CGG Arg Arg
Mutation faux-sens Mutation faux-sens conservative	Le codon spécifie un acide aminé différent Le codon spécifie un acide aminé chimiquement similaire : AAA → AGA Lys Arg (basique) (basique) Ne change pas la fonction protéique dans de nombreux cas
Mutation faux-sens non conservative	Le codon spécifie un acide aminé chimiquement dissemblable : UUU → UCU (phénylalanine) (Serine) (hydrophobe) (polaire)
Mutation non-sens	Le codon signale la terminaison de la chaîne : CAG → UAG Gln codon de terminaison ambre
Mutation par décalage de cadre de lecture	Addition d'une paire de bases (soulignée) AAG ACT CCT AAG → <u>AGC</u> TCC T... Délétion d'une paire de bases (soulignée) AAG <u>ACT</u> CCT AAA → CTC CT...

3.2.2.2. Origine des mutations

a) Mutations spontanées

Elles se produisent pendant les activités cellulaires, principalement la réplication de l'ADN et la réparation cellulaire normale (Dale et Park, 2010).

b) Mutations induites

Elles résultent d'une interaction entre l'ADN et un agent extérieur ou mutagène tel que :

▪ Les rayonnements ionisants

Alpha, Beta, gamma, ou rayon X, résultants habituellement en des délétions ou des insertions d'ADN (Dale et Park, 2010).

▪ Les rayonnements non ionisants

Les UV entraînent la formation de liaisons covalentes entre 2 nucléotides T, on parle de dimère T=T. Cette liaison anormale crée localement une modification de la structure de l'ADN qui perturbe le fonctionnement normal de l'ADN polymérase au moment de la réplication. Ces dimères comme la majeure partie des lésions d'origine chimique, bloquent la transcription et la réplication. Elles sont létales si elles ne sont pas réparées. Elles génèrent aussi des mutations et des réarrangements chromosomiques (Dale et Park, 2010).

▪ Les substances chimiques

- **Les analogues de bases** : produits chimiques qui sont structurellement semblables aux bases d'ADN, mais peuvent avoir un appariement de base avec des propriétés différentes. Par exemple, le bromo-uracil (Bro.U), un analogue de base dérivé de thymine s'apparie normalement avec l'Adénine, toutes fois, il peut donner par la suite un léger changement de structure appelé transition tautomérique en formant une paire avec la guanine. Après réplication de l'ADN, la paire de base originelle TA est remplacée par GC sur l'un des brins fils ce qui correspond à une mutation ponctuelle (Dale et Park, 2010).
- **Les modifiants de bases** : substances chimiques qui font des changements à une base spécifique changeant sa capacité de s'appareiller correctement. Par exemple, la désamination de C crée une base uracile (U) qui s'appareillera avec l'adénine au lieu de la guanine (Dale et Park, 2010).
- **Les agents intercalants** : produits chimiques qui s'insèrent dans l'hélice de l'ADN causant des problèmes de réplication et de transcription d'ADN, habituellement résultant en des délétions ou des insertions (exemple : Bromure d'éthidium) (Dale et Park, 2010).

3.2.3. Les éléments transposables et les séquences d'insertion

3.2.3.1. Eléments génétiques transposables

Les éléments génétiques transposables sont des segments d'ADN qui ont la capacité de bouger à partir d'une position à une autre (Woese *et al.*, 1990).

a) Propriétés des éléments génétiques transposables

✓ Mouvement aléatoire

Les éléments génétiques transposables peuvent bouger de n'importe quelle molécule d'ADN à une autre ou même à un autre endroit de la même molécule. Le mouvement n'est pas totalement aléatoire, il y a des sites de préférence dans la molécule d'ADN auxquels les éléments génétiques transposables vont s'insérer (Woese *et al.*, 1990).

✓ Incapacité d'auto-réplication

Les éléments génétiques transposables n'existent pas de manière autonome (exception de quelques phages transposables) et ainsi, pour être répliqués ils doivent faire partie d'un autre réplicon (Woese *et al.*, 2000).

✓ Transposition médiée par la recombinaison spécifique au site

La transposition nécessite peu ou pas d'homologie entre sa position de départ et le nouveau site. L'évènement de transposition est médié par une transposase codée par l'élément génétique transposable. La recombinaison qui ne nécessite pas d'homologie entre les molécules se recombinant est appelée spécifique au site ou homologue (Woese *et al.*, 2000).

✓ Possibilité d'être accompagnés d'une duplication

Dans de nombreux cas, la transposition d'un élément génétique transposable résulte en le retrait de l'élément de son site d'origine et en l'insertion dans un nouveau site. Cependant, dans certains cas, l'évènement de transposition est accompagné d'une duplication de l'élément génétique transposable. Une copie reste au site d'origine et l'autre est transposée au nouveau site (Lizeaux *et al.*, 2012).

b) Types d'éléments génétiques transposables

- Les séquences d'insertion (IS)

Les séquences d'insertion (IS) sont des éléments génétiques transposables qui ne portent pas de gène connu sauf ceux nécessaires à la transposition (Lizeaux *et al.*, 2012). Les IS sont de courts brins d'ADN qui possèdent à leurs extrémités des séquences répétées et qui sont impliquées dans la transposition. Entre les séquences répétées terminales, se trouvent des gènes impliqués dans la transposition et des séquences qui contrôlent l'expression de ces

gènes mais aucun autre gène non essentiel n'est présent. La présence des IS dans les génomes des bactéries est à l'origine de plusieurs variations génétique, à savoir (Woese *et al.*, 1990 ; Lizeaux *et al.*, 2012) :

- ✓ **Les mutations** : l'introduction d'une séquence d'insertion dans un gène bactérien résulte en l'inactivation de ce gène.
- ✓ **Insertion de plasmide dans les chromosomes** : les sites auxquels s'insèrent les plasmides dans le chromosome bactérien sont au niveau ou près d'une séquence d'insertion dans le chromosome, ils peuvent jouer un rôle dans l'expression de l'information d'un gène adjacent (certains IS portent un site promoteur).
Ils semblent jouer un rôle dans l'organisation et l'arrangement de certains gènes.

- **Les transposons (Tn)**

Les transposons (Tn) sont des éléments génétiques transposables qui portent un ou plusieurs gènes en plus de ceux qui sont essentiels à la transposition. Les transposons sont désignés par Tn suivit d'un numéro (Woese *et al.*, 2000).

La structure d'un Tn est similaire à une séquence d'insertion. Les gènes supplémentaires sont situés entre les séquences terminales répétées. Dans certains cas, les séquences terminales répétées sont en fait des séquences d'insertion. De nombreux gènes de résistance aux antibiotiques sont situés sur des Tn. Ils peuvent sauter d'une molécule d'ADN à une autre, ces transposons portant des résistances aux antibiotiques et sont un facteur majeur du développement de plasmides qui peuvent conférer une résistance multiple à la bactérie qui porte un tel plasmide. Ces plasmides de résistance multiple sont devenus un problème médical majeur à cause de l'utilisation à tort et à travers des antibiotiques et ont conféré un avantage sélectif pour les bactéries portant ces plasmides (Tortora *et al.*, 2003 ; Woese *et al.*, 2000).

3.2.3.2. Les intégrons et les cassettes

a. Les intégrons

Les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Les cassettes sont des éléments mobiles capables d'être intégrés ou excisés par un mécanisme de recombinaison spécifique de site médié par une intégrase. Ces cassettes peuvent être présentes dans la cellule soit sous forme d'ADN circulaire, soit intégrées dans un réplicon (plasmide ou chromosome). Ils peuvent aussi être mobilisés par un élément transposable (Fertoul, 2021).

✓ Types d'intégrons

On distingue deux grands types d'intégrons (Mazel *et al.*, 1998) :

- **Les intégrons de multirésistance (IM)** : sont portés par des plasmides et/ou des transposons, ils sont connus pour leur rôle majeur dans la dissémination des gènes de résistances aux antibiotiques.
- **Les super-intégrons (SI)** : sont strictement chromosomiques et jouent un rôle plus large en tant que réservoir de gènes à haute valeur adaptative.

b. Les cassettes de gènes

Une cassette de gène est un élément mobile non autonome et non répliatif qui associe généralement un seul cadre ouvert de lecture à un site de recombinaison attC. Les cassettes peuvent exister sous forme linéaire, insérée au sein d'un intégron ou transitoirement à l'état libre sous forme circulaire (Collis *et al.*, 1992).

Chaque cassette possède un site de recombinaison attC reconnu par les intégrases. Un site attC est composé de deux sites « core » L et R espacés par une région centrale de taille et de séquence très variable (Figure 10) (Bouvier *et al.*, 2009) :

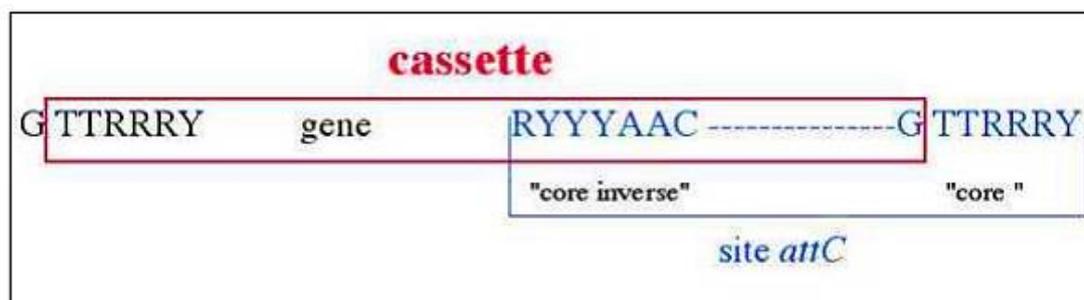


Figure 10. Structure d'une cassette de gènes (Bouvier *et al.*, 2009)

3.3. La plasticité génétique des bactéries dans la biodégradation des xénobiotiques

Le phénomène d'adaptation bactérienne aux modifications environnementales est la matérialisation de l'immense plasticité génétique dont elles disposent. C'est d'ailleurs précisément ce paramètre qui a autorisé leur omniprésence d'un point de vue géographique (puisque capables de coloniser les milieux extrêmes) et biogéochimique (car indispensables à la réalisation des cycles naturels). Leur adaptation à la biodégradation des molécules d'origine anthropique constitue une autre prouesse évolutive à l'échelle temporelle, étant donné la fréquence à laquelle les activités humaines ont généré de nouveaux intrants (Changey, 2011).

Ainsi, la présence des composés xénobiotiques dans un milieu donné, va modifier la structuration populationnelle des microorganismes, bactéries et champignons. Néanmoins, en corrélation avec leur stratégie nutritionnelle ou énergétique, ils pourront en retour influencer sur la concentration, le transfert et la transformation des molécules chimiques du sol (Changey, 2011).

Les bactéries, en raison d'une capacité de multiplication élevée et d'une forte plasticité génétique, ont pu développer des résistances ou des stratégies nutritionnelles leur permettant de pallier ou d'utiliser la présence d'herbicides dans le sol. L'utilisation massive des herbicides est actuellement controversée en raison d'effets avérés ou présumés sur l'environnement et sur la santé publique (Changey, 2011).

Parmi les pesticides connues, l'atrazine (2-chloro-4-éthylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine), un herbicide populaire, est utilisé dans le monde entier pour inhiber la croissance des plantes à feuilles larges indésirables dans l'agriculture (Siripattanakul *et al.*, 2009). Parce qu'il est modérément persistant dans des conditions de sol normales et a une solubilité dans l'eau faible à modérée, l'atrazine et ses dérivés ont même été détectés dans les sols, les eaux de surface et souterraines (Wang et xie, 2012). De plus, l'atrazine a été proposé comme cancérigène possible, perturbateur endocrinien et tératogène, affectant les écosystèmes et la santé humaine (Shenoy, 2012). Une préoccupation croissante concernant la large contamination et les propriétés toxicologiques de l'atrazine a incité les chercheurs à rechercher des options de bioremédiation pour l'élimination de l'atrazine (Viegas *et al.*, 2012).

Les bactéries dégradant l'atrazine produisent un groupe d'enzymes pour décomposer cette molécule complexe et améliorent leurs mécanismes métaboliques. Parmi les bactéries les plus isolées entre 2014 et 2021, seules *Arthrobacter* sp. FM326, *Pseudomonas* sp. AACB et *Bacillus subtilis* HB-6 sont capables de dégrader complètement l'atrazine en dioxyde de carbone et en ammoniac. Cependant, la voie catabolique de l'atrazine la mieux décrite est chez *Pseudomonas* sp. ADP qui code pour des gènes dégradant l'atrazine situés sur un seul plasmide conjugatif pADP-1 (Abd Rani *et al.*, 2021).

3.4. *Pseudomonas* sp. ADP

3.4.1. Historique du genre *Pseudomonas*

En 1894, le genre *Pseudomonas* a été décrit par Migula et inclut de nombreux bacilles à Gram négatif non fermentant, aérobies stricts à flagellation polaire. Ensuite en 1895, Migula y inclut *Pseudomonas pyocyanea*, espèce type du genre. Cette espèce est maintenant appelée

Pseudomonas aeruginosa et connue pour son pouvoir pathogène opportuniste, impliquée notamment dans des pneumopathies acquises sous ventilation ou surinfections de plaies (Anzai *et al.*, 2000).

En 1984, Palleroni a subdivisé le genre *Pseudomonas* en 5 groupes (I à V) sur la base de l'hybridation ADN-ARN. Puis, entre 1984 et 2000, les espèces des groupes II à V sont transférées dans d'autres genres. Le genre *Pseudomonas* est alors restreint aux espèces du groupe ARN de type I (Tableau 5) (Tournus, 2016).

Tableau 5. Classification des *Pseudomonaceae* selon Palleroni et Doudoroff (Tournus, 2016).

Groupe d'ARN	Genres
Groupe I	<i>Pseudomonas stricto sensu</i>
Groupe II	<i>Burkholderia, Pandoraea, Ralstonia</i>
Groupe III	<i>Acidovorax, Comamonas, Delftia</i>
Groupe IV	<i>Brevundimonas</i>
Groupe V	<i>Stenotrophomonas</i>

Le Bergey's Manual retenait 29 espèces de *Pseudomonas* dont 13 sont d'intérêt médical dans l'édition 1974, puis 30 espèces principales dans l'édition de 1984. En 1998, 118 espèces sont décrites dans le genre *Pseudomonas*, alors qu'en 2016, 231 espèces sont intégrées dans le genre. C'est donc un genre en constante évolution (Tournus, 2016).

Des espèces sont retirées du genre *Pseudomonas* pour être affiliées à un autre et de nouvelles espèces sont décrites grâce à l'avancée des méthodes d'identification. L'arbre phylogénétique construit à partir des séquences partielles de l'ADNr 16S regroupe les principales espèces du genre *Pseudomonas* et illustre la notion de groupes distincts ou clusters : *putida*, *fluorescens*, *aeruginosa*, *syringae*, *chlororaphis*, *stutzeri* et *pertucinogena* (Figure 11) (Brenner *et al.*, 2005).

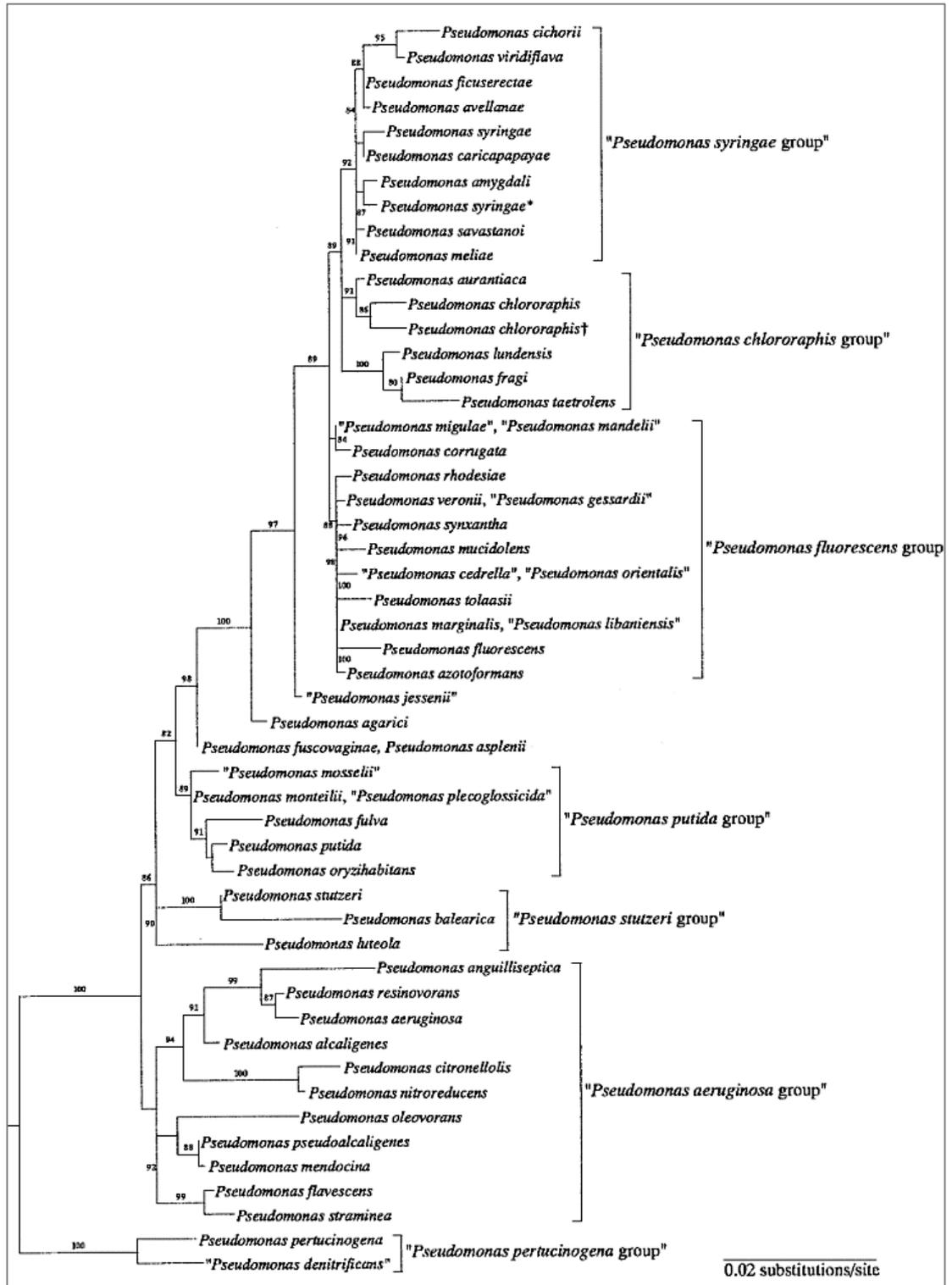


Figure 11. Arbre phylogénétique obtenu à partir des séquences du gène de l'ADNr 16S (Brenner *et al.*, 2005).

3.4.2. Taxonomie

Pseudomonas est un genre bactérien diversifié et complexe qui occupe de nombreuses niches et habitats environnementaux. C'est un organisme modèle, dans lequel des outils taxonomiques ont été développés et testés avec succès (Brenner *et al.* 2005), la classification taxonomique de ce genre est représentée dans le Tableau 6.

Tableau 6. Taxonomie de *Pseudomonas sp.* ADP (Brenner *et al.*, 2005)

Règne	<i>Bacteria</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Souche	<i>Pseudomonas sp.</i> ADP

3.4.3. Principales caractéristiques bactériologiques et écologiques

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, d'un diamètre varie entre 0,5 à 1,3 µm, mobiles par une ciliature polaire (un ou plusieurs flagelles), non sporulant, aérobies stricts et non exigeants (Tournus, 2016). Certaines espèces peuvent produire des pigments fluorescents ou non fluorescents (Tableau 7). D'autres produisent un pigment fluorescent appelé pyoverdine (jaune vert) jouant le rôle de sidérophore. Ces espèces sont classées dans le groupe des *Pseudomonas* fluorescents : *aeruginosa*, *chlororaphis subsp. chlororaphis*, *fluorescens*, *monteilli*, *putida*, *plecoglossidica*, *simiae* et *syringae*. Ces pigments jouent un rôle dans la virulence de la bactérie. Les *Pseudomonas* du groupe non fluorescent sont notamment les espèces *alcaligenes*, *fragi*, *mendocina*, *stutzeri* et *pseudoalcaligenes* (Tournus, 2016).

Tableau 7. Espèces de *Pseudomonas* sp. appartenant aux groupes fluorescent et non fluorescent (Tournus, 2016).

Groupe fluorescent	Groupe non fluorescent
<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.alcaligenes</i>
<i>P.chlororaphis</i>	<i>P.fragi</i>
<i>P.fluorescens</i>	<i>P.fulva</i>
<i>P.monteilii</i>	<i>P.mendocina</i>
<i>P.mosselii</i>	<i>P.pseudoalcaligenes</i>
<i>P.putida</i>	<i>P.stutzeri</i>
<i>P.simiae</i>	
<i>P. syringae</i>	
<i>P.tawainensis</i>	

La température optimale de croissance est de 30°C, bien que certaines espèces survivent à des températures extrêmes : 4°C pour les espèces *putida* et *fluorescens* et 41°C pour les espèces *aeruginosa*, *alcaligenes*, *pseudoalcaligenes*, *stutzeri* et *mendocina* (Freney *et al.*, 2007).

Les bactéries du genre *Pseudomonas* ont des exigences nutritives très modestes. Elles survivent et se multiplient dans des environnements humides. Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans l'eau, le sol, les végétaux et les tissus biologiques. Elles ont une capacité à s'installer dans différentes niches (Fernandez *et al.*, 2015).

3.5. Plasmide pADP-1 de *Pseudomonas* sp. ADP

En 2001, Martinez *et al.* ont réalisé un séquençage complet du plasmide catabolique d'atrazine pADP-1 de *Pseudomonas* sp.ADP, et établi une carte physique circulaire de pADP-1 pour la première fois (Figure 12).

Le pADP-1 est de 108 845 pb de taille, avec une teneur globale en G+C de 62,6 %. Cette valeur se situe dans la fourchette de celles trouvées dans plusieurs genres de bactéries du sol à Gram négatif, y compris les souches *Pseudomonas* et *Alcaligenes*. Des analyses informatiques ont indiqué qu'il code pour 104 cadres de lecture ouverts putatifs (ORF), qui devraient fonctionner dans le catabolisme, la transposition et la maintenance, le transfert et la réplication des plasmides (Martinez *et al.*, 2001). Le pADP-1 contient un squelette IncPβ classique constitué de deux régions impliquées dans la conjugaison du plasmide (les

opérons *tra* et *trb*), une origine de réplication (*oriV*), et une région impliquée dans le contrôle plasmidique, l'hérédité stable et la partition (Martinez *et al.*, 2001).

La principale région catabolique de pADP-1 se situe en dehors des opérons *trb* et *tra*. Cette région contient les trois premiers gènes nécessaires à la dégradation de l'atrazine, *atzA*, *atzB* et *atzC*. De plus, la région contient un opéron de résistance au mercure et plusieurs éléments de séquence d'insertion. L'analyse des enzymes de restriction de pADP-1 a montré que la région catabolique de ce plasmide contient de nombreux sites de restriction, alors que seules quelques enzymes coupent le squelette (Martinez *et al.*, 2001). Les trois derniers gènes de dégradation de l'atrazine, *atzD*, *atzE* et *atzF* sont organisés sous forme d'un pseudo-opéron soumis à la régulation transcriptionnelle d'un régulateur, placé sous la régulation du gène *atzR* codant pour un facteur de transcription de type *lysR* (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2005).

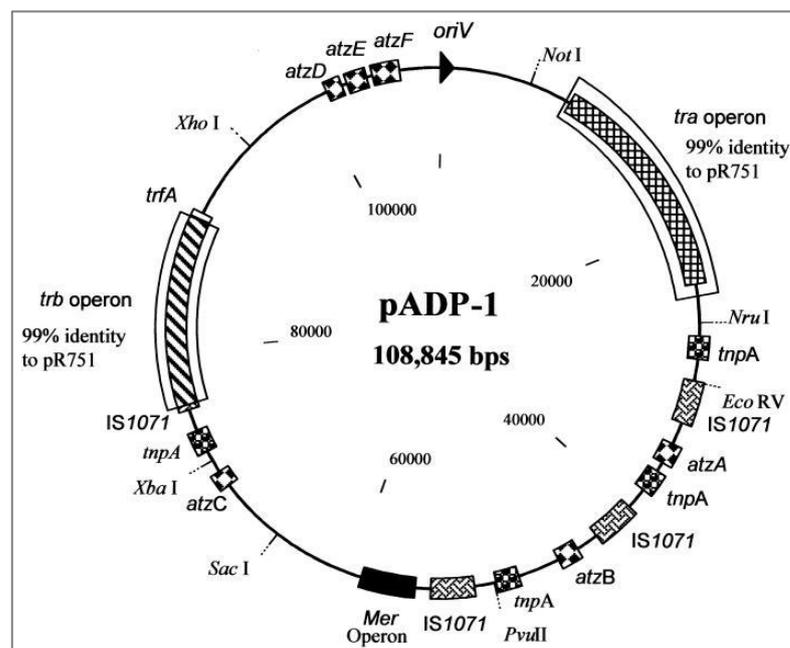


Figure 12. Carte physique circulaire du plasmide catabolique pADP-1 de *Pseudomonas* sp. ADP (Martinez *et al.*, 2001).

3.6. Voies cataboliques de l'atrazine

Un ensemble de six enzymes est impliqué dans la voie de dégradation complète de l'atrazine, divisé principalement en deux voies (Figure 13).

- La voie haute (*upper pathway*)

Elle est caractérisée par trois étapes de dégradation de l'atrazine, consistent en trois hydrolyses catalysées successivement par l'atrazine chlorohydrolase codé par le gène *atzA*, l'hydroxyatrazine éthylaminohydrolase codé par le gène *atzB* et la N-isopropyle-ammelide

Nisopropylaminohydrolase codé par le gène *atzC*. Ces trois enzymes appartiennent à la super-famille des amido-hydrolases métallo-dépendantes, transforme l'atrazine en acide cyanurique (Esquirol *et al.*, 2018).

- **La voie basse (*lower pathway*)**

Elle est aussi caractérisée par trois étapes, impliquant les gènes *atzD* qui code pour l'amidohydrolase, *atzE* qui code pour le biuret hydrolase et *atzF* qui code pour l'allophanate hydrolase, organisés sous forme d'un pseudo-opéron placé sous la régulation transcriptionnelle d'un facteur de transcription de type *lysR* codé par le gène *atzR* qui agit positivement en présence d'acide cyanurique et l'utilisé comme source d'azote (Figure 14). Ces trois enzymes transforment l'acide cyanurique en dioxyde de carbone et en ammonium (Esquirol *et al.*, 2018).

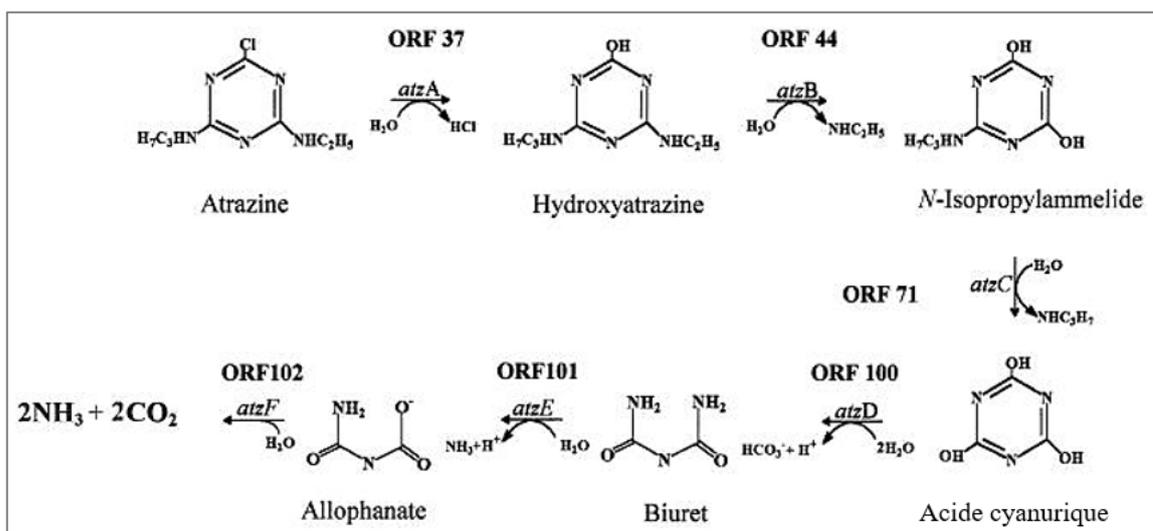


Figure 13. Voies de catabolisme de l'atrazine (Changey, 2011).

Partie II : Partie Expérimentale

Chapitre I : Analyse *in Silico*

1. Matériels et Méthodes

Notre travail consiste à réaliser une recherche *in silico* des gènes de biodégradation de l'atrazine *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* et *atzF* chez *Pseudomonas* sp. ADP. Cette recherche est réalisée en ligne sur les différentes bases et banques de données :

- NCBI (*National Center for Biotechnological Information*)
- PDB (*Protein Data Bank*)
- UniProt (*Universal Protein Resource*)

1.1. Centre National de l'information Biotechnologique (NCBI)

Le Centre National de l'information Biotechnologique (NCBI) a été fondé en 1988 en tant qu'institut central pour le traitement et le stockage des données de biologie moléculaire, il fait partie de la US Bibliothèque National de la Médecine (NLM). NCBI donne accès à différentes bases de données de séquences d'acide nucléique (ARN, ADN) et des protéines ainsi qu'à des bases de données bibliographiques (PubMed), des bases de données génétiques médicales (OMIM) et des outils bio-informatiques (Blast, etc.) (Arnemann, 2019). Toutes ces données et informations sont disponibles via le site Web de NCBI : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

1.2. Banque des données protéiques (PDB)

Fondé en 1971, la banque des données protéique ou *Protein data bank* (PDB), est une collection mondiale de données sur la structure tridimensionnelle des protéines (structure 3D). Ces structures sont essentiellement déterminées par cristallographie aux rayons X ou par spectroscopie RMN. Ces données expérimentales sont déposées dans la PDB par les scientifiques et les chercheurs du monde entier (Bernstein *et al.*, 1977). Leur consultation est gratuite et peut se faire directement via le site Web de la banque : <https://www.rcsb.org>

1.3. *Universal Protein Resource* (UniProt)

Universal Protein Resource (UniProt) est une ressource complète pour les séquences de protéines et les données d'annotation. UniProt est une collaboration entre l'Institut Européen de Bio-informatique (EMBL-EBI), l'Institut Suisse de Bio-informatique (SIB) et le *Protein Information Resource* (PIR) (UniProt, 2021). Toutes les données UniProt sont disponibles gratuitement sur le Web via le site : <https://www.uniprot.org>

1.4. Séquences protéiques

- Les gènes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* et *atzF* de la Biodégradation de l'Atrazine chez *Pseudomonas* sp. ADP.

D'abord pour commencer notre étude, nous avons consulté la plateforme NCBI le 8 juin 2022 pour télécharger les séquences protéiques des gènes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* et *atzF*, avec leurs numéros d'accèsion (Figure 15). Ainsi que le forma FASTA de chaque séquence.

- ✓ *atzA* (AAK50270.1)
- ✓ *atzB* (AAC45138.1)
- ✓ *atzC* (AAB96621.1)
- ✓ *atzD* (AAK50331.1)
- ✓ *atzE* (AAK50332.1)
- ✓ *atzF* (AAK50333.1)

- **FASTA ou (format Pearson)** : est un format de fichier texte utilisé pour stocker des séquences biologiques de nature nucléique ou protéique. Ces séquences sont représentées par une suite de lettres codant des acides nucléiques ou des acides aminés selon la nomenclature IUPAC. Chaque séquence peut être précédée par un nom et des commentaires. Ce format est originellement issu de la suite de programmes FASTA mais, de par son utilisation très répandue, est devenu un standard de en bio-informatique (Cock *et al.*, 2010).

The screenshot shows the NCBI website interface. At the top left is the NIH logo and the text 'National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information'. A 'Connexion' button is in the top right. Below the header is a search bar with a dropdown menu set to 'Toutes les bases' and the search term 'AAK50270.1' entered. A 'Chercher' button is to the right of the search bar. The main content area is divided into three columns. The left column is a navigation menu with items like 'Accueil NCBI', 'Liste des ressources (AZ)', 'Toutes les ressources', 'Produits chimiques et essais', 'Données et logiciels', 'ADN & ARN', 'Domaines & Structures', 'Gènes & Expression', 'Génétique et médecine', 'Génomes et cartes', 'Homologie', 'Littérature', and 'Protéines'. The middle column is titled 'Bienvenue au NCBI' and contains a welcome message, a link to 'À propos du NCBI | Mission | Organisation | Nouvelles et blog du NCBI', and three main sections: 'Soumettre' (with an upload icon), 'Télécharger' (with a download icon), and 'Apprendre' (with a book icon). The right column is titled 'Ressources populaires' and lists various resources like PubMed, Étagère à livres, Centre PubMed, EXPLOSION, Nucléotide, Génome, SNP, Gène, Protéine, and PubChem. At the bottom right of this column is a link to 'Nouvelles et blog du NCBI'.

Figure 15. Recherche de la séquence protéique du gène *atzA*.

1.5. Prédiction des structures 3D des protéines

L'étape suivante dans notre étude consiste à la prédiction des structures 3D des protéines codées par les gènes *atzABCDEF*, afin de déterminer et comprendre leurs fonctions.

Dans notre travail, nous avons utilisé la banque des protéines PDB pour avoir les structures 3D des gènes *atzA*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, *atzF*, et la banque protéique UniProt pour avoir la structure du gène *atzB*.

Pour réaliser cette recherche, il suffit d'entrer le nom de la protéine avec le nom de son organisme producteur dans la case de recherche sur PDB (Figure 16) et UniProt (Figure 17).

The screenshot shows the RCSB PDB website interface. At the top, the search bar contains the text "atzA Pseudomonas sp. ADP", which is highlighted with a red box. Below the search bar, there are navigation options like "Recherche Avancée" and "Parcourir les annotations". The main content area features a sidebar with navigation links (Accueillir, Verser, Chercher, Visualiser, Analyser, Télécharger, Apprendre) and a central section titled "Une vision structurale de la biologie". To the right, there is a "Molécule du mois de juin" section displaying a 3D protein structure labeled "Pyruvate Kinase M2".

Figure 16. Recherche de la structure de la protéine *atzA* sur PDB

The screenshot shows the UniProt website interface. The search bar at the top contains the text "atzB Pseudomonas sp. ADP", highlighted with a red box. Below the search bar, there are navigation options like "EXPLOSION", "Aligner", "Mappage de récupération/ID", "Recherche de peptides", and "SPARQL". The main content area features several sections: "UniProtKB" (Base de connaissances UniProt), "UniRef" (Les grappes de référence UniProt), "UniParc" (UniParc est une base de données complète), "Protéomes" (Un protéome est l'ensemble des protéines censées être exprimées), and "Nouvelles" (Changes to come, Version UniProt 2022_02, UniProt release 2022_01). There is also a "Données à l'appui" section with links for Citations littéraires, Taxonomie, and Emplacements subcellulaires.

Figure 17. Recherche de la structure de la protéine *atzB* sur UniProt

1.6. Recherche de similarité

Afin d'obtenir le degré de parenté et le taux de similarité entre nos séquences et celles trouver sur NCBI, nous avons utilisé le logiciel BLAST pour effectuer cette étude.

- BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*)

BLAST est un outil accessible en ligne, utilisé en bio-informatique pour rechercher des régions de similarités locales entre des séquences. Le programme compare des séquences nucléotidiques ou protéiques à des bases de données de séquences (NCBI) et calcule la significativité statistique des alignements, il est aussi utilisé pour inférer des relations fonctionnelles et évolutives entre les séquences et peut aider à identifier des membres d'une famille de gènes (Legrand, 2016).

Dans notre étude nous avons utilisé BLASTp l'un des types de BLAST (Figure 18), pour effectuer des comparaisons entre nos séquences protéique. Pour réaliser cette étape, il suffit d'entrer le format FASTA de chaque séquence dans la case de recherche (Figure 19).

The image shows the BLAST web interface from the National Library of Medicine. At the top, there is a navigation bar with the NIH logo, the text 'National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information', and a 'Connexion' button. Below this, the page title is 'BLAST®' and there are links for 'Maison', 'Résultats récents', 'Stratégies enregistrées', and 'Aider'. The main content area is titled 'Outil de recherche d'alignement local de base'. It includes a brief description of BLAST and a 'NEWS' box announcing 'BLAST+ 2.13.0 est arrivé !'. Below this, there is a section for 'Explosion Web' with three buttons: 'Nucleotide BLAST' (nucleotide to nucleotide), 'blastx' (translated nucleotide to protein), and 'Protein BLAST' (protein to protein). The 'Protein BLAST' button is highlighted with a red border.

Figure 18. Types de BLAST

Figure 19. Recherche de la similarité des séquences protéiques sur BLASTp

1.7. Etude phylogénétique

La réalisation d'une étude phylogénétique a comme but de comprendre les relations de parenté, de retracer l'historique évolutif d'un gène, d'une famille de gènes ou d'une espèce. Les arbres phylogénétiques sont une très bonne manière de schématiser et d'appréhender ces relations rapidement (Yoann, 2012). Dans notre étude, les arbres phylogénétiques de nos protéines ont été obtenus par le logiciel BLAST.

- **L'arbre phylogénétique :** C'est une forme de classification des espèces traduisant les relations de descendance des espèces avec modification de leurs caractères qui sont transmis d'une génération à l'autre à travers les mécanismes d'hérédité. Un arbre est composé de quatre éléments principaux (Durbin *et al.*, 1998) :
 - La racine, désignant l'ancêtre commun des espèces représentées dans l'arbre.
 - Les nœuds externes ou feuilles qui représentent les unités taxonomiques (les espèces) dont les informations ont été utilisées lors de la construction de l'arbre.
 - Les nœuds internes, représentant des ancêtres hypothétiques.
 - Les branches qui montrent les relations de descendance entre les nœuds de l'arbre

Il existe plusieurs méthodes pour construire un arbre phylogénétique, les plus connues sont :

a) UPGMA

Signifie méthode de groupe de paires non pondérées et moyenne arithmétique. C'est une méthode de regroupement hiérarchique. Elle a été introduite par Sokal et Michener en 1973. C'est la technique la plus rapide qui développe un arbre phylogénétique. Le résultat final est un arbre phylogénétique enraciné avec un ancêtre commun.

Lors du dessin d'un arbre phylogénétique à l'aide de la méthode UPGMA, il considère que les taux d'évolution sont les mêmes pour toutes les lignées. Il s'agit donc d'une hypothèse importante faite dans la technique UPGMA. Cependant, c'est aussi le principal inconvénient de la technique car le taux de mutation n'est pas pris en compte lors de la construction de l'arbre. Au lieu de cela, il suppose que le taux de mutation est une constante. De plus, cette hypothèse est appelée "l'hypothèse de l'horloge moléculaire". Par conséquent, dans le contexte réel, l'arbre phylogénétique construit à partir d'une méthode UPGMA peut ne pas être précis et fiable (Samanthi, 2019).

b) *Neighbor Joining* (NJ)

C'est une autre technique de regroupement utilisée pour produire un arbre phylogénétique. Naruya Saitou et Nei ont été les premiers dans l'introduction de la méthode. La technique produit un arbre sans racine, contrairement à UPGMA. De plus, le regroupement dans cette méthode ne repose pas sur des distances ultra-métriques. Cependant, il considère la variation des taux d'évolution lors de la construction de l'arbre phylogénétique. Ainsi, il existe des variations dans les arbres dessinés à l'aide de cette technique. Par conséquent, cette méthode utilise des algorithmes mathématiques spéciaux pour évaluer ces variations (Samanthi, 2019).

Résultats et Discussions

2. Résultats et Discussion

2.1. Format FASTA et Représentation Graphique

L'étude in silico fait sur la plateforme NCBI des six gènes de biodégradation de l'atrazine, a donné les résultats suivants :

- Le format FASTA des gènes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, *atzF* est représenté respectivement (Figure 20 : A, B, C) (Figure 21 : D, E, F).
- La Représentation Graphique de la partie codante de chaque gène est représentée dans (Figure 22 : A, B, C, D, E, F).

```
>AAK50270.1 atrazine chlorohydrolase (plasmide) [Pseudomonas sp. ADP]
MQTLSIQHGTLVMTDQYRRVLGDSWVHVQDGRIVALGVHAESVPPPADRVIDARGKVVLPGFINAHTHVN
QILLRGGPSHRQFYDWLFNVVYPGQKAMRPEDVAVAVRLYCAEAVRSGITTINNADSAIYPGNIEAAM
AVYGEVGVRRVYARMFDRMDGRIQGYVDALKARSQVELCSIMEETAVAKDRITALSDQYHGTAGGRIS
VWPAPATTTAVTVEGMRWAQAFARDRAVMNTLHMAESDHERIHGMSPAEMYECYGLLDERLQVAHCVFYF
DRKDVRLLRHNVKVASQVVSNAYLGSVAVPPEMVERGMAVIGTDNGNSNDSVNMIGDMKFMMAHIHRA
VHRDADVLTPKILEMATIDGARS LGMDHEIGSIETGKRADLILLDLRHPQTPHHHLAATIVFQAYGNE
VDTVLI DGNVVMENRRLSFLPPERELAFLEEAQSRATAILQ RANMVANPAWRSL
```

A

```
>AAC45138.1 hydroxyatrazine hydrolase (plasmide) [Pseudomonas sp. ADP]
MTTTLTYTGFHQLVTGDVAGTVLNGVDILVRDGEIIGLGPDL PRTLAPIGVGQEQGVEVVNCRGLTAYPGL
INTHHHFQAFVRNLAPLDWTQLDVLAWLRKIYPVFALVDEDCIYHSTVVSMAELIKHGCTTAFDHQYNY
SRRGGPFLVDRQFDAANLLGLRFHAGRGGITL PMAEGSTIPDAMRESTDTFLAD CERLVS RFHDP RP FAM
QRVVVAPSSPVIAYPETFVESARLARHLGVSLH THLGEGETPAMVARFGERSLDWCENRGFVGPDWLAH
GWEFTAADIARLAATGTGVAHCPAPVFLVGA EVDIPAMAAAGVRVGFVGDGHASNDSSNLAECIRLAYL
LQCLKASERQHPVPAPYDFLRMATQGGADCLNRPDLGALAVGRAADFFAVDLNRIEYIGANHDPRSLPAK
VGFSGPVDMTVINGKVVWRNGEFPGLDEME LARAADGVFRRVIYGDPLVAALRRGTGVTPC
```

B

```
>AAB96621.1 N-isopropylammelide isopropylamino hydrolase (plasmide) [Pseudomonas sp. ADP]
MSKDFDLIIRNAYLSEKDSVYDIGIVGDRIIKIEAKIEGTVKDEIDAKGNLVSPGFVDAHTMDKSFTST
GERLPKFWSRPYTRDAAIEDGLKYYKNATHEEIKRHVIEHAHMQVLHGTL YTRTHVDVDSVAKTKAVEAV
LEAKEELKDLIDIQVVAFAQSGFFVDLESESLIRKSLDMGCDLVGGVDPATRENNVEGSLDLCFKLAKEY
DVDIDYHIHDIGTVGVYSINRLAQKTIENGYKGRVTTSHAWCFADAPSEWLDEAIPLYKDSGMKFVTCFS
STPPTMVIKLLEAGINLGCASDNIRDFWVPFGNGDMVQ GALIETQRLELKTNRDLGLIWKMITSEGARV
LGIEKNYGIIEVGKKADLVVLSLSPQWAIIDQAKRLCVIKNGRIIVKDEVIVA
```

C

Figure 20. Format FASTA des gènes *atz* de la voie haute chez *Pseudomonas sp. ADP*
(A) *atzA*, (B) *atzB*, (C) *atzC*.

```
>AAK50331.1 amidohydrolase d'acide cyanurique (plasmide) [Pseudomonas sp. ADP]
MYHIDVFRIPCHSPGDTSGLEDLIETGRVAPADIVAVMGKTEGNGCVNDYTREYATAMLAACLGRHLQLP
PHEVEKRVAFVMSGGTEGVLSPHHTVFARRPAIDHRPAGKRLTLGIAFTRDFLPEEIGRHAQITETAGA
VKRAMRDAGIASIDDLHFVQVKCPLLTPAKIASARSRGCAPVTTDTYESMGYSRGASALGIALATEEVPS
SMLVDESVLNDWSLSSSLASASAGIELEHNVVIAIGMSEQATSELVIAHGVMSSDDAIDAASVRRRTIESLGI
RSSDEMDRIVNVFAKAEASPDGVVRGMRHTMLSDSDINSTRHARAVTGAAIASVVGHGMVYVSGGAEHQG
PAGGGPFAVIARA
```

D

```
>AAK50332.1 biuret hydrolase (plasmide) [Pseudomonas sp. ADP]
MKTVEIIEGSIASGRTSARDVCEEALATIGATDGLINAFTCARTVERARAEADAIDVRRARGEVLPPLAGLP
YAVKNLFDIEGVTTLAGSKINRTLPPARADAVLVQRLKAAGAVLLGGLNMDEFAYGFTTENTHYGPTRNP
HDTGRIAGGSSGGSGAAIAAGQVPLSLGSDTNGSIRVPASLCGVWGLKPTFGRLSRRGTYPFVHSIDHLG
PLADSV EGLALAYDAMQGPDPDPGCSASRIQPSVPVLSQGIAGLRIGVLGGWFRDNAGPAARA AVDVAA
LTLGASEVVMWPDAEIGRAAAFVITASEGGCLHLDDLIRPQDFEPLSVDRFISGVLPVAVYLRAQRFR
RVYRDKVNALFRDWDILIAPATPISAPAIGTEWIEVNGTRHPCRPMAGLLTQPVSFAGCPVVAAPTWPGE
NDGMPIGVQLIAAPWNESLCLRAGKVLQDTGIARLKC
```

E

```
> AAK50333.1 allophanate hydrolase (plasmide) [Pseudomonas sp. ADP]
MNDRAPHPERSGRVTPDHLTDLASYQAAYAAGTDAADVISDLYARIKEDGENPIWISLLPLESALAMLAD
AQQRKDKGEALPLFGIPFGVKDNIDVAGLPTTAGCTGFARTPRQHAFVVQRLVDAGAIPIGKTNLDQFAT
GLNGTRTPFGIPRCVFNENYVSGSSSGSAVAVANGTVPFSLGTDTAGSGRIPAAFNNLVGLKPTKGLFS
GSGLVPAARSLDCISVLAHTVDDALAVARVAAGYDADDAFSRKAGAAALTEKSWPRRFNFGVPAAEHRQF
FGDAEAEALFNKAVRKL EEMGGTCISFDYTPFRQAAELLYAGPWVAERLAAIESLADEHPEVLHPVVRDI
ILSAKRMSAVDTFNGIYRLADLVRAAESTWEKIDVMLLPTAPTIIYTVEDMLADPVRLNSNLGFYTNFVNL
MDLSAIAVPAGFRTNGLPFGVTFIGRAFEDGAIASLGKAFVEHDLAKGNAATAAPPKDTVAIAVVG AHL S
DQPLNHQLTESGGKLRATTRTAPGYALYALRDATPAKPGMLRDQNAVGSIEVEIWDLPVAGFGAFVSEIP
APLGIGTITLEDGSHVKGFLCEPHAIETALDITHYGGWRAYLAAQ
```

F

Figure 21. Format FASTA des gènes *atz* de la voie basse chez *Pseudomonas* sp. ADP

(D) *atzD*, (E) *atzE*, (F) *atzF*.

- ✓ Représentation graphique de la partie codante pour la protéine atrazine chlorohydrolase localisée entre 6 et 437aa.

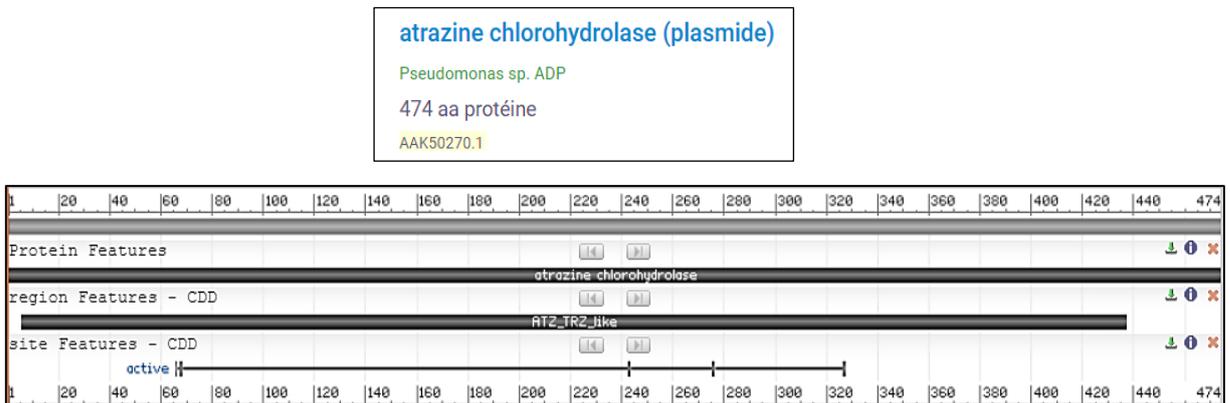


Figure 22.A. Partie codante pour la protéine atrazine chlorohydrolase du gène *atzA*.

- ✓ Représentation graphique de la partie codante pour la protéine hydroxyatrazine hydrolase localisée entre 4 et 444aa.

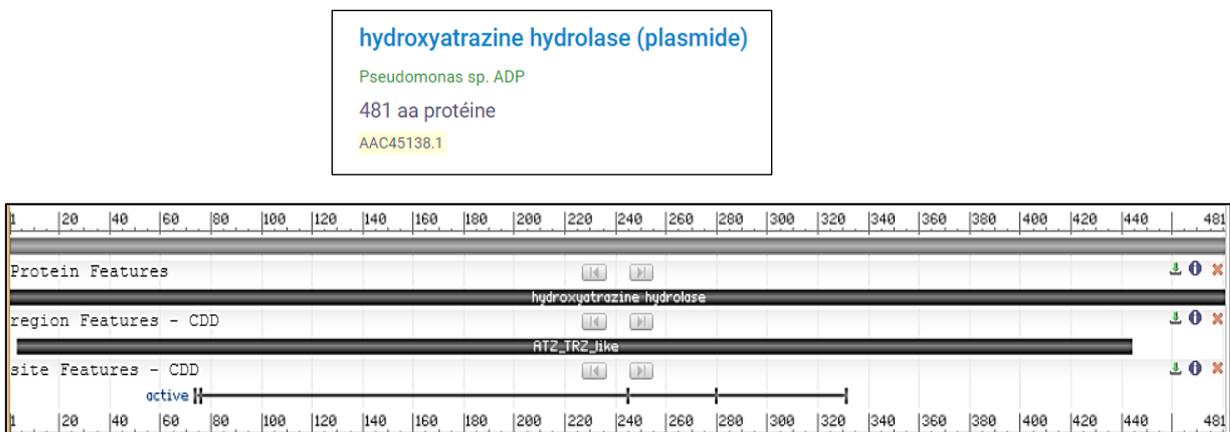


Figure 22.B. Partie codante pour la protéine hydroxyatrazine hydrolase du gène *atzB*.

- ✓ Représentation graphique de la partie codante pour la protéine N-isopropyle-ammelide isopropylamino hydrolase localisée entre 8 et 395aa.





Figure 22.C. Partie codante pour la protéine N-isopropyle-ammelide isopropylamino hydrolase du gène *atzC*.

- ✓ Représentation graphique de la partie codante pour la protéine amidohydrolase d'acide cyanurique localisée entre 4 et 363aa.

amidohydrolase d'acide cyanurique (plasmide)

Pseudomonas sp. ADP
363 aa protéine
AAK50331.1

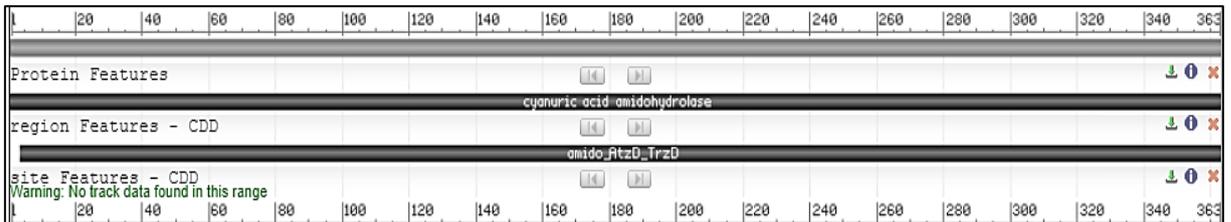


Figure 22.D. Partie codante pour la protéine amidohydrolase d'acide cyanurique du gène *atzD*.

- ✓ Représentation graphique de la partie codante pour la protéine biuret hydrolase localisée entre 2 et 455aa.

biuret hydrolase (plasmide)

Pseudomonas sp. ADP
457 aa protéine
AAK50332.1

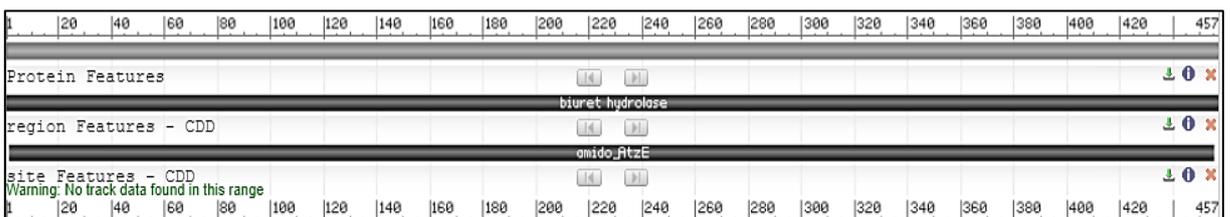
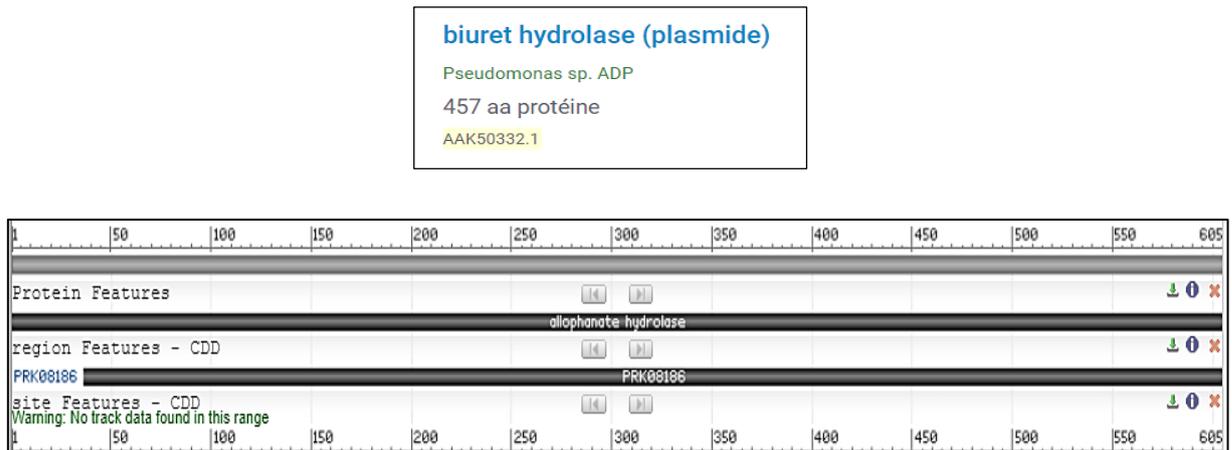


Figure 22.E. Partie codante pour la protéine biuret hydrolase du gène *atzE*.

- ✓ Représentation graphique de la partie codante pour la protéine allophanate hydrolase localisée entre 37 et 605aa.



2.2. Prédiction de Structure

Après les recherches fait sur les banques de protéines PDB et UniProt, nous avons pu obtenir les structures 3D de nos protéines (Figure 23 : A, B, C, D, E, F).

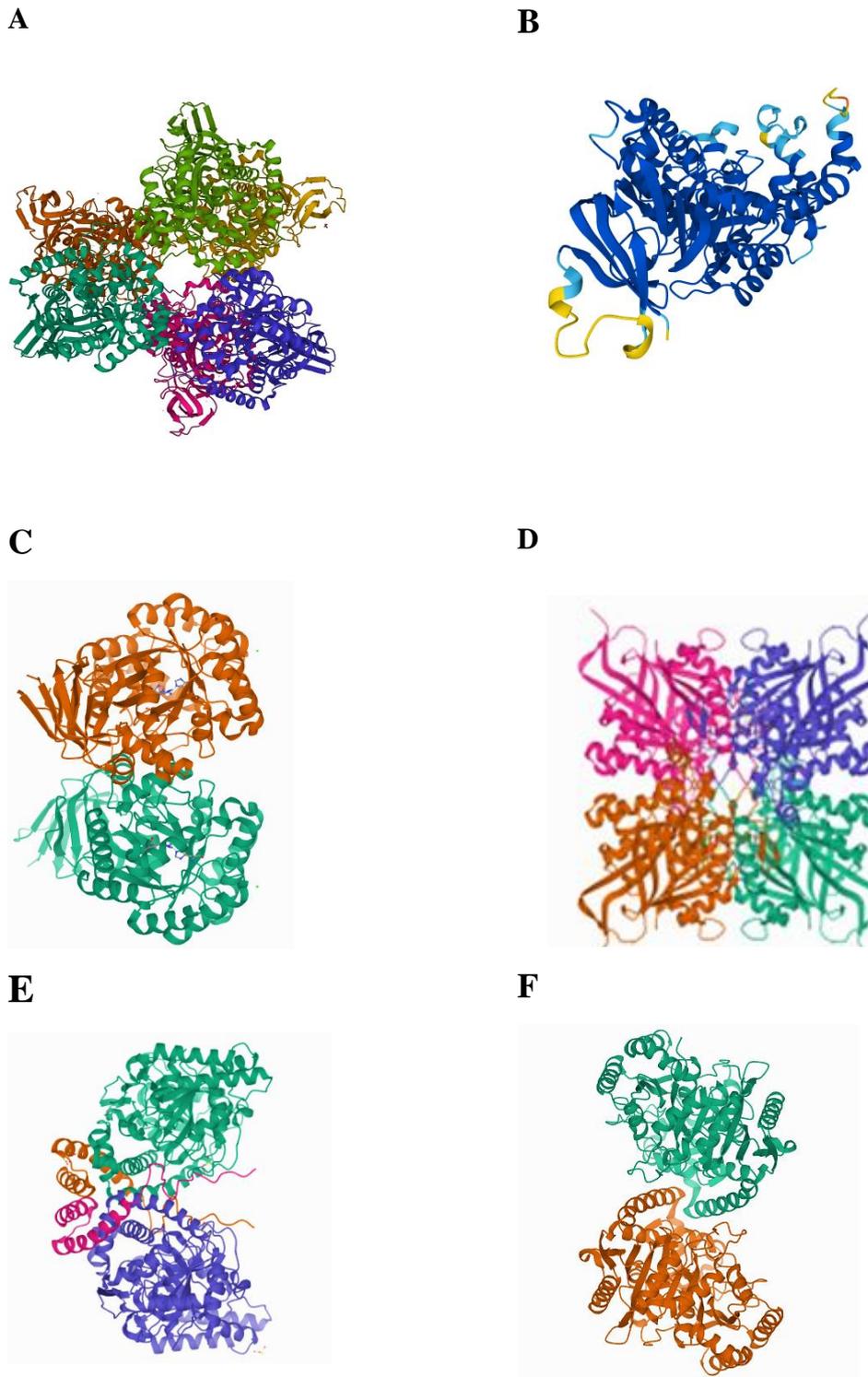


Figure 23. Structure 3D des protéines codés par les gènes *atz* prise à partir de PDP et UniProt.

(A) Atrazine chlorohydrolase codée par le gène *atzA* , (B) hydroxyatrazine hydrolase codée par le gène *atzB* , (C) N-isopropyle-ammelide isopropylamino hydrolase codée par le gène *atzC* , (D) protéine amidohydrolase d'acide cyanurique codée par le gène *atzD* , (E) biuret hydrolase codée par le gène *atzE* , (F) allophanate hydrolase codée par le gène *atzF*.

2.3. Résultats de BLAST :

Après nos recherches fait sur BLASTp, nous avons pu obtenir des listes de séquences protéiques présentent des pourcentages d'identité variables avec nos protéines.

✓ La protéine atrazine Chlorohydrolase du gène *atzA*

L'ensemble des séquences protéiques obtenues, présentent un pourcentage d'identité varie entre 97.54% à 99.37% (Annexe 1-A), on cite notamment :

- Les protéines atrazine chlorohydrolase de *Artheobacter* sp. AD1 et SmzA de *Herbaspirillum* sp. B601, présentent un pourcentage d'identité de 99.16% avec notre protéine.

✓ La protéine hydroxyatrazine hydrolase du gène *atzB*

L'ensemble des séquences protéiques obtenues, présentent un pourcentage d'identité varie entre 55.48% à 100% (Annexe 1-B), parmi lesquelles :

- La protéine hydroxyatrazine hydrolase de *Arthrobacter* sp. AD26 est identique à 100% avec notre protéine, et celle de *Herbaspirillum* sp. B601, représente un pourcentage d'identité de 99.58%.

✓ La protéine N-isopropyle-ammelide isopropylamino hydrolase du gène *atzC*

L'ensemble des séquences protéiques obtenues, présentent un pourcentage d'identité varie entre 56.52% à 99.52% (Annexe 1-C), on cite :

- La séquence protéique *AtzC* de *Shewanella* sp. YJY4 présente un taux d'identité de 99.52%, alors que, des différentes souches de *Pseudomonas* sp. ADP présentent des pourcentages d'identité entre 99.26% et 99.50% avec notre protéine.

✓ La protéine amidohydrolase d'acide cyanurique du gène *atzD*

L'ensemble des séquences protéiques obtenues, présentent un pourcentage d'identité varie entre 60.46% à 99.73% (Annexe 1-D), on cite :

- La protéine amidohydrolase d'acide cyanurique de *Pseudomonas aeruginosa* et d'*Arthrobacter* sp. AD25, présentent respectivement des pourcentages d'identités de 99.70% et 99.45% avec notre protéine.

✓ La protéine biuret hydrolase du gène *atzE*

L'ensemble des séquences protéiques obtenues, présentent un pourcentage d'identité varie entre 71.03% à 100% (Annexe 1-E), on cite :

- La protéine Amidohydrolase de la famille *atzE* d'une *Pseudomonas* non classée, qui est identique à 100% avec notre protéine.

✓ **La protéine allophanate hydrolase du gène *atzF***

L'ensemble des séquences protéiques obtenues, présentent un pourcentage d'identité varie entre 71.03% à 100% (Annexe 1-F), parmi lesquelles :

- La protéine allophanate hydrolase d'une **Pseudomonas** non classée, représente un pourcentage d'identité de 100% avec notre protéine.

2.4. Arbres phylogénétiques :

Grâce à la plateforme NCBI et le logiciel BLASTp, nous avons pu construire les arbres phylogénétiques des six protéines de notre étude, avec la méthode Neighbor Joining (NJ) (Figure 24: A, B, C, D, E, F).

A travers ces résultats, on propose des hypothèses qui nous rapproche à la réalité, afin de comprendre les différents mécanismes évolutifs de nos séquences protéiques.

- ✓ Selon Seffernick *et al.* (2001), L'apparition du gène *atzA*, peut être le résultat d'une évolution par accumulation de mutations dans la séquence du gène *triA* (codant pour la mélamine désaminase) ayant abouti à la formation de l'atrazine chlorohydrolase sélectionnée en réponse à la pression de sélection résultant de l'utilisation généralisée d'atrazine. Seuls 9 acides aminés divergent entre ces deux enzymes. De plus, Si les bactéries à Gram-négatifs synthétisent un atrazine chlorohydrolase codée par le gène *atzA*, les bactéries à Gram-positifs seront à même capable d'hydrolyser l'atrazine à l'aide d'une chlorohydrolase codée par le gène *trzN* (Shapir *et al.*, 2007). D'après les résultats obtenus il existe au moins 22 organismes partagent les mêmes informations génétiques que le gène *atzA* de notre étude (Figure 24. A).

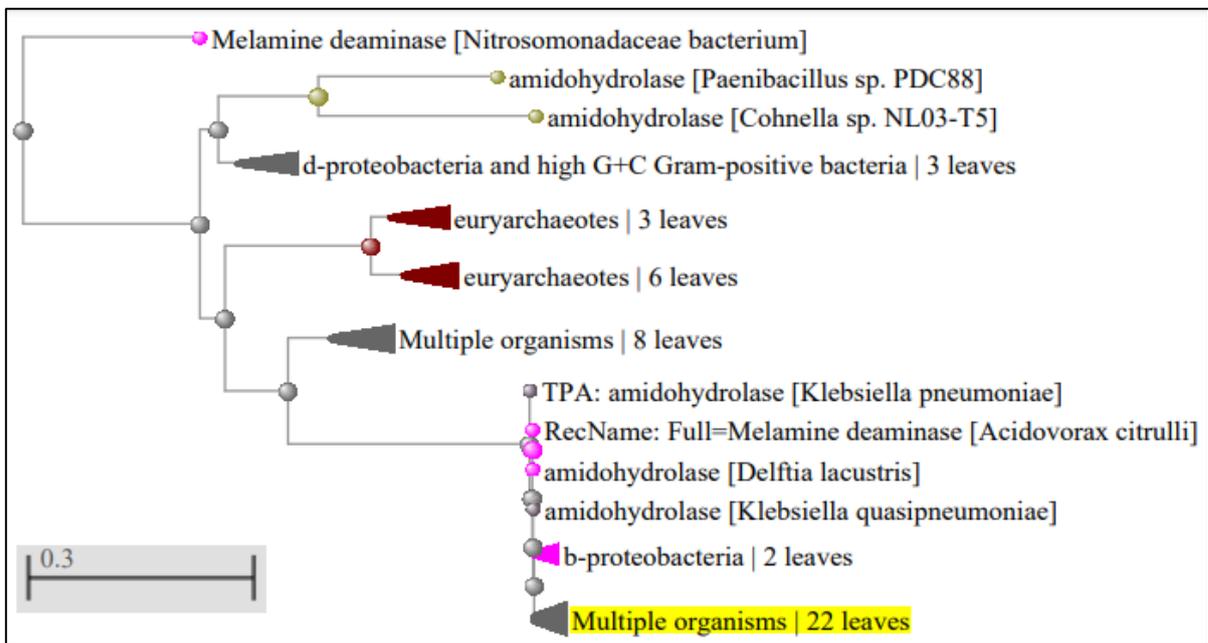


Figure 24.A. Arbre phylogénétique de la protéine atrazine chlorohydrolase (*atzA*).

- ✓ Contrairement à *atzA*, *atzB* est répartie aussi bien chez les bactéries à Gram-positifs que chez les bactéries à Gram-négatifs (Figure 24.B), des études menées sur l'évolution des concentrations des différents métabolites de la minéralisation de l'atrazine ont montré une accumulation transitoire d'hydroxyatrazine, laissant présager le caractère limitant de la transformation de l'hydroxyatrazine catalysée par *atzB* (Mandelbaum *et al.*, 1995). Cette hypothèse a aussi été émise par Devers *et al.* (2008), à l'issue d'une expérience d'écologie évolutive rapportant le gain de fitness d'une souche nouvellement évoluée en raison de la duplication du gène *atzB* levant le caractère limitant de la transformation de l'hydroxyatrazine.

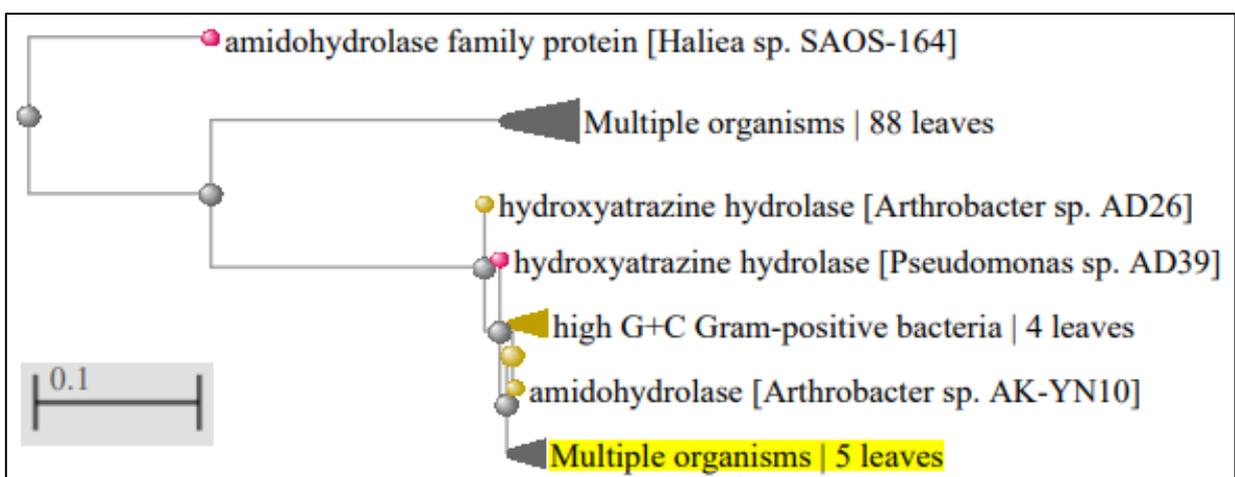


Figure 24.B. Arbre phylogénétique de la protéine hydroxyatrazine hydrolase (*atzB*).

- ✓ *atzC* appartient à la même super-famille qu'*atzA* et *atzB* (Figure 24.C.). *atzC* est situé à environ 34 et 25 kb de l'*atzA* et de l'*atzB*, respectivement. L'analyse de la séquence a confirmé que la teneur en G+C de *atzC* (44 %) était inférieure à celle de l'*atzA* (58 %) et *atzB* (61%) et la plupart des autres gènes présents dans le pADP-1 séquence. Ce résultat suggère que le gène *atzC* a été acquis à partir d'un organisme avec un contenu en G+C très différent (Sadowsky *et al.* 1998).

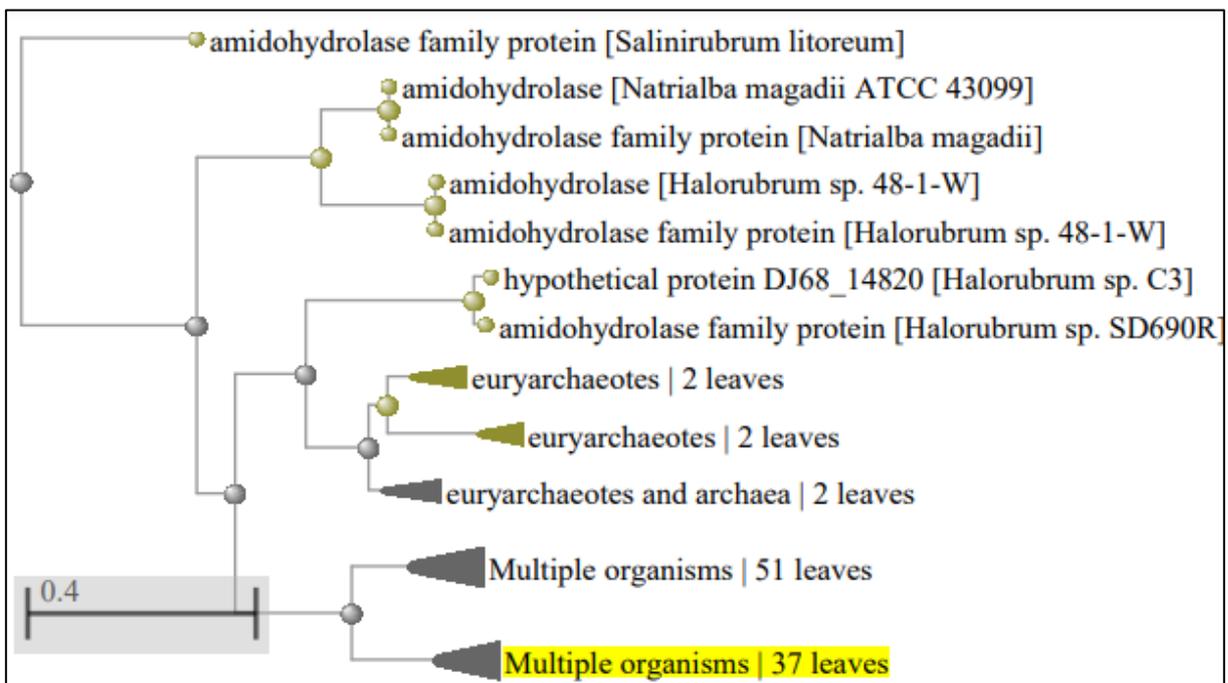


Figure 24.C. Arbre phylogénétique de la protéine N-isopropyle-ammelide isopropylamino hydrolase (*atzC*).

- ✓ *atzD* partage la fonctionnalité d'ouverture de l'hétérocycle avec *trzD* de *Pseudomonas* sp. NRRLB-12227 et *Klebsiella pneumoniae*, un autre enzyme catalysant l'hydrolyse de l'acide cyanurique. Bien que ces deux enzymes catalysent la même réaction, elles ne partagent que 56% d'identité. Comme évoqué précédemment pour *trzN* et *atzA*, pour lesquels une observation similaire a été réalisée, il est probable que ces deux enzymes dérivent d'ancêtres divergents (Fruchey *et al.*, 2003). D'autre part, *atzD* appartenant à la super-famille des amidohydrolases, mais il ne présente qu'une faible identité avec *atzA*, *B* et *C* laissant présager un temps de coalescence plus élevé depuis l'ancêtre commun (Wackett, 2004). L'arbre phylogénétique obtenue dans notre étude, présente un ensemble

de 93 organismes qui partagent le même contenu génétique que le gène *atzD* (Figure 24.D).

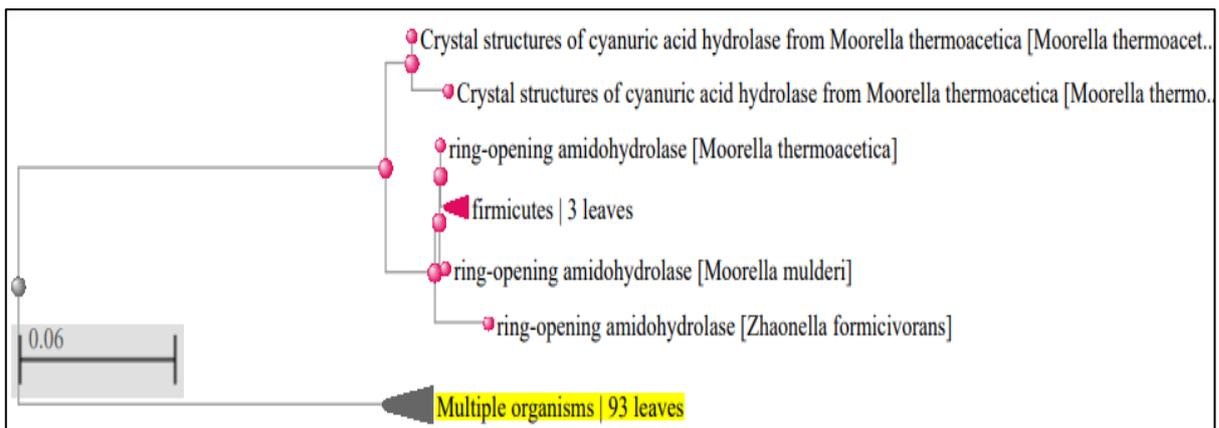


Figure 24.D. Arbre phylogénétique de la protéine amidohydrolase d'acide cyanurique (*atzD*).

- ✓ Selon l'arbre phylogénétique obtenue, le gène *atzE* fait partie de la superfamille des amidohydrolases, et présent des similarités avec le gène *atzE* de *Pseudomonas* sp. et *Pseudomonas aeruginosa* dont il est supposé qu'ils ont divergé d'un ancêtre commun, de plus environ 50 organismes partagent le même contenu génétiques de ce gène (Figure 24.E).

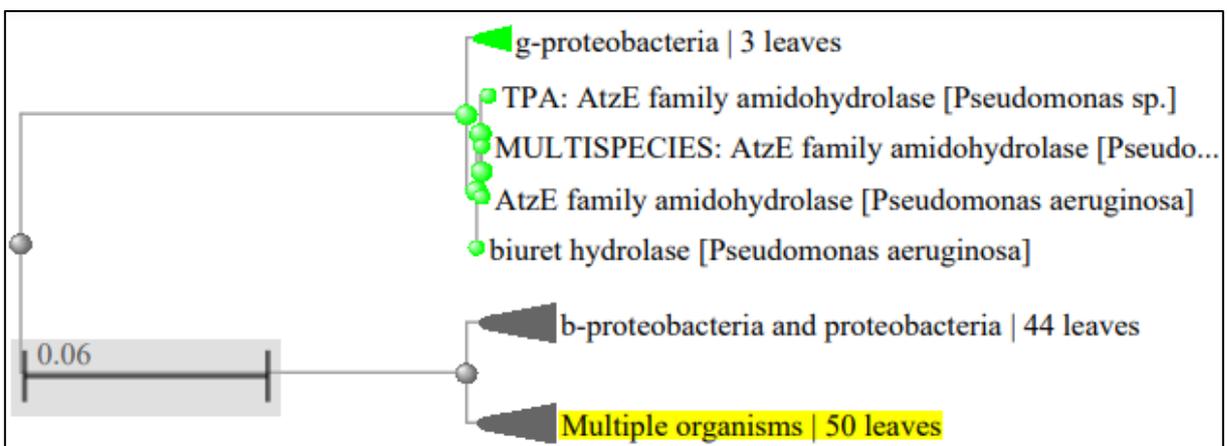


Figure 24.E. Arbre phylogénétique de la protéine biuret hydrolase (*atzE*).

- ✓ *atzF* appartient à la super-famille des amidohydrolases et plus particulièrement à la famille des amidases catalysant l'hydrolyse des amides (Patricelli et Cravatt, 2000). Selon les résultats obtenues, *atzF* est présent chez 28 organismes partagent des données similaires (Figure 24.F).

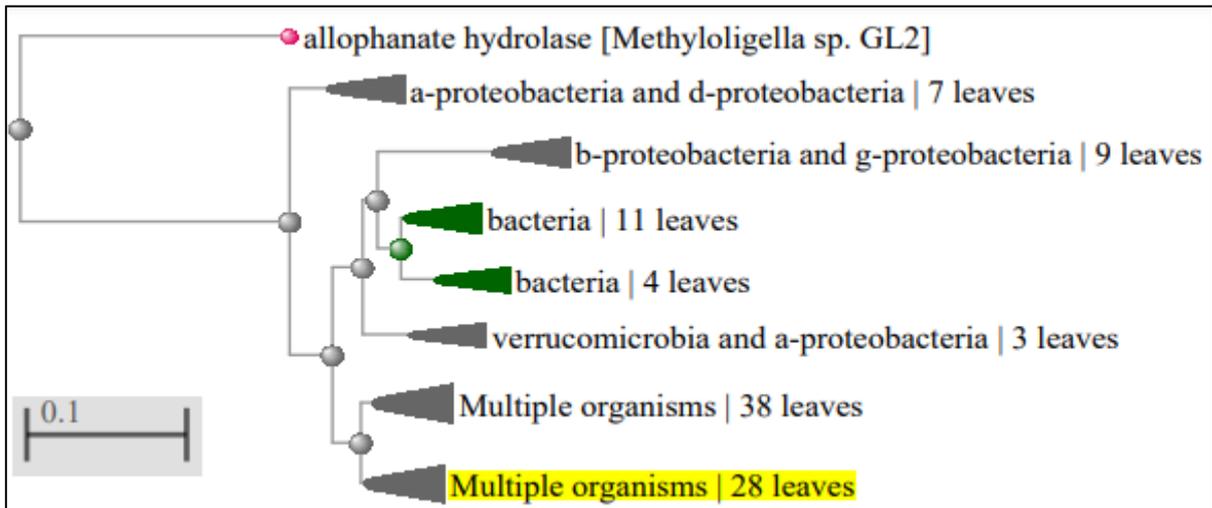


Figure 24.F. Arbre phylogénétique de la protéine allophanate hydrolase (*atzF*).

Comme décrit dans la partie bibliographique, la région catabolique de pADP-1 entre les opérons *tra* et *trb* (situé entre 24.062kb à 76.280kb) contient les gènes *atzABC* responsables à la voie haute. La présence des séquences d'insertion (*IS1071* et *ISPps1*) dans la séquence du plasmide pADP1, flanquants les gènes *atzA* et *atzB* et suggère leur implication dans la construction de ce plasmide catabolique par le recrutement de gènes par des recombinaisons homologues. Par ailleurs, les gènes *atzDEF* de la voie basse sont organisés sous forme d'un pseudo-opéron placé sous la régulation transcriptionnelle d'un facteur de transcription de type *lysR* codé par le gène *atzR* (Changey, 2011). *atzA* et *atzB* avaient été transposés du plasmide pADP1 vers le chromosome bactérien de *Variovorax* sp. MD1 par une transposition conservative relayée par l'*IS1071* (Devers *et al.*, 2007).

Les gènes *atzABC* ont été aussi trouvés localiser dans des plasmides de tailles différentes dans micro-organismes phylogénétiquement divers. De plus, des variantes de *Pseudomonas* sp. souche ADP ont été identifiés qu'ils contiennent *atzB* et *atzC* mais pas le gène *atzA*, certaines bactéries de type sauvage ne contiennent que le gène *atzA*, et des bactéries individuelles d'un consortium métabolisant l'atrazine contiennent chacun un ensemble incomplet des gènes de catabolisme d'atrazine (Martinez *et al.*, 2001).

Pour étudier la stabilité des gènes *atz*, une manipulation d'évolution expérimentale menée sur *Pseudomonas* sp. ADP avait montré que la pression de sélection exercée par l'atrazine avait conduit à l'émergence d'une population nouvellement évoluée présentant une aptitude à dégrader l'atrazine (Devers *et al.* 2008).

Devers *et al.* (2008) en soumettant une population de *Pseudomonas* sp. T34 à une pression de sélection d'atrazine élevée (milieu minéral additionné de 100 mg L⁻¹ d'atrazine comme seule source d'azote) Cette souche possède le plasmide pADP1 contenant les gènes *atzABCDEF* codant les enzymes responsables de la minéralisation de l'atrazine, contenant une duplication en tandem du gène *atzB* sur le plasmide. A la fin de cette expérience, Devers *et al.* (2008), ont obtenu comme résultat une population nouvellement évoluée. Cette population est caractérisée par la disparition du plasmide pADP1 et son insertion complète sur le chromosome bactérien.

Après ces résultats, Changey *et al.*, (2011) ont fait une expérience similaire qui consiste à soumettre une population bactérienne à une pression de sélection constante de l'acide cyanurique. Son utilisation comme seule source d'azote au cours de l'expérimentation d'évolution *in vitro* a causé une famine prolongée des premières étapes de la voie (voie haute). En conséquence de repiquage répété de *Pseudomonas* sp. ADP sur milieu acide cyanurique, une population nouvellement évoluée et plus compétitive en croissance sur milieu acide cyanurique a été retenue.

Une comparaison génétique des populations initiales et nouvellement évoluées a révélé qu'une région de 47 kb de pADP-1 contenant les gènes *atzABC* a été supprimé dans la population nouvellement évoluée (Figure 25), en raison de la pression de sélection de l'acide cyanurique. L'événement de délétion a ensuite été caractérisé en amplifiant la région formée entre les gènes *traC* et le *trbN* du plasmide pADP-1. L'analyse de la séquence a révélé que l'événement de suppression résultait d'une recombinaison homologue qui s'est produite entre des Séquences de 110 pb trouvées dans l'ISPPs1 côté du *traC* et dans une séquence de type *pdhL* du côté *trbN* (Changey *et al.*, 2011).

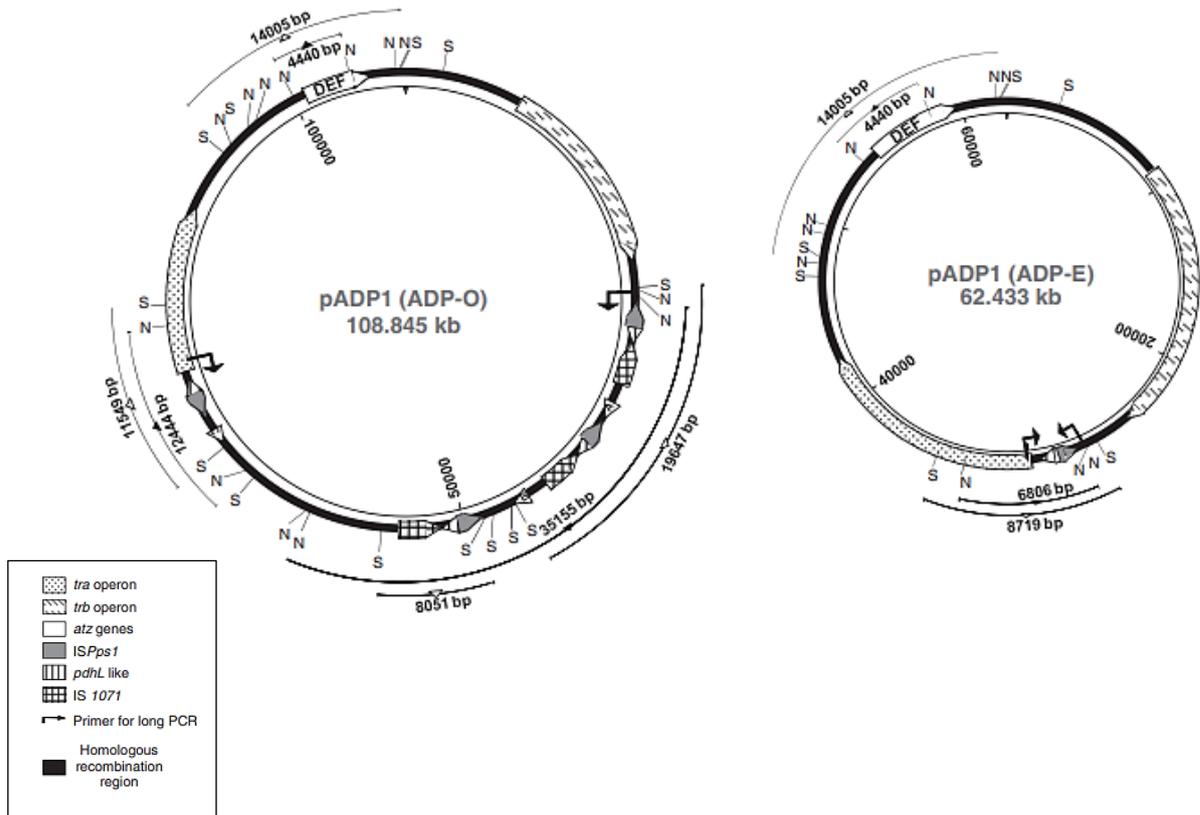


Figure 25. Carte physique circulaire du plasmide catabolique pADP-1 de la population originale (ADP-O) et la nouvellement évoluée (ADP-E) (Changey *et al.*, 2011).

Conclusion

Notre travail a permis de réaliser une recherche de gènes de biodégradation des xénobiotiques chez les bactéries. Les gènes *atz* de catabolisme de l'atrazine chez *Pseudomonas* sp. ADP ont été sélectionnées par la suite comme modèle d'étude des différents mécanismes de variation génétique pouvant se dérouler lors de l'adaptation bactérienne aux nouvelles conditions environnementales.

Les résultats obtenus ont montré que les gènes *atz* sont localisés au niveau du plasmide conjugatif pADP-1. Divisés en deux parties selon les voies catabolique de l'atrazine, les gènes *atzA*, *atzB*, *atzC* sont responsables à la voie haute et transforment l'atrazine en acide cyanurique. Ils sont trouvés disperser dans le plasmide pADP-1 et entourés par des éléments transposables (*IS1071* et *ISPps1*). Tandis que les gènes *atzD*, *atzE*, *atzF* sont responsables à la voie basse. Ils catabolisent l'acide cyanurique en ammonium et dioxyde de carbone. Ce sont organisés sous forme d'un pseudo-opéron régulé transcriptionnellement par *atzR*, un régulateur transcriptionnel de type *lysR*.

De diverses bactéries sont trouvés partageant des pourcentages d'identité élevés avec les gènes de la voie haute y compris *Artheobacter* sp. AD1, *Herbaspirillum* sp. B601, *Shewanella* sp. YJY4. De plus, ces gènes sont trouvés localisés dans des plasmides de tailles différentes chez des microorganismes phylogénétiquement divers. Des expériences étudiant la stabilité des gènes *atz*, ont démontré que ces gènes peuvent être transférer et intégrer partiellement ou intégralement sur le chromosome bactérien (*Variovorax* sp. MD1, *Pseudomonas* sp. T34).

Ainsi, les gènes de la voie basse *atzDEF*, présentent des pourcentages d'identité importantes avec les bactéries *Pseudomonas aeruginosa*, *Arthrobacter* sp. AD25, plus des souches de *Pseudomonas* non classées. Il est supposé que ces gènes soient plus anciens que ceux de la voie haute (*atzABC*), en raison de la présence d'acide cyanurique ou de molécules analogues dans l'environnement. Cette hypothèse est en conformité avec l'organisation en opéron régulé par un facteur de transcription caractéristique de fonction fixée dans le fond génétique des souches microbiennes.

La délétion de régions génomiques peut se produire par recombinaison homologue consécutive à une insertion d'éléments transposables. Les événements de délétions constituent également des facteurs importants dans l'aspect évolutif des génomes procaryotiques contribuant à leur rétractation. Les phénomènes de délétions expliquent pourquoi les génomes

Conclusion

microbiens ne sont pas en constante expansion comme pourrait le laisser présager la seule activité des transposons réplicatifs.

Les résultats finals ont indiqué que les gènes *atz* codant les enzymes de dégradation de l'atrazine ne présentent pas un polymorphisme important. L'hypothèse communément admise pour expliquer cette observation est qu'en raison de leur recrutement récent (20 ans tout au plus) au sein de la voie catabolique *atz*, ces gènes n'ont pas encore eu le temps de diverger. Malgré une similarité de 99% partagée par *triA* et *atzA*, les enzymes codées présentent des spécificités de substrat tout à fait différentes.

Les populations dégradant l'atrazine présentaient une extraordinaire plasticité génétique. Ainsi que le transfert horizontal de gènes (HGT) par conjugaison bactérienne permet l'échange de plasmides cataboliques pADP-1, tandis que la mobilisation des gènes de dégradation par des éléments d'insertion permet de diversifier leur localisation génomique. L'importance écologique de ces deux processus contribue à disperser la fonction de dégradation au sein des différentes communautés microbiennes.

Prises ensemble, ces données suggèrent que les gènes cataboliques de l'atrazine peuvent être acquis ou perdus indépendamment, et que le transfert direct de plasmide n'est peut-être pas le seul mécanisme par lequel les gènes de dégradation de l'atrazine sont disséminés dans l'environnement.

Les xénobiotiques restent des polluants potentiels persistants, et la bioremédiation accompagnée avec les approches moléculaires et bio-informatiques est considérée comme la meilleure méthode pour éliminer ces composés. Ainsi que l'élimination de l'atrazine par *Pseudomonas* sp. ADP nécessite une pression de sélection exercée, pour garantir un bon fonctionnement des gènes *atz*, et par la suite une dégradation totale de la molécule xénobiotique.

Références Bibliographiques

- Adams, G.O., Tawari-Fufeyin, P. Igelenyah, E. (2014). Bioremediation of spent oil contaminated soils using poultry litter. *Research Journal in Engineering and Applied Sciences*3(2) 124- 130
- AFSSA. Dossier sur les eaux embouteillées .consulté sur : <https://www.anses.fr/fr/content/eaux-conditionn>
- Anzai Y., Kim H., Park J-Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol*, 50, 1563-1589.
- Arora, PK (2020). Dégradation médiée par les bacilles des composés xénobiotiques et des métaux lourds. *Devant. Bioeng. Biotechnologies*. 8:570307.
- Azubuiké C. C., Chikere C. B., Okpokwasili G. C. (2016). Bioremediation techniques-classification based on site of application: principle, advantages, limitations, and prospects. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 180–180.
- Bertotto LB, Catron TR, Tal T. (2020). Exploration des interactions entre xénobiotiques, microbiote et neurotoxicité chez le poisson zèbre. *Neuro. Toxicol.* 76, 235–244.
- Bharadwaj, A. (2018). « Bioremédiation des xénobiotiques : une approche de nettoyage respectueuse de l'environnement », dans *Green Chemistry in Environmental Sustainability and Chemical Education*, eds VS Parmar, P. Malhotra et D. Mathur (Singapour : Springer Nature), 1–13.
- Bhatt P, Rene ER, Kumar AJ, Kumar AJ, Zhang W, Chen S (2020) Binding interaction of allethrin with esterase: bioremediation potential and mechanism. *Bioresour Technol* 315:13845
- Bhatt, P., Gangola, S., Bhandari, G., Zhang, W., Maithani, D., Mishra, S., et al. (2020). Nouvelles connaissances sur la dégradation des polluants synthétiques dans les environnements contaminés. *Chemosphere* 259 :128827.
- Boc, A. and Makarenkov, V. (2003), New efficient algorithm for detection of horizontal gene transfer events. *Lecture Notes in Bioinformatics*, G. Benson and R. Page (Eds.), 3rd Workshop on Algorithms in Bioinformatics, Springer-Verlag, pp. 190-201.
- BONOT S., (2010), Persistance et dissémination du plasmide pB10, vecteur de gènes de résistance aux antibiotiques, dans des biomasses issues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, UMR 7564 CNRS, Université Henri Poincaré, Nancy-Université.

Références Bibliographiques

- Bramley-Alves, J., et al., (2014). Phytoremediation of hydrocarbon contaminants in subantarctic soils: an effective management option. *J. Environ. Manage.* 142, 60–69.
- Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. & Garrity, G.M. (2005), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume two The Proteobacteria*, 2ème édition, Springer-Verlag
- Brown J.R., Douady C.J., Italia M.J., Marshall W.E. and Stanhope M.J. (2001), Universal trees based on large, combined protein sequence data sets. *Nat Genet.* 28(3):281-285.
- C. Lizeaux, D. Baude. Bordas. (2012) « Sciences de la Vie et de la Terre, TS, enseignement spécifique ». Programme, p. 42-43
- Centre Léon-Bérard, Bisphénol A, cancer environnement, 2019. Consulté sur : <https://www.cancer-environnement.fr/231-bisphenol-a.ce.aspx>
- Chang I., Kim S., (2005), Wastewater treatment using membrane filtration—effect of biosolids concentration on cake resistance, *Process Biochemistry* 40 1307-1314.
- Cheverier E., (2013) : la phytoremediation, une solution d'avenir pour la Quebec. Memoire en vue de l'obtention du grade de maitre de l'environnement (M.Env), universitaire IHERBOOKE.P15-22
- D. Downey, R. Miller, & T. Dragoo, Parsons Denver, (2004). *Procedures for Conducting Bioventing Pilot Tests and Long-Term Monitoring of Bioventing Systems*, CO. NTIS: ADA423587, 80 pages
- D. Mohan, K.P. Singh, (2002), Single-and multi-component adsorption of cadmium and zinc using activated carbon derived from bagasse—an agricultural waste, *Water Res.* 36 2304–2318.
- Dale J. W. and Park S. F. (2010). *Molecular Genetics of Bacteria*. 5th edition. A John Wiley & Sons, Ltd., Publication.
- Dame, R. T., Rashid, F.-Z. M., & Grainger, D. C. (2019). Chromosome organization in bacteria: mechanistic insights into genome structure and function. *Nature Reviews Genetics*.
- Damstra, T., Page, S.W., Herrman, J.L., Meredith, T., (2002). Persistent organic pollutants: potential health effects? *J. Epidemiol. Community Health* 56 (11), 824–825.
- Datta, S., Mahapatra, N., Halder, M., (2013). pH-insensitive electrostatic interaction of carmoisine with two serum proteins: a possible caution on its uses in food and pharmaceutical industry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 124, 50–62.

Références Bibliographiques

- Dattaa, Sh., Singhc, d,e,l S., Kumarf, V., Singh, D. D., Sidhuc K. Gurpreet., Sadaf A.D., S.Kumard,e,g , Singhh J., Singhc J., (2020). Endophytic bacteria in xenobiotic degradation, *Microbial Endophytes: Prospects for Sustainable Agriculture*.
- Delegan, YA, Valentovich, LN, Shafieva, SM, Ganbarov, KG, Filonov, AE et Vainstein, MB (2019). Caractérisation et analyse du génome de la bactérie hautement efficace thermotolérante *Gordonia* sp. 1D. *Folia Microbiol.* 64, 41–48.
- Devers, M., Rouard, N. and Martin-Laurent, F. (2008), Fitness drift of an atrazine-degrading population under atrazine selection pressure. *Environmental Microbiology* 10 676-684.
- Devers, M., Rouard, N. and Martin-Laurent, F. (2007), Genetic rearrangement of the atzAB atrazinedegrading gene cassette from pADP1:Tn5 to the chromosome of *Variovorax* sp. MD1 and MD2. *Gene* 392 1-6.
- Dhankhar R. and Hooda A. (2000), Fungal biosorption an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aque Knox E.G., Childhood cancers, birthplaces, incinerators, and landfill sites *International Journal of Epidemiology* 29 391-397.ous solutions: A review. *Environmental Technology* 32A (5-6) (2011) 467-491.
- Diene, S., M., Bertelli, C., Pillonel, T., Schrenzel, J., Greub, G., (2014), Génomique et métagénomique bactériennes : applications cliniques et importance médicale, *Rev Med Suisse*, /450 (Vol.0), p. 2155-2161.
- Dobrzanski, Z., Buszewski, B., Opalinski, S. , Kołacz, R. , Koziel, J.A. , (2017). Xenobiotics, toxic compounds, mutagens and carcinogens substances. Classification and regulatory challenges. *Ksenobiotyki, substancje toksyczne, mutagenne i kancerogenne. Klasyfikacja i aspekty prawne. PrzemysłChemiczny* 96 (1), 76 .
- Doolittle W.F. (1999) Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*. 284(5423):2124-2129. Review.
- Dubey K. K., Kumar P., Singh P. K., Shukla P., (2014). Exploring Prospects of Monooxygenase-Based Biocatalysts in Xenobiotics. *Micro- bial biodegradation and bioremediation* (pp. 577-614).
- EFSA, janvier (2015), Avis scientifique vulgarisé sur le bisphénol A - La sécurité du BPA expliquée. Consulté sur : <https://www.cancer-environnement.fr>
- En ligneIovdijova A., Bencko V. (2010). Risque d'exposition à des résidus xénobiotiques sélectionnés et leur devenir dans la chaîne alimentaire - partie I : classification des xénobiotiques. *Annl. Agric. Environ. Méd.* 17, 183–192.

Références Bibliographiques

- Esquirol, Lygie (2020). [Avancées en physiologie microbienne] // *Catabolisme bactérien des herbicides à base de s-triazine : biochimie, évolution et application*.
- F. Changey, M. Devers-Lamrani, N. Rouard, F. Martin-Laurent, (2011), In vitro evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure: Evidence for the selective loss of a 47 kb region on the plasmid ADP1 containing the atzA, B and C genes, *Gene*
- F.Changey, (2011) Etude de l'évolution du potentiel génétique de populations bactériennes dégradant l'atrazine. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, Français.
- Ferdows, M.S., Serwer, P., Griess, G.A, Norris, S.I, and Barbour, AG. (1996) Conversion of a linear to a circular plasmid in the relapsing fever agent *Borrelia hermsii*. *J Bacteriol* 178 : 793-800.
- Ferrer M., Martínez-Abarca F., Golyshin P.N. (2005), Mining genomes and 'metagenomes' for novel catalysts. *Curr Opin Biotechnol*. Dec;16(6):588-93.
- Freney J, Renaud F, Leclercq R et Riegel P. (2007) *Bactériologie clinique*. 2ème édition, Editions ESKA.
- Fruchey, I., Shapir, N., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P. (2003). On the Origins of Cyanuric Acid Hydrolase: Purification, Substrates, and Prevalence of AtzD from *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 3653-3657.
- García-González, V., Govantes, F., Hervás, A., Canosa, I., Porrúa, O., Santero, E. (2007). RÉGULATION DE LA VOIE DE DÉGRADATION DE L'ATRAZINE DANS *Pseudomonas*. Dans : Heipieper, HJ (eds) *Biorestauration des sols contaminés par des composés aromatiques*. Série scientifique de l'OTAN, vol. 76.
- Gaspar, A., et al., (2012). Characterization of saturates, aromatics, resins, and asphaltenes heavy crude oil fractions by atmospheric pressure laser ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels* 26 (6), 3481–3487.
- George C. diCenzo, Turlough M. Finan. (2017) sept. *Microbiol Mol Biol Rev* ; 81(3) : e00019-17. Publié en ligne le 9 août 2017.
- Gilliespie I. M. M., Philp J. C. (2013). Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy. *Trends Biotechnol.* 31, 329–332.
- Gontier M., (2018), Propagation des bactériophages, consulter sur : <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/microbiologie/virologie/les-bacteriophages-de-leur-decouverte-a-leurs-utilisations>
- Gren, I., (2012). Microbial transformation of xenobiotics. *Chemik* 66 (8), 835–842.

Références Bibliographiques

- Harrison PW, Lower RPJ, Kim NKD, Young JPW. 2010. Présentation du « chromide » bactérien: pas un chromosome, pas un plasmide . *Trends Microbiol* **18** :141–148.
- Huang, J.-C. and Shang C. Air Stripping. (2006) *Advanced Physicochemical Treatment Processes*. L. Wang, Y.-T. Hung and N. Shammas, Humana Press. 4 47-79.
- Husnik, F., et McCutcheon, JP (2018). Transfert de gènes horizontal fonctionnel des bactéries aux eucaryotes. *Nat. Rév. Microbiol.* 16, 67–79
- Jaiswal, S., et Shukla, P. (2020). Stratégies alternatives pour la remédiation microbienne des polluants via la biologie synthétique. *Devant. Microbiol* .
- Keri RA, Ho SM, Hunt PA, Knudsen KE et al. (2007), An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*. ; 24 :240-252.
- Kucherenko, S.V., Ovcharenko, A.M., Pushenko, S.L., (2021). Xenobiotics: A Threat to the Health of Living Organisms. *E3S Web of Conferences* 285, 03006.
- Kumar, M., Prasad, R., Goyal, P., Teotia, P., Tuteja, N., Varma, A., Kumar, V., (2017). Environmental biodegradation of xenobiotics: role of potential microflora. *Xenobiotics in the Soil Environment* 319–334
- Kus, E., Eroglu, H.E., (2015). Genotoxic and cytotoxic effects of sunset yellow and brilliant blue, colorant food additives, on human blood lymphocytes. *Pak. J. Pharm. Sci.* 28(1).
- Lauren Arpin-Pont. (2015), *Les produits pharmaceutiques et de soin personnel en milieu marin : prédiction des concentrations environnementales et étude des effets sur le métabolisme endogène d’organismes exposés*. Hydrologie. Université Montpellier, 2015. Français. ffNNT : MONTS172ff.
- Loganathan, B.G., Masunaga, S., (2015). PCBs, dioxins and furans: human exposure and health effects. In: *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, second ed, pp. 239–247.
- M. de Oliveira, B.E.F. Frihling, J. Velasques et al., (2020), *Pharmaceuticals residues and xenobiotics contaminants: Occurrence, analytical techniques and sustainable alternatives for wastewater treatment*, *Science of the Total Environment*
- Mandelbaum, R.T., Allan, D.L. and Wackett, L.P. (1995), *Isolation and Characterization of a Pseudomonas sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 1451-1457.
- Mao, X., Trembley, J., Yu, K., Tringe, SG et Alvarez-Cohen, L. (2019). Dynamique structurale et analyse transcriptomique de *Dehalococcoides mccartyi* au sein d'une communauté déchlorant le TCE en flux complètement mélangé. *Eau Rés.* 158, 146–156

Références Bibliographiques

- Mathew B.B., Singh H., Biju V.G., Krishnamurthy N.B. (2017), Classification, source et effet des polluants environnementaux et leur biodégradation. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* ;36(1):55-71
- Maurya PK (2016). Bioaccumulation de composés xénobiotiques de pesticides dans le système fluvial et sa technique de contrôle : une revue critique. *Sondage J. Ind. Contrôle* 32, 580–594
- Mishra S, Lin Z, Pang S, Zhang W, Bhatt P, Chen S. (2021) Feb, Recent Advanced Technologies for the Characterization of Xenobiotic-Degrading Microorganisms and Microbial Communities. *Front Bioeng Biotechnol*.
- Mishra VK, Singh G., Shukla R. (2019). Impact des xénobiotiques dans un scénario climatique changeant. *Clim. Changer Agri. Ecosys.* 2, 133–151
- Muniesa, M., Colomer-Lluch, M., Jofre, J., (2013). Potential impact of environmental bacteriophages in spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiol.* 8, 739e751.
- Muniesa, M., Imamovic, L., Jofre, J., (2011). Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments. *Microb. Biotechnol.* 4, 725e734.
- Namasivayam C. and Kavitha D. (2004), Removal of congo red from water by adsorption onto activated carbon coir pith, an agricultural solid waste. *Dyes and pigments* 54 47-58.
- Niehus, R., Mitri, S., Fletcher, A. *et al.* (2015), La migration et le transfert horizontal de gènes divisent les génomes microbiens en plusieurs niches. *Nat Commun* 6, 8924
- Nkongolo, KK et Kotha, RN (2020). Progrès dans la surveillance de la dynamique et de la fonction de la communauté microbienne du sol. *J. Appl. Genet.* 61, 249-263.
- Noman, E.A.; Al-Gheethi, A.A.S.; Talip, B.A.; Radin Mohamed, R.M.S.; Nagao, H.; Mohd Kassim, A.H. (2019), Xenobiotic Organic Compounds in Greywater and Environmental Health Impacts. In *Management of Greywater in Developing Countries*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland; Volume 87, pp. 89–108.
- Nzila, A., Ramirez, CO, Musa, MM, Sankara, S., Basheer, C. et Li, QX (2018). Biodégradation des pyrènes et analyse protéomique chez *Achromobacter xylosoxidans*, souche PY4. *Int. Biodétérioration. Biodégrad.* 175, 1294–1305
- Osteen, C.D., Fernandez-Cornejo, J., (2013). Economic and policy issues of US agricultural pesticide use trends. *Pest Manag. Sci.* 69 (9), 1001–1025.
- Palleroni NJ Genre I *Pseudomonas*. Dans : Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM, (2005), éditeurs. *Manuel de bactériologie systématique de Bergey*. 2e éd. Tome 2. Springer ; East Lansing, MI, États-Unis : pp. 323–379

Références Bibliographiques

- Pan, X., Qin, P., Liu, R., Wang, J., (2011). Characterizing the interaction between tartrazine and two serum albumins by a hybrid spectroscopic approach. *J. Agric. Food Chem.* 59 (12), 6650–6656.
- Paul D., Pandey G., Pandey J., Jain R. K. (2005). Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental pollutant restoration. *Trends Biotechnol.* 23, 135–142.
- Pedersen JA, Yeager MA, Suffer IH (2003). Composés organiques xénobiotiques dans les eaux de ruissellement des champs irrigués avec des eaux usées traitées. *J. Agric. Chimie alimentaire.* 51, 1360–1372.
- Perelo L. W. (2010). *In situ* and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J. Hazard. Mater.* 177, 81–89
- Portail de la science. Bisphénol A et reproduction : les experts plangent.
- Qing Li, Q., Loganath, A., Seng Chong, Y., Tan, J., Philip Obbard, J., (2006). Persistent organic pollutants and adverse health effects in humans. *J. Toxic. Environ. Health A* 69 (21), 1987–2005
- Ramachandran R, Jha J, Paulsson J, Chatteraj D. (2017). Initiation de la réplication aléatoire versus régulée par le cycle cellulaire chez les bactéries : aperçu de l'étude du chromosome 2 de *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 81 : e00033-16.
- Rancurel, C., Legrand, L. et Danchin, EG (2017). Aliennesness : détection rapide des transferts horizontaux de gènes candidats à travers l'arbre de vie. *Gènes* 8:248.
- Rodriguez, A., Castrejon-Godinez, M. L., Salazar-Bustamante, E., GamaMartinez, Y., Sanchez-Salinas, E., Mussali-Galante, P., et al. (2020). Omics approaches to pesticide biodegradation. *Curr. Microbiol.* 77, 545–563
- S. Colombano, A. Saada , V. Guerin , P. Bataillard , G. Bellenfant , S. Beranger , D. Hube , C. Blanc , C. Zornig et I. Cirardeau (2010). Quelles techniques pour quels traitements ? analyses couts- bénéfiques. BRGM/RP- 58609-FR.
- S.Dalhatou. (2014), Application des techniques d'oxydation avancée pour la dépollution des effluents organiques dans les eaux de rejets industriels : cas des savonneries. Autre. Université de Grenoble. Français.
- Sadowsky, M., Tong, Z., Souza, M.D. and Wackett, L. (1998): AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. *J Bacteriol* 180 152-8
- Sathishkumar, M., Binupriya, AR, Balk, S. et Yun, S. (2008). Biodégradation du pétrole brut par des souches bactériennes individuelles et un consortium bactérien mixte isolé de zones contaminées par des hydrocarbures. *Nettoyer* 36, 92–96

Références Bibliographiques

- Schéma de mécanisme de conjugaison : www.bioutils.ch/protocoles/22-la-conjugaison-bacterienne
- Schéma de structure d'ADN : <https://www.schoolmouv.fr/cours/cohesion-de-la-matiere/fiche-de-cours>
- Seffernick, J.L., de Souza, M.L., Sadowsky, M.J. and Wackett, L.P. (2001): Melamine Deaminase and Atrazine Chlorohydrolase: 98 Percent Identical but Functionally Different. *J. Bacteriol.* 183 2405-2410
- Shapir, N., Mongodin, E.F., Sadowsky, M.J., Daugherty, S.C., Nelson, K.E. and Wackett, L.P. (2007): Evolution of Catabolic Pathways: Genomic Insights into Microbial s-Triazine Metabolism. *J. Bacteriol.* 189 674-682.
- Shekhar, SK, Godheja, J. et Modi, DR (2020). "Technologies moléculaires pour l'évaluation de la bioremédiation et la caractérisation des communautés microbiennes des sites contaminés par des polluants" dans, *Bioremédiation des déchets industriels pour la sécurité environnementale*, eds. RN Bharagava et G. Saxena (Springer Nature, Singapour), 447–474.
- Simeonov, L.I., Macaev, F.Z., Simeonova, B.G. (Eds.), (2014). *Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe*. Springer.
- Singh, A., Chaudhary, S., Dubey, B. et Prasad, V. (2016). "Gestion microbienne des polluants xénobiotiques organiques dans les terres agricoles", dans *Plant Response to Xenobiotics*, eds A. Singh, SM Prasad et RP Singh (Singapour : Springer), 211–230.
- Speight, James G. (2020). *Natural Water Remediation. Remediation technologies*, 263–303
- Sunita, VJ, Dolly, PR, Bateja, S. et Vivek, ONU (2013). Isolement et dépistage des bactéries utilisant des hydrocarbures (HUB) à partir d'échantillons de pétrole. *Int. J. Curr. Appl. Sci.* 2, 48–60
- Tak Y., Kaur M., Tilgam J., Kaur H., Kumar R., Gautam Ch. (2022). Chapter 2 - Microbes Assisted Bioremediation: A Green Technology to Remediate Pollutants. In: Suyal D.Ch., and Soni R. (Ed.), *Bioremediation of Environmental Pollutant*, (pp 25-52): Springer Nature Switzerland AG 2022.
- Tausz J, Donath P. (1930) Über die Oxydation des Wasserstoffs und der Kohlenwasserstoffe Mittels Bakterien. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*;190: 141–68.
- Tellier, F., Steibel, J., Chabrier, R., Ble, F.X., Tubaldo, H., Rasata, R., Chambron, J., Duportail, G., Simon, H., Rodier, J.F., Poulet, P., (2012). Sentinel lymph nodes

Références Bibliographiques

- fluorescence detection and imaging using Patent Blue V bound to human serum albumin. *Biomed. Opt. Express* 3 (9), 2306–2316
- Timothy M. VOGEL, (2013). Environmental Microbial Genomics, Laboratoire Ampère, UMR CNRS 5005, École Centrale de Lyon, Université de Lyon, Ecully, France
 - Tournus C., (2016), Validation de l'identification des *Pseudomonas* sp. par spectrométrie de masse type MALDI-TOF via la caractérisation d'une collection de souches environnementales et cliniques, Université de Rouen, Paris.
 - Vojdani, A., Vojdani, C., (2015). Immune reactivity to food coloring. In: *Alternative Therapies*, p. 148.
 - o Volume 490, Issues 1–2, p18-25.
 - Wackett, L.P. (2004): Evolution of Enzymes for the Metabolism of New Chemical Inputs into the Environment. *Journal of Biological Chemistry* 279 41259-41262.
 - Wang, S., Li, S., Du, D., Wang, D., Yan, W., (2020). Conjugative transfer of Megaplasmids pND6e1 and pND6e2 enhancing naphthalene degradation in aqueous environment: characterization and bioaugmentation prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 104, 861e871
 - Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87(12):4576-9.
 - Woese, C. R., Olsen, G. J., Ibba, M. and Söll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthetases, the genetic code, and the evolutionary process. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(1):202-36.
 - Wolf, DC, Cryder, Z., Khoury, R., Carlan, C. et Gan, J. (2020). Bioremédiation des sols de champs de tir contaminés par les HAP à l'aide d'approches intégrées. *Sci. Environ.* 726:13844.
 - Yang, J., Feng, Y., Zhan, H., Liu, J., Yang, F., Zhang, K., et al. (2018). Caractérisation d'une souche P31 de *Pseudomonas fulva* dégradant les pyréthroides et voie de dégradation biochimique de la D -phénothrine. *Devant. Microbiol.* 9 :1003.
 - Yang, T., Ren, L., Jia, Y., fan, S., Wang, J., Nahurira, R., et al. (2018). Biodégradation du phtalate de di-(2-éthylhexyle) par *Rhodococcus ruber* YC-YT1 dans l'eau et le sol contaminés. *Int. J. Environ. Rés. Santé publique.* 15 :964.
 - Yu, Y., Yin, H., Peng, H., Lu, G. et Dang, Z. (2019). Mécanisme protéomique de la biodégradation du décabromodiphényléther (BDE-209) par la *microbactérie* Y2 et son

Références Bibliographiques

- potentiel dans l'assainissement du système eau-sédiment contaminé par le BDE-209. *J. Hazard. Mater.* 387 :121708.
- Zhao, Q., Yue, S., Bilal, M., Hu, H., Wang, W. et Zhang, X. (2017). Analyse génomique comparative de 26 souches de *Sphingomonas* et *Sphingobium* : dissémination des capacités de bioremédiation, potentiel de biodégradation et transfert horizontal de gènes. *Sci. Environ.* 609, 1238-1247

Annexes

Annexes

Description	Scientific Name	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> amidohydrolase [Proteobacteria]	Proteobacteria	99.37%	WP_011117157.1
<input checked="" type="checkbox"/> The structure of the hexameric atrazine chlorohydrolase, AtzA [Pseudomonas sp. ADP]	Pseudomonas sp. ADP	99.37%	4V1X_A
<input checked="" type="checkbox"/> atrazine chlorohydrolase [Arthrobacter sp. AD1]	Arthrobacter sp. AD1	99.16%	AAO16227.1
<input checked="" type="checkbox"/> S-adenosylhomocysteine deaminase [uncultured bacterium]	uncultured bacterium	99.16%	ART90156.1
<input checked="" type="checkbox"/> SmzA [Herbaspirillum sp. B601]	Herbaspirillum sp. B601	99.16%	AAY96295.2
<input checked="" type="checkbox"/> atrazine chlorohydrolase [beta proteobacterium CDB21]	beta proteobacterium CDB21	98.95%	BAD69555.1
<input checked="" type="checkbox"/> amidohydrolase [Aminobacter sp. SR38]	Aminobacter sp. SR38	98.31%	WP_192321048.1
<input checked="" type="checkbox"/> amidohydrolase [Klebsiella quasipneumoniae]	Klebsiella quasipneumoniae	97.89%	WP_226548990.1
<input checked="" type="checkbox"/> amidohydrolase [Klebsiella]	Klebsiella	97.89%	WP_063259281.1
<input checked="" type="checkbox"/> TPA: amidohydrolase [Klebsiella pneumoniae]	Klebsiella pneumoniae	97.89%	HBY4120139.1
<input checked="" type="checkbox"/> RechName: Full=Melamine deaminase [Acidovorax citrulli]	Acidovorax citrulli	97.68%	Q8EYU0.1
<input checked="" type="checkbox"/> amidohydrolase [Enterobacter hormaechei]	Enterobacter hormaechei	97.89%	WP_159424623.1
<input checked="" type="checkbox"/> amidohydrolase [Delftia lacustris]	Delftia lacustris	97.68%	WP_206424569.1
<input checked="" type="checkbox"/> amidohydrolase [Herbaspirillum sp. CAH-3]	Herbaspirillum sp. CAH-3	97.89%	WP_154135585.1
<input checked="" type="checkbox"/> amidohydrolase [Melaminivora alkalimesophila]	Melaminivora alkalimesophila	97.68%	WP_019372648.1
<input checked="" type="checkbox"/> TPA: amidohydrolase [Klebsiella pneumoniae]	Klebsiella pneumoniae	97.26%	HBQ0362697.1
<input checked="" type="checkbox"/> atrazine chlorohydrolase [Aminobacter aminovorans]	Aminobacter aminovorans	98.68%	AEB70998.1
<input checked="" type="checkbox"/> atrazine chlorohydrolase [Aminobacter aminovorans]	Aminobacter aminovorans	98.46%	AEB70995.1
<input checked="" type="checkbox"/> atrazine chlorohydrolase [Aminobacter aminovorans]	Aminobacter aminovorans	98.46%	AEB70996.1
<input checked="" type="checkbox"/> atrazine chlorohydrolase [Aminobacter aminovorans]	Aminobacter aminovorans	98.24%	AEB70992.1
<input checked="" type="checkbox"/> atrazine chlorohydrolase [Aminobacter aminovorans]	Aminobacter aminovorans	98.24%	AEB70994.1
<input checked="" type="checkbox"/> atrazine chlorohydrolase [Aminobacter aminovorans]	Aminobacter aminovorans	97.80%	AEB70997.1
<input checked="" type="checkbox"/> atrazine chlorohydrolase [Aminobacter aminovorans]	Aminobacter aminovorans	97.54%	AEB71001.1

**Annexe 1-A. Séquences produisant des alignements significatifs (Atrazine Chlorohydrolase)
(*atzA*)**

Annexes

	La description	Nom scientifique	Par. Ident	Accession
✓	amidohydrolase [protéobactéries]	Protéobactéries	100.00%	WP_011117160.1
✓	amidohydrolase [Micrococccaceae]	Micrococccacées	97,96 %	WP_011777000.1
✓	amidohydrolase [Arthrobacter sp. AK-YN10]	Arthrobacter sp. AK-YN10	97,76 %	ER135184.1
✓	hydroxyatrazine hydrolase [Arthrobacter sp. DNS10]	Arthrobacter sp. DNS10	97,76 %	AGU71906.1
✓	hydroxysimazine hydrolase [Herbaspirillum sp. B601]	Herbaspirillum sp. B601	99,58 %	AAY40323.2
✓	amidohydrolase [Aminobacter sp. SR38]	Aminobacter sp. SR38	99,38 %	WP_192321895.1
✓	hydroxyatrazine hydrolase [bêta protéobactérie CDB21]	bêta protéobactérie CDB21	99,37 %	BAD99556.1
✓	amidohydrolase [Paenarthrobacter ureafaciens]	Paenarthrobacter ureafaciens	97,35 %	WP_243543046.1
✓	amidohydrolase [Leucobacter triazinivorans]	Leucobacter triazinivorans	98,74 %	WP_130110728.1
✓	hydroxyatrazine hydrolase [Arthrobacter sp. AD26]	Arthrobacter sp. AD26	100.00%	ACC78169.1
✓	hydroxyatrazine hydrolase [Pseudomonas sp. AD39]	Pseudomonas sp. AD39	99,22 %	ACI14308.1
✓	protéine de la famille des amidohydrolases [Haliea sp. SAOS-164]	Haliea sp. SAOS-164	65,38%	WP_135441588.1
✓	amidohydrolase [Qingshengfaniella alkalisoli]	Qingshengfaniella alkalisoli	58,35 %	WP_146386487.1
✓	amidohydrolase [Granulosicoccus sp.]	Granulosicoccus sp.	57,11%	MBX2880405.1
✓	amidohydrolase [bactérie Rhizobiaceae]	Bactérie Rhizobiaceae	55,48%	MBO6916842.1
✓	amidohydrolase [Rhodobacter sp.]	Rhodobacter sp.	57,24 %	NQW15101.1
✓	amidohydrolase [Pleomorphomonas oryzae]	Pleomorphomonas oryzae	60,76 %	WP_026793093.1
✓	amidohydrolase [bactérie Rhodobacteraceae]	Bactérie Rhodobacteraceae	56,80%	MCF8483577.1
✓	amidohydrolase [Cypionkella psychrotolerans]	Cypionkella psychrotolerans	58,01 %	WP_054007318.1
✓	amidohydrolase [Pseudorhodobacter sp. PARRP1]	Pseudorhodobacter sp. PARRP1	57,79 %	QYU38210.1
✓	hydroxydéchloroatrazine éthylaminohydrolase (hydroxyatrazine hydrolase) [bactérie Proteobacteria]	Bactérie protéobactérie	58,93 %	MBS1168142.1
✓	amidohydrolase [Pelagovum pacificum]	Pelagovum pacificum	56,62 %	WP_140198079.1
✓	amidohydrolase [Rhizobium non classé]	Rhizobium non classé	59,35 %	WP_062472743.1
✓	amidohydrolase [Rhizobium sp. Feuille341]	Rhizobium sp. Feuille341	59,35 %	WP_062694028.1
✓	amidohydrolase [Pleomorphomonas diazotrophica]	Pleomorphomonas diazotrophica	60,56 %	WP_101287147.1
✓	amidohydrolase [Rhizobium sp. 11515TR]	Rhizobium sp. 11515TR	59,11 %	WP_095438959.1

Annexe 1-B. Séquences produisant des alignements significatifs (hydroxyatrazine hydrolase) (*atzB*)

Annexes

La description	Nom scientifique	Par. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Le mécanisme de réaction de la N-isopropylammélide isopropylaminohydrolase AtzC : aperçu des études structurales et de mutagenèse [Pse...	Pseudomonas sp. ADP	99,50 %	4CQB_A
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropyl amidohydrolase [Protéobactéries]	Protéobactéries	99,50 %	WP_011117177.1
<input checked="" type="checkbox"/> Structure aux rayons X et études de mutagenèse de la N-isopropylammélide isopropylaminohydrolase AtzC [Pseudomonas sp. ADP]	Pseudomonas sp. ADP	99,26 %	5AKQ_A
<input checked="" type="checkbox"/> Le mécanisme de réaction de la N-isopropylammélide isopropylaminohydrolase AtzC : aperçu des études structurales et de mutagenèse [Pse...	Pseudomonas sp. ADP	99,26 %	4CQD_A
<input checked="" type="checkbox"/> Le mécanisme de réaction de la N-isopropylammélide isopropylaminohydrolase AtzC : aperçu des études structurales et de mutagenèse [Pse...	Pseudomonas sp. ADP	99,26 %	4CQC_A
<input checked="" type="checkbox"/> SmzC [Herbaspirillum sp. B801]	Herbaspirillum sp. B8...	99,01 %	AAY40324.2
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropyl amidohydrolase [Micrococcales]	Micrococques	98,53 %	WP_011778997.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropylamino [Arthrobacter sp. AD30]	Arthrobacter sp. AD30	98,33 %	ACI14309.1
<input checked="" type="checkbox"/> enzyme de dégradation de l'atrazine [Arthrobacter sp. AD28]	Arthrobacter sp. AD28	98,06 %	ACC78170.1
<input checked="" type="checkbox"/> protéine de la famille des amidohydrolases [bactérie Actinomycetia]	Bactérie actinomycète	56,52 %	MBE3094533.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropylamino hydrolase [Nocardioides sp. SP12]	Nocardioides sp. SP12	99,52 %	AAP30882.1
<input checked="" type="checkbox"/> AtzC [Shewanella sp. YJY4]	Shewanella sp. YJY4	99,52 %	ALC78532.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropyl amidohydrolase [bactérie non cultivée]	bactérie non cultivée	99,04 %	AAK83883.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropyl amidohydrolase [bactérie non cultivée]	bactérie non cultivée	99,04 %	AAK83881.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropyl amidohydrolase [bactérie non cultivée]	bactérie non cultivée	98,09 %	AAK83882.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropylamino hydrolase [Comamonas sp. A2]	Comonas sp. A2	99,51 %	ACT98408.1
<input checked="" type="checkbox"/> putative N-isopropylammélide isopropylamino hydrolase [Pseudomonas nitroreducens]	Pseudomonas nitrore...	99,50 %	CBH41162.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropylaminohydrolase [Arthrobacter sp.]	Arthrobacter sp.	99,00%	AXH21555.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropylaminohydrolase [Citricoccus sp.]	Citricoccus sp.	97,54 %	ASW20651.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide [bactérie non cultivée]	bactérie non cultivée	98,99 %	AVN87894.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropyl amidohydrolase [Arthrobacter sp. MCMB-438]	Arthrobacter sp. MC...	99,49 %	AAT09437.1
<input checked="" type="checkbox"/> AtzC [Arthrobacter sp. TN155]	Arthrobacter sp. TN155	99,49 %	ALA39984.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropylamino hydrolase [Arthrobacter sp. SD41]	Arthrobacter sp. SD41	99,48 %	AKG54853.1
<input checked="" type="checkbox"/> N-isopropylammélide isopropylamino [Acinetobacter lwoffii]	Acinetobacter lwoffii	99,48 %	AFH89629.1
<input checked="" type="checkbox"/> AtzC [Aminobacter aminovorans]	Aminobacter aminov...	99,47 %	AAK52818.1
<input checked="" type="checkbox"/> AtzC [Nocardioides sp. CMU5]	Nocardioides sp. CM...	98,94 %	ABK78334.1

Annexe 1-C. Séquences produisant des alignements significatifs (N-isopropyle-ammélide isopropylamino hydrolase) (*atzC*)

Annexes

	La description	Nom scientifique	Par. Ident	Accession
✓	amidohydrolase d'acide cyanurique (Pseudomonas non classé)	Pseudomonas non classé	99,73 %	WP_011117191.1
✓	Hydrolase d'acide cyanurique : innovation évolutive par concaténation structurale (Pseudomonas sp. ADP)	Pseudomonas sp. ADP	99,73 %	4BVQ_A
✓	amidohydrolase d'acide cyanurique (Arthrobacter sp. AD25)	Arthrobacter sp. AD25	99,45 %	ABK41868_1
✓	amidohydrolase d'acide cyanurique (Pseudomonas aeruginosa)	Pseudomonas aeruginosa	99,70 %	AIG51547.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Comamonas sp. CAH-2)	Comamonas sp. CAH-2	81,59 %	WP_154164646.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Acidovorax antarcticus)	Acidovorax antarcticus	78,85 %	WP_175505574.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Acidovorax sp. D4N7)	Acidovorax sp. D4N7	79,40 %	WP_231042957.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Proteobacteria)	Protéobactéries	78,85 %	WP_047219898.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Bacteriovorax sp.)	Bacteriovorax sp.	76,37 %	MBC7734439.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Comamonas serinivorans)	Comamonas serinivorans	76,37 %	WP_087283155.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (bactérie Comamonadaceae)	Bactérie Comamonadaceae	75,82 %	RYF40823_1
✓	amidohydrolase de l'acide cyanurique (Polaromonas sp.)	Polaromonas sp.	74,73 %	MBA4328996.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Lamprospedia puyangensis)	Lamprospedia puyangensis	66,39 %	WP_136574217.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Diaphorobacter sp. JS3051)	Diaphorobacter sp. JS3051	68,85 %	WP_196994691.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Verticella sediminum)	Verticella sediminum	61,43 %	WP_143850380.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Variovorax sp. BK613)	Variovorax sp. BK613	61,58 %	WP_184805845.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Variovorax sp. 369)	Variovorax sp. 369	61,58 %	WP_126184121.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Variovorax sp. IB41)	Variovorax sp. IB41	61,54 %	MBJ2157566_1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Variovorax sp. RKNM96)	Variovorax sp. RKNM96	61,82 %	WP_206179310.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Variovorax sp. IB41)	Variovorax sp. IB41	60,96 %	WP_233101864.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Variovorax paradoxus)	Variovorax paradoxus	61,25 %	WP_172872231.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Variovorax sp. RKNM96)	Variovorax sp. RKNM96	61,54 %	QSI28342.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Variovorax sp. YR634)	Variovorax sp. YR634	60,97 %	WP_176928770.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Polaromonas sp.)	Polaromonas sp.	60,46 %	NQW81412.1
✓	amidohydrolase à ouverture de cycle (Variovorax sp. OV084)	Variovorax sp. OV084	60,68 %	WP_177192774.1

Annexe 1-D. Séquences produisant des alignements significatifs (amidohydrolase d'acide cyanurique) (*atzD*)

Annexes

	La description ▼	Nom scientifique ▼	Par. Ident ▼	Accession
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Pseudomonas non classé)	Pseudomonas non cl...	100.00%	WP_011117192.1
✓	Un complexe protéique résiduel inattendu révèle les origines évolutives d'une enzyme catabolique s-triazine. Complexe lié à l'inhibiteur (Pseud...	Pseudomonas sp. ADP	99,78 %	6C8G_A
✓	Un complexe protéique résiduel inattendu révèle les origines évolutives d'une enzyme catabolique s-triazine (Pseudomonas sp. ADP)	Pseudomonas sp. ADP	99,78 %	6C82_A
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Ramlibacter sp. WS9)	Ramlibacter sp. WS9	75,82 %	WP_141508553.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Ramlibacter sp. GTP1)	Ramlibacter sp. GTP1	77,19%	WP_187080114.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Caenimonas sp. HX-9-20)	Caenimonas sp. HX-...	76,32%	WP_145893509.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Acidovorax antarcticus)	Acidovorax antarcticus	76,75 %	WP_175505578.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Protéobactéries)	Protéobactéries	78,07 %	WP_047219901.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Comamonas sp. CAH-2)	Comonas sp. CAH-2	78,95 %	WP_154164643.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Ramlibacter agri)	Ramlibacter agri	78,02 %	WP_169416901.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Ramlibacter monticola)	Ramlibacter monticola	78,95 %	WP_201672187.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Acidovorax sp. D4N7)	Acidovorax sp. D4N7	78,29%	WP_231042955.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (bactérie Burkholderiales)	Bactérie Burkholderi...	78,84%	MBI5280005.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Comamonas serinivorans)	Comamonas serinivo...	76,97 %	WP_087283151.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Caenimonas koreensis)	Caenimonas koreensis	73,25%	WP_153585987.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (bactérie gammaprotéobactérie)	Bactérie gammaprot...	74,17%	MBU0587771.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Ramlibacter)	Ramlibacter	75,00%	WP_157400936.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Curvibacter sp.)	Curvibacter sp.	72,15%	MCA3237533.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (bactérie Burkholderiales)	Bactérie Burkholderi...	72,26%	MBI5908139.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Caenimonas sp. SL110)	Caenimonas sp. SL110	72,59%	WP_048439192.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (bactérie Burkholderiales)	Bactérie Burkholderi...	73,29%	MBI2744203.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (bactérie Burkholderiales)	Bactérie Burkholderi...	71,71%	MBI2789226.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (bactérie Burkholderiaceae)	Bactérie Burkholderi...	73,09 %	MBX9960333.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (Polaromonas sp. 35-83-35)	Polaromonas sp. 35-...	71,03 %	OYY38420.1
✓	Amidohydrolase de la famille AtzE (bactérie Comamonadaceae)	Bactérie Comamona...	72,15%	RYX94527.1

**Annexe 1-E. Séquences produisant des alignements significatifs (biuret hydrolase)
(*atzE*)**

Annexes

	La description ▼	Nom scientifique ▼	Par. Ident ▼	Accession
✓	allophanate hydrolase (Pseudomonas non classé)	Pseudomonas non classé	100,00 %	WP_011117193.1
✓	Structure du domaine amidase de l'allophanate hydrolase de la souche ADP de Pseudomonas sp.(Pseudomonas sp. ADP)	Pseudomonas sp. ADP	100,00 %	4CP8_A
✓	allophanate hydrolase (Herbaspirillum sp. YR522)	Herbaspirillum sp. YR522	74,70 %	WP_008112911.1
✓	allophanate hydrolase (Escherichia coli)	Escherichia coli	70,42 %	EFB9813433.1
✓	putatif urée amidolyase (Enterobacter cloacae)	Enterobacter cloacae	70,25 %	AAK11683.1
✓	allophanate hydrolase (Enterobacteriaceae)	Entérobactéries	70,25 %	WP_197069157.1
✓	allophanate hydrolase (Escherichia coli)	Escherichia coli	70,25 %	EGOT958505.1
✓	allophanate hydrolase (Enterobacteriaceae)	Entérobactéries	70,25 %	WP_044257532.1
✓	TPA : allophanate hydrolase (Escherichia coli)	Escherichia coli	70,25 %	HBL0665444.1
✓	TPA : allophanate hydrolase (Klebsiella pneumoniae)	Klebsiella pneumoniae	70,25 %	HBR4923350.1
✓	allophanate hydrolase (Klebsiella pneumoniae)	Klebsiella pneumoniae	70,25 %	WP_220385483.1
✓	allophanate hydrolase (Raoultella planticola)	Raoultella planticola	70,07 %	QZS67792.1
✓	allophanate hydrolase (Klebsiella pneumoniae)	Klebsiella pneumoniae	70,25 %	SVL75146.1
✓	TPA : allophanate hydrolase (Klebsiella pneumoniae)	Klebsiella pneumoniae	70,25 %	HBT9652217.1
✓	allophanate hydrolase (Zymobacter palmae)	Zymobacter palmae	68,02 %	WP_027704585.1
✓	allophanate hydrolase (Enterobacter hormaechei)	Enterobacter hormaechei	71,62 %	MBK4824767.1
✓	allophanate hydrolase (Brucella puitosa)	Brucella puitosa	64,63 %	WP_207489501.1
✓	allophanate hydrolase (Brucella grignonensis)	Brucella grignonensis	65,13 %	WP_094538708.1
✓	allophanate hydrolase (Klebsiella michiganensis)	Klebsiella michiganensis	69,74 %	WP_218973213.1
✓	allophanate hydrolase (Klebsiella michiganensis)	Klebsiella michiganensis	69,74 %	PPA44631.1
✓	allophanate hydrolase (Microvirga aërophila)	Microvirga aërophile	59,97 %	WP_147022351.1
✓	allophanate hydrolase (Azospirillum sp. TSH100)	Azospirillum sp. TSH100	60,86 %	QCG908111.1
✓	allophanate hydrolase (Azospirillum sp. TSH100)	Azospirillum sp. TSH100	60,86 %	WP_189056284.1
✓	allophanate hydrolase (Magnetospirillum gryphiswaldense)	Magnétospirillum gryphiswaldense	60,94 %	WP_024078368.1
✓	allophanate hydrolase (Skermanella sp. TT6)	Skermanella sp. TT6	61,03 %	WP_201082451.1
✓	allophanate hydrolase (muqueuse de Skermanella)	Muqueuse de Skermanella	61,11 %	WP_202682306.1

**Annexe 1-F. Séquences produisant des alignements significatifs (allophanate hydrolase)
(*atzF*)**