

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



جامعة امحمد بوقرة - بومرداس
UNIVERSITE M'HAMED BOUGARA DE BOUMERDES
Faculté Des Sciences
Département de Biologie

Mémoire de Master Académique
Filière *Sciences Biologiques*
Spécialité *Biotechnologie Microbienne*

THEME

Extraction et caractérisation de quelques molécules
bioactives à partir des souches de *Pseudomonas*
fluorescents et *Bacillus* sp

Réalisée par :

M^{lle} AIT BELKACEM Céline

M^{lle} BELGRADE Amina Nawel

Le jury composé de :

Mme Ait Kaki S.	MCA (UMBB)	Présidente
Mme BENZINA F.	MCB (UMBB)	Promotrice
Mme Mohand Kaci H.	MCA (UMBB)	Co-Promotrice
Mme Ait Kaki A.	MCB (UMBB)	Examinatrice

Année Universitaire 2016/2017

Remercîments

Ce mémoire est le résultat d'un travail de recherche de près d'un an. En préambule, je veux adresser tous mes remerciements aux personnes avec lesquelles j'ai pu échanger et qui m'ont aidé pour la rédaction de ce mémoire.

En commençant par remercier tout d'abord Madame Benzina-F, notre promotrice, pour avoir mené l'encadrement de ce travail, son aide précieuse, sa disponibilité, ses précieux conseils et pour le temps qu'elle nous a consacré durant la réalisation de ce mémoire.

Nos remerciements vont également à, Mme Mohand-Kaci notre co-promotrice pour son aide et ses orientations.

Je remercie également les membres du jury :

Mme Ait Kaki S. Pour l'honneur qu'il nous a accordé en présidant le jury.

Mme Ait Kaki A. Qui a aimablement examiné notre travail.

Nos vifs remerciements vont à tous les enseignants du département de Biologie, particulièrement à ceux ayant contribué à notre formation, ainsi qu'aux techniciens et ingénieurs des laboratoires de Biologie.

Enfin, nous remercions tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.



A dieu source de toute connaissance

*A ma raison de vivre, et ma source de courage
mes chers parents*

*Zui ont sacrifiés leur vie a fin de me voir
réussir*

A mes chères sœurs Sarah et Maria

*A mes chères tantes qui m'ont soutenue durant
mes études*

*A la mémoire des mes grands-parents maternel
et paternel*

A mon fiancé et sa famille

A ma chère amie Sarah

Amina

Dédicaces

♠Je dédie cette thèse a...♠

- ❖ Ma mère et mon père mes sources de courage et de réussite, qui m'ont donné tout l'amour et le soutien moral dont j'avais besoin pour surmonter les obstacles et épreuves de la vie, la réalisation de ce travail est le témoignage sincère de ma gratitude ainsi que le fruit de leurs efforts.
- ❖ A mes deux grand mères, que dieu nous les garde.
- ❖ A mes frères : Rayan et Nael qui m'ont soutenu dans les moments les plus difficiles.
- ❖ A mes oncles, tantes, cousins et cousines.
- ❖ A mes chers amis et a toutes les personnes ayant contribué à la réalisation de ce modeste travail et a tout ceux qui me sont chers.

Céline

Tableau des matières

Introduction générale.....	2
Chapitre I : Partie Bibliographique	
I.1. Diversité Microbienne du sol	3
I.2. Lutte biologique	3
I.3. Mécanismes d'action des microorganismes antagonistes	4
I.3.1. Antibiose	5
I.4. Les bactéries d'intérêt dans la lutte biologique	5
I.4.1. <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents :	6
I.4.1.1. Classification	6
I.4.1.2. Caractéristiques des <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents :	7
a. Caractéristiques morphologiques	7
b. Caractéristiques biochimiques et physiologiques	8
I.4.1.3. Les <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescents et la lutte biologique	8
I.4.1.4. Les métabolites secondaires produits par le groupe fluorescents des <i>Pseudomonas</i>	9
I.4.1.4. 1. Les sidérophores	9
I.4.1.4. 2. Les enzymes	11
a. Amylases	11
b. Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)	11
- Gélatinases	11
- Pectinase.....	12
c. Lipase	12
I.4.1.4. 3. L'acide indole acétique (AIA)	12
I.4.1.4. 4. L'acide cyanhydrique (HCN).....	12
I.4.1.4. 5. Les Antibiotiques	12
I.4.2. Les <i>Bacillus</i> sp.	14
I.4.2.1. Classification	14
I.4.2.2. Intérêt de <i>Bacillus</i> dans la lutte Biologique	15
I.4.2.3. Caractéristiques du genre <i>Bacillus</i> sp.....	16
I.4.2.4. Les toxines et métabolites secondaires produites par les <i>Bacillus</i>	18
a. Les exotoxins.....	19
- Les protéines Cyt	19
- Les protéines Cry	19

Tableau des matières

b. Les exoenzymes	20
-La mélanine	21
-Lécithinase	21
-Les Cellulases	21
d. Les antibiotiques et les antifongiques produits par <i>B. thuringiensis</i>	21
I.4. 2. 4. Mode d'action de <i>Bacillus sp.</i>	22
I.4.2.5 Les principaux métabolites antimicrobiens de <i>Bacillus sp</i>	23
Chapitre II: Matériels et méthodes	
II. 1. Matériels utilisés	24
II.1.1. Matériels non biologiques	24
II.1.1.1. Equipements	24
II.1.1.2. Milieux de culture	24
II.1.2. Matériel biologique	25
II.1.2.1. Souches bactériennes	25
II.1.2.2. Souches fongiques.....	25
II.2. Méthodes	25
II.2.1. Caractérisation phénotypique	25
II.2.1.1. La revivification des souches de <i>Pseudomonas spp. fluorescents</i> et <i>Bacillus sp.</i>	25
II.2.1.2. Etude morphologique	26
II.2.1.2.1. Etude macroscopique	26
II.2.1.2.2. Etude microscopique	26
- Coloration de Gram	26
- La coloration de la spore	27
II.2.1.3. Etude biochimique	28
a. Test catalase	28
b. Test de l'oxydase	28
c. L'utilisation des Galeries API 20NE	29
II.2.2. Production d'enzymes	32
II.2.2. 1. Hydrolyse de l'amidon	32
II.2.2. 2. Hydrolyse de la caséine de lait	32
II.2.2. 3. Hydrolyse de la Chitine.....	32
II.2.2. 4. Recherche de cellulase	32
II.2.2. 5. Production de lipases.....	32
II.2.2. 6. Recherche de Phosphatase.....	33
II.2.3. Synthèse de l'acide indole acétique (AIA)	33

II.2.4. Production de substances volatiles (HCN)	33
II.2.5. Effets des souches sur la croissance mycélienne	33
II.2.5.1. Le test de sélection des souches antagonistes	34
Chapitre III: Résultats	
III. Caractérisation phénotypique et identification des <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents et <i>Bacillus</i> sp.	34
III.1. La revivification des souches de <i>Pseudomonas</i> spp. Et <i>Bacillus</i> sp.	34
III. 2. Etude morphologique de <i>Pseudomonas</i> spp.fluorescents	34
III.2.1. Etude macroscopique	34
III.2.2. Etude microscopique :	35
-Coloration de Gram -	35
III.2.3. Etude Physiologique et biochimique	36
-Test oxydase	36
-Test de catalase	36
Résultats de la galerie API20 NE	37
III. 3. Etude morphologique de <i>Bacillus</i> sp.....	37
III.3.1. Etude macroscopique	37
III.3.2. Etude microscopique	38
-Coloration Gram	38
-Coloration de la spore.....	39
III.3.3. Etude physiologique et biochimique	39
-Test oxydase	39
-Test de catalase	40
III.3. Production des enzymes	42
III.3.1. Mise en évidence de l'activité hydrolytique extracellulaire	42
III.3.1.1. Détermination de l'activité amylolytique	42
III.3.1.2. Hydrolyse de la caséine.....	43
III.3.1.3. Détermination de l'activité lipolytique	44
III.3.1.4. Détermination de l'activité cellulase	47
III.3.1.5. Détermination de l'activité chitinolytique:.....	48
III.3.1.6. Détermination de l'activité phosphatase	49
III.4. Détermination de la Synthèse de l'acide indole acétique(AIA)	50
III.5. Détermination de la Production de substances volatiles HCN.51	
III. 6. Résultats de l'activité antagoniste des souches bactériennes in vitro	52
III.7.Discussion	57

Tableau des matières

Conclusion	59
Résumé	
Annexe	
Références Bibliographiques	

Liste les figures

Figure 1 : Mécanismes d'action des agents de lutte biologique.

Figure 2 : cellule de *Pseudomonas spp.* fluorescent observé au microscope électronique.

Figure 3 : Représentation schématique décrivant les interactions entre plantes et bactéries coopératives (PGPR) dans la rhizosphère.

Figure 4 : Exemples représentatifs de différents sidérophores et de leurs producteurs naturels. Les moieties impliquées dans la coordination du fer sont mises en évidence comme suit: les catécholates sont en rouge, les phénolates sont en orange, les hydroxamates sont en jaune pâle, les α -hydroxycarboxylates (issus des unités de citrate) sont en vert clair et les α -céto-carboxylates (dérivant des unités 2-oxo-glutarate) sont en bleu-vert.

Figure 5 : la forme chimique de quelques antibiotiques sécrétés par les *Pseudomonas spp.* fluorescents.

Figure 6 : cellule de *Bacillus thuringiensis* observé au microscope électronique.

Figure 7 : δ -endotoxines (cristaux protéiques CRY) de *Bacillus thuringiensis*.

Figure 8 : cycle biologique de *Bacillus thuringiensis*.

Figure 9 : schéma simplifié du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* dans l'intestin des lépidoptères.

Figure 10 : aspect morphologique des souches de *Bacillus sp.* Et de *Pseudomonas sp.* (Personnel, 2017).

Figure 11 : aspect microscopique de *Pseudomonas spp.* fluorescents après coloration de Gram observés sous microscope photonique (G*100). (Personnel, 2017).

Figure 12 : Résultat positif du test oxydase de la souche 11 (Personnel, 2017).

Figure 13 : résultat négatif du test catalase de la souche 11 du genre *Pseudomonas spp.* fluorescents. (Personnel, 2017).

Figure 14 : Aspect morphologique de quelques bactéries appartenant au groupe *Bacillus sp* sur milieu GN. (Personnel, 2017).

Figure 15 : aspect microscopique de *Bacillus* sp. Après coloration de Gram observés sous microscope photonique (G*100). (Personnel, 2017)

Figure 16 : aspect des spores chez une des souches de *Bacillus* sp. Sous microscope photonique (G*100). (Personnel, 2017).

Figure 17 : les résultats positifs et négatifs du test oxydase chez différentes souches de *Bacillus* sp. (Personnel, 2017).

Figure18 : résultats positif et négatif du test catalase chez certaines souches de *Bacillus* sp. (Personnel, 2017).

Figure 19 : activité hydrolytique extracellulaire (hydrolyse de l'amidon) de la souche de *Pseudomonas* spp. fluorescents. (Personnel, 2017).

Figure 20 : hydrolyse de l'amidon de 4 souches de *Bacillus* sp. Étudiées (Personnel, 2017).

Figure 21 : activité caséinase de la souche 11 de *Pseudomonas* spp.fluorescents (Personnel, 2017).

Figure 22 : résultats positifs et négatif de l'activité caséinase de certaines souches de *Bacillus* sp. (Personnel, 2017).

Figure 23 : activité lipolytique de la souche 11 de *Pseudomonas* spp.fluorescents (aspect à l'œil nu et aspect sous UV). (Personnel, 2017).

Figure 24 : activité lipolytique de certaines souches de *Bacillus* sp. À l'œil nu et sous UV (Personnel, 2017).

Figure 25 : activité cellulósique de la souche 11 de *Pseudomonas* spp.fluorescents (Personnel, 2017).

Figure 26 : activité cellulósique de certaines souches de *Bacillus* sp. (Personnel, 2017).

Figure 27 : Activité chitinolytique chez la souche de *Pseudomonas* spp.fluorescent avec apparition de plage de lyse. (Personnel,2017)

Figure 28 : Plages de lyse montrant une activité Chitinoiytique chez *Bacillus* sp. (Personnel, 2017).

Figure 29 : Présence d'activité phosphatase chez la souche 11 de *Pseudomonas* spp.fluorescents (personnel,2017)

Figure 30 : Résultats du test de production de l'AIA

Figure 31 : Absence de changement de couleur dans les bandelettes de papier Whatman ceci indique un résultat négatif (personnel, 2017).

Figure 32 : Histogramme représentant l'effet antagoniste des souches bactériennes contre la souche 1 de *V.dahliae*.

Figure 33 : Histogramme représentant l'effet antagoniste des souches bactériennes contre la souche 2 de *V.dahliae*.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de *Pseudomonas sp.*

Tableau 2 : les antibiotiques produits par certaines souches de *Pseudomonas*

Tableau 3 : classification de *Bacillus sp.*

Tableau 4 : classification des *Bacillus* selon la position la forme et la déformation de la préspore

Tableau 5 : classification des delta-endotoxines de *Bacillus thuringiensis*

Tableau 6 : les principaux métabolites antimicrobiens de *Bacillus thuringiensis*

Tableau 7 : lecture de la galerie API 20 NE

Tableau 8 : résumé l'ensemble des caractères morphologiques.

Tableau 9 : résultats des galeries API20 NE de la souche de *Pseudomonas fluorescent spp.*

Tableau 10 : résumé l'ensemble des caractères morphologiques pour toutes les souches.

Tableau 11 : résultats des galeries API20 NE des souches de *Bacillus sp.*

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des différentes activités enzymatiques observées chez les souches de *Pseudomonas spp.fluorescents* et *Bacillus sp.*

Tableau 13 : Inhibition de la croissance mycélienne de *Verticillium dahliae* par les isolats de *Pseudomonas spp. fluorescents* et *Bacillus sp.* testées sur milieu PDA.

Liste des Abréviations

ATB : antibiotique

Bt : *Bacillus thuringiensis*

Cry : Protéine Crystal

Cyt : protéine cytotoxique

Gram+ : gram positif

Gram- : gram négatif

LB : Luria- Bertani

Mm : millimètre

PH : potentiel d'hydrogène

VIP : protéines végétatives insecticides

µl : microlitres

PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria

P : *Pseudomonas*

B : *Bacillus*

HCN : Acide cyanhydrique

API 20NE : appareil et procédés d'identification 20 N entérobactéries

Fig. : Figure

KB : milieu King B

GN : gélose nutritive

H2O2 : l'eau oxygénée

AAF : aéro-anaérobie facultatif

AS : aérobie stricte

Introduction

Le sol est le siège de compétition microbienne due à la richesse biologique très variée, la flore microbienne y est très varié ; elle comprend des champignons, des protozoaires, des algues, des virus exerçant divers effets influençant le développement des plantes. Ils peuvent également améliorer leur compétitivité et leur réponses aux facteurs de stress externes (Kloepper, 1992 ; Glick, 1995). Certains sols ont la capacité de réprimer l'expression de maladies en impliquant fréquemment des bactéries non-pathogènes (Cook et Rovira, 1997).

Parmi les bactéries qui colonisent la rhizosphère, les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) possèdent plusieurs facteurs caractéristiques intrinsèques qui les rendent particulièrement intéressantes en vue de leur utilisation comme agents de lutte biologique, néanmoins les bactéries sont les représentants les plus importants quantitativement.

L'ampleur de cette compétition s'intensifie au voisinage des racines ou zone rhizosphérique de par l'apport de substrats carbonés par la plante. Les microorganismes rhizosphériques, en général, exercent en tant qu'agent de lutte biologique.

Ces souches bactériennes présentant pour la plupart des propriétés antagonistes vis-à-vis des champignons pathogènes ont très vite acquis un statut de vedette comme agent de lutte biologique et constituent une alternative prometteuse aux engrais chimiques et aux pesticides.

Les mesures de contrôles alternatif telle que l'utilisation d'antagonistes sont nécessaires et ont besoin d'être explorés. Cette stratégie est basée sur l'utilisation de microorganismes qui ont soit un potentiel inhibiteur de l'agent causal, soit l'habilité d'accroître le mécanisme de défense de la plante (Piga et *al.*, 1997 ; Lakrin et Fravel, 1998 ; Benhamou et Nicole, 1999 ; De Boer et *al.*, 1991 ; Chérif et *al.* , 2002 ; Silva et *al.*, 2004).

Parmi les antagonistes qui règnent dans les sols saturés en microflore équilibrée pour le milieu et le biotope, on rencontre presque toujours des espèces du genre *Pseudomonas* et *Bacillus*, ces microorganismes ont une grande capacité à produire des substances antimicrobiennes et à entrer en compétition spatiale et nutritionnelle avec les agents phytopathogènes. Le contrôle des phytopathogènes de manière biologique est plus avantageux pour l'environnement en comparaison avec le contrôle chimique (Nautiyal, 2001).

C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail dont l'objectif principal consiste a ;

Introduction

- La revivification et la ré identification d'une collection de souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp. isolées préalablement à partir du sol rhizosphérique de trois plantes cultivées à savoir les nèfles, la pomme de terre et l'orge.
- La recherche de quelques enzymes a effet hydrolytique tels que : les lipases, les amylases, les cellulases, les caséinases et les chitinases.
- L'étude du pouvoir de production de l'acide indole acétique et de l'acide cyanhydrique à effet PGPR.
- L'effet antagoniste des différentes souches étudiées des deux genres *Pseudomonas* spp. fluorescents ainsi que *Bacillus* sp. contre *Verticillium dahliae* agent de la verticilliose.

Pour mener a bien notre étude, il a semblé nécessaire de présenter dans le chapitre 1, le genre *Pseudomonas* et *Bacillus* ; les métabolites secondaires produits par les deux genres et leurs utilisation dans le domaine de la lutte biologique.

Nous avons présenté dans le second chapitre le matériel et la méthodologie adoptée pour notre étude.

Enfin, le troisième chapitre comprend les résultats et les discussions relatives à chaque paramètre étudié et en dernier une conclusion générale et quelques perspectives relatives à notre travail.

I. 1. Diversité Microbienne du sol

Le sol supporte une large proportion de la biodiversité terrestre. Il héberge en effet une grande diversité d'organismes dont la plupart sont responsables de processus de biotransformations et de transfert des composés. Cette diversité biologique est assurée par des organismes très variés (bactéries, champignons, protozoaires, faunes). Les activités des organismes du sol sont concentrées dans des sites généralement associés à la disponibilité en substrats carbonés.

C'est ainsi que les habitats microbiens sont associés aux fractions organiques, aux agrégats, à la litière en décomposition, au sol influencé par les vers de terre et au contact étroit des racines (rhizosphère) (Lynch, 1990). Le terme rhizosphère tire son origine du grec « rhizo » signifiant « racine » et « sphère » le champ d'action ou d'influence (Whipps, 2001 ; Luttenberg et Kamilova, 2009).

Les bactéries sont les organismes les plus dominants dans le sol, et représentent en moyenne 6.10^8 Cellules par gramme de sol. On définit alors les bactéries associées aux racines des plantes comme les rhizobactéries. Celles-ci sont hétérotrophes typiques, très compétitives capables de coloniser le système racinaire riche en éléments nutritifs, tout au long du cycle de développement de la plante (Kloepper, 1993).

Les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) sont des bactéries phyto-bénéfiques interagissant avec la plante sous la forme d'un système associative, c'est-à-dire une interaction facultative. Leur habitat privilégié est la rhizosphère ; même si certaines souches dites endophytes sont capables de coloniser l'intérieur des plantes ainsi que les parties aériennes épiphytes (Kanchana et al., 2013)

Les PGPR les plus fréquemment identifiées sont des *Pseudomonas* spp fluorescent ; mais comptent aussi des *Bacillus*, *Azotobacter*, *Enterobacter* et *Serratia* spp. (Kloepper., 1980 ; Ahelad et Kibret, 2014).

I. 2. Lutte biologique

La lutte biologique peut être définie comme étant l'introduction d'un ennemi naturel à un ravageur/pathogène donné pour réduire les dommages causés par ce dernier. Les ennemis naturels ainsi que les ravageurs/pathogènes sont de plusieurs natures : plantes, insectes, nématodes, champignons, bactéries, virus, etc. (Baie et coll., 2008). Un biopesticide est composé d'un organisme vivant (Plante, nématode, bactérie, champignon ou virus) ou d'un produit dérivé de cet organisme, qui est utilisé pour supprimer ou réprimer un

ravageur/pathogène (Thakore, 2006). Plusieurs biopesticides ont pour principes actifs des microorganismes antagonistes.

I.3. Mécanismes d'action des microorganismes antagonistes

Les microorganismes peuvent exercer une activité antagoniste selon différents mécanismes incluant: la compétition, les interactions directes cellule à cellule, l'antibiose, la dégradation des signaux de quorum sensing (QS), et les actions sur la résistance de l'hôte (Figure1). La Compétition consiste en «la consommation ou le contrôle de l'accès à une ressource comme les nutriments, l'espace ou tout autre facteur dont la disponibilité est limitée» (Widden, 1994). Cette compétition peut se faire entre autres par la création de barrières Physiques (Biofilms) ou la sécrétion des sidérophores permettant la capture du fer. Certains microorganismes sont des hyperparasites et interviennent directement sur le phytopathogène en le parasitant. D'autres microorganismes sont capables d'induire une résistance systémique ponctuelle (Résistance systémique induite) ou encore une résistance plus permanente (Résistance systémique acquise) chez les plantes hôtes. Récemment des études ont montré l'existence d'un mécanisme permettant d'interférer dans la communication intercellulaire essentielle à la pathogénicité de certaines bactéries(QS) (Montesinos et coll., 2009). Un microorganisme donné peut exercer une activité antagoniste en utilisant plusieurs mécanismes à la fois.

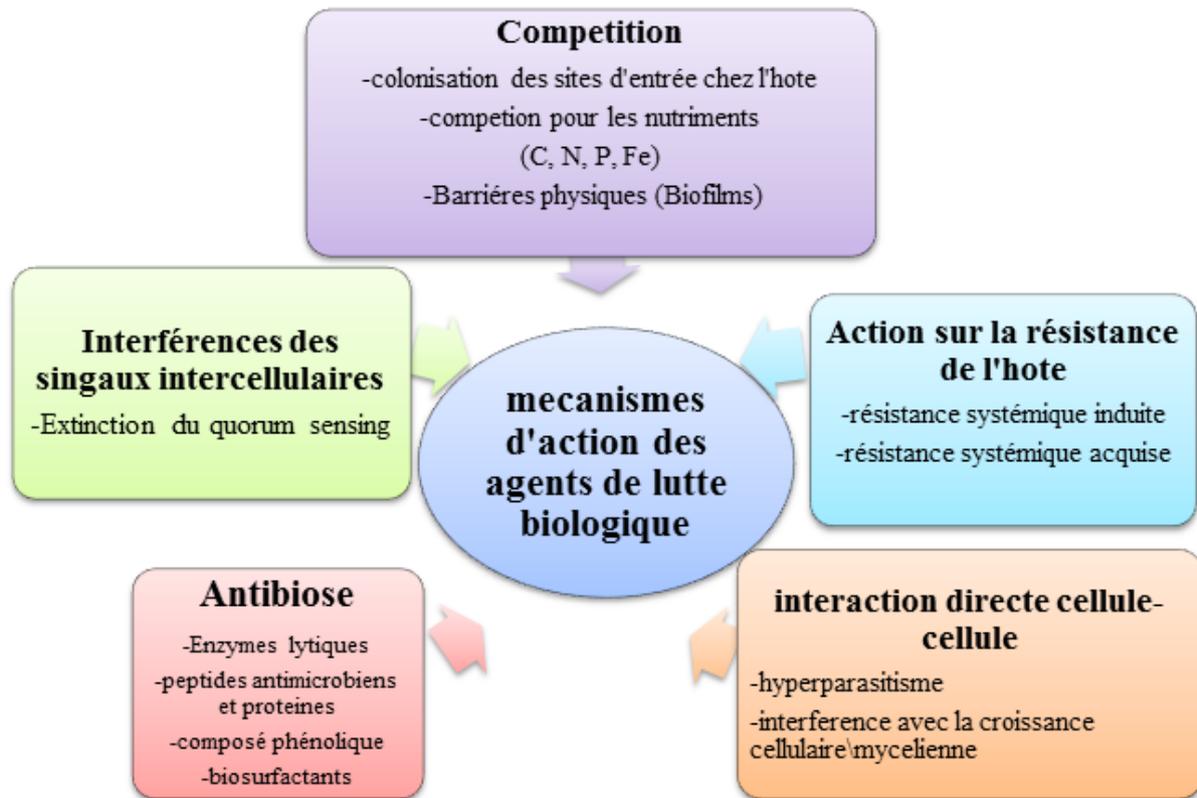


Figure 1 : Mécanismes d'action des agents de lutte biologique (Adapté de Montesinos et coll., 2009).

I.3.1. Antibiose

L'antibiose est définie comme «l'inhibition d'un organisme par le produit métabolique d'un autre organisme» (Cook et Baker, 1974). Les produits métaboliques sont de différentes natures comme des enzymes lytiques, des peptides ou protéines antimicrobiens, des polyketides, des composés phénoliques, des biosurfactants etc. Ils sont classés en deux catégories selon leur volatilité (Fernando et coll., 2006).

- Composés non-volatils
- Composés volatils

I.4. Les bactéries d'intérêt dans la lutte biologique :

Les espèces bactériennes antagonistes appartiennent aux familles des *Enterbacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* et *Bacillaceae*, les trois familles appartiennent au sous-embranchement des eubactériales. Les deux premières font partie de la classe des asporulales, par contre le dernier fait partie de la classe des sporulales (Pervot, 1961). Parmi ces bactéries antagonistes ; les deux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* sont les plus utilisées et les plus répandus.

I.4.1. *Pseudomonas* spp. fluorescents :

Le genre *Pseudomonas* est un grand groupe bactérien particulièrement important, ils sont ubiquitaires rencontrés dans différentes niches écologiques comme les sols, les racines des végétaux, sur les plantes, et dans les eaux douces et marines.

Ces bactéries Gram négatives, non sporulantes, sont aérobies obligatoires, à l'exception de certaines pouvant utiliser le nitrate (NO₃⁻) comme accepteur d'électrons. Leur mobilité est assurée par plusieurs flagelles polaires, et elles ont un métabolisme mésophile et chimioorganotrophe, la plupart étant saprophytes (Bossis et al., 2000). Quelques espèces comme *P. syringae*, sont phytopathogènes et certaines peuvent causer des infections chez l'humain. Particulièrement *P. aeruginosa* reconnu comme pathogène opportuniste et 6 causant des infections pulmonaires mortelles chez les patients atteints de fibrose kystique. Plusieurs études ont souligné le haut degré de diversité au sein de *P. fluorescents*, ce qui a mené à la subdivision de cette espèce en différents biovars (Bossis et al., 2000). Dans le sol, les *Pseudomonas* représentent une grande fraction de la communauté microbienne partageant leur milieu avec des commensaux représentant principalement les genres *Bacillus* et *Actinomyces*. Elles ont une grande capacité à coloniser les racines et à y maintenir une forte densité de population remarquable (Haas et Keel 2003). Cette grande rhizocompétence vient sans doute de leur taux de croissance plus élevé que celui de la plupart des autres rhizobactéries et de leur capacité à métaboliser efficacement plusieurs composés des exsudats racinaires (Chin-A-Woeng et al. 2002). De plus, ces bactéries sont très faciles à isoler et à cultiver au laboratoire. L'espèce *P. fluorescens*, est connue par son aptitude à inhiber la croissance d'un grand nombre d'agents phytopathogènes *in vitro*, cela se fait selon plusieurs mécanismes incluant la production d'une large gamme de métabolites antagonistes et de sidérophores. Ces derniers permettent de compétitionner farouchement l'acquisition du fer. Mais dans la plupart des cas d'inhibition, le facteur déterminant est la production d'antibiotiques qui agissent directement sur l'agent pathogène.

I.4.1.1. Classification

Durant ces dernières années, la classification des bactéries du genre *Pseudomonas* a beaucoup changé. Actuellement elle repose sur des critères phénotypiques, génotypiques et sur la comparaison des gènes codant les ARN ribosomiaux, permettant de classer une quarantaine d'espèces dans le genre *Pseudomonas*. Les espèces *P. fluorescens* et *P. putida* sont subdivisées, respectivement, en cinq biovars (1 à 5) et en deux biovars (AetB) (Achauak et al., 2000). Ces

travaux sur la taxonomie de *P.fluorecens* et *P. putida* montrent que la définition de ces espèces est obsolète, et qu'elles devraient être redivisées en plusieurs espèces (Bossis et al., 2000). La classification de la taxonomie de *P.fluorecens* et *P. putida* requiert des recherches complémentaires qui associent des méthodes phénotypiques récentes, et génotypiques (Palleroni, 2010). Selon Kim et al (2009), la classification de *Pseudomonas* spp. fluorescents est comme suit :

Tableau 1 Classification de *Pseudomonas* sp.

Règne	Bacteria
Embranchement	Proteobacteria
Classe	Gamma proteobacteria
Ordre	Pseudomonadales
Famille	Pseudomonaceae
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas</i> sp.

I.4.1.2. Caractéristiques des *Pseudomonas* spp. fluorescents :

a. Caractéristiques morphologiques :

Les bactéries de genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, des bâtonnets droits ou faiblement incurvés de 0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,5 à 5 µm de long (prescott et al.2003) non sporulés, généralement mobiles grâce à une ciliature polaire multitrèche, rarement immobiles. La taille du génome du groupe *Pseudomonas* fluorescents varie d'environ 6,4 Mb à 7,7 Mb (Paulsen et al.,2005, Silby et al., 2009) pas de différence significative dans la structure du peptidoglycane de la paroi Les cellules de *Pseudomonas* fluorescents cultivées en condition de stress nutritif s'allongent de manière à former de longs bacilles de faible largeur(Figure 2).



Figure 2 : cellule de *Pseudomonas* spp. fluorescente observée au microscope électronique (<http://evolutionexplained.com/category/mutations/>)

b. Caractéristiques biochimiques et physiologiques

Le test de catalase et oxydase est le plus souvent positive, elles sont incapables de fermenter le glucose. Mésophiles, chimio-organotrophes puisqu'elles peuvent croître dans un milieu minérale ne contenant qu'une seule source de carbone. La température optimale pour la croissance des espèces saprophytes est située entre 28°C et 30°C. Toutes les espèces de ce genre ne peuvent croître à pH inférieur à 4.5 (Palleroni, 1984). Certaines populations de *Pseudomonas* spp. fluorescents ont la possibilité de dissimiler l'azote Cette dissimilation est plus ou moins complète selon le groupe taxonomique considéré (Matsubara et Zumft, 1982).

Ces bactéries ont une longévité faible en culture même à 4°C, tous les modes de conservation possibles sont proposés : Lyophilisation, eau distillée stérile avec une anse de culture à température ordinaire de 18°C (*Pseudomonas* phytopathogènes), gélose inclinée avec huile de paraffine, surface d'une gélose molle, tube à vis comme pour les Entérobactéries, congélation.

I.4.1.3. Les *Pseudomonas* spp. fluorescents et la lutte biologique :

La finalité de la bactérisation est d'augmenter le rendement des cultures. Seules certaines souches semblent présenter cette capacité (Weller, 1983). Elles ont été appelées « Plant Growth Promoting Rhizobacteria » (PGPR) par (Kloepper et Schroth, 1993). L'augmentation du rendement d'une culture bactérisée résulte de 2 effets bénéfiques principaux : la stimulation de croissance des plantes et la protection des plantes contre les maladies d'origine tellurique. D'autres effets bénéfiques ont également été décrits. Ainsi certaines souches de *Pseudomonas* stimulent la germination des graines.

D'autres influencent positivement les interactions entre les microorganismes symbiotiques (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ; champignon mycorhiziens) et la plante hôte (Figure3).

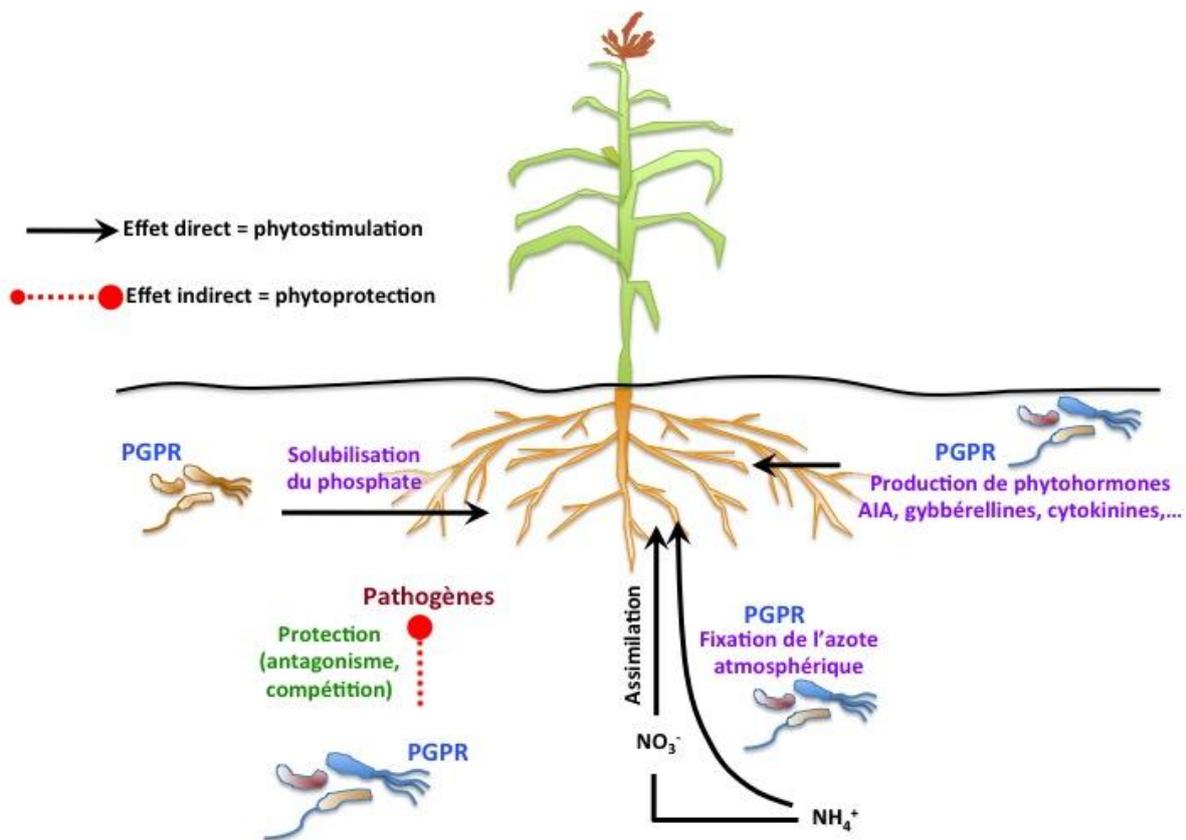


Figure 3 : Représentation schématique décrivant les interactions entre plantes et bactéries coopératives (PGPR) dans la rhizosphère (http://www.ecologiemiocriennelyon.fr/IMG/jpg/fig_PGPR.jpg).

I.4.1.4. Les métabolites secondaires produits par le groupe fluorescents des *Pseudomonas* :

I.4.1.4. 1. Les sidérophores :

Le mot sidérophores, issu du grec, signifie sideros : fer et phore : porteur. L'utilisation des sidérophores représente chez les bactéries l'un des systèmes les plus efficaces pour l'acquisition du fer. Ce sont des métabolites secondaires de faible poids moléculaire, compris entre 200 et 2000 daltons, dont le rôle est de solubiliser, de chélater et d'extraire le fer ferrique de nombreux complexes minéraux ou organiques et de le rendre ainsi accessible aux microorganismes (Neilands, 1995).

Actuellement plus de 500 composés de structures chimiques différentes ont été définis comme sidérophores. Ils sont toujours caractérisés par un, deux ou trois groupes chélatant

bidentés, généralement oxygénés, cruciaux pour la formation de complexes octaédriques hexacoordonnés très stable entre le sidérophores et le fer ferrique, qui permettront de capter le fer. Par contre la nature des groupements chimiques chélatant le fer est assez restreinte (Winkelmann, 2002). Ainsi les sidérophores peuvent être classifiés selon les groupes fonctionnels qu'ils utilisent comme ligands du fer (Winkelmann, 2002)

Ces groupes peuvent être des catécholates, hydroxamates, carboxylates ou des phénolates (Figure 4). On trouve plus rarement des hydroxyacides comme la rhizobactine. Du fait de la forte oxygénation des groupes chélatant, le Fe^{3+} est plus oxophile que le Fe^{2+} , reste la forme de fer pour laquelle le sidérophores a généralement la plus grande affinité. Les sidérophores peuvent être composés de groupes chélatant identiques, mais sont plus fréquemment mixtes. La stœchiométrie sidérophores : fer est variable, et est en fonction du nombre de groupes chélatant portés par le sidérophores.

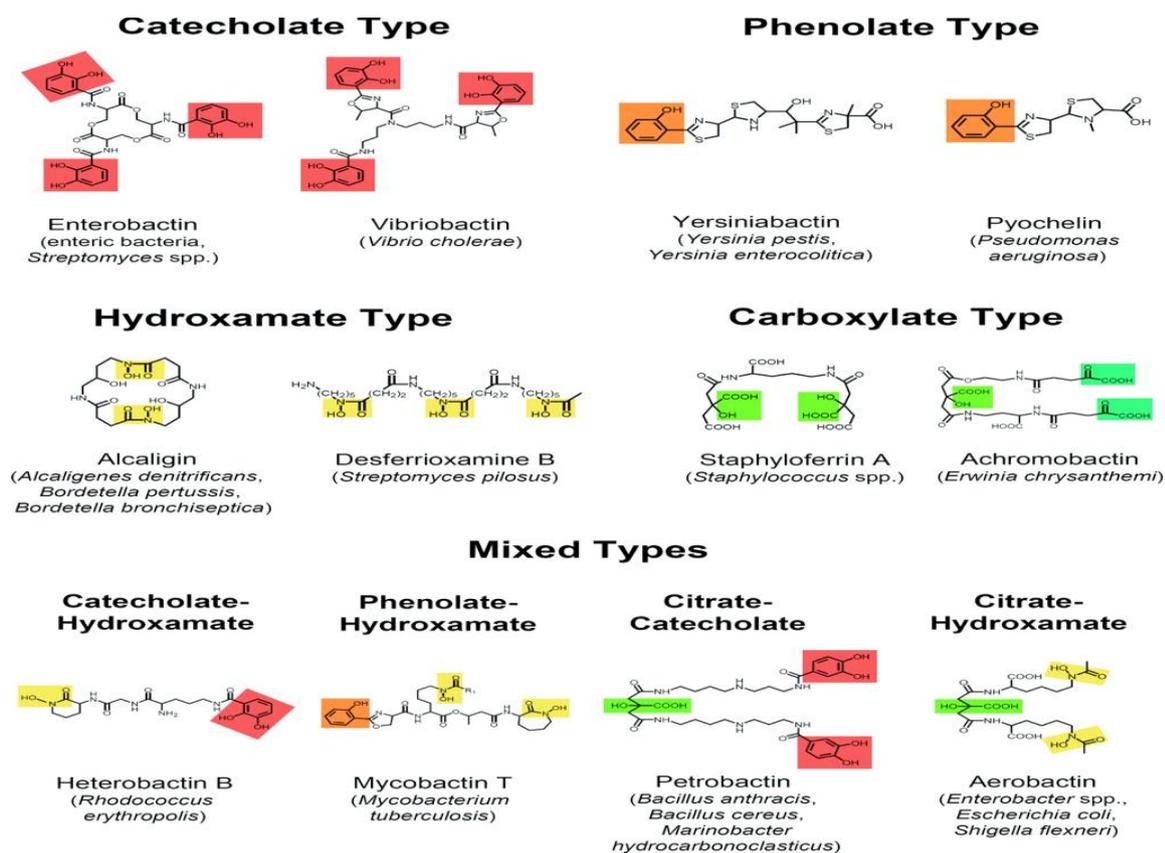


Figure 4 : Exemples représentatifs de différents sidérophores et de leurs producteurs naturels. Les moites impliquées dans la coordination du fer sont mises en évidence comme suit: les catécholates sont en rouge, les phénolates sont en orange, les hydroxamates sont en jaune pâle, les α -hydroxycarboxylates (issus des unités de citrate) sont en vert clair.

I.4.1.4. 2. Les enzymes :**a. Amylases :**

Les amylases sont des macromolécules appartenant à la classe des protéines globulaires, de type endoglycanases de la classe des hydrolases qui agissent sur les liaisons (1,4) de l'amidon. Elles catalysent la dégradation des polymères d'amidon pour produire des dextrines et différents gluco-oligosaccharides de longueur variables. Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes en biotechnologie actuelle (Gupta, 2003). Les amylases sont produites par de nombreuses bactéries. Des *Pseudomonas* sp. isolées du sol rhizosphérique, donnent de meilleurs résultats à la production d'amylase à une température de 37°C et un pH 7.5. Ces enzymes sont fortement stables à pH acide (pH 5.5), ce qui les rendent en grand intérêt dans l'industrie

b. Les enzymes dégradant les parois cellulaires (CWDE)

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases formées d'une ou plusieurs chaînes polypeptidiques. Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique, elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés, offrant une multitude de structures). Selon la nature de leur site catalytique elles sont classées en trois groupes : sérine, cystéine ou métallo-protéase. (Ronald et Harold, 1970)

✚ Gélatinases :

La Gélatinase appartient au groupe des enzymes protéolytiques ayant pour résultat l'hydrolyse gélatineuse. Cette enzyme est observée chez les *Pseudomonas* spp. fluorescents.

✚ Pectinase :

Les enzymes pectiques ou Pectinase sont un groupe d'enzymes : estérases, polygalacturonases et lyases qui agissent sur les substrats pectiques. Les polygalacturonases et les lyases dépolymérisent les substances pectiques pour donner des oligomères de faible masse moléculaire. Les microorganismes (bactéries, champignon, levures) sont la source essentielle de production de polysaccharides. Certaines de ces enzymes ont déjà un intérêt commercial dans l'industrie agro-alimentaire, c'est le cas des Pectinase(Fernandes-SalomãoTM et al., 1996).

c.Lipase :

Les triacylglycérol acyl-hydrolases, ou lipases, sont des enzymes atypiques par leurs mécanismes d'action et leur spécificité de substrats. En fonction du microenvironnement de l'enzyme, elles peuvent en tant qu'hydrolases en milieu aqueux ou comme catalyseurs en synthèse organique, elles sont également responsables du catabolisme des triglycérides en acide gras et en glycérol(Sierra,1957).

I.4.1.4. 3. L'acide indole acétique (AIA)

Composé organique de formule $C_{10}H_9O_2N$, doté de propriétés d'hormone de croissance pour les végétaux. (Il amollit les jeunes parois cellulosiques, ce qui facilite l'élongation des cellules, et il les rend plus perméables, ce qui accélère l'absorption par la cellule, donc sa croissance).(Naik et Sakthivel, 2006).

I.4.1.4. 4. L'acide cyanhydrique (HCN)

Selon Voisard et *al.* (1989), la production d'acide cyanhydrique (HCN) par la souche de *P.fluorescens* cHA5 est nécessaire a la défense de la plante vis-à-vis de l'agent de la pourriture noir tu tabac. ce mécanisme est de moindre importance avec la souche Cha77 L'HCN produit dans la rhizosphère activerait des réactions de défense de la plante, ce qui correspond à un mécanisme indirect de protection.(Meena et *al.*,2001).

I.4.1.4. 5. Les Antibiotiques

plusieurs antibiotiques sont produits par les *Pseudomonas* fluorescents et jouent un rôle important dans l'inhibition d'agents phytopathogènes, le 2,4-diacétyl-phloroglucinol (DPG) produit pas *P.fluorescens* CHA0 (Keel et *al.*, 1992) a montré un effet

suppressifs sur plusieurs phytopathogènes (*G. garminis* et *Thielaviopsis basicola*), d'autres antibiotiques sont produits par les *Pseudomonas* dont le pyoluteorine (Maurhofer et al., 1994), Pyrrolnitrin (Ligon et al., 2000), L'oomycine A (James et Guttersson, 1986 ; Howie et Suslow, 1991) (Voir tableau 2 et figure 5).

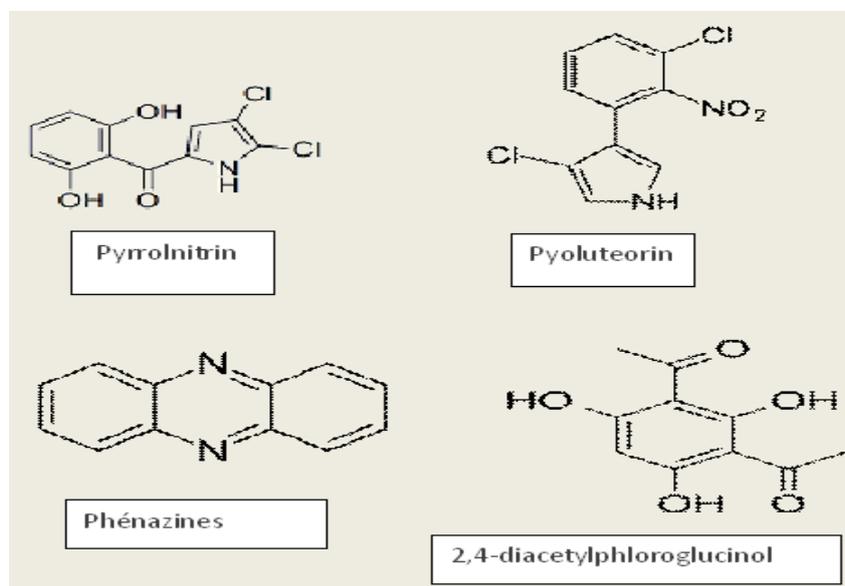


Figure 5 : la forme chimique de quelques antibiotiques secrétés par les *Pseudomonas* spp. fluorescents (Jacques et al, 1994).

Tableau 2 : les antibiotiques produits par certaines souches de *Pseudomonas* (Adapté de Raaijmakers et coll., 2002)

Antibiotiques	Souches	Références
2,4-diacétylphloroglucinol	<i>Pseudomonas</i> spp. Q2-87 CHAO Pf-5 Q8r1-96	Vincent et coll. (1991) Keel et coll. (1992) Howell et Stipanovic (1979) Raaijmakers et Welle(2001)
Phénazines	<i>Pseudomonas</i> spp. 2-79RN10 30-84 PCL1391	Weller(1983) Pierson et Thomashow (1992) Chin-A-Woeng et coll.(1998)
OomycineA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Hv37a	Guttersson et coll.(1986)
Pyolutéorine	<i>P. fluorescens</i> Pf-5 CHAO	Howell et Stipanovic (1979) Keel et coll.(1992)
Pyrrolnitrine	<i>P. fluorescens</i> BL915 <i>Burkholderia cepacia</i> B37w	Ligon et coll. (2000) Burkhead et coll. (1994)
Viscosinamide	<i>P. fluorescens</i> DR54	Nielsen et coll. (1999)
Butyrolactones	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> 63-28	Gamard et coll. (1997)

I.4.2. Les *Bacillus* sp. :

C'est un genre qui se présente sous forme de bâtonnet Gram positif, aérobic strict ou aérobic-anaérobic facultatif. Catalase positif général, mobile par ciliature péritriche (sauf *B. anthracis*), faciles à cultiver, sporogènes dans des conditions défavorables de l'environnement. Ce genre est très diversifié, particulièrement hétérogènes, saprophytes et ubiquitaires. Il existe des espèces acidophiles et d'autres basophiles, mésophiles ou encore thermophiles. Les bacilles sont retrouvés fréquemment dans le sol ou ils ont un rôle dans le cycle du carbone et de l'azote.

Les *Bacillus* sont connues comme producteurs d'antibiotiques avec une activité antagoniste contre les champignons et quelques bactéries pathogènes..(De Vos et al.,2009)

I.4.2.1. Classification

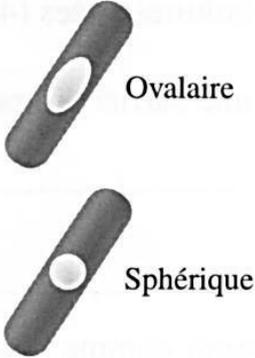
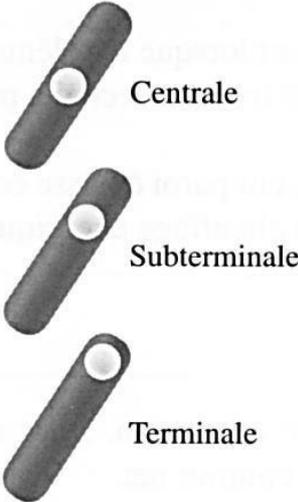
Selon la classification de Bergy (2001) in Gerardet *al* (2003), la classification de *Bacillus* et comme suit (tableau 3).

Tableau 3 : classification de *Bacillus* sp.

Règne	Bacteria
Embranchement	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Bacillales
Famille	Bacillaceae
Genre	<i>Bacillus</i>
Espèce	<i>Bacillus</i> sp.

On classe les *Bacillus* selon la capacité à former des spores ainsi que sur la morphologie de la spore et en fonction d'autres critères (thermophile, caractère respiratoire et fermentaire etc.)(Guiraud, 2002). Selon le tableau 4, on distingue trois formes et trois positions de la présore :

Tableau 4 : classification des *Bacillus* selon la position la forme et la déformation de la présore(Brossard et *al.*, 2008)

Forme	Position	Déformation
 <p>Ovalaire</p> <p>Sphérique</p>	 <p>Centrale</p> <p>Subterminale</p> <p>Terminale</p>	 <p>Non déformante</p> <p>Déformante</p>

I.4.2.2. Intérêt de *Bacillus* dans la lutte Biologique

Bacillus est l'un des microorganismes les plus connues et les plus utilisées dans le domaine de la lutte biologique contre plusieurs insectes ravageurs de culture et agents phytopathogènes (Bravo *et al.*, 2011). Elles jouent également un rôle important dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote ; les spores produites par ces bactéries peuvent revêtir une importance particulière dans la production de préparation commerciale d'antagonistes car ces derniers sont aussi beaucoup plus faciles à stocker et à conserver que des bactéries ne formant pas de spores (Alexandre , 1977).

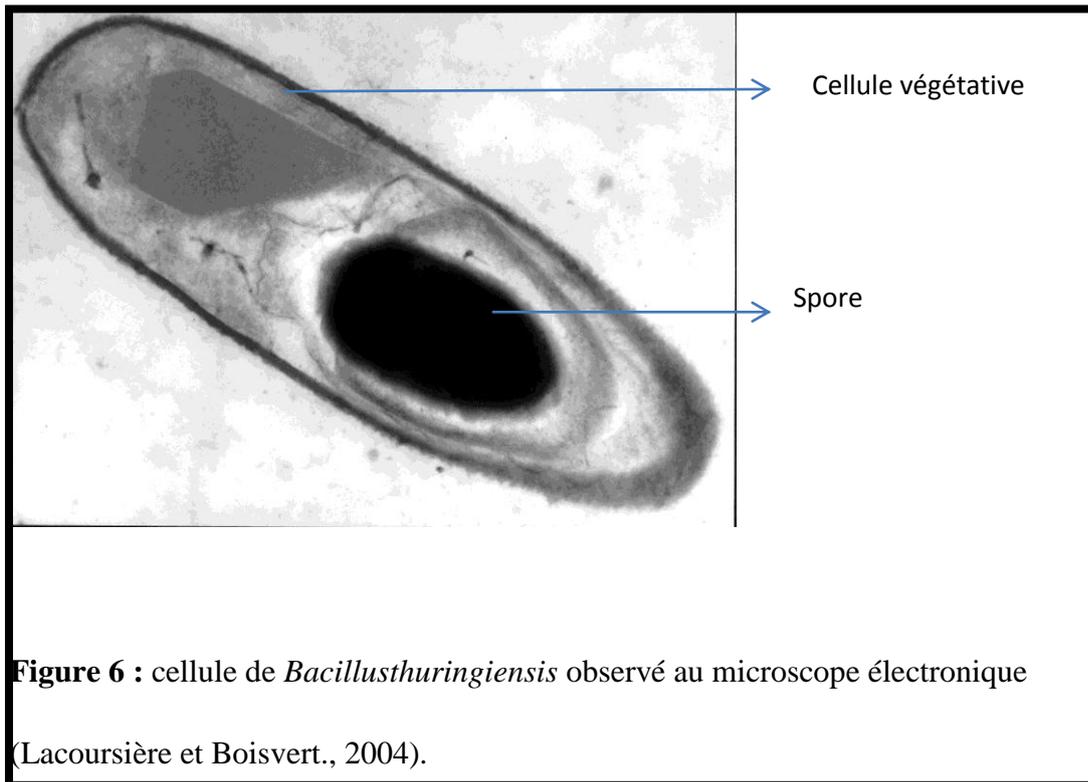
La plupart des espèces du genre *Bacillus* sont utilisées avec succès dans le domaine de l'agriculture et l'industrie fine ainsi que dans le domaine médical et pharmaceutique.

I.4.2.3. Caractéristiques du genre *Bacillus sp.*

Bacillus thuringiensis fait partie d'un groupe de six bacilles, rassemblés sous le terme « Groupe *Bacillus cereus* » : *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus*

pseudomycoïdes, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus thuringiensis*. (Thaphan et al., 2007 ; Brunet., 2009 ; Sansinenea et Ortiz., 2011 ; Sanahuja et al., 2011). La plupart des espèces appartenant à ce groupe, se caractérise par la production d'un Crystal protéique lors de la sporulation. Durant la phase végétative (active), *B. thuringiensis* a une longueur de 5 micromètres et une largeur de 1 micromètre et est pourvue de flagelles (figure 6). Ce sont des bactéries ubiquitaires, on les retrouve un peu partout dans la nature, dans le sol, sur le feuillage des plantes, dans l'eau et dans l'air (Kwang B.O et al., 2000 ; Helassa., 2008).

Ayant des propriétés de résistance à la chaleur et à la déshydratation. Ceci leur confère une répartition cosmopolite, caractérisée par un large spectre d'activité tel que le caractère entomopathogène en formant des corps d'inclusions qu'elle produit lors de sa sporulation. Le *B. thuringiensis* se distingue des autres bacilles par sa capacité à produire des protéines cristallines durant la sporulation appelées Cry (pour Crystal) ou Cyt (pour cytotoxique) selon leurs effets. Ces toxines sont également appelées δ -endotoxines par opposition à d'autres toxines secrétées durant la phase végétative, les protéines Cry sont actives contre les lépidoptères, les diptères, les coléoptères et même contre les nématodes, cette capacité à contrôler les ravageurs dans les cultures fait que Bt est l'un des microorganismes les plus utilisés dans l'agriculture comme bioinsecticides (Chaabouni et al., 2012). Elles sont également récemment très utilisées comme agent antagoniste contre plusieurs phytopathogènes citant par exemple ces effets bénéfiques contre le *Verticillium dahliae* (Hollensteiner et al., 2017 ; Thomashow et Weller 1990 ; Pierson et Weller ; Amer et Utkhede 2000 ; Manjula et al., 2000 ; Collins et Jacobson 2003 ; Jatarafet al., 2004 ; Jorjaniet al., 2011)



- ❖ Son cycle de vie comporte deux (2) phases (YOUNG et *al.*, 1998) (figure 7) :
 - Une phase végétative observée lorsque les conditions du milieu sont favorables. Dans Ce cas, la bactérie se multiplie de façon exponentielle par scissiparité. Elle synthétise Pendant cette phase une exotoxine thermosensible appelée VegetativeInsecticidalProtein ou V.I.P. (VASSAL, 2004).
 - Une phase stationnaire qui se présente lorsque les nutriments essentiels du milieu se Raréfont. Elle se caractérise par une différenciation des cellules bactériennes, aboutissant à la formation des spores. C'est aussi au cours de cette phase qu'intervient la synthèse des delta-endotoxines, substances protéiques conférant à la bactérie un pouvoir pathogène vis-à-vis de certains insectes. Ces protéines s'accumulent dans la cellule bactérienne pour former des cristaux (figure 6) qui sont ensuite libérés dans le milieu. (YOUNG et *al.*, 1998)

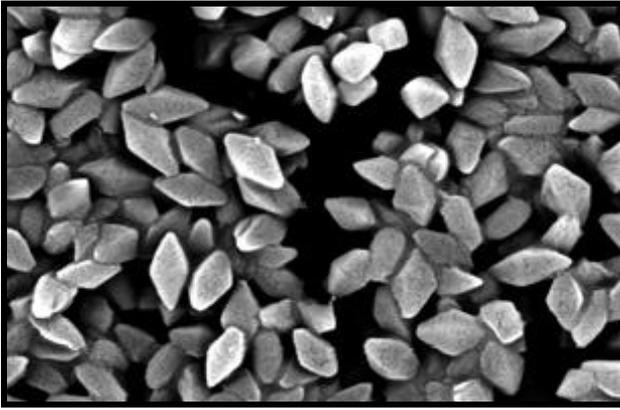


Figure 7 : δ -endotoxines (cristaux protéiques CRY) de *Bacillus thuringiensis* (Microscopy by Jim Buckman on commons.wikimedia.org)

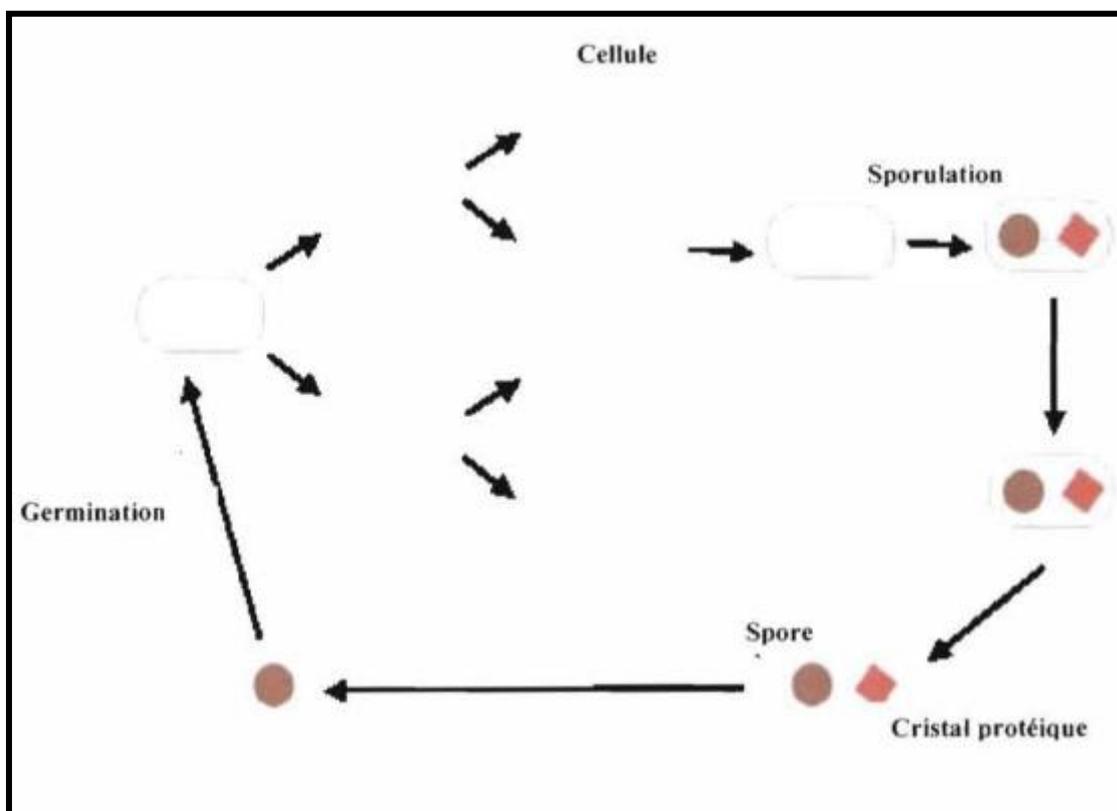


Figure 8 : cycle biologique de *Bacillus thuringiensis* (<http://www.new.gov.qc.ca/pesticides/virus/nil/bit/chap3.htm>)

Sur le plan taxonomique il existe 82 sérotypes différents de l'espèce *Bacillus thuringiensis*. La classification est faite sur la base de l'antigène flagellaire H ; parmi ces sérotypes on distingue kurstaki, israelensis, morissoni, japonensis et aizawai qui sont entomopathogènes.

I.4.2.4. Les toxines et métabolites secondaires produites par les *Bacillus*

a. Les exotoxines

- *B. thuringiensis* est une bactérie qui, au cours de son cycle de vie, fabrique un grand nombre de toxines et métabolites de toutes sortes. Durant la phase végétative, elle produit une toxine thermostable appelée Bêta-exotoxine. Il existe deux variétés de Bêta-exotoxines, soit la Bêta-exotoxine de type 1 et la Bêta-exotoxine de type 2 (Levinson, Kasyan et *al.*, 1990). Les gènes servant à coder les exotoxines sont de nature plasmidique. Ces mêmes plasmides peuvent aussi coder pour les delta-endotoxines (Levinson, Kasyan et *al.*, 1990). Les Bêta-exotoxines ont une structure similaire à l'adénosine triphosphate (ATP) (Bond, Boyce et *al.*, 1969). Elles sont toxiques pour une grande variété d'insectes tels que les nématodes, les diptères et les lépidoptères (World Health Organization, « Environment Health Criteria 217 », 1999).

➤ Les protéines Cyt

Tout comme les protéines Cry, les protéines Cyt se retrouvent dans la famille des δ -endotoxines et sont produites toutes deux dans le même cristal lors de la sporulation. Ces protéines peuvent notamment agir en synergie avec certaines protéines Cry afin d'augmenter leur toxicité sur les insectes (Soberon, Lopez-Diaz et *al.*, 2013). Ces caractéristiques tendent à accroître l'intérêt des chercheurs envers ce type de protéines afin de développer des insecticides plus efficaces.

➤ Les protéines Cry

Au cours de la sporulation, la plupart des souches de *Bacillus thuringiensis* produisent un cristal protéique composé de δ -endotoxines. (Ibrahim, Griko et *al.*, 2010). Grâce à leur toxicité sélective envers différents insectes nuisibles, les protéines Cry sont utilisées depuis les années 1930 en tant qu'insecticide biologique. À ce jour, plus de 500 protéines Cry ont été découvertes et classées dans 72 familles (Crickmore et *al.*, 2014).

La classification des δ -endotoxines synthétisé par les espèces du *Bacillus* sp. est représentée dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 : classification des δ -endotoxines de *Bacillus sp.* (HOFTE et WHITELEY (1989))

Classe	δ -endotoxines	Taille (KDa)	Insectes sensibles	Structures des Cristaux
Cry I	A B C D E F	130-140	Lépidoptères	Bipyramidale
Cry II	A B	71	Diptères et Lépidoptères	Cubique
Cry III	A B	68-73	Coléoptères	Rhomboédrique
Cry IV	A B	125-145	Diptères	Sphérique
Cry V	A	81	Lépidoptères et Coléoptères	Bipyramidales
Cyt	AB	26-28	Diptères	Sphériques

b. Les exoenzymes

Les exoenzymes de *Bacillus sp.* ont un rôle à jouer pour la pathogénicité chez l'insecte et la dégradation des parois fongiques et non sur les vertébrés contrairement aux entérotoxines. Les exoenzymes les plus importantes restent les chitinases et les protéases. La chitinase est une enzyme qui dégrade la chitine qui est une composante de l'exosquelette des insectes ainsi qu'une composante des champignons. Chez l'insecte, la chitinase peut agir en symbiose avec les toxines de *B. thuringiensis* afin de faciliter leur passage à travers la membrane péritrophique de l'intestin de l'insecte (Huber, Cabib et al., 1991 ; Sampsonet Gooday, 1998). La chitinase de *Bacillus* peut aussi avoir une action lytique sur les parois cellulaires de champignons phytopathogènes protégeant ainsi les plantes contre les maladies (de la Vega, Barboza-Corona et al., 2006). *Bacillus sp.* est aussi un grand producteur de protéases de toutes sortes qui, peuvent être intracellulaires et extracellulaires. L'activité des protéases est augmentée durant la phase post-exponentielle, lors de la lyse des bactéries dans le milieu de culture (Andrews, Bibilos et al., 1985). Les protéases de *B. thuringiensis* ont un rôle à jouer autant dans la croissance et la sporulation que dans la toxicité de la bactérie chez l'insecte (Brar, Verma et al., 2007).

La mélanine : c'est un excellent agent phytoprotecteur de *Bacillus thuringiensis* et *B. israelensis* (Sansibebea et Ortiz, 2011)

Lécithinase : il s'agit d'une protéine thermolabile produite par les souches de *Bacillus* lors de la phase de croissance logarithmique, son activité est maximale après 10 h de croissance (Ivinskene et al., 2012)

Les Cellulases : les Cellulases se réfèrent à une classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons 1, 4, B, D glycosidiques et sont principalement produites par les champignons ; les bactéries et notamment les bactéries halophiles (Beguin et Aubert, 1994).

c. Les antibiotiques et les antifongiques produits par *B. thuringiensis*

En plus de synthétiser un bon nombre de protéines insecticides, *Bacillus* produit aussi d'autres métabolites tels que des antibiotiques et des 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 zwittennicine A, les thuricines, la --tochicine, la bacthuricine F4 et les entomocines. La zwittennicine A et les thuricines représentent les métabolites d'importance pour la protection des plantes par les espèces bénéfiques du genre *Bacillus*. La zwittennicine 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*, les bactéries Gram négatives et un grand nombre de fungi pathogènes (Silo-Suh, Stabbet al., 1998). Les thuricines sont quant à elles des bactériocines, c'est-à-dire des peptides avec des propriétés bactéricides ou bactériostatiques. Elles sont par contre actives contre plusieurs *Bacillus* tels *B. thuringiensis*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa* et *Bacillus sphaericus* (Favret and Yousten, 1989). Elles peuvent aussi être actives contre des bactéries plus nuisibles comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica* (Chehimi, Delalande et al., 2007).

Grâce à leur action toxique contre ces bactéries nuisibles, les thuricines peuvent notamment procurer une protection pour les plantes. La découverte de souches de *B. thuringiensis* produisant des antibiotiques et des métabolites antifongiques pourrait avoir comme conséquence la création de pesticides biologiques respectueux de l'environnement.

I.4. 2. 4. Mode d'action de *Bacillus sp.*

À ce jour plusieurs centaines de gènes codant pour des δ -endotoxines ont été répertoriés. Chaque protéine Cry possède généralement un spectre d'activité restreint et limité aux stades larvaires d'un petit nombre d'espèces.

Les δ -endotoxines agissent au niveau des cellules de l'épithélium intestinal. Les cristaux ingérés par les larves d'insectes sont d'abord solubilisés dans la cavité intestinale de la larve, puis la fraction active des δ -endotoxines est libérée par les protéases intestinales des insectes sensibles.(figure9).

Ces deux étapes sont indispensables pour conférer à *Bacillus thuringiensis* son activité insecticide. La présence de récepteurs spécifiquement reconnus par chacune des δ -endotoxines constitue l'étape essentielle du mécanisme d'action et de spécificité de ces toxines. La toxine induit alors la formation de pores dans la membrane des cellules épithéliales, ce qui aboutit à une destruction rapide et presque totale de l'épithélium intestinal.(<http://www.jardinsdefrance.org>)

Au niveau physiologique, l'intoxication se manifeste par une paralysie quasi immédiate du tube digestif qui entraîne une cessation de prise de nourriture. Ceci permet aux spores qui ont été ingérées en même temps que les cristaux, de germer, et aux bactéries issues de cette germination de se multiplier dans l'insecte provoquant une septicémie (Chaufaux, 2005).

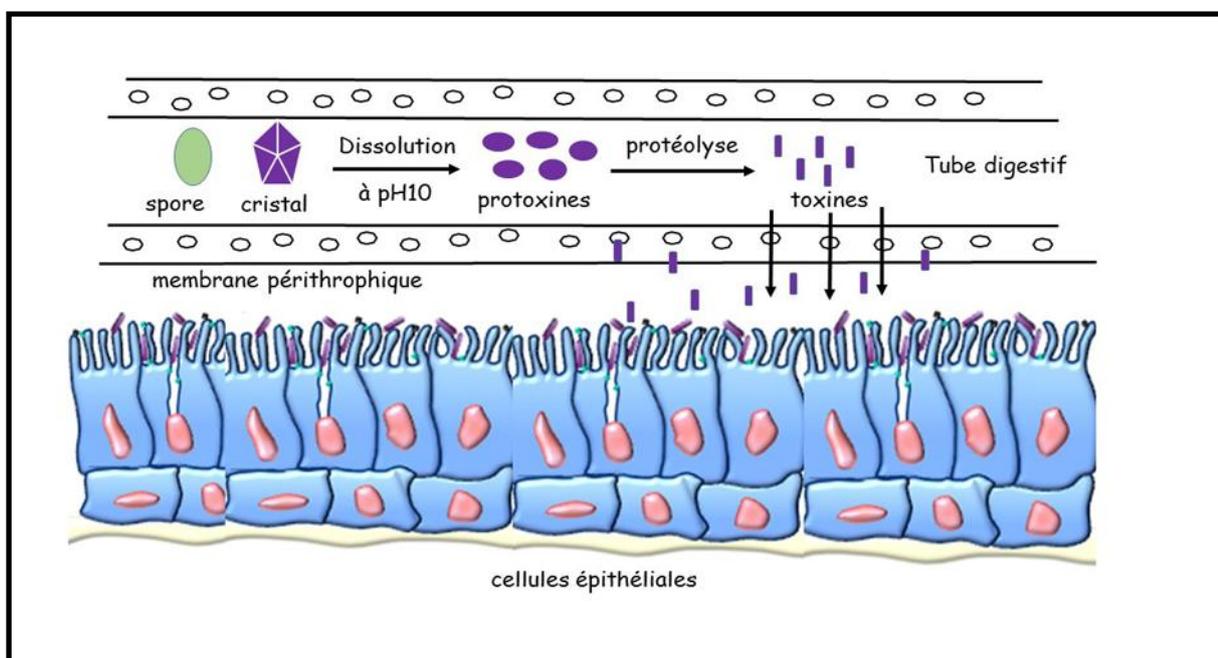


Figure 9 : schéma simplifié du mode d'action de *Bacillus thuringiensis* dans l'intestin des lépidoptères.(<http://www.jardinsdefrance.org>)

Les principaux métabolites antimicrobiens de *Bacillus sp*:

Les métabolites antimicrobiens sont représentés ci-dessous et résumés dans le tableau 6

Tableau 6 : les principaux métabolites antimicrobiens de *Bacillus thuringiensis*

La souche	Métabolites antimicrobiens et enzymes	Activité inhibitrice	Référence
<i>B.thuringiensis</i>	Les chitinases	Les champignons phytopathogènes, <i>Fusarium sp</i> et <i>Sclérolique rolfsii</i>	De la Vega et al., 2002
	les β -exotoxines	Les insectes diptères, les coléoptères, les lépidoptères et certains nématodes	Espinasse et al., 2002 Espinasse et al., 2004
	Les protéines végétatives - insecticides (vip)	Divers diptères, les coléoptères, les lépidoptères et certains nématodes	Xiao et al., 2002 Doss., 2010
	Les bactériocines	Les bactéries Gram +, Gram -, les champignons et certains virus.	Chaabouni et al., 2012

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de Valorisation et de Conservation des Ressources Biologiques (VALCORE) et le laboratoire de Biotechnologie Microbienne (S15) de l'Université M'Hamed Bougara de Boumerdes (UMBB).

Les objectifs tracés sont :

- La revivification et la ré identification des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et de *Bacillus* sp. isolées à partir de trois plantes cultivées à savoir le Néflier, le blé et la pomme de terre, ainsi que la recherche de quelques métabolites secondaires produites par ces dernières tels que les enzymes, l'acide indole acétique (AIA) et l'acide cyanhydrique (HCN).
- Ce travail est complété par l'évaluation de l'activité antagoniste des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et de *Bacillus* sp. contre deux isolats de champignon phytopathogène *Verticillium dahliae* (V1 et V2) appartenant respectivement aux pathotype défoliant (D) et non défoliant (ND).

II. 1. Matériels utilisés

II.1.1. Matériels non biologiques

II.1.1.1. Equipements :

Les équipements ainsi que le matériel utilisé au cours de la réalisation de notre travail sont regroupés dans l'annexe 2.

II.1.1.2. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés et leurs compositions sont présentés au niveau de l'annexe 1. Nous avons utilisés des milieux de ;

- ✓ Revivification GN et King B.
- ✓ la recherche des différentes activités enzymatiques chez *Pseudomonas* et *Bacillus* citant entre autres ;
 - Activité pectinolytique sur milieu gélosé à base de pectine.
 - Activité amylolytique sur milieu gélosé à base d'amidon.
 - Activité protéolytique (caséinases) sur milieu gélosé à base de lait écrémé.
 - Production de lipases sur milieu lipase additionné de tween 40.

- Production de cellulases sur gélose M9 supplémentée de 10g de cellulose et 1.2g d'extrait de levure.
- Production de chitinases sur milieu à base de chitine.
- ✓ La production de l'acide indole acétique (AIA) sur gélose Luria-Bertani additionné de : 5mM de L-tryptophane, 0.06% de SDS, et 1% de glycérol.
- ✓ La production d'acide cyanhydrique (HCN) sur milieu King B liquide additionné de 4.4g/l de Glycine.

II.1.2. Matériel biologique

II.1.2.1. Souches bactériennes

Pour la réalisation de nos expériences, nous avons utilisé 25 souches bactériennes du genre *Pseudomonas*, et *Bacillus*, fournis aimablement par Mme BENZINA, conservées dans des tubes à essais contenant le milieu GN incliné. Les 25 souches ont été isolées à partir de la rhizosphère de trois plantes cultivées (nèfle, orge et pomme de terre), dans la région de Boumerdes (Alliliguia).

II.1.2.2. Souches fongiques

Nous avons utilisé deux souches fongiques de *Verticillium dahliae* à savoir le V1 et le V2 appartenant au pathotype défoliant et non défoliant isolés et caractérisés par Benzina *et al* (2016).

II.2. Méthodes

II.2.1. Caractérisation phénotypique

L'identification des *Pseudomonas* spp. et *Bacillus* sp. est effectuée par différentes méthodes. Dans notre cas il s'agit de techniques classiques faisant appel à une caractérisation phénotypique basé sur des critères morphologiques, biochimiques et physiologiques.

II.2.1.1. La revivification des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp.

La revivification des souches bactériennes utilisées a été effectuée sur le milieu solide GN afin de s'assurer de leur pureté. L'ensemencement en strie des souches est fait sur des boites de Pétri. Ces dernières ont été scellées avec du para film, puis incubé à l'étuve à 30°C pendant 24h.

II.2.1.2. Etude morphologique

II.2.1.2.1. Etude macroscopique

Les colonies obtenues sur milieu solide sont observées à l'œil nu. L'étude macroscopique est basée sur les éléments d'identification donnés par (Joffin et Leyral.,2006) :

- ✓ La forme des colonies : rondes, irrégulières...etc.
- ✓ La taille des colonies : par mesure du diamètre : punctiformes ou non punctiformes.
- ✓ L'opacité : opaque, translucide.
- ✓ L'aspect de la surface
- ✓ L'aspect de contour
- ✓ La consistance
- ✓ L'odeur : présence ou absence.
- ✓ L'élévation : convexe, concave, plate.
- ✓ La chromogènes : couleur de la colonie.

II.2.1.2.2. Etude microscopique

Coloration de Gram

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries Gram positif et Gram négatif, en fonction de la composition chimique de leur paroi, appelée aussi la double coloration à cause de l'utilisation de deux colorants, à savoir le violet de Gentiane et la Fuchsine.

C'est la coloration de base en bactériologie qui permet de distinguer les bactéries Gram positif et gram négatif, en fonction de la composition chimique de leur paroi, appelée aussi la double coloration à cause de l'utilisation de deux colorants, à savoir le violet de gentiane et la fuchsine. Son objectif est de classer les micro-organismes en deux groupes (Gram+ et Gram-) en fonction de la composition chimique de leur paroi et son affinité aux différents colorants (Perry et al .,2004 ;Camille,2007).

a. Réactifs

Violet de Gentiane phénique, Lugol, Alcool a 85° et Safranine ou Fuchsine.

Préparation d'un frottis bactérien

On dépose au centre d'une lame une goutte d'eau distillé stérile, à l'aide d'une anse on étale de façon homogène une colonie bactérienne jeune (18 à 24 heures). Après on passe à la fixation à la chaleur (au bec Bunsen).

Avant de procéder à la coloration du frottis ce dernier doit être parfaitement refroidi.

- Coloration de base : recouvrir totalement la lame par le violet de gentiane, laissé agir une minute et rincer à l'eau distillé.
- Mordançage : recouvrir la lame par la solution de Lugol pendant 45 secondes, et rincer à l'eau distillé.
- Décoloration rapide à l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame incliné obliquement jusqu'à la décoloration (10 à 20 secondes) et rincer à l'eau distillé.
- Contre coloration : recouvrir la lame avec de la Fuchsine et laisser agir une minute, et rincer à l'eau distillé.

On sèche la lame et on passe à l'observation sous microscope photonique à l'immersion (Gx100).

b. La lecture

La paroi des bactéries à Gram positif apparaissent colorées en violet.

La paroi des bactéries à Gram négatif apparaissent colorées en rose (Prevot, 1977).

La coloration de la spore

Les spores ou endospores bactériennes sont des formes de résistances que prennent certaines espèces quand les conditions deviennent défavorables (Singleton, 2005).

La solution aqueuse de vert de malachite à la propriété de traverser avec facilité après chauffage la paroi de la spore et de colorer essentiellement et sélectivement ces substances propres.

Technique

- La préparation d'un frottis bactérien.
- Recouvrir le frottis par un papier filtre sur lequel la solution de vert de malachite est appliquée.

- Chauffer par le bec Bunsen pendant dix minutes (sans jamais laisser évaporer complètement le colorant), à froid la coloration n'aura jamais lieu.
- Rincer à l'eau de robinet après retrait du papier filtre, suivi d'une coloration à la Fuchsine pendant cinq minutes.
- Séchez la lame au bec Bunsen après on passe à l'examen microscopique, à l'immersion (G×100) (Singleton, 2005).

Lecture

Les spores apparaissent colorées en vert et les corps bactériens colorés en rose-bleu, ce qui nous facilite de déterminer la forme et la position de la spore dans le corps bactérien.

II.2.1.3. Etude biochimique

a. Test catalase

➤ Principe

Elle empêche l'accumulation de l'eau oxygénée (H₂O₂) dans la cellule bactérienne dont l'action serait létale; cette enzyme catalyse la réaction suivante :



➤ Technique

Sur une lame propre, déposer une goutte de peroxyde d'hydrogène à 10 volumes, puis à l'aide d'une pipette Pasteur stérile prélever une colonie bactérienne et la déposer dans la solution, la lecture de résultats s'effectue après 2minutes.

➤ Lecture

Un résultat positif se traduit par l'apparition des bulles, suite au dégagement gazeux d'oxygène (Meyer *et al.*, 2004).

b. Test de l'oxydase

Ce test permet de détecter un type particulier de la chaîne respiratoire qui comporte en fin de chaîne un cytochrome c et l'oxydase associée à la recherche de l'oxydase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram négatif.

➤ Principe

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé, qui a une grande importance dans le diagnostic des bacilles à Gram négatif.

Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diaméthyle paraphénylène diamine. Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose –rouge, qui devient noir au contact de l'air.

➤ Technique

Dans des conditions aseptiques, placer dans une boîte de Pétri un disque d'oxydase, et l'imbiber avec de l'eau physiologiques stériles. A l'aide d'une pipette Pasteur prélever une colonie bactérienne jeune âgée de 24 heures et la déposer sur le disque.

➤ Lecture

La réaction positive se manifeste par l'apparition d'une coloration violette qui devient noirâtre au bout de 30 secondes à 1 minute, ce qui indique la présence de cytochrome C – oxydase (Singleton , 2005).

c. L'utilisation des Galeries API 20NE

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des Bacilles à Gram négatif non fastidieux, combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation et une base de données.

➤ Principe

La galerie API 20 NE se compose de 20 micro-tubes contenant milieux et substrats sous forme déshydratée. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries se développent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique.

➤ Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillé stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte
- Sortir la galerie de son emballage individuel.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ Préparation de l'inoculum

- Ouvrir une ampoule d'API NaCl 0.85% medium.
- A l'aide d'une pipette pasteur prélever quelques colonies d'une culture jeunes de 24h.
- Réaliser une suspension bactérienne.

➤ Inoculation de la galerie

- ✚ Remplir uniquement les tubes des tests (et non les cupules) **NO3** à **PNPG** avec la suspension bactérienne.
- ✚ Eviter la formation de bulles.
- ✚ Créer une anaérobiose dans les tests **GLU**, **ADH**, **URE** en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- ✚ Remplir les micro-cupules des tests **GLU** à **PAC**.
- ✚ Remplir tubes et cupules des tests **GLU** à **PAC** en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave.
- ✚ Refermer la boîte d'incubation et la placer dans l'étuve à 37° C pendant 24 heures.

➤ Méthodes de lecture des galeries API20 NE

La méthode de lecture de la galeries API20NE est mentionnée dans le tableau 7.

Tableau7 : lecture de la galerie API 20 NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE Mg/cup.	REACTIONS ENZYMES	Résultats	
				Positif	Négatif
NO3	Potassium nitrate	0.136	Réduction des nitrates en nitrites	NIT1+NIT2/5min	
				incolore	Rose-rouge
				Zn/5min	
				Rose	incolore
TRP	L-Tryptophane	0.2	Formation d'indole (tryptophane)	JAMES/immédiat	
				Incolore Vert pale / jaune	Rose
GLU	D-Glucose	1.92	Fermentation du glucose	Bleu vert	Jaune
ADH	L-arginine	1.92	Arginine DiHydrolase	Jaune	Orange/rose/rouge
URE	urée	0.76	UREase	Jaune	Orange/rose/rouge
ESC	Esculine citrate de fer	0.56/0.072	Hydrolyse (B-glucosidase)	Jaune	Gris /marron/noir
GEL	Gélatine (bovine)	0.6	Hydrolyse (protéase)(gélatine)	Pas diffusion pigment	Diffusion du pigment noir
PNPG		0.22	B-galactosidase (Para-Nitrophenyl-BD-Galactopyranosidase)	Incolore	jaune
GLU	D-Glucose	1.56	Assimilation glucose	Transparence	Trouble
ARA	L-Arabinose	1.4	Assimilation arabinose	Transparence	Trouble
MNE	D-Mannose	1.4	Assimilation mannose	Transparence	Trouble
MAN	D-Mannitol	1.36	Assimilation mannitol	Transparence	Trouble
NAG	N-Acétyl-glucosamine	1.28	Assimilation N-Acétyl-Glucosamine	Transparence	Trouble
MAL	D-Maltose	1.4	Assimilation maltose	Transparence	Trouble
GNT	Potassium gluconate	1.84	Assimilation potassium gluconate	Transparence	Trouble
CAP	Acide caprique	0.78	Assimilation acide caprique	Transparence	Trouble
ADI	Acide adipique	1.12	Assimilation acide adipique	Transparence	Trouble
MLT	Acide malique	1.56	Assimilation maltate	Transparence	Trouble
CIT	Trisodium citrate	2.28	Assimilation trisodium citrate	Transparence	Trouble
PAC	Acide phénylacétique	0.8	Assimilation acide phénylacétique	Transparence	Trouble

II.2.2. Production d'enzymes

II.2.2. 1. Hydrolyse de l'amidon

Elle permet de mettre en évidence la dégradation de ce polysaccharide par nos souches bactériennes. En utilisant un milieu de base additionné d'1% d'amidon soluble (composition du milieu dans l'annexe I). Après incubation de 1 à 5 jours à 30°, les colonies sont inondées avec une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par apparition d'une zone claire autour de la colonie. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun. (Prescot *et al.*, 2003).

II.2.2. 2. Hydrolyse de la caséine de lait

Une culture bactérienne âgée de 24h estensemencée par des points sur milieu gélose au lait. Après 48h d'incubation à 30°C, la présence de cette activité est détectée par un halo clair autour du strie d'ensemencement indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (De VOS *et al.*, 2009).

II.2.2. 3. Hydrolyse de la Chitine

La recherche est effectuée sur milieu gélosé additionné de 10g de Chitine. L'inoculation sur milieu est effectuée en déposant des amas de bactéries à la surface, après incubation de 72h à 30°C la réaction est obtenue. (de la Vega, Barboza-Corona *et al.*, 2006).

Une Réaction positive est traduite par la présence d'un halo blanc autour des colonies Bactérienne.

II.2.2. 4. Recherche de cellulase

La production de cellulase est déterminée selon la méthode décrite par par (Pinky *et al.*, 2012) La gélose M9 (Miller, 1974) (Annexe 1), supplémentée de 10g de cellulose et 1.2g d'extrait de levures, est utilisée pour tester le pouvoir hydrolytique par production de cellulases. Les isolats sont étalés puis incubés pendant 8 jours à 30°C. Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Verma *et al.*, 2007).

II.2.2. 5. Production de lipases

Le milieu décrit par Sierra (1957) a été utilisé pour détecter la production des enzymes lipolytique dans lequel le Tween est utilisé comme substrat lipidique (Sierra, 1957). Le

principe de cette méthode repose sur la précipitation de cristaux du sel de calcium de l'acide gras sous l'influence d'une lipase.

Si la souche possède une activité lipolytique, la précipitation des cristaux sera visible sous forme d'un halo opaque autour des colonies.

II.2.2. 6. Recherche de Phosphatase

La recherche de Phosphatases est effectuée sur milieu PVK par ensemencement en stries centrale sur boîte de pétri, on incube à 30°C pendant 72h. Une réaction positive se traduit par la manifestation d'un halo clair autour des colonies., Nautiyal (2001).

II.2.3. Synthèse de l'acide indole acétique (AIA)

La production d'AIA est déterminé selon la méthode standard . Une colonie isolée est étalée sur gélose Luria Bertani (Annexe1), additionné de : 5mM de L-tryptophane, 0.06% de SDS, et 1% de glycérol. La gélose est recouverte de papier Whatman (80 mm de diamètre), puis incubés à 30°C. Le papier est récupéré, puis traité avec le réactif de Salkowski(Annexe1). (Kaldewey H., 1984)

Les disques de papier filtre sont saturés avec le réactif. Après 10 à 30 min, la production d'AIA et /ou ces analogues se manifeste par la formation d'un halo rose rouge autour des colonies, et pour les souches productrices d'autre types d-indoles la coloration est jaune a jaune brun (Naik et Sakthivel, 2006).

II.2.4. Production de substances volatiles (HCN)

La cyanogénèse a été évaluée sur milieu liquide. Effectuée selon la méthode décrite par Meena et *al.*, (2001), où les isolats bactériens sont cultivés pendant 48h à 30°C sous agitation (180rpm) dans des Erlen Meyer contenant 50ml de King B liquide additionné de 4,4 g/l de Glycine.

Des bandelettes de papier Whatman n° 1 (0.5/10cm) saturées avec une solution de picrate alcaline, sont suspendues verticalement dans ces erlens. Le picrate de sodium présent dans le papier change de couleur en fonction de la production d'HCN (Verma et *al.*, 2007).

II.2.5. Effets des souches sur la croissance mycélienne

En vue de localiser d'éventuelles activités antagonistes *in vitro*, les souches bactériennes issues des opérations citées précédemment de purification et d'identification ont été testées

pour évaluer leurs activités antifongiques vis-à-vis des isolats cryptogamiques de *Verticillium dahliae*.

II.2.5.1. Le test de sélection des souches antagonistes

La sélection est réalisée selon Backer et Cook (1988), sur le milieu PDA (Annexe1).

Cette méthode consiste à déposer un disque mycélien de 5mm de diamètre de l'isolat cryptogamique à étudier au centre d'une boîte de pétri et incubé pendant 24h à 25°C.

Après cette incubation, nous étalons une suspension bactérienne à la périphérie de la boîte d'une façon opposé (de la même souche bactérienne), le tout est incubé à 25°C pendant 5 à 7 jours. Le témoin est préparé de la même sorte à l'exception que la boîte contient le mycélium seulement donc absence de souche bactérienne. La lecture des résultats se fait en comparaison avec la croissance du témoin, après 7 à 15 jours d'incubation à 25°C.

La lecture selon la grandeur des zones d'inhibitions :

- Non antagonistes
- + Présence d'une moyenne activité antagoniste
- + Action antagoniste importante
 - ❖ Seules les souches bactériennes ayant montré une activité antagoniste dans la sélection précédente, sont retenus pour une deuxième confrontation avec les isolats fongiques sur les deux milieux de culture cités précédemment, afin de confirmer leurs activités antagonistes et mesurer les pourcentages d'inhibition.

Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon :

$$I (\%) = (1 - D_n / D_0) \times 100$$

D_n : diamètre en présence de la souche bactérienne.

D₀ : diamètre en absence de la souche bactérienne (témoin).

III. Caractérisation phénotypique et identification des *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp.

III.1. La revivification des souches de *Pseudomonas* spp. Et *Bacillus* sp.

Après incubation à 30°C pendant 24h des 25 souches bactériennes sur milieu GN, nous avons constaté l'apparition de colonies distinctes visible à l'œil nu présentant les critères morphologiques spécifiques du genre *Pseudomonas* et du genre *Bacillus* (figure 5).

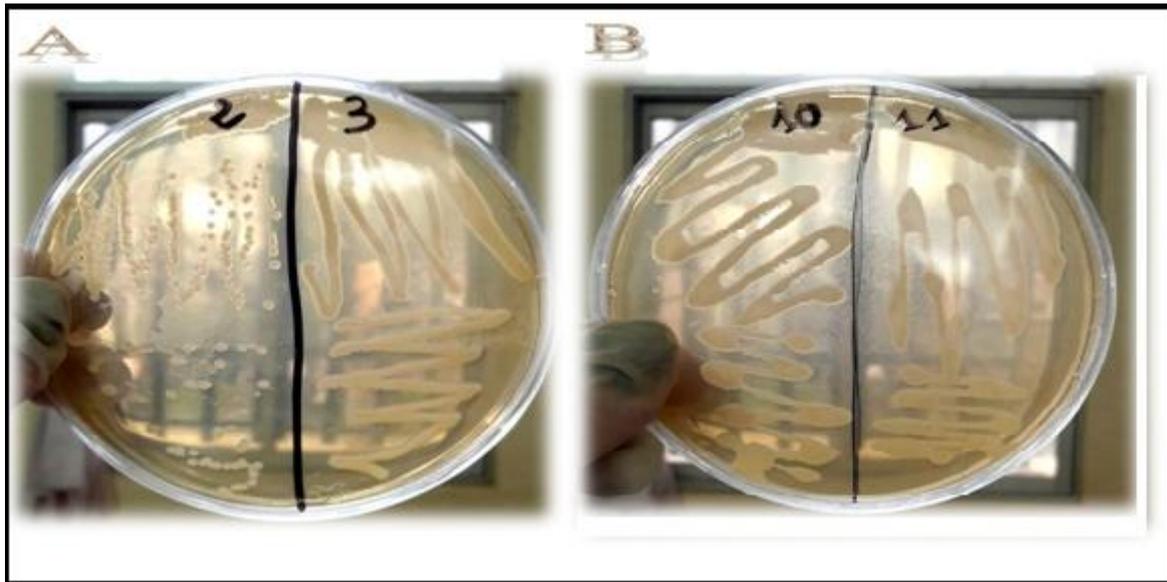


Figure 10 : aspect morphologique des souches de *Bacillus* sp. et de *Pseudomonas* sp.

A : souche 2 et 3 du genre *Bacillus* sp. ; B : souche 11 du genre *Pseudomonas* sp. (Personnel, 2017).

III. 2. Etude morphologique de *Pseudomonas* spp. fluorescents

III.2.1. Etude macroscopique :

L'unique souche de *Pseudomonas* spp. fluorescents est caractérisée par une croissance rapide sur milieu GN, donnant des colonies crème à beige, de forme circulaire, lisse, d'aspect régulier. Les caractéristiques morphologiques de la souche sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 8 : résume l'ensemble des caractères morphologiques.

Caractère macroscopique	Observation
Taille de colonie	0,5 à 1 µm de diamètre sur 1,5 à 5 µm de long
Forme de colonie	Circulaire
Opacité	Opaque
Chromogénèse	Beige à crème
Élévation	Convexe
Aspect de la surface	Lisse
Aspect du contour	Régulier
Consistance	Visqueuse
Odeur	Présence d'odeur typique

III.2.2. Etude microscopique :

L'observation microscopique révèle des bacilles droits ou légèrement incurvés à bouts arrondis. Les cellules se présentent isolées ou groupées par deux. Elles sont asporulées.

Coloration de Gram

Après réalisation de la coloration Gram, la souche bactérienne apparaît avec une couleur rose et de forme bacille, donc ce sont des bacilles à Gram négatifs. Les bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* sont de petits bâtonnets avec une ciliature polaire, présentant un Gram négatif (Prevot, 1977) (Figure 11).



Figure11 : aspect microscopique de *Pseudomonas* spp. fluorescents après coloration de Gram observés sous microscope photonique (Gx100) (Personnel, 2017).

III.2.3. Etude Physiologique et biochimique

✚ Test oxydase

Le test oxydase est basé sur la production d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome c.

L'apparition de la couleur violette foncé sur le disque d'oxydase chez la souche 11 montre une réponse positive, indique qu'il y a eu une oxydation du réactif phénylène diamine pour former un composé coloré en violet.

La recherche de l'enzyme cytochrome c oxydase est considérée comme étant un caractère taxonomique indispensable pour l'identification de groupe fluorescents des *Pseudomonas* (Singleton, 2005) (Figure 12).

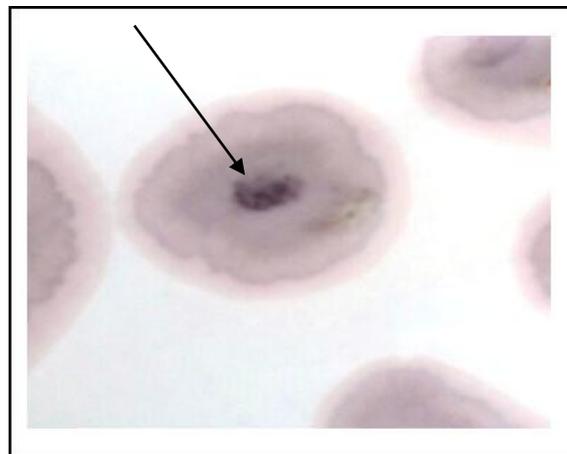


Figure 12 : Résultat positif du test oxydase de la souche 11(Personnel, 2017)

✚ Test de catalase

Le test catalase a pour but de mettre en évidence la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène. L'absence de bulles gazeuses sur la lame chez la souche 11, montre une réponse négative, indique qu'il n'y a pas eu de décomposition du peroxyde d'hydrogène (figure13).

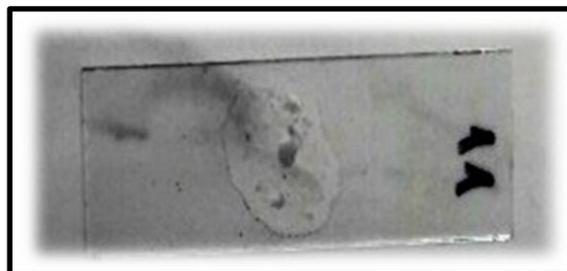


Figure 13 : résultat négatif du test catalase de la souche 11 du genre *Pseudomonas* spp fluorescents (Personnel, 2017).

✚ Résultat de la galerie API20 NE

La souche 11 a subi une identification biochimique par l'utilisation de la galerie API20 NE. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 9 : résultats des galeries API20 NE de la souche de *Pseudomonas fluorescent* spp.

T	N	T	G	A	U	E	G	PN	G	A	M	M	N	M	G	C	A	M	C	P
S	O	R	L	D	R	S	E	PG	L	R	N	A	A	A	N	A	D	L	I	A
	3	P	U	H	E	C	L		U	A	E	N	G	L	T	P	I	T	T	C
ND ₁ R ₂ ⁴	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-

III. 3. Etude morphologique de *Bacillus* sp.

III.3.1. Etude macroscopique



Figure 14 : Aspect morphologique de quelques bactéries appartenant au groupe *Bacillus* sp sur milieu GN (Personnel, 2017)

Les souches de *Bacillus* sp. Sont caractérisées par une croissance rapide sur milieu GN, donnant des colonies de couleur crème à blanchâtres.

Les caractéristiques morphologiques des souches de *Bacillus* sp. Sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 10: résume l'ensemble des caractères morphologiques pour toutes les souches.

Caractère macroscopique	Observation
Taille de colonie	5 µm de long et 1 µm de large
Forme de colonie	Circulaire
Opacité	Opaque
Chromogénèse	Blanche, Beige à crème
Élévation	Plates
Aspect de la surface	Lisse
Aspect du contour	Irrégulier
Consistance	Visqueuse ou non visqueuse
Odeur	Présence d'odeur

III.3.2. Etude microscopique :

L'observation microscopique révèle des bacilles strictement droite, dont les cellules se présentent isolées ou groupées, qui sont dans la plupart des cas sporulantes.

✚ Coloration Gram

Après réalisation de la coloration Gram, la paroi bactérienne des souches testées apparaît de couleur bleu violacée sous forme de bacilles droits, donc ce sont des bacilles à Gram positif. Les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont de grands bâtonnets avec une ciliature péritriche, présentant un Gram positif (Prevot, 1977) (figure15).

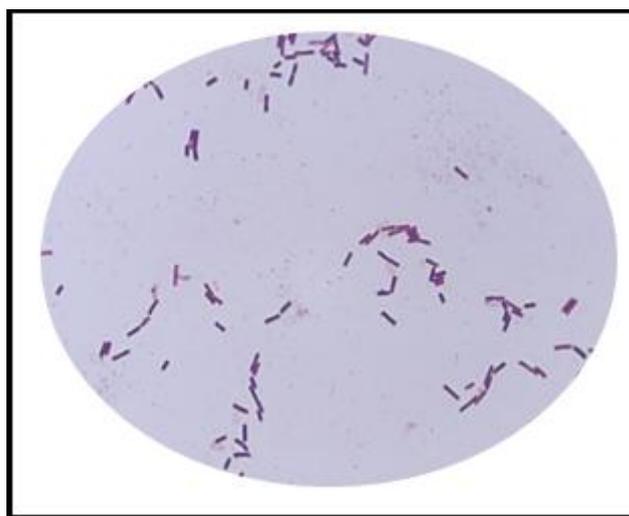


Figure 15 : aspect microscopique de *Bacillus* sp. après coloration de Gram observés sous microscope photonique (GX100) (Personnel, 2017)

✚ Coloration de la spore

La coloration de la spore bactérienne au vert de Malachite a révélé la présence de spores chez certaines souches de *Bacillus* sp (Fig. 16b), pour certaines nous avons même observé la spore après coloration de Gram (Fig. 16a).

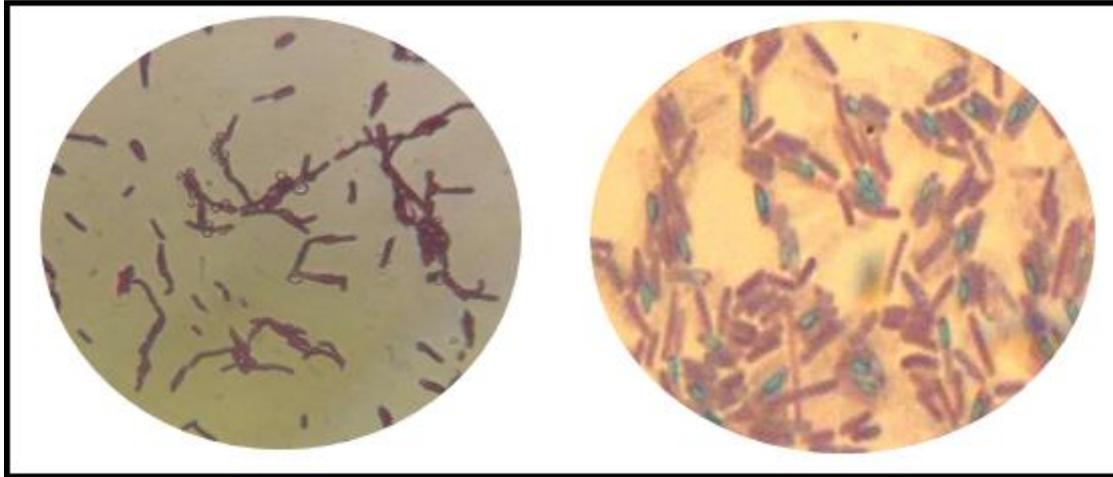


Figure 16 : aspect des spores chez une des souches de *Bacillus* sp. sous microscope photonique (GX100) a : après coloration de Gram ; b : après coloration au vert de Malachite (Personnel, 2017).

III.3.3. Etude physiologique et biochimique

✚ Test oxydase

Le test oxydase est basé sur la production d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C. l'apparition de la couleur violette foncé sur le disque d'oxydase chez les souches 1,14 ,13, montre une réponse positive, indique qu'il y a eu oxydation du réactif phénylène diamine pour former un composé coloré en violet (Singleton , 2005). Par contre, l'absence de la coloration en violet chez les souches 2 et 15, indique qu'il n'y a pas eu oxydation du réactif (figure 17).

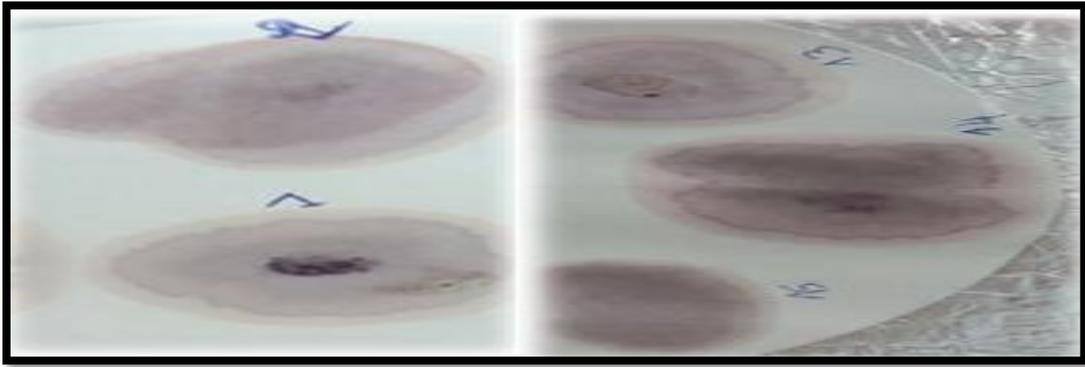


Figure 17: le résultat de test oxydase ; positif(1, 13 et 14) et négatif (2 et 15) chez différentes souches de *Bacillus* sp. (Personnel,2017)

✚ Test de catalase

Le test catalase a pour but de mettre en évidence la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène. L'apparition de bulles gazeuses (effervescence) sur la lame chez les souches 1, 13, 15, 16,17 et 24 montrent une réponse positive, indique qu'il y a eu décomposition du peroxyde d'hydrogène, Par contre l'absence de l'effervescence chez la souche 25, indique qu'il n'y a pas eu décomposition (figure 18).

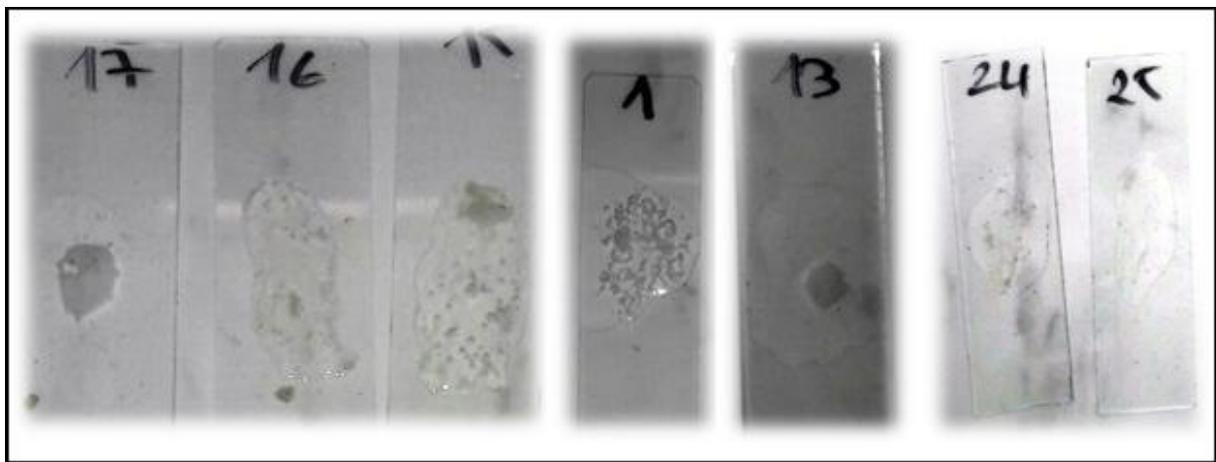


Figure 18 : résultats du test catalase chez certaines souches de *Bacillus* sp. (Personnel, 2017)

✚ L'utilisation des galeries API 20 NE : Les 11 souches ont subi une identification biochimique par l'utilisation des galeries API 20 NE. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

✚ **Tableau 11** : résultats des galeries Api 20 NE des souches de *Bacillus* sp.

T	S	1 OD ₂ ER ₁	2 OD ₁ ER ₁	3 OD ₂ R ₂	4 PD ₁ ER ₂	5 OD ₁ ER	6 OD ₃ ER ₁	7 OD ₂ R ₁	8 ND ₂ ER ₁	9 ND ₃ R ₁	10 ND ₃ R ₂	13 OD ₁ ER ₂
1	NO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	TRP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	ADH	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
5	URE	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
6	ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	ONP G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
9	GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	ARA	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
11	MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
12	MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	NAG	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
14	MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15	GNT	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
16	CAP	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
17	ADI	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
18	MLT	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
19	CIT	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
20	PAC	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-

(+) : réponse positive, (-) : réponse négative.

III.3. Production des enzymes

III.3.1. Mise en évidence de l'activité hydrolytique extracellulaire

Un dépistage des activités protéolytique (caséinases et gélatinases), glycolytiques (amylolytiques, cellulases et chitinases), lipolytiques (lipases) a été effectué.

Le profil de l'activité hydrolytique extracellulaire a montré la capacité des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et des *Bacillus* sp. (Isolées à partir du sol rhizosphérique) à hydrolyser l'amidon, la gélatine, la caséine, le tween, la cellulose ainsi que la chitine.

III.3.1.1. Détermination de l'activité amylolytique

L'hydrolyse de l'amidon est observée quand on ajoute la solution de Lugol à des cultures bactériennes jeunes cultivées sur le milieu de culture solide à base d'amidon, par l'apparition d'une zone claire autour de la colonie. La mise en évidence de l'activité amylolytique de la souche de *Pseudomonas* spp. fluorescents est un critère de classification important, qui permet à ces dernières de coloniser les rhizosphères et de s'adapter aux différents milieux (Lemanceau, 1992).

L'activité hydrolytique amylolytique a été observée chez la souche 11 de *Pseudomonas* spp. fluorescents (figure 19), et chez la totalité des souches de *Bacillus* sp (figure 20).

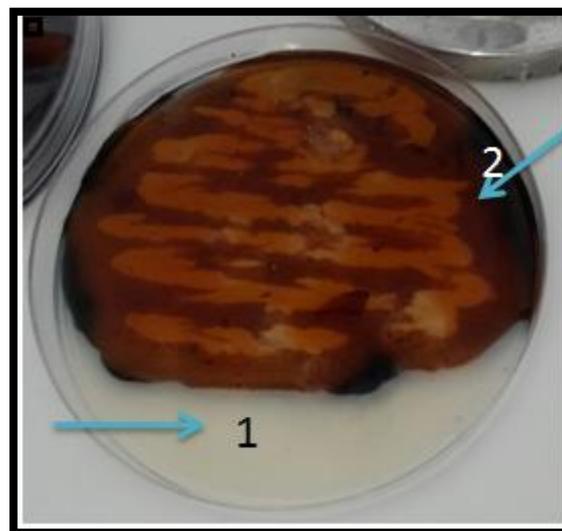


Figure 19 : activité hydrolytique extracellulaire (hydrolyse de l'amidon) de la souche 11 de *Pseudomonas* spp. fluorescents. 1 : dégradation complète de l'amidon traduite par la disparition de la couleur violette après addition de Lugol ; 2 : début de dégradation (personnel, 2017)

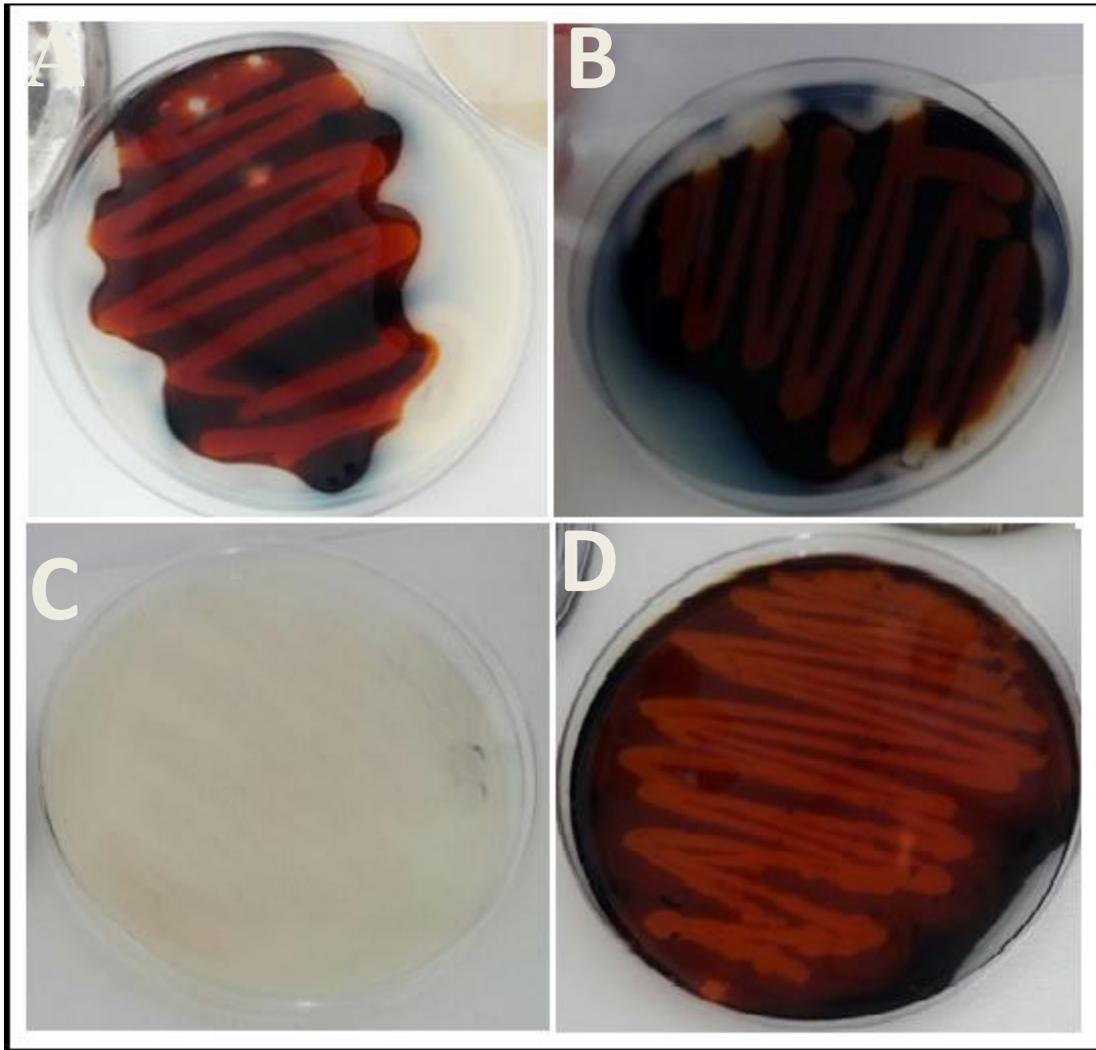


Figure 20 : hydrolyse de l'amidon de 4 souches de *Bacillus* sp. Étudiées (Personnel, 2017)

A : Dégradation partielle de l'amidon ; B : Dégradation moyenne de l'amidon ;

C : Dégradation complète de l'amidon ; D : début de dégradation de l'amidon

III.3.1.2. Hydrolyse de la caséine

La dégradation de la caséine par les souches étudiées est révélée par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

La production des caséinases a été retrouvée chez la souche 11 de *Pseudomonas* spp. fluorescents (figure 21), et chez les souches 13, 3, 5, 8, 10, 7, 1, 2 de *Bacillus* sp. A l'exception de la souche 4, 6, 9 qui ont montrés une réponse négative envers la dégradation de la caséine (figure 22).

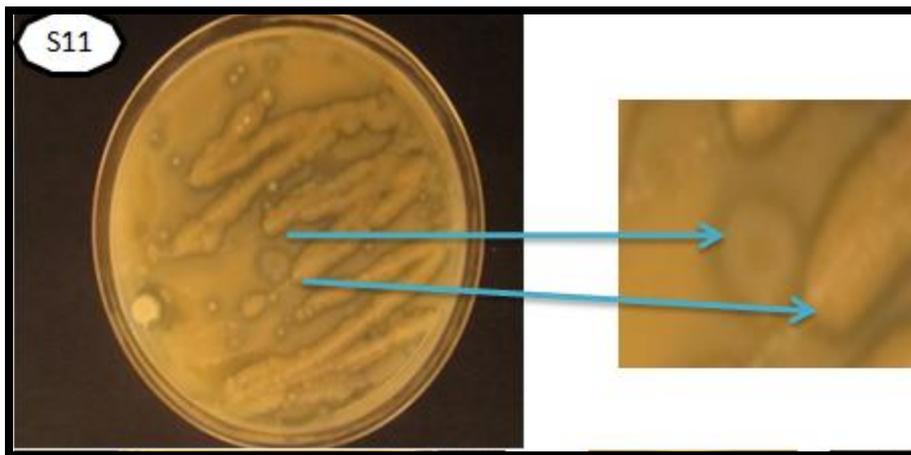


Figure 21 : activité caséinase de la souche 11 de *Pseudomonas* spp.fluorescents (Personnel, 2017)

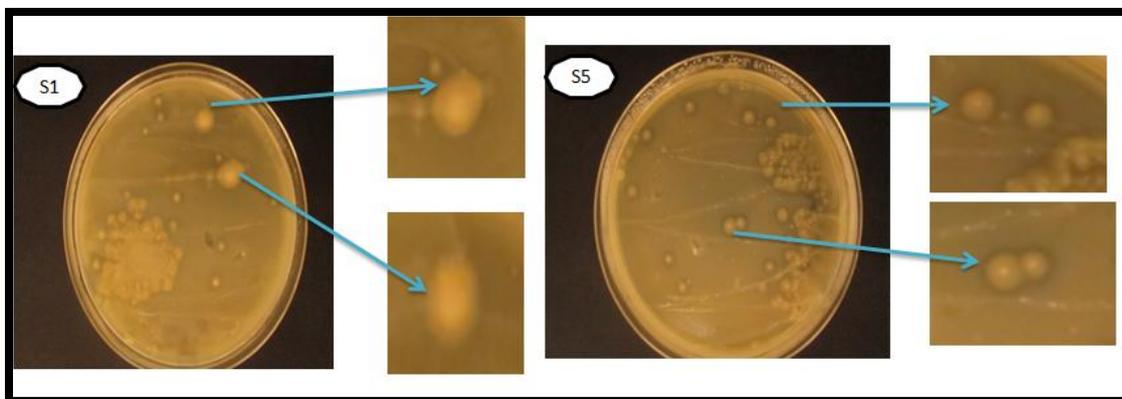


Figure 22 : Résultats positifs de l'activité caséinase de certaines souches de *Bacillus* sp. (Personnel, 2017).

III.3.1.3. Détermination de l'activité lipolytique

Les colonies des microorganismes producteurs de lipases apparaissent entourées d'un halo opaque accompagné par la formation de cristaux de sel de calcium.

D'après les résultats obtenus, nous avons remarqué que l'unique souche de *Pseudomonas* spp.fluorescents testée a montré un pouvoir de production de lipase (figure 23). Cette activité est considérée comme faible si on la compare avec les souches de *Bacillus* sp (figure 24).

Sur le même milieu une activité lipolytique importante est observée chez les souches 7, 10, 1, 5, 4, 8 et 9 de *Bacillus* sp. , alors qu'une activité moyenne est enregistrée chez les souches 6, 2, 3, 1 et 13.

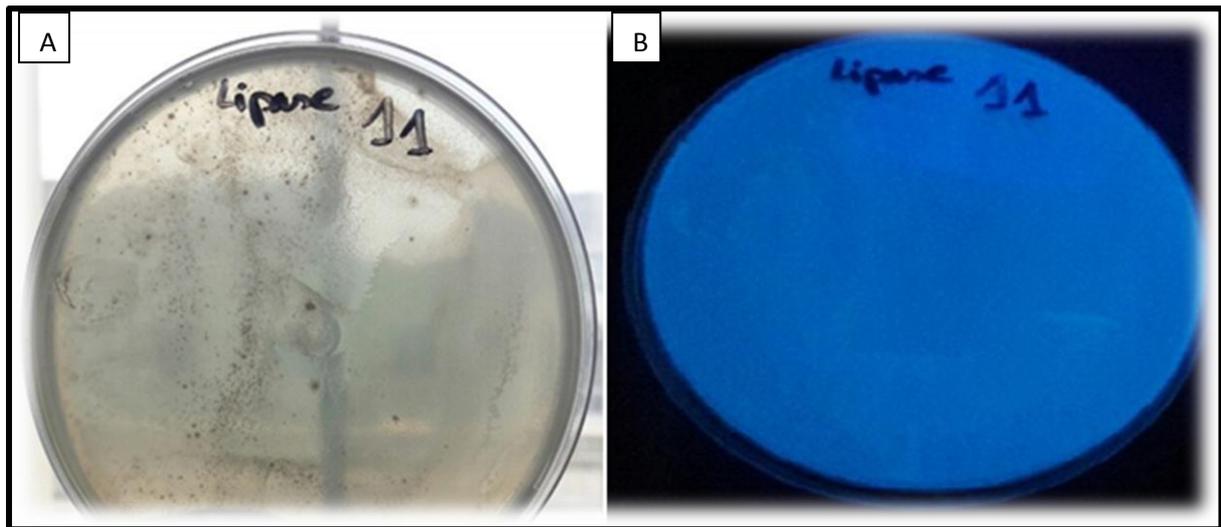


Figure 23 : activité lipolytique de la souche 11 de *Pseudomonas* spp. Fluorescents (A : observée à l'œil nu ; B : observée sous lumière UV à 350 nm) (Personnel, 2017).

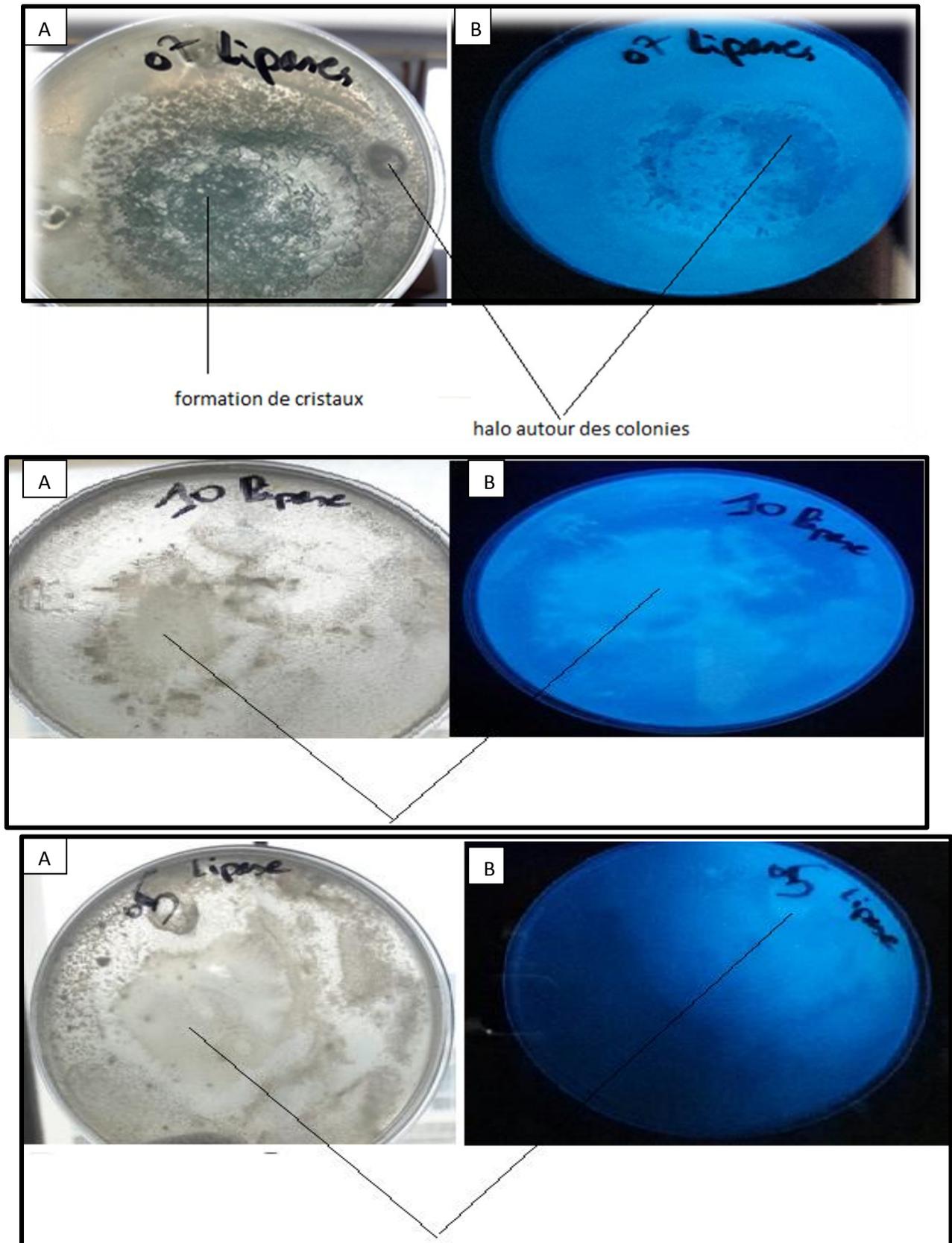


Figure 24 : activité lipolytique observée chez certaines souches de *Bacillus* sp. (A : observée à l'œil nu ; B : observée sous lumière UV à 350 nm) (Personnel, 2017).

III.3.1.4. Détermination de l'activité cellulase

Le pouvoir hydrolytique des souches est révélé également par la production de cellulases.

Le développement d'un halo clair autour des colonies indique une réaction positive (Verma et *al.*, 2007). Les résultats de la production de cellulases par les souches sont présentés dans la figure 25 pour la souche de *Pseudomonas* spp. fluorescents et la figure 26 pour les souches de *Bacillus* sp.

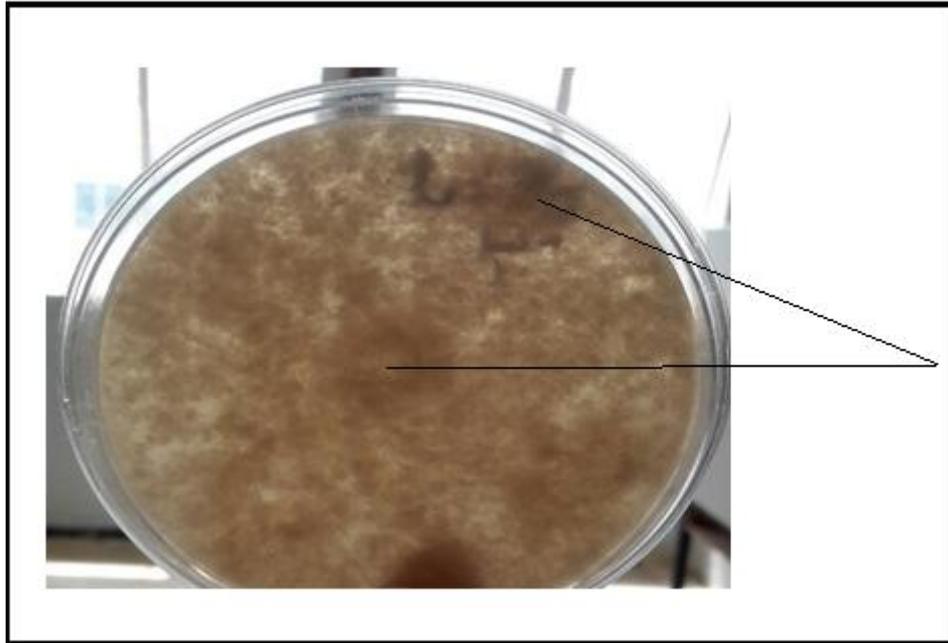


Figure 25 : activité cellulosique de la souche 11 de *Pseudomonas* spp.fluorescents, les flèches indique les zones de lyse de la cellulose (Personnel,2017).

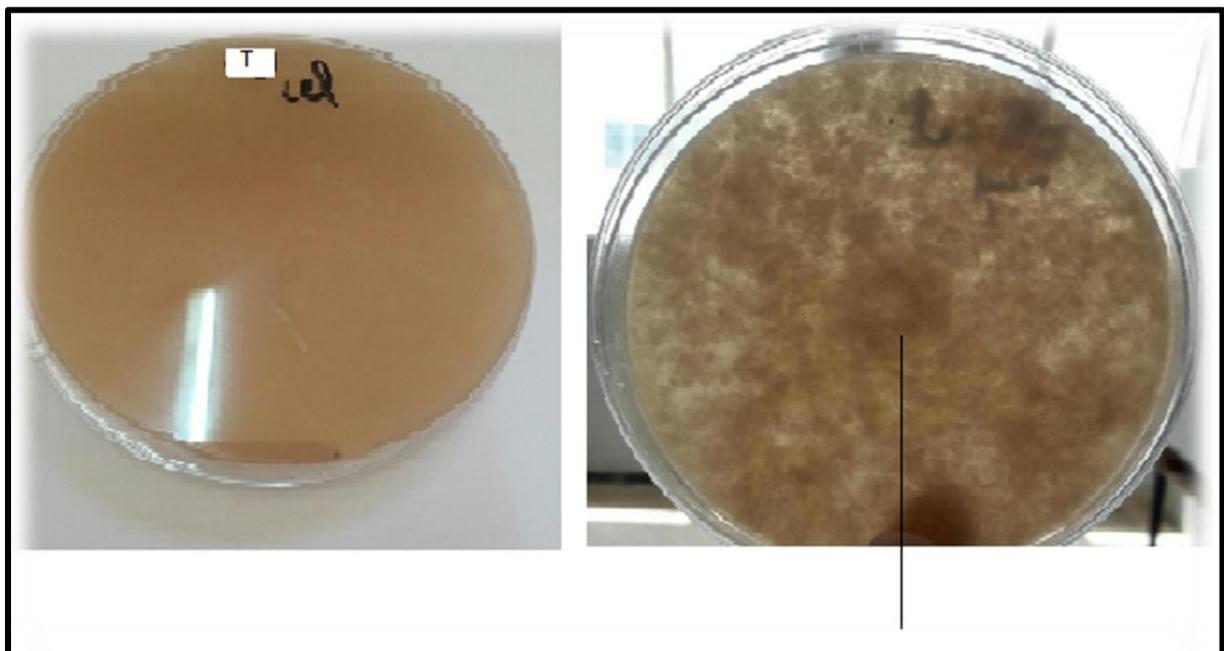


Figure 26 : activité cellulosique de certaines souches de *Bacillus* sp. les flèches indique les zones de lyse de la cellulose (Personnel,2017)

III.3.1.5. Détermination de l'activité chitinolytique:

Ce sont des enzymes chitinolytiques impliquées dans le processus de dégradation de la chitine, l'apparition de plages de lyse autour des colonies indique une réaction positive.

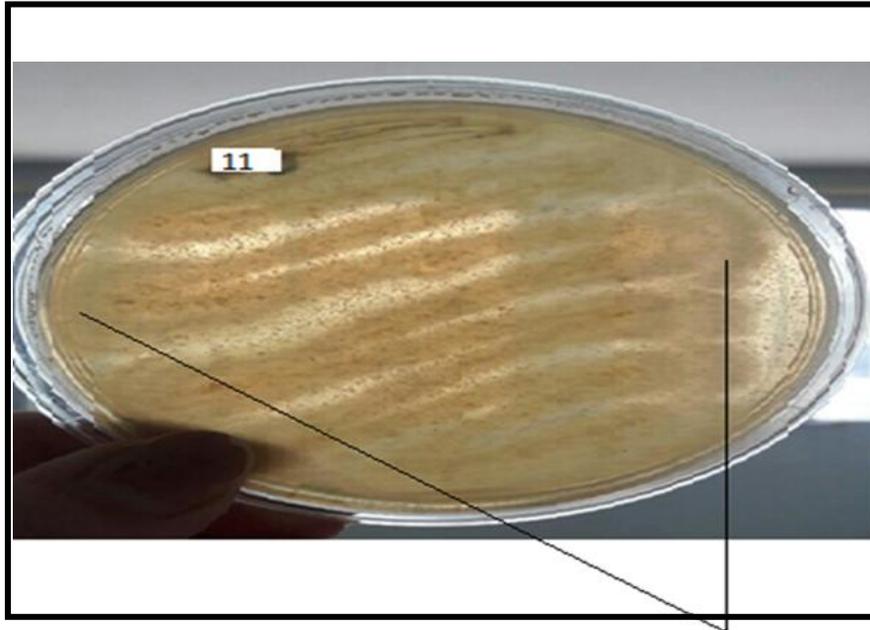


Figure 27 : Activité chitinolytique chez la souche de *Pseudomonas* spp.fluorescent avec apparition de plage de lyse.

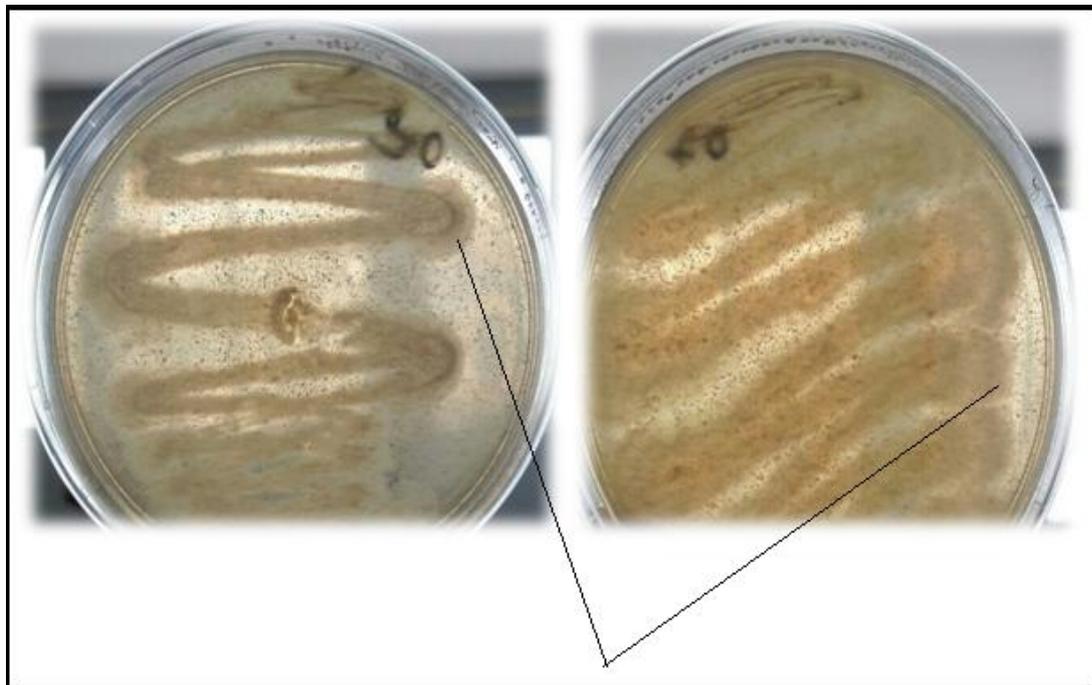


Figure 28 : Plages de lyse montrant une activité Chitinoytique chez *Bacillus* sp. (Personnel, 2017).

III.3.1.6. Détermination de l'activité phosphatase

Il a été observé qu'à l'exception de la souche 11, la totalité des souches restantes ne présentent aucune activité de dégradation des phosphates (Fig. 29).

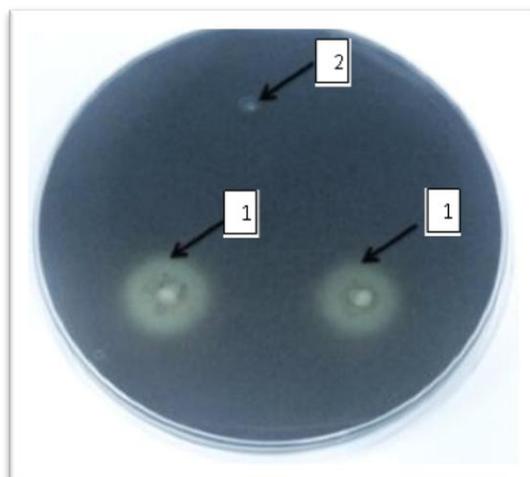


Figure 29 : Présence d'activité phosphatase chez la souche 11 de *Pseudomonas* spp. fluorescents. Les flèches ; 1 : montre un halo clair autour de la colonie, ce qui indique la production de phosphatase. 2 : un témoin négatif (non solubilisation de phosphore)

Le Tableau ci-dessous récapitule les différentes activités enzymatiques enregistrées chez les souches de *Pseudomonas* sp et *Bacillus* sp étudiées.

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des différentes activités enzymatiques observées chez les souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp.

E \ S	Amylase	Caséinase	Lipase	Cellulase	Chitinase	Phosphatase
01	+	+	+	-	+	-
02	+	-	+	-	+	-
03	+	+	+	-	+	-
04	+	-	+	-	+	-
05	+	+	+	-	+	-
06	+	-	+	-	+	-
07	+	+	+	+	+	-
08	+	+	+	+	+	-
09	+	-	+	+	-	-
10	+	+	+	+	-	-
11	+	+	+	-	-	+
12	+	+	+	+	+	-
13	+	+	+	+	-	-

+ : présence d'activité enzymatique ; - : Absence d'activité enzymatique

Malgré la non uniformité des activités et à des degrés variables, la plupart des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et de *Bacillus* sp. ont montré leurs pouvoirs d'utilisation des différents substrats testés. Ceci pourrait suggérer la présence de nombreux enzymes chez la même souche, dont l'induction de la synthèse de ces enzymes est influencée en grande partie par la composition du milieu de culture utilisé, qui est démontré pour la plupart des isolats.

III.4. Détermination de la Synthèse de l'acide indole acétique(AIA)

La production qualitative de l'acide indole acétique et/ou de ses composés apparentés a été observée chez l'isolat de *Pseudomonas* sp. (Figure 29). Cette souche productrice de ce métabolite a développé une coloration rose à la suite de l'addition du réactif révélateur (de Salkowski) après 20mn d'incubation. Tandis que pour les souches de *Bacillus* sp. nous n'avons remarqué aucun changement de couleur sur ce dernier. Le résultat est donc négatif.

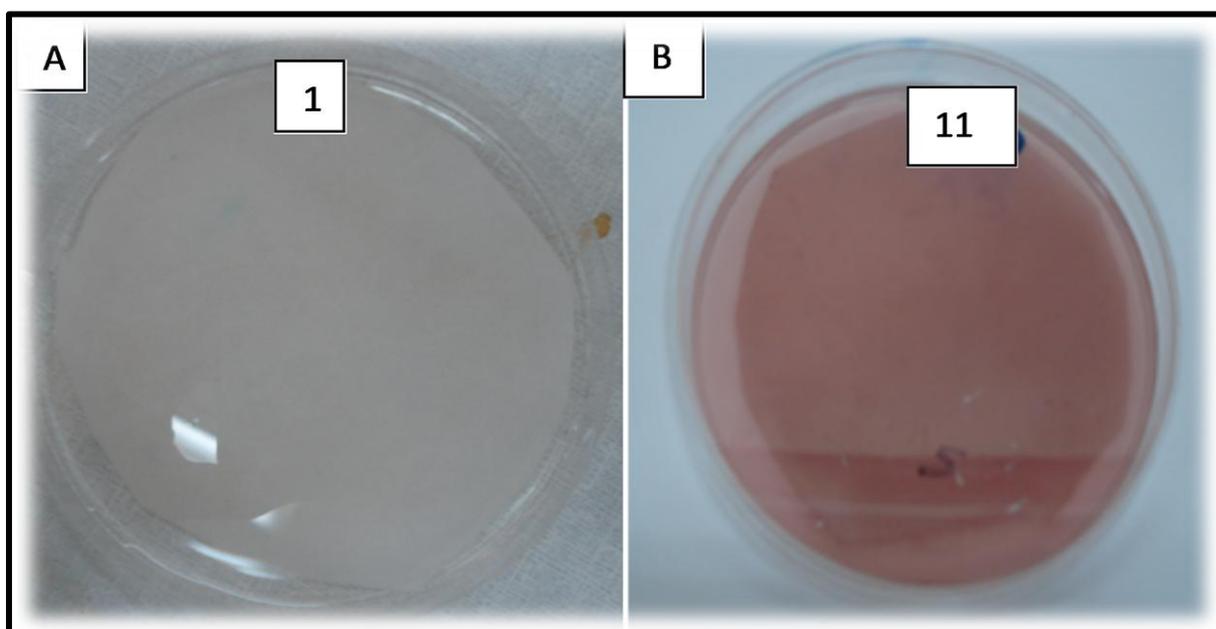


Figure 30 : Résultats du test de production de l'AIA. A : négatif pour toutes les souches de *Bacillus* sp. (Exemple souche 1) ; B : positif pour la souche 11 de *Pseudomonas* sp. (Personnel, 2017)

III.5. Détermination de la Production de substances volatiles (HCN)

Ayant saturé les bandelettes de papiers whatman avec la solution de Picrate alcaline et les avoir suspendus au-dessus des Erlen Meyer contenant les suspensions bactériennes, aucun changement de couleur ne nous est apparu, il n'y a donc pas de production d'HCN et le résultat est négatif.

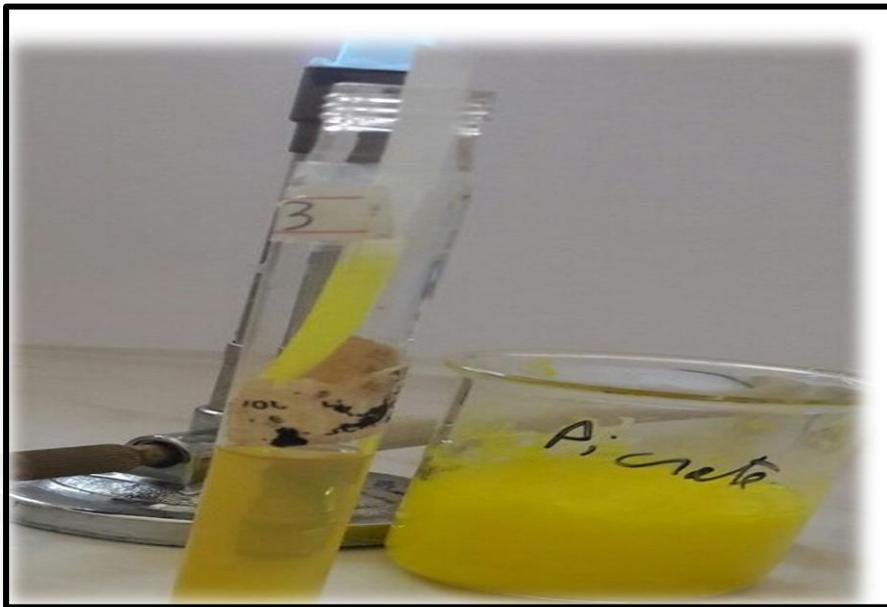


Figure 31 : Absence de changement de couleur dans les bandelettes de papier Whatman ceci indique un résultat négatif (personnel, 2017).

III. 6. Résultats de l'activité antagoniste des souches bactériennes *in vitro*

Le pouvoir antagoniste des isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents et de *Bacillus* sp a été testé par l'inhibition de la croissance mycélienne des deux isolats cryptogamiques de *V. dahliae* à savoir la souche V1 et la souche V2.

Les résultats montrent que 91,67% des souches bactériennes identifiées comme étant des *Pseudomonas* spp. fluorescent et *Bacillus* sp, ont inhibé la croissance mycélienne des deux isolats de *V. dahliae* à savoir le V1 et le V2 (Fig. 31, 32).

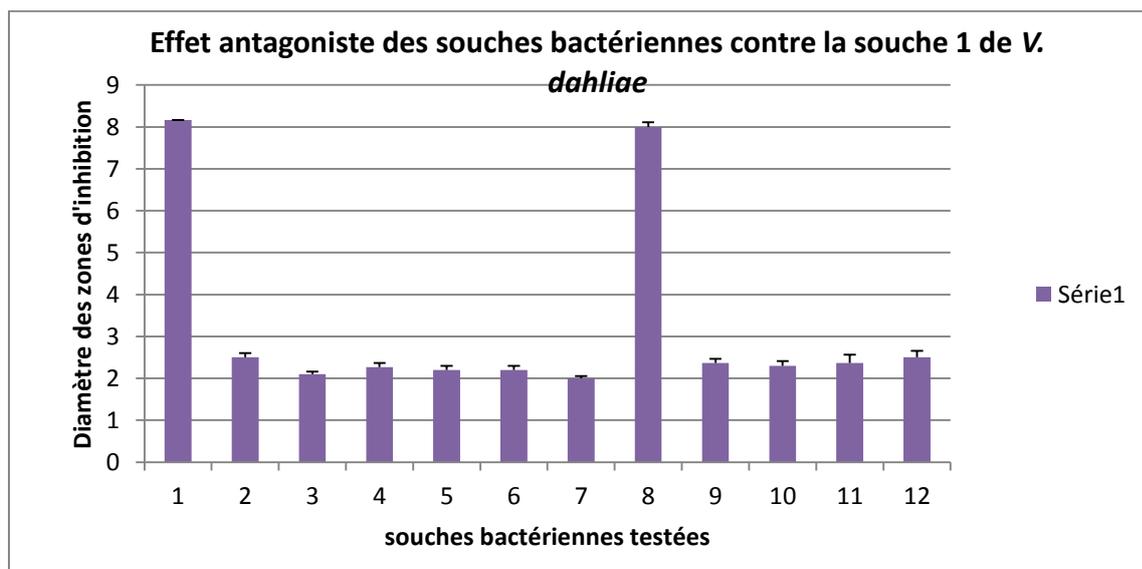


Figure 32 : Histogramme représentant l'effet antagoniste des souches bactériennes contre la souche 1 de *V.dahliae*.

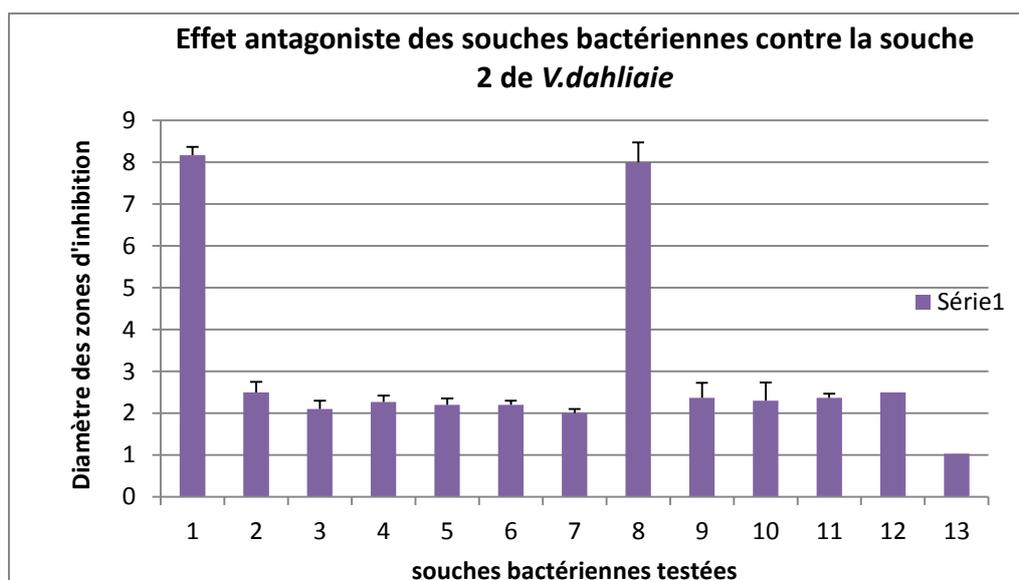


Figure 33 : Histogramme représentant l'effet antagoniste des souches bactériennes contre la souche 2 de *V.dahliaie*.

L'intensité d'inhibition varie selon la souche fongique testée et la souche bactérienne utilisée. Les souches bactériennes S06, S01, S07, S12 ont données les meilleurs résultats, avec des pourcentages d'inhibition 64%, 47%, et 40% respectivement. L'activité antagoniste la plus importante a été observée chez la souche bactérienne S06 contre la souche fongique V1 de *V. dahliaie* appartenant au pathotype non défoliant (voir tableau 12).

Tableau 12 : Inhibition de la croissance mycélienne de *Verticillium dahliaie* par les isolats de *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp. testées sur milieu PDA.

Pourcentages d'inhibition		
Souches bactériennes	V1	V2
01	47%(±0)	34%(±0.2)
02	30%(±0.1)	46%(±0,251661148)
03	34%(±0,05)	40%(±0.2)
04	30%(±0.1)	43%(±0,152752523)
05	36%(±0.1)	43%(±0,152752523)
06	64%(±0.1)	47%(±0.1)
07	40%(±0,057735027)	42%(±0.1)
08	0%(±0,115470054)	39%(±0,472581563)
09	30%(±0.1)	40%(±0,360555128)
10	32%(±0,115470054)	39%(±0,435889894)
11	34.7%(±0.2)	36%(±0.1)
12	40%(±0,152752523)	72%(±0.1)

III.7. Discussions

Les espèces de *Pseudomonas* spp et *Bacillus* sp sont fréquemment isolées de différentes niches écologiques. Certaines peuvent agir comme des pathogènes des animaux des plantes ou des champignons, alors que d'autres sont des bactéries bénéfiques vivant librement dans le sol (Achouak et al., 2000).

Les rhizobactéries ou PGPR favorisant la croissance des plantes qui sont un groupe de microorganismes diversifié présentant deux caractéristiques principales: la capacité de coloniser la rhizosphère d'une part et d'autre part une influence positive sur la croissance de la plante à laquelle elles sont associées (Loper et Gross, 2007).

La compréhension des interactions de ces rhizobactéries avec les plantes et les autres communautés microbiennes a beaucoup évolué durant les deux dernières décennies, en partie grâce aux approches moléculaires (Loper et Gross, 2007).

A partir des résultats obtenus nous avons constaté que nos souches bactériennes appartenant au groupe *Pseudomonas* spp fluorescent et *Bacillus* sp isolées à partir du sol de (nèfle, orge et pomme de terre), ont montré une dégradation de plusieurs substrats tels que les lipides, les protéines et les sucres complexes (amidon, cellulose et chitine) par la production d'une gamme très diversifiée d'enzymes extracellulaires tels que les lipases, les protéases, les amylases, les cellulases et les chitinases. Ces souches peuvent coloniser rapidement et efficacement les rhizosphères (Lemanceau, 1992).

Les cellulases sont des enzymes importants qui sont impliquées dans le contrôle des champignons et des oomycètes, via leur pouvoir de dégradation des composés de la paroi cellulaire tels que la chitine et les enzymes protéolytiques (Schrothand and Handcock, 1981)

Les *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp. sont capables d'hydrolyser l'amidon en maltodextrines résultantes, formant des stries entourées d'une coloration brune plus ou moins claire. Ces bactéries produisent des cellulases en grande quantité.

Nos résultats confirment aussi que certaines souches de *Pseudomonas* spp et *Bacillus* ont montré d'important niveaux de production de lipase sur le milieu Tween, Ceci est en accord avec les travaux d'Iftikhar et al., (2002) qui ont montré que le tween 40 peut être considéré comme une meilleure source de carbone.

La chitinase est une enzyme qui dégrade la chitine qui est une composante de l'exosquelette des insectes ainsi qu'une composante importante de la paroi des champignons. La lyse des parois cellulaires par les enzymes dégradatives excrétées par ces bactéries est une fonction bien connue de mycoparasitisme. La Chitinase, la β -1,3 glucanase et la cellulase sont des enzymes importantes spécialisées dans le contrôle fongique, par leur activité dégradative

des composés des parois cellulaires tels que la chitine, le β 1-6 glucane et les ponts glucosidiques (Schroth et Hancock, 1981; Chet, 1987; Lorito *et al.*, 1996).

Chez l'insecte, la chitinase peut agir en symbiose avec les toxines de *B. thuringiensis* afin de faciliter leur passage à travers la membrane péritrophique de l'intestin de l'insecte (Huber, Cabib *et al.*, 1991; Sampson et Gooday, 1998). La chitinase de *B. thuringiensis* peut aussi avoir une action lytique sur les parois cellulaires de champignons phytopathogènes protégeant ainsi les plantes contre les maladies (de la Vega, Barboza-Corona *et al.*, 2006). Cette nouvelle application peut être intéressante pour le milieu de l'agriculture tout particulièrement pour la protection des récoltes.

Le phosphore, est le second macronutriment requis pour la croissance des plantes après l'azote. Et même dans des sols qui en sont riches, le phosphore se trouve sous une forme insoluble: oxydes de fer et d'aluminium dans les sols acides, et oxydes de calcium dans les sols basiques, et seulement une faible proportion (0.1%) est assimilable par les plantes (Stevenson et Cole, 1999). En plus les $\frac{3}{4}$ du phosphore apporté par les fertilisants appliqués au sol précipitent en des formes insolubles, augmentant ainsi le besoin des cultures en cet élément (Goldstein, 1986). Les bactéries solubilisant le phosphore secrètent des acides organiques et des phosphatases, qui convertissent les formes insolubles de phosphates en ions de phosphates soluble monobasique (H_2PO_4^-) et dibasique (HPO_4^-). Ce phénomène est attribué à la solubilisation minérale du phosphate. La souche 11 de *Pseudomonas* sp. fluorescents solubilise le phosphate, mais cette solubilisation n'est pas due à une production d'acides organiques, mais plutôt à une production d'enzyme.

L'efficacité des isolats de *Pseudomonas spp* et *Bacillus sp* dans la lutte biologique repose sur la convergence d'une multitude de propriétés physiologiques, métaboliques et écologiques. Durant notre travail, il en est ressorti des isolats présentant des caractéristiques qui en font des candidats potentiels dans la lutte biologique. En effet, de nombreux isolats sont capables de synthétiser une multitude de métabolites secondaires reconnus comme importants dans le biocontrôle (Enzymes). Ces isolats se caractérisent par leur capacité protectrice en présence d'agents pathogènes telluriques (Kloepper, 1983)

La production d'enzymes hydrolytiques a été décrite chez de nombreuses bactéries impliquées dans le biocontrôle (Friedlender *et al.*, 1993 ; Viswanathan et Samiyappan, 2001).

La production de métabolites secondaires, impliqués dans l'antagonisme microbien et sous l'effet du milieu de culture (Loper et Schroth 1981 ; Buyer et Leong, 1986). L'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des espèces des isolats testés, mais aussi de la composition du milieu de culture. En effet Haas et Keel (2003), avaient rapporté que la

production de ces composés était hautement influencée par la disponibilité qualitative et quantitative des nutriments.

Les rhizobactéries, en plus de leurs activités protectrices contre les agents phytopathogènes, présentent d'autres effets bénéfiques tels que la promotion de la croissance des plantes (PGPR), par la production de certaines phytohormones telles l'acide indole acétique (AIA).

La synthèse d'AIA est largement réponde chez les *Pseudomonas* sp. fluorescents (Forlani *et al.*, 1995; Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). Nos observations sont en accord avec celles de Naik et Sakthivel (2006), qui avaient suggéré l'induction de la production d'AIA en phase stationnaire de croissance, probablement due à l'induction d'enzymes clé impliquées dans la biosynthèse d'AIA (Oberhansli *et al.*, 1991; Garcia de Salmone *et al.*, 2001).

L'utilisation des microorganismes bénéfiques pour la gestion des maladies liés au sol ont attiré l'attention des scientifiques agronomes durant ces dernières années.

Les bactéries antagonistes emploient différents mécanismes d'antagonismes à savoir les antibiotiques, la production des sidérophores, la sécrétions de divers enzymes, la synthèse d'hormones et l'induction d'une résistance chez les plantes (Thomashow et Weller 1990 ; Piersonet Weller ;Amer et Utkhede 2000 ;Manjula et *al.*,2000 ;Collins et Jacobson 2000;Jataraf et *al.*,2004;Jorjani et *al.*,2011).

Les bactéries antagonistes contrôlent et réduisent efficacement le pouvoir pathogène de plusieurs champignons phytopathogènes tel que le *V.dahliae*. Ceci a été démontré dans diverses études menées précédemment ((Thomashow et Weller 1990 ; Piersonet Weller ;Amer et Utkhede 2000 ;Manjula et *al.*,2000 ;Collins et Jacobson 2000;Jataraf et *al.*,2004;Jorjani et *al.*,2011).

Pseudomonas fluorescens s'est avérée être plus efficace que *Bacillus* en raison des différents mécanismes d'action citant la production des antibiotiques et sidérophores, la synthèse d'hormones et d'enzymes extracellulaires....etc. toutefois, *Bacillus* a présenté également des activités intéressantes due à la synthèse de certains métabolites secondaires tels que la production d'antibiotiques et d'enzymes (Chen et *al.*, 2000; Bharathi et *al.* 2004).

Conclusion

Le contrôle biologique contre les maladies dues à des pathogènes du sol, par l'introduction de microorganismes bénéfiques dans la rhizosphère a été proposé comme une alternative à la lutte chimique et particulièrement par l'utilisation des *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp qui ont fait l'objet d'exploration suppressives des maladies des cultures par antagonisme direct entre bactéries et phytopathogènes.

Notre travail est porté sur la ré identification des souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp. la mise en évidence de la synthèse de leurs métabolites secondaires tels que : les enzymes, l'acide indole acétique (AIA), ainsi que la caractérisation de leurs molécules bioactives isolées à partir du sol rhizosphérique de trois plantes cultivées (Nèfle, Orge et pomme de terre) dans la région de Alliliguia, Wilaya de Boumerdes.

Les tests d'identification macroscopique et microscopique tels que la coloration de Gram, le test oxydase, la catalase et la coloration sporale nous ont permis de sélectionner une seule souche présentant des caractéristiques identiques à celles du groupe des *Pseudomonas* spp. fluorescent ainsi que 24 souches présentant des caractéristiques identiques à celle du groupe de *Bacillus* sp.

L'étude des différentes enzymes (Amylase, cellulase, chitinase, caséinase, lipase, phosphatase) et la production d'acide indole acétique (AIA) montrent pour la majorité des souches une bonne production, donc ces souches peuvent être efficaces et jouent un rôle dans l'antagonisme et la bio stimulation végétale.

Les essais de lutte biologique à l'aide de ces souches bactérienne ont montré qu'il était possible de limiter l'incidence du *V.dahliae*, bien que le niveau de protection ne soit pas assez important. Néanmoins, l'utilisation de ce traitement biologique permet de maintenir la maladie à un seuil acceptable.

Les essais effectués in vitro nous ont permis de mettre en évidence des effets antagonistes de quelques souches bactériennes. Ces effets antagonistes non négligeables pourraient s'ajouter aux autres méthodes de lutte.

Les tests que nous avons développés peuvent servir de base à la mise en évidence de propriétés antibiotiques des *Bacillus* et *Pseudomonas*.

Conclusion

La mise au point d'autres tests permettra de révéler d'autres aspects de l'activité antagoniste des souches bactériennes et de rechercher des espèces plus efficaces afin de les utiliser dans la lutte contre les maladies d'origine tellurique.

En effet, ces isolats pourraient trouver leur place dans les applications biotechnologiques visant une amélioration des rendements et la préservation de l'environnement pour un développement durable. de nombreux travaux ont mis en évidence des souches modèles, toutefois il faut garantir la stabilité et la reproductibilité des effets bénéfiques de ces rhizobactéries à l'échelle de pratiques agronomiques.

Perspectives

- Effectuer une identification plus poussée et fiable par des moyens moléculaires tels que le séquençage complet ou partiel pour mieux caractériser les isolats les plus actifs.
- l'introduction de ces souches de *Pseudomonas* spp. fluorescents et *Bacillus* sp comme agent de biocontrôle dans de nouvelles rhizosphères à grande échelle.
- La recherche d'autres métabolites secondaires à l'origine de ces effets bénéfiques.
- L'antagonisme doit posséder certaines propriétés :
 - Aptitude à la colonisation de la rhizosphère et à la conservation dans les sols.
 - Propriétés technologiques, multiplication de l'antagoniste, formulation simple à l'emploi.
 - Propriétés toxicologiques, indemne de pathogénie pour l'homme, les animaux et les végétaux traités ; pas de risque lors de la fabrication.
 - Propriétés agronomiques, l'apport doit pouvoir s'inscrire dans un itinéraire technique, souvent les meilleures stratégies visent à associer la lutte biologique à une lutte chimique ou à une amélioration des plantes.

Annexe

Annexe : Les milieux de culture

<p>King B (KB) Peptone .20g Glycérol 15ml K₂HPO₄ 1.5g MgSO₄ 15g Eau Distillé 1000ml PH=7.2 avec autoclavage a 120°C pendant 20 min.</p>	<p>PVK (Pikovskaya) (Phosphatases) Glucose 10g Ca₃(PO₄) 2.5g KCl .0,2g MgSO₄.7H₂O 0,1g NaCl 0,2g (NH₄)₂SO₄ 0,5g FeSo₄.7H₂O 0,02g MnSO₄.2H₂O 0,002g Agar 20g pH: 7</p>
<p>Gélose nutritive : Glucose 28g Agar 14g Eau distillée 1000g</p>	<p>Gélose Luria-Bertani (LB) Tryptone 10g Extrait de levure 5g Chlorure de Sodium 5g Agar 15g Eau distillée 1000 ml</p>
<p>Milieu Lipase : Peptone Bactériologique 10g Chlorure de Sodium 5g Chlorure de Calcium 0.1g Tween 80 10 gouttes Agar 25g</p>	<p>Milieu PDA Pomme de terre 200g Dextrose 20g Eau distillée 1000ml</p>
<p>Pour caséinase : Gélose nutritive additionnée de 5% de lait crémé</p>	<p>Milieu pour acide indole acétique Gélose Luria Bertani additionnée de 5 mM de L- tryptophanne, 0.06% de SDS, et 1% de glycérol</p>
<p>Eau Physiologique Sodium chloride 9g Eau distillée 1000ml</p>	

Annexe

Annexe: Matériel et verreries utilisé au cours de l'experimentation:

Verreries et instruments	Appareillages
-Boites de pétri en plastique -Tubes à essai stériles -Pipettes graduées -Béchers -ErlensMeyer de 100 ml -Flacons stériles -Spatule -Anse de platine -Lames et lamelles -Pince en bois -Portoir	-Bec Bunsen -étuve -Balance de precision -Vortex -Plaque chauffante -Réfrigérateur -Incubateur-agitateur -Bain-Marie -Microscope Optique

Réactifs utilisés en expérimentation

- ✓ **Réactif de Salkowski:**
2% de FeCl_3 a 0.5 M dans 35% d'acideperchlorique
- ✓ **Solution de Picrate Alcaline :**
2,3 g d'acide picrique dans 100mL de NaOH

Références Bibliographiques

- Achouak, W., Sutra, L., 2000.** *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.* 50: 9-18.
- Ahemad, M., Kibret, M., 2014.** Mechanisms and applications of plant growth. *Biotech. Adv* 16:729-770.
- Alexandre, H., 1977.** (Dijon, France) *Le vin: un monde d'interactions multiples*. Dept. of Microbiology and Immunology, Dartmouth Medical School, 208 Vail Building, Hanover, NH 03755, USA.
- Amer G.A., Utkhede R.S. 2000.** Development of formulation of biological agents for the management of root rot lettuce and cucumber. *Can. J. Microbiol.* 46 (9): 809–816.
- Andrews, R. E., Jr., M. M. Bibilos, et al. (1985).** "Protease activation of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*." *Applied and environmental microbiology* 50(4): 737-742.
- Baker KF, Cook RJ (1988)** Biological control of plant pathogens. A Phytopathol Soc, St Paul, MN, 433 p
- Bale, J.S., van Lenteren, J.C. et Bigler, F. (2008).** Biological control and sustainable food Production. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363: 761-776.
- Beguin, P., et Aubert, J.P., 1994.** The Biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiological Reviews* 13, 25-28.
- Benhamou, N., Garand, C., Goulet, A. 2002.** Ability of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Strain Fo 47 to induce resistance against *Pythium ultimum* Infection in cucumber *Applied and environmental Microbiology*, 68(8), p. 4044-4060.
- Bergey, D.P., 2001.** *Bergey's Taxonomic Outline. Bergey's Manual of systematic bacteriology, second edition.* http://141.150.157/bergey_soutline/tankyout.htm. Biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:537-547. Biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds
- Bond, R. P., C. B. Boyce, et al. (1969).** "A purification and some properties of an insecticidal exotoxin from *Bacillus thuringiensis* Berliner." *The Biochemical journal* 114(3): 477-488.
- Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L., 2000.** The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie* .20: 51-63.
- Brar, S. K., M. Verma, et al. (2007).** "*Bacillus thuringiensis* proteases: Production and role in growth, sporulation and synergism." *Process Biochemistry* 42(5): 773-790.

Références Bibliographiques

- Bravo,A.,Likitvivatanavog,S.,Gill,S.S.,et Soberon,M.,2011.**Bacillus thuringiensis :A story of successful bioinsecticide.,*Insect biochemistry and molecular biology* 41:423-431.
- Brossard et Terry.,1984.**Bactériologie systématique.Ed.C.R.D.P.Lyon.P:220.
- Brunet,J.F.2009.**Role des facteurs physico-chimiques du microenvironnement intestinal et des boucles inter-hélicales du domaine I dans l'activité de la toxine insecticide Cry 9 Ca du Bacille de Thuringe.,Thèse de Doctorat, Université de Montréal.1-5 pp.
- Burkhead, K.D., Schisler, D.A. et Slininger, P.J. (1994).** Pyrrolnitrin production by Butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain
- Buyer, J. S. and Leong, J., 1986.** Iron transport-mediated antagonism between plant growth-promoting and plant-deleterious *Pseudomonas* strains. *J. Biol. Chem.* 261:791-794.
- Camille,D.,2007.**Microbiologie Pratique pour les laboratoires d'analyse ou de contrôle sanitaire.
- Chaabouni,I.,Guesmi,A.,Cherif,A.2012.**Secondary metabolites of *Bacillus* :Potentials in Biotechnology.Springer Science (ed).347-360 .
- Chehimi, S., F. Delalande, et al. (2007).** "Purification and partial amino acid sequence of thuricin S, a new anti-*Listeria* bacteriocin from *Bacillus thuringiensis*." *Canadian journal of microbiology* 53(2): 284-290.
- Chen C., Belanger R.R., Benhamou N., Paullitz T.C. 2000.** De-fense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant-growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56 (1): 13–23.
- Chérif , M., Sadfi, N., Benhamou, N., Boudabous, A., Hajlaoui, M.R., Tirilly, I.2002.** Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction of the antagonistic bacteria *Bacillus cereus* X16 and *Bacillus thuringiensis* 55T with *Fusarium roseum* var. *sambucinum* in vitro. *J. Plant Pathol.*, (In press).
- Cherif,A.,Ouzari,H.,Daffonchio,D.2002.**Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG 1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in applied microbiology.*32(4):243-247.
- Chin-A-Woeng, T.F.C., Thomas-Oates, J. E., Lugtenberg, B. J.J. and Bloemberg, G.V., 2001.** Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phénazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. Strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:1006-1015.
- Collins D.P., Jacobsen B. 2003.** Optimizing a *Bacillus subtilis* iso-late for biological control of sugar beet *Cercospora* leaf spot. *Biol. Cont. J.* 26 (2): 153–161

Références Bibliographiques

commons.wikimedia.org

Cook, R. et Baker, K. (1974). Biological control of plant pathogens. Freeman, San Francisco, CA, USA. 380 pages.

Cook, R.J., Rovira, A.D. 1976. The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive Soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 8, pp.269-274.

CRICKMORE N., ZEIGLER D.R., FEITELSON J., SCHEPF E., VAN J., LERECLUS D., BAUM J. & DEAN D. H., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 807-813.

Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M. and Zeigler, D.R. "Bacillus thuringiensis toxin nomenclature" (2014)
<http://www.btnomenclature.info/>

De Boer, M., Van Der Sluis, I., Van toon, L. C., Bakker, P.A.H.M 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. Strains to enhance suppression of *Fusarium* wilt of radish European *Journal of plant pathology*, 105, pp. 201-210.

de la Vega, L. M., J. E. Barboza-Corona, et al. (2006). "Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi." *Canadian journal of microbiology* 52(7): 651-657

De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., et Whitman, W.B., 2009. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, 2nd ed., The firmicute. Springer, New York. Volume 3. 63-67.

De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., et Whitman, W.B., 2009. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, 2nd ed., The firmicute. Springer, New York. Volume 3. 63-67.

Doss, V.A., 2010. Binding affinity and larvicidal activity of a novel vegetative insecticidal protein Vip3V. *PSG College of arts and science*. 61(3):176-83.

Espinasse, S., Gohar, M., Lereclus, D., Sanchis, V. 2002. An ABC Transporter from *Bacillus thuringiensis* Is Essential for β -Exotoxin I Production. *J Bacteriol.* 184(21):5848-5854.

Espinasse, S., Gohar, M., Lereclus, D., Sanchis, V. 2004. An extracytoplasmic-Function Sigma Factor is involved in a pathway Controlling β -Exotoxin I Production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* Strain 407-1. *J Bacteriol.* 186(10):3108-3116.

Estruch, J. J., G. W. Warren, et al. (1996). "Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal prote in with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects."

Références Bibliographiques

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93(11): 5389-5394. Et Pierson, E.A. (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soil bome

Et Pierson, E.A. (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soil bome

Favret, M. E. and A. A. Y ousten (1989). "Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*." Journal of Invertebrate Pathology 53(2): 206-216.

Fenghour, H., Ladjama, A., et Taibi, Z., 2002. Recherche de l'activité pectinolytique chez 22 souches de champignons microscopiques isolées d'un sol de la région d'el Kala département de Biochimie, institut des sciences de la nature, université Badji_Mokhtar_(23000). Annaba_Algérie. p44-47.

Fernandes-Salomão TM, Amorim ACR, Chaves-Alves VM, Coelho JLC, Silva DO, Araújo EF. (1996). Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. Revista de Microbiol. (27) : 15–18. fluorescens CHAO: importance of the secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. 2545-2554.

Fernando, W., Nakkeeran, S. et Zhang, Y. (2006). Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. Dans: PGPR: Biocontrol and Biofertilization (Siddiqui, Z. A.), Springer, Dordrecht, the Netherlands. Pp. 67-109. fluorescens CHAO: importance of the secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol.

Fridlender, M., Inbar, J. and Chet. I., 1993. Biological control of soil-borne plant pathogens by a β-1,3-glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. Soil Biol. Biochem. 25:1211–1221.

Gamard, P., Sauriol, F., Benhamou, N., Bélanger, R.R. et Paulitz, T.C. (1997). Novel: butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28. Journal of Antibiotics 50:742-749.

Gerard, J., Tortora Berdell, R., Funke Christine, L Case., et Martin, L. 2003. introduction a la microbiologie. ERPI. QUEBEC. 945p. GERICO du 06 au 10 Décembre 2004. (CD-R).

Glare, T. R, O'Callaghan, M. (2000) *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and Safety Chichester; New York: John Wiley, U.S.A., pp. 2-80.

Glick, B.R., Jacobson, C.B., Schwarza, M.M.K., et Pasternak, J.J., 1995. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. Can. J. Microbiol. 40:911-915.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, K.V., Chauhan, B., 2003. microbial alpha-amylase : a biotechnological perspective. Process. Biochem. 38: 1599-1616.

Haas, D. et Defago, G. (1992). Suppression of root diseases by *Pseudomonas*

Références Bibliographiques

- Haas, D. and Keel, C., 2003.** Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. And relevance for biological control of plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 41:117-153.
- Helassa,N.2008.**Devenir de la protéine insecticide Cry 1 Aa issue de *Bacillus thuringiensis (Bt)* dans le sol. Thèse de Doctorat,Ecole doctorale :centre international d'études superieures en sciences agronomiques.7-14 pp.
- HÔFTE H. & WHITELEY H.R., 1989.** Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological. Review*, 53,242-252.
- Howell, CR .et Stipanovic, R.D. (1979).** Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings
- Howie,W.J.,et Suslow,T.V.,1991.**Role of antibiotic biosynthetis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *pseudomonas fluorescens*.*Mol.Plant.Microb.Inter.*4:393-399.
- <http://www.new.gov.qc.ca/pesticides/virus/nil/bit/chap3.htm>
- Huber, M., E. Cabib, et al. (1991).** "Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(7): 2807-2810.
- Ibrahim, M. A., N. Griko, et al. (2010).** *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective." *Bioengineered bugs* 1(1): 31-50.
- Ivinskene,V.L.,Fluer,F.S,Vasiliauskas,I.F.2012.**Production of lecithinase by *Bacillus thuringiensis*.*Appl Microbiol Biotechnol.*95(3):593-600.
- Jacques,M.A.,1994.**Ecologie quantitative et physiologie de la communauté bactérienne épiphyllle de *Cichorium endivia* var.*latifolia* L.Thèse de doctorat, Université de Paris.
- James, D. W. and Gutterson, N. I., 1986.** Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Appl .Environ. Microbial.* 52: 1183-1198.
- Jataraf J., Radhakrim N.V., Hannk P., Sakoof R. 2005.** Biocontrol of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol* 15: 55–65.
- Joffin,J.N.,Leyral,G.,2006.**Microbiologie technique_TI-Dictionnaire des techniques.4eme edition.Bordeaux:CRDP d'aquitaine.P368.
- Jorjani M., Heydari A., Zamanizadeh H.R., Rezaee S., Naraghi L. 2011.** Controlling sugar beet mortality disease by ap-plication of new bioformulations. *J. Plant Prot. Res.* 52 (3): 303–307.
- Kaldewey H., (1984).** Transport and other modes of movements of hormones (mainly auxins). In *Encyclopedia of plant physiology, New series, Vol 10, Hormonal Regulation of*

Références Bibliographiques

Development II (T.K.Scott, ed.), pp. 80-148. Springer- Verlag, Berlin.

Kanchana,D.,jayanthi,M.,Usharani,G.,Saranraj,P.,Sujitha,D.,2013 a.Prevalence of *Azotobacter* sp.In chilli (*Capsicum annuum* L.).*Int.J.Microbiol.Res.*4(3):300-304.Keel, C , Schnider, U., Maurhofer, M., Voissard, C , Laville, J., Burger, P., Wirthner.

Keel,C.U.,Schinder,M.,Maurhofer,C.,Voissard,J.,Laville,P.,Burger,P.,Wirthner,Haas,D.,et Défago,G.,1992. Supression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol.*Mol.Plant.Microbe.Interact.*5:4-13.

Kim,D., Larsen,R., Pogliano, K., et Glogowski,M.,2009.A microbial biofilm, the genus *Pseudomonas fluorescens*. Microbiologie resource. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire.

Kloepper, J.W., 1983. Effect of seed piece inoculation with plant growthpromoting rhizobacteria on populations of *Erwinia carotovora* on potato roots and daughter tubers. *Phytopathol.* 73: 217-219.

Kloepper,J.W.,1993.Plant Growth Promoting rhizobacteria as biological control agents,In:*Soil Microbial Ecology*.Ed.F.B.Jr.,Metting.Marcel Dekker inc.,N.Y.p.225-273.

Kloepper,J.W.,Beauchamp.,1992.proposed definition related to induced disease resistance. *Biocontrol science technology* 2:349-351.

Kloepper,J.W.,Loeng,J.,Teintze,M.,et Schroth.,M.N.,1980.*Pseudomonas siderophore* s:a mechanism explaining disease suppressive soils.*Curr.Microbiol.*4:317-320.

Kwang-Bo, J.,M,Sc.,Jean-Charles Coté.,2000. Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*.*Bulletin technique.*29 :2-14.

Lacoursière, J.O. et J. Boisvert (1994). Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec, Laboratoire de recherches sur les arthropodes piqueurs, Université du Québec à Trois-Rivières.

Lacousière J.O et Boisvert J.,2004. Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec.thèse de Doctorat, Université du Québec a trois-rivières,Canada.14-21 pp.

Larkin, R.P., Fravel, D.R.1998.Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Dis.*, 82, pp. 1022-1028.

Lemanceau,P.,1992.Beneficial effects of rhizobacteria on plants:exemple of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Agronomie.*12:413-437.

Références Bibliographiques

- Levinson, B. L., K. J. Kasyan, et al. (1990).** "Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography." *Journal of Bacteriology* 172(6):3172-3179.
- Ligon, J.M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N.R., Hofmann, D. et Kempf, H.J., 2000.** Natural Products with antifungal activity from *Pseudomonas*. *Biocontrol bacteria. pest Manag. Sci.* 56.688-695
- Loper, J. E. and Gross, A. H., 2007.** Genomic analysis of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Eur. J. Plant Pathol.* 119:265–278.
- Loper, J.E. and Schroth, M.N., 1981.** Factors affecting antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathol.* 70: 871-891.
- Lugtenberg, B., et Kamilova, F., 2009.** Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:541-5.
- Lynch, J.M., 1990.** The rhizosphere. Lynch J.M. Ed. John Wiley et Sons Ltd, Chichester.
- Manjula K., Krishna G.K., Podile A.R. 2004.** Whole cell of *Bacillus subtilis* AF1 proved more effective than cell-free and chitin-ase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust. *Can. J. Microbiol.* 50 (9): 737–744
- Matsubara, T. and Zumft. W. G., 1982.** Identification of a copper protein as part of the nitrous oxide-reducing system in nitrite-respiring (denitrifying) *Pseudomonas*. *Arch Microbiol.* 132: 322-328.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J.P. and Défago, G., 1994.** Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathol.* 84: 139-146.
- Meena, B(2001).**, Radhajeyalakshmi, R., Marimuthu, T., Vidhyasekaran, P., Sabitha Doraiswamy and Velazhahan,. Induction of pathogenesis related proteins, phenolics and phenylalanine ammonia lyase in groundnut by *Pseudomonas fluorescens*.
- Meyer, J.J., Staley, J.T., et Lorey, 2004.** Cour de questions revision. PCEM. PCEP. 2 ème cycle master. Ed. Dunod. Paris. PP.480-481. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5:4-13.
- Montesinos, E., Bonaterra, A. et Moselio, S. (2009).** Pesticides, Microbial. Dans: *Encyclopedia of Microbiology* (Moselio, S.), Academic Press, Oxford, UK. Pp. 110-120.
- Naik, P.R., et Sakthivel, N., 2006.** Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. Strain PUP6 with plant-growth-promoting traits and antifungal potential. *Res. Microbiol.* 157:538-546.

Références Bibliographiques

- Neilands, J.B., 1995.** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Bio. Chem.* 270: 26723-26726. Of potatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2031-2039. Of potatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 60:2031-2039.
- Palleroni, N. J., 1984.** Genus *Pseudomonas* Migula 1894. In : Krieg, N.R., Holt, J.G.(Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. I. Williams and Wilkins Co, Baltimore, USA, pp.141-171.
- Palleroni, N. J., 2010.** The *Pseudomonas* Story. *Environ. Microbiol.* 12(6): 1377-1383. Paulsen, I.T., Press, C.M. Ravel, J., Kobayashi, D.Y., Myers, G.S.A., Marvodi, D.V., Deboy, R.T., Sehadri, R., Ren, Q., Madupu, R., et al., 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23: 873-878.
- Perry, J.J., Staley, J.T., et Lory, S., 2004.** Cours et questions de révisions. PCEM. PCEP. 1^{er} cycle/licence 2eme cycle/master. Dunod. Ed. Paris. pp :480-481.
- Pervot A.R., (1961)**-Traité de systématique bactérienne. Ed. Dunod. T1, 471p. phénazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 5:330-339. *Phytopathology* 69:480-482.
- Pierson E.A., Weller D.M. 1994.** Use of mixture of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat.
- Pierson, L.S. et Thomashow, L.S. (1992).** Cloning and heterologous expression of the *Phytopathology* 84: 940-947
- Pinky P (2012).** In vitro Cellulose Rich Organic Material Degradation by Cellulolytic *Streptomyces albospinus* (MTCC 8768). *Mal. J. Microbiol.* Vol 8(3) 2012, pp. 164-169.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., et Klein D.A., 2003.** *Microbiologie*. Ed. De boeck. Bruxelles. 1137p.
- Prevot, A.P., 1977.** *Bactériologies, notions élémentaire*. Ed. Presses universitaires de France. P 218 *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 57:2928-2934.
- Raaijmakers, J., Vlami, M. et de Souza, J. (2002).** Antibiotic production by bacterial
- Raaijmakers, J.M. et Weller, D.M. (2001).** Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp.: characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8rl-96. *Applied and Environmental Microbiology* 67:
- Ronald K.S., Harold S.L. (1970).** Methods for the isolation of proteolytic marine bacteria. *Appl. Microbiol.* 20: 991-992. In: Shivanand P., Jayaraman G. (2009). Production of

Références Bibliographiques

extracellular protease from halotolerant bacterium *Bacillus aquimaris* VITP4 isolated from Kumta coast. *Process Biochem.* 44: 1088–1094.

Sampson, M. N. and G. W. Gooday (1998). "Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects." *Microbiology* 144 (pt 8): 2189-2194.

Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R. M., Capell, T., Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*. 9:283-300.

Sansinenea, E et Ortiz, A. 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus spp.* *Biotechnol Lett* 33 :1523-1538.

Schnepf, E., N. Crickmore, et al. (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins." *Microbiology and molecular biology reviews*: MMBR 62(3): 775-806.

Schroth, M. N. et Hancock, J. G., 1981. Selected topics in biological control. *Annu. Rev. Microbiol.* 35:453-476.

Sierra G (1957). a simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *J. Microbial Seriol.*, 23: 15-22.

Silo-Suh, L. A, E. V. Stabb, et al. (1998). "Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*." *Current microbiology* 37(1): 6-11.

Silva, H. S. A., Romeiro, R. S., Carrer-Filho, R., Pereira, J. L. A., Mizubuti, E. S. G., Munteer, A. 2004. Introduction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. *Journal of phytopathology*, 152, pp.371-375.

Singleton, P., 2005. *Bactériologie pour la médecine. La biologie et la Biotechnologie.* Ed. Dunod. Paris. 541 p.

Soberon, M., 1. A. Lopez-Diaz, et al. (2013). "Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: a protein fold conserved in several pathogenic microorganisms." *Peptides* 41 : 87-93. Suppressive to take-all. *Phytopathology* 73:1548-1553.

Thakore, Y. (2006). The biopesticide market for global agricultural use. *Industrial Biotechnology* 2:194-208.

Thaphan, P., Keawsompong, S., Chanpaisaeng, J. 2007. L'isolement, la toxicité et la détection du gène cry dans *Bacillus thuringiensis* isolats dans la province de Krabi, Thaïlande. thèse de Docteur de l'université Pierre et Marie Curie.

THOMAS W. E. & ELLAR D. J., 1983. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israeliensis* insecticidal delta-endotoxin. *FEBS Letters*, 154, 362-368.

Références Bibliographiques

- Thomashow L.S., Weller D.M. 1990.** Role of antibiotics and siderophores in biocontrol of take-all disease of Nader Hassan- zadeh, wheat. *Plant Soil* 129: 93–99.
- URAICHUEN S., 2002.** Etude comparative de la toxicité et des sites récepteurs des delta endotoxines de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sur deux ravageurs du cotonnier : *Helicoverpa armigera* (Hübner) et *Heliothis virescens* (Fabricius) : relation avec la résistance. Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 149 p.
- VASSAL J.M., 2004.** *Bacillus thuringiensis*: mode d'action et résistance. Atelier Projet
- Verma,M.,Satinder,K.,Brar,R.D.,Tyagi,R.Y.,Surampalli,J.,et Valero,R.,2007.** Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp :Panoply of Biological control. *Biochem. Eng.J.* 37:1-20. Vincent, M.N., Harrison, L.A., Brackin, J.M., Kovacevich, P.A., Mukerji, P., Weller, D.M.
- Viswanathan, R. and Samiyappan, R., 2001.** Antifungal activity of chitinases produced by some fluorescent pseudomonads against *Colletotrichum falcatum* Went. Causing red rot disease in sugarcane. *Microbiol. Res.* 155: 309– 314.
- Weller D.M. 1988.** Biological control of soil-born plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26: 379–407.
- Weller, D.M. and Cook, R. J., 1983.** Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent *Pseudomonas*. *Phytopathology*, 73:463-469.
- Whipps,J.M.,2001.** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J.Exp.Bot.*52:487-511.
- Widden, P. (1994).** Competition and the fungal community. Dans: *The mycota IV. Environmental and Microbiological* (Esser, K, Wicklow, D.T., Svderstrvm, B.E.). Springer-Verlag, Berlin, Allemagne. Pp. 135-147.
- Winkelmann, G., 2002.** Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 691-696.
- World Health Organization (1999)** "Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*" Geneva, Environment health criteria 217, pp. 6-69.
- Xiao,L.,Liu,C.,Xie,C.,Cai,J.,Liu,D.,Chen,Y.2002.** heterogeneous expression of chitinase gene from *Bacillus licheniformis* MY75 and the characterization of expressed ChiMY. *Otein Expr Purif.*26 (1):82-8.
- YOUNG J.M., CHILCOTT C.N., BROADWELL A., WIGLEY P.J. & LECADET M.M., 1998.** Identification of serovars of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1915 in New Zeland. *New Zeland Journal of crop and Horticultural Science*, 26,63-68.

Références Bibliographiques

Yu, C. G., M. A. Mullins, et al. (1997). "*The Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A lyses midgut epithelium cells of susceptible insects." *Applied and environmental microbiology* 63(2): 532-536.

Huber, M., E. Cabib, et al. (1991). "Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88(7): 2807-2810.

Sampson, M. N. and G. W. Gooday (1998). "Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects." *Microbiology* 144 (pt 8): 2189-2194.

de la Vega, L. M., J. E. Barboza-Corona, et al. (2006). "Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi." *Canadian journal of microbiology* 52(7): 651-657.

Résumé

La lutte Biologique utilise des organismes vivants dans le but de limiter la pullulation et/ou la nocivité de diverse ennemis de culture et se base sur la régulation préventive et durable d'importants ravageurs par leurs ennemis naturels et ceci en ayant recours a des rhizobactéries à savoir les *Pseudomonas spp* fluorescent et *Bacillus sp* qui sont considérés comme étant le groupe de rhizobactéries le plus fréquemment identifiées et utilisable dans le domaine de la lutte biologique.

L'objectif de notre travail consiste a déterminer les éléments sur lesquelles se base cette interaction entre bactéries antagonistes et bioagresseurs des culture tels que les métabolites secondaires produits par *Pseudomonas sp* fluorescents et *Bacillus sp*.

Des tests préliminaires macroscopiques et microscopiques, ont permis de sélectionner des souches pour chaque genre qui ont subis différentes techniques de caractérisation physiologique et biochimique. Ces bactéries ont montré leur aptitudes à produire des métabolites secondaires tels que les enzymes (Lipases, chitinases, cellulases...) Quant aux tests d'antagonismes, ils ont montré des résultats très satisfaisant.

Mots-clés : la lutte biologique, *Pseudomonas spp*.fluorescent,*Bacillus sp*,Antagonisme, enzymes,AIA,métabolites secondaires, rhizosphère,

Abstract

The biological control use alive organism with the aim of limiting the multitude and/or the harmfulness of multiple enemies of culture and bases itself on the preventive and long-lasting regulation of important devastating by their natural enemies and this by resorting has rhizobactéries to know fluorescent *Pseudomonas spp* and *Bacillus sp* who are considered as being the group of rhizobactéries most frequently identified and usable in the field of the biological fight (wrestling).

The objective of our work consists has to determine the elements on whom(which) bases itself this interaction between opposing(conflicting) bacteria and bioagresseurs culture such as the secondary métabolites produced by fluorescent *Pseudomonas sp* and *Bacillus sp*.

Macroscopic and microscopic (tiny) preliminary tests, allowed selecting origins (stumps) for every kind (genre) which underwent various techniques of physiological and biochemical characterization. These bacteria showed them capacities to produce secondary métabolites

Such as enzymes (Lipases, chitinases, cellulases) as for the tests of antagonisms, they showed results (profits) very satisfactory.

ملخص

المكافحة البيولوجية تستخدم الكائنات الحية من أجل الحد من انتشار و/أو أضرار متنوعة من الأعداء في الزراعة و تقوم على تنظيم الوقائية المستدامة للآفات الهامة من قبل الأعداء الطبيعية ، و هذا عن طريق اللجوء إلى بكتريا الجذور و هي بسودوموناس الفلورسنت و باسيلوس التي تعتبر مجموعة بكتريا الجذور التي يتم في معظم الأحيان تحديدها و ا تستخدمها في مجال مكافحة البيولوجية. والهدف من عملنا هو تحديد العناصر التي تركز على التفاعل بين معادية البكتيريا و مهاجم عضوي مثل المركبات الثانوية التي تنتجها بسودوموناس الفلورسنت و باسيلوس .

لاختبارات الأولية العيانية والمجهريّة ، قد أسفرت عن اختيار سلالات لكل من الجنسين الذين خضعوا تقنيات مختلفة من توصيف الفسيولوجية والبيوكيميائية . هذه البكتيريا قد أظهرت قدرتها على إنتاج المركبات الثانوية مثل الإنزيمات (الليباز، الكيتيناز، السليلوزات...)، فيما يخص نشاطها المضاد فقد أظهرت النتائج مرضية جدا.