

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE



جامعة احمد بوقرة-بومرداس

UNIVERSITAIRE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES

Faculté Des Sciences

Département de Biologie

### **Mémoire de master Académique**

Domaine : *Sciences de la nature et de la vie*

Filière : *Sciences Biologiques*

Spécialité : *Biotechnologie Microbienne*

### **THEME**

**Criblage de collection souches locales de *Bacillus thuringiensis*  
ayant une activité antimicrobienne produite au cours de la  
croissance.**

**Présenter par :**

**BENYAHIA Linda**

**MAIDI Hind**

*Devant le jury composé de :*

Présidente : Mme Khemili S. (UMBB)

Promotrice : Mme Allouane R. (UMBB)

Examinatrice : Mme Benzina F. (UMBB)

Année Universitaire 2016/2017

# Remerciement

*Avant tout, nous remercions **Dieu** le tout-puissant, le Miséricordieux, de nous avoir donné le courage, la force, la santé et la persistance et de nous avoir permis de finaliser ce travail.*

*Nous exprimons nos remerciements et nos gratitude à notre promotrice **Mme ALLOUANE**, maître de conférences B à l'UMBB pour s'être guidée et encouragée pendant toute la durée de nos travaux, ainsi qu'à la confiance qu'elle nous a attribuée tout au long de nos études. Nous lui attestons notre gratitude pour son encadrement, ses encouragements, ses conseils, ses orientations et sa patience.*

*Un merci spécial s'adresse à la technicienne du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne et de Biochimie « Nadia », de son aide et soutien moral.*

*Nous saisissons cette occasion pour exprimer nos profonds respects et nos reconnaissances à l'ensemble des enseignants de l'université M'Hamed Bouguera de Boumerdes, qui ont participé à nos formations graduées et post graduées et tout le membre de jury d'avoir accepté de juger le présent travail.*

*Enfin, nous remercions notre famille : nos parents pour leurs soutiens sans failles, parfois inquiets mais toujours compréhensifs, tout au long de ces années, ainsi que les frères, les sœurs, les cousines, oncles, et tantes pour leurs soutiens affectifs et moraux.*

*Sans oublier tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, soient assurées de notre profonde gratitude.*

**Merci**



***Dédicace***

***Grace Allah***

***Je dédie ce modeste travail***

***À mes très grandes chères au monde mes parents Djamel et  
Dahbia qui m'ont toujours soutenu, et ont été toujours  
présentent et toujours m'encourager durant mes études.  
J'espère que je suis la bonne fille que vous êtes rêvés de  
l'avoir***

***À toutes mes chères cousines***

***À mes chères tantes et mes oncles surtout Noureddine***

***À toute la famille Benyahia et Yazid***

***Et bien sûr à mes copines de mon chemin qui sont toujours à  
côté de moi dans les rires comme dans les larmes***

***À toutes mes amies***

***À tous les étudiants de master 2 Biotechnologie Microbienne***

***BTM***

***À tous qui m'aide près ou loin***



***LINDA***



## ***Dédicace***

*Je dédie ce modeste travail*

*À mon très cher père Ahmed et ma très chère mère Chafika  
pour leurs amours, leurs encouragements et leurs sacrifices  
durant toutes mes années d'études que dieu leur donne une  
longue vie et parfaite santé.*

*À ma sœur Ahlem et mon frère Abderrahmane, ainsi que  
tous les membres de ma famille petits et grands.*

*À mes tantes paternelles Farida, Nassira, Saliha et mes  
tantes maternelles Zahida, Hadjira et Hassiba.*

*À mon cher binôme de tous les temps Benyahia Linda pour  
les bons et les mauvais moments que nous avons passés  
ensemble.*

*À mes copines Mouna, Amel, Hassiba, Loubna, Nessrine,  
Djamila, Thiziri, Nadia et Imen.*

*À la section Master 2 BTM 2016 /2017.*

*Ffind*



|                            |   |
|----------------------------|---|
| Introduction générale..... | 1 |
|----------------------------|---|

## Chapitre I : Données Bibliographiques

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Groupe <i>Bacillus cereus</i> .....                                       | 3  |
| 1.1 Définition de groupe <i>Bacillus cereus</i> .....                        | 3  |
| 1.2 Historique.....                                                          | 3  |
| 1.3 Classification de groupe <i>Bacillus cereus</i> .....                    | 4  |
| 2. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....                                       | 5  |
| 2.1 Historique.....                                                          | 5  |
| 2.2 Caractéristiques générales.....                                          | 6  |
| 2.2.1 Description de <i>B. thuringiensis</i> .....                           | 6  |
| 2.2.2 Classification sérotypique de <i>B. thuringiensis</i> .....            | 7  |
| 2.2.3 Habitat.....                                                           | 9  |
| 2.2.4 Cycle de croissance.....                                               | 9  |
| 3. Métabolite secondaire de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....              | 11 |
| 3.1 Définition.....                                                          | 11 |
| 3.2 Historique.....                                                          | 11 |
| 3.3 Utilisation.....                                                         | 11 |
| 4. Principaux métabolites secondaires de <i>Bacillus thuringiensis</i> ..... | 11 |
| 4.1 Bactériocines.....                                                       | 11 |
| 4.1.1 Généralités.....                                                       | 11 |
| 4.1.2 Définition et caractéristiques principales.....                        | 12 |
| 4.1.3 Nature.....                                                            | 12 |
| 4.1.4 Nomenclature.....                                                      | 12 |

|         |                                                                           |    |
|---------|---------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1.5   | Classification des bactériocines.....                                     | 12 |
| 4.1.6   | Bactériocines de <i>B. thuringiensis</i> .....                            | 14 |
| 4.1.7   | Mode et mécanisme d'action des bactériocines.....                         | 16 |
| 4.1.7.1 | Mode d'action des bactériocines.....                                      | 16 |
| 4.1.7.2 | Mécanisme d'action générale des bactériocines.....                        | 17 |
| 4.1.8   | Application des bactériocines.....                                        | 18 |
| 4.1.8.1 | Application en agroalimentaire.....                                       | 18 |
| 4.1.8.2 | Application médicales des bactériocines.....                              | 20 |
| 4.1.8.3 | Impact économique des bactériocines.....                                  | 21 |
| 4.2     | Delta-endotoxines (protéines Cry et Cyt).....                             | 22 |
| 4.2.1   | Généralité.....                                                           | 22 |
| 4.2.2   | Nomenclature et classification.....                                       | 23 |
| 4.2.3   | Gènes codants pour des protéines Cry.....                                 | 24 |
| 4.2.4   | Structure moléculaire des toxines Cry à trois domaines.....               | 24 |
| 4.2.5   | Mode d'action des delta-endotoxines.....                                  | 25 |
| 4.2.6   | Effet insecticide.....                                                    | 26 |
| 4.2.7   | Effet antimicrobien.....                                                  | 27 |
| 4.3     | Antibiotiques et antifongiques produits par <i>B. thuringiensis</i> ..... | 28 |
| 4.3.1   | Zwittermicine A.....                                                      | 28 |
| 4.3.1.1 | Historique.....                                                           | 28 |
| 4.3.1.2 | Définition.....                                                           | 28 |
| 4.3.2   | Fongycines.....                                                           | 29 |
| 4.3.2.1 | Définition.....                                                           | 29 |

|           |                                                                          |           |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3.2.2   | Domaine d'application des fongycines.....                                | 30        |
| 4.3.3     | Iturine.....                                                             | 31        |
| 4.3.3.1   | Historique.....                                                          | 31        |
| 4.3.3.2   | Définition.....                                                          | 31        |
| 4.3.3.3-  | Activités biologiques des antibiotiques ituriniques.....                 | 32        |
| <b>5.</b> | <b>Bactéries pathogènes de l'homme.....</b>                              | <b>33</b> |
| 5.1       | <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                       | 33        |
| 5.1.1     | Historique.....                                                          | 33        |
| 5.1.2     | Description de <i>Staphylococcus aureus</i> .....                        | 33        |
| 5.1.3     | Habitat.....                                                             | 34        |
| 5.1.4     | Facteur de risque de colonisation par <i>Staphylococcus aureus</i> ..... | 34        |
| 5.1.5     | Pouvoir pathogène de <i>Staphylococcus aureus</i> .....                  | 35        |
| 5.2       | <i>Salmonella typhimurium</i> .....                                      | 35        |
| 5.2.1     | Historique.....                                                          | 35        |
| 5.2.2     | Description de <i>Salmonella typhimurium</i> .....                       | 35        |
| 5.2.3     | Habitat.....                                                             | 36        |
| 5.2.4     | Pouvoir pathogène de <i>Salmonella thyphimirium</i> .....                | 36        |
| 5.3       | <i>Escherichia coli</i> .....                                            | 36        |
| 5.3.1     | Historique.....                                                          | 36        |
| 5.3.2     | Description d' <i>Echerichia coli</i> .....                              | 37        |
| 5.3.3     | Habitat.....                                                             | 37        |
| 5.3.4     | Pouvoir pathogène d' <i>Esherichia coli</i> .....                        | 38        |

## Chapitre II: Matériel et méthodes

|                                                                                                                                                     |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Matériel.....</b>                                                                                                                             | <b>39</b> |
| 1.1 Matériel biologiques.....                                                                                                                       | 39        |
| 1.1.1 Souches de <i>B. thuringiensis</i> .....                                                                                                      | 39        |
| 1.1.2 Souches microbiennes utilisées dans les tests de l'activité antimicrobienne.....                                                              | 40        |
| 1.2 Matériel non biologiques.....                                                                                                                   | 41        |
| <b>2. Méthodes.....</b>                                                                                                                             | <b>41</b> |
| 2.1 Revivification des souches.....                                                                                                                 | 41        |
| 2.2 Vérification de la pureté des souches microbiennes.....                                                                                         | 41        |
| 2.3 Conservation des souches.....                                                                                                                   | 41        |
| 2.4 Etude de pouvoir antagoniste des souches de <i>B. thuringiensis</i> .....                                                                       | 41        |
| 2.4.1 Criblage de souches de Bt en utilisant <i>B. thuringiensis</i> subsp. aizawai et <i>Staphylococcus aureus</i> comme souches indicatrices..... | 41        |
| 2.4.1.1 Méthode d'antagonisme différé.....                                                                                                          | 42        |
| 2.5 Etude de l'activité antimicrobienne des surnageants de culture.....                                                                             | 44        |
| 2.5.1 Obtention de surnageants de culture exempts de cellules.....                                                                                  | 44        |
| 2.5.2 Méthode de diffusion en milieu gélosé.....                                                                                                    | 45        |
| 2.6 L'effet des surnageants de cultures des souches antagonistes de Bt sur la cinétique de croissance des souches bactériennes tests.....           | 46        |
| 2.7 Etude de l'activité antifongique.....                                                                                                           | 48        |



## Chapitre III : Résultats et discussions

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1- Vérification de la pureté des souches de <i>B. thuringiensis</i> .....                                                                     | 49 |
| 2- Activité antagoniste des souches de <i>B. thuringiensis</i> .....                                                                          | 51 |
| 2.1 Activité antagoniste des souches de <i>B. thuringiensis</i> sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                        | 53 |
| 2.2- Activité antagoniste des souches de <i>B. thuringiensis</i> sur <i>B. thuringiensis subsp aizawai</i> .....                              | 55 |
| 3- Détection de l'activité antimicrobienne des surnageants de culture des souches de <i>B. thuringiensis</i> .....                            | 56 |
| 3.1 Méthode des puits.....                                                                                                                    | 57 |
| 3.2 Méthode des disques.....                                                                                                                  | 58 |
| 4 Effet des surnageants de culture des souches de <i>B. thuringiensis</i> sur la cinétique de croissance des bactéries-test.....              | 60 |
| 4.1 Etude de l'effet des surnageants des souches de <i>B. thuringiensis</i> sur la cinétique de croissance des bactéries à Gram positifs..... | 61 |
| 4.1.1 Sur <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                                                                                  | 61 |
| 4.1.2 Sur <i>B. thuringiensis subsp aizawai</i> .....                                                                                         | 65 |
| 4.2 Etude de l'effet des surnageants des souches de <i>B. thuringiensis</i> sur la cinétique de croissance des bactéries à Gram négatifs..... | 70 |
| 4.2.1 Sur <i>Salmonella typhimurium</i> .....                                                                                                 | 70 |
| 4.2.2 Sur <i>Escherichia coli</i> .....                                                                                                       | 75 |
| 5- Etude de l'activité antifongique.....                                                                                                      | 80 |
| Conclusion et perspectives.....                                                                                                               | 83 |

## Référence bibliographiques

## Annexes

## Liste des figures

|                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1:</b> <i>B. thuringiensis israelensis</i> au stade de la sporulation.....                                                                                                                | 7  |
| <b>Figure 2:</b> <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>morrisoni</i> en phase de sporulation vue au microscope électronique à transmission, montrant les inclusions cristallines et la spore..... | 7  |
| <b>Figure 3:</b> <i>Bacillus thuringiensis</i> en microscopie en contraste de phase .....                                                                                                           | 7  |
| <b>Figure 4:</b> Cristaux de Bt observés en microscopie électronique à transmission.....                                                                                                            | 7  |
| <b>Figure 5:</b> Schématisation du cycle vital de <i>B.thuringiensis</i> .....                                                                                                                      | 10 |
| <b>Figure 6:</b> Classification universelle des bactériocines.....                                                                                                                                  | 13 |
| <b>Figure 7:</b> Schéma montrant les principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif.....                                                               | 17 |
| <b>Figure 8:</b> Structure tridimensionnelle d'une toxine Cry et ces 3 domaines .....                                                                                                               | 25 |
| <b>Figure 9:</b> mode d'action insecticide de Bt .....                                                                                                                                              | 26 |
| <b>Figure 10:</b> Aspect morphologique du <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                                                                                                        | 34 |
| <b>Figure 11:</b> Colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> sur Müller-Hinton .....                                                                                                                  | 34 |
| <b>Figure 12:</b> Aspect morphologique du <i>Salmonella typhimurium</i> en microscopie optique (X1000) .....                                                                                        | 36 |
| <b>Figure 13:</b> Aspect morphologique des colonies du <i>Salmonella typhimurium</i> en culture .....                                                                                               | 36 |
| <b>Figure 14:</b> Aspect morphologique des colonies d' <i>Echirichia coli</i> en microscopie optique.....                                                                                           | 37 |
| <b>Figure 15 :</b> Aspect morphologique des colonies d' <i>Echirichia coli</i> en culture.....                                                                                                      | 37 |
| <b>Figure 16:</b> Schéma de préparation de la pré-culture des souches tests ( <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 et <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> ).....                  | 42 |
| <b>Figure 17:</b> Schéma de test d'antagonisme différé.....                                                                                                                                         | 43 |
| <b>Figure 18 :</b> Schéma de l'obtention de surnagants de culture exempts de cellules.....                                                                                                          | 44 |
| <b>Figure 19 :</b> L'aspect macroscopique des souches de <i>Bacillus thuringiensis</i> cultivées à 37 °C pendant 24 heures.....                                                                     | 51 |
| <b>Figure 20 :</b> Activité inhibitrice des souches de <i>B. thutringiensis</i> contre <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                                                           | 54 |
| <b>Figure 21 :</b> Absence d'activité antagoniste des souches de <i>B. thuringiensis</i> contre <i>Staphylococcus aureus</i> .....                                                                  | 5( |

## Liste des figures

---

|                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 22:</b> Activité inhibitrice des souches de <i>B. thuringiensis</i> contre <i>Bacillus thuringiensis subsp aizawai</i> .....                                                                                                                 | 56 |
| <b>Figure 23:</b> Absence d'activité inhibitrice de souche de <i>B. thuringiensis</i> contre <i>B. thuringiensis subsp aizawai</i> . ....                                                                                                              | 56 |
| <b>Figure 24:</b> Résultat de l'activité antimicrobienne des surnagents de culture de souche de <i>B. thuringiensis</i> sur la souche test <i>Bacillus thuringiensis subsp aizawai</i> par la méthode des puits en milieu Muller Hinton. ....          | 58 |
| <b>Figure 25:</b> Résultat de l'activité antimicrobienne des surnagents de culture de souche de <i>B. thuringiensis</i> sur la souche test <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode des puits en milieu Muller Hinton .....                         | 58 |
| <b>Figure 26:</b> Résultat de l'activité antimicrobienne de surnagent de culture de souche de <i>B. thuringiensis</i> sur la souche test <i>Bacillus thuringiensis subsp aizawai</i> par la méthode des disques en papier en milieu Muller Hinton..... | 60 |
| <b>Figure 27:</b> Résultat de l'activité antimicrobienne de surnagent de culture de souche de <i>B. thuringiensis</i> sur la souche test <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode des disques en papier en milieu Muller Hinton .....               | 60 |
| <b>Figure 28:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A.....                                                                              | 62 |
| <b>Figure 29:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A.....                                                                   | 63 |
| <b>Figure 30:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B.....                                                                              | 63 |
| <b>Figure 31:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B.....                                                                   | 64 |
| <b>Figure 32:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B.....                                                                              | 64 |
| <b>Figure 33:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B.....                                                                   | 65 |

|                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 34:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A.....            | 67 |
| <b>Figure 35:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A..... | 67 |
| <b>Figure 36:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B.....            | 68 |
| <b>Figure 37:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B..... | 68 |
| <b>Figure 38:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B.....            | 69 |
| <b>Figure 39:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B..... | 69 |
| <b>Figure 40:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Salmonella typhimurium</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A.....                                 | 72 |
| <b>Figure 41:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Salmonella typhimurium</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A.....                      | 72 |
| <b>Figure 42:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Salmonella typhimurium</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B.....                                 | 73 |
| <b>Figure 43:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Salmonella typhimurium</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B.....                      | 73 |
| <b>Figure 44:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Salmonella typhimurium</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B .....                                | 74 |
| <b>Figure 45:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Salmonella typhimurium</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B.....                      | 74 |
| <b>Figure 46:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Escherichia coli</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A.....                                       | 76 |

|                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 47:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Escherichia coli</i> après 24h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A.....  | 76 |
| <b>Figure 48:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Escherichia coli</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B.....            | 77 |
| <b>Figure 49:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Escherichia coli</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B..... | 77 |
| <b>Figure 50:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Escherichia coli</i> avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B.....            | 78 |
| <b>Figure 51:</b> Courbe de suivi de la croissance de la souche <i>Escherichia coli</i> après 24 h avec l'ajout de surnagent de la souche de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B..... | 78 |
| <b>Figure 52:</b> Résultats de l'activité antifongique des souches de <i>B. thuringiensis</i> sur <i>Aspergillus niger</i> .....                                                | 81 |

## Liste des tableaux

---

|                                                                                                                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau 1:</b> sérotype de <i>B. thuringiensis</i> .....                                                                                                                                      | 8  |
| <b>Tableau 2:</b> Les bactériocines produits par <i>B. thuringiensis</i> .....                                                                                                                   | 14 |
| <b>Tableau 3:</b> Quelques bactériocines utilisées dans la conservation des aliments.....                                                                                                        | 18 |
| <b>Tableau 4:</b> les principaux bactériocines utilisées dans le domaine médical.....                                                                                                            | 20 |
| <b>Tableau 5:</b> Diversité des protéines Cry.....                                                                                                                                               | 24 |
| <b>Tableau 6:</b> spectre d'action de quelques souches de Bt.....                                                                                                                                | 27 |
| <b>Tableau 7:</b> Effet antimicrobien des toxines Cry et Cyt.....                                                                                                                                | 27 |
| <b>Tableau 8:</b> Quelques antifongiques et bioinsecticides de <i>Bacillus</i> commercialisés.....                                                                                               | 29 |
| <b>Tableau 9:</b> Souches de <i>B. thuringiensis</i> utilisées et leurs origines.....                                                                                                            | 40 |
| <b>Tableau 10:</b> Souches bactériennes utilisées dans les tests de l'activité antibactérienne.....                                                                                              | 40 |
| <b>Tableau 11:</b> caractères macroscopiques de 20 souches de <i>B. thuringiensis</i> .....                                                                                                      | 49 |
| <b>Tableau 12:</b> Evaluation de l'activité inhibitrice des souches de Bt vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> en utilisant la méthode d'antagonisme différé.....                           | 54 |
| <b>Tableau 13:</b> Evaluation de l'activité antagoniste des souches de Bt vis-à-vis de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> en utilisant la méthode d'antagonisme différé.....     | 55 |
| <b>Tableau 14:</b> Activité antibactérienne des souches de Bt sur <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>airawai</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode de diffusion en puits.....   | 57 |
| <b>Tableau 15:</b> Activité antibactérienne des souches de Bt sur <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>airawai</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> par la méthode de diffusion sur disque..... | 59 |
| <b>Tableau 16:</b> Résultats de suivi de la croissance de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> avec l'ajout des surnageant des souches de <i>B. thuringiensis</i> (2SA3A, *6S2B, *6S5B).....   | 61 |
| <b>Tableau 17:</b> Résultats de suivi de la croissance de la souche <i>Staphylococcus aureus</i> après 24 h.....                                                                                 | 62 |
| <b>Tableau 18:</b> Résultats de suivi de la croissance de la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> avec l'ajout de surnageant des souches de <i>B. thuringiensis</i> .....   | 66 |



## Liste des tableaux

---

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau 19:</b> Résultats de suivi de la croissance de la souche <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> après 24 h.....                                   | 66 |
| <b>Tableau 20:</b> Résultats de suivi de la croissance de la souche <i>Salmonella typhimurium</i> avec l'ajout de surnagent des souches de <i>B. thuringiensis</i> ..... | 71 |
| <b>Tableau 21:</b> Résultats de suivi de la croissance de la souche <i>Salmonella typhimurium</i> après 24 h.....                                                        | 71 |
| <b>Tableau 22:</b> Résultats de suivi de la croissance de la souche <i>Escherichia coli</i> avec l'ajout de surnageant des souches de <i>B. thuringiensis</i> .....      | 75 |
| <b>Tableau 23:</b> Résultats de suivi de la croissance de la souche <i>Escherichia coli</i> après 24 h.....                                                              | 75 |

## Liste des abréviations

---

AAF : Aéro-anaérobie facultatif

AS : Aérobie strict

Av-J.-C : Avant Jésus-Christ.

Bt: *Bacillus thuringiensis*

Bta: *Bacillus thuringiensis aizawai*

CMI: Concentration Minimale Inhibitrice

Cr : cristal

Cry : Protéine Cristalline

Cyt : Protéine cytolitique

DO : Densité optique

GN : Gélose nutritive

h : heurs

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

j : jour

KDa : Kilo Dalton

LB : Luria Bertani

MH : Muller Hinton

min : Minute

mg : Milligramme

ml : millilitre

mm : millimètre

nm : nanomètre

PFT : Pore-Forming Toxin : toxine formant pores

## Liste des abréviations

---

pH : Potentiel d'Hydrogène

rpm : Rotation par minute.

Sp : spore

Subsp.: sous espèce

Sys.E : système d'éluant

trs/min : Tours/min

VP1 : Réactif Voges Proskauer 1.

VP2 : Réactif Voges Proskauer 2.

Vip : protéines insecticides végétatives

V : Volume

Z.D.I : zone d'inhibition

(v/v) : Volume / volume

(m/v) : Masse / volume

$\alpha$ -exotoxine : Alpha exotoxine

$\beta$ -exotoxine : Beta exotoxine

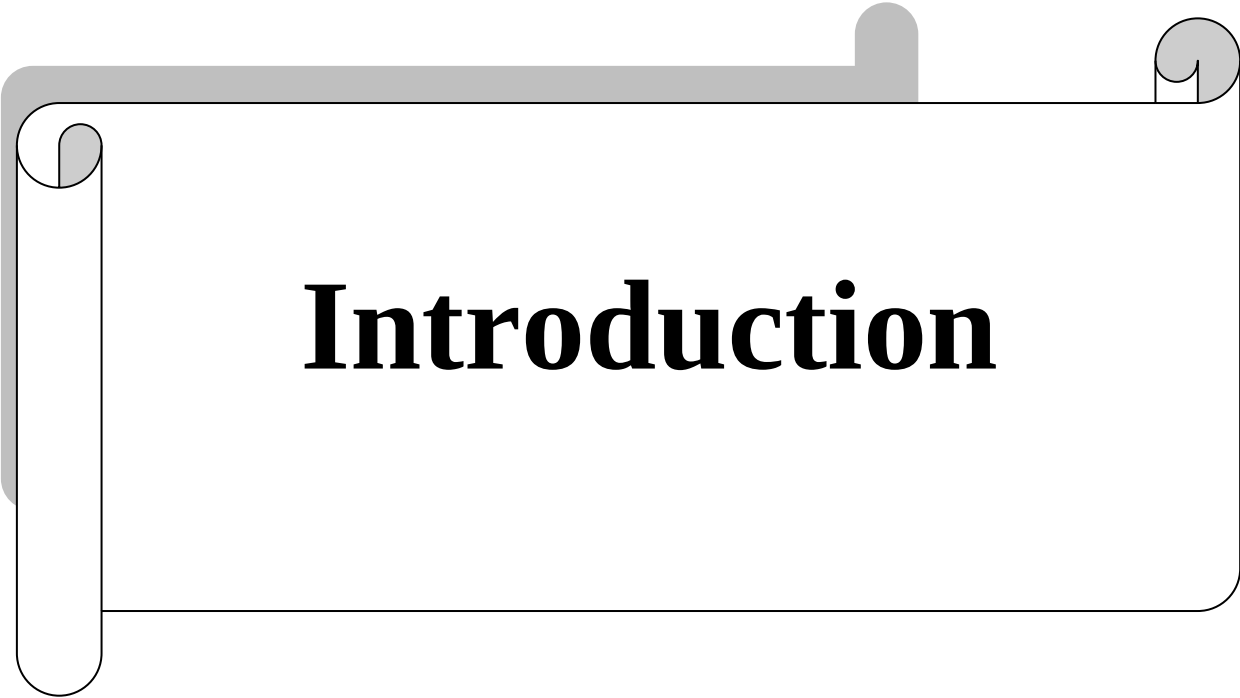
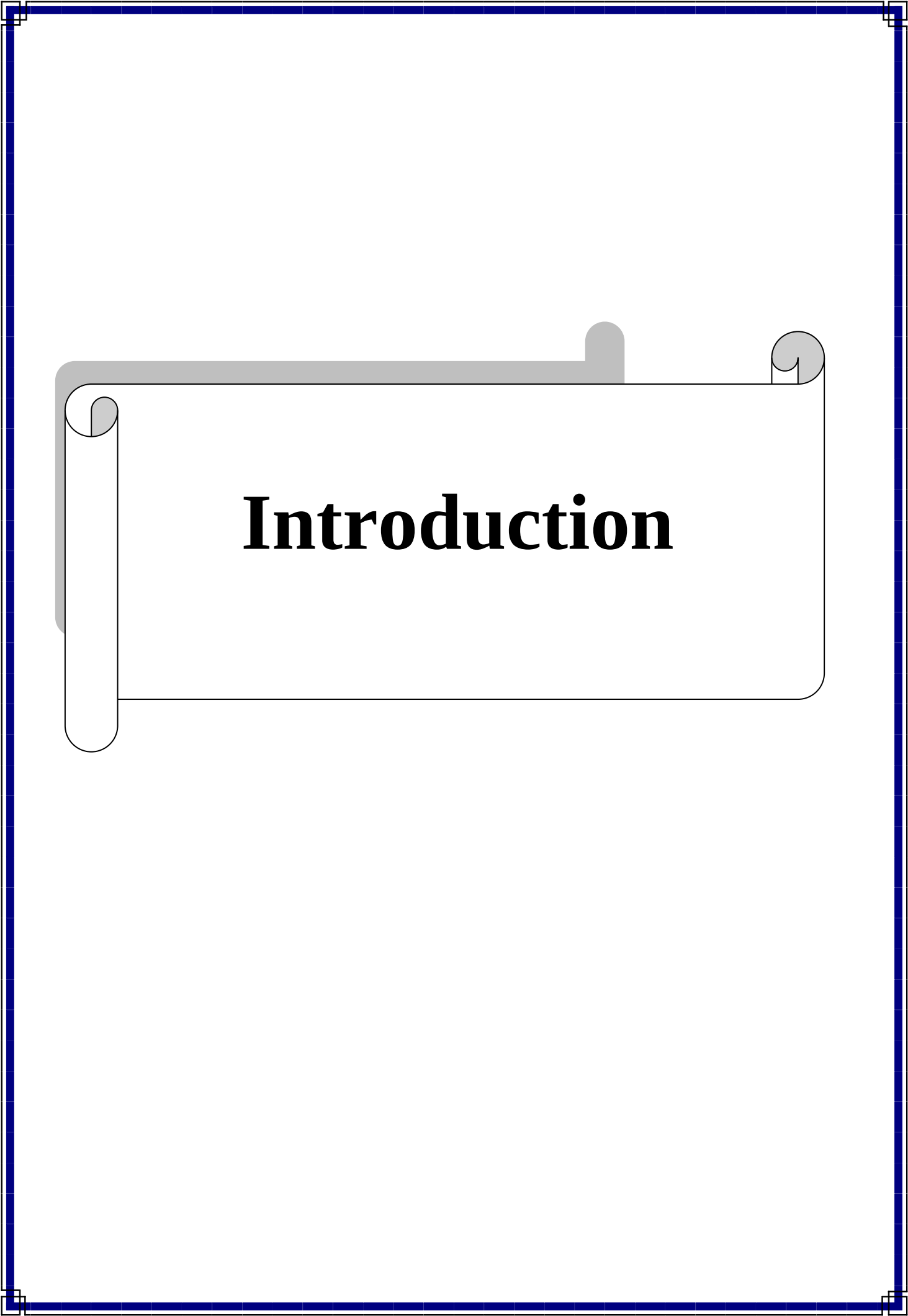
$\delta$ -endotoxine : Delta endotoxine

$\mu$ l: Microlitre

$\mu$ m : Micromètre

°C : degré Celsius

$\lambda$  : Longueur d'onde de la radiation



# Introduction

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie très utilisée en biotechnologie dans le domaine de la lutte biologique comme alternative ou en complément des pesticides synthétiques chimiques en agriculture, est maintenant l'agent de lutte biologique le plus utilisé dans le monde. C'est une bactérie de forme bâtonnet, à Gram positif, sporulée, entomopathogène, chimiohétérotrophe, anaérobie facultative (Rahbani, 2015).

La recherche de nouvelles molécules ayant une activité antimicrobienne est le sujet de plusieurs travaux récents, ceci est dû au développement de l'antibiorésistance chez les microorganismes pathogènes de l'Homme et des animaux. Les bactéries membres du genre *Bacillus* sont des producteurs primordiaux de métabolites antimicrobiens, dont l'espèce *Bacillus thuringiensis* qui est caractérisée par sa capacité à produire des métabolites secondaires ayant une activité antimicrobienne très divers tels que les bactériocines, les chitinases et les antibiotiques au cours de sa croissance qui sont utilisées dans différents domaines.

Les bactériocines sont des substances protéiques antimicrobiennes qui ont un large spectre d'inhibition incluant des micro-organismes d'altération et pathogènes. Ceci a conduit les chercheurs à s'intéresser à ces molécules et à leur éventuelle application dans le domaine de l'agro-alimentaire comme bio-conservateurs et en médecine humaine et vétérinaire comme de nouveaux agents antimicrobiens.

Notre étude s'insère dans cette optique et a pour objectifs :

- Le criblage d'une collection de souches de Bt isolées à partir du sol de différentes régions en Algérie pour l'activité antagoniste à l'encontre de bactéries phylogénétiquement proche de Bt afin de sélectionner les souches susceptibles d'être bactériocinogènes.
- L'étude de l'activité antibactérienne des surnagants de culture des souches de Bt sélectionnées sur des bactéries pathogènes de l'homme à Gram + et à Gram -
- L'étude de l'activité antifongique des souches de Bt sélectionnées.

Le présent mémoire est structuré comme suit :

Après cette introduction générale qui présente la problématique et les objectifs. Le premier chapitre présente des données bibliographiques comportant trois parties : la première présente le groupe *Bacillus cereus* avec ces caractères biologiques, sa position systématique, son habitat, ainsi que ces espèce pathogènes. La seconde partie est focalisée sur l'espèce *Bacillus thuringiensis* qui est traité très en détail. Dans la troisième partie, l'accent est mis sur les métabolites secondaires de Bt produite au cours de croissance tels que les bactériocines, les antibiotiques et les delta-endotoxines cours de sporulation. Le deuxième chapitre présente le matériel utilisé ainsi que les méthodes suivies. Les résultats et leur discussion sont présentés dans le chapitre trois. Une conclusion générale et les perspectives de nos résultats sont données à la fin.

# Chapitre I



## Données bibliographiques



## 1. Le groupe *Bacillus cereus*

### 1.1 Définition de groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *Bacillus cereus* est un groupe qui regroupe des espèces de bactéries formants endospores et comprend six espèces : *Bacillus cereus sensus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus pseudomycoides*. Il a été montré que ces espèces sont taxonomiquement très proches mais phénotypiquement variable notamment en matière de pathogénicité (Pandiani, 2010).

Ce sont des bacilles Gram positifs, aérobies ou parfois anaérobies facultatifs, capables de produire une endospore quand les conditions deviennent défavorables. Elles ont des capacités physiologiques très diversifiées. En effet, elles peuvent être impliquées dans la minéralisation du phosphate, la dénitrification, la protéolyse ou la production d'antibiotiques (Soufiane, 2013).

Il est possible de distinguer *B. cereus* des autres *Bacillus* de morphologie similaire de part la mobilité, l'activité hémolytique, l'incapacité à fermenter le mannitol, ainsi que par la production d'une lécithine extrêmement active (Pandiani, 2010).

*Bacillus thuringiensis* est un pathogène des insectes très largement utilisé comme agent de lutte biologique en agriculture.

*Bacillus anthracis*, l'agent étiologique de l'anthrax est responsable de la maladie du charbon chez l'homme et l'animal (Dromigny, 2008).

*Bacillus cereus sensu stricto* communément appelé *Bacillus cereus*, est un pathogène opportuniste émergent, généralement associé à des toxi-infections alimentaires ou à des infections locales de l'œil.

Au moment de la sporulation, seule l'espèce *B. thuringiensis* se distingue des autres par la production d'une inclusion parasporale (Rahbani, 2015).

### 1.2 Historique

Historiquement, *Bacillus anthracis* est la plus ancienne des bactéries appartenant au groupe *Bacillus cereus*. Les premières descriptions présumées de la maladie de charbon datent de l'antiquité et sont évoquées dans la bible. Les symptômes sont décrits par Virgile (71-19 av. J.-C) sous forme de graves lésions cutanées aux points de contact avec des vêtements en

laine contaminée. Davaine, en 1836, attribue la maladie à la présence de bâtonnets dans le sang qu'il s'appelle « bactériidies charbonneuses ». Koch rebaptise cette bactérie *Bacillus anthracis*. *Bacillus cereus* a été isolé en 1887 dans une étable par Frankland et Frankland. *Bacillus thuringiensis* a été isolé pour la première fois en 1901 au Japon par Ichiwata. *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides* ont été plus récemment identifiés (Daou, 2008).

### 1.3 Classification

Les 7 groupes phylogénétiques du groupe *Bacillus cereus* (*sensu lato*) sont classés par profil thermique de croissance puis par leur cytotoxicité (Guinebretiere *et al.*, 2008).

- **Groupe I :**

Il s'agit d'un groupe mésophile correspondant à l'espèce *B. pseudomycoides* (colonie de type rhyzoidale). Les souches de ce groupe sont généralement non cytotoxiques.

- **Groupe II :**

Ce groupe inclut 75% de souches psychrotrophes et 25% de souches mésophiles, correspondant à l'espèce *B. thuringiensis* II ou *B. cereus* II. Ce groupe contient des souches cytotoxiques (toxines diarrhéiques).

- **Groupe III :**

Il s'agit d'un groupe mésophile correspondant à l'espèce *B. thuringiensis* III ou *B. cereus* III ou *B. anthracis*. Les souches de ce groupe contiennent des toxines diarrhéiques et émétiques.

- **Groupe IV :**

Il s'agit d'un groupe mésophile correspondant à l'espèce *B. thuringiensis* IV ou *B. cereus* IV. Les souches de ce groupe sont généralement cytotoxiques (toxines diarrhéiques).

- **Groupe V :**

Il s'agit d'un groupe intermédiaire correspondant à l'espèce *B. thuringiensis* V ou *B. cereus* V. Ce groupe peut contenir des souches cytotoxiques (toxines diarrhéiques).

- **Groupe VI :**

Il s'agit d'un groupe psychrotolerant correspondant à l'espèce *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* ou *B. thuringiensis* VI. Ce groupe ne contient pas des toxines.

- **Groupe VII :**

Il s'agit d'un groupe thermotolérant correspondant à la nouvelle espèce *B. cereus* VII.

Les souches de ce groupe sont généralement très cytotoxiques (toxines diarrhéiques).

## 2. *Bacillus thuringiensis*

### 2.1 Historique

L'utilisation des bactéries pour contrer les insectes nuisibles aux cultures ne remonte guère qu'à quelques décennies. Les Égyptiens possédaient plusieurs collections de bactéries servant à tuer les insectes qui s'attaquaient aux plantations (Auger, 2015). La bactérie *Bacillus thuringiensis* a été isolée initialement en 1901 par le bactériologiste japonais Shigetane Ishiwata à partir de larves mortes de vers à soie (*Bombyx mori*), présentant la maladie sotto. Elle a été alors nommée *Bacillus sotto* (Castella, 2008). Ishiwata a décrit les symptômes observés chez les larves de vers à soie quand elles étaient exposées à ce *Bacillus*.

En 1911, un scientifique allemand, Ernst Berliner, a isolé une bactérie similaire à partir de teignes de farine [*Ephestia Kuenniella* (Zeller)] dans l'état de Thuringe en Allemagne qui a donné le nom à l'espèce et alors renommées *Bacillus thuringiensis* (Castella, 2008). Depuis, différentes souches ont été isolées dans divers habitats tels que le sol, les insectes, la poussière de papillons, et des feuilles de conifères (Helassa, 2008).

Depuis 60 ans cette bactérie est utilisée comme insecticide biologique. Les premiers essais de lutte biologique avec Bt ont été réalisés en Hongrie dans les années 1920 et en Yougoslavie dans les années 1930 pour contrôler principalement les Lépidoptères (Helassa, 2008).

C'est en France, en 1938, que *B. thuringiensis* fût utilisée pour la première fois à titre d'insecticide, et ce, sous le nom générique Sporéine, par la suite, un nouveau produit le thuricide apparut au début des années 1960 (Helassa, 2008).

En 1976, deux découvertes importantes ont permis de démontrer le grand potentiel insecticide de *B. thuringiensis*. Tout d'abord, il y a eu la découverte de la sous-espèce *israelensis*, toxique pour les moustiques et les mouches noires et par la suite, la découverte de la sous-espèce *tenebrionis*, toxique pour les coléoptères, ce qui permis l'ouverture de nouveaux marchés, grâce à une action larvicide sur les moustiques, les similies (vecteurs de

l'onchocercose) et les coléoptères (Suty, 2010). En 1996, plusieurs espèces végétales ont été génétiquement modifiées par des gènes à base de Bt (Nabors, 2008).

### 2.2 Caractéristiques générales

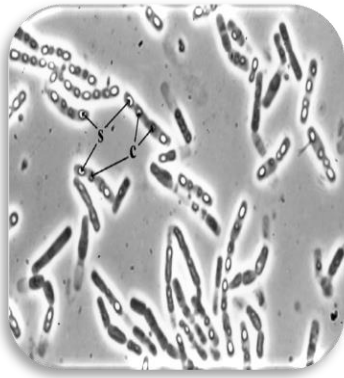
#### 2.2.1 Description de *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie entomopathogène, chimiohétérotrophe, anaérobie ou aérobie facultative, Gram positif, sporulée, ayant des propriétés de résistance à la chaleur et à la déshydratation, se présente habituellement en paire ou en chaîne, pourvue de flagelles mais mobile avec une ciliature pérित्रiche, elle se développe naturellement comme saprophyte et se nourrit de la matière organique morte (Rahbani, 2015).

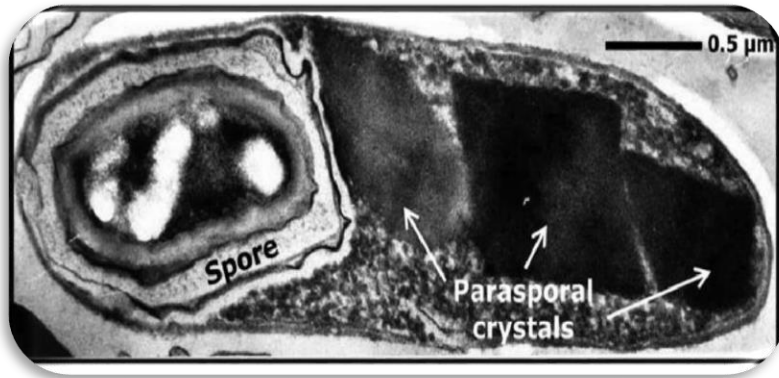
Elle fait partie du groupe *Bacillus cereus* qui comprend six espèces dont *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus thuringiensis* (Rahbani, 2015).

Durant sa phase végétative (active), *B. thuringiensis* à la forme d'un bâtonnet de 5 µm de longueur et de 1 µm de large, ubiquitaire, ce qui signifie que l'on peut la retrouver un peu partout dans la nature; que ce soit dans le sol, sur le feuillage, dans l'eau et même dans l'air (Rahbani, 2015).

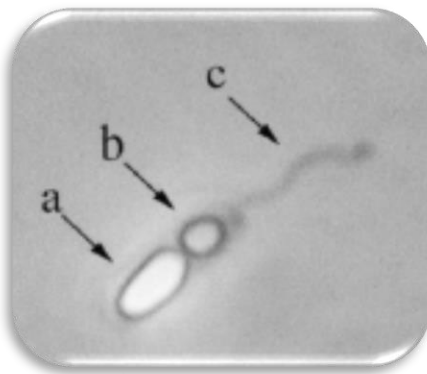
A l'état sporulé, Bt se caractérise par la production d'un cristal parasporal, c'est d'ailleurs par son inclusion cristalline présentant des propriétés entomopathogènes sur les lépidoptères, les diptères et les coléoptères que l'on distingue Bt de *Bacillus cereus* (Helassa, 2008).



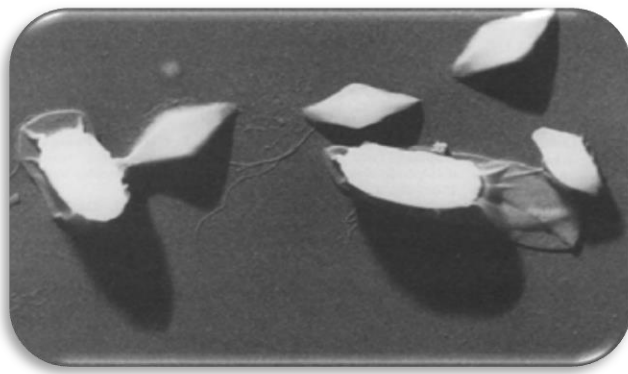
**Figure 1 :** *Bacillus thuringiensis israelensis* au stade de la sporulation. S:spore, C:cristal (Lacoursière et Boisvert, 2004).



**Figure 2 :** *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* en phase de sporulation vue au microscope électronique à transmission, montrant les inclusions cristallines et la spore (Lacoursière et Boisvert, 2004).



**Figure 3 :** *Bacillus thuringiensis* en microscopie en contraste de phase ; a: spore ; b : inclusion parasporale contenant les cristaux de protéines; c : filament (Helassa, 2008).



**Figure 4 :** Cristaux de Bt observés en microscopie électronique à transmission (Helassa, 2008).

## 2.2.2 Classification sérotypique de *Bt*

Le système initial utilisé pour identifier et classier les souches de *B. thuringiensis* était basé sur les caractéristiques morphologiques et biochimiques (El Khoury, 2013). Ce système a été graduellement remplacé par les analyses sérologiques appelées sérotypie. Cette dernière, qui correspond à la réaction immunologique à l'antigène flagellaire H, a permis

l'établissement d'un nouveau système de classification pour *B. thuringiensis*, ce nouveau système a permis de grouper les milliers de souches de *B. thuringiensis* isolés dans le monde entier dans des H-sérotypes (El Khoury, 2013). En 1999, les résultats issus de la sérotypie ont été mis à jour par Lecadet (El Khoury, 2013). Maintenant, il existe 69 H-sérotypes différents et 82 sérovars.

**Tableau 1** : sérotypes de *B. thuringiensis* (Dromigny, 2008).

| Antigènes flagellaires | Sous-espèces de Bt                     | Antigènes flagellaires | Sous-espèces de Bt                      |
|------------------------|----------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|
| H1                     | <i>Bt</i> subsp. <i>Thuringiensis</i>  | H29                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Amagiensis</i>      |
| H2                     | <i>Bt</i> subsp. <i>Finitimus</i>      | H30                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Medellin</i>        |
| H3a,H3c                | <i>Bt</i> subsp. <i>Alesti</i>         | H31                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Toguchini</i>       |
| H3a,H3b,H3c            | <i>Bt</i> subsp. <i>Kurstaki</i>       | H32                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Cameroun</i>        |
| H3a,H3d                | <i>Bt</i> subsp. <i>Sumiyoshiensis</i> | H33                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Leesis</i>          |
| H3a,H3d,H3e            | <i>Bt</i> subsp. <i>Fukuokaensis</i>   | H34                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Konkukian</i>       |
| H4a,H4d                | <i>Bt</i> subsp. <i>Sotto</i>          | H35                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Seoulensis</i>      |
| H4a,H4c                | <i>Bt</i> subsp. <i>Kenya</i>          | H36                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Malaysiensis</i>    |
| H5a,H5c                | <i>Bt</i> subsp. <i>Galleriae</i>      | H37                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Anadalousiensis</i> |
| H5a,H5c                | <i>Bt</i> subsp. <i>canadensis</i>     | H38                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Oswaldocruzi</i>    |
| H6                     | <i>Bt</i> subsp. <i>entomocidus</i>    | H39                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Brasiliensis</i>    |
| H7                     | <i>Bt</i> subsp. <i>Aizawai</i>        | H40                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Huazhongensis</i>   |
| H8a,H8b                | <i>Bt</i> subsp. <i>Morrisoni</i>      | H41                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Sooncheon</i>       |
| H8a,H8c                | <i>Bt</i> subsp. <i>Ostrinae</i>       | H42                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Jinghongiensis</i>  |
| H8b,H8d                | <i>Bt</i> subsp. <i>Nigeriensis</i>    | H43                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Guiyanguebsus</i>   |
| H9                     | <i>Bt</i> subsp. <i>Tolworthi</i>      | H44                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Higo</i>            |
| H10a,H10b              | <i>Bt</i> subsp. <i>darmstadiensis</i> | H45                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Roskildiensis</i>   |
| H10a,H10c              | <i>Bt</i> subsp. <i>Londrina</i>       | H46                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Chanpaisis</i>      |
| H11a,H11b              | <i>Bt</i> subsp. <i>Toumanoffi</i>     | H47                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Wratlaviensis</i>   |
| H11a,H11c              | <i>Bt</i> subsp. <i>kyushuensis</i>    | H48                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Balearica</i>       |
| H12                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Toumanoffi</i>     | H49                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Muju</i>            |
| H13                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Pakistani</i>      | H50                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Navarrensis</i>     |
| H14                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Israelensis</i>    | H51                    | <i>Bt</i> subsp. <i>Xiaquangiensis</i>  |

|                  |                                         |     |                                        |
|------------------|-----------------------------------------|-----|----------------------------------------|
| <b>H15</b>       | <i>Bt</i> subsp. <i>Dokota</i>          | H52 | <i>Bt</i> subsp. <i>Kim</i>            |
| <b>H16</b>       | <i>Bt</i> subsp. <i>Indiana</i>         | H53 | <i>Bt</i> subsp. <i>Asturriensis</i>   |
| <b>H17</b>       | <i>Bt</i> subsp. <i>tohokuensis</i>     | H54 | <i>Bt</i> subsp. <i>Poloniensis</i>    |
| <b>H18a,H18b</b> | <i>Bt</i> subsp. <i>kumamotoensis</i>   | H55 | <i>Bt</i> subsp. <i>Palmanyolensis</i> |
| <b>H18a,H18c</b> | <i>Bt</i> subsp. <i>Yosso</i>           | H56 | <i>Bt</i> subsp. <i>Rongseni</i>       |
| <b>H19</b>       | <i>Bt</i> subsp. <i>tochigiensis</i>    | H57 | <i>Bt</i> subsp. <i>Pirenaica</i>      |
| <b>H20a,H20b</b> | <i>Bt</i> subsp. <i>yunnanensis</i>     | H58 | <i>Bt</i> subsp. <i>Argentinensis</i>  |
| <b>H20a,H20c</b> | <i>Bt</i> subsp. <i>pondicheriensis</i> | H59 | <i>Bt</i> subsp. <i>Iberica</i>        |
| <b>H21</b>       | <i>Bt</i> subsp. <i>Colmeri</i>         | H60 | <i>Bt</i> subsp. <i>Pingluonsis</i>    |
| <b>H22</b>       | <i>Bt</i> subsp. <i>shandongiensis</i>  | H61 | <i>Bt</i> subsp. <i>Sylvestriensis</i> |
| <b>H23</b>       | <i>Bt</i> subsp. <i>Japonensis</i>      | H62 | <i>Bt</i> subsp. <i>Zhaodongensis</i>  |
| <b>H24a,H24b</b> | <i>Bt</i> subsp. <i>neoleonensis</i>    | H63 | <i>Bt</i> subsp. <i>Bolivia</i>        |
| <b>H24a,H24c</b> | <i>Bt</i> subsp. <i>novosibirsk</i>     | H64 | <i>Bt</i> subsp. <i>Azorensis</i>      |
| <b>H25</b>       | <i>Bt</i> subsp. <i>coreanensis</i>     | H65 | <i>Bt</i> subsp. <i>Pulsiensis</i>     |
| <b>H26</b>       | <i>Bt</i> subsp. <i>Silo</i>            | H66 | <i>Bt</i> subsp. <i>Gracioensis</i>    |
| <b>H27</b>       | <i>Bt</i> subsp. <i>mexicanensis</i>    | H67 | <i>Bt</i> subsp. <i>Wazensis</i>       |
| <b>H28a,H28b</b> | <i>Bt</i> subsp. <i>Monterrey</i>       | H68 | <i>Bt</i> subsp. <i>Thailandensis</i>  |
| <b>H28a,H28c</b> | <i>Bt</i> subsp. <i>Jegathesan</i>      | H69 | <i>Bt</i> subsp. <i>Pahangi</i>        |

## 2.2.3 Habitat

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie ubiquitaire largement répandue dans le sol (Rahbani, 2015), vivant à la fois comme saprophyte, utilisant les matières organiques provenant des organismes morts, elle peut occuper des niches écologiques très variées comme les poussières de grains, les cadavres des insectes, les boues activées (Rahbani, 2015), les plantes, les sédiments marins, et les divers habitats aquatiques (Lacourcière et Boisvert, 2004).

*Bacillus thuringiensis* est isolée de plusieurs habitats : les savanes, les forêts, les désert, les eaux douces, et dans des excréments d'animaux (Ndao, 2014).

## 2.2.4 Le cycle de croissance

Le cycle de croissance de *Bt* est caractérisé par deux phases (El Khoury, 2013): phase végétative et phase stationnaire (figure 5).

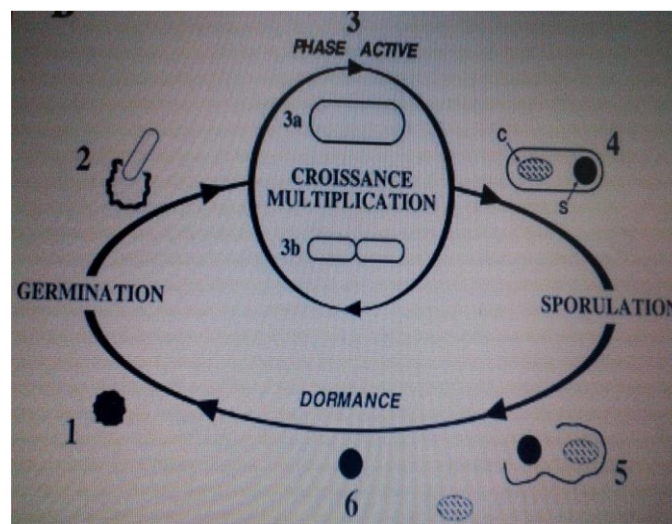


Lors de la phase végétative, la bactérie se divise en deux cellules identiques par scissiparité après formation d'un septum central au niveau de la membrane plasmique.

La phase stationnaire se caractérise par la sporulation qui se fait par division asymétrique de la cellule. Les spores sont une forme de résistance qui assure la conservation et la dispersion de Bt, avant de germer pour donner un nouveau cycle de croissance végétative.

Lorsque la spore se trouve dans des conditions de croissance favorables, elle sera réhydratée et germera pour donner une cellule végétative qui débutera son cycle de croissance. Ce cycle de division se répète pour donner toute une population sécrétant des enzymes nécessaires à la dégradation de la matière nutritive et son assimilation. Une fois le substrat nutritif devient limité, les bactéries rentrent dans la phase stationnaire formant ainsi les spores et les cristaux protéiques

Simultanément à la sporulation, chaque bactérie produit des cristaux protéiques composés d'une ou plusieurs toxines présentant des propriétés insecticides (Drabo, 2005).



**Figure 5 :** Schématisation du cycle vital de *B.thuringiensis*, 1) germination : réhydratation de la spore, 2) germination : production de la cellule végétative, 3) croissance et multiplication des cellules végétatives, 4) sporulation : formation de la spore (s) et de l'inclusion cristalline (c), 5) lyse : éclatement de la cellule végétative et libération de la spore et du cristal, 6) période de dormance : la spore résiste aux conditions défavorables (Lacoursière et Boisvert, 2004).



## 3. Les métabolites secondaires produits par *Bt*

Les membres du genre *Bacillus* sont très connus comme producteurs de substances antimicrobiennes, y compris les antibiotiques peptidiques, les lipopeptides et les bactériocines qui font l'objet de nombreuses études. La variabilité structurale de ces composés a attiré la curiosité des chimistes et leur activité biologique a inspiré l'industrie pour rechercher les premières structures (Abriouel *et al.*, 2011).

### 3.1 Définition

Les métabolites secondaires sont des substances qui ont une large activité biologique (antimicrobiennes, antiviral, immunosuppresseurs, et antitumorales) et qui ne sont pas nécessaires à la croissance de la bactérie, généralement produits pendant la fin de la phase exponentielle de croissance ou pendant la phase stationnaire (Sansinenea et Ortiz, 2011).

### 3.2 Historique

En 1891 Kossel a défini les métabolites secondaires avec exclusion composés qui n'appartiennent pas à des métabolites primaires provoquant des critiques qui n'ont jamais cessé. Le concept généralement accepté est que les métabolites primaires sont des composés chimiques des organismes vivants qui sont vital pour leur fonctionnement tandis que les métabolites secondaires sont des composés dispensables (Sansinenea et Ortiz, 2011).

### 3.3 Utilisation

Les métabolites secondaires sont utilisés contre les bactéries, les champignons, les amibes, les plantes, les insectes et les animaux. Utilisés aussi comme agent de transport des métaux, des agents symbiotiques entre microbes et plantes, nématodes et insectes et les animaux supérieurs, même comme des hormones sexuelles et effecteurs de différenciation (Chaabouni *et al.*, 2012).

## 4. Les principaux métabolites secondaires de *Bacillus thuringiensis*

Les métabolites secondaires produits par le genre *Bacillus* sont relativement moins reconnu par rapport à ceux produits par les bactéries lactiques malgré leur large spectre antimicrobien et leurs hautes activités parmi ces derniers :

### 4.1 Les Bactériocines

#### 4.1.1 Généralités

La découverte des bactériocines remonte au début du 20ème siècle lorsque Gratia (1925) démontra l'existence d'une substance inhibitrice, thermostable, provenant d'un

dialysat d'un milieu de culture d'*Escherichia coli* V (Taale, 2016). Cette substance nommée colicine V inhibe la croissance d'une autre souche d'*Escherichia coli*.

### 4.1.2 Définition et caractéristiques principales

La définition qui était la plus acceptée donnée aux bactériocines est celle de Klaenhammer qui les définit en tant que protéines ou complexes de protéines a un effet soit bactéricide provoquant la mort de la bactérie cible, soit bactériostatique inhibant la mort de la bactérie cible (Taale, 2016).

Elles sont des peptides antimicrobiens, synthétisées au niveau du ribosome, subissant des modifications post-traductionnelles telles que la déshydrations (Taale, 2016). Leur poids moléculaire est relativement petit (2-6 kDa) ce qui leur permet d'accéder aux cellules cibles et perméabiliser la membrane en se liant à des récepteurs de surface (Taale, 2016).

Cependant, des études récentes ont démontré qu'il existe certaines qui sont actives également contre des bactéries à Gram négatif. Ils se sont avérés actifs à des températures relativement élevés et sur une large plage de pH (Taale, 2016).

Les bactériocines se différencient par leur poids moléculaire, leurs propriétés biochimiques, leur origine génétique, ainsi que par leur spectre et mode d'action (Taale, 2016).

### 4.1.3 Nature

Les bactériocines sont des protéines ou des complexes de protéines constituées généralement de 30 à 60 acides aminés. Ces substances peuvent être des protéines simples comme elles peuvent être associées à une partie lipidique ou glucidique (Taale, 2016).

### 4.1.4 Nomenclature

La nomination des bactériocines est attachée soit au genre ou à l'espèce de la première souche productrice en ajoutant le suffixe "cine" pour indiquer le pouvoir létal (Taale, 2016).

### 4.1.5 Classification des bactériocines

Selon Makhoulfi (2011), l'élucidation ces dernières années de la structure, du mode d'export et du mécanisme d'action des différentes bactériocines a rendu leur classification assez difficile. C'est pourquoi plusieurs classifications ont été proposées par divers auteurs :

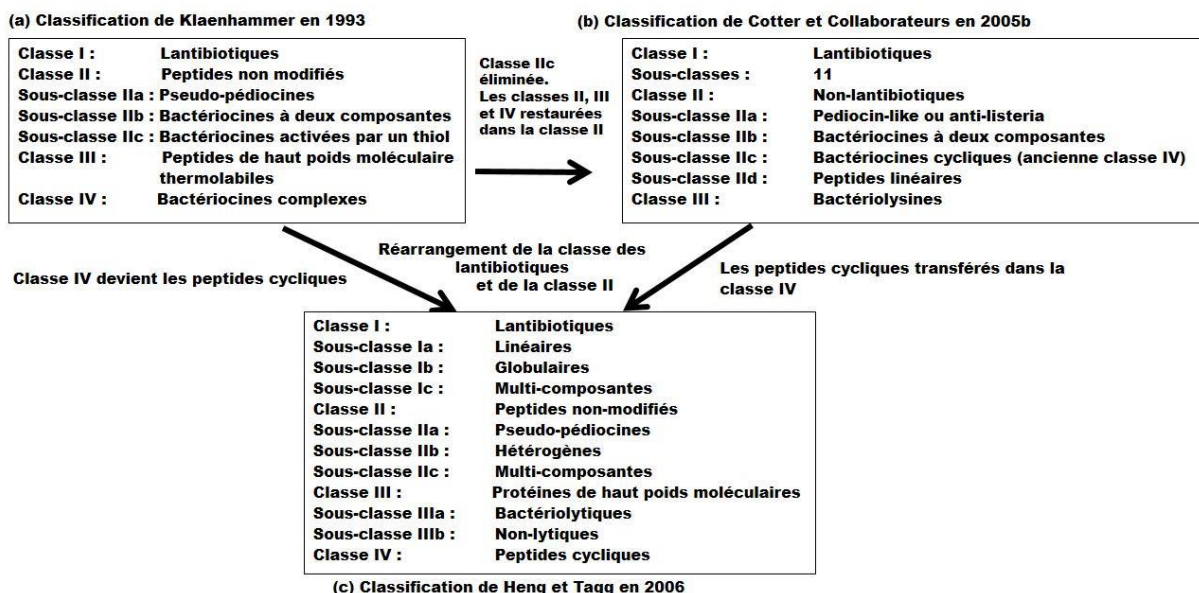
Klaenhammer a proposé de classer les bactériocines en quatre principales classes en se basant sur leurs structures primaires et tridimensionnelles et sur leurs modes d'action (Makhoulfi, 2011).

- La classe I regroupant les bactériocines modifiées post-traductionnellement appelées lantibiotiques.
- la classe II renfermant les bactériocines non modifiées et thermo-résistantes appelées « pediocin-like ».
- La classe III renferme les bactériolysines qui sont des protéines thermosensibles pourvues d'activité enzymatique.
- la classe IV dans laquelle se trouvent les bactériocines complexes.

La classification récente des bactériocines est celle de Cotter *et al.* (2005) qui regroupe les bactériocines en trois classes : les lantibiotiques, les non-lantibiotiques et les bactériolysines.

Une nouvelle classification des bactériocines proposée par Heng et Tagg en (2006) est considérée comme universelle car elle prend en compte les bactériocines produites par les bactéries à Gram positives et les bactéries à Gram négatives. Cette classification divise les bactériocines en quatre classes avec des sous-groupes (Figure 6). On distingue la classe des lantibiotiques, la classe des peptides non-modifiés, la classe des protéines de haut poids moléculaire et la classe des peptides cycliques.

La figure 6 a été proposée en se référant aux travaux de Klaenhammer (1993), de Cotter *et al.* (2005) et de Heng et Tagg (2006).



**Figure 6:** Classification universelle des bactériocines

(a) Classification proposée par Klaenhammer (1993),

(b) Classification proposée par Cotter *et al.* (2005),

(c) Classification proposée par Heng et Tagg (2006).

4.1.6 Les bactériocines de *B. thuringiensis*

*B. thuringiensis* a la capacité de produire divers types de bactériocine.

**Tableau 2 :** Les bactériocines produits par *B. thuringiensis*

| Souche de Bt                                                    | Bactériocine                   | Souches sensibles                                                | Effets biologiques             | Références                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>B. thuringiensis</i> BMG 1.7</b>                          | Thuricine 7                    | <i>Streptococcus pyogenes</i> et <i>Listeria monocytogenes</i> . | Bactéricide                    | Cherif <i>et al.</i> (2001).<br>Ahern <i>et al.</i> (2003).<br>Gray <i>et al.</i> (2006).<br>Sansinenea et Ortiz (2011).<br>Chehimi <i>et al.</i> (2012). |
| <b><i>B. thuringiensis</i> B 439</b>                            | Thuricine 439 A et thuricine B | <i>B. cereus</i> , <i>Listeria innocua</i>                       | Bactericide<br>Bactériolytique | Ahern <i>et al.</i> (2003).<br>Gray <i>et al.</i> (2006).<br>Sansinenea et Ortiz (2011).                                                                  |
| <b><i>B. thuringiensis</i> subsp <i>thochigiensis</i> HD868</b> | Tochicine                      | Les souches de Bt et <i>B. cereus</i> .                          | Bactéricide                    |                                                                                                                                                           |
| <b><i>B. thuringiensis</i> subsp <i>entomocidus</i> HD 9</b>    | Entomocine 9                   | <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .  | Bactericide                    | Cherif <i>et al.</i> (2003).<br>Sansinenea et Ortiz (2011).                                                                                               |
| <b><i>B. thuringiensis</i> HD2</b>                              | Thuricine HD2                  | Gram+ et ( <i>B.megaterium</i> , <i>B.polymyxa</i> )             | Bactericide                    | Gray <i>et al.</i> (2006).<br>Sansinenea et Ortiz (2011).                                                                                                 |
| <b><i>B. thuringiensis</i> subsp <i>Kurstaki</i> BUPM 4</b>     | Bacthuricine F 4               | Différents espèces de <i>Bacillus</i> .                          | Bactéricide                    | Gray <i>et al.</i> (2006).<br>Sansinenea et Ortiz (2011).<br>Chehimi <i>et al.</i> (2012).                                                                |

|                                                                                                            |                     |                                                                                                                 |             |                                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------------------------------------------------|
| <b>B.</b><br><b><i>thuringiensis</i></b><br><b>NEB 17</b>                                                  | Thuricine 17        | <i>B. cereus</i><br>ATCC 14579<br><br><i>B.thuringiensis</i><br><i>ssp.</i><br><i>thuringiensis Btl</i><br>267. | Bactéricide | Gray <i>et al.</i> (2006).<br>Chehimi <i>et al.</i> (2012). |
| <b>B.</b><br><b><i>thuringiensis</i></b><br><b>subsp</b><br><b><i>morrisoni</i></b><br><b>(LBIT 269)</b>   | Morricine<br>269    | <i>B. cereus</i> et<br>d'autres Gram+<br>ainsi sur les<br>Gram- ( <i>Vibrio</i><br><i>choléra</i> )             | Bactéricide | Barboza-Corona <i>et al.</i><br>(2007).                     |
| <b>B.</b><br><b><i>thuringiensis</i></b><br><b>subsp</b><br><b><i>kenyae</i></b><br><b>(LBIT 404)</b>      | Kenyacine<br>404    |                                                                                                                 |             |                                                             |
| <b>B.</b><br><b><i>thuringiensis</i></b><br><b>subsp</b><br><b><i>tolworthi</i></b><br><b>(LBIT 524)</b>   | Tolworthcine<br>524 |                                                                                                                 |             |                                                             |
| <b>B.</b><br><b><i>thuringiensis</i></b><br><b>subsp</b><br><b><i>entomocidus</i></b><br><b>(LBIT 420)</b> | Entomocine<br>420   |                                                                                                                 |             |                                                             |
| <b>B.</b><br><b><i>thuringiensis</i></b><br><b>subsp</b><br><b><i>kurstaki</i></b><br><b>(LBIT 287)</b>    | Kurstacine<br>287   |                                                                                                                 |             |                                                             |
| <b>B.</b>                                                                                                  | Entomocine          | <i>Listeria</i>                                                                                                 | Bactericide | Cherif <i>et al.</i> (2008).                                |

|                                                                                              |                      |                                                                                                                     |                                |                                                                                                                          |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>thuringiensis</i></b><br><b>subsp</b><br><b><i>entomocidus</i></b><br><b>HD110</b>     | 110                  | <i>monocytogenes</i> ,<br><i>Paenibacillus</i><br><i>larvae</i> et<br>différents<br>espèces de<br><i>Bacillus</i> . |                                | Chehimi <i>et al.</i> (2012).                                                                                            |
| <b><i>B. thuringiensis</i></b><br><b>SF 361</b>                                              | Thuricine H          | <i>B. cereus</i> F<br>4552.                                                                                         | Bactéricide                    | Lee <i>et al.</i> (2009).                                                                                                |
| <b><i>B. thuringiensis</i></b><br><b>subsp</b><br><b><i>entomocidus</i></b><br><b>HD 198</b> | Thuricine S          | <i>B. thuringiensis</i><br>subsp<br><i>darmastadiensis</i>                                                          | Bactériolytique<br>Bactéricide | Chehimi <i>et al.</i> (2010).<br>Sansinenea et Ortiz (2011).<br>Chehimi <i>et al.</i> (2012).                            |
| <b><i>B. thuringiensis</i></b><br><b>BUPM 103</b>                                            | Bacthuricine<br>F103 | <i>Listeria</i><br><i>monocytogenes</i> ,<br><i>B. cereus</i> .<br><i>Agrobacterium</i><br><i>tumefaciens</i>       | Bactéricide,<br>antimicribien. | Kamoun <i>et al.</i> (2011).                                                                                             |
| <b><i>B. thuringiensis</i></b><br><b>DPC 6431</b>                                            | Thuricine<br>CD      | <i>Clostridium</i><br><i>difficile</i> .                                                                            | Bactericide<br>Bactériolytique | Sansinenea et Ortiz (2011).<br>Chehimi <i>et al.</i> (2012).<br>Rea <i>et al.</i> (2014).<br>Taale <i>et al.</i> (2016). |
| <b><i>B. thuringiensis</i></b><br><b>subsp</b><br><b><i>entomocidus</i></b><br><b>HD 198</b> | Thuricine S          | <i>B. thuringiensis</i><br>subsp<br><i>darmastadiensis</i>                                                          | Bactériolytique<br>Bactéricide | Chehimi <i>et al.</i> (2010).<br>Sansinenea et Ortiz (2011).<br>Chehimi <i>et al.</i> (2012).                            |

#### 4.1.7 Mode et mécanisme d'action des bactériocines

##### 4.1.7.1 Mode d'action des bactériocines

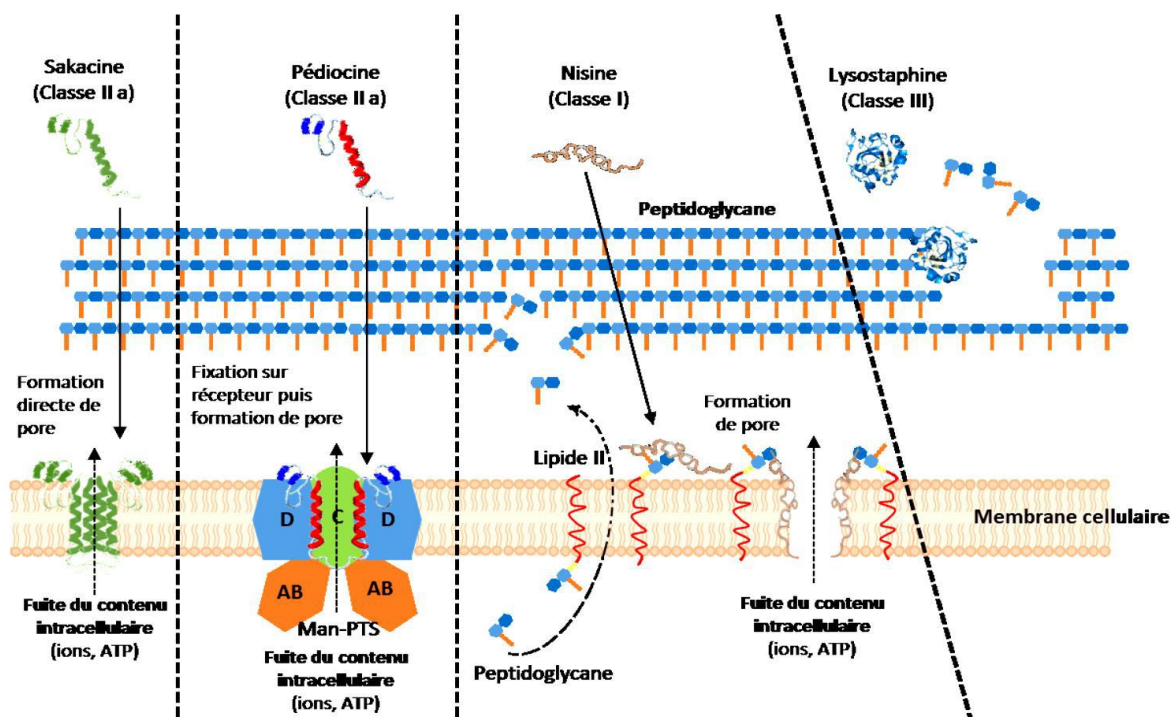
Le mode d'action des bactériocines sur une bactérie cible se fait par adsorption sur la surface cellulaire suivie d'un effet létal. Le mode d'action peut se faire par : un effet

bactériostatique ; un effet bactéricide au cours duquel les bactéries meurent tout en gardant leur intégrité physique car il n'y a pas eu de lyse cellulaire et un effet bactériolytique conduisant à une dissolution de la cellule bactérienne. L'état physiologique de la bactérie productrice et les conditions expérimentales (concentration et pureté de la bactériocine, concentration de la cellule cible et milieu de culture) peuvent influencer l'activité des bactériocines (Taale, 2016). Enfin, la combinaison de plusieurs bactériocines permet d'augmenter leur activité et leur spectre d'action (Dortu et Thonart, 2009). Le mode d'action diffère d'un groupe à un autre.

#### 4.1.7.2 Mécanisme d'action générale des bactériocines

Le mécanisme d'action des bactériocines se décompose en trois étapes :

- la fixation du peptide sur la membrane de la cellule cible. Durant cette étape le peptide adopte sa conformation tridimensionnelle lui permettant d'exprimer son activité,
- l'insertion de la bactériocine dans la membrane cytoplasmique. Au cours de cette étape, plusieurs peptides antibactériens sont recrutés pour former un pore,
- la formation du pore conduit à des fuites de composés intracellulaires vitaux (Figure 7). Cette perte entraîne des effets néfastes pour la cellule cible, allant d'un simple ralentissement de la vitesse de croissance bactérienne à la mort cellulaire.



**Figure 7 :** Schéma montrant les principaux mécanismes d'action des bactériocines produites par les bactéries à Gram positives (Fernandez, 2014).

### 4.1.8 Applications des bactériocines

Ces dernières décennies, les bactériocines compte tenu de leur innocuité ont été proposées pour plusieurs applications.

#### 4.1.8.1 Applications en Agroalimentaire

La bioconservation d'un aliment consiste à augmenter sa durée de vie et à améliorer sa sécurité sanitaire en utilisant des microorganismes et /ou leurs métabolites (Taale, 2016). De plus, les bactériocines ne sont pas toxiques pour les cellules eucaryotes et perdent leur activité en présence des protéases dans le tractus gastro-intestinal ; d'où l'intérêt accru porté à leurs applications ces dernières décennies. Le tableau V illustre quelques bactériocines utilisées dans le monde pour augmenter la durée de vie de certains aliments.

**Tableau 3 :** Quelques bactériocines utilisées dans la conservation des aliments (Galvez *et al.*, 2011).

| Application                | Bactériocine       | Classe | Effet                                                                                                                                         |
|----------------------------|--------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dans les produits laitiers | Nisine             | I      | Prévenir la prolifération d'endospores de <i>Clostridium botulinum</i> et la contamination par <i>Listeria monocytogenes</i> dans le fromage. |
|                            | Lacticine 3147     | I      | Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les yaourts naturels et le fromage écrémé                                                    |
|                            | Pédiocine PA-1/AcH | Iia    | Inhibition de <i>Listeria</i>                                                                                                                 |



|                                            |                          |                                                                                     |     |                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                            |                          |                                                                                     |     | <i>monocytogenes</i><br>dans les fromages<br>blancs, crèmes et<br>sauces à base de<br>fromage.                                                             |
|                                            | <b>Entérocline AS-4S</b> |                                                                                     | IIc | Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> et<br>inhibition lente de<br><i>Staphylococcus aureus</i> dans le lait<br>écrémé.                              |
| Dans les<br>viandes et<br>les<br>volailles | <b>Nisine</b>            | En<br>combinaison<br>avec<br>des acides<br>organiques,<br>lysozyme et<br>chélateurs | I   | Décontamination des<br>surfaces de<br>préparations de<br>viandes crues.                                                                                    |
|                                            |                          | sous forme de<br>film, activée<br>par de l'EDTA                                     | I   | Inhibition des<br>entérobactéries et<br>des<br>espèces appartenant<br>à <i>Carnobacterium</i><br>dans les tranches de<br>bœuf pendant la<br>réfrigération. |
|                                            |                          | En<br>combinaison<br>avec                                                           | I   | Inhibition<br><i>d'Escherichia coli</i> et<br>des                                                                                                          |

|                   |                  |                                       |     |                                                                                               |
|-------------------|------------------|---------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
|                   |                  | Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH) |     | <i>Staphylococcus</i> sp. dans le jambon cuit.                                                |
|                   | <b>Pédiocine</b> |                                       | Iia | Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les viandes crues.                           |
| Dans les Poissons | <b>Nisine</b>    | Traitée à la chaleur (65°C)           | I   | Inhibition totale de <i>Listeria innocua</i> dans le caviar d'esturgeon ou de saumon (ikura). |
|                   |                  | Immobilisée à des films plastiques    | I   | Inhibition de <i>Listeria monocytogenes</i> dans le saumon fumé pendant la réfrigération.     |

#### 4.1.8.2 Applications médicales des bactériocines

L'émergence de la résistance aux antibiotiques conventionnels ces dernières années a orienté la recherche vers l'étude de nouveaux agents antimicrobiens tels que les bactériocines.

**Tableau 4:** les principaux bactériocines utilisées dans le domaine médical.

| La Bactériocine       | Espèce productrice                 | Microorganismes notables sensibles                                                     | Le traitement                     | Référence                 |
|-----------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| <b>La mersacidine</b> | <i>Bacillus</i> sp. HIL Y-85,54728 | <i>Listeria</i> ,<br><i>Staphylococcus</i><br><i>Propionibacterium</i><br><i>acnes</i> | Traitements d'infections cutanées | Sass <i>et al.</i> (2008) |

|                             |                                                       |                                                           |                                      |                             |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|
| <b>salivaricine A2 et B</b> | <i>Streptococcus salivarius</i>                       | bactéries responsables de la mauvaise haleine             | Traitements de la gingivite          | Tagg (2004)                 |
| <b>La subtilosine A</b>     | <i>B. subtilis</i>                                    | <i>L. monocytogenes</i> ,<br><i>Gardnerella vaginalis</i> | Traitements des infections vaginales | Sutyak <i>et al.</i> (2008) |
| <b>la nisine A</b>          | <i>Staphylococcus sp.</i> et <i>Streptococcus sp.</i> | <i>S. aureus</i> ,<br><i>Streptococcus agalactiae</i>     | Traitements de la mastite            | Cotter <i>et al.</i> (2005) |

#### 4.1.8.3 Impact économique des bactériocines

Les bactériocines sont utilisées sous forme purifiée, semi-purifiée ou sous la forme d'un concentré obtenu après fermentation d'un substrat qu'elle nécessite alimentaire comme le lait ou la viande (Makhloufi, 2011).

Outre la forme lyophilisée (Taale, 2016), plusieurs formes de conditionnement des bactériocines sont de nos jours proposées : l'adsorption des bactériocines dans les particules de silicone, l'encapsulation dans les liposomes ou l'incorporation dans différents matériaux (alginate de calcium, cellulose, protéines de soja, films de polysaccharides) (Taale, 2016).

Néanmoins, le commerce des bactériocines connaît un taux de croissance annuel de 2 – 3% et a atteint un chiffre d'affaire de plus de 24 milliards de dollars US en 2007 (Taale, 2016). La commercialisation de la nisine occupe la part la plus importante car elle est à ce jour la seule bactériocine autorisée par la FAO à être utilisée comme additif alimentaire. Ces dernières années la production et la commercialisation des différentes bactériocines ont atteint des valeurs records car en suivant le taux de croissance annuel ; aujourd'hui on atteint un chiffre d'affaire de plus de 50 milliards de dollars US. Les principales sociétés productrices sont Danisco A/S (Danemark), Royal DSM (Hollande), Kerry Group Plc (Irlande), Rhodia S.A. (France), Sysco Foods (USA), Schreiber Foods (USA), etc.

L'utilisation des halocines dans les industries du textile permet de limiter la croissance des organismes halophiles présents à cause de l'emploi massif de sel lors des procédés de tannage. Cette utilisation réduirait les coûts de production (Taale, 2016).

## 4.2 Les delta-endotoxines (protéines Cry et Cyt)

### 4.2.1 Généralité

Lors de la sporulation, Bt synthétise des inclusions de cristaux essentiellement composés de une ou plusieurs protéines cristales (Cry) et cytolytiques (Cyt) (Girard, 2008). Elles sont aussi appelées  $\delta$ -endotoxines (Brunet, 2009), et peuvent représenter 20 à 30 % du poids sec des cellules sporulées (Helssa, 2008). Elles ont généralement une forme pyramidique, cubique, rectangulaire, sphérique, et parfois irrégulière (Barnabé, 2004).

#### ➤ Les protéines Cry

Ce sont synthétisées sous forme de protoxines d'environ 70 kDa ou 90 kDa, dont la forme toxique est de 66-67 kDa (Helessa, 2008). Elles appartiennent à la classe des PFT (Pore-Forming Toxin) dans la catégorie des toxines en hélices- $\alpha$ , pour les quelles les hélices forment un pore transmembranaire (Dubois, 2013). Ces toxines sont excrétées par la bactérie productrice, activées par les protéases de l'hôte puis se lient aux récepteurs membranaires de la cellule cible par la formation d'une oligomère capable de s'insérer dans la membrane cellulaire (Yezza, 2005).

Plus de 500 protéines Cry ont été découvertes chez *B. thuringiensis* et *cereus* (Crickmore *et al.*, 2014) ciblant des insectes différents tels que les Lépidoptères, les Diptères, les Coléoptères mais aussi les Hyménoptères, les Homoptères, les Orthoptères, les Mallophages, les Nématodes, les mites et les protozoaires (Ninaon, 2007).

#### ➤ Les protéines Cyt

Ces protéines sont codées par des gènes plasmidiques et leur taille oscille autour de 25 kDa. Contrairement aux protéines Cry qui elles, demandent une interaction spécifique avec des récepteurs cellulaires et une activation par des protéases, les protéines Cyt interagissent directement avec les lipides membranaires des cellules et pénètrent dans la membrane pour ainsi former un pore (Auger, 2015).

Ces protéines peuvent notamment agir en synergie avec certaines protéines Cry afin d'augmenter leur toxicité sur les insectes. Il a également été démontré que les protéines Cyt peuvent aider à contrer la résistance des moustiques envers les protéines Cry. Cependant, il est bien connu que les protéines Cyt possèdent un pouvoir hémolytique et non spécifique envers différents types de cellules. C'est pourquoi la compréhension exacte de leur mode d'action reste à déterminer afin d'en faire un insecticide sécuritaire et efficace. Le manque de

spécificité de la toxine semble néanmoins être le principal inconvénient quant à leur utilisation (Auger, 2015).

### 4.2.2 Nomenclature et classification

La première nomenclature a fait son apparition en 1989 et celle-ci était principalement basée sur l'activité insecticide des toxines de *B. thuringiensis* (Castella, 2008). Les protéines Cry et Cyt étaient donc classées selon leur spectre d'activité contre certains groupes d'insectes ainsi que selon leurs structures primaires basées sur leurs séquences d'ADN.

Afin de répondre à la forte croissance de découvertes de protéines Cry et Cyt, l'élaboration d'une nouvelle nomenclature était nécessaire (Auger, 2015). Celle-ci suggère un classement des protéines Cry et Cyt par rapport à leurs séquences d'acides aminés et abolit également les chiffres romains au profit des chiffres arabes donnant quatre rangs hiérarchiques composés de chiffres, de lettres majuscules et minuscules, en fonction de sa place dans l'arbre phylogénétiques (Castella, 2008 ; El-Khoury, 2013).

- Le premier rang : représente par un nouveau chiffre arabe, permet de différencier les toxines possédant moins de 45 % d'homologie avec une protéine connue (Paris, 2010).
- Le deuxième rang : représente par une lettre majuscule, permet de différencier les toxines possédant de 45 à 78 % d'homologie de séquence protéique (Cry 4A, Cry 4B,...) (Paris, 2010).
- Le troisième rang : représente par une lettre minuscule, permet de différencier les toxines possédant de 78 à 95 % d'identité de séquence protéique (Cry 4Aa, Cry 4Ab,...) (Paris, 2010).
- Le quatrième rang : indiqué par un nombre correspond aux toxines présentant plus de 95 % (Castella, 2008).

En effet, de façon générale, la classe 1 est spécifique des Lépidoptères, la classe 2 est des Lépidoptères et les Diptères, la classe 3 des Coléoptères et la classe 4 des Diptères (Helessa, 2008).

Une classe 5 supplémentaire a été ajoutée ultérieurement, dirigée contre les Lépidoptères et Coléoptères (Helssa, 2008).

Le tableau 5 représente la classification des  $\delta$ -endotoxines les mieux caractérisées.

**Tableau 5:** Diversité des protéines Cry (Abdoulaye, 2005).

| δ-endotoxines |                    |              | Sérotypes de Bt                                        | Forme du cristal |
|---------------|--------------------|--------------|--------------------------------------------------------|------------------|
| Classe        | S/classe           | Taille (KDa) |                                                        |                  |
| <b>Cry 1</b>  | A, B, C, D, E et F | 130-140      | <i>kurstaki, berliner, entomocidus, aizawai, kenya</i> | bipyramidale     |
| <b>Cry 2</b>  | A et B             | 71           | <i>kurstaki</i>                                        | cubique          |
| <b>Cry 3</b>  | A et B             | 68-73        | <i>tenebrionis</i>                                     | rhomboédrique    |
| <b>Cry 4</b>  | A et B             | 125-145      | <i>israelensis</i>                                     | sphérique        |
| <b>Cry 5</b>  | A                  | 81           | <i>kurstaki</i>                                        | bipyramidale     |

#### 4.2.3 Gènes codants pour des protéines Cry

Les gènes codants des protéines Cry ont été nommés gènes cry et leurs emplacements de synthèse situés sur des plasmides de Bt (Ninaon, 2007) de poids moléculaire compris entre 1,5 à 180 KDa, chaque bactérie pouvant contenir de 2 à 17 plasmides. Les gènes de cristaux sont transcrits par une ARN polymérase spécifique à la sporulation (Lamontagne, 2004). Depuis, le nombre de séquences des gènes (codants pour les protéines Cry et Cyt est passé de 14 à plus de 250.

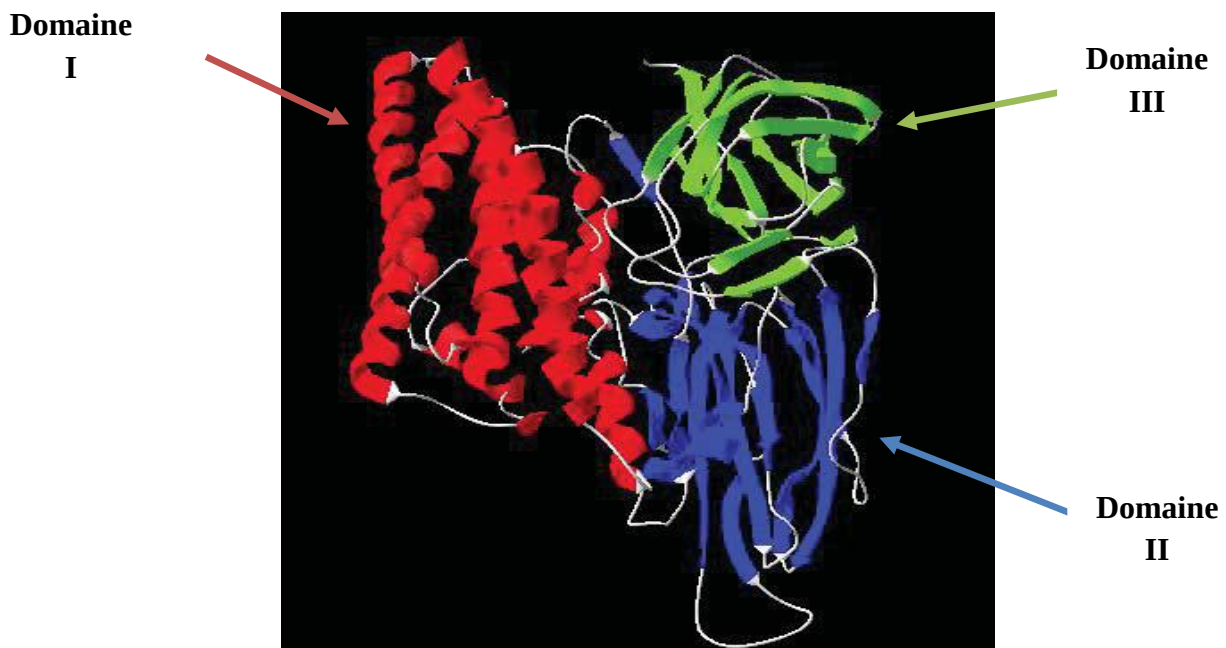
#### 4.2.4 Structure moléculaire des toxines Cry à trois domaines

La description topologique des trois domaines de la majorité des toxines Cry peut maintenant être donnée grâce à la résolution des structures cristallines de huit toxines différentes, soit Cry3Aa, Cry1Aa, Cry2Aa, Cry3Bb, Cry1Ac, Cry4Ba, Cry4Aa et Cry8Ea (Brunet, 2009).

Ces huit structures, dont l'une est représentée dans la figure 8, montrent d'abord à quel point la structure tridimensionnelle de ces toxines est remarquablement conservée malgré la faible homologie entre leur structure primaire respective.

- Le domaine I : ce domaine est constitué de 7 hélices  $\alpha$  reliées entre elles par des boucles (Griko *et al.*, 2010).

- Le domaine II est constitué de 3 feuillets  $\beta$  antiparallèles. Les feuillets  $\beta$  sont emballés autour d'un noyau central hydrophobe formant une structure dite «  $\beta$ -prisme ». (Griko *et al.*, 2010).
- Le domaine III, quant à lui, se présente sous la forme de deux feuillets- $\beta$  antiparallèles légèrement repliés et superposés l'un à l'autre (sandwich- $\beta$ ) (Griko *et al.*, 2010).



**Figure 8** : Structure tridimensionnelle d'une toxine Cry et ces 3 domaines (Paris, 2010).

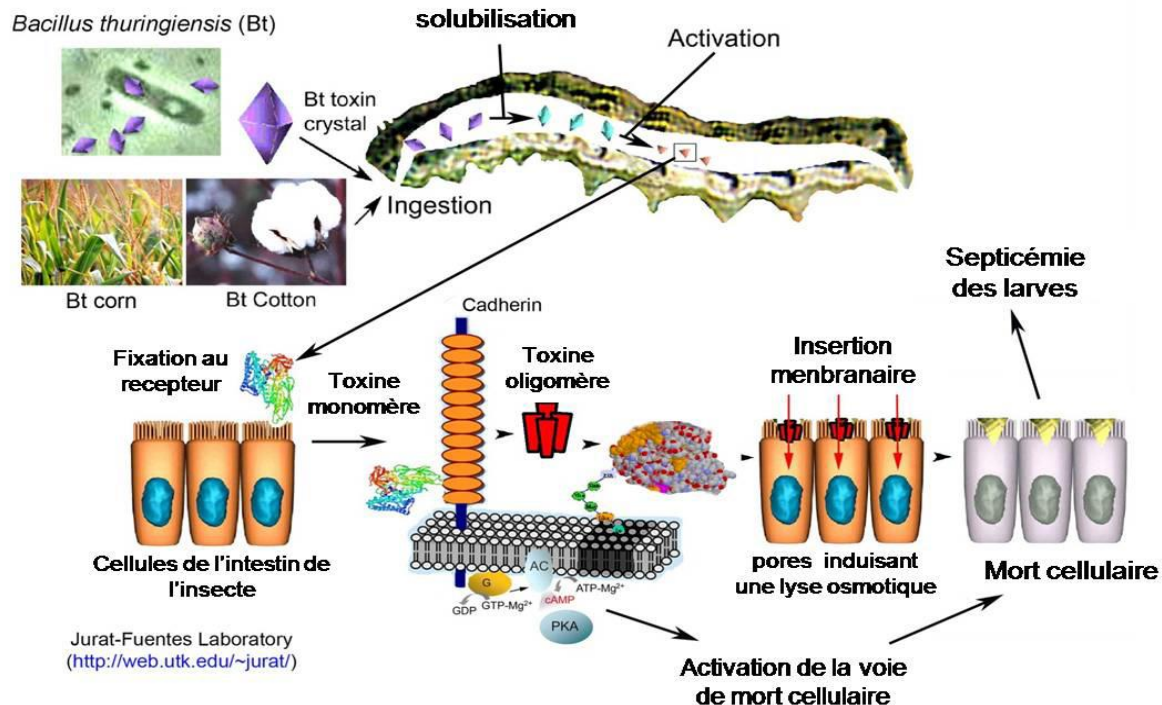
#### 4.2.5 Mode d'action des $\delta$ -endotoxines

Le mode d'action des protéines Cry est aujourd'hui connu. Les protéines cristallisées exercent leurs effets sur l'hôte en lysant les cellules épithéliales de l'intestin moyen et en provoquant la paralysie du tube digestif.

L'insecte infecté cesse de se nourrir et finit par mourir s'il ne parvient pas à se rétablir. Une fois ingérés, les cristaux se dissolvent dans l'environnement alcalin de l'intestin moyen de l'hôte. La protéolyse de la protéine cristallisée solubilisée ou protoxine produit le fragment toxique, la toxine. Après avoir été ingéré, le cristal est dissout, puis partiellement digéré. La toxine se fixe alors sur des récepteurs spécifiques de l'intestin moyen de l'insecte. Elle y forme des pores transmembranaires conduisant à un influx d'électrolytes et d'eau aboutissant à la lyse des cellules épithéliales.

Cette destruction progressive des structures du tube digestif permet la germination des spores ingérées avec le cristal et la multiplication végétative des cellules bactériennes dans

l'hémocoel. Ainsi, les tissus de l'insecte sont peu à peu envahis, si bien que la larve cesse de s'alimenter et finalement meurt (Ninaon, 2007). L'affaiblissement de l'insecte est parfois précipité par l'intervention d'autres agents infectieux.



**Figure 9** : mode d'action insecticide de Bt (Vega et Kaya, 2012)

## 4.2.6 Effet insecticide

Depuis leur première mise en marché dans les années 1930, les toxines insecticides produites par Bt sont demeurées les biopesticides les plus utilisés dans le monde. En agriculture et en foresterie, appliquées comme insecticides ou directement intégrées au sein de plantes modifiées génétiquement, elles contrôlent la prolifération souvent dramatique de plusieurs lépidoptères et coléoptères nuisibles. En santé publique, leur application a permis de réduire radicalement certaines populations de diptères porteurs de maladies transmissibles à l'être humain (Brunet, 2007).

Des souches de Bt ont été trouvées avec  $\delta$ -endotoxine qui est actif contre un grand nombre d'insectes nuisibles et certains d'autres organismes c-à-d. Lépidoptère, Homoptère, nématode, protozoaire, mites, mallophages, hyménoptères, diptères, coléoptères (Lamri, 20015).



**Tableau 6** : spectre d'action de quelques souches de Bt (Lydie, 2010).

| Souche de Bt                                            | Insecte cible             |
|---------------------------------------------------------|---------------------------|
| <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Kurstaki</i>    | Lépidoptères, Coléoptères |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Israelensis</i> | Larves de diptères        |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Tenebrionis</i> | Coléoptères               |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Aizwai</i>      | Lépidoptères              |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Galleriae</i>   | Lépidoptères              |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Japonensis</i>  | Coléoptères du sol        |
| <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>Xentari</i>     | Lépidoptères              |

#### 4.2.7 Effet antimicrobien

Quelques travaux (Yudina *et al.*, 2004 ; Knaak *et al.*, 2007 ; Yudina *et al.*, 2007 ; Cahan *et al.*, 2008) ont traité de l'effet antimicrobien des toxines Cry et Cyt.

L'effet antimicrobien des toxines Cry a été étudié seulement sur des bactéries anaérobies strictes (archaeobactéries et *Clostridium*) et des moisissures.

L'effet antimicrobien des toxines Cyt de *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* a été étudié sur *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (Figure 6).

**Tableau 7**: Effet antimicrobien des toxines Cry et Cyt (Yudina *et al.*, 2004 ; Knaak *et al.*, 2007 ; Yudina *et al.*, 2007 ; Cahan *et al.*, 2008).

| Etude                       | Sérotypes de Bt                                           | Toxines Cry et Cyt                      | Microorganismes testés                                                 | Effet antimicrobien |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b>Yudina et al. (2004)</b> | <i>kurstaki</i>                                           | Cry 1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A et Cry2B | <i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> , <i>methanosarcina barkeri</i> | Bacterio- statique  |
|                             | <i>amgiensis</i><br><i>monterry</i><br><i>israelensis</i> | Toxines Cry<br>Toxines Cry<br>Cry11A    | <i>M.Arboriphilus</i> et<br><i>M. barkeri</i>                          | Bacterio-statique   |
|                             | <i>kurstaki</i>                                           | Cry1A                                   | <i>Clostridium butyricum</i><br>et <i>Cl.acetonobutylicum</i>          | Bacterio-statique   |

|                           |                                                   |                  |                                                                                                                |                   |
|---------------------------|---------------------------------------------------|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| (2007)                    | <i>tenebrionis galleriae</i>                      | Cry3Aa<br>Cry1D  | <i>Cl. butyricum</i><br><i>Cl. Acetobutylicum</i> et <i>M. barkeri</i>                                         | Bacterio-statique |
| Cahan<br>et al.<br>(2008) | <i>israelensis</i>                                | Cyt1Aa           | <i>Escherichia coli</i>                                                                                        | bactericide       |
|                           |                                                   |                  | <i>staphylococcus aureus</i>                                                                                   | Bacterio-statique |
| (Knaak<br>et al,<br>2004) | <i>thuringiensis</i> 407<br><i>kurstaki</i> HD-73 | Cry1Ab<br>Cry1Ac | <i>Rhizoctonia solani</i> ,<br><i>Pyricularia grisea</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> et <i>Fusarium solani</i> | Pas d'effet       |

## 4.2 Les antibiotiques et les antifongiques produits par *B. thuringiensis*

En plus de synthétiser bon nombre de protéines insecticides, *B. thuringiensis* produit aussi d'autres métabolites tels des antibiotiques et antifongiques. Ces métabolites peuvent notamment servir aux plantes pour les aider à lutter contre certains champignons ou bactéries néfastes. On compte parmi ces métabolites, la zwittermicine A, les thuricines, la tochicine, la bacthuricine F4 et les entomocines. La zwittermicine A représente le métabolite d'importance pour la protection des plantes par *B. thuringiensis*.

### 4.3.1 Zwittermicine A

#### 4.3.1.1 Historique

La zwittermicine A est un antibiotique qui a été isolé pour la première fois à partir de *Bacillus cereus* UW85 pour son effet protecteur de la plante alfalfa (luzerne) et contre l'oomycète *Phytophthora medicaginis* (Auger, 2015). La zwittermicine A fût par la suite identifiée chez plusieurs *Bacillus* grâce à une nouvelle méthode d'identification qui consiste à établir si la souche inhibe la croissance d'*E. herbicola* et si la souche est sensible au phage P7 (Auger, 2015). La découverte de ce nouvel antibiotique est importante pour la protection des plantes puisqu'il est actif contre les oomycètes, les bactéries Gram négatives et un grand nombre de fungi pathogènes (Auger, 2015).

#### 4.3.1.2 Définition

Zwittermicine A est un antibiotique aminopolyol fongistatique de 396 Da qui est produit par de nombreux bacilles, y compris les souches de Bt. Elle est produite au cours de la

sporulation de Bt (Auger, 2015). La Zwittermicine A obtenue à partir de *Bacillus cereus* peut augmenter l'activité insecticide de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, alors que seule, elle ne montre aucune activité insecticide lors d'un essai contre la spongieuse (*Lymantria dispar*) (Auger, 2015).

### 4.3.2 Les fongycines

#### 4.3.2.1 Définition

Les fongycines sont des lipopeptides composés d'un décapeptide. Elles ont été isolées de *Bacillus subtilis* par Vanittanakom. Les fongycines ont une activité antifongique contre les champignons filamenteux et agissent dans des activités de lutte contre les phytopathogènes (Chtioui, 2011).

Les fongycines dont la structure générale est un cycle peptidique de 7 L- et D-acides aminés (iturines et surfactine) ou 10 L et D-acides aminés (Chtioui, 2011).

Yu Li *et al.* (2012) et Pathak *et al.* (2012) ont décrit de nouvelles classes de fongycines, à savoir fongycine A-C19, fongycine C: C15 – C18, fongycine D: C15 – C18 et fongycine S (Ait Kaki, 2014).

**Tableau 8 :** Quelques antifongiques et bioinsecticides de *Bacillus* commercialisés (Silverio *et al.*, 2009).

| Type             | Organisme                             | Produit commerciale | Cible                                                           | Culture         |
|------------------|---------------------------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------|
| <b>Fongicide</b> | <i>Bacillus subtilis</i> QST713       | Serenade®           | <i>Botrytis</i> spp.                                            | Légumes, fruits |
| <b>Fongicide</b> | <i>Bacillus subtilis</i>              | HiStick®            | <i>Fusarium</i> ,<br><i>Rhizoctonia</i> ,<br><i>Aspergillus</i> | Soja, arachide  |
| <b>Fongicide</b> | <i>Bacillus licheniformis</i> SB 3086 | EcoGuard®           | <i>Sclerotinia</i> spp.,<br>anthracnose                         | Gazon           |

|                    |                                   |           |                                  |                                      |
|--------------------|-----------------------------------|-----------|----------------------------------|--------------------------------------|
| <b>Fongicide</b>   | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | Taegro®   | <i>Rhizoctonia, Fusarium</i>     | Arbustes, plantes ornementales       |
| <b>Insecticide</b> | <i>Bacillus thuringiensis</i>     | Rona Eco® | Chenille, larves de lépidoptères | Pelouse et jardin                    |
| <b>Insecticide</b> | <i>Bacillus thuringiensis</i>     | Biobit®DF | Lépidoptères                     | Vignes, arbres fruitiers, maraichage |

#### 4.3.2.2 Domaine d'application des fongycines

##### ➤ En agro-alimentaire et agriculture

Le large spectre antifongique et la faible toxicité in vivo de la fongycine permettent, par exemple d'envisager leur utilisation pour la protection des semis et des récoltes. En effet cette molécule est considérée comme responsable de l'antagonisme in vivo de plusieurs souches de *Bacillus* vis-à-vis de champignons phytopathogènes par exemple *Fusarium oxysporum* (Coutte, 2009). En outre, les fongycines ont capable d'induire la résistance systématique chez les végétaux contre des phytopathogènes (Chtioui, 2011).

##### ➤ En pétrochimie

L'industrie pétrolière utilise les fongycines pour extraire le pétrole absorbé sur la roche, pour diminuer sa viscosité afin de faciliter son transit dans pipeline. Cette industrie utilise également les fongycines pour tenter de réparer autant que faire se peut, les dégâts qu'elle provoque de temps à autre en mer et sur terre (Coutte, 2009).

##### ➤ En environnement

Les fongycines présentent plusieurs avantages par rapport aux produits chimiques tensioactifs synthétiques, tels que leur faible concentration micellaire critique (CMC), leur biodégradabilité, et sont particulièrement bien étudiée pour les applications environnementales telles que la bioremédiation des sols et la dispersion des déversements

de pétrole (Coutte, 2009). leurs propriétés permettent de favoriser la récupération des polluants en facilitant leur détachement de la matrice solide (Chtioui, 2011).

➤ **En pharmaceutique et cosmétique**

Les fongycines montrent un potentiel élevé en qualité d'antifongique et sont susceptible d'entrer dans la composition des certains produits cosmétiques afin d'en améliorer la conservation (Chtioui, 2011).

### 4.3.3 Iturine

#### 4.3.3.1 Historique

Le premier antibiotique iturinique, l'iturine A, a été découvert en 1950 (Nail *et al.*, 2013) à partir du milieu de culture d'une souche de *B. subtilis* présentant une activité antifongique. La détermination de sa séquence a permis de montrer que l'iturine A est un lipopeptide cyclique renfermant un acide gras  $\beta$ -aminé (Nail *et al.*, 2013). Par la suite, différentes souches de *B. subtilis* ont été cultivées afin de rechercher une activité antifongique dans leur milieu de culture. C'est ainsi que quatre nouveaux composés antifongiques de nature lipopeptidique et renfermant un acide gras  $\beta$ -aminé ont été découverts et forment, avec l'iturine A, la famille des antibiotiques ituriniques : ce sont la mycosubtiline, la bacillomycine Lc, la bacillomycine F et la bacillomycine D (Nail *et al.*, 2013). À côté de ceux-ci, d'autres composés ayant des activités antifongiques sont produits par *B. subtilis* mais n'appartiennent pas à la famille des ituriniques (Nail *et al.*, 2013).

Les études concernant l'activité biologique de ces antibiotiques ont été effectuées durant de longues années. Les résultats, qui seront présentés et discutés ultérieurement dans cette bibliographie, ont permis d'affirmer l'existence des activités hémolytique, antibactérienne et bien évidemment antifongique. L'activité antibactérienne reste limitée aux genres *Micrococcus* et *Sarcina*, tandis que l'activité antifongique présente un large spectre contre différents types de levures et de champignons (Nail *et al.*, 2013).

#### 4.3.3.2 Définition

Les antibiotiques ituriniques, produits par *Bacillus subtilis*, représentent une famille qui comprend l'iturine A, la mycosubtiline, les bacillomycines D, F et Lc. Ce sont des lipopeptides cycliques possédant des acides gras  $\beta$ -aminés reliés à un peptide formé par sept acides  $\alpha$ -aminés avec une séquence chirale invariable. Ils sont connus essentiellement par leur pouvoir antifongique et ils ont également des propriétés antibactériennes et hémolytiques. Ces

propriétés proviennent de leur nature amphiphile qui leur permet d'interagir avec différents constituants membranaires (Nail *et al.*, 2013).

### 4.3.3.3 Activités biologiques des antibiotiques ituriniques

Les antibiotiques ituriniques présentent une multitude d'activités biologiques au niveau de différentes espèces. Certes, leur activité antifongique reste la plus importante, mais leurs activités hémolytique et antibactérienne ne sont pas négligeables. De plus, ils sont suspectés d'avoir une activité antiproliférative. Toutes ces activités biologiques leur confèrent un potentiel d'application dans le domaine médical ou phytosanitaire (Nail *et al.*, 2013).

#### ➤ **Activité antifongique**

L'activité antifongique des antibiotiques ituriniques a fait l'objet de nombreuses publications scientifiques. Ceci peut s'expliquer par la découverte de ces antibiotiques grâce à leur activité forte et efficace contre différents champignons et levures.

Des travaux ont été démontrés que les antibiotiques ituriniques lysent des sphéroplastes de *S. cerevisiae* et ont un effet inhibiteur sur la synthèse de macromolécules biologiques (Nail *et al.*, 2013).

#### ➤ **Activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne des antibiotiques ituriniques est réduite à deux genres de bactéries, *Micrococcus* et *Sarcina* (Nail *et al.*, 2013). Concernant *Micrococcus luteus*, la présence d'iturine A dans le milieu prévient la croissance bactérienne et, à partir d'une certaine concentration, provoque la lyse des protoplastes des bactéries.

#### ➤ **Activité antiproliférative**

L'activité antiproliférative de l'iturine A a été mise en évidence sur des ovocytes des étoiles de mer (Nail *et al.*, 2013). Un blocage de la séparation des membranes cytoplasmique des cellules à la fin de la division survient lorsqu'elles sont traitées avec de l'iturine A. Donc, l'iturine A semble agir durant la télophase de la mitose. En effet, en présence de l'iturine A, on observe un nombre important de noyaux dans « une cellule ».

## **5. Bactéries pathogènes de l'Homme**

Dans cette partie quelques microorganismes pathogènes de l'homme sont présentés avec un historique, une description des caractères biologique, l'habitat ainsi que le pouvoir pathogène.

Il s'agit de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* et *Escherichia coli*.

### **5.1. *Staphylococcus aureus***

#### **5.1.1 Historique**

Dans les deux premières communications à l'académie des sciences en 1876 et 1880, Louis Pasteur a révélé et insisté sur l'existence de cette bactérie, qu'il avait isolée à la fois du pus de l'anthrax et de l'ostéomyélite et aussi des eaux de la seine. Ces germes, disposés en grappes de raisin à l'examen microscopique, ont été décrits par Robert Koch en 1878 (Aouati, 2009).

Ces isolats observés et identifiés en 1879 dans des pus de furoncle et d'ostéomyélite par Pasteur comme étant "un organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais très fréquemment associés en petits amas". Ainsi, il les a cultivés en 1880 et disait que "l'ostéomyélite est le furoncle de la moelle épinière" (Aouati, 2009).

Ce n'est que plus tard; en 1882 que le nom "Staphylocoque" a été donné par le chirurgien Ogston, pour décrire ces grains (*kokkos*), groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (*Staphylos*).

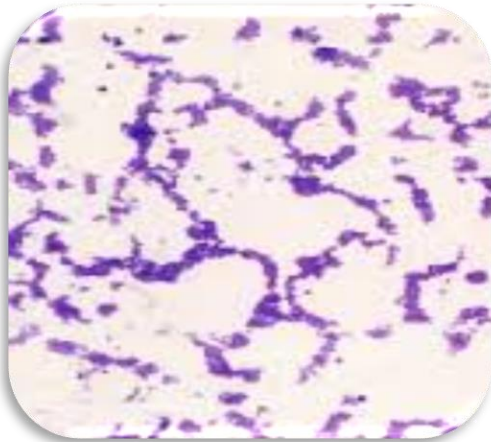
En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries, il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées (Aouati, 2009).

Le genre *Staphylococcus* a été séparé de celui de *Micrococcus* par Evans en 1957 (El Haddad, 2010).

#### **5.1.2 Description de *Staphylococcus aureus***

Le *S. aureus* est une bactérie de la famille des *Micrococcaceae*, qui inclut deux genres: les microcoques et les staphylocoques. Le genre *Staphylococcus* regroupe trente six espèces, dont dix huit espèces ont été retrouvées chez L'Homme parmi lesquelles *S. aureus* qui peut être responsable de nombreuses infections. Le *S. aureus* est une cocci à Gram positif de forme sphérique de 0,5 à 1,5 $\mu$  de diamètre (El-Anzi., 2014). Ils sont immobiles, aéro-anaérobie

facultative, non sporulés. La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après culture, *S. aureus* se distingue des autres staphylocoques par la pigmentation dorée de ses colonies et sa capacité à fermenter le mannitol.



**Figure 10 :** Aspect morphologique du *Staphylococcus aureus* en microscopie optique (X1000). (El-Anzi., 2014).



**Figure 11 :** Colonies de *Staphylococcus aureus* sur Müller-Hinton ([http://journals.co-action.net/index.php/dfa/article/view/26431/html\\_7](http://journals.co-action.net/index.php/dfa/article/view/26431/html_7)).

### 5.1.3 Habitat

Les staphylocoques sont des pathogènes humains (Aouati, 2009). Elles sont présents dans l'environnement : air, sol, eau, aliments, mobilier, matériels et vivent à l'état commensal sur la peau et les muqueuses des organismes humains et animaux dès la naissance. Le réservoir de *S. aureus* est essentiellement humain : on peut l'isoler particulièrement au niveau des zones chaudes et humides de l'organisme telles que les fosses nasales, l'oropharynx, les creux axillaires, le périnée et le tube digestif (El-Anzi, 2014).

### 5.1.4 Facteurs de risque de colonisation par *S. aureus*

- Âge avancé
- Sexe masculin Pathologie pulmonaire chronique
- Diabète
- Insuffisance rénale terminale et dialyse (El-Anzi, 2014).



### **5.1.5 Pouvoir pathogène de *S. aureus***

*S. aureus* est responsable d'infections au niveau de la peau, des articulations, des os et des systèmes vasculaire et respiratoire. Il est également responsable d'infections superficielles cutanées, sous-cutanées et muqueuses telles que les furoncles, panaris impétigo, abcès, cellulites ou lymphangites. *S. aureus* est la principale cause d'ostéomyélites, de méningites et d'endocardites infectieuses.

*S. aureus* est un pathogène majeur impliqué dans les infections respiratoires Communautaires et nosocomiales (El-Anzi, 2014).

## **5. 2. *Salmonella Typhimurium***

### **5.2.1 Historique**

En 1880, Ebert a observé le bacille de la typhoïde dans des coupes de rate, l'agent de la fièvre typhoïde et Gaffky est parvenu à cultiver ce bacille en 1884 tel que revu par Grimont et coll (Bergeron, 2009).

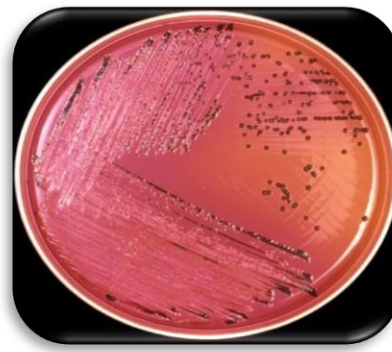
Par la suite, en 1886, Salmon et Smith ont découvert chez des porcs un organisme qui est maintenant connu sous le nom de *Salmonella choleraesuis*. Ces chercheurs pensaient alors qu'ils venaient d'isoler l'organisme causant la fièvre porcine (cholera du porc). Les salmonelles ont été nommées en l'honneur du bactériologiste et vétérinaire américain Daniel Elmer Salmon. En 1896, Widal a mis en évidence la diversité antigénique des souches de *Salmonella* à l'aide d'un nouveau test qu'il a appelé sérodiagnostique (Bergeron, 2009).

### **5.2.2 Description de *Salmonella Typhimurium***

Les salmonelles appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae* et elles sont classées dans le genre *Salmonella* ayant des déterminants morphologiques et biochimiques homogènes. Les salmonelles sont des bacilles à Gram négatif sont aéro-anaérobies facultatives mesurant 0.7 à 1.5 µm de large sur 2.0 à 5.0 µm par long et mobiles, grâce à des flagelles péritriches. Toutefois, les sérovars Pullorum et Gallinarum et certains mutants ne sont pas mobiles. Après 24h d'incubation à 37°C Les colonies ont généralement un diamètre de 2 à 4 mm, Elles sont généralement lisses (smooth : S), rarement rugueuses (rough : R); c'est un pathogène intracellulaire facultatif qui infecte l'hôte par voie orale (Bergeron, 2009). Les salmonelles sont non sporulantes, non encapsulées, Le génome de la bactérie est composé d'un ADN chromosomique et d'un ou plusieurs plasmides (Cécile *et al.*, 2001).



**Figure 12 :** Aspect morphologique du *Salmonella typhimurium* en microscopie optique (A) (X1000) (<http://www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=7778>).



**Figure 13 :** Aspect morphologique des colonies du *Salmonella typhimurium* en culture. ([http://textbookofbacteriology.net/salmonella\\_3.html](http://textbookofbacteriology.net/salmonella_3.html)).

### 5.2.3 Habitat

L'habitat des salmonelles est le tractus intestinal des humains et de la plupart des espèces animales à sang chaud et froid (Bergeron, 2009).

### 5.2.4 Pouvoir pathogène de *Salmonella typhimurium*

La salmonellose est la deuxième maladie entérique la plus importante mondialement; c'est une zoonose sérieuse pour l'homme (Bergeron, 2009).

Les infections à *Salmonella typhimurium* représentent un problème de taille pour la santé publique. Celui-ci peut infecter l'humain et qui cause une gastro-entérite qui peut être sévère ou non selon l'immunité de la personne atteinte, elle cause aussi des diarrhées et de fièvre typhoïde. Cependant, depuis quelques années, une augmentation des cas septicémiques causés par *S. typhimurium* et associés à des signes cliniques sévères et de la mortalité est observée (Bergeron, 2009).

## 5.3. *Escherichia coli*

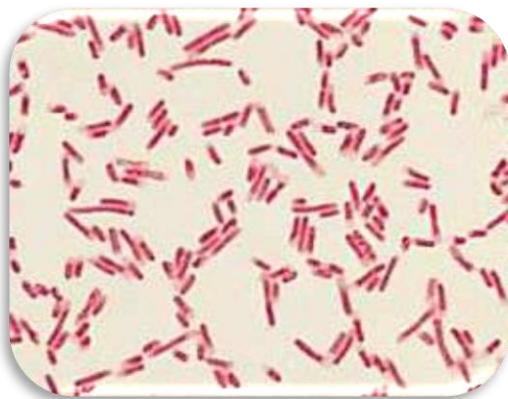
### 5.3.1 Historique

Le bacille *Bacterium coli commune* a été décrit pour la première fois en 1885 après avoir été isolé dans des selles de nourrissons par l'allemand Theodor Escherich. En 1919, en hommage aux travaux d'Escherich, Castellani et Chalmers proposent de renommer cette bactérie *Escherichia coli* (Montel *et al.*, 2013).

Initialement, le genre *Escherichia* regroupait six espèces : *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. albertii* et *E. vulneris*, mais récemment (Montel *et al.*, 2013) ont démontré que les souches d'*E. blattae* devaient être reclassées dans le genre *Shimwellia* en tant qu'espèce *Shimwellia blattae*.

### 5.3.2 Description d'*Escherichia coli*

Le genre *Escherichia* appartient, à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les *Escherichia coli* sont des bacilles à coloration de Gram négative, aéro-anaérobies facultatifs qui peuvent fermenter les nitrates. Ces bactéries sont catalase positives et ne possèdent pas d'oxydase (Montel *et al.*, 2013), non-sporulante, *E. coli* est l'une des premières bactéries à coloniser le tractus intestinal des mammifères, elles font parties de la flore commensale de l'Homme et des animaux à sang chaud (Montel *et al.*, 2013).



**Figure 14 :** Aspect morphologique des colonies d'*Escherichia coli* en microscopie optique. (<http://tpehe.eklablog.com/1-escherichia-coli-a114633722>).



**Figure 15 :** Aspect morphologique des colonies d'*Escherichia coli* en culture. (<https://www.flickr.com/photos/seabird/2511721407>).

### 5.3.3 Habitat

La niche écologique de cette bactérie se trouve dans la couche de mucus sécrétée par l'épithélium du côlon, mais aussi dans le sol. Etant donné qu'elle est hautement compétitive dans cet environnement, *E. coli* est la bactérie anaérobie facultative la plus abondante dans le côlon humain, dans celui d'autres mammifères et des oiseaux (Ramos, 2010).

### 5.3.4 Pouvoir pathogène d'*Escherichia coli*

Le centre national de référence (CNR) des *E. coli* définit deux catégories de pathovars pour *E. coli*, en se basant sur leur pathogénicité (Kern-Benaibout, 2006) :

- les *E. coli* à l'origine de pathologies intestinales;
- les *E. coli* à l'origine de pathologies extra intestinales.

Parmi les *E. coli* à l'origine de pathologies intestinales, principalement de diarrhées, le CNR propose la classification suivante :

- les *E. coli* enterotoxinogènes, ETEC, dont la pathogénicité est liée à la sécrétion de deux types de toxine, une toxine thermostable ST et une thermolabile LT.
- les *E. coli* entéropathogènes, EPEC, dont la pathogénicité est liée aux lésions d'attachement/effacement (AE), définies par un attachement de ces bactéries sur les cellules intestinales, et par un effacement des microvillosités, consécutif à une altération du cytosquelette.
- les *E. coli* entérohémorragiques, EHEC, qui induisent des colites hémorragiques chez l'homme, et qui, particulièrement chez les enfants, peuvent se compliquer en syndrome hémolytique et urémique SHU (insuffisance rénale sévère pouvant nécessiter une dialyse ou une transplantation rénale) et en purpura thrombotique et thrombocytopénique PTT (troubles nerveux associés). Ces affections peuvent être mortelles.

Dans un rapport sur les *E. coli* qui provoquent des diarrhées, l'Organisation Mondiale de la Santé ajoute une septième classe : les *E. coli* attachant et effaçant, AEEC, définis comme des *E. coli* qui s'attachent aux entérocytes et effacent les microvillosités, et qui ne produisent pas toujours de verocytotoxine. Les EPEC ne sont qu'un sous-type des AEEC.

- les *E. coli* entéroinvasifs, EIEC, à l'origine de syndromes dysentériques, et dont la pathogénicité est proche des *Shigella*. Ces *E. coli* ont acquis la capacité à envahir les cellules épithéliales ce qui provoque des ulcérations de la muqueuse du gros intestin.
- les *E. coli* entéroaggrégatifs, EAggEC (on retrouve parfois le sigle EAEC dans la bibliographie), caractérisés par un type d'adhésion agrégative en « brique empilées », à l'origine de nécroses du pôle apical des villosités avec œdème inflammatoire et hémorragique de la sous muqueuse.
- les *E. coli* à adhérence diffuse, DAEC, qui ont acquis la capacité d'adhérer aux cellules Hep-2 et qui paraissent uniformément dispersés sur toute la surface des cellules épithéliales.

# Chapitre II



## Matériel et méthodes

### Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de Biotechnologie Microbienne du département de biologie à l'Université M'HAMED BOUGARA Boumerdès (UMBB).

#### 1- Matériel

##### 1-1- Matériel biologique

##### 1-1-1- Les souches de *Bacillus thuringiensis*

Les souches de *Bacillus thuringiensis* utilisées dans notre étude sont :

Une souche de *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, isolée à partir du bioinsecticide B401 (Vita swarm, France) importée en Algérie et distribuée par API-agro (IPA) pour l'utilisation par les apiculteurs contre la fausse teigne de la cire *Galleria mellonella*, et vingt souches de *Bacillus thuringiensis* qui ont été isolées à partir du sol de différentes régions en Algérie [(1P1A, 1S5A, 1S4A et 1S4C de Kasr el arab-Ain salah), (2P2C, 2P2B, 2P1A, 2P3A, \*2P4C, 2SA5C, 2SA3A, 2SA2B, 2SA5A et 2SA3C de Borj Amar Idris-Illizi), (\*6S5C, \*6S2B, \*6S5B, 6S1A et 6S5E de Tolga-Biskra) et (3-3.B Ammal-Boumerdès)] (Tableau 9).

Ces souches ont été isolées, identifiées et caractérisées au niveau du laboratoire de recherche Valcor, équipe exploration et exploitation de la microflore locale utile (Bouzegzi et Kadour, 2012 ; Sayed *et al.*, 2013). Ces souches nous ont été fournies conservées dans une solution de glycérol à 30% à -80 °C.

**Tableau 9 :** Souches de *B. thuringiensis* utilisées et leurs origines

| Souches de Bt | Origine (sol)            | Souches de Bt | Origine (sol)            |
|---------------|--------------------------|---------------|--------------------------|
| 1S4A          | Kasr el arab (Ain salah) | 2SA3A         | Borj Amar Idris (Illizi) |
| 1S5A          |                          | 2SA5A         |                          |
| 1S4C          |                          | 2SA2B         |                          |
| 1P1A          |                          | 2SA3C         |                          |
| 6S1A          | Tolga (Biskra)           | 2SA5C         |                          |
| *6S2B         |                          | 2P1A          |                          |
| *6S5B         |                          | 2P3A          |                          |
| *6S5C         |                          | 2P2B          |                          |
| 6S5E          |                          | 2P2C          |                          |
| 3-3.B         | Ammal (Boumerdes)        | *2P4C         |                          |

### 1-1-2- Les souches microbiennes utilisées dans les tests de l'activité antimicrobienne

Les souches microbiennes testées sont celles utilisées dans notre étude comme microorganismes cibles dans les tests de l'activité antimicrobienne. Il s'agit des souches de la collection américaine ATCC, qui ont été fournies par l'institut Pasteur d'Algérie-Alger. Les souches utilisées sont présentées dans le tableau 10.

**Tableau 10 :** Souches bactériennes utilisées dans les tests de l'activité antibactérienne.

| Microorganisme   | Souches cibles                           |
|------------------|------------------------------------------|
| Bactérie à Gram- | <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311 |
|                  | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922       |
| Bactérie à Gram+ | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923  |
| Moisissure       | <i>Aspergillus niger</i> ATCC 6275       |

### 1-2- Matériel non biologique

La liste des milieux de culture, l'appareillage, la verrerie, les réactifs et les produits chimiques utilisés dans notre travail sont présentés dans l'annexe 1.

### 2- Méthodes

#### 2-1- Revivification des souches

Les souches de Bt étaient conservées dans une solution de glycérol à 30% (v/v) à -20°C, celles des microorganismes-tests sur gélose nutritive inclinée pour les bactéries et sur milieu PDA pour la moisissure.

Les souches bactériennes ont été revivifiées par repiquage sur gélose nutritive en boîtes de Pétri et incubées à 37 °C pendant 24 h, afin d'obtenir une culture jeune.

La moisissure a été repiquée sur milieu PDA en boîte de Pétri et incubée à 25°C pendant 7 jours.

#### 2-2- Vérification de la pureté des souches microbiennes

Afin de vérifier la pureté des souches microbiennes, un repiquage de colonie d'une culture jeune a été ensemencé par stries d'épuisement sur milieu LB solide pour les souches de Bt et sur gélose nutritive pour les bactéries-tests et incubées à 37°C pendant 24 h, afin d'obtenir des colonies isolées.

#### 2-3- Conservation des souches

Après avoir revivifié les souches et confirmé leur identité, ces dernières sont conservées dans une solution de glycérol à 30% (v/v) dans des tubes Eppendorfs à -20°C.

#### 2-4- Etude de pouvoir antagoniste des souches de *Bacillus thuringiensis*

##### 2-4-1- Criblage de souches de Bt en utilisant *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comme souches indicatrices

Une collection de 20 souches de Bt a été vérifiée pour la production d'une activité antagoniste contre *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*, et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 qui est une souche de collection ATCC. Cette dernière espèce comprend les souches pathogènes pour l'homme et agents d'intoxications alimentaires. Le choix de ces deux espèces pour le criblage de souches de Bt ayant un effet antagoniste afin de sélectionner celles



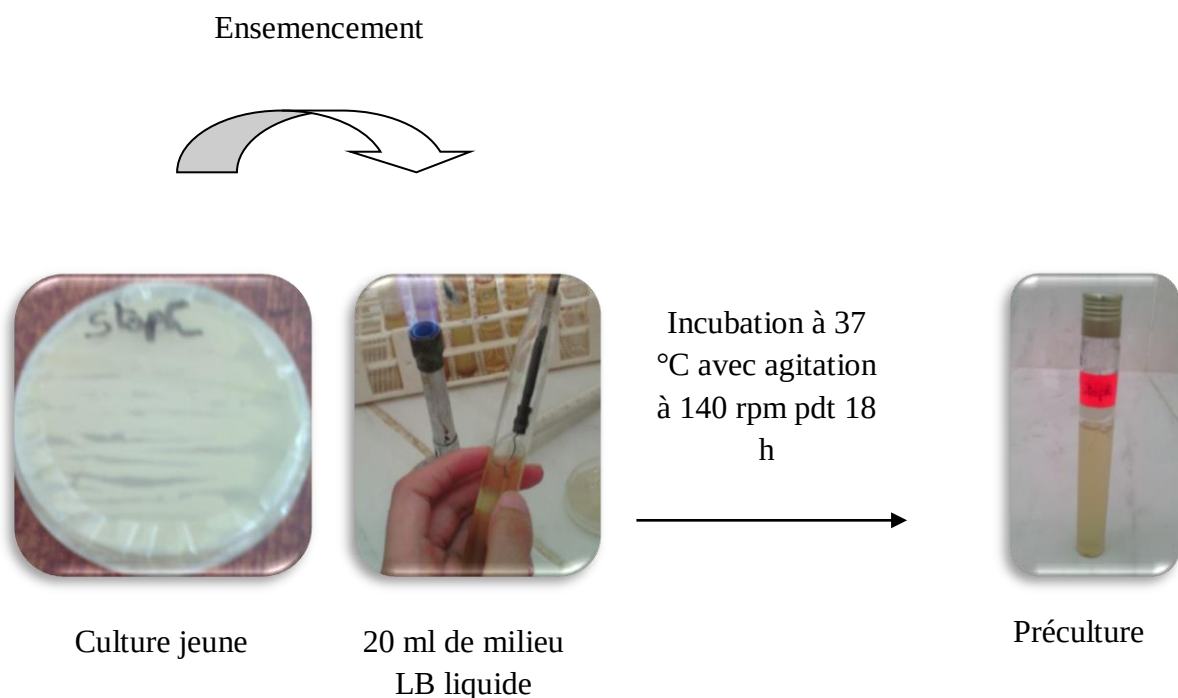
bactériocinogènes est fait en se basant sur les données bibliographiques montrant que les bactériocines agissent principalement sur des souches appartenant à des espèces phylogénétiquement proches de l'espèce de la souche productrice (Belguesmia *et al.*, 2011). Ces deux souches sont désignées souches indicatrices car elles nous indiquent sur les souches antagonistes probablement bactériocinogènes.

Pour cela on a adopté la méthode d'antagonisme différé décrite dans le paragraphe suivant.

#### 2-4-1-1- La méthode d'antagonisme différé

##### ➤ Préparation des pré-cultures

Les pré-cultures des souches tests (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*) ont été obtenues par inoculation des tubes de milieu LB liquide de 20 ml avec une culture de 24 h sur gélose nutritive à 37°C. Les tubes sont incubés dans un incubateur agitateur sous agitation de 140 rpm et à 37 °C pendant 18 h.



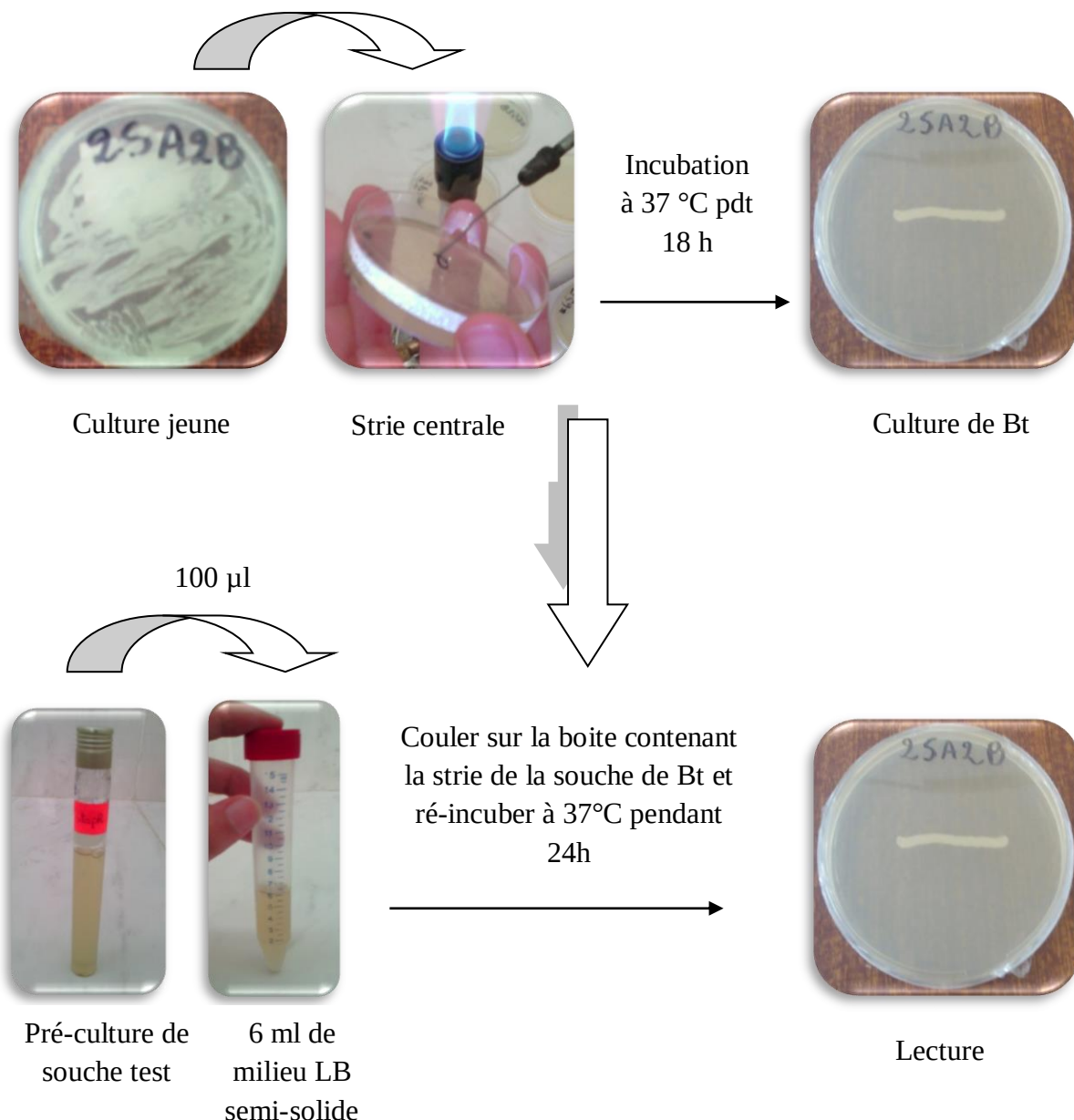
**Figure 16 :** Schéma de préparation de la pré-culture des souches tests (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*).

##### ➤ Test d'antagonisme différé

Les tests d'antagonismes ont été réalisés selon la méthode citée par Mazaache (2012). La méthode d'antagonisme différé était utilisée. Cette méthode consiste à ensemencer une culture jeune de Bt sur milieu LB solide en boîte de Pétri par stries et à les incubées pendant 18 h

à 37 °C. La pré-culture de la souche test est préparée parallèlement. Cent µl de la pré-culture de la souche test est ensuite homogénéiser dans 6 ml de LB molle puis couler sur la boîte contenant la culture de la souche de Bt et ré-incuber à 37°C pendant 24h. L'activité antagoniste des souches de Bt est traduite par l'absence de la culture de la souche test autour de la culture de Bt. Plus la zone d'inhibition est large plus l'effet antagoniste est important.

Ensemencement d'une strie au milieu de la boîte de Pétri.



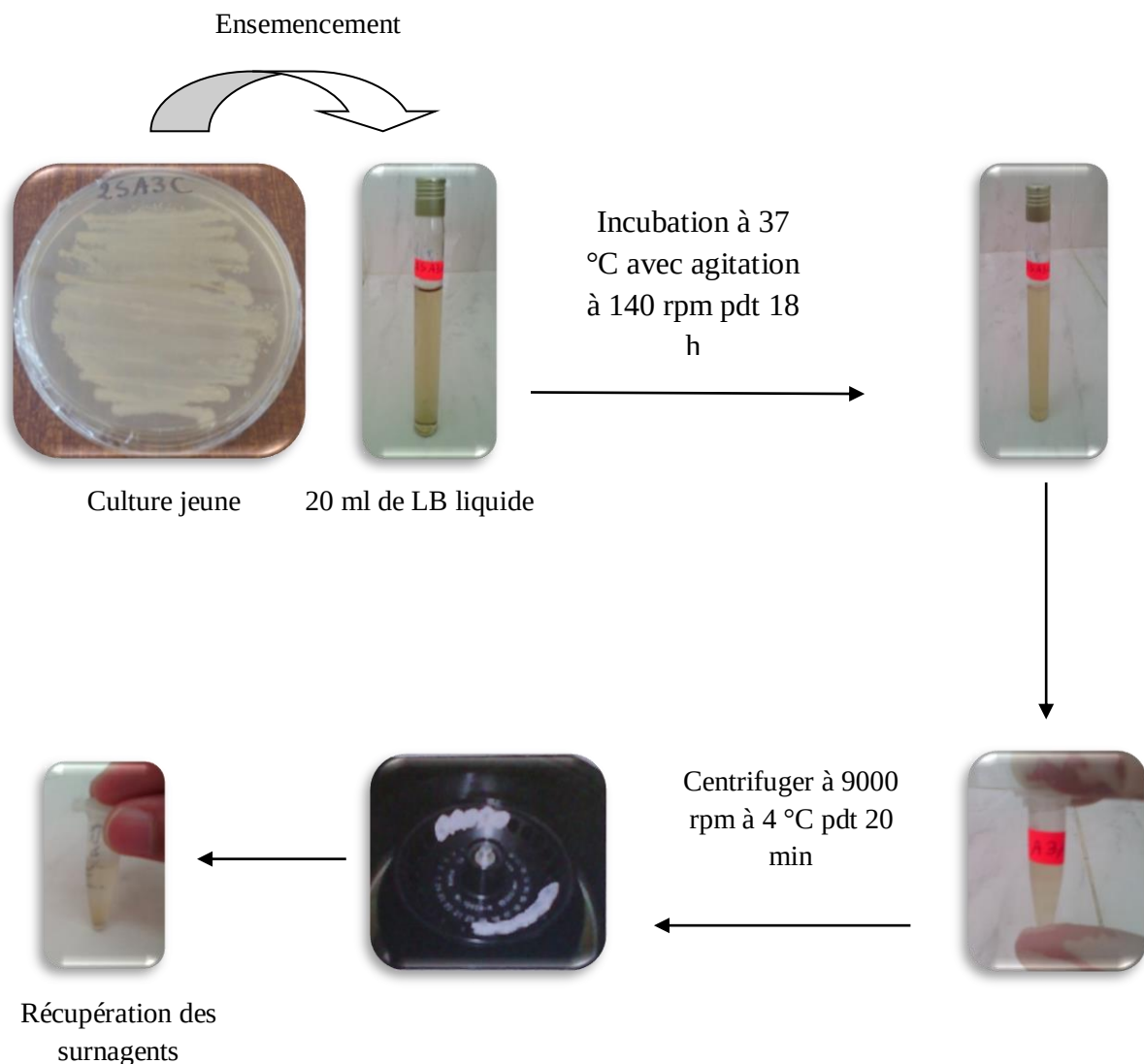
**Figure 17 :** Schéma de test d'antagonisme différé.

## 2.5 Etude de l'activité antimicrobienne des surnagants de culture

### 2.5.1 Obtention de surnagants de culture exempts de cellules

Des tubes à essai contenant 20 ml par tube de milieu LB liquide sont inoculés par les souches de Bt ayant une activité antagoniste sélectionnées préalablement cultivées sur milieu LB solide. Les tubes sont incubés à 37 °C pendant 18h sous agitation de 140 rpm.

Les surnagants sont récupérés après centrifugation à 9000 rpm à 4 °C pendant 20 min.



**Figure 18 :** Schéma de l'obtention de surnagants de culture exempts de cellules.

L'activité antimicrobienne des surnagants des souches a été déterminée en utilisant les tests suivants :

**2.5.2 Méthode de diffusion en milieu gélosé****➤ La méthode des puits**

Une suspension bactérienne de la souche cible (*Bacillus thuringiensis aizawai*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) est préparée dans l'eau physiologique (9 g/l de NaCl) à partir d'une culture solide afin d'obtenir une DO 600 nm comprise entre 0,2 et 0,3. Vingt µl de cette suspension est ensemencé en surface de la gélose Muller Hinton.

Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés stérilement dans la gélose de chaque boîte. Les puits sont remplis avec 100 µl du surnagent de culture, et on place les boîtes à 4 °C pendant 2 à 4 heures pour permettre une bonne diffusion des molécules antimicrobiennes.

Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures. Le résultat positif se traduit par l'absence de culture autour des puits (Siboukeur, 2011).

**➤ La méthode des disques**

Une suspension bactérienne de la souche cible (*Bacillus thuringiensis aizawai*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) est préparée dans l'eau physiologique (9 g/l de NaCl) à partir d'une culture solide afin d'obtenir une DO 600 nm comprise entre 0,2 et 0,3. 20 µl de cette suspension est ensemencé en surface de la gélose Muller Hinton.

Cette technique consiste à utiliser des disques en papier préalablement stérilisés et imprégnés avec 60 µl du surnagent de culture. Les disques sont déposés à la surface des boîtes contenant le milieu Muller Hinton, puis les boîtes sont placées à 4 °C pendant 2 à 4 heures pour permettre une bonne diffusion de la substance antibactérienne.

Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 h. Le résultat positif se traduit par l'absence de culture autour des disques (Makhloufi, 2011; Siboukeur, 2011).

**2.6 L'effet des surnagents de cultures des souches antagonistes de Bt sur la cinétique de croissance des souches bactériennes tests**

A partir d'une préculture de 24 h sur gélose nutritive des souches bactériennes cibles *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus thuringiensis aizawai*, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Escherichia coli* ATCC 25922, 1 ml de la préculture de chaque souche bactérienne a été ensemencée dans des tubes à essais contenant 20 ml de bouillon nutritif, ces derniers ont été incubés à 37 °C à 140 rpm.

La lecture de la densité optique se fait à l'aide d'un spectrophotomètre après un prélèvement aseptique chaque 30 min à une longueur d'onde de 600 nm, au cours de la phase exponentielle de croissance, 3ml de surnagents de cultures de souches de Bt sélectionnées sont ajoutés dans chaque tube contenant les souches bactériennes-tests en culture puis les tubes sont incubés de nouveau à 37°C.

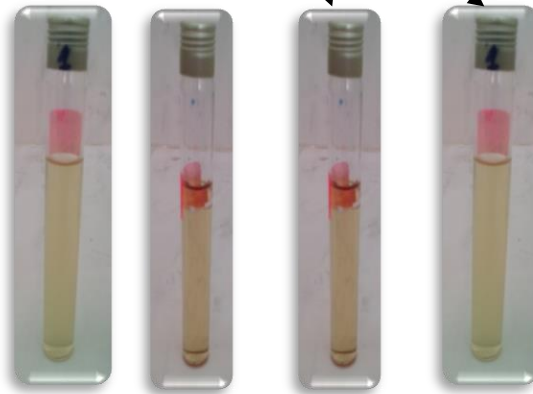
Le témoin négatif pour cette expérience consiste en l'ajout de 3ml d'eau distillée stérile dans les mêmes conditions au lieu des surnagents pour chaque bactérie-test.

La pré-culture de Bactérie-test



Inoculation de bouillon nutritif

1ml 1ml 1ml 1ml



Incubation dans l'incubateur agitateur à 37 °C et à 140 rpm et lecture de la DO à 600 nm chaque 30 min.

Ajoute de 3 ml de surnagent de *Bt*

Ajoute de 3 ml eau distillée stérile (témoin négatif)

Incubation des tubes de nouveau à 37°C, lecture de DO 600 nm.

### 2.7 Etude de l'activité antifongique

Certaines bactéries ont la capacité d'inhiber la croissance des levures par la synthèse de molécules bioactives.

Cette étude permet la détermination de la sensibilité de la moisissure *Aspergillus niger* ATCC 6275 aux souches de *B. thuringiensis* sélectionnés.

Ce test consiste à ensemencer la moisissure *Aspergillus niger* ATCC 6275 à l'extrémité de la boîte de Pétri contenant le milieu PDA et la souche de Bt par écouvillonnage dans la moitié opposée de la boîte. Les boîtes sont incubées à 28°C pdt 10 jours.

# Chapitre III



## Résultats et discussions



### 1. Vérification de la pureté des souches de Bt

La mise en culture de *B. thuringiensis* subsp *aizawai* à partir du bioinsecticide B-401 et la revivification des souches de Bt isolées à partir du sol, suivi de repiquages sur milieu LB solide nous ont permis l'obtention de colonies isolées visibles à l'œil nu ayant un même aspect (figure 19).

L'aspect des colonies est décrit dans le tableau 11.

**Tableau 11** : caractères macroscopiques de 20 souches de Bt

| Caractères macroscopiques | Observation    |
|---------------------------|----------------|
| Forme de colonies         | Arrondie       |
| Taille des colonies       | 1 à 4 mm       |
| Opacité                   | Opaque         |
| Chromogènes               | Blanchâtre     |
| Elévation                 | Colonie bombée |
| Aspect de la surface      | Rugueuse       |
| Aspect du contour         | Irrégulier     |
| Consistance               | Crémeuse       |
| Odeur                     | Absente        |



1S4A



1S5A



1S4C



1P1A



2P1A



2P2C



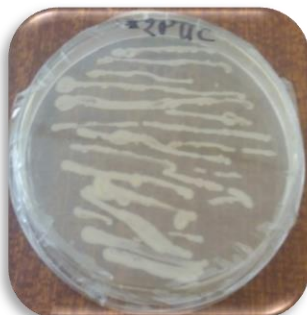
2SA5C



2SA2B



2SA5A



2P4C



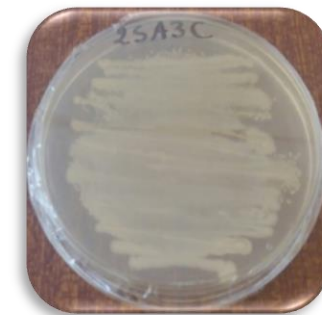
2P3A



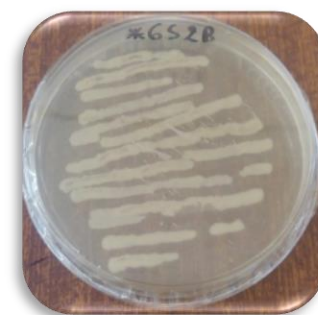
2P2B



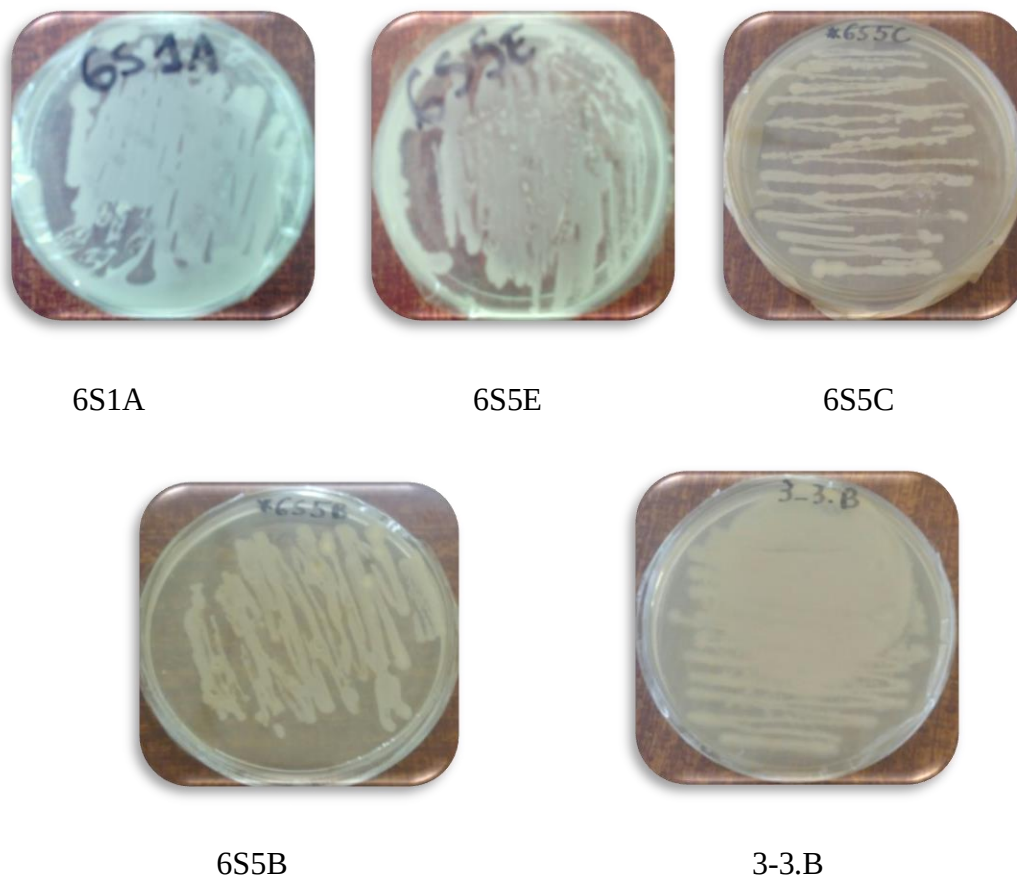
2SA3A



2SA3C



6S2B



**Figure 19:** L'aspect macroscopique des souches de *B. thuringiensis* (1S4A, 1S4C, 1S5A, 2P1A, 2P2C, 2SA5C, 6S1A, 2SA5A, 2SA5A, 2SA2B, 6S5E, \*2P4C, \*6S5B, \*6S2B, \*6S5C, 1P1A, 2P3A, 2P2B, 2SA3A, 2SA3C et 3-3.B) cultivées à 37 °C pendant 24heures.

## 2. Activité antagoniste des souches de *B. thuringiensis*

Cette étude est menée dans le but de rechercher des souches de *B. thuringiensis* ayant un pouvoir antimicrobien parmi les vingt souches de *B. thuringiensis* isolées à partir de différentes régions en Algérie [(1P1A, 1S5A, 1S4A et 1S4C de Kasr el arab-Ain salah), (2P1A, 2P2C, 2P2B, 2P3A,\*2P4C, 2SA5C, 2SA3A, 2SA2B, 2SA5A et 2SA3C de Borj Amar Idris-Illizi), (\*6S5C, \*6S2B, 6S1A, 6S5E et 6S1A de Tolga- Biskra) et (3-3.B à Ammal-Boumerdes )].

La recherche d'éventuelle production des molécules inhibitrices par les souches de *B. thuringiensis* est réalisée selon la méthode d'antagonisme différé (Achemchem *et al.*, 2004). *B. thuringiensis* subsp *aizawai* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été utilisées comme des souches indicatrices. La présence d'une zone d'inhibition autour de la strie de la culture de la souche productrice (souche de Bt) permet de vérifier la présence d'une activité

antagoniste, ce qui se traduit par la production et la sécrétion dans le milieu de culture d'une molécule antimicrobienne par cette souche de Bt. L'absence de la culture autour des stries indique l'inhibition de croissance de la souche test.

Le criblage des 20 souches de *B. thuringiensis* isolées à partir du sol de différentes régions en Algérie pour l'activité antagonistes vis-à-vis de deux souches indicatrices *B. thuringiensis* subsp *aizawai* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a montré que deux souches de *B. thuringiensis* (6SA1 et 6S5E) (figure 20) ont une activité inhibitrice de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et trois souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B et \*6S5B) (figure 21) ont une activité inhibitrice de la croissance de *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* (tableaux 12 et 13).

Des travaux antérieurs se sont intéressés à la sélection de souches de *B. thuringiensis* ayant une activité antagoniste à l'encontre de bactéries à partir de collection de souches isolés. Ahern *et al.* (2003) en criblant une collection de souche de Bt et *B. cereus* pour l'activité antagoniste en utilisant *Listeria innucue* comme bactérie indicatrice ont trouvé que plusieurs souches ont un effet antagoniste mais une seul souche avait un effet très marqué et constant a été sélectionnée.

Une collection de 50 souches de Bt isolées du Mexique a été testée pour l'activité antagoniste à l'encontre de *B. cereus*. 11 souches étaient inhibitrices de *B. cereus* parmi lesquelles 5 ont été sélectionnés (Barboza-Corona *et al.*, 2007).

Kamoun *et al.* (2011) ont sélectionnée une seule souche de Bt parmi d'autre isolées du sol en Tunisie en utilisant *B. cereus* ATCC14579 comme souche indicatrice.

Les trois souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B et \*6S5B) (figure 19) possèdent une activité inhibitrice très importante sur *B. thuringiensis* subsp *aizawai*, c'est pourquoi on les a sélectionnés pour le reste de l'étude.

L'effet antagoniste des souches de *B. thuringiensis* était plus marqué sur *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* comparé à celle de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ceci pourrait être expliqué par le fait que nos souches sécrètent des molécules bioactives ayant une activité plus importante sur les souches appartenant à des espèces phylogénétiquement proche.

Ces molécules bioactives pourraient être des bactériocines et ces trois souches de *B. thuringiensis* peuvent être bactériocinogènes surtout que plusieurs souches de *B. thuringiensis* sont rapportées dans la littérature comme étant productrices de bactériocines (Chehimi *et al.*, 2012).

Chehimi *et al.* (2012) ont montré que la tochicin de la souche thochigensis HD-868 de *B. thuringiensis* a une activité inhibitrice contre plus de 20 souches de *B. thuringiensis* ainsi que l'Entomocin 9 de la souche *B. thuringiensis* spp Entomocidus HD9 a montré une activité contre plusieurs bactéries à Gram positifs.

La bactériocine (thuricine 439) de la souche *B. thuringiensis* B439 était active sur toutes les souches testées de *B. cereus* et *B. thuringiensis* et aussi sur une souche de *Listeria innocue*. (Ahern *et al.*, 2003).

Paik *et al.* (1997) ont purifié le Tochicine à partir de *B. thuringiensis subsp tochigiensis* active seulement contre 20 souches de collection de *B. thuringiensis* et une souche de *B. cereus*.

La bactériocine Bacthuricine F 103 inhibent la croissance de plusieurs souches de *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. ureus*, *B. licheniformis* et *Listeria monocytogenes* qui sont des contaminants d'aliments et le phytopathogène *Agrobacterium sp* mais n'a pas d'activité sur d'autre bactéries à Gram positif (*S.aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus xyloxy*, *Enterococcus faecium* et *Streptococcus pyogenes*) (Kamoum *et al.*, 2011).

### **2.1 Activité antagoniste des souches de *Bacillus thuringiensis* sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

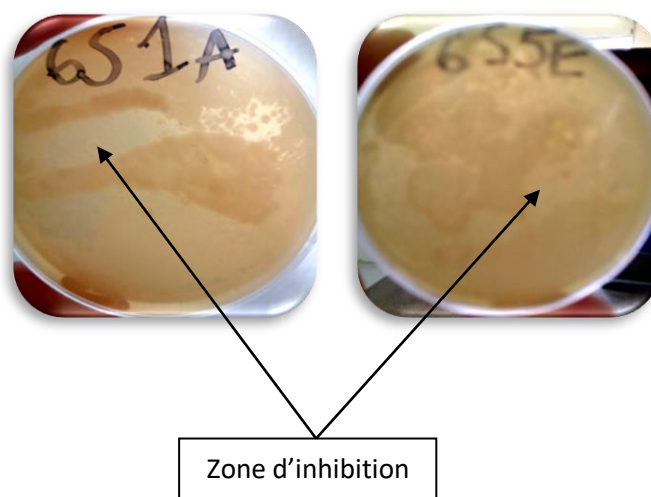
L'activité antagoniste des souches de *B. thuringiensis* (1S4A, 1S4C, 1S5A, 2P1A, 2P2C, 2SA2B, 2SA5A, 2SA5C, 6S1A, 6S5E) sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en utilisant la méthode d'antagonisme différé est représentée dans le tableau 12 et les figures 20 et 21.

**Tableau 12 :** Evaluation de l'activité inhibitrice des souches de *B. thuringiensis* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en utilisant la méthode d'antagonisme différé.

| Souche test                             | Souches de Bt | Résultat |
|-----------------------------------------|---------------|----------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 1S4A          | -        |
|                                         | 1S4C          | -        |
|                                         | 1S5A          | -        |
|                                         | 2P1A          | -        |
|                                         | 2P2C          | -        |
|                                         | 2SA2B         | -        |
|                                         | 2SA5A         | -        |
|                                         | 2SA5C         | -        |
|                                         | 6S1A          | +        |
|                                         | 6S5E          | +        |

- : absence d'activité inhibitrice

+ : présence d'activité inhibitrice



**Figure 20:** Activité inhibitrice des souches de *B. thuringiensis* (6S1A et 6S5E) contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.





**Figure 21:** Absence d'activité antagoniste des souches de *B. thuringiensis* 1S4A contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## 2.2 Activité antagoniste des souches de *Bacillus thuringiensis* sur *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*

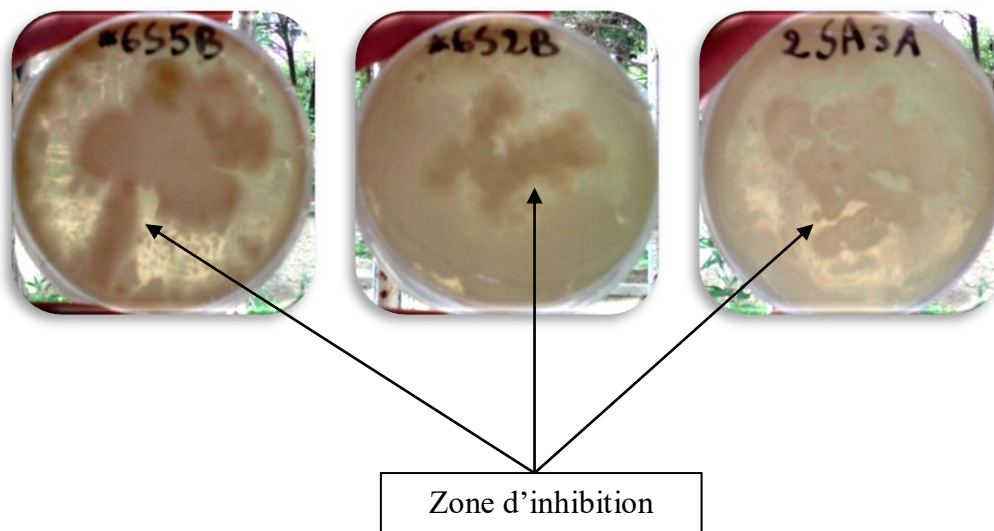
L'activité antagoniste des souches de *B. thuringiensis* (\*2P4C, \*6S2B, \*6S5B, \*6S5C, 1P1A, 2P2B, 2P3A, 2SA3A, 2SA3C, 3-3.B) sur *B. thuringiensis* subsp *aizawai* en utilisant la méthode d'antagonisme différé est représentée dans le tableau 13 et les figures 22 et 23.

**Tableau 13 :** Evaluation de l'activité antagoniste des souches de *B. thuringiensis* vis-à-vis de *B. thuringiensis* subsp *aizawai* en utilisant la méthode d'antagonisme différé.

| Souche test                                        | Souche de Bt | Résultat |
|----------------------------------------------------|--------------|----------|
| <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>aizawai</i> | *2P4C        | -        |
|                                                    | *6S2B        | +        |
|                                                    | *6S5B        | +        |
|                                                    | *6S5C        | -        |
|                                                    | 1P1A         | -        |
|                                                    | 2P2B         | -        |
|                                                    | 2P3A         | -        |
|                                                    | 2SA3A        | +        |
|                                                    | 2SA3C        | -        |
|                                                    | 3-3.B        | -        |

- : absence d'activité inhibitrice

+ : présence d'activité inhibitrice



**Figure 22 :** Activité inhibitrice des souches de *B. thuringiensis* (\*6S5B, \*6S2B et 2SA3A) contre *Bacillus thuringiensis subsp aizawai*.



**Figure 23:** Absence d'activité inhibitrice de souche de *B. thuringiensis* 2SA3C contre *B. thuringiensis subsp aizawai*.

### 3. Détection de l'activité antimicrobienne des surnagants de cultures des souches de *B. thuringiensis*

Cette méthode permet de mettre en contact le surnageant de culture de la souche de *B. thuringiensis* avec la souche test. Les nombreuses méthodes décrites pour la détection des souches de *B. thuringiensis* productrices de bactériocines sont basées sur le principe que ces substances protéiques peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible. La production de bactériocine est détectée par le pouvoir inhibiteur du surnageant de culture exempt de cellules de la bactérie testée sur la croissance du germe cible.

Cette étude est menée dans le but de tester le potentiel antimicrobien des surnagants de cultures des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B, \*6S5B). La mise en évidence de



cette activité est réalisée par la technique des disques en papier et la méthode des puits qui sont des méthodes de diffusion en milieu gélosé (Muller Hinton).

### 3.1 Méthode des puits

L'activité antibactérienne des surnagents de cultures des souches de *B. thuringiensis* sélectionnées a été évaluée sur milieu solide par la technique des puits.

Les résultats obtenus (tableau 14 et figures 24 et 25) ont montré l'absence d'une zone inhibitrice avec les surnagents des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A et \*6S5B) sur la souche test *B. thuringiensis* subsp *aizawai* (figure 24), le faible volume de surnagent déposé (100 µl), la faible concentration des substances antimicrobiennes dans les surnagents des isolats de *B. thuringiensis* n'était pas suffisante pour atteindre le seuil d'inhibition, à savoir la CMI de chaque souche test utilisée peut être la cause de l'absence de zone inhibitrice avec les souches testées (De Oliva Neto *et al.*, 2004), mais une zone inhibitrice est observée avec les surnagents des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B et \*6S5B) sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (figure 25) et \*6S2B de *B. thuringiensis* sur *B. thuringiensis* subsp *aizawai* (figure 24).

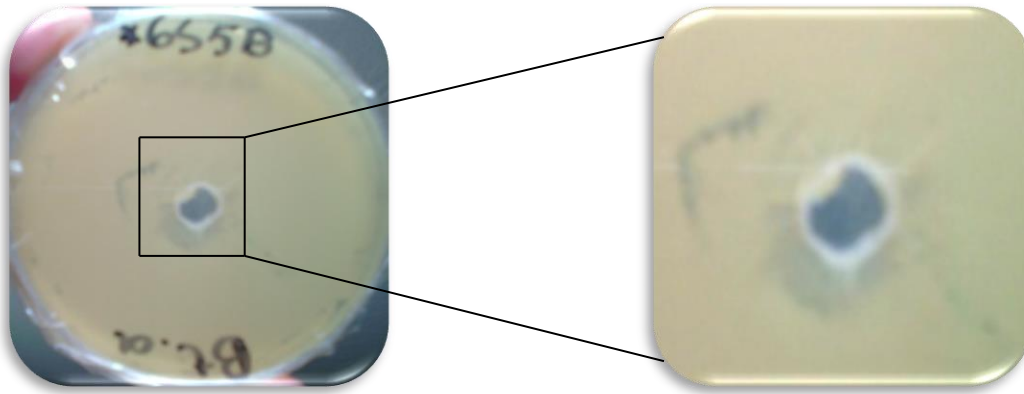
Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Barboza-Corona *et al.* (2007), ces auteurs ont trouvé dans leur étude que 5 souches parmi les 11 positifs présentent une zone d'inhibition mesurable avec la souche indicatrice *B.cereus* tandis que les 6 autres souches n'ont montré aucune activité malgré qu'elles étaient positives dans le premier test de criblage.

**Tableau 14 :** Activité antibactérienne des souches de *B. thuringiensis* sur *B. thuringiensis* subsp *airawai* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par la méthode de diffusion en puits.

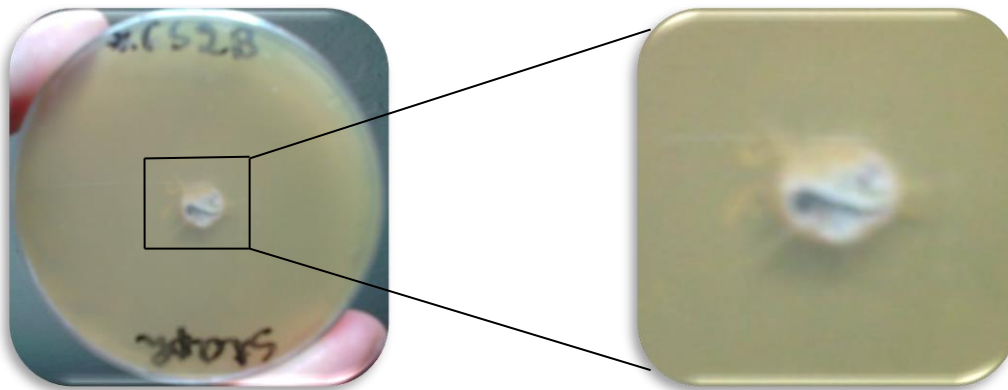
| Souche test                                        | Souche productrice | Résultat |
|----------------------------------------------------|--------------------|----------|
| <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>airawai</i> | 2SA3A              | -        |
|                                                    | *6S2B              | +        |
|                                                    | *6S5B              | -        |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923            | 2SA3A              | +        |
|                                                    | *6S2B              | +        |
|                                                    | *6S5B              | +        |

+ : Présence de zone d'inhibition

- : Absence de zone d'inhibition



**Figure 24 :** Résultat de l'activité antimicrobienne des surnagents de culture de souche de *B. thuringiensis* \*6S5B sur la souche test *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* par la méthode des puits en milieu Muller Hinton.



**Figure 25 :** Résultat de l'activité antimicrobienne des surnagents de culture de souche de *B. thuringiensis* \*6S2B sur la souche test *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par la méthode des puits en milieu Muller Hinton.

### 3.2 Méthode de disques

Le test par la méthode des disques a permis de mettre en évidence l'activité antimicrobienne. En effet, on a observé l'apparition des zones inhibitrices autour des disques (figures 26 et 27) avec le surnagent de la souche 2SA3A de *B. thuringiensis* sur *B. thuringiensis* subsp *aizawai* (figure 26). Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 15. Les zones d'inhibitions sont claires malgré l'utilisation de surnagent et non pas de bactériocines purifiés.

L'absence d'une zone d'inhibition avec le surnagent de la souche 2SA3A de *B. thuringiensis* sur *B. thuringiensis* subsp *aizawai* peut avoir pour origine la possibilité d'adsorption partielle des molécules peptidiques de bactériocines sur la paroi des Bt et donc son élimination avec le

culot, Il peut être aussi dû à la faible concentration de surnagent en bactériocines (Holo *et al.*, 2002).

Par ailleurs, le diamètre des zones d'inhibitions varie selon le type de milieu de culture utilisé et la souche utilisée comme souche indicatrice ou souche cible (Trias *et al.*, 2008).

Néanmoins, l'apparition de zone inhibitrice indique qu'il existe un effet antibactérien des surnagents des souches de *B. thuringiensis* sur *B. thuringiensis* subsp *aizawai* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De même Barboza-Corona *et al.* (2007) ont observés des comportements similaires et une plus grande sensibilité des souches de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 envers les substances inhibitrices de Bt.

Aussi, Dischinger *et al.* (2009) ont trouvés dans leur étude que l'activité inhibitrice de surnagent de culture de leur souche de Bt est observée seulement contre les bactéries à Gram positifs testées.

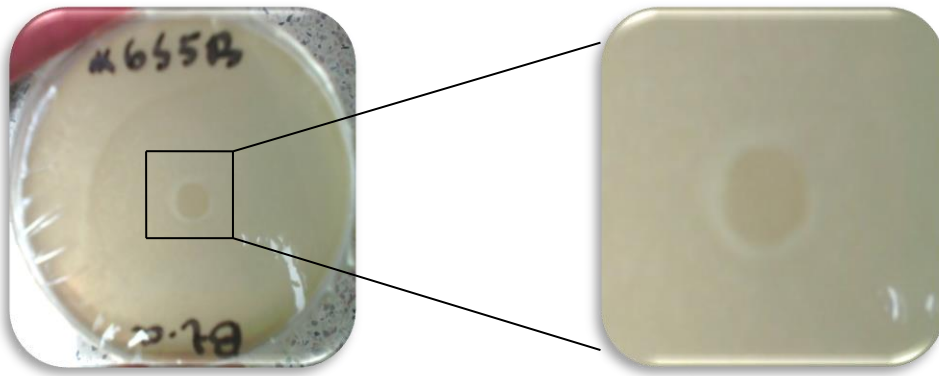
**Tableau 15:** Activité antibactérienne des souches de Bt sur *B. thuringiensis* subsp *airawai* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par la méthode de diffusion sur disque.

| Souche test                                        | Souche productrice | Résultat | Largeur de zone d'inhibition (mm) |
|----------------------------------------------------|--------------------|----------|-----------------------------------|
| <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>airawai</i> | 2SA3A              | -        | 0                                 |
|                                                    | *6S2B              | +        | 8                                 |
|                                                    | *6S5B              | +        | 7                                 |
| <i>Staphylococcus Aureus</i> ATCC 25923            | 2SA3A              | +        | 9                                 |
|                                                    | *6S2B              | +        | 7.5                               |
|                                                    | *6S5B              | +        | 9                                 |

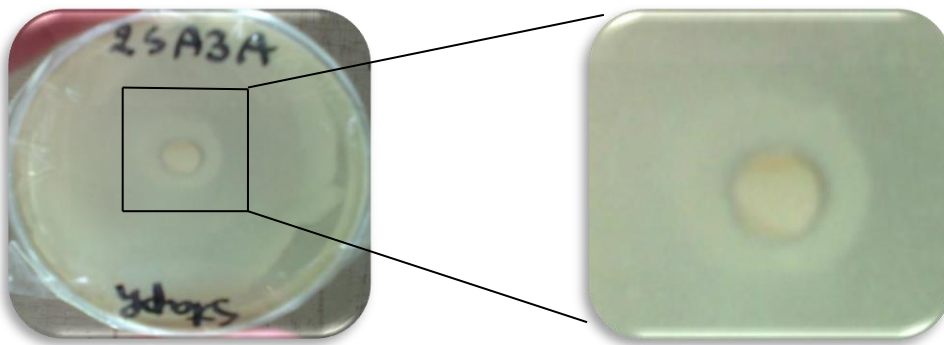
Diamètre de disque : 6 mm

+ : Présence de zone d'inhibition

- : Absence de zone d'inhibition



**Figure 26 :** Résultat de l'activité antimicrobienne de surnagent de culture de souche de *B. thuringiensis* \*6S5B sur la souche test *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* par la méthode des disques en papier en milieu Muller Hinton.



**Figure 27 :** Résultat de l'activité antimicrobienne de surnagent de culture de souche de *B. thuringiensis* 2SA3A sur la souche test *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par la méthode des disques en papier en milieu Muller Hinton.

#### **4. Effet des surnagents de culture des souches de *B. thuringiensis* sur la cinétique de croissance des bactéries-tests**

Les surnagents de culture des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B, \*6S5B) ont été étudié vis-à-vis des souches cibles *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella thyphimurium* ATCC 13311, *Escherichia coli* ATCC 25922 et la souche indicatrice *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*.

#### 4.1 Etude de l'effet des surnagents des souches de *Bacillus thuringiensis* sur la cinétique de croissance des bactéries à Gram positifs

L'étude de l'effet de la cinétique de la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* est représentée dans les tableaux 16, 17, 18 et 19 et les figures 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 et 39.

##### 4.1.1 Sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

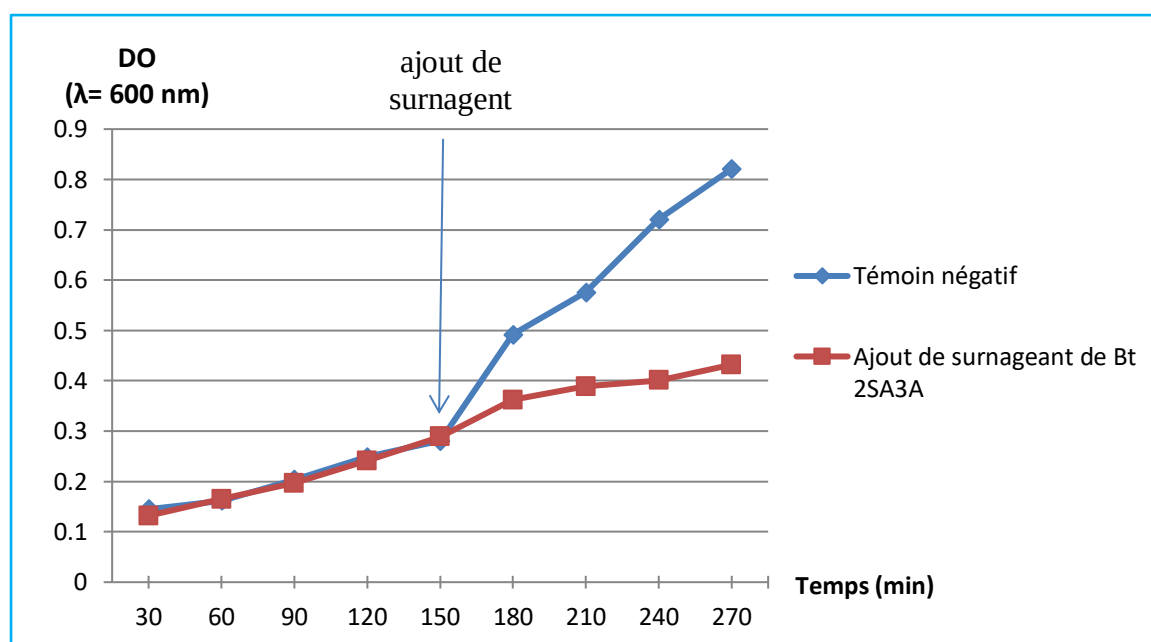
L'étude de l'effet de la cinétique de la croissance bactérienne de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est représentée dans les tableaux 13 et 14 et les figures 28, 29, 30, 31, 32 et 33.

**Tableau 16 :** Résultats de suivi de la croissance de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec l'ajout des surnagents de culture des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B, \*6S5B).

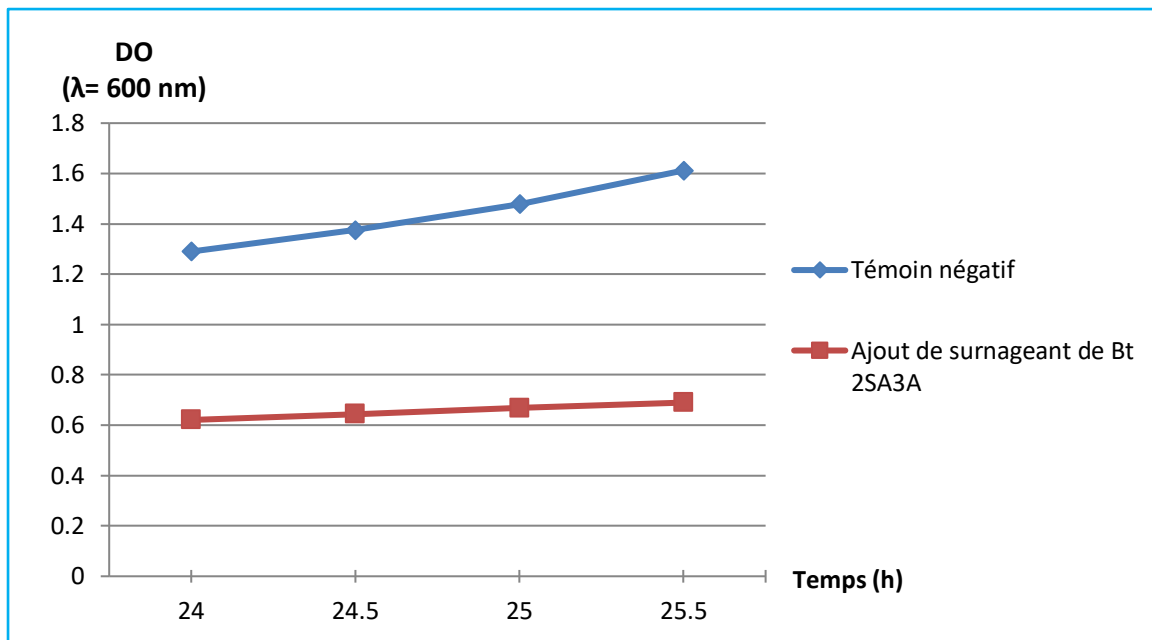
| DO (600nm) / Temps (min) | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B | Témoin négatif |
|--------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
| 30                       | 0.132                                               | 0.172                                               | 0.163                                               | 0.145          |
| 60                       | 0.165                                               | 0.198                                               | 0.184                                               | 0.162          |
| 90                       | 0.197                                               | 0.231                                               | 0.213                                               | 0.204          |
| 120                      | 0.241                                               | 0.271                                               | 0.257                                               | 0.249          |
| 150                      | 0.289                                               | 0.312                                               | 0.301                                               | 0.281          |
| 180                      | 0.362                                               | 0.372                                               | 0.412                                               | 0.492          |
| 210                      | 0.389                                               | 0.435                                               | 0.439                                               | 0.576          |
| 240                      | 0.401                                               | 0.442                                               | 0.44                                                | 0.721          |
| 270                      | 0.432                                               | 0.465                                               | 0.476                                               | 0.821          |

**Tableau 17 :** Résultats de suivi de la croissance de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 après 24 h.

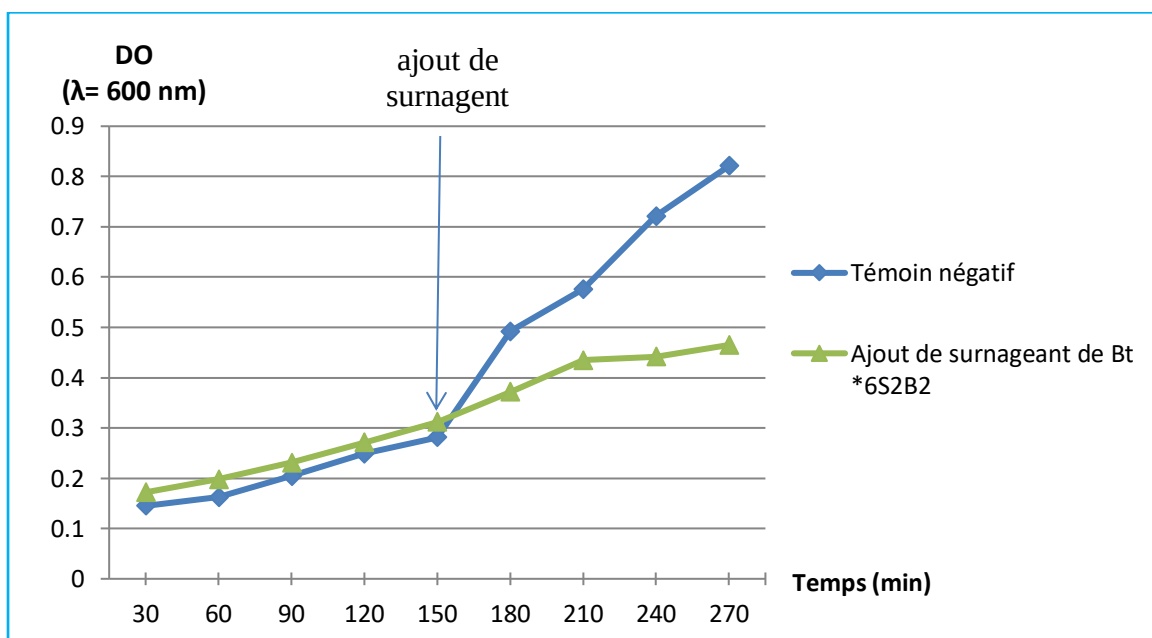
| DO (600 nm) / Temps (h) | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B | Témoin négatif |
|-------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
| 24                      | 0.621                                               | 0.616                                               | 0.643                                               | 1.29           |
| 24,5                    | 0.644                                               | 0.639                                               | 0.662                                               | 1.376          |
| 25                      | 0.668                                               | 0.675                                               | 0.679                                               | 1.479          |
| 25,5                    | 0.69                                                | 0.694                                               | 0.697                                               | 1.612          |



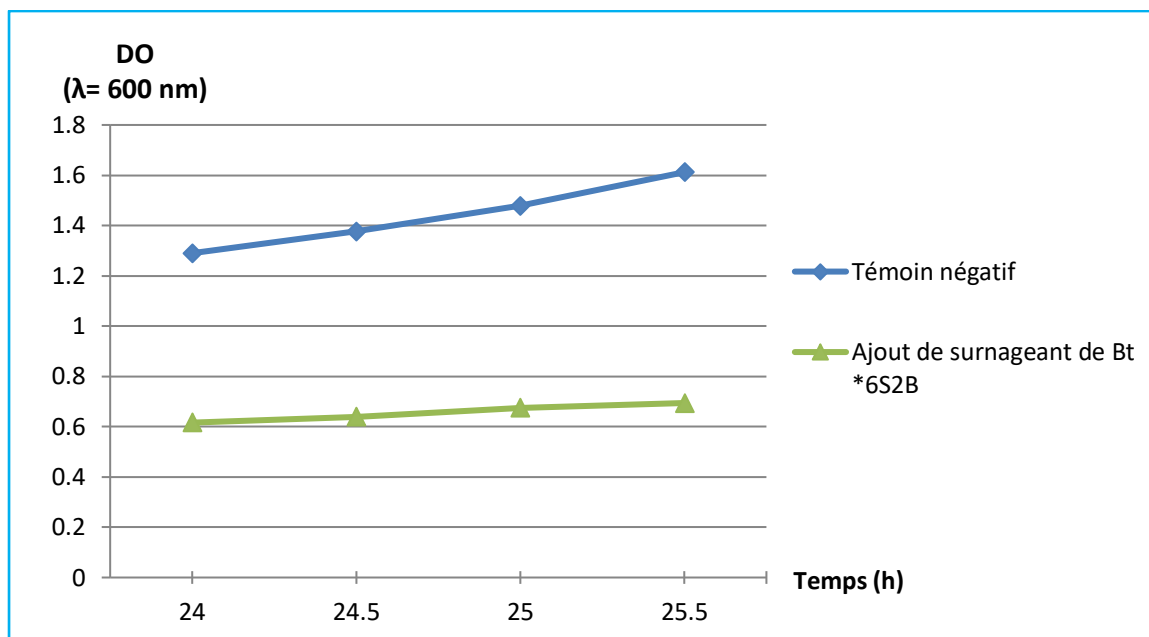
**Figure 28 :** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* 2SA3A.



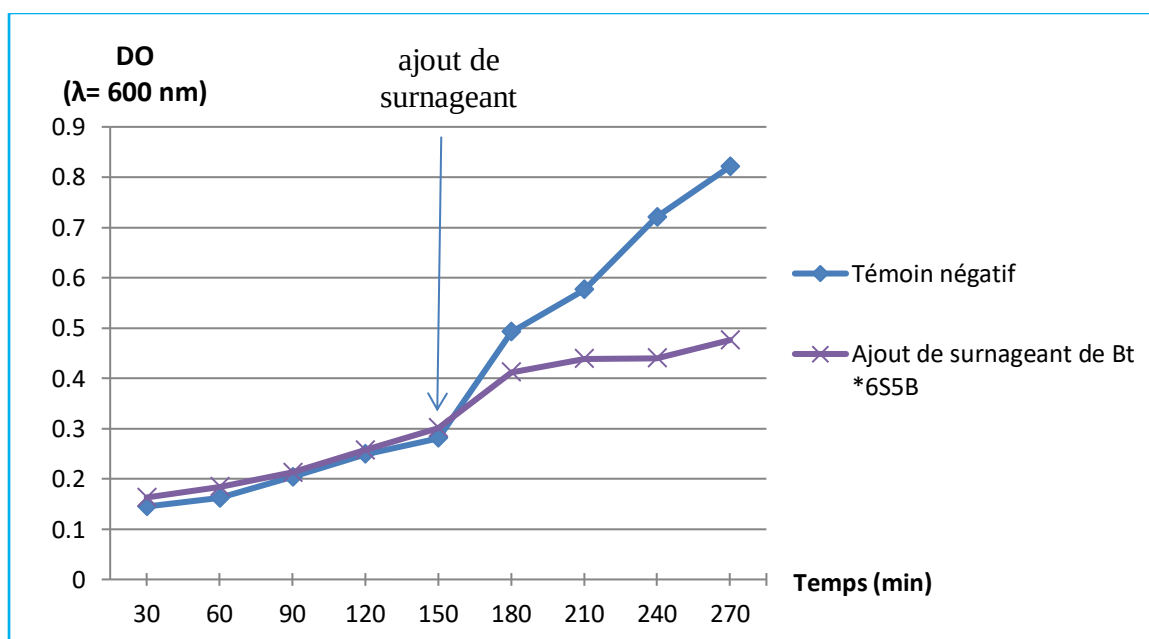
**Figure 29 :** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* 2SA3A.



**Figure 30 :** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S2B.

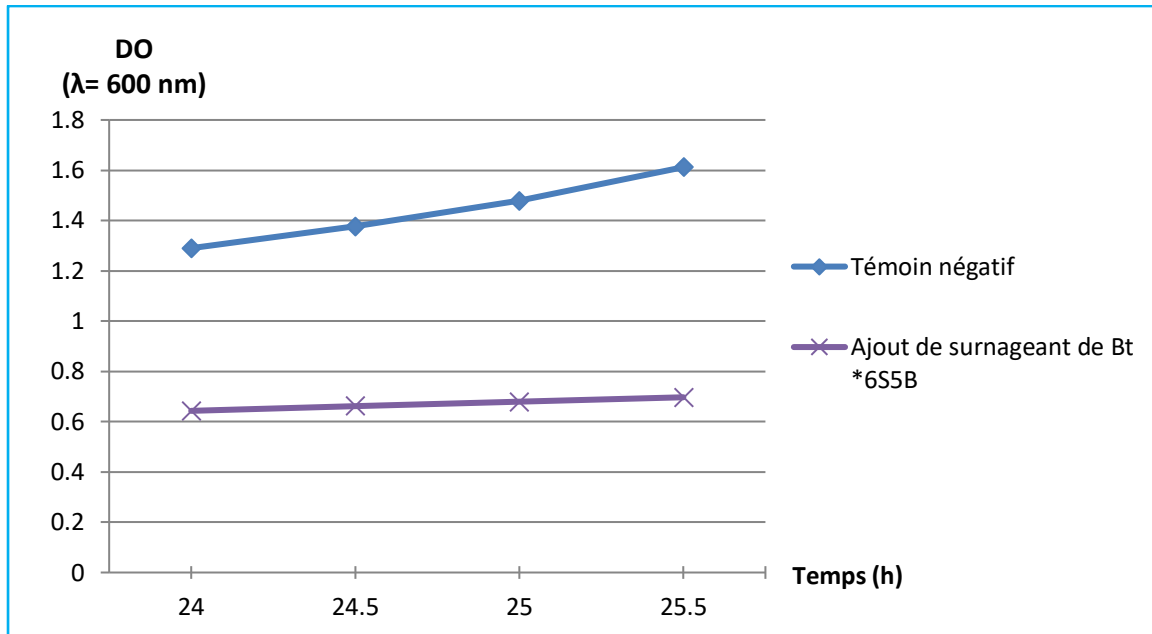


**Figure 31 :** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S2B.



**Figure 32 :** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S5B.





**Figure 33 :** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S5B.

#### 4.1.2 Sur *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*

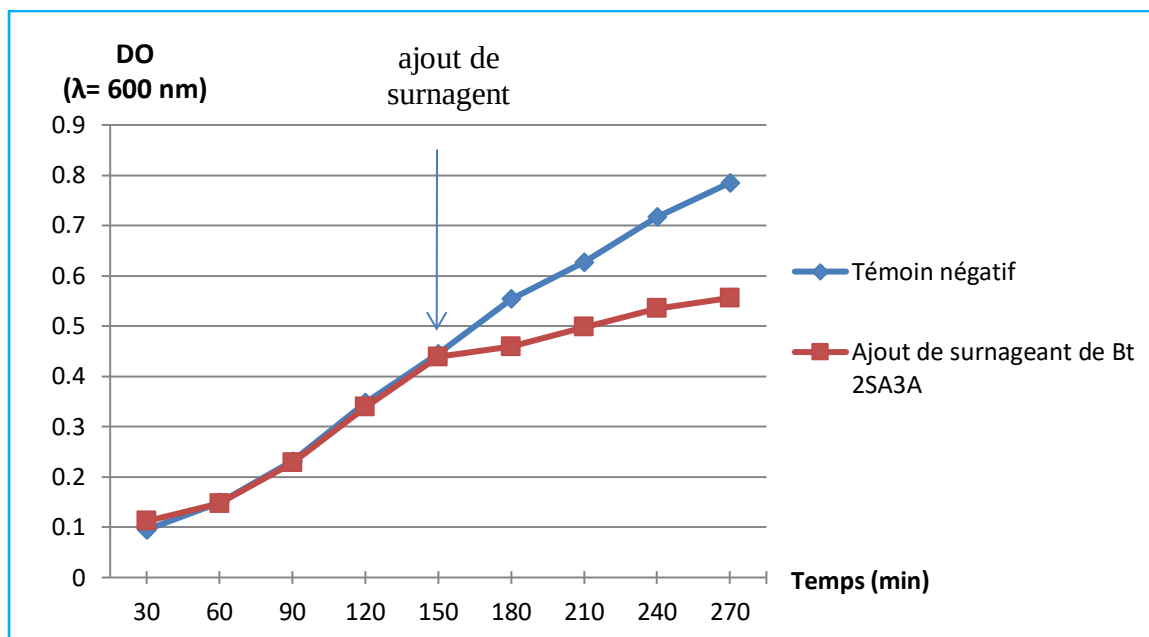
L'étude de l'effet de la cinétique de la croissance bactérienne de *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* est représentée dans les tableaux 18 et 19 et les figures 34, 35, 36, 37, 38 et 39.

**Tableau 18 :** Résultats de suivi de la croissance de la souche *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* avec l'ajout des surnagents des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B, \*6S5B).

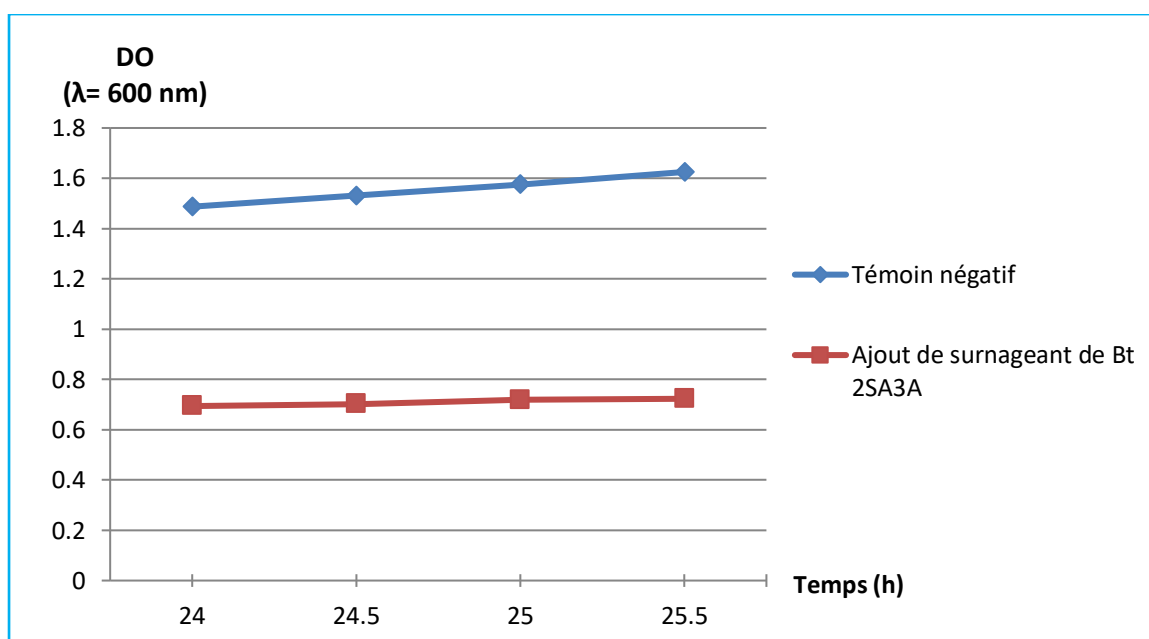
| DO (600 nm) / Temps (min) | Ajout de surnagent de 2 <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B | Témoin négatif |
|---------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
| 30                        | 0.112                                                 | 0.108                                               | 0.117                                               | 0.095          |
| 60                        | 0.147                                                 | 0.143                                               | 0.151                                               | 0.149          |
| 90                        | 0.228                                                 | 0.249                                               | 0.239                                               | 0.231          |
| 120                       | 0.339                                                 | 0.329                                               | 0.335                                               | 0.348          |
| 150                       | 0.439                                                 | 0.398                                               | 0.414                                               | 0.445          |
| 180                       | 0.459                                                 | 0.414                                               | 0.432                                               | 0.554          |
| 210                       | 0.498                                                 | 0.462                                               | 0.441                                               | 0.627          |
| 240                       | 0.535                                                 | 0.49                                                | 0.476                                               | 0.717          |
| 270                       | 0.556                                                 | 0.522                                               | 0.497                                               | 0.785          |

**Tableau 19 :** Résultats de suivi de la croissance de la souche *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* après 24 h.

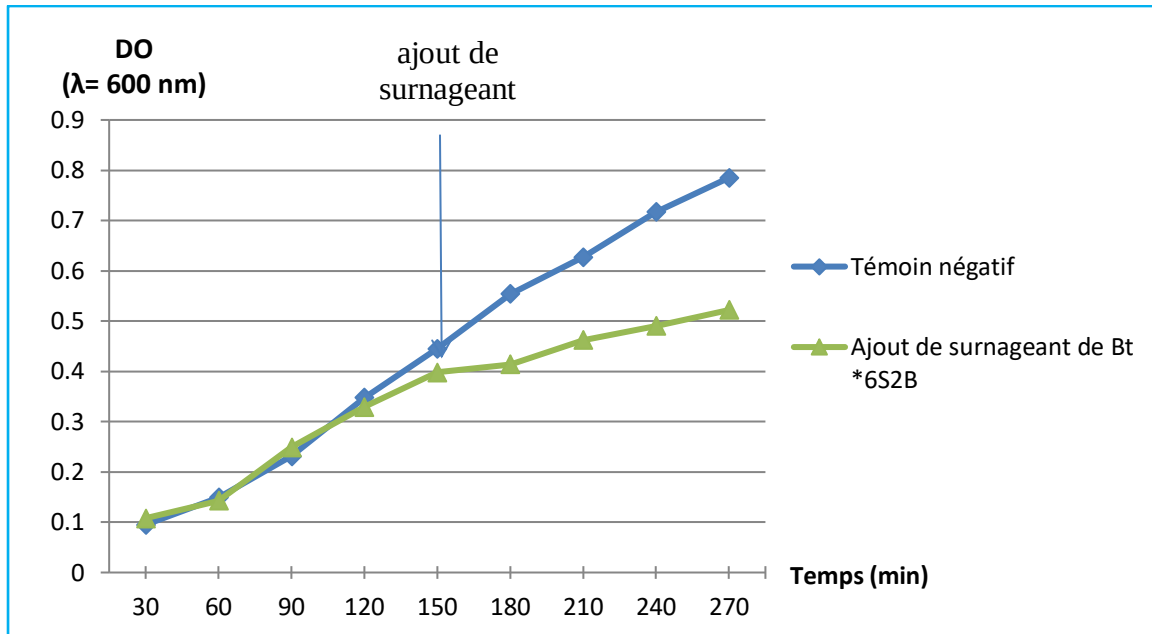
| DO (600 nm) / Temps (h) | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B | Témoin négatif |
|-------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
| 24                      | 0.694                                               | 0.662                                               | 0.674                                               | 1.487          |
| 24,5                    | 0.702                                               | 0.683                                               | 0.691                                               | 1.531          |
| 25                      | 0.719                                               | 0.699                                               | 0.704                                               | 1.576          |
| 25,5                    | 0.723                                               | 0.707                                               | 0.718                                               | 1.625          |



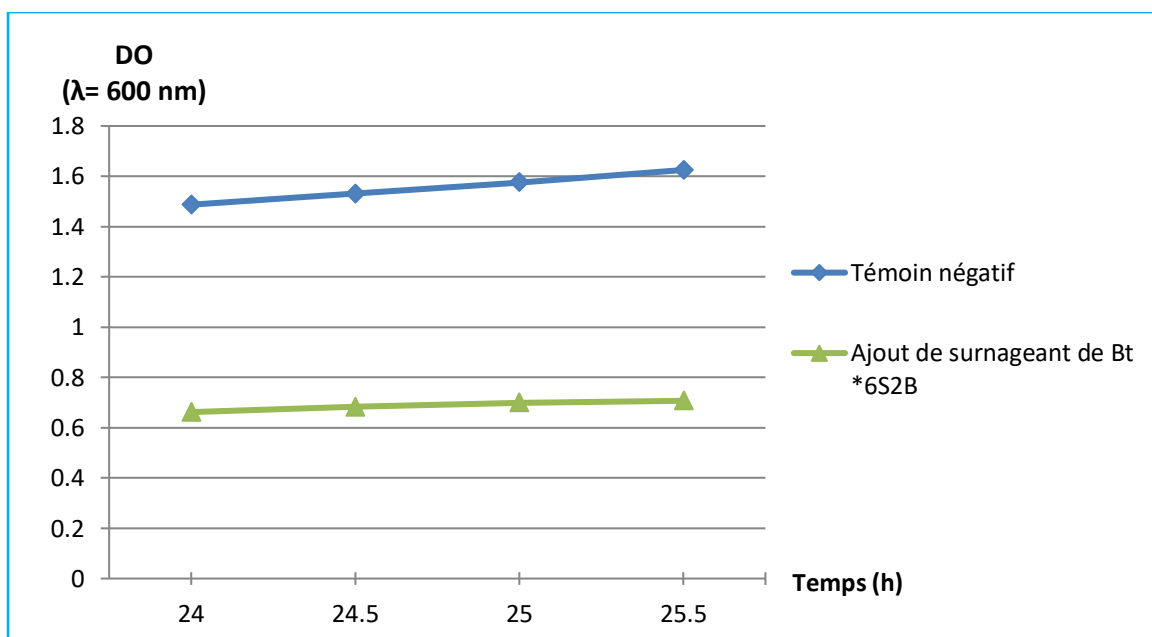
**Figure 34:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* 2SA3A.



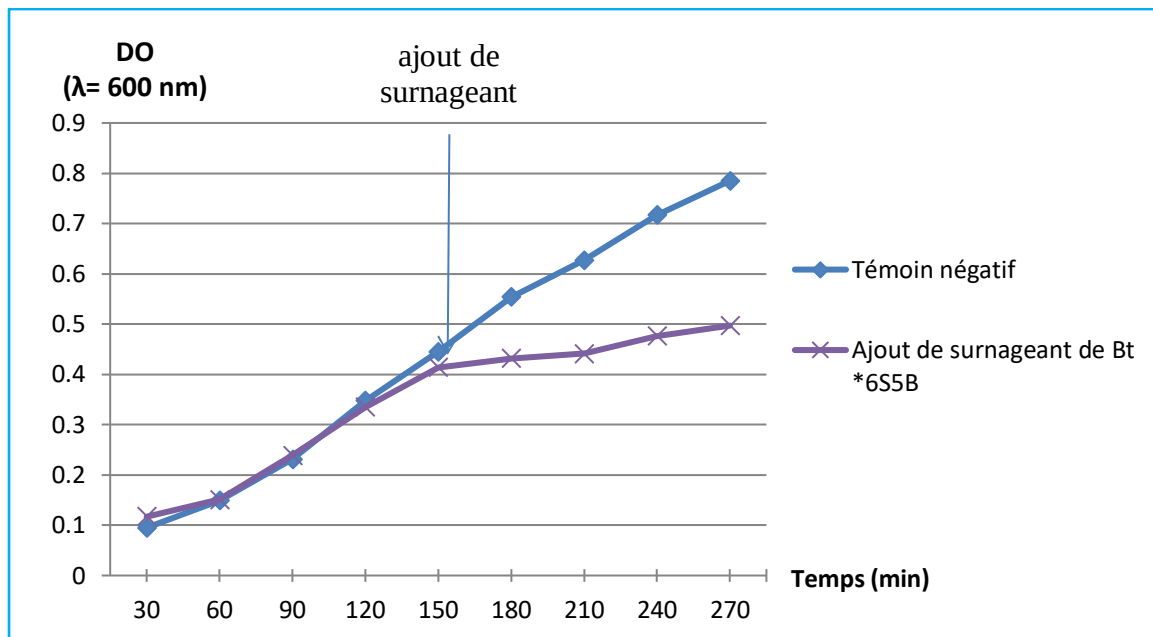
**Figure 35:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* 2SA3A.



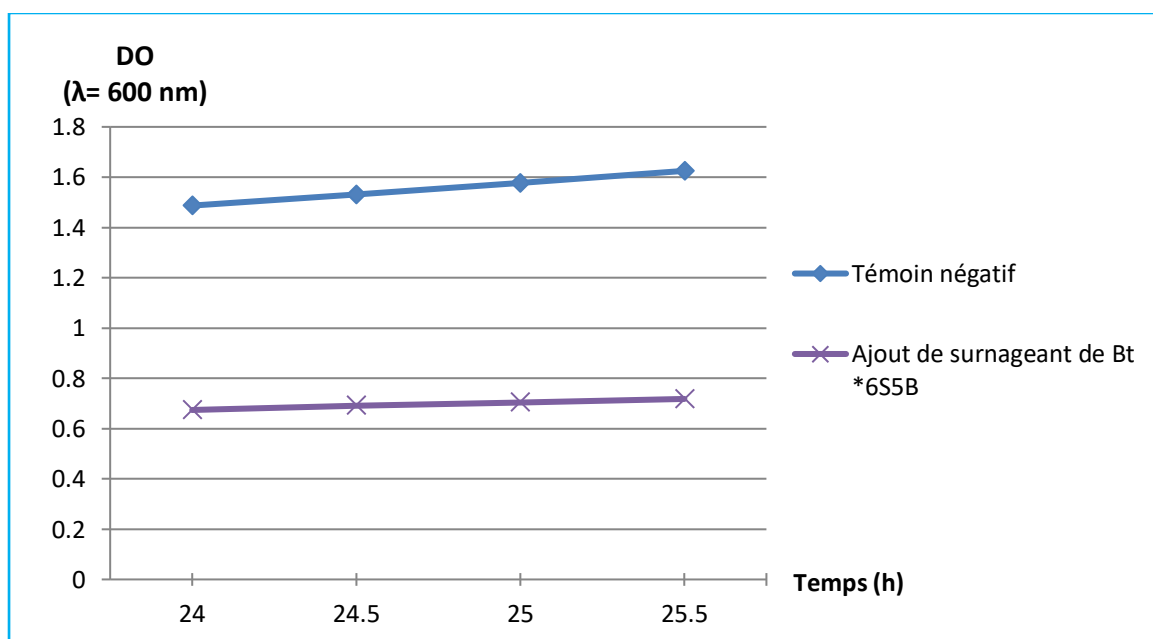
**Figure 36:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S2B.



**Figure 37:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S2B.



**Figure 38:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S5B.



**Figure 39:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S5B.

Dans ces courbes (Figure 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 et 39) on peut observer que la densité optique augmente en fonction de temps pour le témoin négatif et nos échantillons parallèlement ce qui explique qu'il y'a une croissance bactérienne.

L'ajout des surnagent des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*2S2B, \*2S5B) après 150 min de culture a induit stabilisation de la densité optique des échantillons par rapport au témoin. L'effet de nos surnagents se traduit par une inhibition de la croissance des bactéries (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*) en comparaison avec les témoins qui poursuivent leur croissance. Ceci confirme que les surnagents des souches de Bt ont un effet bactériostatique provoquant l'inhibition de croissance des bactéries à Gram positifs.

### **4.2 Etude de l'effet des surnagents des souches de *Bacillus thuringiensis* sur la cinétique de croissance des bactéries à Gram négatifs**

L'étude de la cinétique de la croissance bactérienne de *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Escherichia coli* ATCC 25922 est représentée dans les tableaux 20, 21, 22 et 23 et les figures 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 et 51.

#### **4.2.1 *Salmonella typhimurium* ATCC 13311**

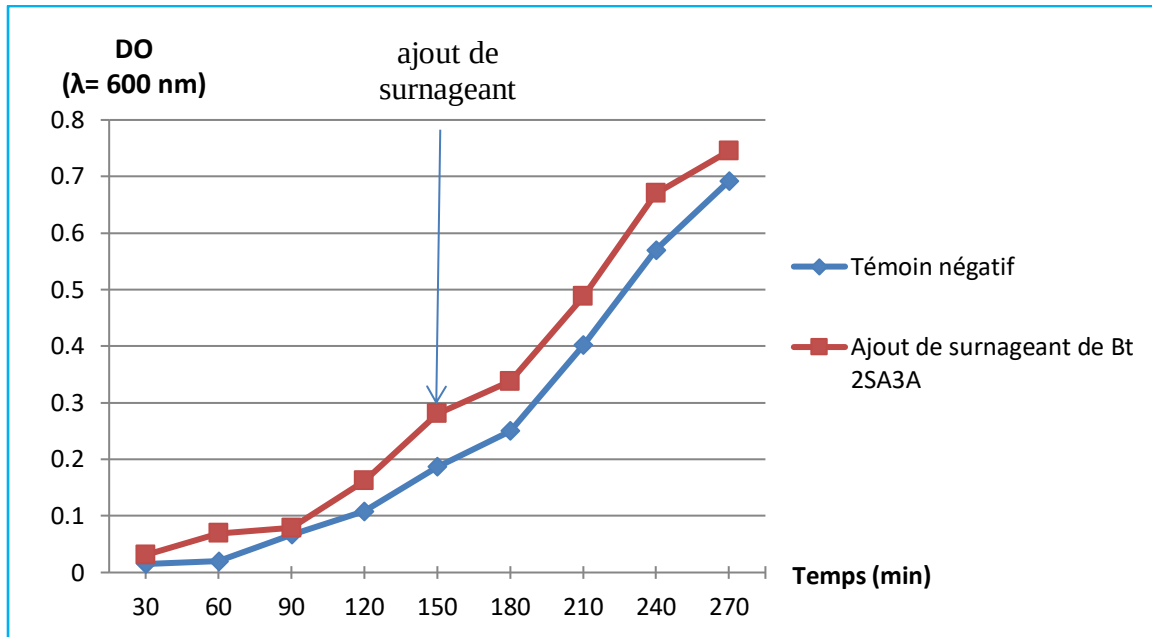
L'étude de l'effet de la cinétique de la croissance bactérienne de *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 est représentée dans les tableaux 20 et 21 et les figures 40, 41, 42, 43, 44 et 45.

**Tableau 20 :** Résultats de suivi de la croissance de la souche *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 avec l'ajout des surnagents des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B, \*6S5B).

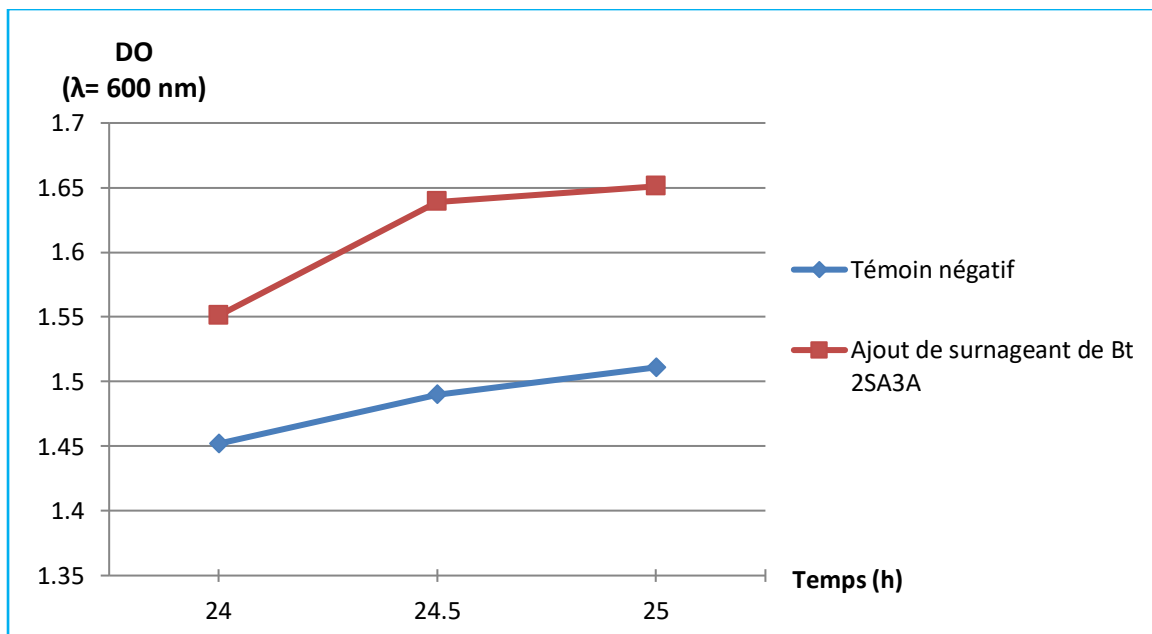
| DO (600 nm) / Temps (min) | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B | Témoin négatif |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
| 30                        | 0.031                                               | 0.054                                               | 0.052                                               | 0.015          |
| 60                        | 0.069                                               | 0.06                                                | 0.059                                               | 0.02           |
| 90                        | 0.079                                               | 0.068                                               | 0.09                                                | 0.067          |
| 120                       | 0.162                                               | 0.086                                               | 0.128                                               | 0.108          |
| 150                       | 0.281                                               | 0.181                                               | 0.253                                               | 0.187          |
| 180                       | 0.338                                               | 0.241                                               | 0.315                                               | 0.25           |
| 210                       | 0.488                                               | 0.411                                               | 0.457                                               | 0.402          |
| 240                       | 0.67                                                | 0.589                                               | 0.685                                               | 0.57           |
| 270                       | 0.745                                               | 0.687                                               | 0.732                                               | 0.692          |

**Tableau 21 :** Résultats de suivi de la croissance de la souche *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 après 24 h.

| DO (600 nm) / Temps (h) | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B | Témoin négatif |
|-------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
| 24                      | 1.551                                               | 1.566                                               | 1.554                                               | 1.452          |
| 24,5                    | 1.639                                               | 1.6                                                 | 1.62                                                | 1.49           |
| 25                      | 1.651                                               | 1.631                                               | 1.643                                               | 1.511          |

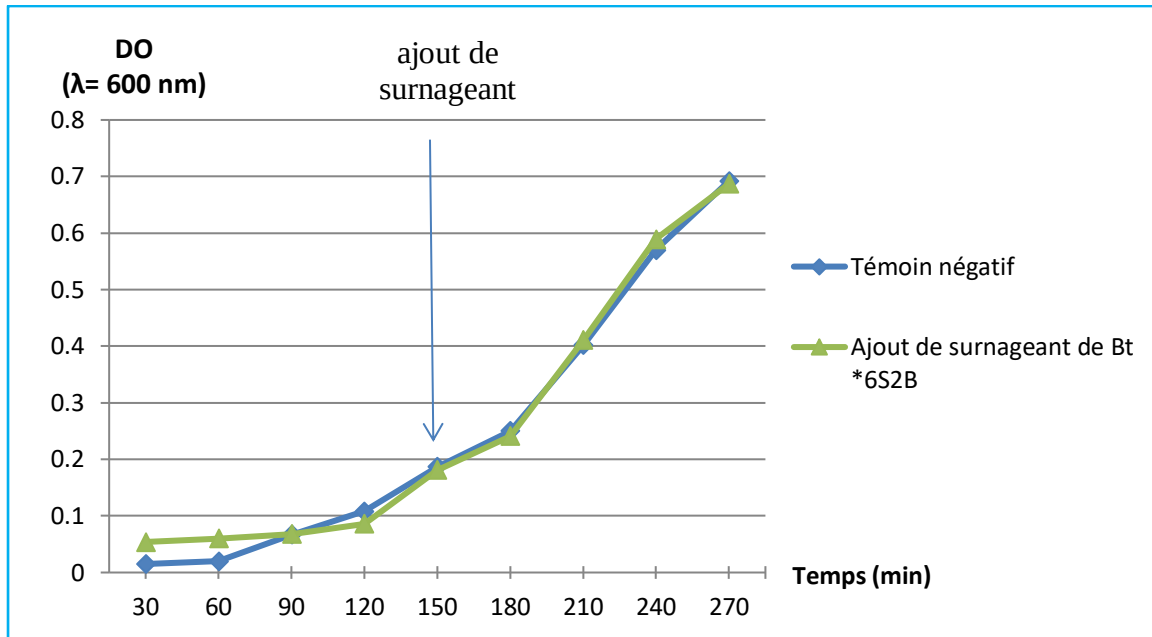


**Figure 40:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* 2SA3A.

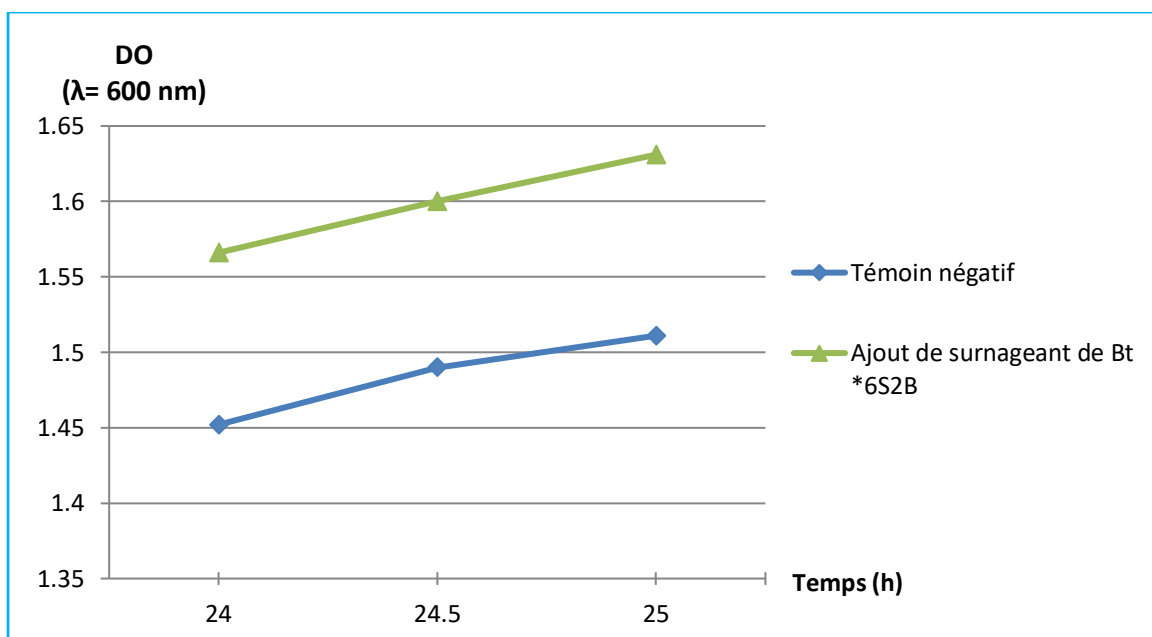


**Figure 41:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* 2SA3A.

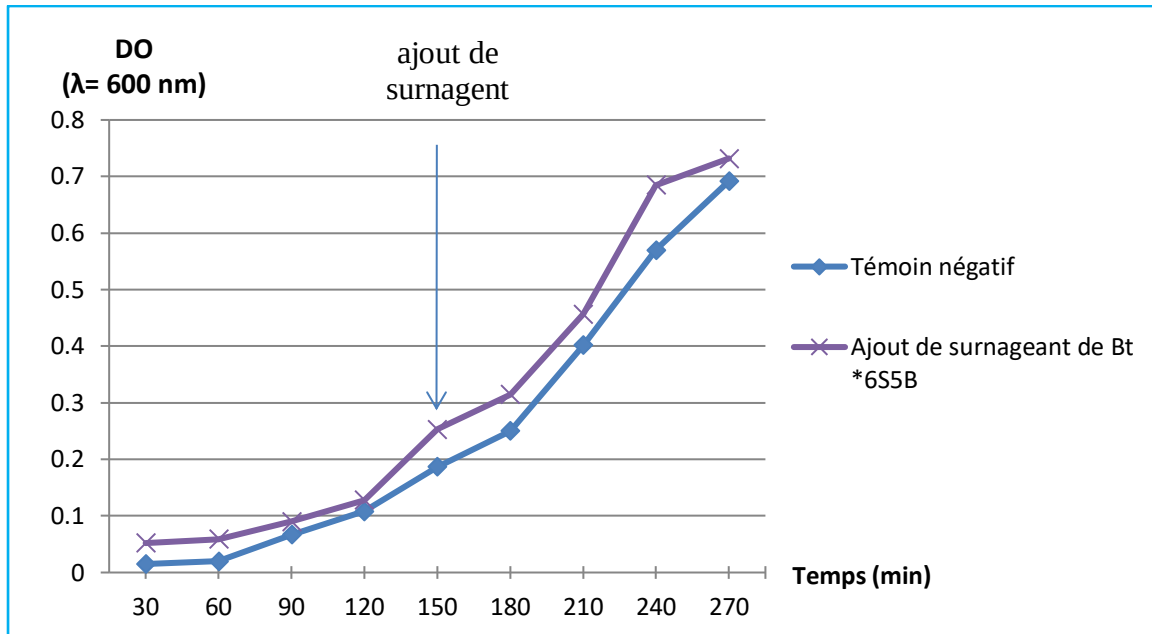




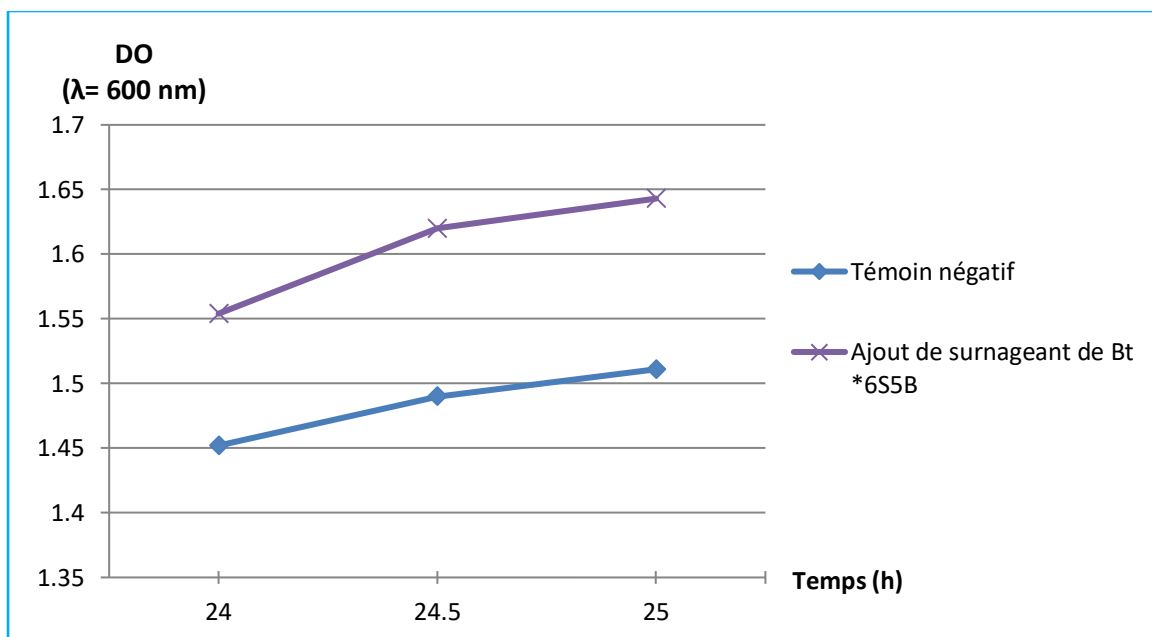
**Figure 42:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S2B.



**Figure 43:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S2B.



**Figure 44:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S5B.



**Figure 45:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S5B.

4.2.2 *Escherichia coli* ATCC 25922

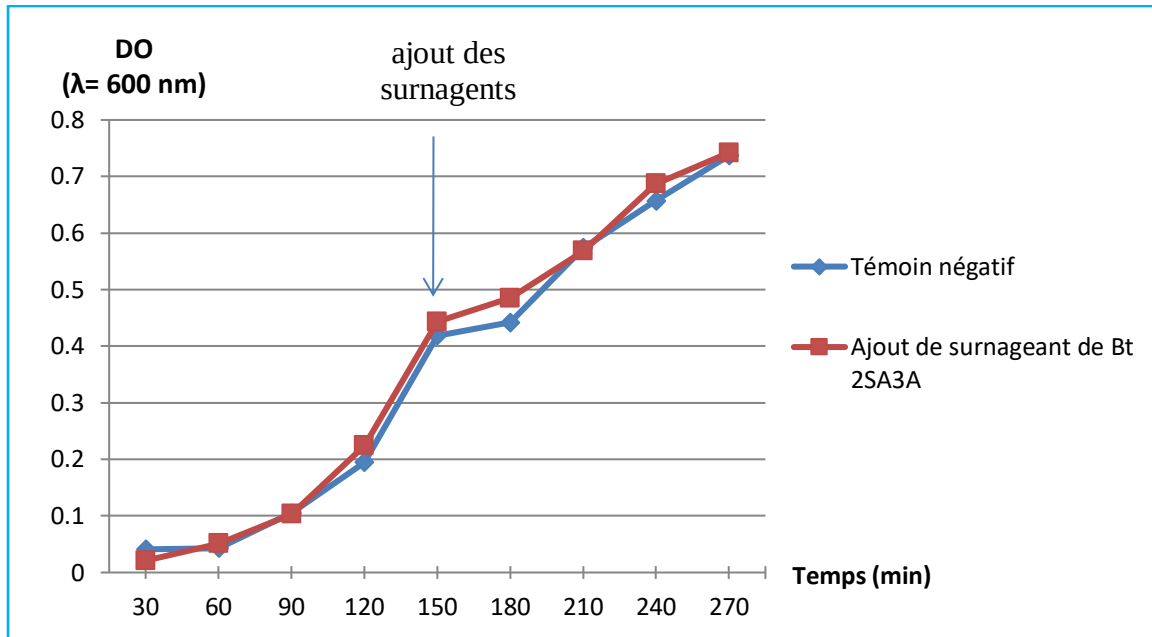
L'étude de l'effet de la cinétique de la croissance bactérienne d'*Escherichia coli* ATCC 25922 est représentée dans les tableaux 22 et 23 et les figures 46, 47, 48, 49, 50 et 51.

**Tableau 22 :** Résultats de suivi de la croissance de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 avec l'ajout des surnagents des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B, \*6S5B).

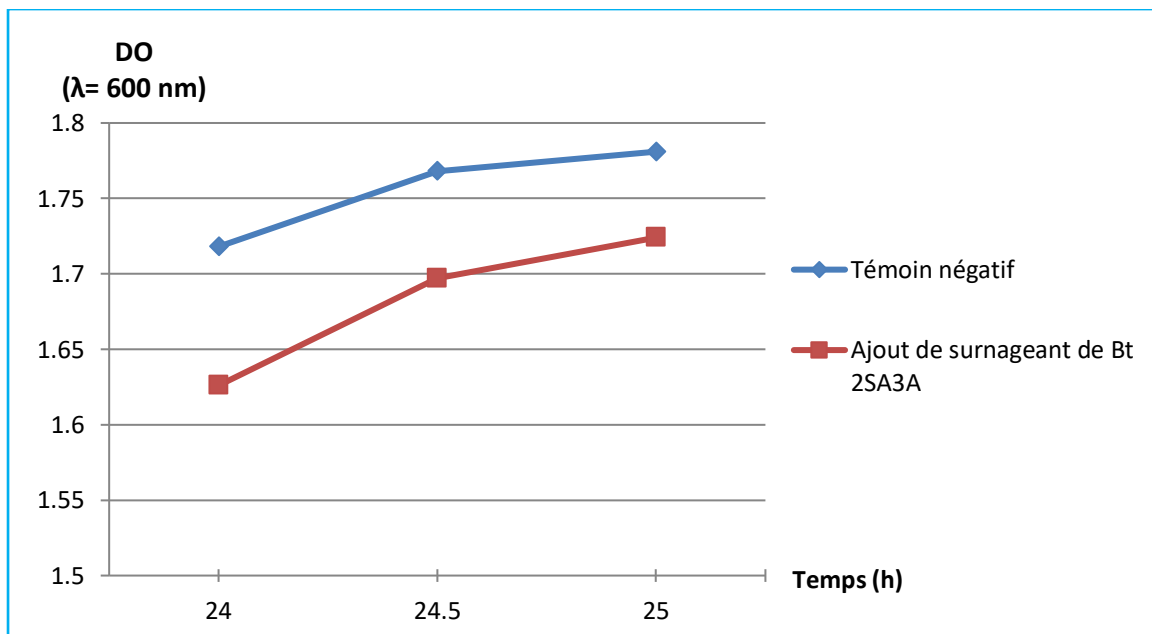
| DO (600 nm) / Temps (min) | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B | Témoin négatif |
|---------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
| 30                        | 0.021                                               | 0.016                                               | 0.047                                               | 0.041          |
| 60                        | 0.051                                               | 0.043                                               | 0.103                                               | 0.043          |
| 90                        | 0.103                                               | 0.101                                               | 0.16                                                | 0.105          |
| 120                       | 0.224                                               | 0.2                                                 | 0.243                                               | 0.195          |
| 150                       | 0.443                                               | 0.436                                               | 0.441                                               | 0.419          |
| 180                       | 0.485                                               | 0.478                                               | 0.513                                               | 0.442          |
| 210                       | 0.568                                               | 0.584                                               | 0.568                                               | 0.574          |
| 240                       | 0.687                                               | 0.739                                               | 0.741                                               | 0.657          |
| 270                       | 0.742                                               | 0.783                                               | 0.791                                               | 0.737          |

**Tableau 23 :** Résultats de suivi de la croissance de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 après 24 h.

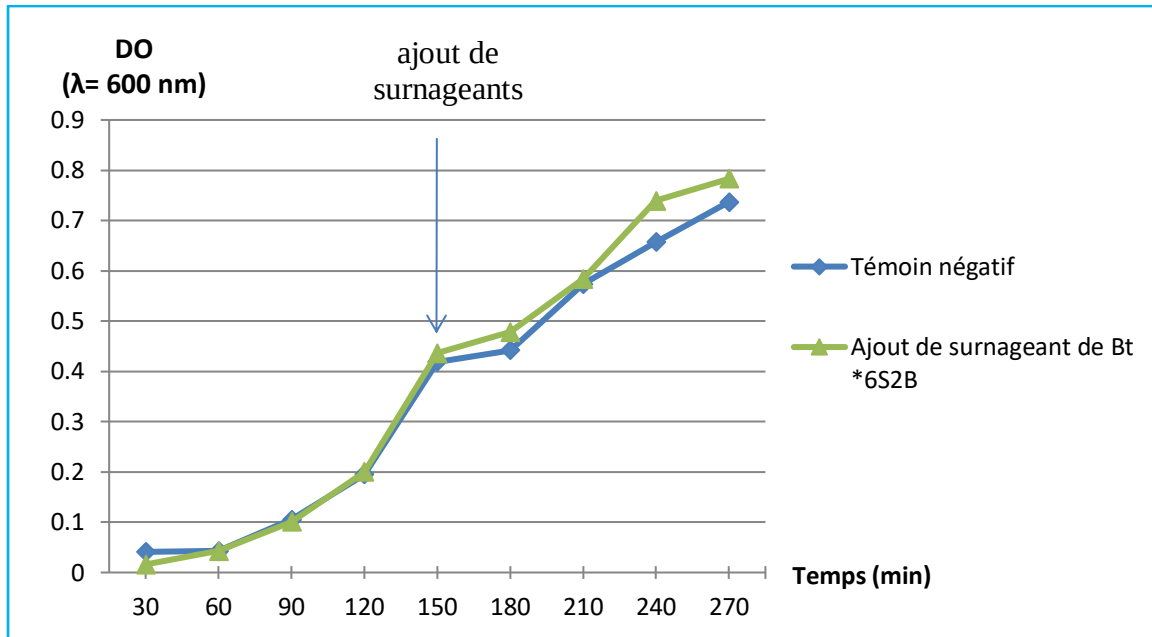
| DO (600 nm) / Temps (h) | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> 2SA3A | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S2B | Ajout de surnagent de <i>B. thuringiensis</i> *6S5B | Témoin négatif |
|-------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------|
| 24                      | 1.626                                               | 2.05                                                | 1.405                                               | 1.718          |
| 24,5                    | 1.697                                               | 2.059                                               | 1.45                                                | 1.768          |
| 25                      | 1.724                                               | 2.064                                               | 1.484                                               | 1.781          |



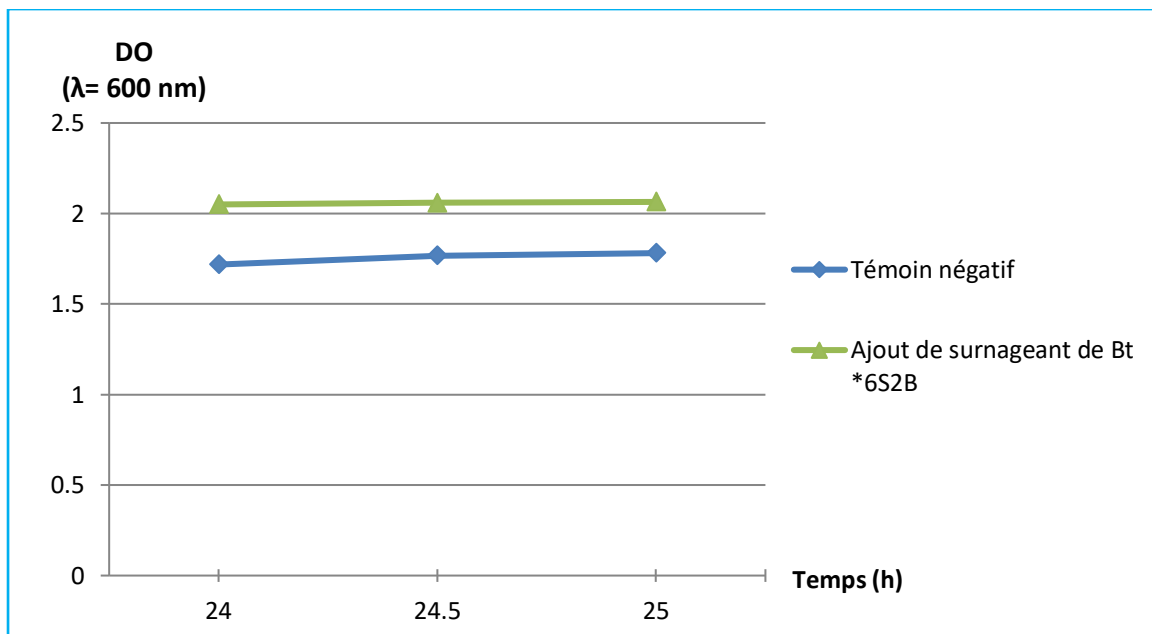
**Figure 46:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* 2SA3A.



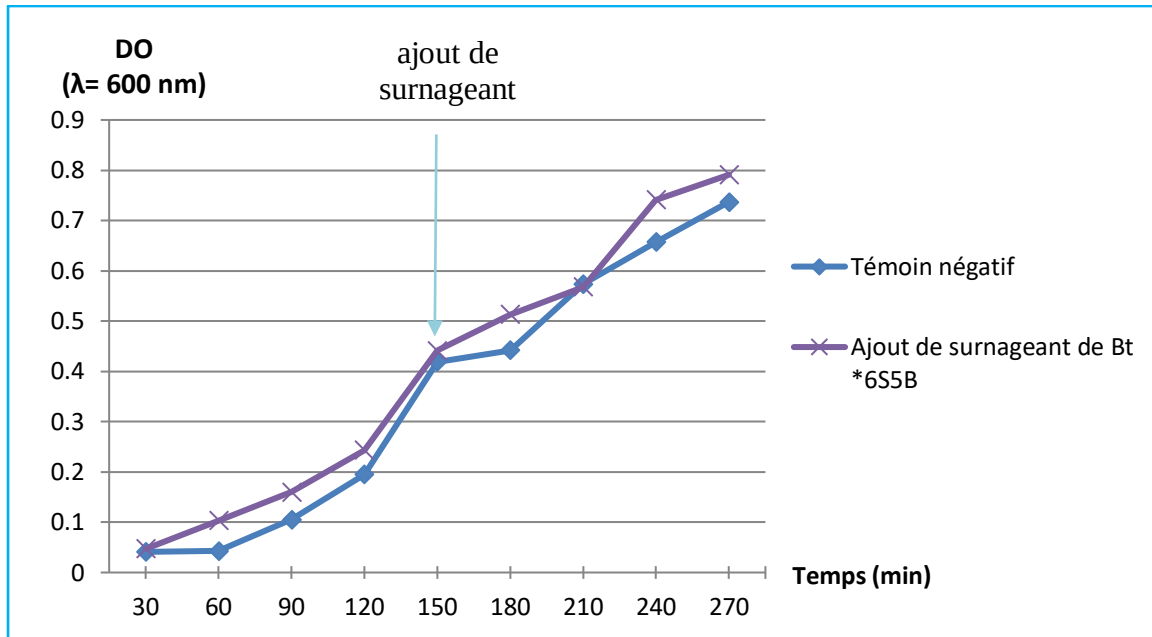
**Figure 47:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 après 24h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* 2SA3A.



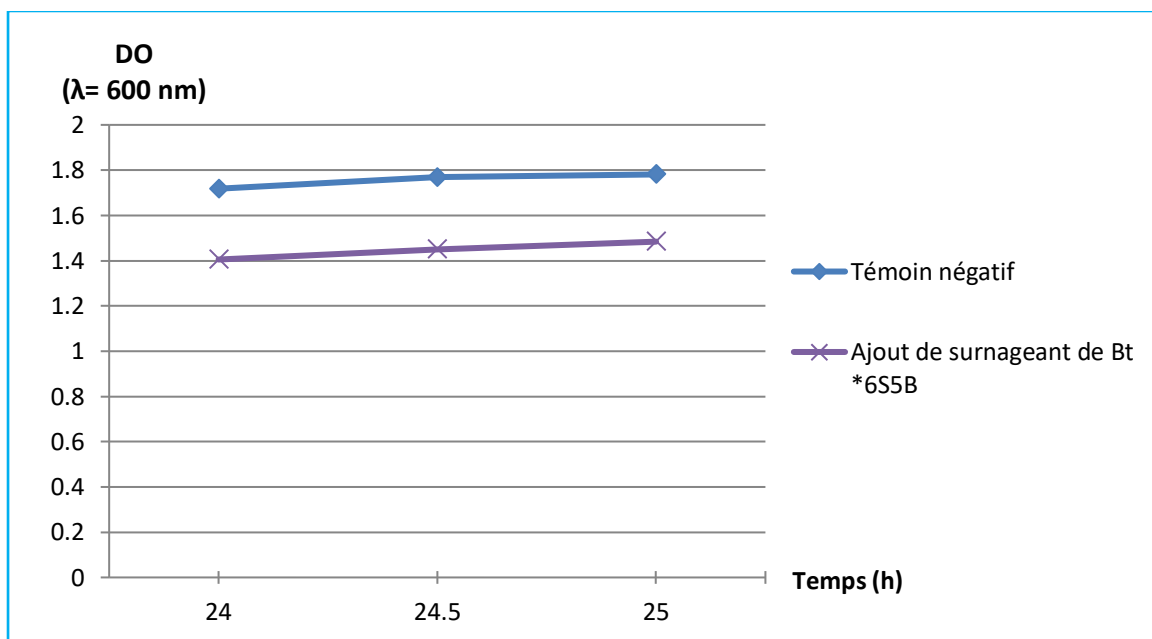
**Figure 48:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S2B.



**Figure 49:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S2B.



**Figure 50:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S5B.



**Figure 51:** Courbe de suivi de la croissance de la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 après 24 h avec l'ajout de surnageant de la souche de *B. thuringiensis* \*6S5B.

Dans ces courbes (Figures 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 et 51) on peut observer que la densité optique augmente en fonction de temps pour les témoins négatifs et nos échantillons parallèlement ce qui montre une croissance de *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Escherichia coli* ATCC 25922.

L'ajout des surnagants des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*2S2B, \*2S5B) après 150 min de culture n'a pas montré un effet sur la densité optique des échantillons par rapport au témoin. Les bactéries tests (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Escherichia coli* ATCC 25922) poursuivent leurs croissances normalement en comparaison avec les témoins. Ceci confirme que les surnagants de culture des souches de Bt n'ont pas un effet sur la croissance des bactéries à Gram négatifs testées.

Ces résultats concordent avec les caractéristiques de la plupart des bactériocines découvertes, qui ne sont pas actives sur la plupart des bactéries à Gram négatif. En effet, tandis que Chaabouni *et al.* (2012) rapportent que la bactériocine Entomocin 9 du *B. thuringiensis* subsp. *entomocidus* HD9 est active sur *Pseudomonas aeruginosa*. Tandis que Ahern *et al.* (2003) ont démontré une activité contre seulement *Listeria innocua* sans affecter les bactéries à Gram négatif testées (*Enterobacter aerogenes*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas*, *Salmonella typhimurium*), ainsi que les travaux de Barbosa-corona *et al.* (2007) qui montrent l'absence d'activité inhibitrice de 5 bactériocines de différents sérotypes de Bt (*Bt morrisoni*, *Bt Kurstaki*, *Bt entomocidus*, *Bt tolworthi*, *Bt kenyae*) sur les bactéries à Gram négatif suivante : *E. coli*, *Shigella sp.*, *P. aeruginosa*, mais ces 5 bactériocines étaient actives sur *Vibrio cholerae*.

Les bactéries à Gram positif sont généralement plus sensibles à l'effet bactéricide des souches de Bt. Les bactériocines sont surtout actives sur les bactéries pathogènes à Gram positifs et agissent en formant des pores dans la membrane cytoplasmique qui entraînent des perturbations des fonctions cellulaires. Song et Richard (1997) ont montré que chez les bactéries à Gram positif, les cellules résistantes aux bactériocines ont une membrane de composition différente de celles des cellules sensibles (Labioui *et al.*, 2005).

Acuna *et al.* (20012) ont décrit la conception et l'expression d'un nouveau peptide hybride recombinant combinant l'entérotoxicine CRL35 et Microcin V nommé Ent35-MccV. La bactériocine chimérique a montré une activité antimicrobienne contre les isolats cliniques entérohémorragiques d'*Escherichia coli* et contre *Listeria monocytogenes*, ainsi que d'autres

bactéries pathogènes. Par conséquent, Ent35-MccV peut trouver des applications importantes dans l'industrie des aliments et des produits pharmaceutiques.

Gray *et al.* (2006) ont identifié et caractériser un peptide produit par *Bacillus thuringiensis*. Ce peptide a inhibé la croissance de 16 / 19 souches de *B. thuringiensis*, 4/4 souches de *Bacillus cereus*, entre autres, ainsi qu'une souche gram-négative *Escherichia coli* MM294 (pBS42). À la fois des effets bactéricides et bactériostatiques ont été observés sur *B. cereus* ATCC 14579 et des effets bactéricides ont été observés sur *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* Bt1267.

He *et al.* (2006) ont isolé *Bacillus licheniformis* ZJU12 du sol qui produite des peptides de type bactériocine qui sont actifs sur diverses espèces de bactéries Gram-positives (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*) mais pas contre les bactéries à Gram négatif testées (*Acinetobacter baumannii*, *Branhamella catarrhalis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus sp* et *Pseudomonas aeruginosa*) sauf *Xanthomonas oryzae* subsp *oryzae*. Les peptides de type bactériocine étaient sensibles à la protéinase K et à la trypsine et sans effet néfaste sur les souris.

He *et al.* (2006) ont isolé *Bacillus licheniformis* ZJU12 du sol qui produite des peptides de type bactériocine qui sont actifs sur des champignons pathogènes (*Alternaria brassicae*, *Fusarium oxysporum*, *Guignardia sp.*, *Pyricularia grisea* et *Rhizoctonia solani*).

### 5. Etude de l'activité antifongique

Les trois souches de Bt sélectionnées (2SA3A, \*6S2B, \*6S5B), probablement bactériocinogènes, présentent une activité antifongique très marquée contre *Aspergillus niger* ATCC 6275. Ces résultats (Figure 52) sont en accord avec ceux trouvées par Kayalvizhi et Gunasekaran, (2008) qui ont démontré que leurs souches de Bt testées présentent une activité inhibitrice contre des levures. Contrairement aux études de Pradip *et al.* (2012) sur des isolats de Bt qui n'ont démontré aucune activité inhibitrice sur les levures testées.





**Figure 52:** Résultats de l'activité antifongique des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B, \*6S5B) sur *Aspergillus niger* ATCC 6275.

Des études antérieures se sont intéressées à l'étude de l'activité antifongique des enzymes chitinases produites par différents souches de *B. thuringiensis*.

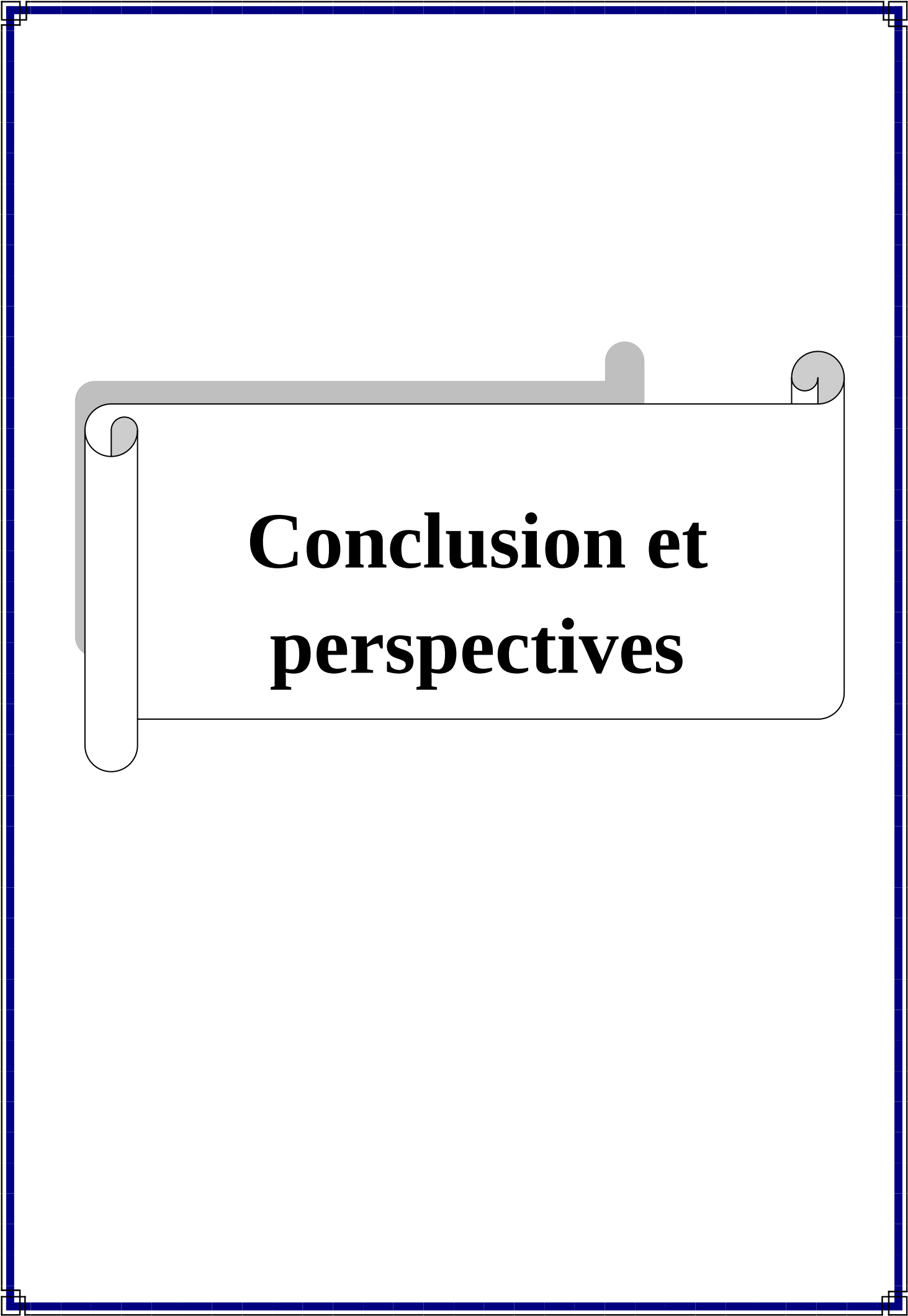
Ramirez *et al.* (2004) ont utilisé *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* pour produire de la chitinase sur les déchets de crevettes. L'activité antifongique de cette chitinase sur les champignons phytopathogènes a été étudiée sur les cultures en croissance et sur les graines de soja infesté par *Sclerotium rolfsii*.

L'inhibition fongique s'est révélée être de 100% pour *S. rolfsii*; 55% à 82% pour *A. terreus*, *A. flavus*, *Nigrospora sp*, *Rhizopus sp*, *A. niger*, *Fusarium sp.*, *A. candidus*, *Absidia sp* et *Helminthosporium sp*; 45% pour *Curvularia sp*; et 10% pour *A. fumigatus*. Lorsque les graines de soja ont été infectées par *S. rolfsii*, la germination a été réduite de 93% à 25%; l'ajout de la chitinase a augmenté la germination à 90%.

Gomaa (2012) a isolée trente souches bactériennes de la rhizosphère des plantes prélevées en Égypte et les a testées pour la production de l'enzyme chitinase. Les deux souches *Bacillus thuringiensis* NM101-19 et *Bacillus licheniformis* NM120-17 ont montré l'activité chitinolytique la plus élevée parmi celles qui ont été étudiées. In vitro, les chitinases de *B. thuringiensis* et *B. licheniformis* ont un potentiel de lyse de la paroi cellulaire de nombreux champignons phytopathogènes testés (*Streptomyces aureofaciens* et *Streptomyces halstedii*). L'ajout de la chitinase de *B. thuringiensis* était plus efficace que celle de *B. licheniformis* en augmentant la germination des graines de sojas infectés par divers champignons phytopathogènes (Gomaa, 2012).

Des études de Sadfi *et al.* (2011), parmi 83 bactéries formant des spores appartenant au genre *Bacillus* ont été isolé du sol tunisie. Ces isolats ainsi que cinq souches supplémentaires de

*Bacillus thuringiensis*, préalablement sélectionné pour leur efficacité contre les insectes, ont été testés in vitro et in vivo contre *Fusarium roseum* subsp. *sambucinum*. Les deux isolats X16 de *B. cereus* et I32 de *B. licheniformis* ainsi que les 3 souches testées de *B. thuringiensis* (1T, 10T et 55T) ont pu se dégrader la chitine colloïdale. L'isolat X16 de *B. cereus* a montré une activité chitinase 2 à 3 fois plus élevée que celle de la souche 55T de *B. thuringiensis*. Les résultats des expériences sur l'effet des isolats de *Bacillus* inhibition de croissance fongique variable selon l'isolat testé (les genres de *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Fusarium*, *Gaeumanomyces*, *Nectria*, *Pythium*, *Phytophthora*) et le milieu sur lequel l'isolat bactérien a été cultivé. Sur PDA, 8 isolats de *Bacillus* sur 9 ont montré un effet inhibiteur sur la croissance du *Fusarium*, alors que sur NA, X16, 1T et 10T semblent être les seuls isolés *Bacillus* testés capables de produire des substances volatiles efficaces contre le pathogène. Ces isolats ont entraîné une réduction de plus de 11,8% dans la croissance des champignons.



# **Conclusion et perspectives**

L'espèce *Bacillus thuringiensis* (Bt) fait partie du groupe *Bacillus cereus*, son habitat principal est le sol. Les bactéries de ce groupe sont des producteurs primordiaux de métabolites antimicrobiens, dont l'espèce *Bacillus thuringiensis* qui est caractérisée par sa capacité à produire des métabolites secondaires ayant une activité antimicrobienne très divers tels que les bactériocines, les chitinases et les antibiotiques au cours de sa croissance. *Bacillus thuringiensis* a fait l'objet de plusieurs études exhaustives en raison de leur potentiel biotechnologique dans le domaine de la lutte biologique.

Le but de notre travail est le criblage de collection de 20 souches locales de *Bacillus thuringiensis* qui ont été isolées à partir du sol de différentes régions en Algérie : les souches [(1P1A, 1S5A, 1S4A et 1S4C de Kasr el arab-Ain salah), (2P2C, 2P2B, 2P1A, 2P3A, \*2P4C, 2SA5C, 2SA3A, 2SA2B, 2SA5A et 2SA3C de Borj Amar Idris-Illizi), (\*6S5C, \*6S2B, \*6S5B, 6S1A et 6S5E de Tolga-Biskra) et (3-3.B de Ammal-Boumerdès)], ayant une activité antimicrobienne produites au cours de la croissance, sur des souches microbiennes pathogènes de l'Homme *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* qui a été isolée à partir du bioinsecticide B401 utilisé dans la lutte contre la fausse teigne de la cire (*Galleria mellonella*) ont été utilisées pour sélectionner les souches de Bt qui ont un pouvoir antagoniste. L'activité antimicrobienne a été étudiée sur *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*, *Salmonella thyphimurium* ATCC 13311 et *Escherichia coli* ATCC 25922, et afin d'étudier l'activité antifongiques des souches de Bt sélectionner, *Aspergillus niger* a été utilisé.

L'étude de l'activité antagoniste des souches de Bt isolées du sol de différentes régions en Algérie contre deux souches indicatrices *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en utilisant la méthode d'antagonisme différé a permis de constater que: deux souches de *B. thuringiensis* (6SA1 et 6S5E) ont une activité inhibitrice de la croissance de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et trois souches de Bt (2SA3A, \*6S2B et \*6S5B) ont une activité inhibitrice de la croissance de *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*. Les autres souches de Bt testées n'ont pas montré un effet antagoniste.

## Conclusion et perspectives

---

L'activité antibactérienne des surnagents de culture des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B, \*6S5B) en utilisant les méthodes de diffusion sur disque en papier et en puits sur milieu solide (Muller Hilton) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* a été étudiée. Ces résultats montrent que les surnagents des souches (2SA3A et \*6S5B) de Bt n'ont pas un effet sur la souche test *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* par la méthode de diffusion en puits, et le surnagent de la souche 2SA3A de Bt sur *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* par la méthode de diffusion sur disque en papier. Ceci peut être dû au faible volume de surnagent déposé (100 µl dans les puits et 60 µl sur les disques) ou la faible concentration des substances antimicrobiennes dans les surnagents des isolats de Bt n'était pas suffisante pour atteindre le seuil d'inhibition, mais un effet antimicrobien détecter avec les surnagents des souches (2SA3A, \*6S2B et \*6S5B) de Bt sur la souche test *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et le surnagent de la souche \*6S2B de Bt sur *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* par la méthode de diffusion en puits et surnagents des souches (2SA3A, \*6S2B et \*6S5B) de Bt sur la souche test *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et les surnagents de (\*6S2B et \*6S5B) de Bt sur *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* par la méthode de diffusion sur disque en papier.

L'étude de l'effet des surnagents de culture des souches de *Bacillus thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B et \*6S5B) sur la cinétique de la croissance des bactéries à Gram positifs (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai*) et à Gram négatifs (*Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Escherichia coli* ATCC 25922) a montré que les souches *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus thuringiensis* subsp *aizawai* sont sensibles aux métabolites contenus dans les surnagents de culture des souches de Bt, on un arrêt de la croissance a été observé après ajout des surnagents de chacune des 3 souches de Bt en plein phase exponentielle de croissance. Cependant, la croissance des souches bactérienne à Gram négatif *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Escherichia coli* ATCC 25922 n'était pas affectée.

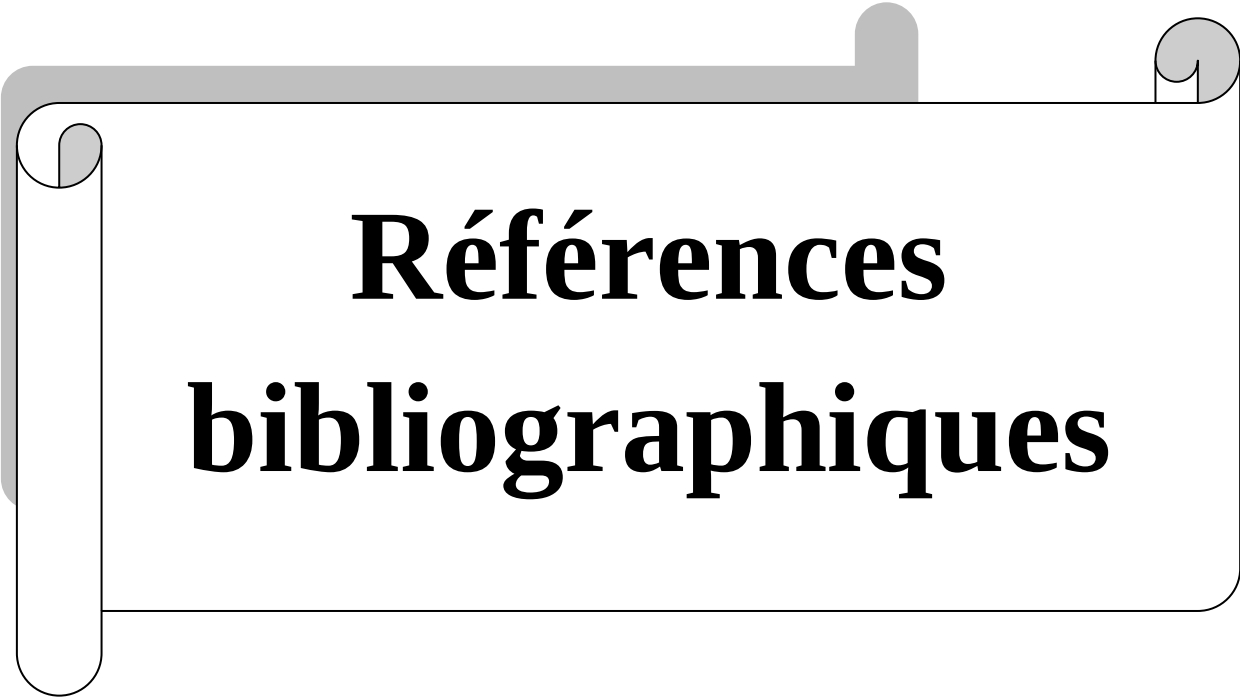
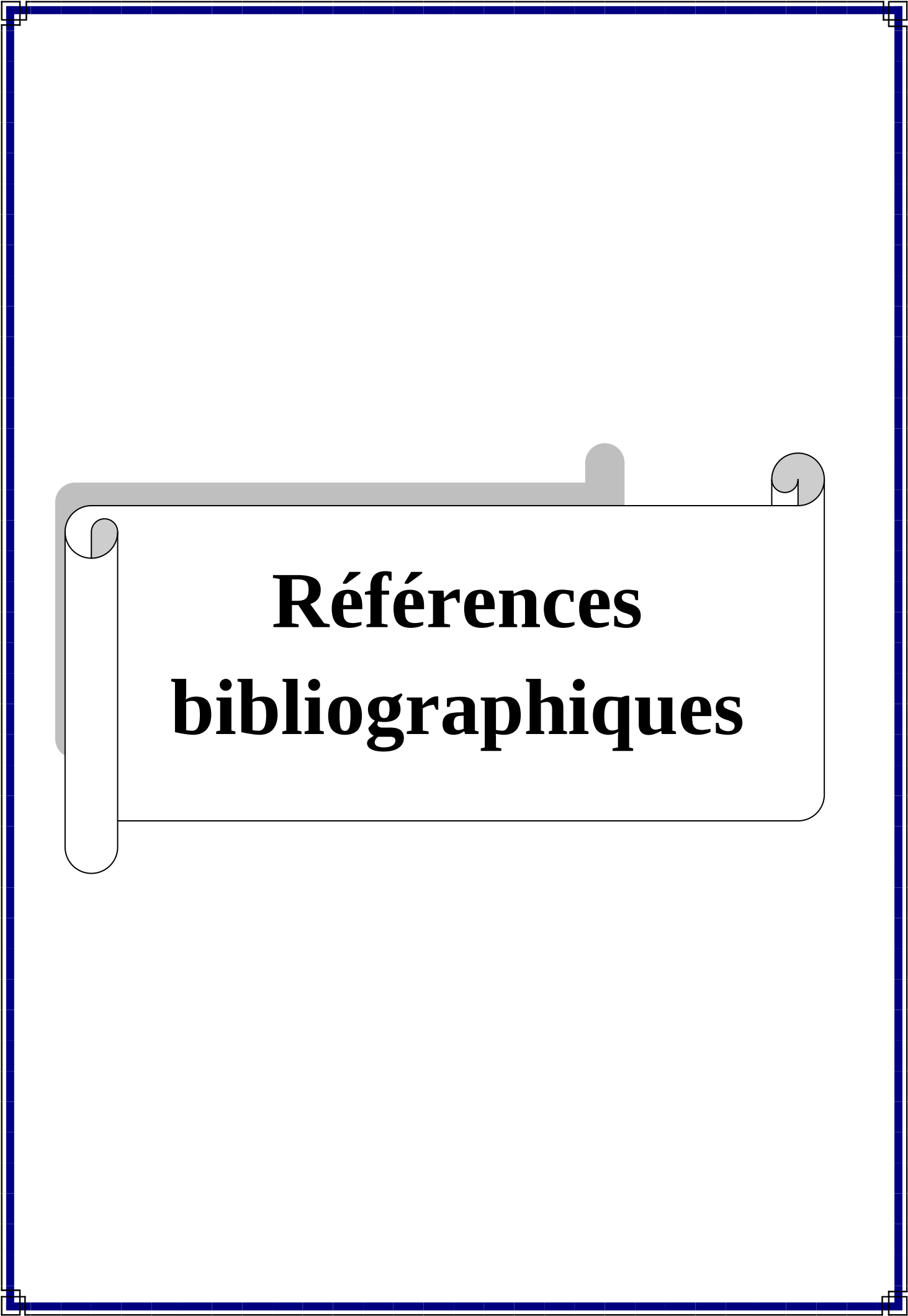
Une activité antifongique très marquée des souches de *B. thuringiensis* (2SA3A, \*6S2B et \*6S5B) sur *Aspergillus niger*, à été révélée.

## Conclusion et perspectives

---

A l'issue de cette étude il serait intéressant de la compléter et l'approfondir par :

- La purification des bactériocines des souches de Bt.
- La caractérisation des bactériocines purifiés.
- L'étude de l'activité chitinolytique des souches de Bt ayant une activité antifongique.



# **Références bibliographiques**

### A

1. **Abdoulaye D., 2005.** Evaluation de l'efficacité de deux delta-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* (cry 1Ac et cry 2Ab) synthétisées par le cotonnier transgénique (coton Bt) dans la gestion de la résistance de HELICOVERPA AMIGERA (HUBNER) a la DELTAMETHRINE. Mémoire de d'ingénieur du développement rural (option agronomie).
2. **Abriouel H., Franz- Charles M. A. P., Ben omar N., 2011.** Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS microbiology reviews*. **35**: 201-232.
3. **Achemchem F., Abrini J., Martinez- Bueno M., Valdivia E., Maqueda, M., 2004.** Purification et caractérisation d'une bactériocine anti-*Listeria* produite par *Entérocooccus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre. *Biotechnologies*. 3-6.
4. **Acuna L., Picariello G., Sesma F., Morero D. R., Bellomio A., 2012.** A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. Open Bio. **2**: 12-19.
5. **Adriana M., Cardenas J., De La Fuente-Salcido N. M., Salcedo- Hernandez R., 2012.** Effects of physical culture parametrs on bacteriocin production by Mexican strains of *Bacillus thuringiensis* after cellular induction. *Journal of industrial microbiology & biotechnologie*. **39**: 183-189.
6. **Ahern M., Verschueren S., Sinderen D. V., 2003.** Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. FEMS Microbiology letters. **220**: 127-131.
7. **Ait Kaki A., 2014.** Recherche de nouvelles potentialités de bactéries du genre *Bacillus* pour l'agriculture et l'agroalimentaire. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat troisième cycle en Biotechnologie. Université Constantine 1. 118p.
8. **Allouche F., Hellal A., Laraba A., 2010.** Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. Nature et technologie. **03** : 13-20.



## Références bibliographiques

---

9. **Aouati H., 2009.** Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Mémoire présenté pour l'obtention du Diplôme de Magister en Microbiologie appliquée et Biotechnologies microbiennes. Université de Constantine.123p.
10. **Attar A. Z., Jaoua S., 2011.** Bacteriocin from qatari *Bacillus thuringiensis* crystal producing strains. Poster. Qatar University, Doha, Qatar. EVPS1.
11. **Auger P., 2015.** Activité anti-cancéreuse d'une parasporine de *Bacillus thuringiensis* 4R2. Mémoire. Université du Québec. 95p.

### B

12. **Barboza-Corona J. E., Vazquez-Acosta H., Bideshi D. K., 2007.** Bacteriocin-like inhibitor substances produced by mexican strains of *Bacillus thuringiensis*. *Archives of microbiology*. **187**: 117-126.
13. **Barnabé S., 2004.** Hydrolyse et oxydation partielle de boues d'épuration comme substrat pour produire *Bacillus thuringiensis* HD-1. Thèse de Doctorat en science de l'eau. Université du Québec : Institut national de la recherche scientifique. Centre-eau terre et Environnement. Canada. 339p.
14. **Belguesmia Y., Naghmouchi K., Chihib N. E., Drider D., 2011.** Class IIa bacteriocins: current knowledge and perspectives. Springer Verlag. 1-41pp.
15. **Bergeron N., 2009.** Caractérisation phénotypique et génotypique d'isolats de *Salmonella typhimurium* provenant de porcs sains ou septicémiques. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D sciences vétérinaires. Université de Montréal. 263p.
16. **Boisvert J., Lacoursière J.O., 2004.** Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec, Québec, ministère de l'Environnement, Envirodoq no ENV/2004/0278, 101 p., document préparé par l'Université du Québec à Trois-Rivières pour le ministère de l'Environnement du Québec.
17. **Bouzegzi H., Kaddour S., 2012.** Isolement, identification et caractérisation de *Bacillus thuringiensis* à partir du sol. Thèse de Master. Université de Boumerdès. 42p.

18. **Brunet J. F., 2009.** Rôle des facteurs physico-chimiques du micro-environnement intestinal et des boucles inter-hélicales du Domaine I dans l'activité de la toxine insecticide Cry9Ca du bacille de Thuringe. Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Physique. Université de Montréal. 177p.

### C

19. **Cahan R., Friman H., Nitzan Y., 2008.** Antibacterial activity of Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *Microbiology*. **154**: 3529-35.
20. **Castella C., 2008.** Cry1C, toxine de *Bacillus thuringiensis* : Analyse des récepteurs potentiels et du mode d'action sur lignées cellulaire Sf9. Mémoire pour l'obtention du diplôme de l'école pratique des hautes études. Ecole pratique des hautes études des sciences de la Vie et de la Terre. France. 40p.
21. **Cécile D., Elise B. C., 2001.** *Salmonella typhimurium* dt104 : bactériologie, épidémiologie, antibiorésistance. Thèse pour le doctorat vétérinaire. École nationale vétérinaire d'Alfort. 98p.
22. **Chaabouni I., Guesmi A., Cherif, A., 2012.** Secondary Metabolite of *Bacillus*: Potentials in Biotechnology. *Springer Science* (ed). 347- 360.
23. **Chehimi S., Limam F., Lanneluc I., Delalande F., Dorselaer A. V., Sable S., 2012.** Identification of three novel *B. thuringiensis* strains that produce the Thuricin S bacteriocin. *Microbiologie des aliments*. **3**: 3-10.
24. **Cherif A., Chehimi S., Limem F., Hansen B. M., Hendriksen N. B., Daffonchio, D., et al., 2003.** *Journal of Applied Microbiology*. **95**: 990–1000.
25. **Cherif A., Rezgui W., Raddadi N., Daffonchio D., Boudabbous A., 2008.** Caractérisation et purification partielle de entomocin 110, une nouvelle bactériocine identifié à partir de *Bacillus thuringiensis* subsp. entomocidus HD110, la recherche microbiologique. **163**: 684-692.
26. **Chtioui O., 2011.** Production sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioréacteur à disques tournants. Thèse pour l'obtention du titre de docteur. Université Lille 1. 196p.
27. **Cotter P. D., Hill C., Ross R. P., 2005.** Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. **3**: 777-788.

28. **Coutte F., 2009.** Production sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioréacteur a membrane. Thèse pour l'obtention de titre de docteur. Université Lille 1. 243p.
29. **Crickmore N., Baum J., Brav A., Lereclus D., Narva K., Sampson K., Schnepf E., Sun M., Zeigler D. R., 2014.** *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. Available: <http://www.btnomenclature>.
30. **Cuevas R. G., 2010.** Effets génotoxiques des souches d'*Escherichia coli* produisant la Colibactine. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'Université de Toulouse. Université Toulouse III - Paul Sabatier. 125p.

### D

31. **Daou N., 2008.** Identification de nouveaux facteurs hôtes-dépendants chez *Bacillus cereus* caractérisation moléculaires et fonctionnelle d'IIsA, une protéine de surface essentielle pour l'acquisition du fer au cours de l'infection. Thèse de grade de Docteur de l'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (Agro Paris Tech), l'université Saint Joseph de Beyrouth (USJ).
32. **De Oliva Neto P., Ferreira M. A., Yokoya F., 2004.** Screening for yeast with antibacterial properties from an ethanol distillery. *Bioresource Technology*. **92**: 1- 6.
33. **Dischinger J., Josten M., Szekat C., Sahl H. G., Bierbaum G., 2009.** Production of the Novel Two-Peptide Lantibiotic Lichenicidin by *Bacillus licheniformis* DSM 13. PLoS One. **4**: e 6788.
34. **Dortu C., Thonart P., 2009.** Les bactériocines des bactéries lactiques: caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement*. **13**: 143-154.
35. **Drabo A., 2005.** Evolution de l'efficacité de deux delta-endotoxines de *Bacillus thuringiensis* (cry 1ac et cry 2ab) synthétisées par le cotonnier transgénique (coton *Bt* dans la gestion de la résistance de HELICOVERPA AMIGERA HUBNER) a la delthamethrin. Thèse Ing UPBD. Burkina-Faso. 74p.
36. **Dromigny E., 2008.** *Bacillus cereus*. (monographie de microbiologie), collection dirigée par jean-paul Larpent. Edition : TEC & DOC Lavoisier. 203p.
37. **Dubois T., 2013.** Etude de système de communication NprR-NprX au sein du groupe *Bacillus cereus*. Thèse de doctorat. Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (Agro Paris Tech). 136p.

### E

38. **El-Anzi O., 2014.** Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées au centre hospitalier Ibn Sina de Rabat. Thèse pour l'obtention du Doctorat en Médecine. Université Mohammed V – Souissi. Faculté de médecine et de pharmacie. Rabat. 146p.
39. **El Haddad L., 2010.** Caractérisation des phages de *Staphylococcus aureus*. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maîtrise des Sciences (M. Sc.). Université Laval Québec. 94p.
40. **El Khoury M., 2013.** Analyse moléculaire des gènes *cry1A* d'une souche de *Bacillus thuringiensis* et étude de l'interaction des toxines correspondantes dans un modèle de membrane biomimétique. THÈSE pour obtenir le grade de Docteur. L'université de Montpellier II. 236p.

### F

41. **Fernandez B., 2014.** Activité biologique et impact sur le microbiote intestinal des bactéries lactiques bactériocinogènes. PhD thesis, Université Laval, Québec, 143p.

### G

42. **Gálvez A., Abriouel H., Omar N. B., et Lucas R., 2011.** Food applications and regulation. In Drider D et Rebuffat S (Ed.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From genes to applications*. New York: Springer. 353-390.
43. **Girard F., 2008.** Importance de l'hélice  $\alpha 4$  et des boucles inter-hélicales du domaine 1 dans le mécanisme de formation de pores par la toxine Cry1Aa du bacille de thuringe. Thèse du grade de philosophiae Doctor, Université de Montréal. Faculté des études supérieures et postdoctorales.
44. **Gomaa E. Z., 2010.** Chitinase Production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their Potential in Antifungal Biocontrol. The Journal of Microbiology. **50**: 103-111.

45. Gray E. J., Lee K. D., Souleimanov A. M., Di Falco M. R., Zhou X., Ly A., Charles T. C., Drisco B. T et Smith D. L., 2006. A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *Journal of Applied Microbiology* ISSN. 1364-5072.
46. Griko *et al.*, 2010. «*Bacillus thuringiensis* : a genomies and proteomies perspective. » *Bioengineered bugs*. **1**: 31-50.
47. Guinebretiere M. H., Thompson F. L., Sorokin A., Normand P., Dawyndt P., Ehling-Schulz M., Svensson B., Sanchis V., Nguyen-The C., Heyndrickx M and De Vos P., 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*. **10**: 851-865.

### H

48. He L., Chen W., Liu Y., 2006. Production and partial characterization of bacteriocin-like peptides by *Bacillus licheniformis* ZJU12. *Microbiological Research*. **161**: 321-326.
49. Helassa N., 2008. Devenir de la protéine insecticide Cry1Aa issue de *Bacillus thuringiensis* (BT) dans le sol. Thèse dirigée par Siobhan STAUNTON et Hervé QUIQUAMPOIX. Centre international d'études supérieures en sciences agronomiques (Montpellier sup agro). Montpellier. Ecole Doctorale. 178p.
50. Heng N. C., Tagg J. R., 2006. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*. **4**. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1273-c1>.
51. Holo H., Faye T., Brede D. A., Nilsen T., Odegård I., Langsrud T., Brendehaug J., Nes I., 2002. Bacteriocins of propionic acid bacteria. *Lait* **82**: 59-68.

### I

52. Ibrahim M. A., N. Griko, *et al.*, 2010. "*Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered bugs*. **1**: 31-50.

### K

53. **Kamoun F., Ben Fguira I., Ben Hassen N. B., Mejdoub H., Lereclus D., Jaoua S., 2011.** Purification and characterization of a New *Bacillus thuringiensis* Bacteriocin Active against *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Agrobacterium*. *Appl Biochem Biotechnol*. **165**: 300-314.
54. **Kamoun F., Mejdoub H., Aouissaoui H., Reinbolt J., Hammami A., Jaoua S., 2005.** Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Applied Microbiology*. **98**: 881–888.
55. **Kayalvizhi N., Gunasekaran P., 2008.** Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. *Letters in applied microbiology*. **47**: 600-607.
56. **Kern-Benaiboutm E. M., 2006.** *Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'homme : Synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission a l'homme par la contamination de l'environnement. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Ecole nationale vétérinaire Toulouse. 153p.
57. **Klaenhammer T. R., 1993.** Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. **12**: 39-85.
58. **Knaak N., Rohr A. A., Fuiza L. M., 2007.** In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and Cry proteins in phytopathogenic fungi of paddy rice field, Bazil. *Journal of Microbiology*. **38**.
59. **Kristoffersen S. M., Tourasse N. J., Kolste A. B et Okstard O. A., 2011.** Interspersed DNA Repeats bcr18 of *Bacillus cereus* Group Bacteria From three Distinct Groups with Different Evolutionary and Functional Patterns. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 963-983.

### L

60. **Labioui H., Elmoualdi L., El Yachoui M., Ouhssine M., 2005.** Sélection de souches de bactéries Lactiques antibactérienne, *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*. **44** : 237-250.

## Références bibliographiques

---

61. **Lamontagne E., 2004.** Caractérisation de nouvelles souches de *Bacillus thuringiensis* d'intérêt pour la production de biopesticides et d'enzymes par fermentation de boues d'épuration municipales. Mémoire du grade de maître des sciences, université du Québec, INRS-ETE.
62. **Lamri H., 2015.** Efficacité entomopathogène du *Bacillus subtilis* et du *Bacillus thuringiensis* sur quelques paramètres de croissance et de fécondité du criquet migrateur *Locusta migratoria* (Linné, 1758) (Oedipodinae, Acrididae). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie. Université Mohamed Khider- Biskra. 81p.
63. **Lee H., Churey J. J., Worob R. W., 2009.** FEMS Microbiology Letters, 29, 205–213.
64. **Lydie S., 2010.** La lutte biologique vers de nouveaux équilibres écologiques. Ed Educari. Quae. 44-92.

### M

65. **Makhloufi K. M., 2011.** Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. PhD Thesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI. Paris. 228p.
66. **Mezaache S., 2012.** Localisation des déterminants de la suppression de quelques souches de *Pseudomonas* isolées de Rhizosphère de la pomme de terre. Thèse de Doctorat. 69p.
67. **Montel M. C., Delphine T. S., 2013.** Croissance et survie des *Escherichia coli* producteurs de Shiga Toxines (STEC) en fonction des technologies fromagères mettant en œuvre du lait cru. Thèse pour l'obtention du grade de DOCTEUR D'UNIVERSITE : Physiologie et génétique moléculaire. Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand. 326p.

### N

68. **Nabors M., 2008.** Biologie végétale (structure, fonctionnement, écologie et biotechnologie). © 2008 Pearson Education France. 614p.
69. **Nail M. N., Besson F., Deleu M., 2013.** Interactions des antibiotiques ituriniques avec la membrane plasmique. Apport des systèmes biomimétiques des membranes (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **17**: 505-516.

## Références bibliographiques

---

70. **Ndao A., 2014.** Mise à l'échelle de la production du biopesticide *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* avec comme substrat des eaux usées d'amidon. Mémoire présenté pour l'obtention du grade Maître des sciences, M.Sc en Sciences de l'eau et de l'environnement INRS-ISHÉDD. Université du Québec. 98p.

### P

71. **Pandiani F., 2012.** Mécanismes d'adaptation aux basses températures de croissance de la bactérie pathogène *B. cereus* : rôle des hélicases a ARN. Thèse pour obtenir le titre de Docteur de l'université d'avignon et des Pays de Vaucluse Discipline : Biotechnologie, Microbiologie. Pp 6-9.
72. **Paris M., 2010.** Evolution de la résistance au bactério-insecticide Bti chez les moustiques. Thèse de Doctorat en biologie, mention Biodiversité-Ecologie-Environnement. Université JOSEPH FOURIER-GRENOBLE. Ecole doctorale chimie et science du vivant.
73. **Pradip K. S., Chittpurna., Ashish., Sharma V., Patil P. B., Korpole S., 2012.** Identification, purification and characterization of Laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. PLoS. **7**: e31498.

### R

74. **Rahbani J., 2015.** Optimisation, étude de la cinétique et dimensionnement de la production des biopesticides a base de souches de *Bacillus thuringiensis* isolées du sol libanais. Thèse en vue de l'obtention du doctorat de l'Université de Toulouse. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). 234p.
75. **Ramírez A. R., Escudero-Abarca B. I., Aguilar-Uscanga G., Hayward-Jones P.M., Barboza-Corona J. E., 2004.** Antifungal Activity of *Bacillus thuringiensis* Chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. Journal Of Food Science M131. **69**.
76. **Ramos G. C., 2010.** Effets génotoxiques des souches d'*Escherichia coli* produisant la Colibactin. Thèse En vue de l'obtention du Doctorat de L'université De Toulous : Microbiologie. l'Université Toulouse III. 125p.
77. **Rea M. C., Sit C. S., Clayton E., O'Connor P. M., Whittal R. M., Zheng J., et al., 2010.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **107**: 9352–9357.



### S

78. **Sadfi N., Chérif M., Fliss I., Boudabbous A., Antoun H., 2001.** Evaluation of bacterial isolates from salty soils and *Bacillus thuringiensis* strains for the biocontrol of fusarium dry rot of potato tubers. *Journal of Plant Pathology*. **83**: 101-118
79. **Sansinenea E., Ortiz A., 2011.** Secondary metabolite of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett*. **33**: 1523- 1538.
80. **Sass P., Jansen A., Szekat C., Sass V., Sahl H. G., Bierbaum G., 2008.** The lantibiotic mersacidin is a strong inducer of the cell wall stress response of *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*. **8**: 186pp.
81. **Siboukeur A., 2011.** Etude de l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine) produites par *Lactococcus lactis subsp lactis*, isolée à partir du lait camelin. Mémoire de Magister en Biologie. Université de Kasdi Merbah Ouargla. 31- 37pp.
82. **Silverio F., de Alvarenga E., Moreno S., Picanco M., 2009.** Synthesis and insecticidal activity of new pyrethroids. *Pest Manage. Sci*. **65**: 900-905.
83. **Some N. H., 2007.** Impact du coton Bollgard II sur la faune auxiliaire des insectes nuisibles du cotonnier. Cas de *Encarsia* sp. parasitoïde de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera : Aleyrodidae) à l'Ouest du Burkina Faso. Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme d'Etudes Approfondies (D.E.A) en Gestion Intégrée des Ressources Naturelles (GIRN). Université Polytechnique de Bobo. 56p.
84. **Song H. J., Richard J., 1997.** Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *Int. J. Food Microbiol*. **36**: 155-161.
85. **Soufiane B., 2013.** Propriétés physiologiques et génétiques-communes entre *Bacillus weihenstephanensis* et des souches de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus* et *Bacillus mycoides*. Thèse. Université du Québec. 222p.
86. **Suty L., 2010.** La lutte biologique vers de nouveaux équilibres écologiques. Educagri editions/ Editions Quae (ed). 44p.
87. **Sutyak K. E., Wirawan R. E., Aroutcheva A. A., Chikindas M. L., 2008.** Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*. **104**: 1067-1074.

### T

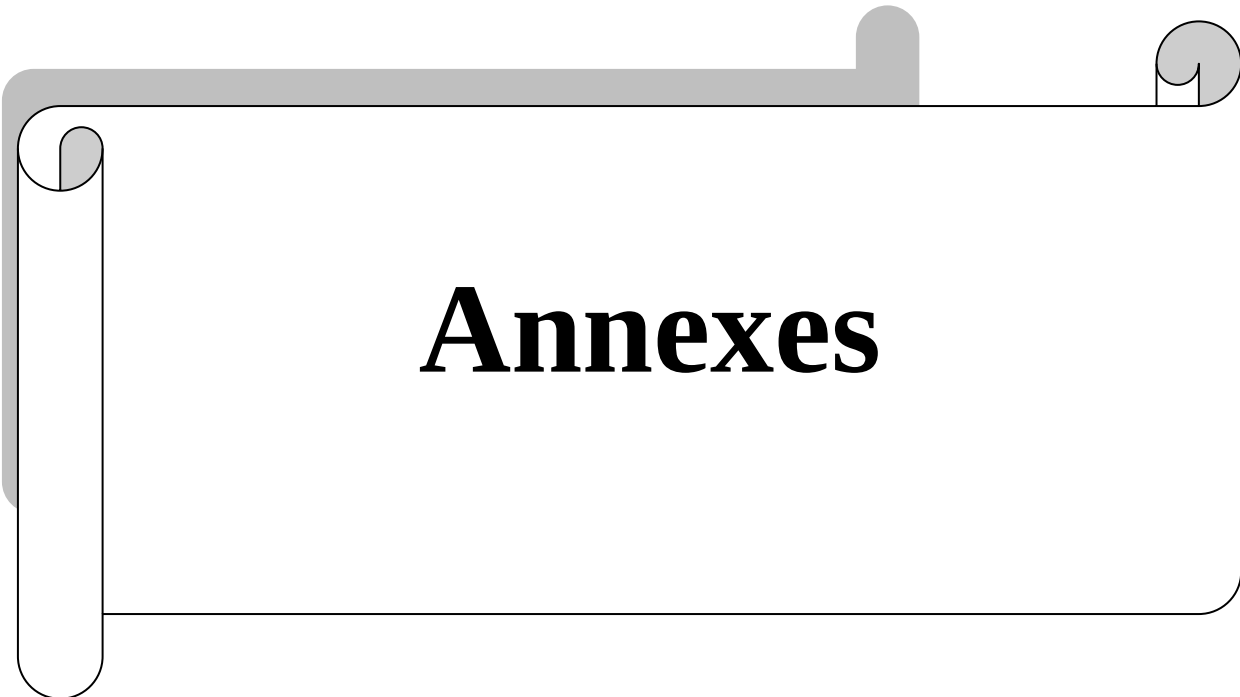
88. **TAALE E., 2016.** Recherche de molécules bioactives d'origine microbienne: caractérisation biochimique et moléculaire des souches de bactéries isolées du *Soumbala*, du *Bikalga* et de certains yaourts consommés au Burkina Faso, productrices de bactériocines. Thèse Unique pour obtenir le grade de Docteur. Université Ouaga IPR Joseph Ki-Zerbo. 207p.
89. **Taale E., Savadogo A., Zongo C., Tapsoba F., Karou S. D., Traore A. S., 2016.** les peptides antimicrobiens d'origine microbienne : cas des bactériocines. *Int. J. Biol. Sci.* **10**: 384-399.
90. **Tagg J., 2004.** Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. *Indian Journal of Medical Research.* **119**: 13-16.
91. **Trias R., Bañeras L., Badosa E., Montesinos E., 2008.** Bioprotection of Golden Delicious apples and Iceberg lettuce against food borne bacterial pathogens by lactic acid bacteria. *Journal of Food Microbiology.* **123**: 50-60.

### V

92. **Vega F., Kaya H., 2012.** *Insect Pathology*. Second edition ed: Elsevier 508.

### Y

93. **Yazza A., 2005.** Conception d'une stratégie de production opérationnelle de biopesticide à base de *Bacillus thuringiensis* utilisant les boues d'épuration comme substrat de fermentation. Thèse du grade de Doctorat en science de l'eau. Université du Québec. Institut national de la recherche scientifique Eau, Terre et Environnement.
94. **Yudina T. G., Brioukhanov A. L., Zalunin I. A., Revina L. P., Shestakov A. I., Voyushina N. E., Chestukhina G. G., Netrusov A. I., 2007.** Antimicrobial activity of different proteins and their fragments from *Bacillus thuringiensis* parasporal crystals against *clostridia* and *archaea*. *Anaerobe.* **13**: 6-13.
95. **Yudina T. G., Bryukhanov A. L., Netrusov A. I., 2004.** Susceptibility of *archaea* to the antibiotic effect of the parasporal inclusion proteins from different *Bacillus thuringiensis* subspecies. *Microbiology.* **73**: 25-30.

A decorative graphic of a scroll with a grey shadow, positioned horizontally across the middle of the page. The scroll is unrolled in the center, revealing the title.

# **Annexes**

## Annexe 1

**Matériel non biologique**

- **Milieu de culture**

Les milieux de culture utilisés dans notre étude sont les suivants :

Gélose nutritive, milieu Mueller Hinton, bouillon nutritive liquide, milieu PDA.

**Produits, appareillage et verrerie**

Le matériel, les produits et l'équipement indispensables et nécessaire pour notre travail sont représentés dans le tableau suivant.

**Tableau :** liste de consommable, appareillage et réactifs utilisés.

| Consommables                 | Appareillages           | Réactifs et produits utilisés |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|
| -anse de platine             | - agitateur magnétique  | - L'eau distillée             |
| -Boîte de Pétri              | - Agitateur à plaque    | - L'eau de Javel              |
| -béchers                     | chauffante              | - Eau physiologique           |
| -barreau magnétique          | - Agitateur incubateur  | - Glycérol                    |
| - cuves                      | - Bain marie            | - Tryptone                    |
| -lames et lamelles           | - Micropipettes         | - Peptone                     |
| - erlenmeyers de 1L, 500 ml, | - Microscope photonique | - Agar                        |
| 250 ml, 100 ml               | - Spectrophotomètre     | - Extrait de levure           |
| - éprouvettes                | UV-Visible              | - Extrait de viande           |
| - écouvillons                | - Bec benzène           | - Nacl                        |
| - fiole gradué               | - Balance analytique    |                               |
| - flacons                    | - Etuve                 |                               |
| - pipettes Pasteur           | - pH mètre              |                               |
| - pipettes graduées          | - Vortex                |                               |
| - pissettes                  | - Autoclave             |                               |
| - parafilm                   | - Réfrigérateur         |                               |
| - Tubes eppendorfs           | - Congélateur           |                               |
| - Tubes à essai              | - Centrifugeuse         |                               |
| - Tube flacon                |                         |                               |

## Annexe 2

### Milieux de culture

#### ➤ Préparation de milieu LB liquide

- Tryptone.....10g
- Extrat de levure.....5g
- Nacl.....10g
- Eau distillée.....QSP 1000ml
- Agiter
- pH =7

Remplir le milieu dans un erlenmeyer, autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

Conserver l'erlenmeyer dans le réfrigérateur à 4°C.

Répartir la solution obtenue dans des tubes à essais à raison de 10 ml dans chaque tube et autoclaver pendant 30 minutes à 120°C et conserver.

#### ➤ Préparation de milieu LB solide

- Tryptone.....10g
- Extrat de levure.....5g
- Agar.....15g
- Nacl.....15g
- Eau distillée.....QSP 1000ml
- Agiter
- pH =7

Remplir le milieu dans un erlenmeyer, autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

Conserver l'erlenmeyer dans le réfrigérateur à 4°C.

#### ➤ Préparation de milieu LB Molle

- Tryptone.....10g
- Extrat de levure.....5g
- Agar.....7g
- Nacl.....15g
- Eau distillée.....QSP 1000ml

- Agiter
- pH =7

Remplir le milieu dans un erlenmeyer, autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

Conserver l'erlenmeyer dans le réfrigérateur à 4°C.

➤ **Solution de glycérol à 30 %**

- Glycérol.....3ml
- Eau distillée.....7ml

Remplir les tubes eppendorfs et autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

➤ **Bouillon nutritive**

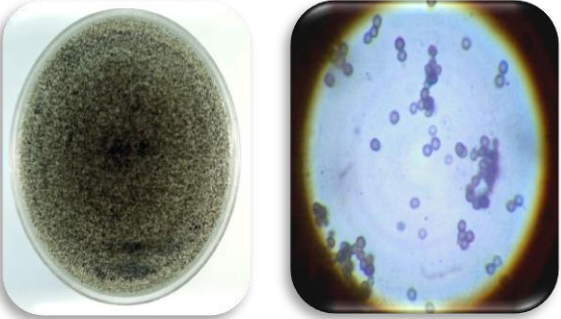
- Peptone.....15g
- Extrait de viande.....2g
- Extrait de levure.....1g
- NaCl.....5g
- Eau distillée.....250ml
- Agiter
- pH =7

Remplir le milieu dans un erlenmeyer, autoclaver à 120 °C pendant 20 minutes.

Conserver l'erlenmeyer dans le réfrigérateur à 4°C.

Répartir la solution obtenue dans des tubes à essais à raison de 10 ml dans chaque tube et autoclaver pendant 30 minutes à 120°C et conserver.

## Annexes 3

| La moisissure utilisée dans le test de l'activité antifongique                                                                                | Caractères généraux                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p data-bbox="339 342 571 376"><i>Aspergillus niger</i></p>  | <p data-bbox="791 342 1374 707"><i>Aspergillus niger</i> est un champignon filamenteux qui se développe en aérobiose, il croît facilement sur milieu PDA. Les colonies peuvent atteindre 3 à 4 cm en 10 jours, ils apparaissent d'abord blanches, puis jaunes, et enfin granuleuses noires. Cette espèce à une croissance rapide, avec un optimum thermique compris entre 25 et 30°C, <i>Aspergillus niger</i> peut pousser sur une très large gamme de pH : 1,4–9,8.</p> |

## Résumé

*Bacillus thuringiensis* (Bt) est une bactérie entomopathogène, utilisée fréquemment en lutte biologique, qui produit des métabolites secondaires, au cours de sporulation des delta-endotoxines qui ont une forte activité entomotoxique, et au cours de croissance tels que les bactériocines et les antibiotiques qui ont une activité antimicrobienne. L'objectif de cette étude était d'évaluer l'activité antimicrobienne d'une collection de souches de Bt isolées à partir du sol de différentes régions en Algérie sur des souches microbiennes pathogènes de l'Homme. Dans un premier temps, l'activité antagoniste contre une souche indicatrice est testée en utilisant la méthode d'antagonisme différé, puis l'activité antimicrobienne des surnageants de culture des souches antagonistes est étudiée sur des souches microbiennes en utilisant les méthodes des puits et des disques sur milieu solide, afin de déterminer le spectre d'activité antimicrobienne. L'effet des surnageants de culture des souches de Bt sélectionnées sur la cinétique de croissance des bactéries pathogènes sur milieu liquide a été également étudié.

**Mots clés:** *Bacillus thuringiensis*, métabolites secondaires, bactériocines, antibiotiques, activité antimicrobienne, activité antagoniste.

## Abstract

*Bacillus thuringiensis* (Bt) is an entomopathogenic bacterium frequently used in biological control, produces secondary metabolites during sporulation of delta-endotoxins which have a high entomotoxic activity, and growth courses such as bacteriocins and antibiotics which have an antimicrobial activity. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of a collection of Bt strains isolated from the soil of different regions in Algeria on pathogenic microbial strains of humans. First, the antagonist activity against an indicator strain is tested using the delayed antagonism method, and then the antimicrobial activity of the culture supernatants of the antagonist strains studies on microbial strains using the well and Disks on a solid medium, in order to determine the spectrum of antimicrobial activity. The effect of the culture supernatants of the selected Bt strains on the growth kinetics of pathogenic bacteria on liquid medium was also studied.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, secondary metabolites, bacteriocins, antibiotics, antimicrobial activity, antagonist activity.



## الملخص

*Bacillus thuringiensis* هي نوع من البكتيريا الضارة بالحشرات، التي يكثر استخدامها في مكافحة البيولوجية.

والتي تنتج المركبات الثانوية. خلال التبوغ السموم دلتا الداخلية التي لها مفعول قوي على الحشرات. و خلال النمو مثل مبيد الجراثيم و المضادات الحيوية التي لها نشاط مضادات الميكروبات. تم تقييم الهدف من هذه الدراسة نشاط الميكروبات من جمع سلالة باسيلوس معزولة عن التربة من مناطق مختلفة من الجزائر على سلالات الجراثيم المسببة للأمراض البشرية. في البداية، يتم اختبار النشاط ضد سلالة المؤشر باستخدام أسلوب العداء المؤجل، كذلك تمت دراسة تأثير نشاط مضادات الميكروبات من السائل الطافي لسلالات الضد على عدة سلالات ميكروبية باستخدام أساليب الأبار و الأقراص على وسط صلب لتحديد الطيف من النشاط البكتيري. و ايضا دراسة تأثير السائل الطافي لسلالات بكتيريا باسيلوس المنتقة على حركية نمو البكتيريا المسببة للأمراض في وسط سائل.

**الكلمات المفتاحية:** المركبات الثانوية, مبيد الجراثيم, المضادات الحيوية, نشاط مضادات الميكروبات.